

## 分科会 報告品目（食品添加物関係）

・アスパラギナーゼ

1 ~ 33

### 各剤について

- ・ 詮問書（厚生労働大臣から薬事・食品衛生審議会会长へ）
  - ・ 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。



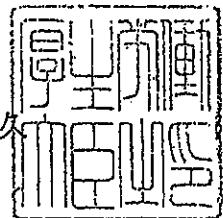
厚生労働省発食安0320第1号

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

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

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。

```
MPLKILLSALASLASASPLLYSRTTNETFVFTNANGLNFTQMNTTLPNVTIFATGGTIAGSDSSSTATTGYT
SGAVGVLSLIDAVPSMLDVANAGVQVANVGSEITSIDLISMSKKLNRVVCEDEPTMAGAVITHGDTLEETA
FFLDATVNCGKPIIVGAMRPSTAISADGPFNLLAEAVTVAASTSARDRGAMVVMNDRIASAYYVTKTNANTMD
TFKAMEMGYLGEMISNTPFFFYPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNAISSLGAQQGIVIAG
AGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQSMRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQKSRLLLGQLLSQGKNI
TEIADVFGTDAA
```

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°C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> 國際がん研究機関（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。

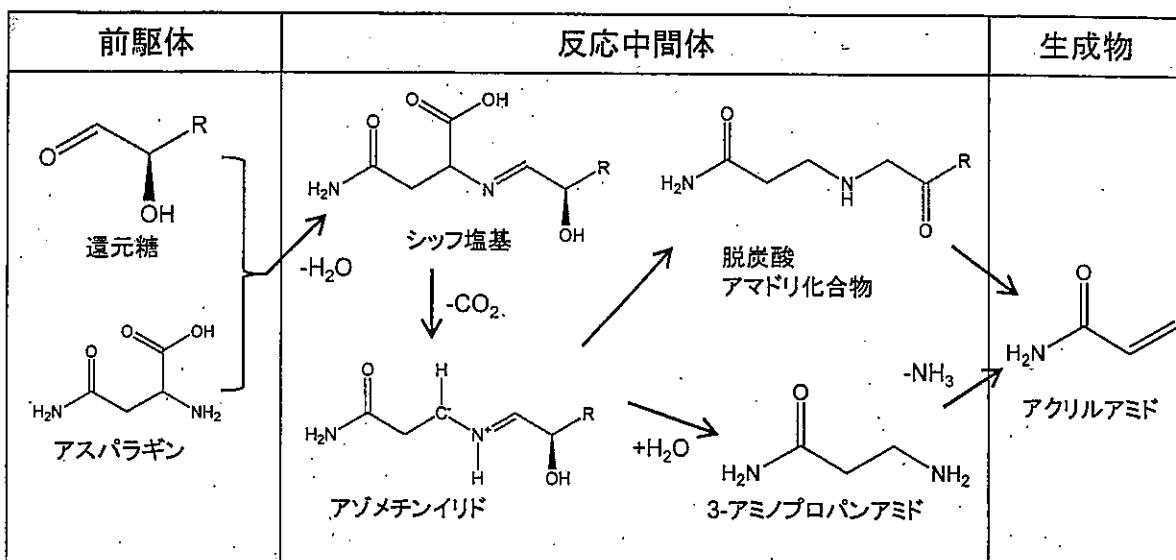


図1 食品中のアクリルアミドの主な生成経路<sup>3</sup>

## (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

3 「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

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

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

