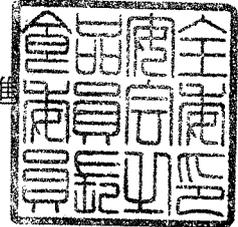




府 食 第 9 7 号
平成 2 6 年 1 月 2 7 日

厚生労働大臣
田村 憲久 殿

食品安全委員会
委員長 熊谷 進



食品健康影響評価の結果の通知について

平成 2 4 年 9 月 2 6 日 付け 厚生労働省 発 食 安 0 9 2 6 第 2 号 を も っ て 貴 省 か ら 当 委 員 会 に 意 見 を 求 め ら れ た *Aspergillus niger* ASP-72 株 を 用 い 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 の 結 果 は 下 記 の と お り で す の で 、 食 品 安 全 基 本 法 (平 成 1 5 年 法 律 第 4 8 号) 第 2 3 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 。

ま た 、 本 件 に 関 し て 行 っ た 国 民 か ら の 意 見 ・ 情 報 の 募 集 に お い て 、 貴 省 に 関 す る 意 見 ・ 情 報 が 別 添 の と お り 寄 せ ら れ ま し た の で お 伝 え し ま す 。

記

Aspergillus niger ASP-72 株 を 用 い て 生 産 さ れ た ア ス パ ラ ギ ナ ー ゼ が 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 、 一 日 摂 取 許 容 量 を 特 定 す る 必 要 は な い 。

添加物評価書

Aspergillus niger ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ

2014年1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
○食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿	4
○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	6
(3) 成分	7
(4) 性状等	8
(5) 使用方法	8
4. 評価要請等の経緯	8
5. 添加物指定の概要	9
II. 一日摂取量の推計等	10
1. 欧州における摂取量	10
2. 我が国における摂取量	10
III. 安全性に係る知見の概要	10
1. 生産菌株の安全性	10
(1) 非病原性の確認	10
(2) 非毒素産生性の確認	11
(3) その他	12
2. 本品目の安全性	12
(1) 体内動態（消化管内での分解性等）	12
(2) 毒性	14
IV. 国際機関等における評価	19
1. JECFA における評価	19
2. 米国における評価	19
3. 欧州における評価	19
4. その他の国における評価	19

5. 我が国における評価等	19
V. 食品健康影響評価	20
別紙1：略称	21
別紙2：各種毒性試験等成績	22
別紙3：本品目の推定一日摂取量（使用食品（群）摂取量ベース）	24
参照	25

<審議の経緯>

- 2012年 9月 27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ついて要請（厚生労働省発食安 0926 第 2号）、関係書類の接受
- 2012年 10月 1日 第 448 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2013年 2月 22日 第 115 回添加物専門調査会
- 2013年 3月 14日 補足資料の提出依頼
- 2013年 9月 20日 補足資料の接受
- 2013年 9月 24日 第 122 回添加物専門調査会
- 2013年 10月 21日 第 491 回食品安全委員会（報告）
- 2013年 10月 22日から 11月 20日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2014年 1月 22日 添加物専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
- 2014年 1月 27日 第 501 回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

（2012年 7月 1日から）

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

<食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

(2013年9月30日まで)

今井田 克己 (座長)
梅村 隆志 (座長代理)
石井 邦雄
石塚 真由美
伊藤 清美
江馬 眞
久保田 紀久枝
高橋 智
塚本 徹哉
頭金 正博
中江 大
森田 明美
山田 雅巳

(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
手島 玲子
戸塚 ゆ加里
北條 仁

要 約

酵素として使用される添加物「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」(EC 番号：3.5.1.1、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)) (以下「本品目」という。)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。

評価に用いた試験成績は、*A. niger* ASP-72 株の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに本品目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。

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「添加物に関する食品健康影響評価指針」(平成 22 年 5 月 27 日食品安全委員会決定)の第 2 章第 6 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 mgTOS/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。

I. 評価対象品目の概要

1. 用途

加工助剤（参照 1）

2. 名称等

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

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

EC⁽¹⁾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）

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）

（参照 1、2）

3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法

（1）基原

今般、厚生労働省に添加物「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」（以下「本品目」という。）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を要請した者（以下「指定等要請者」という。）によれば、本品目の生産菌株の宿主である *A. niger* は、一般環境中に見出される糸状菌であり、食品の加工等に用いられる酵素や、クエン酸等の有機酸の生産に使用されてきた歴史を有するとされている。（参照 2、3）

指定等要請者によれば、本品目の生産菌株 *A. niger* ASP-72 株は、*A. niger* が本来有してい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ものであり、組換え DNA 技術を応用して得られた微生物であるが、*A. niger* 宿主株自身及び *A. niger* 遺伝子供与体に由来する DNA 以外の DNA 配列は存在しないものとされている。（参照 2）

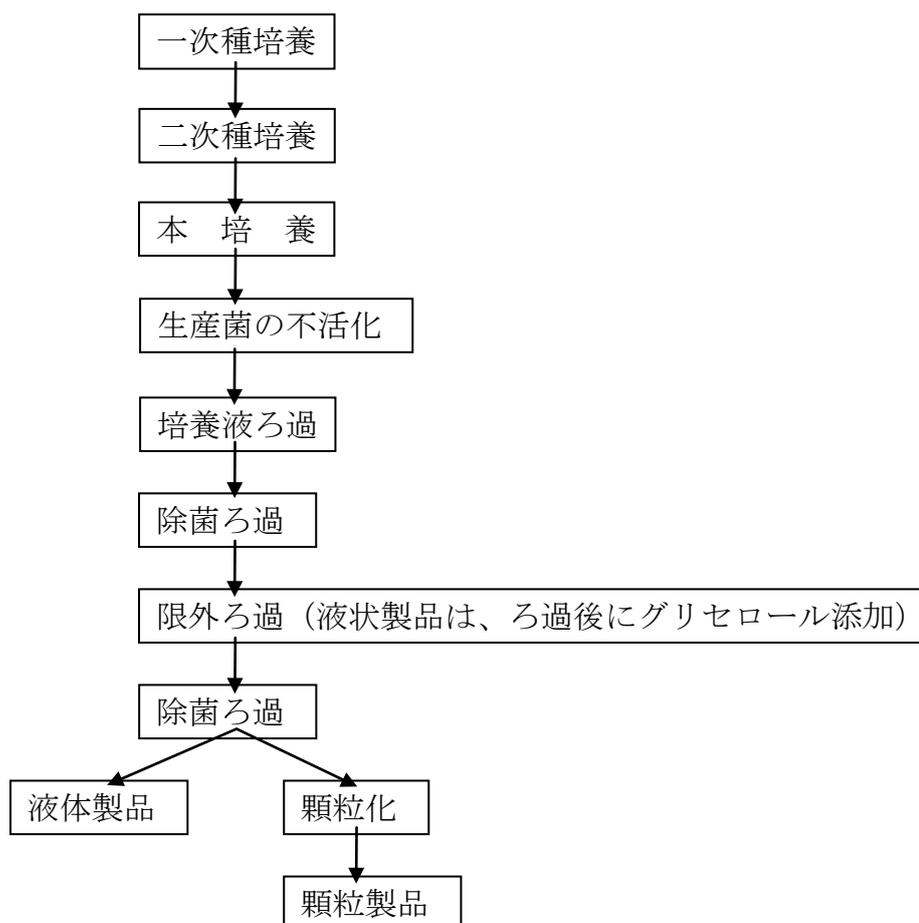
（2）製造方法

指定等要請者によれば、本品目の製造方法の概略は図 1 のとおりとされている。この製造方法における「除菌ろ過」の過程において、生産菌及び菌体断片が本品目から完全に分離されるとされている。本品目には液体製品及び顆粒製品の 2 種類があり、いずれも酵素活性はそれぞれ 2,500 ASPU⁽²⁾/mL 及び 2,500 ASPU/g に調整されるとされている。（参照 2）

