

## 分科会 審議品目（食品添加物関係）

- ・グルタミルバリルグリシン . . . . . 1-1 ~ 1-37
- ・アスパラギナーゼ (*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたもの)  
. . . . . 2-1 ~ 2-48

### 各品目について

- ・ 諮問書（厚生労働大臣から薬事・食品衛生審議会会長へ）
- ・ 評価書（食品安全委員会委員長から厚生労働大臣へ）

と2文書がございます。



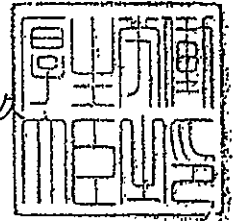
天

厚生労働省発食安1.107第1号

平成25年11月7日

薬事・食品衛生審議会  
会長 西島 正弘 殿

厚生労働大臣 田村 憲久



諮 問 書

食品衛生法（昭和22年法律第233号）第10条及び第11条第1項の規定に基づき、下記の事項について、貴会の意見を求めます。

記

1. グルタミンパリルグリシンの添加物としての指定の可否について
2. グルタミンパリルグリシンの添加物としての使用基準及び成分規格の設定について

平成26年3月18日

薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会  
分科会長 岸 玲子 殿

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会  
添加物部会長 若林 敬二

食品添加物の指定等に関する薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会添加物部会報告について

平成25年11月7日付け厚生労働省発食安1107第1号をもって厚生労働大臣から諮問された、下記の事項について、当部会において審議を行った結果を別添のとおり取りまとめたので、これを報告する。

記

1. グルタミンバリングリシンの添加物としての指定の可否について
2. グルタミンバリングリシンの添加物としての使用基準及び成分規格の設定について

## グルタミルバリルグリシンの食品添加物の指定に関する部会報告書

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：グルタミルバリルグリシン

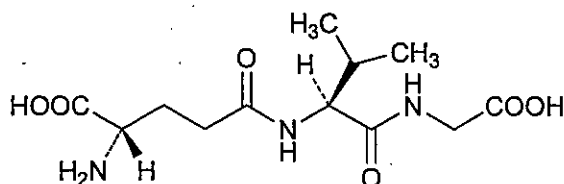
英名： Glutamyl-Valyl-Glycine

化学名： (2*S*)-2-amino-4-[(1*S*)-1-[(carboxymethyl)carbamoyl]-2-methylpropyl]carbamoylbutanoic acid

CAS 番号： 38837-70-6

### 2. 構造式、分子式及び分子量

構造式：



分子式及び分子量：

$C_{12}H_{21}N_3O_6$  303.31

### 3. 用途

調味料

### 4. 概要及び諸外国での使用状況

#### (1) 概要

グルタミルバリルグリシンは、 $\gamma$ グルタミル構造<sup>1</sup>を有するトリペプチド<sup>2</sup>の調味料である。魚醤や醤油等の食品中に微量含まれており、コク味<sup>3</sup>機能を有する成分とさ

<sup>1</sup> グルタミン酸の $\gamma$ 位のカルボキシル基とアミノ酸のアミノ基がペプチド結合した構造。

<sup>2</sup> 本物質は、L- $\gamma$ -グルタミン酸とL-バリルグリシンが縮合した構造を有しているが、要請者によると、立体特異的に製造され、D体を含む異性体が混入する可能性は低いとされている。

<sup>3</sup> 要請者によると、コク味とは甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の5基本味では表せない味を指し、基本味及び基本味の周辺の味の厚み・ひろがり・持続性・まとまりなども増強する効果

れている。

JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) では、2012年にフレーバーとして<sup>4</sup>「安全性上の懸念は無い」と評価されている。

米国では、2010年にフレーバーモディファイヤーとしてFEMA GRAS (FEMA: The Flavor and Extract Manufacturers Association, GRAS: Generally Recognized As Safe) として認められている。

欧州連合 (EU) においては、2013年10月現在評価が行われているところである。

## (2) 諸外国での使用状況等

コーデックス委員会では、フレーバーは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であるGSFA (食品添加物に関するコーデックス一般規格) の対象とされておらず、特段使用基準は設定されていない。

米国では、2010年にFEMA GRASとして認められており、スナック菓子 (使用上限値 160ppm) やスープ (使用上限値 50ppm) 等の食品に対して使用が認められているが、2013年現在使用実態はない。

その他諸外国等については、2013年10月現在、タイ、韓国、台湾及びFEMA-GRAS認可をもって使用が承認される国において使用が認可されている。タイ、韓国、台湾においては使用基準は定められておらず、既にタイ及びマレーシアにおいてフレーバーとして添加濃度100ppm以下で使用されている。

## 5. 食品添加物としての有効性

グルタミルバリルグリシンは、コク味<sup>3</sup>付与機能を有する調味料とされている。

グルタミルバリルグリシンと同様にコク味を有するとされる物質としてグルタチオン (GSH)<sup>5</sup>が挙げられる。要請者によると、コク味とカルシウムセンシングレセプター (CaSR) 活性には正の相関があり、各種ペプチドのCaSR活性を評価した結果、グルタミルバリルグリシンはGSHと比べて約10倍活性が高いことが分かった<sup>6</sup>。また、コク味に関する官能評価を行った結果、CaSR活性と同様に、グルタミルバリルグリシンはGSHと比べて約10倍活性が高いことが示された<sup>6</sup> (図A及び図B参照)。

---

を持つとされている。

<sup>4</sup> 米国及び欧州等におけるフレーバーは、日本でいう「香料」だけでなく、日本では「香料」に分類されない「調味料」(旨味等を付与する物質等) が含まれる場合がある。なお、コーデックスにおける「フレーバー」の定義は、「フレーバーは、食品の風味を添え、変化させ、又は高めるために食品に添加される製品である。」とされ、また「風味とは、口に取り込まれ、主に味覚と嗅覚、また口内全体の疼痛及び触覚受容体によって認識され、脳によって受け取られ解釈される物質の特徴の総体である。」とされている。

<sup>5</sup> 我が国においては、グルタチオンは2013年11月現在、食品添加物としては認められていない。

<sup>6</sup> Takeaki Ohsu, *et al.*, Involvement of the Calcium-sensing Receptor in Human Taste Perception. *J Biol. Chem.* (2010) 285(2):1016-22

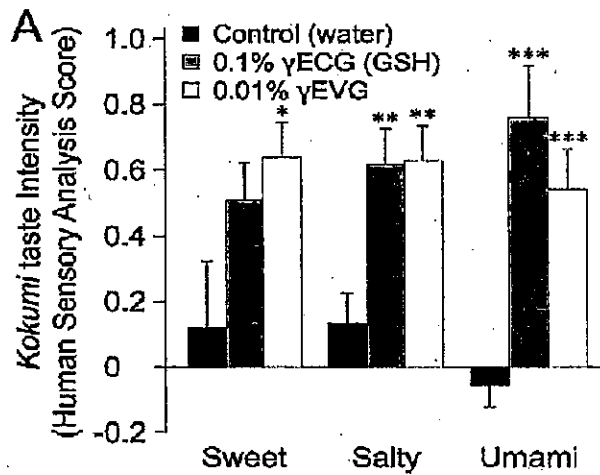


図 A : 3 つの基本味に対するグルタチオンとグルタミルバリルグリシンによる味の増強効果

※  $\gamma$ ECG ; グルタチオン、 $\gamma$ EVG ; グルタミルバリルグリシン

<試験方法>

3.3%スクロース溶液 (Sweet)、0.9%塩化ナトリウム溶液 (Salt) 及び0.5%L-グルタミン酸溶液 (Umami) のそれぞれに、水、0.1%グルタチオン、0.01%グルタミルバリルグリシンを添加し、口に含んで5秒後のそれぞれの味の増強を評価。評価は、-2~+2の5段階評価 (-2 ; 明らかに弱まった、+2 ; 明らかに強まった) で行い、20人の評価者のスコアの平均を比較。

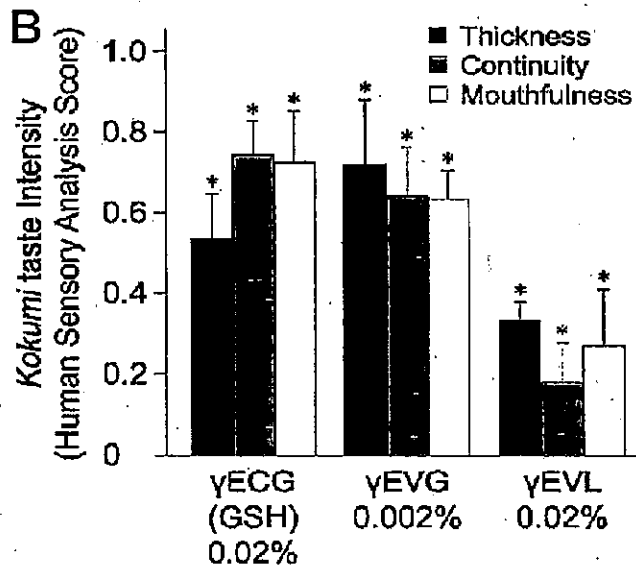


図 B : グルタチオンとグルタミルバリルグリシンのコク味の比較

※  $\gamma$ ECG ; グルタチオン、 $\gamma$ EVG ; グルタミルバリルグリシン、 $\gamma$ EVL ;  $\gamma$ -Glu-Val-Leu