### (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°C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。

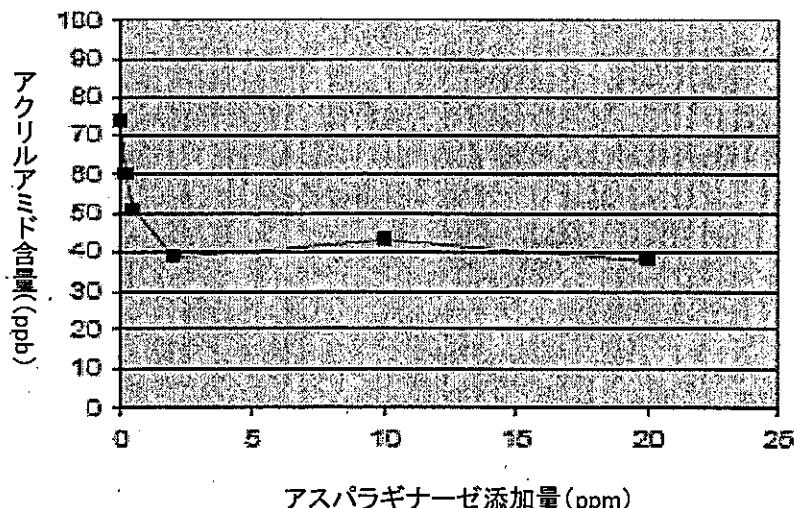


図2-1 パンにアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

##### (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°C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。

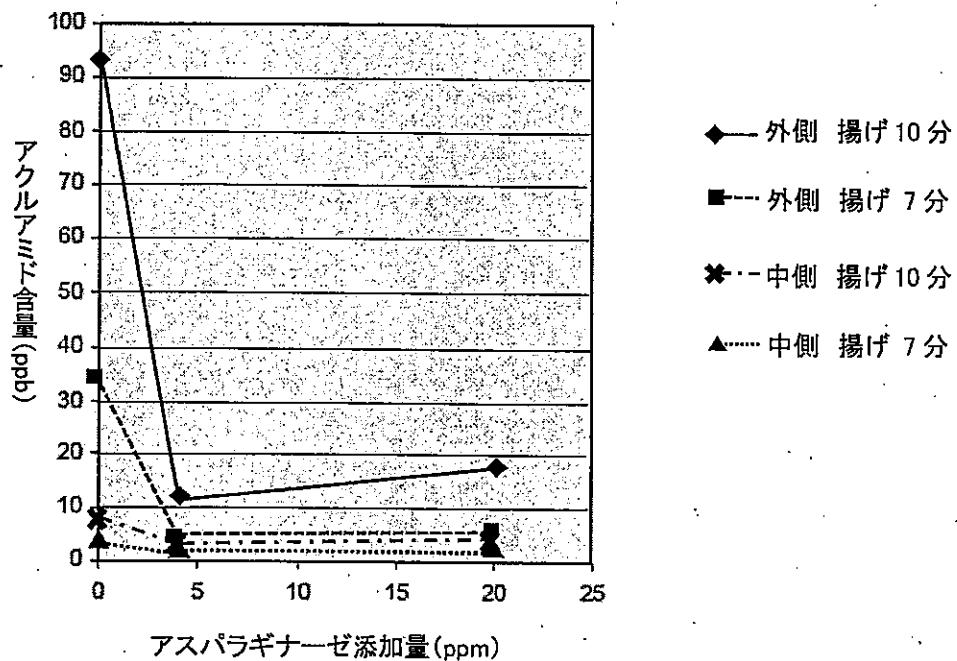


図2-2 ドーナツにアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(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）

クラッカ一生地に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。

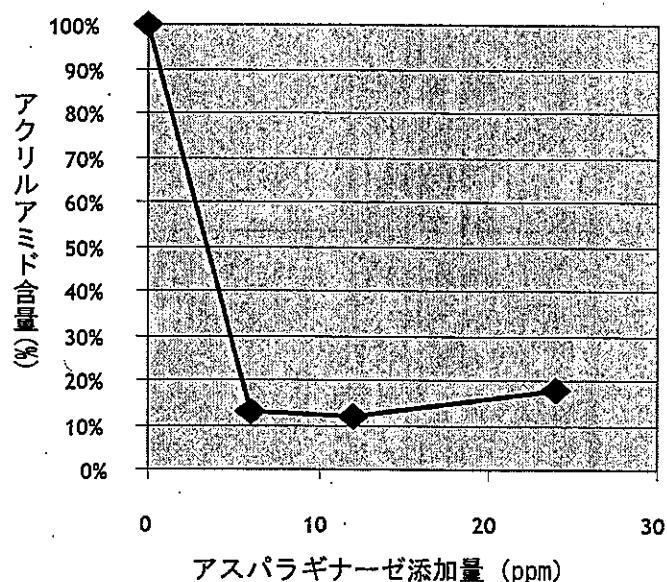


図2-3 クラッカーの生地にアスパラギナーゼを添加した場合のアクリルアミド低減効果

(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°Cで4時間反応させた後、180°C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°C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。

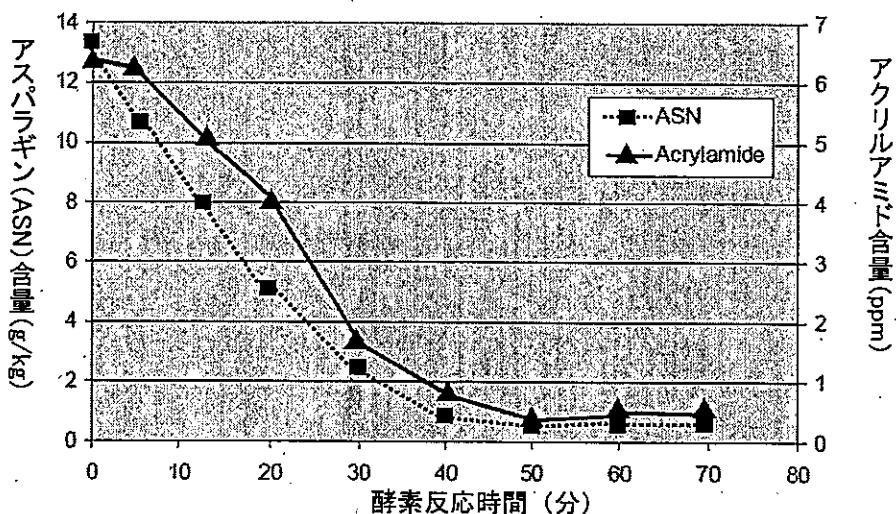


図3 じゃがいも生地にアスパラギナーゼを添加した場合の揚げじゃがいも中のアスパラギン及びアクリルアミドの低減効果

#### (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) 食品中の安定性

アスパラギナーゼは70°C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°C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°C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產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、アレルゲン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。