¹ 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。

² 指定等要請者によれば、L-アスパラギンを基質とし、pH5.0、37℃の条件下で本品目を作用させ、生成したアンモニアをフェノールニトロプルシド等と反応させる方法により測定したとき、1 分間にアンモニア 1 μmol に相当する吸光度（波長 600 nm）の増加を与える酵素量が 1 ASPU であるとされている。

図1 本品目の製造方法の概略（参照2）



(3) 成分

指定等要請者によれば、本品目の有効成分は、生産菌株により菌体外に産生される378アミノ酸からなる単量体のたん白質であり、その一次配列は図2のとおりであるとされている。分子量は、アミノ酸組成からの計算では39,584 Da、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) による測定では40~42 kDaであるとされている。等電点は、アミノ酸組成からの計算では4.48、実測値は3.6とされている。指定等要請者は、これらの理論値と実測値との違いについて、本品目が7箇所の糖鎖部位を有するため、糖鎖の結合の程度により生じるもの又は末端のアミノ酸が欠損することにより生じるものであるとしている。至適pHは4~5、至適温度は50℃とされている。本品目中の製剤中の総有機固形分 (TOS) の含有率は、6~10%に調整されるとされている。(参照2)

図2 有効成分のアミノ酸一次配列（参照2）

MPLKPILLSALASLASASPLLYSRTTNETFVFTNANGLNF	40
TQMNTTLPNVTFATGGTIAGSDSSSTATGTYTSGAVGVL	80
SLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEDTSDILISMSKKL	120
NRVVCEDPTMAGAVITHGTDLEETAFFLDATVNCGKPIV	160
IVGAMRPSTAISADGPFNLLEAVTVAASTSARDRGAMVVM	200
NDRIASAYYVTKTNANTMDTFKAMEMGYLGEMISNTPFFF	240
YPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNA	280
ISSGAQGIVIAGAGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQS	320
MRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQKSRILLGLLLS	360
QGKNITEIADV FALGTDA	378

指定等要請者によれば、本品目は、1 g 又は 1 mL 当たり 2,375 ASPU 以上の酵素活性（アスパラギナーゼ活性）を有するとされている。（参照2）

（4）性状等

指定等要請者によれば、本品目は、「ごくうすい灰み若しくはごくうすい黄みを帯びた灰色の顆粒又は黄～褐色の透明な液体」とされている。（参照2）

（5）使用方法

指定等要請者によれば、本品目は、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酸及びアンモニアに加水分解する作用を有し、食品加工の際に本品目を添加することにより、食品の味や色等に影響を与えずにアクリルアミド生成を低減させるとされている。また、アスパラギンをアスパラギン酸及びアンモニアに加水分解する以外の副反応はないとされている。（参照2）

4. 評価要請等の経緯

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進展の結果、食品中のアスパラギンが、ブドウ糖、果糖等の還元糖と高温で反応してアクリルアミドへ変化することが明らかにされている。国際癌研究機関（IARC）は、アクリルアミドについて、発がん性を「2A」（ヒトに対しておそらく発がん性がある。）と分類している。（参照4）

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5）

米国では、指定等要請者が本品目について一般的に安全とみなされる（GRAS）物質としての届出を行ったところ、2007年3月、FDAから当該届出に異論がない旨の回答がなされている。（参照6）

欧州連合（EU）（フランス及びデンマークを除く。）では、加工助剤たる酵素は添加物として規制されていなかったが、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³。（参照7、8、9）

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及び規格基準の設定の要請がなされ、関係資料が取りまとめられたことから、食品安全基本法第24条第1項第1号に基づき、食品安全委員会に対して食品健康影響評価の要請がなされたものである。

なお、2013年9月、食品安全委員会は、本品目における組換えDNA技術に関して、「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、当該基準の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断した旨の食品健康影響評価結果を厚生労働大臣あて通知している。

5. 添加物指定の概要

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、本品目について、添加物としての指定の可否及び規格基準の設定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。（参照1、2）

³ なお、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、それぞれ2007年及び2008年に本品目の使用が許可されている。

II. 一日摂取量の推計等

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、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。

III. 安全性に係る知見の概要

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. niger* であるとされている。（参照 2）

指定等要請者は、本品目の製造工程において、除菌ろ過工程を経ることにより、生産菌及び菌体断片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。（参照 2）

（1）非病原性の確認

Nyiredy ら（1975）の報告によれば、1 日齢のニワトリ（10 羽）に *A. niger* の胞子を大量に経口投与する試験が実施されている。その結果、真菌症は発症せず、投与した *A. niger* の胞子は投与翌日に消化管から検出されなかったとされている。（参照 11）

Schuster ら（2002）の報告によれば、*A. niger* は自然界に広く存在しており、一般的に非病原性と考えられ、ヒトは日常的に *A. niger* の胞子の暴露を受けているが、それにより感染症に罹患するということはないとされている。また、ごくまれに *A. niger* がヒト体内で日和見感染により増殖するような場合があるが、そのほぼ全例で、当該患者には重篤な疾病や免疫抑制処置の経

歴があるとされている。また、*A. niger* 感染によるヒトの疾病としては、肺アスペルギルス症、原発性皮膚アスペルギルス症、特に熱帯地域における耳真菌症等について報告がなされているとされている（参照 3）。本委員会としては、上記の症例のほとんどが吸入や経皮といった、経口以外の経路からの暴露によるものであり、薬剤の使用や疾患のために免疫機能が低下していたり、皮膚表面を傷つけたりした症例にみられたものが多く、健常なヒトにとって問題となるようなものではないと判断した。

（2）非毒素産生性の確認

Schuster ら（2002）の報告によれば、*A. niger* については、アフラトキシン類を産生する能力を有していないことが明らかにされており、また、トリコセシン類を産生することを証明する知見は存在しないとされている。また、*A. niger* を利用した酵素生産条件下において、コウジ酸の産生は経験的に認められていないとされている。一方、*A. niger* に属する菌株がオクラトキシン A を産生したとする報告があることから、*A. niger* を生産菌株として食品に使用される酵素を生産するに当たっては、オクラトキシン A の産生の可能性を確認すべきであると指摘されている。（参照 3）

Frisvad ら（2011）の報告によれば、*A. niger* の菌株（180 種類）について液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC/MS/MS）を用いて検査を実施した結果、81%からフモニシン B₂、B₄ 又は B₆ のいずれかが検出されたとされている。（参照 1 2）

指定等要請者は、当該生産菌株 *A. niger* ASP-72 株について、最も二次代謝産物を産生しやすいとされる 3 種類の培地⁴で培養し、毒性のある二次代謝産物に関して HPLC により分析を行ったところ、オクラトキシン及びオクラトキシンに関連する代謝産物を含め、信頼に足るかび毒のデータライブラリに収載されているマイコトキシンが検出されなかったとしている。（参照 1 3）

Pel ら（2007）の報告によれば、*A. niger* ASP-72 株の祖先に当たる *A. niger* CBS 513.88 株にフモニシン類合成遺伝子クラスターが認められたとされている。指定等要請者は、本報告を基に、*A. niger* ASP-72 株にもフモニシン類合成に関わる主要遺伝子群が存在するとしている。（参照 1 4、1 5）