#### <試験方法>

チキンコンソメに、0.02%グルタチオン、0.002%グルタミルバリルグリシン、0.02%グルタミルバリルロイシン（弱いコク味機能を有するペプチド）を添加し、①口に含んで5秒後の味の強さ（Thickness）、②20秒後の味の強さ（Continuity）、③口の中全体の味の強さ（Mouthfulness）を評価。評価は、-2～+2の5段階評価（-2；明らかに弱まった、+2；明らかに強まった）で行い、20人の評価者のスコアの平均を比較。

GSHは天然由来として肉、レバー、魚介、野菜等に高度に含有されている他、スープやスナックといったコク味が好まれる食品群に対してGSH高含有の調味料が使用されている。

グルタミルバリルグリシンはこういったスープやスナックといったコク味が好まれる食品の他、アイスクリーム、チーズやヨーグルトなど様々な食品に対して平均15～80ppmの濃度での使用が想定される。

#### 6. 食品安全委員会における評価状況

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12月11日付け厚生労働省発食安1211第1号により食品安全委員会あて意見を求めたグルタミルバリルグリシンに係る食品健康影響評価については、以下の評価結果が平成25年8月5日付け府食第648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、添加物「グルタミルバリルグリシン」が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「食品常在成分であること又は食品内若しくは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、添加物「グルタミルバリルグリシン」の安全性について、同指針に基づき、試験の一部について省略し、遺伝毒性及び28日間反復投与毒性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、グルタミルバリルグリシンについての毒性に係る知見を検討した結果、添加物「グルタミルバリルグリシン」については、遺伝毒性、反復投与毒性の懸念はないと判断した。

以上のことから、本委員会としては、添加物「グルタミルバリルグリシン」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評価した。



## 7. 摂取量の推計

上記の食品安全委員会の評価の結果によると、以下のとおりである。

### 【一日摂取量の推計等（添加物評価書抜粋）】

指定等要請者によれば、添加物「グルタミンバリングリシン」は、スープやスナックといったGSH高含有の調味料が使用されている食品群のほか、アイスクリーム、チーズやヨーグルトといったコク味が好まれる食品群に、平均添加濃度15～80 ppm、また最大添加濃度30～160 ppmで使用するものとされている。添加物「グルタミンバリングリシン」の使用が想定されるそれぞれの食品分類の一日摂取量の全年齢平均値と添加物「グルタミンバリングリシン」の最大添加濃度を乗じて各食品分類から摂取される添加物「グルタミンバリングリシン」の量を求め、これらを合計して添加物「グルタミンバリングリシン」の推定一日摂取量を算出すると、約44 mg/人/日（約0.88 mg/kg 体重/日）になるとされている。（参照2、11）

指定等要請者によれば、グルタミンバリングリシンの使用が想定される食品（コーヒー飲料、アイスクリーム、飲料、マーガリン、クリーマー、ビール様飲料、スープ類、つゆ・たれ類、粉体調味料、ハム・ソーセージ、乳系使用冷凍食品）の市場規模は、8,400,000 トンとされている。平均的な喫食時濃度を40 ppmとし、すべての商品に添加されるわけではないことから納入率1%とすると年間消費量は約4,000 kgと計算される。日本の人口1億2751万人の1割がグルタミンバリングリシンを摂取すると想定すると、推定一日摂取量は0.859 mg/人/日（約0.017 mg/kg 体重/日）になるとされている。（参照2、12）

本委員会としては、添加物「グルタミンバリングリシン」の推計値が過小にならないよう留意し、一日摂取量を44 mg/人/日（0.88 mg/kg 体重/日）と考えた。

## 8. 新規指定について

要請された使用方法に基づき、添加物として適切に使用する範囲において安全性に懸念がないことを食品安全委員会が確認していることから、食品衛生法（昭和22年法律第233号。以下「法」という。）第10条の規定に基づく添加物としてグルタミンバリングリシンを指定することは、差し支えない。

## 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、次のとおり設定することが適当である。

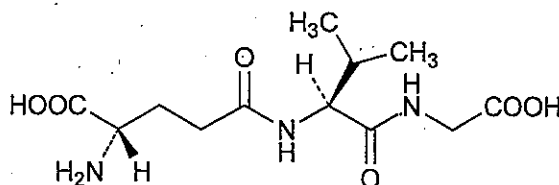
(1) 使用基準について

グルタミンバリングリシンについては、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及び摂取量の推計等、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。

(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のとおり）。

グルタミルバリルグリシン  
 Glutamyl-Valyl-Glycine  
 L-γ-Glutamyl-L-Valyl-Glycine



$C_{12}H_{21}N_3O_6$

分子量 303.31

(2*S*)-2-amino-4-[(1*S*)-1-[(carboxymethyl)carbamoyl]-2-methylpropyl]carbamoylbutanoic acid

[38837-70-6]

含 量 本品を乾燥物換算したものは、グルタミルバリルグリシン ( $C_{12}H_{21}N_3O_6$ ) 95.0~102.0% を含む。

性 状 本品は白~淡赤色の粉末である。

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき、 $3,321\text{cm}^{-1}$ 、 $3,282\text{cm}^{-1}$ 、 $1,712\text{cm}^{-1}$ 、 $1,654\text{cm}^{-1}$ 、 $1,619\text{cm}^{-1}$ 及び $1,541\text{cm}^{-1}$ のそれぞれの付近に吸収帯を認める。

純度試験

(1) 鉛 Pbとして $1.0\mu\text{g/g}$ 以下

本品 4.0g を量り、白金製、石英製若しくは磁製のるつぼ又は石英製ビーカーに入れる。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。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 $450\sim 600^\circ\text{C}$ 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碎き、硫酸(1→4) 1ml及び硝酸1ml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) 10ml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10mlとし、検液とする。別に、鉛標準原液1mlを正確に量り、水を加えて正確に100mlとする。この液4mlを正確に量り、硝酸(1→100)を加えて正確に10ml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  $As_2O_3$ として $1.0\mu\text{g/g}$ 以下

本品 2.0g を量り、水 20mlを加え、加温し、必要があれば超音波処理して溶かし、検液とする。装置Bを用いる。

乾燥減量 1.0%以下( $105^\circ\text{C}$ , 1時間)

定量法 本品及び定量用グルタミルバリルグリシン約0.05gずつを精密に量り、それぞれを水に溶かし、正確に50mlとする。それぞれの液5mlずつを正確に量り、それぞれに水を加え、正確に20mlとし、検液及び標準液とする。検液及び標準液をそれぞれ20 $\mu\text{l}$ ずつ量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。検液及び標準液のグルタミルバリルグリシンのピーク面積 $A_T$ 及び $A_S$ を測定し、次式により含量を求める。

グルタミルバリングリシン (C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>) の含量 (%)

$$\frac{\text{乾燥物換算した定量用グルタミルバリングリシンの採取量 (g)}}{\text{乾燥物換算した試料の採取量 (g)}} \times \frac{A_T}{A_S} \times 100$$

操作条件

検出器 紫外吸光光度計(測定波長 210 nm)

カラム充填剤 5 μm の液体クロマトグラフィー用オクタデシルシリル化シリカゲル

カラム管 内径 4.6mm, 長さ 25cm のステンレス管

カラム温度 30 ~40°Cの一定温度

移動相A リン酸二水素カリウム 6.8 g を水 1,000ml に溶かし, リン酸で pH3.0 に調整する。

移動相B 移動相A 400ml にアセトニトリル 600ml を加える。

濃度勾配 A : B (100 : 0) で 25 分間保持した後, A : B (100 : 0) から (0 : 100) までの直線濃度勾配を 25 分間行う。

流量 1.0 ml/分

試薬・試液

グルタミルバリングリシン, 定量用 C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> 本品は白~淡赤色の粉末である。

含量 本品を乾燥物換算したものは, グルタミルバリングリシン (C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>) 99.0%以上を含む。

確認試験 本品を赤外吸収スペクトル測定法中の臭化カリウム錠剤法により測定するとき, 3,321cm<sup>-1</sup>, 3,282cm<sup>-1</sup>, 1,712cm<sup>-1</sup>, 1,654cm<sup>-1</sup>, 1,619cm<sup>-1</sup>及び 1,541cm<sup>-1</sup>のそれぞれの付近に吸収を認める。

純度試験 類縁物質 本品 25mg を量り, 水を加えて溶かして 25ml とし, 検液とする。この液 5 ml を正確に量り, 水を加えて正確に 50ml とする。この液 5 ml を正確に量り, 水を加えて正確に 50ml とし, 比較液とする。検液及び比較液 20μl につき, 次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行い, 検液の主ピーク以外のピークの面積及び比較液の主ピーク的面積を測定し, 次式より類縁物質の量を求めるとき, 0.50%以下である。

$$\text{類縁物質の量 (\%)} = \frac{\text{検液の主ピーク以外のピークの合計面積}}{\text{標準液の主ピーク的面積}}$$

操作条件 「グルタミルバリングリシン」の定量法の操作条件を準用する。

乾燥減量 1.0%以下 (105°C, 1時間)

定量法 本品約 0.4g を精密に量り, ギ酸 3ml を加えて溶かし, 酢酸 50ml を加え, 0.1mol/L 過塩素酸で滴定する。終点の確認は, 通例, 電位差計を用いる。別に空試験を行い補正し, 更に乾燥物換算する。

0.1mol/L 過塩素酸 1 ml = 30.33mg C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

