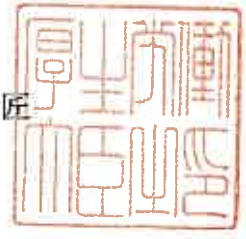




厚生労働省発生食0726第1号
令和元年7月26日

薬事・食品衛生審議会
会長 橋田 充 殿

厚生労働大臣 根本



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. *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエヒメラーゼの添加物としての指定の可否について
2. *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエヒメラーゼの添加物としての規格基準の設定について

令和元年 9 月 3 日

薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会
会長 村田 勝敬 殿

薬事・食品衛生審議会
食品衛生分科会添加物部会
会長 佐藤 恭子

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

令和元年 7 月 26 日付け厚生労働省発生食 0726 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. *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼの添加物としての指定の可否について
2. *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼの添加物としての規格基準の設定について

***Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産された プシコースエピメラーゼ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及び規格基準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ことに伴い、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：*Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ

英名：Psicose Epimerase expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP)

C A S 番号：1618683-38-7

E C 番号：EC 5.1.3.30

2. 成分

Escherichia coli K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ（以下、本要請品目）の有効成分はホモテトラマーの酵素であり、サブユニットは32kDa、アミノ酸配列から予想される等電点は4.86であるとされている。サブユニットのアミノ酸残基数は289であり、その配列は以下に示すとおりであるとされている。

1	MKIGCHGLVW	TGHFDAEGIR	YSVQKTREAG	FDLVEFPLMD	PFSFDVQTAK
51	SALAEHGLAA	SASLGLSDAT	DVSSDPAAVV	KAGEELNRA	VDVLAELGAT
101	DFCGVIYSAM	KKYMEDATAA	GLANSKAAVG	RVADRASDLG	INVSLEVVR
151	YETNVLNTGR	QALAYLEELN	RPNLGIHLDT	YHMNIEESDM	FSPILDTAEA
201	LRYVHIGESH	RGYLGTSVD	FDTFFKALGR	IGYDGPVVFE	SFSSSVVAPD
251	LSRMLGIWRN	LWADNEELGA	HANAFIRDKL	TAIKTIELH	

3. 用途

製造用剤（フルクトースを異性化してプシコースに変換する酵素）

4. 概要及び諸外国での使用状況等

(1) 概要

本要請品目は、*Arthrobacter globiformis* から得られたプシコースエピメラーゼ遺伝子を大腸菌（*Escherichia coli* K-12 W3110株）に導入することにより得られる

酵素であり、フルクトースをプシコースに異性化する酵素である。

本要請品目によって得られるプシコースはフルクトースに類似の味質や物性を備え、エネルギー値はほぼゼロであり、食後の血糖上昇抑制作用を示す食品とされている。

(2) 諸外国での使用状況等

コーデックス委員会の策定したコーデックス食品添加物一般基準（GSFA）では、加工助剤（酵素を含む）は対象とされておらず、FAO/WHO食品添加物専門家会議（JECFA）において、本要請品目の評価は行われていない。

米国において、本要請品目は、2016年にFDAからGRAS物質としての届出に異議がない旨の回答が出されている。

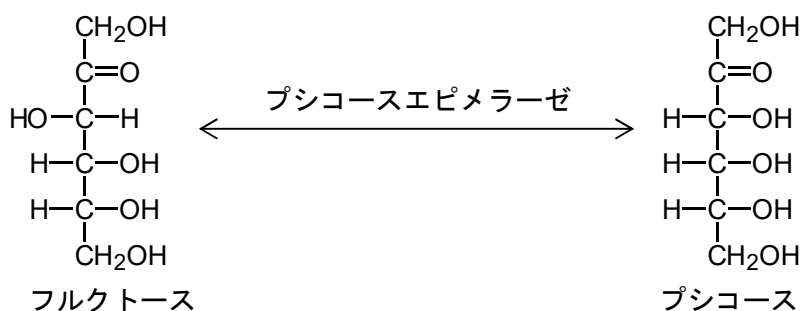
欧州連合（EU）（フランス及びデンマークを除く。）では、加工助剤として用いる酵素に対して2018年9月時点で規制がないため、本要請品目は法令上使用可能であるが、使用実績はないとされている。フランス及びデンマークでは、酵素に関する独自の規制が実施されており、流通には認可を必要としているが、本要請品目は認可されておらず、使用実績はない。欧州食品安全機関（EFSA）において、本要請品目の評価は行われていない。

オーストラリア・ニュージーランドでは、食品用酵素は加工助剤として規制されており、流通には認可を必要としているが、本要請品目は認可されておらず、使用実績はない。オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）において、本要請品目の評価は行われていない。

5. 食品添加物としての有効性

(1) プシコースエピメラーゼの機能

本要請品目は、フルクトースとプシコースを相互に異性化する酵素であり、プシコースを生産する目的で使用される。



(2) プシコースエピメラーゼの反応性

本要請品目の有効性について確認実験が行われており、試験結果の概要は以下のとおり。

50%フルクトース水溶液24.0 g（固形分12.0 g）に、本要請品目（粉末製品）を0（対照）、960、2400及び7200単位加えて混和し、50℃で1時間反応を行った。その結果、表1のように、12.0 gのフルクトースから最大で2.74 gのプシコースの生成が確認された。

表1 酵素単位と生成プシコース量

酵素単位 （単位）	反応液1g当りの プシコースの 重量（g）	反応液の重量 （g）	生成プシコース量 （g）
0	0.00	24.0	0.00
960	0.07	24.2	1.70
2400	0.10	24.5	2.38
7200	0.11	25.5	2.74

(3) 食品中の安定性

本要請品目はプシコースの生産に使用する酵素であり、プシコースの生産過程中、イオン交換樹脂を用いた脱塩工程及び活性炭を用いた脱色工程によってプシコースから十分に除去されるため、本要請品目がプシコース中に残存する可能性は極めて低く、食品中で活性を示すことは想定されないとしている。

本要請品目を用いて生産された結晶プシコース中のタンパク質量について、改良デュマ法による分析を行った結果、結晶プシコース中に含まれるタンパク質量は0.1 g/100 g 未満¹であったとされている。

(4) 食品中の栄養成分に対する影響

本要請品目はプシコースから十分に除去されるため、食品中の栄養素に影響を及ぼすことは想定されないとしている。

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30年10月10日付け厚生労働省発生食1010第3号により食品安全委員会に対して意見を求めた。*Escherichia coli*

¹ 日本食品標準成分表 2015 年版（七訂）において、タンパク質の最小表示の位は少数第1位とされている。

K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラ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31年3月26日付け府食第167号により通知されている。

【食品健康影響評価】

本委員会としては、本品目の組換えDNA技術応用添加物の安全性審査に係る食品健康影響評価については、評価基準に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

また、本委員会としては、本品目の添加物としての指定及び規格基準設定に係る食品健康影響評価については、以下のように判断した。

本品目の製造を目的として適切に管理された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安全性の懸念はない。

本品目について、酵素指針における「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」を検討した結果、本品目の毒性については、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与による毒性及びアレルギー性に係る知見を用いて評価を行うこととした。

本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性及び反復投与による毒性の懸念はなく、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低い。

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NOAEL2.0% (TOS換算で雄：1.02gTOS²/kg体重/日、雌：1.12gTOS/kg体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 (国民全体で0.332mg TOS/kg体重/日、小児で0.918mg TOS/kg体重/日) とを比較して得られる安全マージンは十分である。

以上を踏まえ、本委員会としては、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結果によると、本要請品目の摂取量は、表2のとおりである。

² TOS：総有機固形物 (Total Organic Solids)

表2 本要請品目の推定一日摂取量

由来となる食品群			国民全体			小児		
			プシコー スの一日 摂取量 （g /人/ 日）	本要請品 目の一日 摂取量 （mg TOS/人/ 日）	本要請品 目の一日 摂取量 （体重あ たり、mg TOS/kg 体 重/日）	プシコー スの一日 摂取量 （g /人/ 日）	本要請品 目の一日 摂取量 （mg TOS/人/ 日）	本要請品 目の一日 摂取量 （体重あ たり、mg TOS/kg 体 重/日）
穀類	小麦・ 加 工 品	パン 類 （ 菓 子 パンを 除く）	1. 69	1. 52	0. 028	1. 21	1. 09	0. 066
		菓 子 パ ン類	0. 24	0. 22	0. 004	0. 24	0. 21	0. 013
砂糖・甘味料類			0. 65	0. 58	0. 011	0. 36	0. 32	0. 020
野菜類	野菜ジュース		0. 43	0. 38	0. 007	0. 35	0. 31	0. 019
果実類	ジャム		0. 13	0. 12	0. 002	0. 10	0. 09	0. 005
	果汁・果汁飲料		0. 37	0. 34	0. 006	0. 90	0. 81	0. 049
魚介類	魚 介 加 工 品	魚介(佃 煮)	0. 10	0. 09	0. 002	0	0	0
乳類	牛乳・ 乳 製 品	発酵乳・ 乳 酸 菌 飲料	1. 92	1. 73	0. 031	2. 04	1. 83	0. 111
		そ の 他 の 乳 製 品	0. 42	0. 38	0. 007	0. 89	0. 80	0. 049
菓子類	和菓子類		0. 52	0. 47	0. 008	0. 38	0. 34	0. 020
	ケーキ・ペスト リー類		0. 35	0. 31	0. 006	0. 29	0. 26	0. 016
	ビスケット類		0. 10	0. 09	0. 002	0. 17	0. 15	0. 009
	キャンディー類		0. 15	0. 13	0. 002	0. 75	0. 67	0. 041
	その他の菓子類		0. 66	0. 59	0. 011	1. 24	1. 12	0. 068