指定等要請者委託試験報告（2013a）によれば、*A. niger* ASP-72 株の培養液（4 検体）についての LC/MS/MS による分析の結果、フモニシン B₂、B₄

⁴ ツァペック酵母エキス寒天培地、麦芽エキス寒天培地及び酵母エキス・スクロース寒天培地とされている。

及び B₆は検出されなかったとされている。(参照 16、17)

また、指定等要請者委託試験報告(2013b)によれば、*A. niger* ASP-72株を用いて生産されたアスパラギナーゼの最終製品(2検体)について、LC/MS/MSによる分析の結果、フモニシン B₁及び B₂⁵⁾は検出されなかったとされている。以上より、指定等要請者は、*A. niger* ASP-72株について、標準的な酵素生産に用いられる培養条件下ではフモニシン類を産生することはないと考察している。(参照15、17、18)

(3) その他

厚生労働省の「既存添加物名簿収載品目リスト」においては、*A. niger*を基原とする添加物として α -アミラーゼ、アントシアナーゼ、イヌリナーゼ、インベルターゼ、カタラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、キシラナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、 β -グルコシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、酸性ホスファターゼ、セルラーゼ、トランスグルコシダーゼ、フィターゼ、プロテアーゼ、ペクチナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ホスホリパーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ及びリパーゼが掲げられていることから、我が国においては、既に *A. niger*を基原とする添加物が食品の加工等に使用されてきているものと考えられる(参照19)。また、米国 FDA は、*A. niger*由来の α -アミラーゼ、セルラーゼ、アミログルコシダーゼ、カタラーゼ、グルコースオキシダーゼ、リパーゼ、ペクチナーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、カルボヒドラーゼ、プロテアーゼ及びカタラーゼについて、非病原性・非毒素産生性の生産菌株を用いて適正使用規範(GMP)の下で生産される限りにおいては GRAS 物質とみなされるとの認識を示している。(参照3、20)

以上より、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。

2. 本品目の安全性

(1) 体内動態(消化管内での分解性等)

本品目の有効成分は、378 アミノ酸からなるたん白質であることが明らかにされており、経口的に摂取された後は消化管内で速やかに分解され、他の食品由来のたん白質の場合と同様に体内へ吸収されると考えられる。このこ

⁵⁾ フモニシン B₁及び B₂のほか、3-AC-デオキシニバレノール、アフラトキシン B₁、B₂、G₁及び G₂、デオキシニバレノール、ジアセトキシスシルペノール、HT-2 トキシン、ニバレノール、オクラトキシン A、ステリグマトシスチン、T-2 トキシン並びにゼアラレノンが確認されており、フモニシン B₁及び B₂の検出限界は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、オクラトキシン A の検出限界は 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であったとされている。

とを明確にするため、「添加物に関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）（以下「指針」という。）の第2章第6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」に該当するか否かについて、以下のとおり整理した。

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解して食品常在成分と同一物質になること。

指定等要請者試験報告（2013）によれば、本品目を95℃で5分間加熱処理したもの及び加熱処理をしていないものについて、人工胃液（pH1.2）に添加し、37℃で0⁶、0.5、2、5、10、20、30又は60分間インキュベートを行った後、SDS-PAGEに供する試験が実施されている。その結果、加熱処理の有無にかかわらず、本品目は0.5分未満で3,500 Da以下の低分子に分解されることが示されたとされている。（参照15、21）

また、指定等要請者によれば、ウェブサーバExPASy⁷において提供されてい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、アスパラギナーゼ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、初回の酵素分解においてオリゴペプチド（30～50アミノ酸を含む。）まで分解されることが示唆され、体内では、このオリゴペプチドはペプチダーゼにより更に分解され、アミノ酸として吸収されて通常の代謝経路をたどると考えられるとされている。（参照2、22、23）

以上より、本委員会としては、本品目について、消化管内で低分子に分解されることが確認され、最終的に食品常在成分であるアミノ酸まで分解されることが考えられることから、①の事項が満たされたと考えた。

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）が明らかであること。

上述（p.13）のとおり、指定等要請者によれば、本品目の有効成分の分解に関わる主要な因子は、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン、ペプチダーゼ等の酵素であるとされており、特に上述の人工胃液を用いた試験成績において、ペプシン（pH1.2）により速やかに3,500 Da以下の低分子に分解されることが示されたとされている。（参照2、15）

⁶ 指定等要請者によれば、予め37℃に温めた人工胃液中に本品目を添加し、混和し、37℃の水浴に浸した後速やかに水浴中から取り出し、反応を停止させたものであるとされている。

⁷ 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、たん白質及びプロテオミクス（網羅的たん白質解析）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。指定等要請者によれば、本品目の豪州・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）における評価の際にも、ExPASyを用いた資料が用いされたとされている。

以上より、本委員会としては、本品目について、②の事項が満たされると考えた。

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。

上述 (p.13) のとおり、指定等要請者によれば、本品目は、消化管内で速やかに分解され、食品常在成分であるアミノ酸として吸収されると考えられることから、糖質、ビタミン、ミネラル等の他の栄養成分の吸収は阻害しないとされている。(参照2、15)

以上より、本委員会としては、本品目について、③の事項が満たされると考えた。

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。

上述 (p.13) のとおり、指定等要請者によれば、本品目は消化管内で速やかに分解されて食品常在成分であるアミノ酸として通常の代謝経路をたどると考えられることから、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すること及び生体内に蓄積することは考え難いとされている。(参照2、15)

以上より、本委員会としては、本品目について、④の事項が満たされると考えた。

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題が起きないこと。

本品目の最大一日摂取量は、上述 (p.10) のとおり0.549 mgTOS/kg体重/日と推定され、これは日本人のたん白質の平均一日摂取量67.8 gの約0.04%に過ぎず、本品目の主成分の過剰摂取の問題が起こることはないと考えられる。(参照15、24)

以上より、本委員会としては、本品目について、⑤の事項が満たされると考えた。

以上より、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。

(2) 毒性

上述 (p.14) のとおり、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ため、指針に基づき、本品目の毒性について、遺伝毒性、90日間反復投与毒性⁸及びアレルギー性に係る試験成績で検討を行うこととした。なお、指定等要請者からは出生前発生毒性に係る試験成績も提出されており、当該知見も検討に含めることとした。

① 遺伝毒性

a. 遺伝子突然変異を指標とする試験

(a) 微生物を用いる復帰突然変異試験

指定等要請者委託試験報告(2006a)によれば、本品目に係る製剤化前原末(ロットAPE0604、TOS 89.68%)についての細菌(*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537及び*Escherichia coli* WP2uvrA)を用いた復帰突然変異試験(最高用量5 mg/plate)が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照25)

b. 染色体異常を指標とする試験

(a) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験

指定等要請者委託試験報告(2006b)によれば、本品目に係る製剤化前原末(ロットAPE0604、TOS 89.68%)についての培養ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験(最高用量5 mg/mL)が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。(参照26)

以上のとおり、本品目については、ガイドラインに規定された最高用量まで実施された試験において、遺伝子突然変異誘発性及び染色体異常誘発性のいずれも認められていない。したがって、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ものと考えられた。

② 反復投与毒性

a. 13週間反復投与毒性試験(指針における90日間反復投与毒性試験に該当)

