

アスパラギナーゼに係る意見募集の結果について

- 食品添加物「アスパラギナーゼ」については、平成 26 年 6 月 4 日に開催された薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会にて食品添加物への指定及び規格基準の設定について了承されたところである。
 - 平成 26 年 6 月 16 日～7 月 15 日にパブリックコメントを行い、食品添加物への指定及び規格基準の設定について意見を募集したところ、5 件の意見が寄せられた（別添 1 参照）。
 - そのうちの成分規格等に関する意見（試薬・試液中の「アスパラギナーゼ」の名称及び「アスパラギナーゼ」の定義）について、改めて検討を行い、下記のとおり成分規格案等を変更することが適当であると判断した。
 - （1）試薬・試液中の「アスパラギナーゼ」の名称の変更
 - ・変更前：アスパラギナーゼ
 - ・変更後：アスパラギナーゼ，酵素活性測定用
 - （2）「アスパラギナーゼ」の定義の変更
 - ・変更前

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。
 - ・変更後

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。グリセロール，マルトデキストリン又は小麦粉を含むことがある。
- ※ なお、上記変更に伴い、「アスパラギナーゼ」の成分規格において一部文言の修正を行っている。
- このため、食品添加物「アスパラギナーゼ」の成分規格案を変更の上、食品添加物への指定及び規格基準の設定に関して所要の手続きを進めてまいりたい（改正後の成分規格案は別添 2 参照。）。

「食品衛生法施行規則（昭和 23 年厚生省令第 23 号）」及び「食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）」の一部改正に係る御意見の募集について（アスパラギナーゼの添加物への指定及び規格基準の設定）」に寄せられた御意見等について（案）

（御意見）

① 御意見（アスパラギナーゼの定義について）（同旨他 2 件）

アスパラギナーゼ成分規格の定義において、その第一段落「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。」「本品は、糸状菌 (*Aspergillus niger* に限る。ただし、毒素産生性株を除く。) 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。」と変更していただきたい。

理由

遺伝子組換え微生物を利用して生産された添加物にあっては、その菌株が属種を代表することはないため菌株を指定して安全性評価が行われます。従って、その添加物の生産に使用される微生物はその菌株まで指定する必要があると考えられます。しかし、今回のアスパラギナーゼにおきましては、*Aspergillus niger* 由来のアスパラギナーゼ遺伝子を *Aspergillus niger* に組み込んだものであり、食品安全委員会におきまして「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」の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断されていますので、この点から生産菌の菌株まで指定する必然性はないと考えられます。

従来より天然物から得られた添加物の安全性に関する調査は、ある特定のロットを代表として行われており、微生物の生産するものであれば、特定の菌株の生産したものをその属種の代表として扱ってきていると思われます。従来からある指定添加物の内、微生物によって産生されるもので必ずしも純度が高いとは言えないものであっても、その菌株を特定して指定した例はありません。たとえばキサントタンガムは、「本品は、キサントモナス属菌 (*Xanthomonas campestris*) の培養液から得られた、多糖類を主成分とするものである。」とされています。また納豆菌ガムは、「本品は、納豆菌 (*Bacillus subtilis*) の培養液から得られた、ポリグルタミン酸を主成分とするものである。」とされています。更に ϵ -ポリリシンは、「本品は、放線菌 (*Streptomyces albulus*) の培養液より、イオン交換樹脂を用いて吸着、分離して得られたものである。」とされています。これらの例からも、同じ種族から得られたものは安全性において大きな違いはないと考えられてきたと思われます。

アスパラギナーゼの EC 番号は 3. 5. 1. 1 ですが、NC-IUBMB の Enzyme Nomenclature で引用されているデータベースにおいても酵素を生産する多くの菌がその属種名で記載されていますが、菌株には限定されていません。

アスパラギナーゼの海外での扱いにおきましても、JECFA の Monographs ではその SOURCES には「Asparaginase is produced by submerged fed-batch fermentation of a genetically modified strain of *Aspergillus niger* which contains the asparaginase gene derived from *A. niger*.」となっており、菌株までの特定をしておりません。米国の GRAS ではアスパラギナーゼの告知を GRN No. 428 で行っており、Substance は「Asparaginase enzyme preparation from genetically modified *Aspergillus niger*.」と記載されており、菌株までの指定はありません。以上のことから、微生物の生産する添加物におきましては、その生産菌を属種の段階で規定することは重要ですが、菌株の指定までは不要と考えられます。