由来となる食品群			国民全体			小児		
			ブシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)	ブシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本要請品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)
嗜好飲料類	その他の嗜好飲料	コーヒ－・ココア	4.67	4.20	0.076	0.06	0.05	0.003
		その他の嗜好飲料	4.71	4.24	0.077	5.92	5.32	0.323
調味料・香辛料類	調味料	その他の調味料	3.23	2.90	0.053	1.96	1.76	0.107
合計			20.34	18.29	0.332	16.84	15.15	0.918

注) 国民平均 (1 歳以上) 及び小児 (1～6 歳) の体重は 55.1 kg 及び 16.5 kg と
して算出。

7. 新規指定について

ブシコースエピメラゼについては、食品安全委員会における食品健康影響評価を踏まえ、食品衛生法（昭和22年法律第233号）第10条の規定に基づく添加物として指定することは差し支えない。なお、指定の名称は「ブシコースエピメラゼ」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。

8. 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

Escherichia coli K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたブシコースエピメラゼについては、①消化管内で容易に分解され、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 を特定する必要がないこ

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。

(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、米国の GRAS Notice（No. 624）との対比表は別紙 3 のとおり。）。

(参考)

これまでの経緯

平成30年	10月10日	厚生労働大臣から食品安全委員会委員長宛てに 食品添加物の指定に係る食品健康影響評価を依頼
平成30年	10月16日	第716回食品安全委員会（要請事項説明）
平成30年	11月12日	第169回添加物専門調査会
平成31年	1月15日	第726回食品安全委員会（報告）
平成31年	1月16日	食品安全委員会における国民からの意見募集 （～平成31年2月14日）
平成31年	3月20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
平成31年	3月26日	第736回食品安全委員会（報告） 食品安全委員会より食品健康影響評価の結果の通知
令和元年	7月26日	薬事・食品衛生審議会へ諮問
令和元年	7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

氏 名	所 属
石見 佳子	東京農業大学総合研究所教授
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
工藤 由起子	国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部長
笹本 剛生	東京都健康安全研究センター食品化学部長
佐藤 恭子 ○	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長
杉本 直樹	国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部第二室長
瀧本 秀美	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所栄養疫学・食育研究部長
戸塚 ゆ加里	国立研究開発法人国立がん研究センター研究所発がん・予防研究分野 ユニット長
中島 春紫	明治大学農学部農芸化学科教授
原 俊太郎	昭和大学薬学部教授
二村 睦子	日本生活協同組合連合会組織推進本部長
三浦 進司	静岡県立大学食品栄養科学部教授
吉成 浩一	静岡県立大学薬学部薬学科教授

※部会長

成分規格 (案)

プシコースエピメラーゼ

Psicose Epimerase

Allulose Epimerase

アルロースエピメラーゼ

[1618683-38-7]

定 義 本品は、細菌 (*Arthrobacter globiformis*に限る。) が本来有するプシコースエピメラーゼ遺伝子を導入した大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 W3110 株に限る。) の培養物から得られた、フルクトースとプシコースを相互に異性化する酵素である。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 当たり 230 単位以上の酵素活性を有する。

性 状 本品は、淡褐～濃褐色の液体又は灰色の粉末である。

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 $5\mu\text{g/g}$ 以下 (0.80 g、第 1 法、比較液 鉛標準液 4.0mL、フ
レーム方式)

ただし、検液の調製において、残留物が硝酸 (1→100) 5 mL に溶けない場合には、
第 3 法により操作する。

(2) ヒ素 As として $3\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50 g、第 5 法、標準色 ヒ素標準液 3.0mL、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、生菌数は 50000 以下である。また、大腸菌及びサルモネラは認めない。ただし、生菌数試験の試料液は第 3 法、大腸菌試験及びサルモネラ試験の前培養液は、それぞれ第 3 法及び第 2 法により調製する。

酵素活性測定法 (i) 基質溶液 D (+) - プシコース 0.18 g を量り、水を加えて溶かし、
更に水を加えて正確に 5 mL とする。用時調製する。

(ii) 試料液 本品約 1.0 g を精密に量り、1 mL 中に 4～10 単位を含むように、希釈液を加えて溶かして一定容量とし、試料液とする。ただし、希釈液は pH8.0 のリン酸緩衝液 (0.05mol/L) と塩化マグネシウム試液 (1mol/L) を 199 : 1 の割合で混和した液を用いる。

(iii) D (-) - フルクトース標準液 酵素活性測定用 D (-) - フルクトース約 0.27 g を精密に量り、水を加えて溶かして正確に 100mL とし、標準原液とする。標準原液を水で 1.5 倍、3 倍、5 倍及び 15 倍に正確に希釈し、1 mL 中に D (-) - フルクトース

($C_6H_{12}O_6=180.16$) $10\mu\text{mol}$ 、 $5\mu\text{mol}$ 、 $3\mu\text{mol}$ 及び $1\mu\text{mol}$ を含む 4 濃度の液を調製し、D (－) ーフルクトース標準液とする。

(iv) 操作法 試料液 0.100mL を試験管に入れ、試料液の調製に用いた希釈液 0.400mL を加えて混和し、蓋をして $50\pm0.5^\circ\text{C}$ で 5 分間加温する。次に、この試験管に基質溶液 0.500mL を加えて混和し、 $50\pm0.5^\circ\text{C}$ で正確に 10 分間反応させた後、水浴中で 2 分間加熱する。冷後、この液に、あらかじめろ紙で付着水を除いた強酸性陽イオン交換樹脂約 100mg 及び弱塩基性陰イオン交換樹脂（遊離型）約 100mg を加えて 15 分間振とうし、メンブランフィルター（孔径 $0.2\mu\text{m}$ ）でろ過し、検液とする。ただし、強酸性陽イオン交換樹脂は、C 試薬・試液等、1. 試薬・試液、強酸性陽イオン交換樹脂の項に従い水洗したものを用いる。別に、試料液の代わりに希釈液 0.100mL を試験管に入れ、以下検液の調製と同様に操作し、対照液とする。検液、対照液及び 4 濃度の D (－) ーフルクトース標準液をそれぞれ $10\mu\text{L}$ ずつ正確に量り、次の操作条件で液体クロマトグラフィーを行う。それぞれの D (－) ーフルクトース標準液のピーク面積と濃度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) から検量線を作成する。次に検液及び対照液の D (－) ーフルクトースのピーク面積を測定し、検量線から検液及び対照液中の D (－) ーフルクトースの濃度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$) をそれぞれ求め、次式により酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間に D (－) ーフルクトース $1\mu\text{mol}$ を遊離させる酵素量を 1 単位とする。

$$\text{酵素活性 (単位/g)} = \frac{(C_T - C_B) \times V_T}{M}$$

ただし、 C_T ：検液中の D (－) ーフルクトースの濃度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)

C_B ：対照液中の D (－) ーフルクトースの濃度 ($\mu\text{mol}/\text{mL}$)

V_T ：調製した試料液の容量 (mL)

M：試料の採取量 (g)

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充填剤 約 $9\mu\text{m}$ の液体クロマトグラフィー用陽イオン交換樹脂 (Ca 型)

カラム管 内径 8mm 、長さ 30cm のステンレス管

カラム温度 80°C

移動相 水

流量 $0.4\text{mL}/\text{分}$

試薬・試液等

1. 試薬・試液

塩化マグネシウム試液 ($1\text{mol}/\text{L}$) 塩化マグネシウム六水和物 203g を量り、水を加え

て溶かし、1000mL とする。

酵素活性測定用D（一）－フルクトース D（一）－フルクトース、酵素活性測定用を見よ。

D（＋）－プシコース $C_6H_{12}O_6$ [551－68－8]

本品は、白～ごく薄い黄色の結晶性の粉末又は粉末である。

比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = +2.0 \sim +6.0^\circ$ (0.1 g、水、10mL)

純度試験 類縁物質 本品 20mg を水 2 mL に溶かし、検液とする。検液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 50mL とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 10 μ 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い、ピーク面積を測定するとき、検液の主ピークと溶媒ピークとを除くピークの合計面積は、比較液の主ピークの面積より大きくない。ただし、面積測定範囲は、主ピークの保持時間の 3 倍までとする。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充填剤 5～10 μ m の液体クロマトグラフィー用アミノプロピル基化学結合型シリカゲル

カラム管 内径 3～8 mm、長さ 15～30cm のステンレス管

カラム温度 35～40℃の一定温度

移動相 アセトニトリル／水混液（7：3）

流量 D（＋）－プシコースの保持時間が 6～9 分になるように調整する。

D（一）－フルクトース、酵素活性測定用 $C_6H_{12}O_6$ [57－48－7]

本品は、無～白色の結晶又は粉末である。

比旋光度 $[\alpha]_D^{20} = -90 \sim -94^\circ$ 本品約 4 g を精密に量り、アンモニア試液 0.2mL 及び水 80mL を加えて溶かし、30 分間放置した後、水を加えて正確に 100mL とし、旋光度を測定する。

純度試験 (1) 溶状 澄明 (1.0 g、水 20mL)

(2) 乾燥減量 2.0%以下 (減圧、18 時間)