指定等要請者委託試験報告(2006c)によれば、6週齢のWistarラット(各群雌雄各20匹)に本品目に係る製剤化前原末(ロットAPE0604)

⁸ なお、本品目については、指定等要請者から提出された13週間反復投与毒性試験(反復投与毒性の項のa)が、指針における90日間反復投与毒性試験に該当するものと判断した。

(34,552 ASPU/g、TOS 89.68%) (0、0.2、0.6及び1.8%⁹) ; 雄0、130、391及び1,157、雌0、151、452及び1,331 mg/kg体重/日。TOS換算で雄0、117、351及び1,038、雌0、135、405及び1,194 mgTOS/kg体重/日) を13週間混餌投与する試験が実施されている。その結果、いずれの群においても死亡動物は認められなかったとされている。血液学的検査においては、投与開始8日後の高用量群の雄で単球の増加が認められ、13週目の全投与群の雄で好塩基球の減少が認められたとされている。これについて試験担当者は、被験物質の用量や投与期間に関連したものではなく、かつ、背景データの範囲内の変化であったことから、毒性学的に意義はないものと考察している。血液生化学的検査においては、投与開始8日後の高用量群の雌雄及び中用量群の雌でソルビトールデヒドロゲナーゼ活性の低値が認められたとされている。これについて試験担当者は、その後の検査では確認されず、かつ、病理組織学的検査での肝臓に係る所見との関連性も認められなかったことから、毒性学的に意義はないものと考察している。尿検査においては、雄の高用量群で三リン酸結晶の僅かな増加が認められたとされている。これについて試験担当者は、三リン酸は尿中に通常存在する物質であり、増加の程度は臨床的に問題となるものではないと考察している。そのほか、一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、その他の機能検査（機能観察総合検査（FOB）、自発運動量等）、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において、被験物質の投与に関連した影響は認められなかったとされている。以上の結果より、試験担当者は、本品目に係る製剤化前原末（ロットAPE0604）に係るNOAELを、雌雄共に本試験の最高用量である1.8%（雄1,157 mg/kg体重/日（1,038 mgTOS/kg体重/日）、雌1,331 mg/kg体重/日（1,194 mgTOS/kg体重/日））としている（参照15、27、28、29）。本委員会としては、血液学的検査において13週目の全投与群の雄で認められた好塩基球の減少については、試験担当者の考察に加え、病理組織学的検査において特段の所見が認められないことから、投与物質の毒性影響とは認められないと判断した。その他については、試験担当者の判断を是認し、本試験における被験物質のNOAELを、雌雄共に本試験の最高用量である1.8%（雄1,157 mg/kg体重/日（1,038 mgTOS/kg体重/日）、雌1,331 mg/kg体重/日（1,194 mgTOS/kg体重/日））と考えた。

⁹ 指定等要請者は、*A. niger* GEP-44 株由来のプロテアーゼ（本品目と構造的に関連する酵素）を被験物質とする13週反復投与毒性試験のNOAELが5,040 mgTOS/kg体重/日であったことから、本品目が同用量で毒性を有する可能性は低く、また、本品目の生産菌株が*A. niger* GEP-44株と同系統に属することから、培養液に由来する物質が毒性を有する可能性も低いと判断している。以上を根拠とし、最高用量を1.8%（1,000 mgTOS/kg体重/日以上に相当）と設定した14日間用量設定試験で毒性が認められなかったことから、経済協力開発機構（OECD）ガイドライン408を参照し、本13週間反復投与毒性試験の最高用量も1.8%に設定したとされている。

③ 生殖発生毒性

a. 出生前発生毒性試験

指定等要請者委託試験報告（2006d）によれば、Wistarラット（各群雌25匹）に、本品目に係る製剤化前原末（ロットAPE0604）（34,552 ASPU/g、TOS 89.68%）（0、0.2、0.6及び1.8%；0、136、403及び1,205 mg/kg体重/日。TOS換算で0、122、361及び1,081 mgTOS/kg体重/日。）を、妊娠0～21日に混餌投与する試験が実施されている。その結果、母動物の一般状態、体重、摂餌量及び病理組織学的検査において、被験物質の投与に関連した影響は認められなかったとされている。胎児の検査では、低用量群及び中用量群の胎児で外表、内臓及び骨格の奇形が散見されたとされている。これらについて試験担当者は、奇形発現の頻度は低く、用量相関性が認められなかったことから、被験物質の投与に関連したものではないとしている。また、着床後胚/胎児死亡率並びに胎児及び胎盤重量に被験物質の投与に関連した影響は認められなかったとされている。以上の結果より、試験担当者は、本品目に係る製剤化前原末（ロットAPE0604）に係るNOAELは、本試験の最高用量である1.8%（1,205 mg/kg体重/日（1,081 mgTOS/kg体重/日））としている（参照30）。本委員会としては、試験担当者の判断を是認し、本試験における被験物質のNOAELを、本試験の最高用量である1.8%（1,205 mg/kg体重/日（1,081 mgTOS/kg体重/日））と考えた。

④ アレルゲン性

指定等要請者によれば、本品目は、*A. niger*が本来有してい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生産菌株から得られた酵素であり、*A. niger*は、食品生産又は食品加工に使用されている酵素及び有機酸の生産において安全に使用されてきた歴史があるとされている。本品目については、2007年に諸外国で使用が開始されて以降、これまでに本品目の摂取に由来するアレルギー症状の発症例が報告されていないことを含め、本品目がヒトに対するアレルゲン性を有するという知見は現時点で報告されていないとされている。（参照15）

本品目は遺伝子組換え微生物を利用して製造され、有効成分がたん白質であることから、「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（平成20年6月食品安全委員会決定）を参考に、①既知のアレルゲンとの構造相同性及び②物理化学的処理に対する感受性に関する事項について考察を行うこととした。

a. 既知のアレルゲンとの構造相同性

指定等要請者によれば、SDAP¹⁰⁾を用いて、国際連合世界食糧農業機関 (FAO) /世界保健機関 (WHO) のガイドラインに沿って、本品目の有効成分と既知のアレルゲンについて、6、7及び8アミノ酸配列の連続一致検索並びに80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すものの検索が実施されている。その結果、6アミノ酸配列が有効成分と連続一致する既知アレルゲンたん白質が2件認められたが、7～8アミノ酸配列が有効成分と連続一致する既知アレルゲンたん白質は認められなかったとされている (参照 2、31、32、33)。なお、Hilemanら (2002) の報告によれば、一般的に、6アミノ酸配列以下の連続一致は、ノイズ¹¹⁾の範囲内と判断できる可能性が高いとされている。(参照 34)

また、指定等要請者によれば、有効成分についての80アミノ酸スライディングウインドウ検索 (アミノ酸配列を80個単位に区切り、その中で35%以上の相同性を示すものの検索) を実施した結果、35%以上の相同性を示したものは認められなかったとされている。(参照 2、31)

b. 人工消化液等による分子量又は免疫反応性の変化

上述 (p.13) のとおり、Ⅲ 2 (1) ①の試験成績において、本品目はpH1.2の人工胃液中では0.5分未満で3,500 Da以下の低分子まで分解されることが示されたとされている。(参照 15、21)

また、人工消化液による試験結果ではないが、上述 (p.13) のコンピュータシミュレーションの結果、本品目はペプシン、トリプシン及びキモトリプシンの初回の酵素分解においてオリゴペプチド (30～50アミノ酸を含む。) まで分解されることが示唆されたとされている。(参照 2、23)

c. 加熱処理による免疫反応性の変化

加熱処理による免疫反応性の変化に関する試験は実施されていないが、上述 (p.13) のとおり、Ⅲ 2 (1) ①の試験成績において、95℃で5分間加熱処理しても、本品目はpH1.2の人工胃液中では0.5分未満で3,500 Da以下の低分子まで分解されることが示されたとされている。(参照 15、21)