定量用グルタミルバリングリシン グルタミルバリングリシン, 定量用を見よ。

### グルタミンバリングリシン規格設定の根拠

グルタミンバリングリシンは、第76回(2012年)JECFA会議において、フレーバーの中のE. アミノ酸及び関連物質の一つとして評価され、香料規格が設定されている。また、フレーバーモディファイヤー(うま味調味料)として、FEMA GRAS(FEMA GRAS No. 4709)の認証を取得した。日本では、調味料は香料以外の食品添加物であるため、JECFAの香料規格を参照しつつも、指定要請者により提出された成分規格案(指定要請規格案)を参考に成分規格案を設定した。

#### 含量

JECFAの香料規格では、99.0%以上と規定されているが、指定要請者によれば、FEMAへの申請の際には、製造規格として「>95.0% purity」の情報を記述しており、規格はFEMAに提出した1ロットの分析データのみから規定されたと推察されることであった。また、指定要請の資料によれば、複数ロットの実測定の結果、下限は96.5%、上限は99.0%であったが、定量法は、標準品を対照とするHPLCによる分析であるため、分析のばらつきを考慮してグルタミンバリングリシン( $C_{12}H_{21}N_3O_6$ ) 95.0~102.0% (乾燥物換算)と規定しており、本規格案ではこれを採用した。

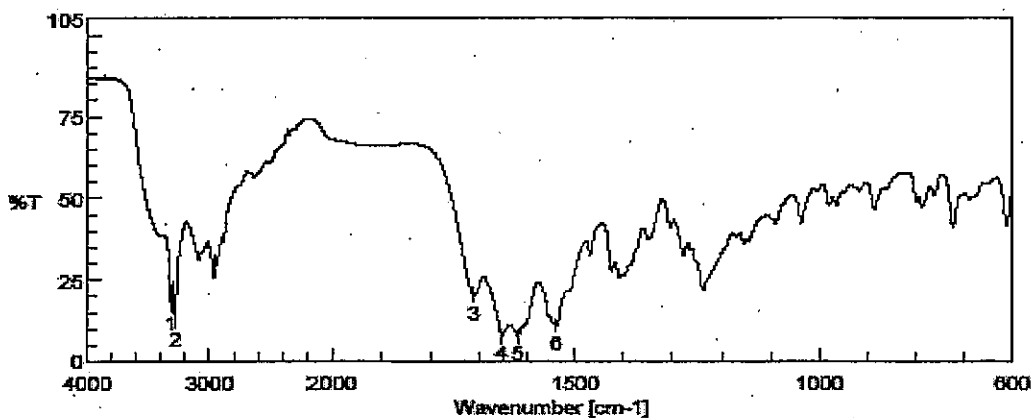
#### 性状

指定要請規格案では、実測定の結果を基に、「本品は白~淡赤色の粉末である。」と規定しており、本規格案ではこれを採用した。

した。

#### 確認試験

指定要請規格案では、確認試験として赤外吸収スペクトル法の臭化カリウム錠剤法が採用され、「本品につき赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法により、試験を行うとき、 $3321\text{cm}^{-1}$ 、 $3282\text{cm}^{-1}$ 、 $1712\text{cm}^{-1}$ 、 $1654\text{cm}^{-1}$ 、 $1619\text{cm}^{-1}$ および $1541\text{cm}^{-1}$ 付近に吸収を認める。」とされていたことから、同法を採用することとした。参考のため、特徴的な吸収波数帯及び赤外吸収スペクトルを示す。



【ピーク検出結果】

No.	位置	強度	No.	位置	強度	No.	位置	強度
1	3319.86	17.0638	2	3282.25	12.1237	3	1711.51	20.2798
4	1653.66	7.75925	5	1519.91	7.72467			
6	1540.85	10.9285						

波数	帰属
3, 321cm <sup>-1</sup> 付近	N-H 伸縮振動
3, 282cm <sup>-1</sup> 付近	N-H 伸縮振動
1, 712cm <sup>-1</sup> 付近	C=O 伸縮振動
1, 654cm <sup>-1</sup> 付近	カルボン酸イオン伸縮振動
1, 619cm <sup>-1</sup> 付近	アミド I 吸収帯
1, 541cm <sup>-1</sup> 付近	アミド II 吸収帯

### 純度試験

(1) 鉛 指定要請規格案では、規格値「Pbとして1.0μg/g以下」が規定され、JECFAにおいても、グルタミン酸塩類の鉛規格を「1μg/g以下」としていることから、試験法は、乾式灰化—原子吸光光度法（フレイム方式）を採用し、「Pbとして1.0μg/g」を採用した。本試験法における添加回収率は、93.6%（相対標準偏差3.4%）と良好であった。

(2) ヒ素 指定要請規格案では、規格値「As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として1.0μg/g以下」が規定されたことから、これを採用した。なお、ヒ素試験法の検液の調製 第1法は、「別に規定する量の試料を量り、水5mlを加え、必要があれば加温して溶かし、検液とする。」と規定されているが、試料2.0gは水5mlに溶けにくいいため、検液の調製には、水20mlを用いることとした。また、本試験法における添加回収率は、89.8%（相対標準偏差1.8%）であった。

乾燥減量 指定要請規格案では、「1.0%以下(105℃, 1時間)」が規定されたことから、これを採用した。なお、実測値は0.13%（相対標準偏差8.5%）であった。

定量法 指定要請規格案では、純度 99.0%以上の定量用グルタミルバリルグリシンを標準物質とする定量法が提案されたことから、本規格案でもこれを採用した。なお、指定要請者の報告書によれば、カラムとして、Hydrosphere C18 (内径 4.6mm, 長さ 25cm, 粒径 5 $\mu$ m, ワイエムシィ) を用い、カラム温度 30 $^{\circ}$ Cで分析した場合、グルタミルバリルグリシンの保持時間は、17.4分であったが、L-column ODS-V (内径 4.6mm, 長さ 25cm, 粒径 5 $\mu$ m, 化学物質評価研究機構) を用いた場合、保持時間は、カラム温度 30 $^{\circ}$ Cでは 23分と遅くなり、他の規格試験法で比較的多く用いられている 40 $^{\circ}$ Cでは 19分と、指定要請者の試験結果と近くなったことから、カラム温度については幅を持たせることとし、「30~40 $^{\circ}$ Cの一定温度」とした。

## これまでの経緯

平成24年12月11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12月17日	第458回食品安全委員会（要請事項説明）
平成25年4月25日	第117回食品安全委員会添加物専門調査会
平成25年5月16日	第118回食品安全委員会添加物専門調査会
平成25年6月24日	第479回食品安全委員会（報告）
平成25年6月25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7月24日）
平成25年8月5日	第484回食品安全委員会（報告）
平成25年8月5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25年11月7日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
平成25年11月27日	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会添加物部会
平成26年1月29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
穠山 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

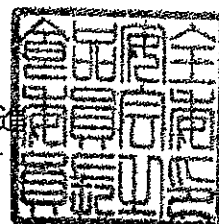




府食第648号  
平成25年8月5日

厚生労働大臣  
田村 憲久 殿

食品安全委員会  
委員長 熊谷 道博



食品健康影響評価の結果の通知について

平成24年12月11日付け厚生労働省発食安1211第1号をもって貴省から当委員会に意見を求められたグルタミルバリルグリシン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。

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

グルタミルバリルグリシン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

## グルタミンバリングリシン

2013年8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.....	3
○要約.....	4
I. 評価対象品目の概要.....	5
1. 用途.....	5
2. 名称.....	5
3. 化学式及び構造式.....	5
4. 分子量.....	5
5. 性状等.....	5
6. 安定性.....	5
7. 評価要請の経緯.....	6
8. 添加物指定の概要.....	7
II. 一日摂取量の推計等.....	7
1. 我が国における一日推定摂取量.....	7
2. 海外における使用量.....	7
III. 安全性に係る知見の概要.....	8
1. 体内動態.....	8
(1) 食品常在成分等への該当性.....	8
(2) その他.....	11
2. 毒性.....	12
(1) 遺伝毒性.....	12
(2) 反復投与毒性.....	13
IV 国際機関等における評価.....	14
1. JECFA における評価.....	14
2. 米国における評価.....	14
V. 食品健康影響評価.....	14
別添 食品添加物が食品内又は消化管内で分解して食品常在成分となることを確認 する場合の検討事項.....	15

別紙 1 : 略称.....	16
別紙 2 : 各種毒性試験成績.....	17
参照.....	18

<審議の経緯>

- 2012年12月12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1211第1号）、関係書類の  
接受
- 2012年12月17日 第458回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2013年4月25日 第117回添加物専門調査会
- 2013年5月16日 第118回添加物専門調査会
- 2013年6月24日 第479回食品安全委員会（報告）
- 2013年6月25日から7月24日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2013年8月1日 添加物専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2013年8月5日 第484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）  
石井 克枝  
上安平 洌子  
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>

（2012年10月1日から）

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

## 要 約

調味料として使用される添加物「グルタミンバリングリシン」(CAS 登録番号：38837-70-6) 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、グルタミンバリングリシンを被験物質とした遺伝毒性、反復投与毒性に関するものである。

本委員会としては、添加物「グルタミンバリングリシン」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)における「食品常在成分であること又は食品内若しくは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、添加物「グルタミンバリングリシン」の安全性について、同指針に基づき、試験の一部について省略し、遺伝毒性及び 28 日間反復投与毒性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、グルタミンバリングリシンについての毒性に係る知見を検討した結果、添加物「グルタミンバリングリシン」については、遺伝毒性、反復投与毒性の懸念はないと判断した。

以上のことから、本委員会としては、添加物「グルタミンバリングリシン」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評価した。