(3) 類縁物質 本品 20mg を水 2 mL に溶かし、検液とする。検液 1 mL を正確に量り、水を加えて正確に 50mL とし、比較液とする。検液及び比較液をそれぞれ 10 μ 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い、ピーク面積を測定するとき、検液の主ピークと溶媒ピークとを除くピークの合計面積は、比較液の主ピークの面積より大きくない。ただし、面積測定範囲は、主ピークの保持時間の 3 倍までとする。

操作条件

検出器 示差屈折計

カラム充填剤 5～10 μ m の液体クロマトグラフィー用アミノプロピル基化学結合型シリカゲル

カラム管 内径 3～8 mm、長さ 15～30 cm のステンレス管

カラム温度 35～40℃の一定温度

移動相 アセトニトリル／水混液（7：3）

流量 D（－）－フルクトースの保持時間が 4～7 分になるように調整する。

(別紙2)

プシコースエピメラーゼ成分規格設定の根拠（案）

プシコースエピメラーゼの成分規格は、米国の GRAS Notice (No. 624) (GRAS 規格) の D-allulose 3-epimerase from *Arthrobacter globiformis* M30 expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110 及び第9版食品添加物公定書（公定書）の他の酵素品目の成分規格を参照し設定した。

名称

GRAS 規格の名称を参照し、和名は「プシコースエピメラーゼ」、英名は「Psicose Epimerase」とした。また、和名別名として「アルロースエピメラーゼ」、英名別名として「Allulose Epimerase」を加えた。

CAS 登録番号

CAS 登録番号は、GRAS 規格に記載はないが、D-Psicose 3-epimerase の CAS 登録番号である 1618683-38-7 とした。

定義

公定書の他の酵素品目の定義の記載を参照し、本品目の基原及び本質として「細菌 (*Arthrobacter globiformis* に限る。) が本来有するプシコースエピメラーゼ遺伝子を導入した大腸菌 (*Escherichia coli* K-12 W3110 株に限る。) の培養物から得られた、フルクトースとプシコースを相互に異性化する酵素である。」とし、含まれる可能性のある食品又は添加物についても示した。

酵素活性

酵素活性は、GRAS 規格では「1g 当たり 500 単位以上」であるが、GRAS 規格申請以降に、より安定性の高い製品としたため、製品の実態に合わせて「本品は、1g 当たり 230 単位以上の酵素活性を有する。」とした。

性状

性状は、GRAS 規格では「液体又は粉末である。」と設定しており、製品の色についての記載も加え、「本品は、淡褐～濃褐色の液体又は灰色の粉末である。」とした。

確認試験

公定書の他の酵素品目の確認試験に倣い、「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

公定書の他の酵素品目の純度試験に準じて、鉛とヒ素の項目を設定した。

(1) 鉛

GRAS 規格では、 $5\mu\text{g/g}$ 以下と設定されており、公定書の他の酵素品目の鉛の項においても、 $5\mu\text{g/g}$ 以下と設定されていることから、本規格案では、「鉛 Pb として $5\mu\text{g/g}$ 以下 (0.80 g、第 1 法、比較液 鉛標準液 4.0mL、フレイム方式)」とし、他の酵素品目の記載と同様に、製品の溶解が困難な場合を想定し、ただし書きを記載した。

(2) ヒ素

GRAS 規格では、ヒ素は設定されていないが、公定書の他の酵素品目の純度試験に準じ、ヒ素の項として「As として $3\mu\text{g/g}$ 以下 (0.50 g、第 5 法、標準色 ヒ素標準液 3.0mL、装置 B)」とした。

微生物限度

GRAS 規格では、大腸菌群、大腸菌及びサルモネラが設定されているが、公定書の他の酵素品目の微生物限度試験に準じて、生菌数、大腸菌及びサルモネラを設定した。また、微生物限度値及び試料液や前培養液の調製法も公定書の他の酵素品目に準じて設定した。

酵素活性測定法

本規格案の酵素活性測定法は、GRAS 規格と同じ原理によるものであり、本品を D (+)ーブシコースに作用させ、生成する D (-)ーフルクトースを液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定し、酵素活性単位として求める方法である。活性の正確な評価のため、本品が最も高い基質特異性を示す D (+)ーブシコースを基質とし、また、公定書既収載のグルコースイソメラーゼの活性試験法第 2 法と同様に、酵素反応で増加する D (-)ーフルクトース量を液体クロマトグラフィーにより測定し、1 分間に $1\mu\text{mol}$ の D (-)ーフルクトースを増加させる酵素量を 1 単位として活性を算出するものである。

なお、酵素活性測定法の計算式は、下記の A/B に基づき設定した。

$$\begin{aligned} A &= \text{反応で 1 分間に生じた D (-)ーフルクトース} (\mu\text{mol}) \\ &= (C_T - C_B) (\mu\text{mol/mL}) \times 1.000 (\text{mL}) (=0.100+0.400+0.500) \text{ / } 10 (\text{分}) \end{aligned}$$

$$B = \text{反応に用いた酵素} (\text{g}) = M (\text{g}) \times 0.100 (\text{mL}) \text{ / } V_T (\text{mL})$$

酵素活性 (単位/g)

$$= A/B = 1 \text{ 分間に生じた D (-)ーフルクトース} (\mu\text{mol}) \text{ / 用いた酵素の量} (\text{g})$$

ただし、 C_T : 検液中の D (-)ーフルクトースの濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)

C_B : 対照液中の D (-)ーフルクトースの濃度 ($\mu\text{mol/mL}$)

V_T ：調製した試料液の容量（mL）

M ：試料の採取量（g）

試薬・試液

成分規格の酵素活性測定法で用いる塩化マグネシウム試液（1 mol/L）、D（+）－ブシコース及びD（－）－フルクトース、酵素活性測定用について、試薬・試液の規格を新たに設定した。

(別紙 3)

プシコースエピメラーゼの規格対比表

	本規格(案)	米国、GRAS Notice (No. 624)
名称 (英名)	プシコースエピメラーゼ Psicose Epimerase (別名 Allulose Epimerase、 アルロースエピメラーゼ)	D-allulose 3-epimerase from <i>Arthrobacter globiformis</i> M30 expressed in <i>Escherichia coli</i> K-12 W3110
定義	本品は、細菌 (<i>Arthrobacter globiformis</i> に限る。) が本来有するプシコースエピメ ラーゼ遺伝子を導入した大腸菌 (<i>Escherichia coli</i> K-12 W3110 株に限 る。) の培養物から得られた、フルクトー スとプシコースを相互に異性化する酵素で 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	1 g 当たり 230 単位以上	1 g 当たり 500 単位以上
性状	淡褐～濃褐色の液体又は灰色の粉末	液体又は粉末
確認試験	酵素活性を示す。	—
純度試験		
鉛	5 µg/g 以下	5 µg/g 以下
ヒ素	3 µg/g 以下	—
微生物限度		
生菌数	1 g につき 50000 以下	—
大腸菌群	—	1 g につき 10000 以下
大腸菌	認めない (第 3 法)	認めない

サルモネラ	認めない（第２法）	認めない
酵素活性測定法	HPLC	HPLC



府 食 第 1 6 7 号
平 成 3 1 年 3 月 2 6 日

厚生労働大臣
根本 匠 殿

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成 30 年 10 月 10 日付け厚生労働省発生食 1010 第 3 号をもって貴省から当委員会に意見を求められた *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラゼに係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 23 条第 2 項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添 1 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、別添 2 のとおり、貴省に関する意見・情報が寄せられましたので添付します。

記

Escherichia coli K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラゼについては、「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）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはない。また、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・遺伝子組換え食品等評価書

Escherichia coli K-12 W3110
(pWKLP) 株を用いて生産された
プシコースエピメラーゼ

2019年3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	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. 起源又は発見の経緯等	8
5. 我が国及び諸外国における使用状況	9
(1) 我が国における使用状況	9
(2) コーデックス委員会	9
(3) 米国における使用状況	9
(4) EU における使用状況	9
(5) その他の国における使用状況	9
6. 国際機関等における評価	9
(1) 我が国における評価等	9
(2) JECFA における評価	10
(3) 米国における評価	10
(4) EU における評価	10
(5) その他の機関における評価	10
7. 遺伝子組換え技術に係る安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違	10
(1) 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料	10
(2) 宿主及び導入 DNA	11
(3) 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料	11
(4) 宿主の構成成分等に関する資料	11
(5) 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	11
(6) 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点	12
8. 評価要請等の経緯、指定の概要	12

9. 評価に適用されるべき指針等	12
Ⅱ. 安全性に係る知見の概要	13
1. 遺伝子組換えに係る安全性	13
(1) 宿主に関する事項	13
(2) ベクターに関する事項	13
(3) 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項	14
(4) 組換え体に関する事項	16
(5) 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	16
(6) 遺伝子組換え添加物に関する事項	17
2. 酵素の消化管内での分解性に関連する事項	17
3. 酵素の毒性	19
(1) 遺伝毒性	19
(2) 反復投与毒性	20
(3) アレルゲン性	21
Ⅲ. 一日摂取量の推計等	22
1. 国際機関等における推計	22
2. 我が国における推計	22
Ⅳ. 食品健康影響評価	25
＜別紙：略称＞	27
＜参照＞	28

＜審議の経緯＞

2018 年 10 月 11 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（厚生労働省発生食 1010 第 3 号）、関係書類の接受