以上より、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

¹⁰ 指定等要請者によれば、SDAP は、相同性検索機能を備えているたん白質データベースとして、網羅性が高いと考えられており、SDAP を用いた資料は、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議 (JECFA) における本品目の評価で用いられたとされている。(参照 2)

¹¹ アレルゲン性の有無とは関係ない偶然の一致とされている。

目が易消化性であり、既存アレルゲンとの相同性が認められないことから、本品目のアレルゲン性の懸念は極めて低いと判断した。

IV. 国際機関等における評価

1. JECFA における評価

2008 年の第 69 回会合において、JECFA は、本品目について、13 週間反復投与毒性試験における NOEL 1,038 mgTOS/kg 体重/日と、過小推計を最も避けた推定を行った場合の一日摂取量 4.1 mgTOS/kg 体重/日とのマージンが約 250 であることをもって、GMP に従って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 (not specified)」と結論している。(参照 10、35)

2. 米国における評価

上述 (p.9) のとおり、米国では、2007 年 3 月、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は GRAS 物質であるとする指定等要請者からの届出に対し、FDA から異論はない旨の回答がなされている。(参照 6)

3. 欧州における評価

上述 (p.9) のとおり、EU (フランス及びデンマークを除く。)では、加工助剤たる酵素は添加物として規制されておらず、本品目についての安全性評価は行われていない。(参照 7)

フランスにおいては、2007 年 5 月、仏食品衛生安全庁 (AFSSA) が本品目について安全性に懸念がないと評価している。(参照 8)

4. その他の国における評価

豪州・ニュージーランドにおいては、2008 年、FSANZ において本品目について安全性に懸念がないと評価されている。(参照 36)

5. 我が国における評価等

我が国において、アスパラギナーゼは添加物としての使用が認められていない。*A. niger* を基原とする添加物としては、Ⅲ 1 (3) で述べたとおり、種々の物質が厚生労働省の「既存添加物名簿収載品目リスト」に掲げられていることから、我が国においては、既に *A. niger* を基原とする添加物が食品の加工等に使用されてきているものと考えられる。(参照 19)

V. 食品健康影響評価

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 mgTOS/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。

<別紙 1 : 略称>

略称	名称等
AFFSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments : 仏食品衛生安全庁
EC	Enzyme Commission : 国際生化学・分子生物学連合酵素委員会
EU	European Union : 欧州連合
FAO	Food and Agriculture Organization : 国際連合食糧農業機関
FOB	Functional Observational Battery : 機能観察総合検査
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand : 豪州・ニュージーランド食品基準機関
GMP	Good Manufacturing Practice : 適正使用規範
GRAS	Generally Recognized As Safe : 一般的に安全とみなされる
IARC	International Agency for Research on Cancer : 国際癌研究機関
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LC/MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method : 液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development : 経済協力開発機構
SDAP	Structural Database of Allergenic Proteins : アレルゲン性たん白質の構造データベース
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis : 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
TOS	Total Organic Solids : 総有機固形分
WHO	World Health Organization : 世界保健機関

<別紙 2 : 各種毒性試験等成績>

試験項目	試験種類	動物種等	試験期間	投与方法	群設定	被験物質	投与量	試験結果概要	参照
遺伝毒性	復帰突然変異試験	<i>S. typhimurium</i> TA98、 TA100、 TA1535 TA1537 <i>E. coli</i> WP2uvrA	-	<i>in vitro</i>	-	本品目の製剤化前原末（ロット APE0604、TOS 89.68%）	最高用量 5 mg/plate	代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。	指定等要請者委託試験報告（2006a） （参照 2 5）
遺伝毒性	染色体異常試験	培養ヒト末梢血リンパ球	-	<i>in vitro</i>	-	本品目の製剤化前原末（ロット APE0604、TOS 89.68%）	最高用量 5 mg/mL	代謝活性化系の有無にかかわらず陰性であったとされている。	指定等要請者委託試験報告（2006b） （参照 2 6）
反復投与毒性	13 週間試験	Wistar ラット	13 週間	混餌投与	各群雌雄各 20 匹	本品目の製剤化前原末（ロット APE0604、ASPU/g、TOS 89.68%）	0、0.2、0.6、1.8%；雄 0、130、391、1,157、雌 0、151、452、1,331 mg/kg 体重/日。TOS 換算で雄 0、117、351、1,038、雌 0、135、405、1,194 mgTOS/kg 体重/日。	本委員会としては、血液学的検査において 13 週目の全投与群の雄で認められた好塩基球の減少については、試験担当者の考察に加え、病理組織学的検査において特段の所見が認められないことから、投与物質の毒性影響とは認められないと判断した。その他については、試験担当者の判断を是認し、本試験における被験物質の NOEL を、雌雄共に本試験の最高用量である 1.8%（雄 1,157 mg/kg 体重/日（1,038 mgTOS/kg 体重/日）、雌 1,331 mg/kg 体重/日（1,194 mgTOS/kg 体重/日））と考えた。	指定等要請者委託試験報告（2006c） （参照 2 7）

試験項目	試験種類	動物種等	試験期間	投与方法	群設定	被験物質	投与量	試験結果概要	参照
生殖発生 毒性	出生前発生毒 性試験	Wistar ラット	妊娠 0～21 日	混餌投与	各群雌 25 匹	本品目の製 剤化前原末 (ロット APE0604、 34,552 ASPU/g、 TOS 89.68%)	0、0.2、0.6、 1.8% ; 0、136、 403、1,205 mg/kg 体重/日。 TOS 換算で 0、 122、361、1,081 mgTOS/kg 体重/ 日。	本委員会としては、試験担当者の判断 を是認し、本試験における被験物質の NOAEL を、本試験の最高用量である 1.8% (1,205 mg/kg 体重/日 (1,081 mgTOS/kg 体重/日)) と考えた。	指定等要請者委託試 験報告 (2006d) (参照 3 0)

<別紙3：本品目の推定一日摂取量（使用食品（群）摂取量ベース）>

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）に対する本品目の使用量及び最終製品中の残存量は、以下の表1のとおりである。これは、2008年にJECFAにおいて評価された際に用いられたデータと同一である。（参照10）

表1 各食品（群）に対する本品目の使用量及び最終製品中の残存量

対象食品群	a. 原料への酵素最大添加量 (ASPU/kg)	b. 最終製品中の最大原料量 (%)	c. 最終製品中の最大残存酵素量 (ASPU/kg) (a×b)	d. 最終製品中の最大残存酵素量 (mgTOS/kg) *
パン類	385	91	350	9.97
シリアル食品	850	95	808	23.1
ポテト製品	15,000	100	15,000	428
調味料**	6,200	≤2	124	3.54

* JECFAに提出された申請資料に用いられたロットにおける酵素活性及びTOSの平均値から算出されている。

** 海外におけるProcess Flavours（アミノ酸や糖等をメイラード反応させて生成する調味料）を想定している。

指定等要請者は、本品目が直接使用される食品（群）摂取量（平成21年国民健康・栄養調査（参照24）より）を基に、本品目の一日摂取量を以下の表2のように推定している。（参照2）