## I. 評価対象品目の概要

### 1. 用途

調味料（参照 1、2）

### 2. 名称

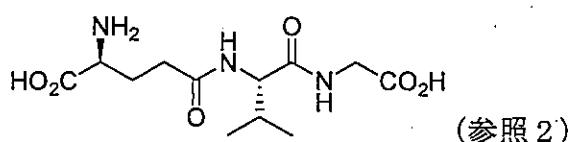
和名：グルタミルバリルグリシン

英名：Glutamyl-valyl-glycine、L-γ-Glutamyl-L-valyl-glycine

CAS 登録番号：38837-70-6（参照 1、2）

### 3. 化学式及び構造式

$C_{12}H_{21}N_3O_6$



### 4. 分子量

303.31(参照 2)

### 5. 性状等

今般、厚生労働省に添加物「グルタミルバリルグリシン」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。）による添加物「グルタミルバリルグリシン」の成分規格案では、含量として「本品を乾燥物換算したものはグルタミルバリルグリシン（ $C_{12}H_{21}N_3O_6$ ）95.0~102.0%を含む」、性状として「本品は、白～淡赤色の粉末である。」とされている。（参照 2、3）

指定等要請者によれば、添加物「グルタミルバリルグリシン」の有効成分の性質は、「白色で無臭の結晶であり、融点は 225~228℃、比旋光度  $[\alpha]_D^{20}$  : -29 ( $c=1.0$ 、 $H_2O$ )、酸解離定数は  $pK_{a1}=2.5$ 、 $pK_{a2}=3.8$ 、 $pK_{a3}=9.6$  である。水に溶けやすく、非極性溶媒に対して溶けにくい。」とされている。（参照 2）

### 6. 安定性

指定等要請者（2011a）の報告によれば、グルタミルバリルグリシンの保存試験（25℃/相対湿度 60%及び 40℃/相対湿度 75%、12 か月間）が実施されている。その結果、保存による含量及び光学異性体の量の変化は認められなかったとされている。類縁物質として $\alpha$ -Glu-Val-Gly が環化したピログルタミン酸

-Val-Gly の温度依存的な生成が認められ、最大で 0.70%であったとされている。  
(参照 4)

指定等要請者 (2011b) の報告によれば、グルタミルバリルグリシンの水溶液中における安定性試験 (50~80°C、pH2~10) が実施されている。その結果、水溶液中のグルタミルバリルグリシンの残存率について、50°C、全ての pH で、48 時間以内の変化は認められなかったとされている。80°Cでは、pH の低下及び経過時間の増加に依存した減少傾向が認められたとされている。(参照 5)

## 7. 評価要請の経緯

指定等要請者によれば、グルタミルバリルグリシンは、 $\gamma$ -グルタミル構造 (グルタミン酸の $\gamma$ 位のカルボキシル基とアミノ酸のアミノ基がペプチド結合した構造) を有し、この構造を持つ種々のペプチドは、にんにくや玉ねぎの他、チーズ、肉、貝、ワインや酒などに含まれており、コク味付与機能を有する物質であるとされている。(参照 6、7、8、9)

指定等要請者によれば、コク味機能はカルシウムセンシングレセプター (CaSR<sup>(1)</sup>) 活性と正の相関を示し、添加物「グルタミルバリルグリシン」は、コク味を有する物質として知られているグルタチオン (GSH) の約 10 倍の CaSR 活性を有するとされている。(参照 2)

添加物「グルタミルバリルグリシン」について、外国における使用実績は認められていない。

今般、添加物「グルタミルバリルグリシン」について、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たことから、厚生労働省は、添加物の指定及び規格基準の設定の検討を開始するに当たり、食品安全基本法第 24 条第 1 項第 1 号の規定に基づき、食品安全委員会に食品健康影響評価を依頼したものである。(参照 1)

なお、添加物「グルタミルバリルグリシン」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。) 及び「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について」(平成 8 年 3 月 22 日衛化第 29 号厚生省生活衛生局長通知) (以下「平成 8 年厚生省ガイドライン」という。) に基づき、「食品常在成分であること又は食品内若しくは消化管内で分解して食品常在成分となることが科学的に明らかの場合」

<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。



として、毒性に関する資料の添付が一部省略されて資料の整理が行われている。  
(参照 10)

## 8. 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、添加物「グルタミンバリングリシン」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)

## II. 一日摂取量の推計等

### 1. 我が国における一日推定摂取量

指定等要請者によれば、添加物「グルタミンバリングリシン」は、スープやスナックといった GSH 高含有の調味料が使用されている食品群のほか、アイスクリーム、チーズやヨーグルトといったコク味が好まれる食品群に、平均添加濃度 15~80 ppm、また最大添加濃度 30~160 ppm で使用するものとされている。添加物「グルタミンバリングリシン」の使用が想定されるそれぞれの食品分類の一日摂取量の全年齢平均値と添加物「グルタミンバリングリシン」の最大添加濃度を乗じて各食品分類から摂取される添加物「グルタミンバリングリシン」の量を求め、これらを合計して添加物「グルタミンバリングリシン」の推定一日摂取量を算出すると、約 44 mg/人/日 (約 0.88 mg/kg 体重/日) になるとされている。(参照 2、11)

指定等要請者によれば、グルタミンバリングリシンの使用が想定される食品(コーヒー飲料、アイスクリーム、飲料、マーガリン、クリーマー、ビール様飲料、スープ類、つゆ・たれ類、粉体調味料、ハム・ソーセージ、乳系使用冷凍食品)の市場規模は、8,400,000 トンとされている。平均的な喫食時濃度を 40 ppm とし、すべての商品に添加されるわけではないことから納入率 1%とすると年間消費量は約 4,000 kg と計算される。日本の人口 1 億 2751 万人の 1 割がグルタミンバリングリシンを摂取すると想定すると、推定一日摂取量は 0.859 mg/人/日 (約 0.017 mg/kg 体重/日) になるとされている。(参照 2、12)

本委員会としては、添加物「グルタミンバリングリシン」の推計値が過小にならないよう留意し、一日摂取量を 44 mg/人/日 (0.88 mg/kg 体重/日) と考えた。

### 2. 海外における使用量

指定等要請者によれば、添加物「グルタミンバリングリシン」の米国におけ

る各食品カテゴリーの最高濃度と各食品の摂取量を乗じて添加物「グルタミンルバリングリシン」の一日摂取量を算出すると、32.63 mg/人/日となり、米国人の平均体重 60kg とすると、約 0.54 mg/kg 体重/日とされている。(参照 2、13、14)

### Ⅲ. 安全性に係る知見の概要

#### 1. 体内動態

##### (1) 食品常在成分等への該当性

添加物「グルタミンルバリングリシン」は、トリペプチドであることから、食品由来のたん白質と同じように、消化管において速やかに食品成分に分解されると推定される。このことをより明らかにするため、指針における「食品常在成分であること又は食品内若しくは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な場合」に該当するかどうかについて、以下のとおり整理した。

##### ① 食品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 (2010a) の報告によれば、グルタミンルバリングリシンを人工胃液に 20 ppm (66.6  $\mu$ M) の濃度で添加し、37°C で 0、2、4、6 時間インキュベートする試験が実施されている。その結果、6 時間後、グルタミンルバリングリシンについて 97% (60.5  $\mu$ M) の残存が認められたとされている。(参照 15)

指定等要請者 (2010b) の報告によれば、グルタミンルバリングリシンを人工腸液に 5 ppm (15.5  $\mu$ M) の濃度で添加し、37°C で 0、3、6 時間インキュベートする試験が実施されている。その結果、6 時間経過後、グルタミンルバリングリシンについて約 40% (6.17  $\mu$ M) の残存、L-valyl-glycine (VG) について 2.93  $\mu$ M の生成が認められたとされている。(参照 16)

指定等要請者 (2010c) の報告によれば、グルタミンルバリングリシンをヒト小腸粘膜ホモジネートに 5 ppm (15.5  $\mu$ M) の濃度で添加し、37°C で 0、10、30、60、90 分間インキュベートする試験が実施されている。その結果、グルタミンルバリングリシンについて 30 分後に 19.5% (2.99  $\mu$ M) の残存、90 分後に 2.0% (0.31  $\mu$ M) の残存が認められたとされている。VG について 10~60 分後に 3.18  $\mu$ M まで増加が認められたが、90 分後には当初と同濃度になったとされている。(参照 17)

指定等要請者（2010d）の報告によれば、グルタミルバリルグリシンをヒト小腸粘膜マイクロソーム画分に 5 ppm (15.5  $\mu$ M) の濃度で添加し、37°C で 0、5、10、15、30、60 分間インキュベートする試験が実施されている。その結果、グルタミルバリルグリシンについて 15 分後に定量限界未満となったとされている。VG について 5 分後をピークとして 11.27  $\mu$ M まで増加、その後 6.01  $\mu$ M まで減少が認められたとされている。（参照 1 8）

指定等要請者（2011）の報告によれば、食品中のグルタミルバリルグリシン並びに分解物（L- $\gamma$ -glutamyl-L-valine ( $\gamma$ EV) 及び VG) について、含有量を分析する試験が実施されている。その結果、分析を行った 66 食品中、魚醤、調味料、乳製品、魚介等の 41 食品でグルタミルバリルグリシン (0.1~48.3 ppm) が認められたとされている。また、分解物である  $\gamma$ EV 及び VG については、多くのサンプルにおいてグルタミルバリルグリシンよりも高い濃度 ( $\gamma$ EV : 0.01~378.6 ppm、VG : 0.1~850.4 ppm) が認められたとされている。（参照 1 9）