2018 年 10 月 16 日 第 716 回食品安全委員会（要請事項説明）

2018 年 11 月 12 日 第 169 回添加物専門調査会

2019 年 1 月 15 日 第 726 回食品安全委員会（報告）

2019 年 1 月 16 日から 2 月 14 日まで 国民からの意見・情報の募集

2019 年 3 月 20 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

2019 年 3 月 26 日 第 736 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＞

（2018 年 7 月 1 日から）

佐藤 洋 （委員長）
山本 茂貴 （委員長代理）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
吉田 充

＜食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿＞

（2018 年 4 月 1 日から）

梅村 隆志 （座長）
頭金 正博 （座長代理）
石井 邦雄
石塚 真由美
伊藤 清美
伊藤 裕才
宇佐見 誠
佐藤 恭子
杉山 圭一
祖父江 友孝
高須 伸二
高橋 智
塚本 徹哉
戸塚 ゆ加里

中江 大
西 信雄
北條 仁
松井 徹
森田 明美
山田 雅巳

〔調査審議に参画した食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員〕¹

児玉 浩明
手島 玲子
中島 春紫

¹ 「遺伝子組換え微生物を利用して製造された酵素を新たに添加物として指定すること等について、食品安全基本法第 24 条の規定に基づき意見を求められた場合の取扱いについて」（平成 30 年 10 月 16 日食品安全委員会決定）に基づき調査審議の際に招へいした遺伝子組換え食品等専門調査会の専門委員。

要 約

添加物として使用される遺伝子組換え技術を用いて生産された酵素「*Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ」について、「添加物（酵素）に関する食品健康影響評価指針」（平成 29 年 7 月 18 日食品安全委員会決定。以下「酵素指針」という。）及び「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。以下「評価基準」という。）に基づき、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績等は、*E. coli* K-12 株及び *Arthrobacter globiformis* の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに *E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ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、本品目の組換え DNA 技術応用添加物の安全性審査に係る食品健康影響評価については、評価基準に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

また、本委員会としては、本品目の添加物としての指定及び規格基準設定に係る食品健康影響評価については、以下のように判断した。

本品目の製造を目的として適切に管理された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安全性の懸念はない。

本品目について、酵素指針における「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」を検討した結果、本品目の毒性については、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与による毒性及びアレルギー性に係る知見を用いて評価を行うこととした。

本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性及び反復投与による毒性の懸念はなく、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低い。

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 2.0 % (TOS 換算で雄 : 1.02 g TOS/kg 体重/日、雌 : 1.12 g TOS/kg 体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 (国民全体で 0.332 mg TOS/kg 体重/日、小児で 0.918 mg TOS/kg 体重/日) とを比較して得られる安全マージンは十分である。

以上を踏まえ、本委員会としては、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

製造用剤（参照 1）

2. 名称等

和名：*Escherichia coli* K-12 W3110（pWKLP）株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ

英名： Psicose Epimerase expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110（pWKLP）（参照 1）

EC²番号：未登録（参照 1）

CAS 登録番号：1618683-38-7（参照 2）

要請者：松谷化学工業株式会社

開発者：松谷化学工業株式会社

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「*Escherichia coli* K-12 W3110（pWKLP）株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ」（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、本品目の基原は *Arthrobacter globiformis* M30 であるとされている。指定等要請者によれば、*A. globiformis* は第 9 版食品添加物公定書においてグルコースイソメラーゼの基原として掲げられており、アメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC）における分類が Biosafety level 1（ヒトに疾病を起こすことが知られていないもの）であるとされている。（参照 3、4、5）

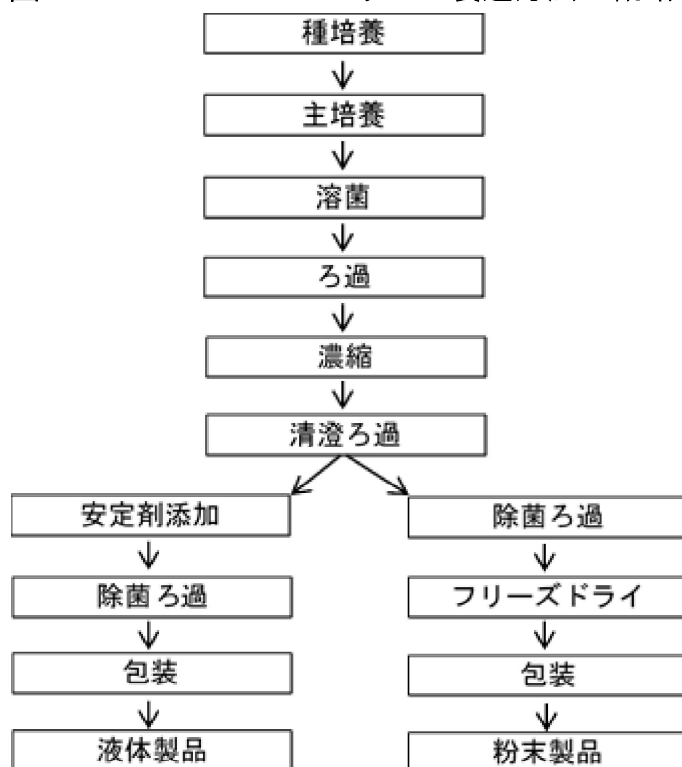
指定等要請者によれば、本品目の生産菌株である *E. coli* K-12 W3110（pWKLP）株は *A. globiformis* が本来有するプシコースエピメラーゼ遺伝子を含む発現ベクター pWKLP を宿主である *E. coli* K-12 W3110 株に導入して得られたとされている。（参照 1）

（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。生産菌は、溶菌工程で不活化され、ろ過工程、清澄ろ過工程及び除菌ろ過工程で生産物から充分に分離除去されるため、本品目に残存することはないとされている。（参照 1）

² 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。

図1 プシコースエピメラーゼ製造方法の概略



(3) 成分

指定等要請者によれば、本品目の有効成分はホモテトラマーの酵素であり、サブユニットは 32 kDa、アミノ酸配列から予想される等電点は 4.86 であるとされている。サブユニットのアミノ酸残基数は 289 であり、その配列は図 2 に示すとおりであるとされている。（参照 1、6、7）

図2 有効成分のサブユニットのアミノ酸一次配列

1	MKIGCHGLVW	TGHFDAEGIR	YSVQKTREAG	FDLVEFPLMD	PFSFDVQTAK
51	SALAEHGLAA	SASLGLSDAT	DVSSSEPAVV	KAGEELLNRA	VDVLAELGAT
101	DFCGVIYSAM	KKYMEPATAA	GLANSKAAVG	RVADRASDLG	INVSLEVVR
151	YETNVLNTGR	QALAYLEELN	RPNLGIHLDT	YHMNIEESDM	FSPILDTAEA
201	LRYVHIGESH	RGYLGTSVD	FDTFFKALGR	IGYDGPVVFE	SFSSSVVAPD
251	LSRMLGIWRN	LWADNEELGA	HANAFIRDKL	TAIKTIELH	

また、指定等要請者によれば、既知のタンパク質との相同性について、本品目のアミノ酸配列を基に National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BlastP プログラムで検索した結果、本品目は新規のタンパク質であることが確認されたとされている。（参照 8）

指定等要請者によれば、本品目の全タンパク質当たりのプシコースエピメラーゼ量は、65.0～71.7%に相当したとされている。（参照 9）

(4) 性状等

指定等要請者の成分規格案によれば、本品目の性状は、淡褐色から濃褐色の液体又は灰色の粉末であるとされている。(参照 1)

(5) 使用方法

指定等要請者によれば、本品目はプシコース³の製造用剤であり、プシコースの生産において、フルクトース⁴水溶液に本品目を添加して使用する又は本品目をイオン交換樹脂等の担体に吸着させて固定化したものにフルクトース溶液を通過させて使用するとされている。後者の場合、カラムに充填し固定化した後、そのカラムにフルクトース水溶液を通過させて連続的に使用することができ、この手法が実用的な使用形態であるとされている。プシコースエピメラーゼの異性化反応は平衡反応であり、例えば 30℃ではフルクトース：プシコース=76：24であって、プシコースの生産においては酵素反応時間を調整して平衡付近まで反応させるとされている。また、指定等要請者によれば、副反応は知られていないとされている。(参照 1、3、6)

4. 起源又は発見の経緯等

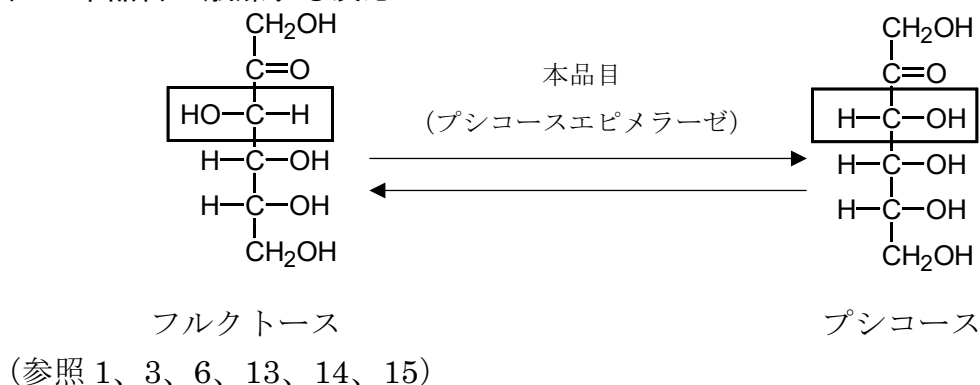
1994 年、香川大学の何森らは、フルクトースを異性化してプシコースに変換する酵素を発見した。これによりプシコースの生産が可能となった。プシコースはフルクトースに類似の味質や物性を備え、エネルギー値はほぼゼロであり、食後の血糖上昇抑制作用を示すとされている。(参照 1、10、11、12)