表2 本品目の推定一日摂取量

表1における対象食品群	「平成21年国民健康・栄養調査」において参照した分類		d. 最終製品への最大残存酵素量 (mgTOS/kg)	e. 一日食品摂取量 (g/人/日)	f. 本品目の推定一日摂取量 (mgTOS/kg体重/日) (d÷1,000×e÷50)
	中分類	小分類			
パン類	小麦・加工品		9.97	99.4	0.0198
	菓子類	ケーキ・パストリー類	9.97	6.3	0.0013
		ビスケット類	9.97	1.6	0.0003
シリアル食品	その他の穀類・加工品		23.1	8.2	0.0038
ポテト製品	いも類		428	54.6	0.4674
	菓子類	その他の菓子類***	428	6.1	0.0522
調味料	調味料・香辛料類	その他の調味料****	3.54	59.4	0.0042
合計					0.549

*** ポテトチップス等を想定している。

****Process Flavoursを想定している。

<参照>

- 1 厚生労働省,「*Asparaginase niger* ASP-72 株を利用し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 (平成 24 年 9 月 26 日付けで食品健康影響評価を依頼した事項), 第 448 回食品安全委員会 (平成 24 年 10 月 1 日)
- 2 DSM ニュートリションジャパン(株), 食品添加物指定の要請資料 *Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ (指定等要請者作成資料), 2012 年 9 月 24 日
- 3 Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC and van Dijck PWM: On the safety of *Aspergillus niger* – a review. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 59: 426-35
- 4 食品安全委員会, 加工食品中のアクリルアミドについて.
参考 : <http://www.fsc.go.jp/sonota/acrylamide-food170620.pdf> (2012 年 8 月閲覧)
- 5 Codex Alimentarius Commission, Code of practice for the reduction of acrylamide in foods, CAC/RCP 67-2009.
- 6 Tarantino LM (Director, Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN), Food and Drug Administration (FDA)), Agency response letter GRAS notice No. GRN 000214, CFSAN/Office of Food Additive Safety, March 12, 2007
- 7 European Parliament and Council of the European Union: Regulation (EC) No 1331/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 establishing a common authorization procedure for food additives, food enzymes and food flavourings, Official Journal of the European Union, 31.12.2008, L354/1-6
- 8 AFSSA, Opinion of the French Food Safety Agency relating to the application for authorization to use a self-cloned *Aspergillus niger* asparaginase in the preparation of foods containing L-asparagine and carbohydrates which are cooked at temperatures above 120°C, such as bread and the other cereal goods (including breakfast cereals), potato-based fried goods and certain yeast extracts, Afssa-Submission No.2007-SA-0040, Maison-Alfort, May 31, 2007.
- 9 Danish Veterinary and Food Administration, Preventase/Approval, File: 2007-20-5406-00130/BXJE, September 24, 2007.
- 10 Asparaginase from *Aspergillus niger* expressed in *A. niger*. In WHO (ed.), Food Additives Series 60, Safety evaluation of certain food additives, prepared by the sixty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert

Committee on Food Additives (JECFA), Rome, 17-26 June 2008, WHO, Geneva, 2009; pp.3-13.

- 1¹ Nyiredy I, Etter L, Fesüs I and Mayer G: The fate of mould “spores” in the digestive tract of chicks. *Acta Vet Acad Sci Hung* 1975; 25: 123-8
- 1² Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson RA et al.: Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains. *PLoS One* 2011; 6(8): e23496
- 1³ Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science (KNAW) , Report, analyses of two *Aspergillus niger* strains, TM06.055 (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- 1⁴ Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ et al.: Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* 2007; 25(2): 221-31
- 1⁵ DSM ニュートリションジャパン株式会社, *A. niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼの補足資料提出依頼に関する調査結果, 2013年9月12日
- 1⁶ Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Science (KNAW) , Report, analyses of four fermentation broths on the presence of toxic metabolites, TM 11.124 : 2013a (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- 1⁷ DSM Food Specialities B. V., STATEMENT REG#00060018. August 29, 2013 (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- 1⁸ DSM Food Specialities B. V., Absence of fumonisins in the enzyme asparaginase. 2013b (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- 1⁹ α -アミラーゼ, アントシアナーゼ, イヌリナーゼ, インベルターゼ, カタラーゼ, α -ガラクトシダーゼ, キシラナーゼ, キトサナーゼ, グルカナーゼ, β -グルコシダーゼ, グルコースオキシダーゼ, 酸性ホスファターゼ, セルラーゼ, トランスグルコシダーゼ, フィターゼ, プロテアーゼ, ペクチナーゼ, ペプチダーゼ, ヘミセルラーゼ, ホスホジエステラーゼ, ホスホリパーゼ, ポリフェノールオキシダーゼ, リパーゼ. 日本食品添加物協会技術委員会編, 既存添加物名簿収載品目リスト注解書. 日本食品添加物協会, 東京, 1999
- 2⁰ Rulis AM (Director, Office of Food Additive Safety, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration), Re: GRAS Notice No. GRN 000089, April 3, 2002.

-
- ^{2 1} Stor M and Misset M: Proteolytic breakdown of asparaginase under simulated gastric conditions. July 19, 2013 (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- ^{2 2} Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD and Bairoch A: ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3784-88
- ^{2 3} Enzymatic breakdown of asparaginase: ExPASy PeptideCutter (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- ^{2 4} 厚生労働省, 平成 21 年国民健康・栄養調査報告, 平成 23 年 10 月, pp.10-15, 56, 68-71
- ^{2 5} van den Wijngaard MJM (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V6805/15, Bacterial reverse mutation test with enzyme preparation of *Aspergillus niger* (ASP72), TNO project number 031.10803/03.41, TNO study code 6805/15, TNO, the Netherlands, 2006a (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- ^{2 6} Usta B and de Vogel N (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V6802/14, Chromosomal aberration test with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* (ASP72) in cultured human lymphocytes, TNO project number 031.10803/03.42, TNO study code 6802/14, TNO, the Netherlands, 2006b. (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- ^{2 7} Lina BAR (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V6998, repeated-dose (13-week) oral toxicity study with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* containing asparaginase activity (ASP72) in rats, volume 1, TNO project number 031.10642, TNO study code 6998, TNO, the Netherlands, 2006c. (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- ^{2 8} 食品安全委員会, 遺伝子組換え食品等評価書「プロテアーゼ」. 2007 年 7 月
- ^{2 9} Krishnappa H, Study No.3716/03, Repeated dose 90-day oral toxicity study by gavage with enzyme preparation of *Aspergillus niger* (GEP 44) in wistar rats. Toxicology Department Rallis Research Centre, India, 2004. (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- ^{3 0} Tegelenbosch-Schouten MM (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Natuurwetenschappelijk Onderzoek)), TNO report V7043, Oral prenatal developmental toxicity study with an enzyme preparation of *Aspergillus niger* containing asparaginase activity (ASP72) in rats, TNO project

number 031.10803, TNO study code 7043, TNO, the Netherlands, 2006d.
(DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)

- ^{3 1} DSM Food Specialties, Sequence comparison between asparaginase and known (food) allergens, reference: DFS/REG 00056472, June 29, 2010 (DSM ニュートリションジャパン株式会社社内資料) (未公表)
- ^{3 2} Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, Evaluation of allergenicity of genetically modified foods, Rome, Italy, 22-25 January 2001.
- ^{3 3} Ivanciuc O, Schein CH and Braun W: SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(1): 359-362
- ^{3 4} Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD et al.: Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 128(4): 280-291
- ^{3 5} WHO and FAO (ed.), Technical Report Series No.952, Evaluation of certain food additives, sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, 17-26 June 2008, WHO, 2009; pp.19-22 and 187-190.
- ^{3 6} Foods Standards Australia New Zealand, Application A1003, Asparaginase from *Aspergillus niger* as a processing aid (enzyme) approval report, 1 October, 2008.