Toelstede ら（2009）の報告によれば、各種チーズにおける  $\gamma$ EV の含有量を測定する試験が実施されている。その結果、数種チーズにおいて高濃度 (234.4 ppm 以下) の  $\gamma$ EV が認められたとされている。（参照 9）

指定等要請者は、添加物「グルタミルバリルグリシン」は、胃ではほとんど分解されないが、小腸で一部が分解される他、小腸粘膜の主にマイクロソーム画分に含まれる成分により速やかに VG に分解され、更に VG もバリンとグリシンに分解されることが確認されたとしている。したがって、グルタミルバリルグリシンは、消化管内で分解してグルタミン酸、バリン及びグリシンを生じると推定される。また、グルタミルバリルグリシン及びその分解物と想定される  $\gamma$ EV 及び VG は種々の食品中に含まれることも認められている。（参照 2）

以上より、本委員会としては、①の事項が確認されると考えた。

- 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。

指定等要請者は、上述の人工胃液、人工腸液、ヒト小腸粘膜ホモジネート液、ヒト小腸粘膜マイクロソーム画分による試験の結果、グルタミルバリルグリシンが  $\gamma$ グルタミル基を有するトリペプチドであること、主要代謝物が VG であることから、グルタミルバリルグリシンは、膜たん白として小腸に発現し、 $\gamma$ グルタミル基を転移させる gamma-glutamyl-

transpeptidase によって分解される可能性が推察されるとしている。(参照 2、15、16、17、18)

以上より、本委員会としては、②の事項が確認されると考えた。

- ③ 食品添加物の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、当該食品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。

指定等要請者は、添加物「グルタミルバリルグリシン」の一日摂取量(約 44 mg/人/日)は、日本人のたん白質の平均一日摂取量(67.3 g/人/日)の 0.065%に過ぎないとしている。したがって、仮にグルタミルバリルグリシンが未変化体のまま全て吸収されたとしても、一日の総たん白質摂取量に与える影響はほとんどないとしている。また、上述のとおり、グルタミルバリルグリシンは消化管で速やかにジペプチドやアミノ酸に分解され、他の食品のたん白質、ペプチド又はアミノ酸と同様に生体に利用されるとしている。(参照 2、20)

日本食品標準成分表準拠アミノ酸成分表 2010 によれば、食品可食部のたん白質 1 g に含まれる各アミノ酸は、グルタミン酸で 70~410 mg、バリンで 26~84 mg、グリシンで 20~290 mg とされている(参照 21)。たん白質の平均一日摂取量が 67.3 g/人/日であることから、食事由来の各アミノ酸の一日摂取量は、グルタミン酸で約 4.7~28 g/人/日、バリンで約 1.7~6 g/人/日、グリシンで約 1.3~19 g/人/日と考えられる。添加物「グルタミルバリルグリシン」の推定一日摂取量が約 44 mg/人/日であることから、添加物「グルタミルバリルグリシン」に由来する各アミノ酸の一日摂取量は、グルタミン酸で約 21 mg/人/日、バリンで約 17 mg/人/日、グリシンで約 11 mg/人/日と考えられる。食事由来の各アミノ酸の一日摂取量と添加物「グルタミルバリルグリシン」の摂取に由来する各アミノ酸の一日摂取量を比較すると、添加物「グルタミルバリルグリシン」の摂取によるアミノ酸の摂取量への影響は少ないと考えられる。

以上より、本委員会としては、③の事項が確認されると考えた。

- ④ 摂取された食品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。

指定等要請者は、上述のとおり、グルタミルバリルグリシンは消化管で速やかにジペプチドやアミノ酸に分解され、他の食品のたん白質、ペプチ

ド又はアミノ酸と同様に生体に利用されるとしている。また、グルタミルバリルグリシンの推定摂取量は総たん白質摂取量の0.065%と微量であり、添加物「グルタミルバリルグリシン」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ることは考えにくく、また生体組織中に蓄積する懸念はないとしている。(参照2、15、16、17、18)

以上より、本委員会としては、④の事項が確認されると考えた。

⑤ 食品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。

上述のとおり、指定等要請者は、添加物「グルタミルバリルグリシン」の一日摂取量(約44 mg/人/日)は、日本人のたん白質の平均一日摂取量(67.3 g/人/日)の0.065%に過ぎないとしている。(参照2) また、上述のとおり、食事由来の各アミノ酸の一日摂取量と添加物「グルタミルバリルグリシン」の摂取に由来する各アミノ酸の一日摂取量を比較すると、添加物「グルタミルバリルグリシン」の摂取によるアミノ酸の摂取量への影響は少ないと考えられる。

以上より、本委員会としては、⑤の事項が確認されると考えた。

以上より、本委員会としては、添加物「グルタミルバリルグリシン」が指針における「食品常在成分であること又は食品内若しくは消化管内で分解して食品常在成分となることが科学的に明らかな場合」に該当すると判断した。

(2) その他

グルタミルバリルグリシンは、上述のとおり消化管内でジペプチドであるVGに分解されるとされている。ここでは、VGによるアンジオテンシン変換酵素阻害に伴う血圧降下等の薬理作用発現の可能性について検討を行った。

Cheungら(1980)の報告によれば、ウサギ肺細胞ホモジネートから精製したアンジオテンシン変換酵素に各種ジペプチドを添加し、酵素阻害活性を検討する試験が実施されている。その結果、VGのIC<sub>50</sub>は1,100 μMであったとされている。(参照22)

以上より、本委員会としては、アンジオテンシン変換酵素に対するVGのIC<sub>50</sub>は、添加物「グルタミルバリルグリシン」を摂取することにより体内で生成するVGの濃度に比較して十分高いことから、アンジオテンシン変換酵素の阻害による血圧降下等の懸念はないと考えた。

## 2. 毒性

上述のとおり、添加物「グルタミンバリングリシン」については、指針における「食品常在成分であること又は食品内若しくは消化管内で分解して食品常在成分となることが科学的に明らかな場合」に該当すると考えた。したがって、本委員会としては、添加物「グルタミンバリングリシン」の毒性について、指針に基づき試験の一部について省略し、遺伝毒性及び28日間反復投与毒性に係る試験成績を用いて検討を行うこととした。

### (1) 遺伝毒性

#### ① 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(2010e)によれば、添加物「グルタミンバリングリシン」について、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(最高濃度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、復帰突然変異コロニー数の用量依存性のある2倍以上の増加は認められず、遺伝子突然変異誘発作用は認められなかったとされている。(参照23)

#### ② 染色体異常を指標とする試験

##### a. ほ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(2010f)によれば、添加物「グルタミンバリングリシン」について、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽培養細胞を用いた染色体異常試験(短時間処理法及び連続処理法ともに:最高濃度3,100 µg/mL)が実施されており、代謝活性化系の有無にかかわらず、構造異常及び倍数性異常出現率の増加は認められず、陰性であったとされている。(参照24)

##### b. げっ歯類を用いる小核試験

指定等要請者委託試験報告(2010g)によれば、8週齢のICRマウス(各群雄5匹)に添加物「グルタミンバリングリシン」(500、1,000、2,000 mg/kg 体重/日)を約24時間間隔で2回経口投与する小核試験が実施されており、陰性であったとされている。(参照25)

本委員会としては、以上の結果から、添加物「グルタミンバリングリシン」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遺伝毒性試験において、遺伝子突然変異誘発性及び染色体異常誘発性、小核試験のい

れも陰性であることから、生体にとって特段問題となる遺伝毒性は認められないと判断した。

## (2) 反復投与毒性

指定等要請者委託試験報告(2010h)によれば、6週齢のSDラット(各群雌雄各10匹)に添加物「グルタミルバリルグリシン」(0、100、300、1,000 mg/kg 体重/日:平均被験物質摂取量はそれぞれ雄で0、113.9、336.5、1,112.7 mg/kg 体重/日、雌で114.0、327.9、1,123.8 mg/kg 体重/日)を28日間混餌投与する試験が実施されている。その結果、投与期間中のいずれの投与群においても死亡は認められず、一般状態、機能検査、握力、自発運動量、体重、摂餌量、摂水量、眼科学的検査、血液学的検査、剖検及び病理組織学的検査のいずれの検査項目においても被験物質投与に起因すると考えられる変化は認められなかったとされている。尿検査において、300 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で、たん白尿陽性例の増加傾向が認められたとされているが、試験実施者は、腎臓等の臓器障害を示唆する血液生化学的検査、解剖検査若しくは病理組織学的検査の変化が認められなかったことから、毒性学的意義のない変化と考えられるとしている。血液生化学的検査において、尿素窒素及びクレアチニンについて、1,000 mg/kg 体重/日投与群の雄に減少が認められたが、試験実施者は、増加ではないことから毒性学的意義のない変化であるとしている。器官重量について、100及び1,000 mg/kg 体重/日投与群の雌で脾臓の相対及び絶対重量の減少、300 mg/kg 体重/日投与群の雌で胸腺の相対及び絶対重量の減少、肺及び腎臓の相対重量の増加が、100 mg/kg 体重/日投与群の雄で副腎の相対重量の減少が認められたが、試験実施者は、いずれも用量に関連した変化ではなく、試験施設の背景値の範囲内の軽微な変化であり、血液学的検査や脾臓を含むリンパ・造血器系の病理組織学的検査で異常は認められなかったことから、毒性学的意義のない変化と考えられるとしている。以上の結果から、試験実施者及び指定等要請者は、グルタミルバリルグリシンのNOAELを雌雄ともに最高用量である1,000 mg/kg 体重/日(雄で1,112.7 mg/kg 体重/日、雌で1,123.8 mg/kg 体重/日)を上回るものと判断している(参照26)。本委員会としては、尿検査で認められたたん白尿陽性例について、100 mg/kg 体重/日以上投与群の雄で増加傾向を認めるものとするが、毒性学的意義のない変化と考えること及びその根拠については同意する。血液生化学的検査で認められた尿素窒素及びクレアチニンの減少について、毒性学的意義のない変化と考えることには同意するが、その根拠は軽微な変化であり、栄養状態や尿量に特段の異常がなく、筋肉等の臓器障害を示唆する血液生化学的検査、解剖検査又は病理組織学的検査の変化が認められなかったことに求めるべきであるとする。その他については、試験実施者の意見に同意する。以上より、本委員会としては、本試験におけるNOAEL