指定等要請者によれば、工業的大量生産に有用な微生物由来のプシコース生産酵素の探索を開始したところ、プシコース及びフルクトースの異性化反応を触媒し、それ以外の副反応がない *A. globiformis* M30 株由来のケトース 3-エピメラーゼを 2011 年に発見したとされている。2012 年、*A. globiformis* M30 株由来のプシコースエピメラーゼ遺伝子がクローニングされたことから、当該遺伝子を *E. coli* K-12 W3110 株に導入して生産された酵素製品が本品目である。本品目が触媒する異性化反応は、図 3 に示すとおりである。

³ 以降全て D 体を指す。

⁴ 以降全て D 体を指す。

図 3 本品目が触媒する反応



5. 我が国及び諸外国における使用状況

(1) 我が国における使用状況

我が国において、本品目の添加物としての使用は認められていない。

(2) コーデックス委員会

コーデックス委員会の策定したコーデックス食品添加物一般基準 (GSFA) では、加工助剤 (酵素を含む) は対象とされていない。

(3) 米国における使用状況

米国では、指定等要請者がプシコースについて一般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、2014 年、FDA から当該届出に異議がない旨の回答がなされており、このプシコースを生成する酵素として本品目を使用できるとされている。(参照 1、16、17、18)

(4) EU における使用状況

指定等要請者によれば、欧州連合 (EU) (フランス及びデンマークを除く。) では、加工助剤として用いる食品用酵素について、2018 年 9 月現在で規制がないため、本品目は法令上使用可能であるが、使用された実績はないとされている。また、フランス及びデンマークでは、酵素に関する独自の規制が実施され、本品目は法令上使用不可とされており、使用された実績はない。(参照 1)

(5) その他の国における使用状況

指定等要請者によれば、オーストラリア及びニュージーランドでは、本品目は法令上使用不可とされており、使用された実績はない。(参照 1)

6. 国際機関等における評価

(1) 我が国における評価等

我が国において、本品目の食品健康影響評価は行われていない。

（２）JECFA における評価

FAO/WHO 食品添加物専門家会議（JECFA）において、本品目の評価は行われていない。

（３）米国における評価

本品目は FDA に対して GRAS 物質としての届出がなされ、2016 年、当該届出に異議がない旨の回答が出されている。（参照 19、20、21）

（４）EU における評価

欧州食品安全機関（EFSA）において、本品目の評価は行われていない。（参照 1）

（５）その他の機関における評価

オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）において、本品目の評価は行われていない。（参照 1）

7. 遺伝子組換え技術に係る安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

（１）従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

プシコースエピメラーゼは未指定の添加物であるため、我が国において、比較対象とされる従来の添加物がない。本品目のような遺伝子組換え技術を利用した未指定添加物の評価においては、比較対象となる添加物はないものの、通常の添加物としての評価に必要な資料に基づく検討に加え、評価基準に基づき評価可能な項目を検討することにより、安全性の評価が可能であると考えられた。

なお、同基準における比較対象とはならないが、参考として米国において GRAS 認定されている *A. globiformis* 由来のプシコースエピメラーゼとの比較について記載した。（参照 16）

① 名称、基原及び有効成分

名称：プシコースエピメラーゼ

基原：*A. globiformis*

有効成分：プシコースエピメラーゼ

CAS No.：1618683-38-7

② 製造方法

培養液から菌体を回収し、ビーズミルを用いて細胞破碎後、遠心分離して上清を採取する。

③ 用途及び使用形態

フルクトースに本品目を作用させることで、フルクトースを異性化してプシコースが生成されるため、本品目はプシコースの製造用剤として使用される。フルクトース水溶液に本品目を直接添加し、イオン交換樹脂などに本品目を固定した後、フルクトース水溶液を通過させて使用する。

④ 摂取量

プシコースが添加される対象食品群の一日摂取量（参照 22）にプシコースの最大添加量を乗じることで、プシコースの推定一日摂取量を算出した（20.34 g/人/日）。この値にプシコースに残存するプシコースエピメラーゼの全有機固形分（Total Organic Solids (TOS)）の割合を乗じることによりプシコースエピメラーゼの推定一日摂取量を算出したところ、429.1 µg TOS/kg 体重/日であった。

（2）宿主及び導入 DNA

① 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主は、*E. coli* K-12 W3110 株である。

② DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

プシコースエピメラーゼ遺伝子の供与体は、*A. globiformis* M30 株である。

③ 挿入 DNA の性質及び導入方法

プシコースエピメラーゼ遺伝子はプシコースエピメラーゼをコードする。当該酵素は、フルクトースをプシコースに変換するエピマー化反応を触媒する異性化酵素である。発現ベクター pWKLp を塩化カルシウム法により *E. coli* K-12 W3110 株に導入し、形質転換を行った。

（3）宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

E. coli K-12 株は、添加物の製造に用いられた実績がある。（参照 23）

（4）宿主の構成成分等に関する資料

E. coli K-12 株及びその由来株に有害生理活性物質を産生するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において Biosafety level 1 に相当する。（参照 24）

（5）遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

① 製品名及び有効成分

製品名：マツラーゼ FE

有効成分：プシコースエピメラーゼ

② 製造方法

3. (2) に記載のとおりである。

③ 用途及び使用形態

7. (1) ③ に記載のとおりである。

④ 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

有効成分は同一である。なお、*E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株は、*A. globiformis* M30 株に比較して数百倍の生産性を有する。(参照 25)

(6) 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点

① 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

従来の添加物の生産菌は *A. globiformis* M30 株であり、本品目の生産菌は *E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株である点である。なお、アミノ酸配列は同一である。(参照 6、7)

② 組換え体と宿主

E. coli K-12 W3110 (pWKLP) 株と宿主との相違点は、*E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株には発現プラスミド pWKLP が導入され、プシコースエピメラーゼ産生能を有する点である。

8. 評価要請等の経緯、指定の概要

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並びに本品目における組換え DNA 技術に関する安全性について、関係書類が取りまとめられたことから、食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 1 項第 1 号並びに同法第 24 条第 1 項第 14 号、食品安全委員会令（平成 15 年政令第 273 号）第 1 条第 1 項及び食品安全委員会令第 1 条第 1 項の内閣府令で定めるときを定める内閣府令（平成 15 年内閣府令第 66 号）第 1 号の規定に基づき、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、厚生労働省は、本品目に使用基準は設けないこととしている。

9. 評価に適用されるべき指針等

本品目について、本委員会としては、酵素指針に基づき評価を行うこととした。また、必要に応じて、評価基準に基づき評価を行った。

II. 安全性に係る知見の概要

1. 遺伝子組換えに係る安全性

(1) 宿主に関する事項

① 分類学上の位置づけ（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は *E. coli* K-12 W3110 株である。

② 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

E. coli K-12 株誘導体は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られておらず、Biosafety level 1 に相当する。（参照 24）

③ 寄生性及び定着性に関する事項

E. coli K-12 株誘導体が腸管内に定着することは知られていない。

④ 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

E. coli K-12 株誘導体には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

⑤ 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

E. coli は、環境中に存在するバクテリアの主要な種の 1 つであり、ヒト等の腸内細菌でもある。*E. coli* の多くは無害であるが、病原性大腸菌の存在が知られている。

(2) ベクターに関する事項

① 名称及び由来に関する事項

発現ベクター pWKLP の作製には、pBR322 由来のプラスミド pKK223-3 が用いられた。

② 性質に関する事項

a. DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pKK223-3 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。（参照 26）

b. 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pKK223-3 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

c. 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pKK223-3 の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

d. 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pKK223-3 にはアンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐

性遺伝子が含まれている。

e. 伝達性に関する事項

プラスミド pKK223-3 には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。(参照 27)

f. 宿主依存性に関する事項

プラスミド pKK223-3 の複製開始配列は、*E. coli* で機能する。(参照 28)

(3) 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

① 挿入 DNA の供与体に関する事項

a. 名称、由来及び分類に関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子の供与体は *A. globiformis* M30 株である。*A. globiformis* M30 株は、指定等要請者によって、工業的な大量生産に有用なプシコース生産酵素を産生する微生物として、土壌から単離された微生物である。

b. 安全性に関する事項

A. globiformis は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られておらず、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において Biosafety level 1 に相当する。(参照 24)

② 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

a. 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

A. globiformis M30 株の全ゲノム配列を決定し、プシコースエピメラーゼ遺伝子の塩基配列を同定した。プシコースエピメラーゼ遺伝子は、*A. globiformis* M30 株のゲノムを鋳型にして PCR 法により得た。(参照 15)

b. 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

c. 挿入遺伝子の機能に関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子が発現するプシコースエピメラーゼは、フルクトースを異性化してプシコースを生成する。

③ 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

a. プロモーターに関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子のプロモーターは *tac* プロモーター配列である。*tac* プロモーターは、*E. coli* 由来の *trp* プロモーター及び *lac* プロモーターのそれぞれ一部を連結させたハイブリッドプロモーターである。（参照 29）

b. ターミネーターに関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子のターミネーターは、*E. coli* 由来の *rrnB* ターミネーター配列である。（参照 30）

c. その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

プシコースエピメラーゼ遺伝子の翻訳効率を向上させるため、シャイン・ダルガノ (SD) 配列をプシコースエピメラーゼ遺伝子上流に挿入した。（参照 31）また、*E. coli* 由来の改変 *lacI* 遺伝子を導入して、プシコースエピメラーゼ遺伝子の転写を適切に制御した。（参照 32）

④ ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項

発現ベクター pWKLP は、プラスミド pKK223-3 に改変 *lacI* 遺伝子を挿入して中間ベクターを作製し、プシコースエピメラーゼ遺伝子及び SD 配列を挿入することにより作製された。（参照 33）

⑤ 構築された発現ベクターに関する事項

a. 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

発現ベクター pWKLP の塩基数及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。（参照 34）

b. 目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームに関する事項

発現ベクター pWKLP について、6 つの読み枠においてオープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行った。その結果、開始コドンから終止コドンで終結される連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 105 個見いだされた。（参照 35）

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性を調査するため、データベース⁵を用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸配列が 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。また、タンパク質データベース⁶を用いて、E-value<0.01 を指標

⁵ AllergenOnline v16 (January 27, 2016)

⁶ Virulence BLAST Interface

として相同性検索を行った結果、相同性を示す 14 個のタンパク質が検出されたが、いずれも毒性タンパク質との報告はなかった。(参照 36、37)

c. 発現ベクター上の意図する挿入領域に関する事項

意図する挿入領域は、発現ベクターpWKLP の全領域である。

d. 挿入遺伝子の純化に関する事項

発現ベクターpWKLP は、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

⑥ DNA の宿主への導入方法に関する事項

発現ベクターpWKLP を用いて、塩化カルシウム法により宿主を形質転換した後、アンピシリンを含む寒天培地で選抜することにより、*E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を得た。なお、発現ベクターpWKLP は染色体外にプラスミドとして存在している。

⑦ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

発現ベクターpWKLP はアンピシリン耐性遺伝子を持つ。アンピシリン耐性遺伝子は β -ラクタマーゼをコードする遺伝子であり、 β -ラクタマーゼは一般細菌、放線菌及び真菌でも生産されることが知られている。(参照 38) これまで安全に使用されてきた実績がある。なお、本品目の製造のための生産菌培養過程においてアンピシリンは使用されていない。

(4) 組換え体に関する事項

① 宿主との差異に関する事項

E. coli K-12 W3110 (pWKLP) 株は、発現ベクターpWKLP をプラスミド DNA として有する点で宿主と異なる。

② 遺伝子導入に関する事項

a. 制限酵素による切断地図に関する事項

発現ベクターpWKLP の塩基配列及び制限酵素地図は明らかである。

b. オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

(3) ⑤ b に記載のとおりである。

(5) 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

① 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

本品目の製造原料は食品原料及び食品添加物を用いており、製造器材は食品用

酵素の製造に安全に使用されてきた実績がある。

② 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること

本品目の製造原料は食品原料及び食品添加物を用いており、製造器材は食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績があるため、安全であると考えられる。

(6) 遺伝子組換え添加物に関する事項

① 諸外国における認可、食用等に関する事項

I. 5. 及び6. に記載のとおりである。

② 組換え体の残存に関する事項

本品目中の発現ベクターpWKLP 由来の DNA 残存について、定量 PCR 法にて解析した結果、検出された DNA 量は約 10 ppb と低い結果であったため（参照 39）、安全性には問題はないと考えられた。

③ 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

E. coli K-12 株誘導体は、添加物製造に使用されている実績があり、問題のある非有効成分が含まれることは考えにくい。

④ 精製方法及びその効果に関する事項

本品目の精製は、溶菌、ろ過、除菌等の工程を経て行われ、安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。

⑤ 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項

本品目のプシコースエピメラーゼ含有量の変動により、有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられる。

2. 酵素の消化管内での分解性に関連する事項

酵素指針に基づき、以下の（1）から（5）までについて検討した。

（1）消化管内で容易に分解されること。

指定等要請者によれば、本品目の酵素原末（Lot 番号：3T-2）を、人工胃液又は人工腸液中において、37℃でインキュベーションを行った後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供する試験が実施されている。インキュベーション時間は人工胃液では 15 若しくは 30 秒又は 1、2、5、10、30 分間、人工腸液では 1、10、30、60、120 又は 180 分間とされている。その結果、人工胃液処理では反応 1 分間で当該酵素バンドは完全に消失したが、当該酵素の分解に伴い 10kDa 以下

に低分子のペプチドのバンドが認められたとされている。一方、人工腸液処理では反応 60 分間で当該酵素バンドは完全に消失し、かつ低分子ペプチドのバンドは認められなかったとされている。(参照 40)

指定等要請者によれば、加熱処理による本品目の分解性については、プシコースの製造工程で加熱過程がないこと、ヒトが経口摂取する際に加熱過程がない場合があること等の理由により、実施していないとされている。(参照 1)

人工胃液処理では、本品目の 10kDa 以下までの分解が確認され、部分分解物が認められたものの、人工腸液処理では認められなかったことから、本委員会としては、本品目は、消化管内で容易に分解されると考えた。

(2) 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。

指定等要請者によれば、2. (1) の消化試験において、本品目の分解に関わる主要な因子は pH 1.1 でのペプシン及び pH 6.9 でのパンクレアチン (膵液に含まれる多種の酵素の混合物であり、トリプシン及びキモトリプシン等の酵素を含む) であるとされている。(参照 40)

(3) 酵素の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、当該酵素又はその分解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。

本委員会としては、指定等要請者の考察を基に、以下を踏まえ、本品目が他の栄養成分の吸収を阻害する懸念はないと考えた。(参照 1)

- ・本品目は消化管内で容易に分解され、他の食品由来のタンパク質と同じように体内へ吸収されることが考えられること。
- ・本品目はプシコースの生産に利用される酵素であり、プシコースの生産過程の精製工程で十分に除去されるため、本品目が食品中に含まれる可能性はほぼないこと。

(4) 酵素を使用した食品を摂取したとき、当該酵素及びその分解物が当該酵素の主要な成分の過剰摂取の問題を起こさないこと。

指定等要請者によれば、本品目の一日摂取量はⅢ. 2. に記載のとおり、国民全体及び小児 (1~6 歳) でそれぞれ 18.29 mg TOS/人/日及び 15.15 mg TOS/人/日と推定され、これは国民全体のタンパク質の平均摂取量 68.5 g の約 0.027% 及び小児のタンパク質の平均摂取量 44.1 g の約 0.034% に過ぎないことから、本品目を使用した食品を摂取することにより、当該酵素及びその分解物が当該酵素の主要な成分の過剰摂取の問題を起こす懸念はないとされている。(参照 1、22)

(5) 摂取された酵素が消化管内で分解されないまま、未分解物又は部分分解物として大量に糞便中に排泄されないこと。また、未分解物又は部分分解物が生体組織中に蓄積しないこと。

本委員会としては、指定等要請者の考察を基に、以下を踏まえ、本品目の未分解物又は部分分解物が大量に糞便中に排泄される懸念及び生体組織中に蓄積される懸念はないと考えた。(参照 1)

- ・ 2. (1) の消化試験において、本品目の酵素原末は、人工胃液では 10kDa 以下までの分解が確認され、部分分解物が認められたものの、人工腸液では未分解物や部分分解物は確認されていないこと。
- ・ 本品目はプシコースの生産に利用される酵素であり、プシコースの生産過程の精製工程で十分に除去されるため、本品目が食品中に含まれる可能性はほぼないこと。

以上を踏まえ、本委員会としては、本品目は酵素指針第 2 の 2 の「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」の (1) から (5) までを満たすと判断した。

3. 酵素の毒性

(1) 遺伝毒性

本品目の酵素原末 (Lot 番号 : 3T-2) に関する遺伝毒性の試験成績は、表 1 のとおりである。

表 1 本品目に関する遺伝毒性の試験成績

指標	試験種類	試験対象	用量等	試験結果概要	参照
遺伝子突然変異	復帰突然変異試験 (<i>in vitro</i> , GLP)	細菌 (<i>Salmonella typhimurium</i> TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>)	最高用量 5 mg/plate	陰性 (代謝活性化系の有無に関わらず)	社内資料 (2015a) (参照 41)
染色体異常	小核試験 (<i>in vitro</i> , GLP)	ヒト末梢血リンパ球	最高用量 2,000 µg/mL (代謝活性化系存在下及び非存在下、細胞毒性のため 500 µg/mL まで観察) (4 時間処理)	陰性 (代謝活性化系の有無及び処理時間に関わらず)	社内資料 (2015b) (参照 42)
			最高用量 800 µg/mL (代謝活性化系非存在下、細胞毒性のため 75 µg/mL まで観察) (24 時間処		

			理)		
--	--	--	----	--	--

以上の結果に加え、2. のとおり、本品目は消化管内で容易に分解され、他の食品由来のタンパク質と同じように体内へ吸収されると考えられる。したがって、本委員会としては、*in vivo* の試験成績はないものの、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と判断した。

(2) 反復投与毒性

① ラットを用いた 13 週間経口投与試験（社内資料（2015c）、GLP）

Wistar ラット（雌雄各群 10 匹）に、本品目の酵素原末（Lot 番号：3T-2）を、表 2 のような投与群を設定して、13 週間混餌投与する試験が実施されている。