***Aspergillus niger* ASP-72 株を用い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関する審議結果（案）についての意見・情報の募集結果について**

1. 実施期間 平成25年10月22日～平成25年11月20日
2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送
3. 提出状況 4通
4. 意見・情報の概要及び食品安全委員会の回答

	意見・情報の概要*	食品安全委員会の回答
1	<p>昨今は特に健康食品と謳った商品の中に「体にいいらしい」と言うだけで新しい添加物、菌類が使用されすぎており危機感を感じる。</p> <p>体に影響がなさそうなら可とし、確かな安全性より企業の利益重視傾向になっており、今回のアスパラギナーゼに関しても、可とすればありとあらゆる食品に使われそうである。</p> <p>アスパラギナーゼは抗がん剤に使用する薬品でもあり、また副作用も報告されている。そのため一般の食品に添加物として使用する意味は企業の利益以外無く、不要なものであるはず。利益主導の社会の中で人体に影響の大きい食品類の安全性を維持する為には不可とするべきである。</p> <p>もし、どうしても可とするのなら必ずはっきりと分かるよう表示する事。</p>	<p>指定等要請者によれば、添加物「<i>Aspergillus niger</i> ASP-72 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。）の用途は、健康食品への添加ではなく、「本品目の添加により食品中のアスパラギンを分解し、食品中でアスパラギンが加熱されることで生成されるアクリルアミドを低減すること」とされています。</p> <p>御指摘の「抗がん剤に使用する薬品」が何を指すのか必ずしも明らかではありませんが、例えば、我が国で医薬品として承認されている、L-アスパラギナーゼ凍結乾燥品 5000 K.U を有効成分とする「注射用アスパラギナーゼ」は、注射剤として静脈又は筋肉内に直接投与されるものであり、「血中のL-アスパラギンを分解し、アスパラギン要求性腫瘍細胞を栄養欠乏状態にすることにより抗腫瘍効果」を発揮するものとされています。⁽¹⁾</p> <p>一方、本品目は 70℃で失活するとされているため、加熱によるアクリルアミドの生成を低減するという使用目的を考慮すると、本品目を添加した食品は摂取時には当然加熱され、本品目は失活しているものと考えられます。また、本品目は食品を加工する際に添加物として使用されるものであり、経口で摂取された後、消化管内で消化・分解を受け、食品常在成分であるア</p>

	<p>ミノ酸として吸収されると考えられます。</p> <p>したがって、本品目と、L-アスパラギナーゼ凍結乾燥品を有効成分とする医薬品の安全性を比較することは、使用方法が大きく異なるため適当でないと考えます。</p> <p>本品目の添加物としての安全性については、「添加物に関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）（以下「指針」という。）に従い適切に評価を実施し、添加物として適切に使用される限り、安全性に懸念はなく、ADIを特定する必要はないと判断いたしました。</p> <p>添加物指定の可否や、食品への使用に当たっての表示に関する御意見については、リスク管理機関にお伝えいたします。</p> <p>(1) 一般財団法人日本医薬情報センター編, JAPIC 医療用医薬品集 2014 : 47-48 (2013)</p>
--	--

	意見・情報の概要※	食品安全委員会の回答
2	<p>1日の摂取量や影響など、体重 50 kg の大人が例にあげられています。影響を受けやすいのは、乳幼児と考えられますので、その例もあげてあるとよいです。</p>	<p>指針では、第4の6で「妊婦・胎児、乳幼児、小児、高齢者等における検討は、リスクを考えうる知見がある場合に必要に応じて行う。」とされております。</p> <p>一般に乳幼児は体重が少ないため、体重当たりの暴露量が多くなりやすいこと、また成人に比べて代謝が異なることがあること等がリスクを高める要素として考えられますが、本品目の摂取における安全性評価においては、反復経口投与毒性試験において kg 体重当たりの検討を行っていること及び乳幼児のリスクが高まるという特段の知見は得られていないことから、食品安全委員会としては、乳幼児の摂取量や影響について、成人とは別途検討する必要はないと判断いたしました。</p>
3	<p>貴会の食品健康影響評価が対象とされる範囲ではありませんが、本物質の使用により加工食品中のアクリルアミドが低減される「ベネフィット」を食品事業者等が過大、過度に宣伝し、消費者に対して非科学的な「ゼロリスク」を煽る事態が懸念されます。アクリルアミドについてこれまで貴会(※)などが示されてきた科学的な知見・判断との間に齟齬が生じることの無いよう、関係リスク管理機関に厳重に申し送りいただきたい。</p> <p>※http://www.fsc.go.jp/sonota/acrylamide-food170620.pdf</p>	<p>御意見ありがとうございました。いただいた御意見につきましては、リスク管理機関にお伝えいたします。</p>

	意見・情報の概要※	食品安全委員会の回答
4	<p>今回、貴委員会が公表された「添加物評価書 <i>Aspergillus niger</i> ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ（案）」（以下評価書案）に関して、以下のコメントを提出いたします。</p> <p>本品目は、加熱食品におけるアクリルアミドの生成を低減できる有用性が期待されます。その一方で、本品目の評価結果がリスク管理機関に通知された場合、貴委員会が添加物としての酵素の評価を完了した最初の事例となることから、基本的な考え方を整理することも含め、慎重に検討する必要がありますと考えます。</p> <p>1. 基原微生物の毒素非産生性の確認について</p> <p>近年、Frisvad らは 180 種類の <i>A. niger</i> 菌株を調査し、81%の菌株がフモニシン B₂、B₄および B₆を産生し、17%の菌株がオクラトキシン A を産生すること¹（評価書案の参照 12 でも引用されています）、およびフモニシン B₂の産生が使用する培地によって異なること²を報告しています。</p> <p>一方、評価書案の p.11 にはオクラトキシンとフモニシン類は検出されなかったと記載されていますが、どのような試験で確認されたのか、資料（評価書案の参照 13、16、17）が未公表とされており知ることができません。</p> <p>今後の酵素の評価においても、基原微生物の毒素非産生性の確認は最重要と考えられますので、例えば、以下のような事項について十分な確認、検討が必要と考えます。</p> <p>① <i>A. niger</i> ASP-72 株が、既知のマイコトキシン産生能を持つ菌株とは異なる菌株であることを確認し、評価書に記載することが必要ではないでしょうか。</p>	<p>1. について</p> <p>①について</p> <p>指定等要請者による提出資料（参照 13）によれば、マイコトキシンを含む二次代謝産物を最も産生しやすいとされる 3 種類の培地で培養した本品目の生産菌株である <i>A. niger</i> ASP-72 株（以下「本生産菌株」</p>