を雌雄ともに本試験の最高用量である 1,000 mg/kg 体重/日（雄で 1,112.7 mg/kg 体重/日、雌で 1,123.8 mg/kg 体重/日）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

2012 年、JECFA は、添加物「グルタミンバリングリシン」の評価を行っている。評価の結果、添加物「グルタミンバリングリシン」は、フレーバーの中の「AMINO ACIDS AND RELATED SUBSTANCES」グループで構造クラス I として評価され、「No safety concern」と判断されたとされている。（参照 27）

##### 2. 米国における評価

2010 年 2 月、FEMA expert panel は、添加物「グルタミンバリングリシン」について、指定の使用範囲において GRAS (FEMA GRAS No. 4709) 認証し、2011 年には使用範囲の拡大が認定されたとされている。（参照 13、14）

#### V. 食品健康影響評価

本委員会としては、添加物「グルタミンバリングリシン」が「添加物に関する食品健康影響評価指針」における「食品常在成分であること又は食品内若しくは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、添加物「グルタミンバリングリシン」の安全性について、同指針に基づき、試験の一部について省略し、遺伝毒性及び 28 日間反復投与毒性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、グルタミンバリングリシンについての毒性に係る知見を検討した結果、添加物「グルタミンバリングリシン」については、遺伝毒性、反復投与毒性の懸念はないと判断した。

以上のことから、本委員会としては、添加物「グルタミンバリングリシン」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評価した。



別添 食品添加物が食品内又は消化管内で分解して食品常在成分となることを確認する場合の検討事項（平成8年厚生省ガイドライン 表2より）

1. 食品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。
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。
3. 食品添加物の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、当該食品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。
4. 摂取された食品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。
5. 食品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。

<別紙1：略称>

略称	名称等
CaSR	カルシウムセンシングレセプター
EU	European Union：欧州連合
FEMA	Flavor and Extract Manufactures Association
GRAS	Generally Recognized As Safe：一般的に安全とみなされる
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives： FAO/WHO：合同食品添加物専門家会議
Glu	Glutamic Acid：グルタミン酸
Gly	Glycine：グリシン
GSH	グルタチオン
$\gamma$ EV	L- $\gamma$ -glutamyl-L-valine：L- $\gamma$ -グルタミル-L-バリン
Val	Valine：バリン
VG	L-valyl-glycine：L-バリル-グリシン

＜別紙2：各種毒性試験成績＞

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> WP2184		<i>in vitro</i>		グルタミルババリ ルグリシン	最高用量 5 mg/plate	代謝活性化系の有無にかかわらず、復帰突然変異コロニー数の用量依存性のある2倍以上の増加は認められず、遺伝子突然変異誘発作用は認められなかったとされている。	指定等要請者委託試験報告(2010e) 参照 2 3
遺伝毒性	染色体異常試験	チャイニーズ・ハム スター肺由来線維芽 培養細胞		<i>in vitro</i>		グルタミルババリ ルグリシン	最高濃度 3,100 µg/mL	代謝活性化系の有無にかかわらず、構造異常及び倍数性異常出現率の増加は認められず、陰性であったとされている。	指定等要請者委託試験報告(2010f) 参照 2 4
遺伝毒性	げっ歯類を用いる小核試験	ICRマウス	約24時間 間隔で2 回	経口投与	各群雄5 匹	グルタミルババリ ルグリシン	500、1,000、 2,000 mg/kg 体 重/日	陰性であったとされている。	指定等要請者委託試験報告(2010g) 参照 2 5
反復致毒性	28日間試験	ラット	28日間	経口投与	各群雄雌 各10匹	グルタミルババリ ルグリシン	0、100、300、 1,000 mg/kg 体 重/日	本委員会としては、本試験におけるNOAELを雌雄共に本試験の最高用量である1,000 mg/kg 体重/日(雄で1,112.7 mg/kg 体重/日、雌で1,123.8 mg/kg 体重/日)と判断した。	指定等要請者委託試験報告(2010h) 参照 2 6

<参照>

- 1 厚生労働省, 「グルタミンバリルグリシン」の添加物指定及び規格基準設定に関する食品健康影響評価について, 第458回食品安全委員会(平成24年12月17日)
- 2 味の素株式会社, 食品添加物の指定要請添付資料 グルタミンバリルグリシン, 2012年12月6日
- 3 味の素株式会社社内資料, 代表的なIRスペクトル, 2009年10月6日
- 4 味の素株式会社社内資料, KF001の保存安定性, 2011年3月8日 a
- 5 味の素株式会社社内資料, 試験報告書 調理条件を想定した水溶液中の Glutamyl-valyl-glycine 安定性試験, 2011年11月22日 b
- 6 Ueda Y, Sakaguchi M, Hirayama K, Miyajima R and Kimizuka A: Characteristic Flavor Constituents in Water Extract of Garlic. *Agri Biol Chem* 1990; 54(1): 163-9
- 7 Ichikawa M, Ide N, Ono K: Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 4849-54
- 8 Shaw ML, Pither-Joyce MD, McCallum JA: Purification and cloning of a  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase from onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 2005; 66: 515-22
- 9 Toelstede S and Hofmann T: Kokumi-Active Glutamyl Peptides in Cheeses and Their Biogenesis by *Penicillium roquefortii*. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 3738-48
- 10 厚生省, 食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針について(平成8年3月22日衛化第29号)
- 11 味の素株式会社社内資料, Glutamyl-valyl-glycine が添加される食品分類と Glutamyl-valyl-glycine の最大摂取量, 2012年6月22日
- 12 味の素株式会社社内資料, 日本国内事業市場規模から算出したグルタミンバリルグリシンの1日摂取量, 2012年6月21日
- 13 味の素株式会社社内資料, Letter from the FEMA expert panel dated February 19, 2010

- 
- 14 味の素株式会社社内資料, Letter from the FEMA expert panel dated Feburary 28, 2011 (additional food categories)
  - 15 味の素株式会社社内資料, The *in vitro* study on the degradation of KF001 in the simulated gastric fluid, 2010年1月15日 a (2012年1月18日修正)
  - 16 味の素株式会社社内資料, The *in vitro* study on the degradation of KF001 (5 ppm) in the simulated intestinal fluid, 2010年1月15日 b (2012年1月18日修正)
  - 17 味の素株式会社社内資料, The *in vitro* study on the degradation of KF001 (5 ppm) in the homogenate of human small intestinal mucosa, 2010年1月15日 c
  - 18 味の素株式会社社内資料, The *in vitro* study on the degradation of KF001 (5 ppm) in the microsomal fraction from human small intestinal mucosa, 2010年1月15日 d
  - 19 味の素株式会社社内資料, 食品中における Glutamyl-valyl-glycine ならびにその想定加水分解物の分析, 2011年10月
  - 20 厚生労働省, 平成21年国民健康・栄養調査報告  
(<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyou/dl/h22-houkoku-07.pdf>)
  - 21 文部科学省, 日本食品標準成分表準拠 アミノ酸成分表 2010
  - 22 Cheung HS, Wang FL, Ondetti MA, Sabo EF and Cushman DW: Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. J Biol Chem 1980; 255(2): 401-7.
  - 23 (株)ボゾリサーチセンター, 最終報告書 KF001 の細菌を用いる復帰突然変異試験(試験番号 T-0564), 2010年12月13日(指定等要請者委託試験報告 2010e)
  - 24 (株)ボゾリサーチセンター, 最終報告書 KF001 の哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験(M-1437), 2010年12月13日(指定等要請者委託試験報告 2010f)
  - 25 (株)ボゾリサーチセンター, 最終報告書 KF001 のマウスを用いた小核試験(M-1432), 2010年12月10日(指定等要請者委託試験報告 2010g)
  - 26 (株)ボゾリサーチセンター, 最終報告書 KF001 のラットを用いた28日間混餌

---

投与毒性試験, 2010年12月17日(指定等要請者委託試験報告 2010h)

- <sup>27</sup> In WHO and FAO(ed.), Technical Report Series 974, Evaluation of Certain Food Additive, Seventy- sixth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 2012; pp. 55-60

**グルタミンバリングリシン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6月25日～平成25年7月24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 1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	1. 科学的に論証された資料です。よく理解できました。 2. 専門委員会が導き出した日本人における一日摂取量の査定は妥当です。 3. 日本にも米国と同様な GRAS 認証制度(?)を期待いたします。	1及び2について 御意見をいただき、ありがとうございました。 3について いただいた御意見については、関係機関(厚生労働省)とも共有させていただきます。