表 2 試験群の設定

用量設定	0、0.5、1.0、2.0%
酵素原末摂取量	雄：0、0.28、0.55、1.14 g/kg 体重/日 雌：0、0.31、0.63、1.25 g/kg 体重/日
TOS 換算 ⁷ 摂取量	雄：0、0.25、0.49、1.02 g TOS/kg 体重/日 雌：0、0.28、0.56、1.12 g TOS/kg 体重/日

その結果、以下の所見が認められたとされている。

- ・1.0%投与群：赤血球数の増加（雌）、尿の pH の上昇（雌）
- ・0.5%以上投与群：摂水量の減少（雄、39～40 日）
- ・0.5%投与群及び 1.0%投与群：卵巣の絶対及び相対重量の減少（雌）
- ・0.5%投与群：摂水量の減少（雄、73～74 日）、脾臓の絶対重量の減少（雌）

試験実施者は、それぞれの所見について以下のように考察し、いずれも偶発的なものであり、投与の影響によるものではないとしている。

- ・摂水量の減少については、用量依存性がなく、投与期間を通じた摂水量に影響が認められていない。
- ・赤血球数の増加及び尿の pH の上昇については、高用量群で認められていない。
- ・脾臓の絶対重量の減少については、相対重量が減少しておらず、高用量群で認められていない。
- ・卵巣の絶対及び相対重量の減少については、用量依存的でなく、病理組織学的な変化によって裏付けられていない。

以上の結果から、試験実施者は、本試験における NOAEL を最高用量である

⁷ 酵素原末の TOS 値 89.4%から、指定等要請者が換算したとされている。

2.0 %としている。（参照 43）

本委員会としては、試験実施者の判断を妥当と考え、本試験における NOAEL を最高用量である 2.0 %（TOS 換算で雄：1.02 g TOS/kg 体重/日、雌：1.12 g TOS/kg 体重/日）と判断した。

（３）アレルゲン性

① 宿主のアレルゲン性に関する事項

指定等要請者によれば、*E. coli* K-12 株誘導体がアレルゲン性を有するとの報告はないとされている。（参照 1）

② 酵素のアレルゲン性に関する事項

指定等要請者によれば、本品目のアレルゲン性に関する知見は特に知られていないが、③及び④に記載するとおり、本品目がアレルギー反応を誘発する可能性は非常に低いと考えられるとされている。（参照 1）

③ 酵素の物理化学的性状の変化に関する事項

本委員会としては、指定等要請者の考察を基に、2.（1）の酵素原末を用いた人工胃液及び人工腸液による消化性試験において、人工胃液処理では本品目の 10kDa 以下までの分解が確認され、部分分解物が認められたものの、人工腸液処理では未分解物や部分分解物が確認されていないことを踏まえ、本品目がアレルギー誘発性の懸念がなくなる質量⁸以下まで分解されることが確認されたと考えた。（参照 1）

④ 酵素と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

本品目と既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性について、8 アミノ酸配列の連続一致検索及び 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示すものの検索を実施したところ、既知のアレルゲンとの相同性は検出されなかったとされている。（参照 44）

以上を踏まえ、指定等要請者は、本品目がアレルギー反応を誘発する可能性は非常に低いと考察している。（参照 1）

本委員会としては、加熱処理に関するデータが提出されていないものの、本品目の宿主及び本品目について、アレルゲン性に関する知見が特に知られていないこと、人工胃腸液でアレルギー誘発性の懸念がなくなる質量以下まで分解されることが確認されたこと、及び既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性が検出されなか

⁸ 酵素指針の脚注 7 において「Huby（2000）によれば、アレルゲンは最低 2 つの IgE 結合部位をもち、1 つの部位は最低でも 15 アミノ酸残基であるとされている。このため、アレルゲンは 30 アミノ酸残基以上でなければならず、およそ 3 kDa とされる。」と記載されている。

ったことを踏まえ、添加物として適切に使用される場合、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低いと判断した。

Ⅲ. 一日摂取量の推計等

1. 国際機関等における推計

国際機関等において、本品目の一日摂取量の推計は行われていない。

2. 我が国における推計

指定等要請者は、本品目の一日摂取量を以下のように推計している。(参照 1)

本品目はプシコースの生産に使用する酵素であるため、まず、プシコースの一日摂取量を推計した。プシコースは砂糖や異性化糖を代替する食品素材として利用されると考えられる。そこで、砂糖や異性化糖が使用されている食品群⁹をプシコースが使用される可能性のある使用対象食品群とし、各食品群の一日摂取量を平成 28 年国民健康・栄養調査報告から得て、それぞれ想定されるプシコースの最大添加率(%)を乗じ、それらの総和を求めて、表 3 のとおりプシコースの一日摂取量を推計した。推計は、国民全体及び小児(1～6 歳)の 2 つの集団を対象として行った。

なお、プシコースの最大添加率(%)は、米国でプシコースについて指定等要請者が GRAS 物質としての届出を行った際に提案した添加率(米国での調査結果を踏まえたもの)を基にしている。(参照 16)

その結果、プシコースの一日摂取量は、国民全体及び小児で、それぞれ 20.34 g/人/日及び 16.84 g/人/日と推計された¹⁰。(参照 45)

表 3 プシコースの推定一日摂取量

使用対象食品群			プシコースの最大添加率 (%)	国民全体		小児	
				食品摂取量 (g/人/日)	プシコースの一日摂取量 (g/人/日)	食品摂取量 (g/人/日)	プシコースの一日摂取量 (g/人/日)
穀類	小	パン類	5.0 ¹¹	33.8	1.69	24.2	1.21
	麦・加工	(菓子パンを					

⁹ 指定等要請者独自の調査に基づいて選択したとされている。

¹⁰ 2016 年 2 月、食品安全委員会は、プシコースを関与成分とする特定保健用食品「レア スイート」について、「本食品一日当たりの摂取目安量 5 g 中に含まれる関与成分は、D-プシコース 5 g である。」、「本食品の特定保健用食品としての安全性を確保するためには、少なくとも次の事項について、使用者への情報提供の徹底が必須であると判断した。①本食品を摂取した場合に LDL-C が上昇する可能性があり、特に、高 LDL-C 血症及び境界域高 LDL-C 血症の人は注意すべきこと。②本食品の一日摂取目安量を守り、過剰摂取は行わないこと。③D-プシコースを原材料として含む他の食品との併用は避けること。」としている。

¹¹ 指定等要請者によれば、米国での GRAS 届出において対応する食品群がないことから、「Confections & Frostings」の値を用いたとされている。

	品	除く)					
		菓子パン類	5.0 ¹¹	4.8	0.24	4.7	0.24
砂糖・甘味料類			10.0 ¹²	6.5	0.65	3.6	0.36
野菜類	野菜ジュース		3.5	12.2	0.43	10.0	0.35
果実類	ジャム		10.0	1.3	0.13	1.0	0.10
	果汁・果汁飲料		3.5	10.7	0.37	25.6	0.90
魚介類	魚介加工品	魚介(佃煮)	50.0 ¹³	0.2	0.10	0.0	0
乳類	牛乳・乳製品	発酵乳・乳酸菌飲料	5.0	38.4	1.92	40.8	2.04
		その他の乳製品	5.0	8.4	0.42	17.8	0.89
菓子類	和菓子類		5.0	10.4	0.52	7.5	0.38
	ケーキ・ペストリー類		5.0	7.0	0.35	5.8	0.29
	ビスケット類		5.0	2.0	0.10	3.3	0.17
	キャンディー類		50.0	0.3	0.15	1.5	0.75
	その他の菓子類		10.0	6.6	0.66	12.4	1.24
嗜好飲料類	その他の嗜好飲料	コーヒー・ココア	3.5	133.3	4.67	1.7	0.06
		その他の嗜好飲料	3.5	134.7	4.71	169.1	5.92
調味料・香辛料類	調味料	その他の調味料	5.0	64.5	3.23	39.2	1.96

¹² 指定等要請者によれば、米国での GRAS 届出においては、「Sugar」の最大添加率は 10%、「Sugar substitutes」の最大添加率は 100%とされており、本推計では前者の値を用いたとされている。

¹³ 米国での GRAS 届出において対応する食品群がないことから、指定等要請者独自の調査に基づく値としたとされている。

プシコースの一日摂取量の合計			20.34		16.84
----------------	--	--	-------	--	-------

次に、使用された本品目が最大限プシコースに残存すると仮定した場合の、残存する本品目の TOS の割合を求めたところ、表 4 のとおり 0.090% となった。(参照 46、47)

表 4 プシコースに最大限残存すると仮定した場合の本品目の割合

本品目の TOS ¹⁴	2.57 %
プシコース 1kg の調製に用いる本品目の量 ¹⁴	0.035 kg/kg プシコース
TOS に換算した、プシコース 1kg の調製に用いる本品目の量	$0.035 \times 0.0257 = 0.00090$ kg TOS/kg プシコース
プシコースに残存する本品目の TOS の割合	0.090 %

表 3 のプシコースの推定一日摂取量に、本品目の残存する TOS の割合 0.090 % を乗じて、本品目の一日摂取量を表 5 のとおり算出したところ、国民全体及び小児で、それぞれ 18.29 mg TOS/人/日 (0.332 mg TOS/kg 体重/日) 及び 15.15 mg TOS/人/日 (0.918 mg TOS/kg 体重/日) と推計された。なお、平均体重として国民全体で 55.1 kg 及び小児で 16.5 kg を用いた。

表 5 本品目の推定一日摂取量

由来となる食品群			国民全体			小児		
			プシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)	プシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)
穀類	小麦・加工品	パン類 (菓子パンを除く)	1.69	1.52	0.028	1.21	1.09	0.066