一方、微生物の病原性や毒素産生性は同じ属種のものでも異なる性質を示します。病原性に関しましては、食品安全委員会の評価の中で、*A. niger* の経口による暴露は、「健全なヒトにとって問題となるようなものではない。」と判断されています。このため特に問題とする必要はないと考えられます。しかし、毒素産生性については *A. niger* はフモニシンの産生性を有する株が存在することが知られています。このため、定義中に「ただし、毒素産生性株を除く。」の一文を入れることを提案いたします。

(回答)

本件については、要請者から「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」として添加物の指定要請があり、同内容で食品安全委員会に食品健康影響評価を受けたことを踏まえ、意見募集案のとおり、指定名を「アスパラギナーゼ」とし、成分規格の定義中に *A. niger* ASP-72 株である旨を規定したものです。

御指摘のあった定義中の *A. niger* ASP-72 株の削除等については、食品安全委員会の食品健康影響評価の範囲を超えるものと考えられることから、意見募集案のとおりとさせていただきます。

なお、今後、成分規格改正の要請があった場合は、食品安全委員会の食品健康影響評価や薬事・食品衛生審議会での審議等、必要な手続に従って検討を行います。

② 御意見（アスパラギナーゼの定義等について）

試薬・試液中の「アスパラギナーゼ」について、本品が酵素活性測定法の比較液に用いられるものであれば、そのことがわかるようタイトルを変更するとともに、酵素活性が既知のものが使用されるのであれば、試薬・試液の定義中にその旨を記載すべきではないか。また、成分規格の定義中の、食品又は添加物を含むことがある旨の記載は、現行の酵素規格の記載方法と整合性を図るべきではないか。

（回答）

御指摘を踏まえ、成分規格の試薬・試液中の「アスパラギナーゼ」の表題を「酵素活性測定用アスパラギナーゼ」に変更し、定義に酵素活性が既知のものである旨を追記しました。

また、成分規格の定義については、他の酵素の成分規格を踏まえ、「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。」を「グリセロール、マルトデキストリン又は小麦粉を含むことがある。」に修正しました。

③ 御意見（表示について）

食品表示を統一することは消費者として、とてもありがたいことだと思います。

しかし、パッケージにスペースが無ければ表示しなくて良いと言う風になれば、それにつけ込み表示しない業者が出て来るのが懸念されます。

それから、問い合わせの窓口を設置すれば表示義務が要らないという案ですが、窓口も 24 時間 365 日対応する訳は無いし、いちいち問い合わせるのは消費者としてもとても手間なので、この案はやめて頂きたいと思います。

（回答）

御指摘は食品表示に関する事項であり、本意見募集の内容には関連しないものと考えられます。

※下線部分が変更箇所

アスパラギナーゼ

1. 成分規格 (案)

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。) グリセロール, マルトデキストリン又は小麦粉を含むことがある。

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 $5.0\mu\text{g}/\text{g}$ 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 $450\sim 600^{\circ}\text{C}$ 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炭化物を砕き、硫酸 (1→4) 1 ml 及び硝酸 1 ml で潤し、白煙が発生しなくなるまで加熱した後、電気炉で強熱して完全に灰化する。残留物に塩酸 (1→4) 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。なお、 500°C 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 100ml 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 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 $4.0\mu\text{g}/\text{g}$ 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) を加え、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 100ml 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) 20 ml 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酵素活性測定用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、塩基性 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，塩基性 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酵素活性測定用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 μmol 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酵素活性測定用アスパラギナーゼの採取量 (g)

2. 試薬・試液 (案)

アスパラギナーゼ，酵素活性測定用 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。本品は，既知の酵素活性を有する。本品の 1 単位は，L-アスパラギンを基質として，pH5.0，37°C において 1 分間に 1 μmol 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 $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [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 21 g を量り，水 500ml を加えて溶かし，水酸化ナトリウム試液，2 mol/L で pH5.0 に調整し，水を加えて 1,000ml とする。

酵素活性測定用アスパラギナーゼ アスパラギナーゼ，酵素活性測定用を見よ。

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 3 ml 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 3 ml 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。

水酸化ナトリウム試液，2 mol/L 水酸化ナトリウム 80 g を量り，水を加えて溶かし，1,000ml とする。

フェノール・ニトロプルシド試液，塩基性 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。

3. 使用基準 (案)

特になし