※頂いた意見・情報をそのまま掲載しています。







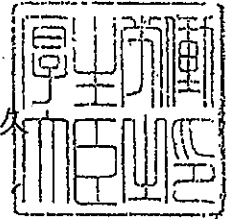
厚生労働省発食安0320第1号

平成26年3月20日

薬事・食品衛生審議会

会長 西島 正弘 殿

厚生労働大臣 田村 憲久



諮 問 書

食品衛生法（昭和22年法律第233号）第10条及び第11条第1項の規定に基づき、下記の事項について、貴会の意見を求めます。

記

1. アスパラギナーゼ（*Aspergillus niger* ASP-72株を用いて生産されたもの）の添加物としての指定の可否について
2. アスパラギナーゼ（*Aspergillus niger* ASP-72株を用いて生産されたもの）の添加物としての使用基準及び成分規格の設定について

平成26年5月15日

薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会  
分科会長 岸 玲子 殿

薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会  
添加物部会長 若林 敬二

食品添加物の指定等に関する薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会添加物部会報告について

平成26年3月20日付け厚生労働省発食安0320第1号をもって厚生労働大臣から諮問された、下記の事項について、当部会において審議を行った結果を別添のとおり取りまとめたので、これを報告する。

記

1. アスパラギナーゼ (*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたもの) の添加物としての指定の可否について
2. アスパラギナーゼ (*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたもの) の添加物としての使用基準及び成分規格の設定について

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。

```
MPLKPILLSALASLASASPLLYSRTTNETFVFTNANGLNFTQMNTLTPNVTIFATGGTIAGSDSSSTATGTYT  
SGAVGVLSLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEDITSDILISMSKLNRYVCCEDPTMAGAVITHGTDITLEETA  
FFLDATVNCCKPIVIVGAMRPSTAISADGPFNLLEAVTVAASTSARDRGAMVVMNDRIASAYVYTKTNANTMD  
TFKAMEMGYLGEMISNTPFFFYPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNAISSGAQGIVIAG  
AGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQSMRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQKSRILLGLLLSQGKNI  
TEIADVFAFGTDA
```

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 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

アスパラギナーゼは、*Aspergillus 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 *A. niger*

ASP-72株を用いて生産されるものである。アスパラギナーゼは、アクリルアミド<sup>1</sup>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<sup>2</sup>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。

<sup>1</sup> 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。

<sup>2</sup> 「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。

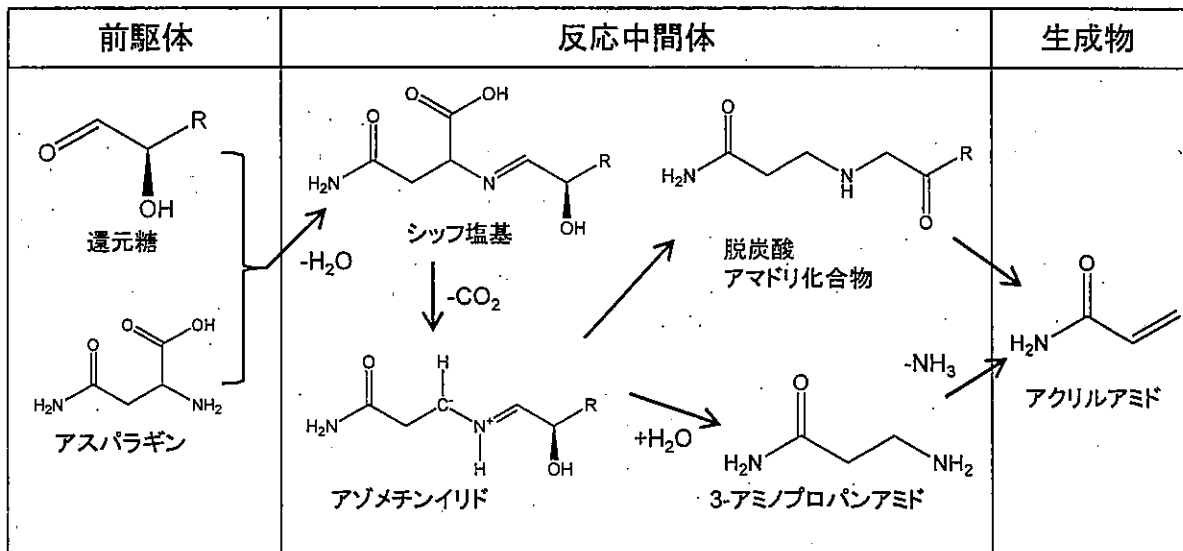


図1 食品中のアクリルアミドの主な生成経路<sup>3</sup>

## (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<sup>4</sup>、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（GSFA<sup>5</sup>（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

<sup>3</sup> 「食品中のアクリルアミドを低減するための指針（第1版）」（2013年11月 農林水産省）より抜粋

<sup>4</sup> 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。

<sup>5</sup> 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。

(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。

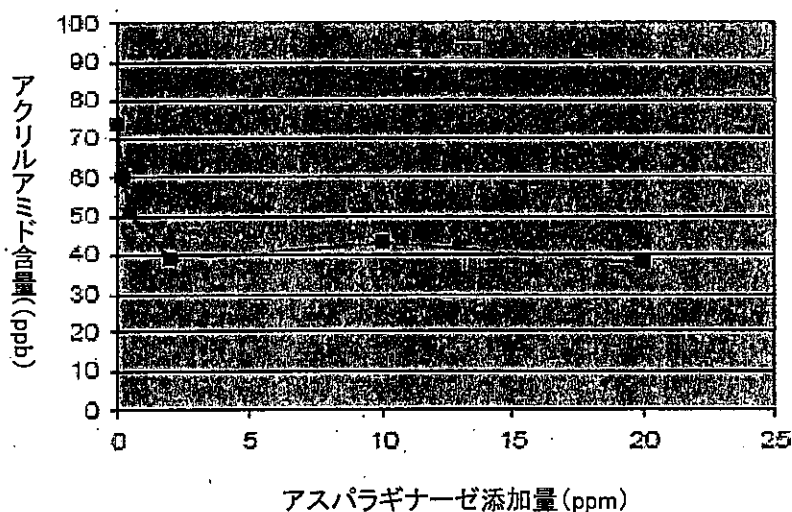


図2-1 パンにアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(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。

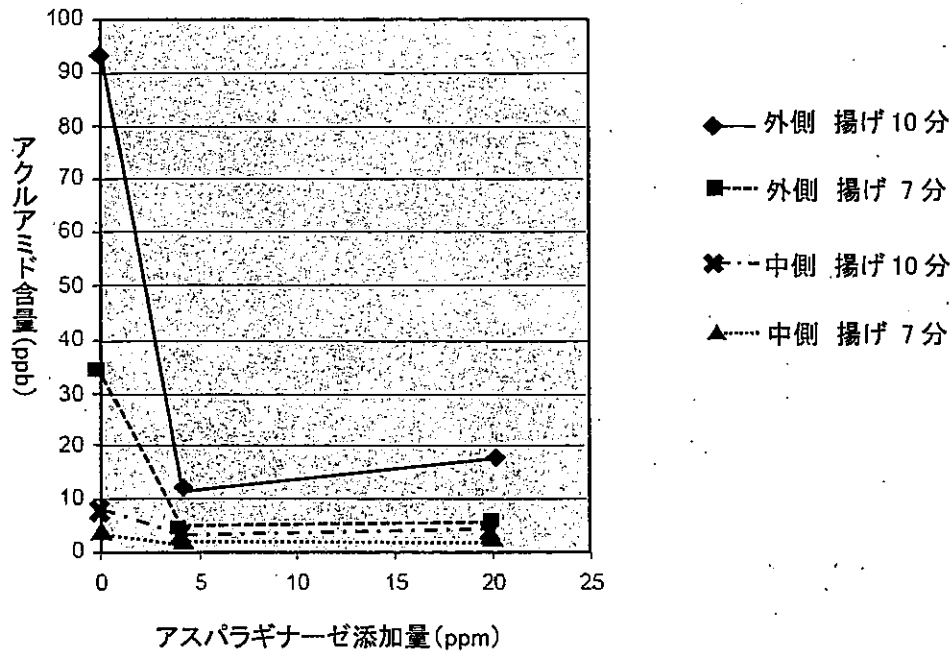


図 2-2 ドーナツにアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(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°C 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。