<p>②マイコトキシンの産生が培養条件により変化しうることを考慮して、確認試験の条件を検討すべきではないでしょうか。</p> <p>③評価書中に分析条件（検出限界等）を</p>	<p>という。) について、HPLC により分析を行ったところ、信頼に足るかび毒のデータライブラリに収載されているマイコトキシンが検出されなかったとされており、他の提出資料とも併せて、本生産菌株は、マイコトキシン産生能を持たないものと判断しました。</p> <p>なお、御指摘を受け、評価書の参照 13 に関する記載部分に上記の旨を追記いたします。</p> <p>②について 御指摘のとおりマイコトキシンの産生は培養条件により変化しうるものですが、本生産菌株については、上記のとおり、最もマイコトキシンを産生しやすいとされている 3 種類の培地において培養した本生産菌株について、信頼に足るかび毒のデータライブラリに収載されているマイコトキシンは検出されなかったとされております。</p> <p>また、最終製品についても、指定等要請者委託試験報告（2013b）（参照 18）によれば、フモニシン B₁ 及び B₂ のほか、3-AC-デオキシニバレノール、アフラトキシン B₁、B₂、G₁ 及び G₂、デオキシニバレノール、ジアセトキシシルペノール、HT-2 トキシン、ニバレノール、オクラトキシン A、ステリグマトシスチン、T-2 トキシン並びにゼアラレノンの確認試験が実施されており、いずれも検出限界以下とされております。</p> <p>以上から、提出された試験結果を検討した結果、本生産菌株についてはマイコトキシン産生の懸念はなく、最終製品にもマイコトキシンは含まれないものと判断しました。</p> <p>なお、御指摘を受け、評価書には試験項目（培地の種類及び最終製品において確認したマイコトキシンの種類）について追記いたします。</p> <p>③について</p>
--	--

<p>記載することが必要ではないでしょうか。</p> <p>④幅広いマイコトキシンについて最終製品での確認を行うべきではないでしょうか。また、検体数を増やす必要があるのではないのでしょうか。（評価書案には「フモニシン B₁及び B₂は検出されなかった」と書かれていますが、その他のフモニシン類やオクラトキシンが確認されていないように思えます。また、2検体しか分析されていません。）</p> <p>⑤以上も含め、酵素の基原微生物の毒素非産生性の確認に必要なデータのあり方（質や量）を検討するべきではないのでしょうか。</p> <p>2. 酵素の評価における「食品常在成分と同一物質になること」の確認について 評価書案では、アスパラギナーゼは「人工胃液によって 3,500 Da 以下の低分子に分解されることが示された」とされています。また、コンピュータシミュレーションから「オリゴペプチドまで分解されることが示唆され」「最終的に食品常在成分であるアミノ酸まで分解されると考えられる」とされています。しかし、アスパラギナー</p>	<p>本品目の評価において、マイコトキシンのうち、特に確認が必要と考えた、最終製品中のオクラトキシン A 並びにフモニシン B₁及び B₂について、検出限界を評価書に追記いたします。</p> <p>④について 上記のとおり、最終製品について、各種マイコトキシンの分析がされていることを確認しております。 検体数につきましては、本委員会においては、工業生産においては培養条件が一定であること及び継代において毒素を新たに産生するような突然変異は考え難いと判断し、異なるロットの 2 検体の分析結果で本生産菌株のマイコトキシン産生性の懸念はないものと判断しました。</p> <p>⑤について 酵素の基原微生物の毒素非産生性の確認に必要なデータについては、その微生物種ごとに既に得られている知見を踏まえ、検討する必要があると考えます。 本生産菌株については、Schuster ら (2002) (参照 3) による <i>A. niger</i> のレビュー及び Frisvad ら (2011) (参照 12) による <i>A. niger</i> の各株のフモニシン検出結果の知見から、オクラトキシン及びフモニシンの産生能の有無の確認が特に必要であると判断し、提出された試験結果から検討する限り、毒素産生性の懸念はないものと判断しました。</p> <p>2. について 御指摘のとおり、本品目について試験的に証明されているのは、体内で 3,500 Da 以下の低分子に分解されることのみであり、全てがアミノ酸まで分解されて吸収されることは本委員会の予測としての判断です。 しかしながら、一般的な事実として、食肉由来、植物由来等から様々なたん白質が食品として摂取され、その消化・分解に伴</p>
---	---

<p>ゼが人工胃液によって 3,500 Da 以下の低分子に分解されることは実験的に明らかにされた事実ですが、それら低分子がすべて消化管内でアミノ酸まで分解されるとするのはコンピュータシミュレーションも含めた予測であり、実験的に証明されたものではないと考えます。厳密に言えば、これら低分子の中には食品常在成分ではないペプチドも存在し、それが吸収されることもあり得るように思えます。</p> <p>一方、JECFA (FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議) や EFSA (欧州食品安全機関) では、酵素の評価において、必ずしも「食品常在成分と同一物質になること」の確認を必要としていません。</p> <p>したがって、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・貴委員会が「食品常在成分と同一物質になる」という点を重視して酵素の安全性評価を行うのであれば、アミノ酸まで分解されることの厳密な検証を求めるべきではないでしょうか。 ・あるいは、酵素の安全性評価においては、「食品常在成分と同一物質になる」ことまで言及するには無理があるのではないのでしょうか。ただし、人工消化液等による分解試験自体は、アレルギー性等の評価の参考になるため、有用と考えます。 <p>なお、評価書案 p.13、13 行目には「体内で低分子に分解される」、同 27 行目および p.14、6 行目には「体内で速やかに分解され」との記載がありますが、「体内」は「消化管内」とすべきと思います。</p> <p style="text-align: right;">以上</p> <p>参考文献</p> <p>1) J. C. Frisvad, T. O. Larsen, U. Thrane, M. Meijer, J. Varga, R. A. Samson and K. F. Nielsen, Fumonisin and ochratoxin production in industrial <i>Aspergillus niger</i> strains. PLoS One 6; e23496 (2011).</p> <p>2) J. C. Frisvad, J. Smedsgaard, R. A.</p>	<p>い最終的に様々なオリゴペプチドが体内で生成し、吸収されていると考えます。本品目の評価においては、消化管内において消化される時間も確認できるよう、本品目を人工胃液で処理した後、SDS-PAGE を実施する試験も確認しており、その結果、本品目に由来するバンドが 30 秒未満で消失するとともに、本試験における最小マーカーの 3,500 Da までのバンドが認められませんでした。このことから、本品目が胃内で 3,500 Da 以下の低分子に分解されることが確認されております。さらにコンピュータシミュレーションにおいて、胃及び腸管内でオリゴペプチド及びアミノ酸となることが示唆されたこと、そしてペプチダーゼにより更なる分解を受けると考えられることから、通常の食品を摂取した場合と同様に、毒性に懸念のある物質が生成し吸収される可能性は極めて低くなると考えられ、本品目については、消化管内で最終的にアミノ酸まで分解され、「食品常在成分と同一物質になる」と判断しました。</p> <p>なお、アレルギー性の評価においても、人工胃液で処理した試験結果も含めて確認しております。</p> <p>本品目の評価に用いた毒性に関する資料は、JECFA における本品目の評価結果^②や、EFSA における酵素の評価に必要な資料のガイダンス^③を参照する限り、両機関が評価に必要とする資料を網羅しており、さらに消化管内での分解性に関する資料を加えたものです。したがって、アレルギー性を含めた各種安全性の懸念について、より適切な評価を行うことができたと考えています。</p> <p>p.13 及び p.14 については、御指摘のとおり「体内」を「消化管内」とするよう評価書を修正いたします。</p>
---	---

	Samson, T. O. Larsen and U. Thrane, Fumonisin B ₂ production by <i>Aspergillus niger</i> . J. Agric. Food Chem., 55: 9727-9732 (2007).	(2) WHO Food Additive Series; 60: 3-13 (2009) (3) The EFSA Journal; 1305: 1-26 (2009)
--	---	--

※頂いた意見・情報をそのまま掲載しています。