¹⁴ 指定等要請者による測定値に基づく。

		菓子パン類	0.24	0.22	0.004	0.24	0.21	0.013
砂糖・甘味料類			0.65	0.58	0.011	0.36	0.32	0.020
野菜類	野菜ジュース		0.43	0.38	0.007	0.35	0.31	0.019
果実類	ジャム		0.13	0.12	0.002	0.10	0.09	0.005
	果汁・果汁飲料		0.37	0.34	0.006	0.90	0.81	0.049
魚介類	魚介加工品	魚介（佃煮）	0.10	0.09	0.002	0	0	0
乳類	牛乳・乳製品	発酵乳・乳酸菌飲料	1.92	1.73	0.031	2.04	1.83	0.111
		その他の乳製品	0.42	0.38	0.007	0.89	0.80	0.049
菓子類	和菓子類		0.52	0.47	0.008	0.38	0.34	0.020
	ケーキ・ペストリー類		0.35	0.31	0.006	0.29	0.26	0.016
	ビスケット類		0.10	0.09	0.002	0.17	0.15	0.009
	キャンディー類		0.15	0.13	0.002	0.75	0.67	0.041
	その他の菓子類		0.66	0.59	0.011	1.24	1.12	0.068
嗜好飲料類	その他の嗜好飲料	コーヒー・ココア	4.67	4.20	0.076	0.06	0.05	0.003
		その他の嗜好飲料	4.71	4.24	0.077	5.92	5.32	0.323
調味料・香辛料類	調味料	その他の調味料	3.23	2.90	0.053	1.96	1.76	0.107
合計			20.34	18.29	0.332	16.84	15.15	0.918

本委員会としては、指定等要請者の推計を妥当なものと考え、本品目の一日摂取量を、国民全体で 0.332 mg TOS/kg 体重/日及び小児で 0.918 mg TOS/kg 体重/日と判断した。

IV. 食品健康影響評価

本委員会としては、本品目の組換え DNA 技術応用添加物の安全性審査に係る食品健康影響評価については、評価基準に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

また、本委員会としては、本品目の添加物としての指定及び規格基準設定に係る食品健康影響評価については、以下のように判断した。

本品目の製造を目的として適切に管理された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安全性の懸念はない。

本品目について、酵素指針における「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」を検討した結果、本品目の毒性については、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与による毒性及びアレルギー性に係る知見を用いて評価を行うこととした。

本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性及び反復投与による毒性の懸念はなく、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低い。

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 2.0 % (TOS 換算で雄 : 1.02 g TOS/kg 体重/日、雌 : 1.12 g TOS/kg 体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 (国民全体で 0.332 mg TOS/kg 体重/日、小児で 0.918 mg TOS/kg 体重/日) とを比較して得られる安全マージンは十分である。

以上を踏まえ、本委員会としては、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：略称>

略称	名称等
ATCC	American Type Culture Collection：アメリカ培養細胞系統保存機関
EC	Enzyme Commission：国際生化学・分子生物学連合酵素委員会
EFSA	European Food Safety Agency：欧州食品安全機関
EU	European Union：欧州連合
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand：オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関
GRAS	Generally Recognized As Safe：一般的に安全とみなされる
GSFA	General Standard for Food Additives：コーデックス食品添加物一般基準
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives：FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LDL-C	低比重リポタンパク質コレステロール
NCBI	National Center for Biotechnology Information：米国国立生物工学情報センター
ORF	Open Reading Frame：オープンリーディングフレーム
PCR	Polymerase Chain Reaction：ポリメラーゼ連鎖反応
TOS	Total Organic Solids：総有機固形分

<参照>

- 1 松谷化学工業株式会社, プシコースエピメラーゼ概要書
- 2 CAS Registry Number (CAS RN): 1618683-38-7
- 3 松谷化学工業株式会社, *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ 安全性審査申請書類
- 4 厚生労働省 消費者庁, 第9版食品添加物公定書, 2018
- 5 American Type Culture Collection, Product Sheet. *Arthrobacter globiformis*
- 6 Yoshihara A, Kozakai T, Shintani T, Matsutani R, Ohtani K, Iida T et. al., Purification and characterization of D-allulose 3-epimerase derived from *Arthrobacter globiformis* M30, a GRAS microorganism. J Biosci Bioeng 2016; 123(2): 170-6
- 7 社内資料, Physical and chemical parameter of D-allulose 3-epimerase. 2018
- 8 社内資料, *Arthrobacter globiformis* M30 株由来のプシコースエピメラーゼの新規性. 2016a
- 9 社内資料, プシコースエピメラーゼの純度について. 2017
- 10 Itoh H, Okaya H, Khan AR, Tajima S, Hayakawa S, and Izumori K: Purification and characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. Biosci Biotechnol Biochem 1994; 58(12): 2168-71
- 11 Iida T, Hayashi N, Yamada T, Yoshikawa Y, Miyazato S, Kishimoto Y et al.: Failure of D-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans. Metabolism 2010; 59: 206-14
- 12 Iida T, Kishimoto Y, Yoshikawa Y, Hayashi N, Okuma K, Tohi M et al.: Acute D-psicose administration decreases the glycemic responses to an oral maltodextrin tolerance test in normal adults. J Nutr Sci Vitaminol 2008; 54: 511-4
- 13 世界知的所有権機関国際事務局, 国際特許 国際公開番号: WO 2013/005800 A1 発明の名称: アルスロバクター グロビホルミスの生産する酵素 出願人: 松谷化学工業株式会社
- 14 日本国特許庁, 特許公報 特許番号: 特許第 5848834 号 発明の名称: アルスロバクターグロビホルミスの生産するケトース3-エピメラーゼ 特許権者: 松谷化学工業株式会社

-
- 15 日本国特許庁，公開特許公報 特許出願公開番号：特開 2014-140361 発明の名称：ケトース 3 - エピメラーゼ酵素 出願人：松谷化学工業株式会社
- 16 Matsutani Chemical Industry Co. Ltd., GRAS notification for allulose (psicose) (GRAS Notice (GRN) No.498). 2013
- 17 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2014
- 18 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2014
- 19 Matsutani Chemical Industry Co. Ltd., GRAS notification for D-allulose 3-epimerase from *Arthrobacter globiformis* M30 expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110 (GRAS Notice (GRN) No.624). 2016
- 20 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2016
- 21 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2016
- 22 厚生労働省，平成 28 年国民健康・栄養調査報告 第 1 部 栄養素等摂取状況調査の結果，平成 29 年 12 月
- 23 公益財団法人，日本食品科学研究振興財団，既存添加物名簿収載品目リスト、（最終改正 平成 26 年 1 月 30 日）
- 24 国立感染症研究所，病原体等安全管理規程 別冊 1 「病原体等の B S L 分類等」平成 22 年 6 月
- 25 社内資料，プシコースエピメラーゼ酵素活性の測定結果. 2017（未発表）
- 26 社内資料，プラスミド pKK223-3 の確認. 2016（未発表）
- 27 F. Bolivar, R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. O. Betlach, H. L. Heyneker and H. W. Boyer: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2; 1977: 95-113
- 28 J. Brosius and A. Holy: Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic *lac* operator. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 6929-6933
- 29 H. A. de Boer, L. J. Comstock and M. Vasser: The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 21-25
- 30 A. Orosz, I. Boros and P. Venetianer: Analysis of complex transcription

-
- termination region of the *Escherichia coli rrnB* gene. Eur. J. Biochem. 1991; 201: 653-659
- 31 J. Shine and L. Dalgarno: The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1974; 71: 1342-1346
- 32 J. W. Warren, J. R. Walker, J. R. Roth and E. Altman: Construction and characterization of a highly regulable expression vector, pLAC11, and its multipurpose derivatives, pLAC22 and pLAC33. Plasmid 2000; 44: 138-151
- 33 社内資料, 遺伝子発現用ベクターpWKLP の構築. 2016 (未発表)
- 34 社内資料, 発現プラスミド pWKLP の確認. 2016 (未発表)
- 35 社内資料, pWKLP のオープンリーディングフレームの検索. 2016 (未発表)
- 36 社内資料, pWKLP のオープンリーディングフレームのアレルゲン解析. 2016 (未発表)
- 37 社内資料, pWKLP のオープンリーディングフレーム_毒性タンパク検索結果. 2016 (未発表)
- 38 澤井哲夫: β ラクタム系抗生物質。大野雅二、大村智編、抗生物質研究の最先端、東京化学同人、東京、1987 ; 121-129
- 39 社内資料, 定量 PCR 法によるプシコースエピメラーゼ製品中の遺伝子の定量. 2016 (未発表)
- 40 社内資料, プシコースエピメラーゼの消化性試験. 2016b
- 41 社内資料, Bacterial reverse mutation test with Matsurase FE. 2015a
- 42 社内資料, In vitro micronucleus test with Matsurase FE in cultured human lymphocytes. 2015b
- 43 社内資料, Sub-chronic (13-week) oral toxicity study with Matsurase FE in rats. 2015c
- 44 社内資料, *Arthrobacter globiformis* 由来プシコースエピメラーゼのアレルギー誘発性に関するアレルゲン配列データベースを用いた解析. 2017
- 45 食品安全委員会, 特定保健用食品評価書「レア スイート」. 2016 年 2 月
- 46 社内資料, *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼによるプシコース生産の検討. 2018

⁴⁷ 社内資料, *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼの Total Organic Solids の算出. 2018