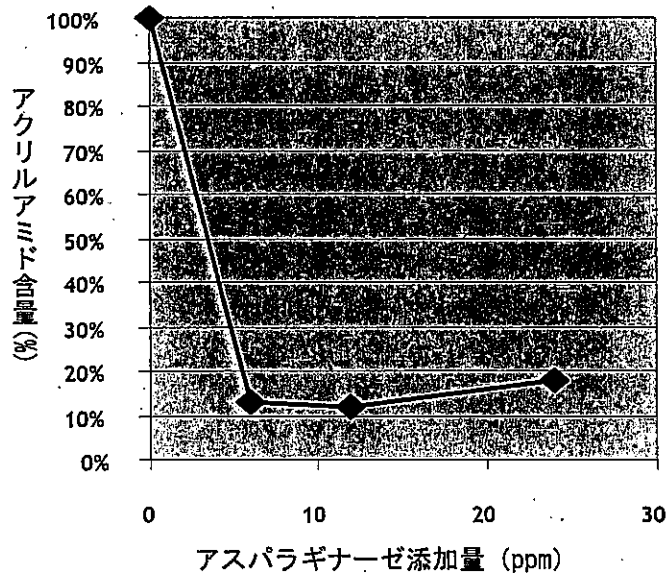


図 2-3 クラッカーの生地 にアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(iv) 調味料

酵母エキスに 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。



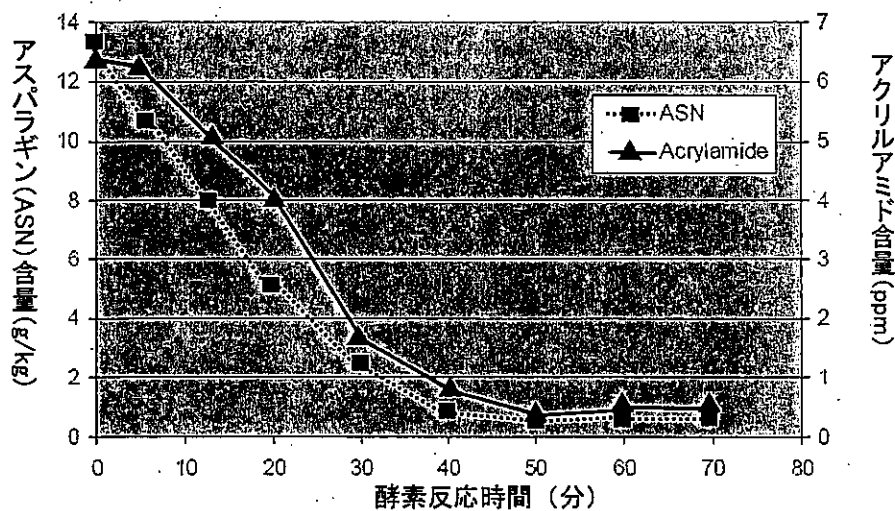


図3 ジャがいも生地にアスパラギナーゼを添加した場合の揚げじゃがいも中のアスパラギン及びアクリルアミドの低減効果

(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<sup>6</sup>。

(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大部分は失活すると考えられる。

(3) 食品中の栄養素に及ぼす影響

食品中のアスパラギン及びアスパラギン酸の量に影響を与える。

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

<sup>6</sup> 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。

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、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NOEL 1,038 mgTOS<sup>7</sup>/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

<sup>7</sup> 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4.1mgTOS/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50kgとして、別紙3の表2のとおり、0.549mgTOS/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、0.549mgTOS/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 2,375 単位以上の酵素活性を有する。

**性状** 本品は、黄～褐色の澄明な液体又はごくうすい灰み若しく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 $\mu$ 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碎き、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 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として4.0 $\mu$ 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

4,000 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°C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°C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°C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°C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°C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°C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  $\mu$ 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・試液

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～褐色の澄明な液体又はごくうすい灰み若しく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 $\mu$ 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]

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1,000mlとする。

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。

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。

## 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°C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、1g 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/25g試料、大腸菌群：30/g以下、大腸菌：不検出/25g）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（5mg/kg以下）、ヒ素（3mg/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（As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>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（As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>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1g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。	(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 <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 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
穠山 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



府 食 第 9 . 7 号

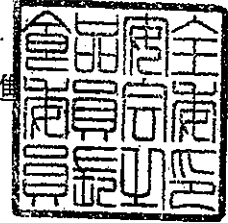
平成 2 6 年 1 月 2 7 日

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

<参考人>

鎌田 洋一  
手島 玲子  
戸塚 ゆ加里  
北條 仁

(2013年10月1日から)

梅村 隆志 (座長)  
頭金 正博 (座長代理)  
龜山 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



## 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<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)

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)

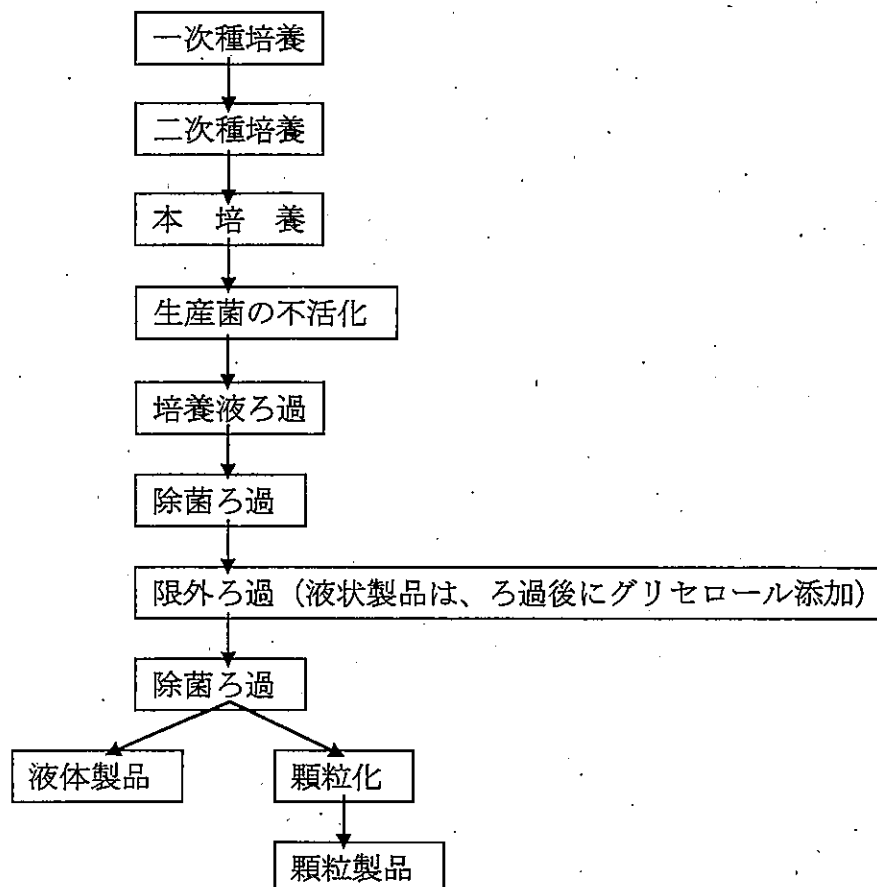
#### (2) 製造方法

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<sup>(2)</sup>/mL 及び 2,500 ASPU/g に調整されるとされている。(参照 2)

<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。

<sup>2</sup> 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 1µmol 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
TQMNTTLPNVTIFATGGTIAGSDSSSTATGTYTSGAVGVL	80
SLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEDTSDILISMSKKL	120
NRVVCEDPTMAGAVITHGTDLEETAFFLDATVNCGKPIV	160
IVGAMRPSTAISADGPFNLLEAVTVAASTSARDRGAMVVM	200
NDRIASAYYVTKTNANTMDTFKAMEMGYLGEMISNTPFFF	240
YPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNA	280
ISSGAQGIVIAGAGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQS	320
MRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQKSRILLGLLLS	360
QGKNITELADVFLGTDA	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」であるとされている。(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<sup>3)</sup>。(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)

<sup>3)</sup> 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、トリコテセ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B<sub>2</sub>、B<sub>4</sub>又はB<sub>6</sub>のいずれかが検出されたとされている。（参照12）

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<sup>4</sup>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13）

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14、15）

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B<sub>2</sub>、B<sub>4</sub>

<sup>4</sup> ツァベ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 B<sub>6</sub>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 B<sub>1</sub>及び B<sub>2</sub><sup>5)</sup>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  $\alpha$ -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、 $\alpha$ -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、 $\beta$ -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  $\alpha$ -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、 $\beta$ -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

<sup>5</sup> フモニシン B<sub>1</sub>及び B<sub>2</sub>のほか、3-AC-デオキシニバレノール、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>、デオキシニバレノール、ジアセトキシスシルベノール、HT2 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、T2 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 B<sub>1</sub>及び B<sub>2</sub>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0<sup>6</sup>、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ExPASy<sup>7</sup>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<sup>8</sup>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)

<sup>8</sup> 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%<sup>9)</sup>；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。

<sup>9</sup> 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、SDAP<sup>(10)</sup>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<sup>(11)</sup>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勧告して、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25)
遺伝毒性	染色体異常常試験	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26)
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、 34,552 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、試験担当者からの考察に加え、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。	指定等要請者委託試験報告 (2006c) (参照27)

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30)

<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・ペストリー類	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, Maisson-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.

- 1<sup>1</sup> Nyiredy I, Etter L, Fesus I and Mayer G: The fate of mould "spores" in the digestive tract of chicks. *Acta Vet Acad Sci Hung* 1975; 25: 123-8
- 1<sup>2</sup> 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
- 1<sup>3</sup> 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)
- 1<sup>4</sup> 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
- 1<sup>5</sup> 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
- 1<sup>6</sup> 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)
- 1<sup>7</sup> 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)
- 1<sup>8</sup> 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)
- 1<sup>9</sup>  $\alpha$ -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,  $\alpha$ -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,  $\beta$ -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
- 2<sup>0</sup> 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<sup>1</sup> 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<sup>2</sup> 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<sup>3</sup> 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<sup>4</sup> 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<sup>5</sup> van den Wijngaard MJM (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Naturwetenschappelijk 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<sup>6</sup> Usta B and de Vogel N (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Naturwetenschappelijk 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<sup>7</sup> Lina BAR (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Naturwetenschappelijk 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<sup>8</sup> 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<sup>9</sup> 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)
- 2<sup>0</sup> Tegelenbosch-Schouten MM (TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast Naturwetenschappelijk 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)

- <sup>31</sup> 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)
- <sup>32</sup> 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.
- <sup>33</sup> Ivanciuc O, Schein CH and Braun W: SDAP: database and computational tools for allergenic proteins. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(1): 359-362
- <sup>34</sup> 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
- <sup>35</sup> 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.
- <sup>36</sup> Foods Standards Australia New Zealand, Application A1003, Asparaginase from *Aspergillus niger* as a processing aid (enzyme) approval report, 1 October, 2008.