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<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パーセンタイル）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1-0）

## 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、0.549 mgTOS/kg 体重/日と判断した。

## 8. 新規指定について

アスパラギナーゼを食品衛生法第10条の規定に基づく添加物として指定することは、要請された使用方法において、食品安全委員会において人の健康に悪影響をお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, 希釀, 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, 希釀, 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帶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 μg/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っぽ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°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砕き、硫酸(1→4) 1 ml 及び硝酸 1 ml で潤し、白煙が発生しなくなるまで加熱した後、電気炉で強熱して完全に灰化する。残留物に塩酸(1→4) 10 ml を入れ、水浴上で加熱して蒸発乾固する。残留物に少量の硝酸(1→100)を加え、加温して溶かし、冷後、更に硝酸(1→100)を加えて正確に 10 ml とし、検液とする。なお、500°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 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 μg/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 (pH 5.0) 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 (pH 5.0) 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2.5g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、1ml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、1ml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3.9g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・ニトロブルシド試液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<sub>T</sub>及びA<sub>C</sub>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・ニトロブルシド試液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<sub>B1</sub>及びA<sub>B2</sub>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1μmol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 ( $A_{B_T}$  又は  $A_{B_C}$ ) を引いた値

$D_f$ ：試料溶液又は比較原液の希釣係数

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～褐色の透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帶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°Cにおいて1分間に 1μmol 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 (2 mol/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・ニトロブルシド試液 (アルカリ性) 水酸化ナトリウム溶液 (13→50) 8～10ml をとり、ニトロブ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つたこと  
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、希釀、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、希釀、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 1mL 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、1 g 当たり 2375 単位以上の酵素活性を有する。」  
とし、活性の単位については、8 版公定書及び 9 版公定書の他の酵素規格に倣い、酵素活性測定法の  
項に規定した。

## ○ 性状

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

## ○ 確認試験

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

#### 純度試験及び微生物限度

JECFAの酵素一般規格では、鉛（5mg/kg以下）、微生物限度（サルモネラ：不検出/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（5 mg/kg以下）、ヒ素（3 mg/kg以下）、抗菌活性（抗菌活性を示してはならない）、微生物限度（細菌数：50,000/g以下、大腸菌及びサルモネラ：認めない）を規定している。8版公定書の酵素規格では、鉛（Pbとして5.0 $\mu$ g/g以下）、ヒ素（As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>として4.0 $\mu$ g/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5.0 $\mu$ g/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4.0 $\mu$ g/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
	サルモネラ	認めない
	総大腸菌群	設定しない
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

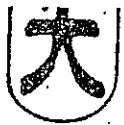
- 平成24年 9月27日 厚生労働大臣から食品安全委員会委員長あてに  
食品添加物の指定に係る食品健康影響評価を依頼  
第448回食品安全委員会（要請事項説明）
- 平成24年10月 1日 第115回食品安全委員会添加物専門調査会
- 平成25年 2月22日 第122回食品安全委員会添加物専門調査会
- 平成25年10月21日 第491回食品安全委員会（報告）
- 平成25年10月22日 食品安全委員会における国民からの意見募集  
(～平成25年11月20日)
- 平成26年 1月27日 第501回食品安全委員会（報告）
- 平成26年 1月27日 食品安全委員会より食品健康影響評価の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



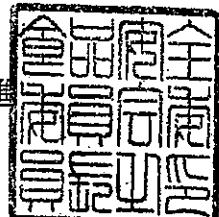
府食第97号  
平成26年1月27日

厚生労働大臣

田村 憲久 殿

食品安全委員会

委員長 熊谷 遼



食品健康影響評価の結果の通知について

平成24年9月26日付け厚生労働省発食安0926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

*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. 歐州における摂取量 .....	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. 國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. 歐州における評価 .....	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 涌子  
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 真  
久保田 紀久枝  
高橋 智  
塚本 徹哉  
頭金 正博  
中江 大  
森田 明美  
山田 雅巳

(2013年10月1日から)

梅村 隆志 (座長)  
頭金 正博 (座長代理)  
梶山 浩  
石井 邦雄  
石塚 真由美  
伊藤 清美  
今井田 克己  
宇佐見 誠  
久保田 紀久枝  
祖父江 友孝  
高橋 智  
塚本 徹哉  
戸塚 ゆ加里  
中江 大  
北條 仁  
森田 明美  
山田 雅巳

<参考人>

鎌田 洋一  
手島 玲子  
戸塚 ゆ加里  
北條 仁

## 要 約

酵素として使用される添加物「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」(EC 番号 : 3.5.1.1、CAS 登録番号 : 9015-68-3 (L-アスパラギン酸アミドヒドロラーゼとして)) (以下「本品目」という。)について、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に用いた試験成績は、*A. niger* ASP-72 株の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに本品目を被験物質とした遺伝毒性、反復投与毒性、アレルゲン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、アレルゲン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、既存アレルゲンとの相同意識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。

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）

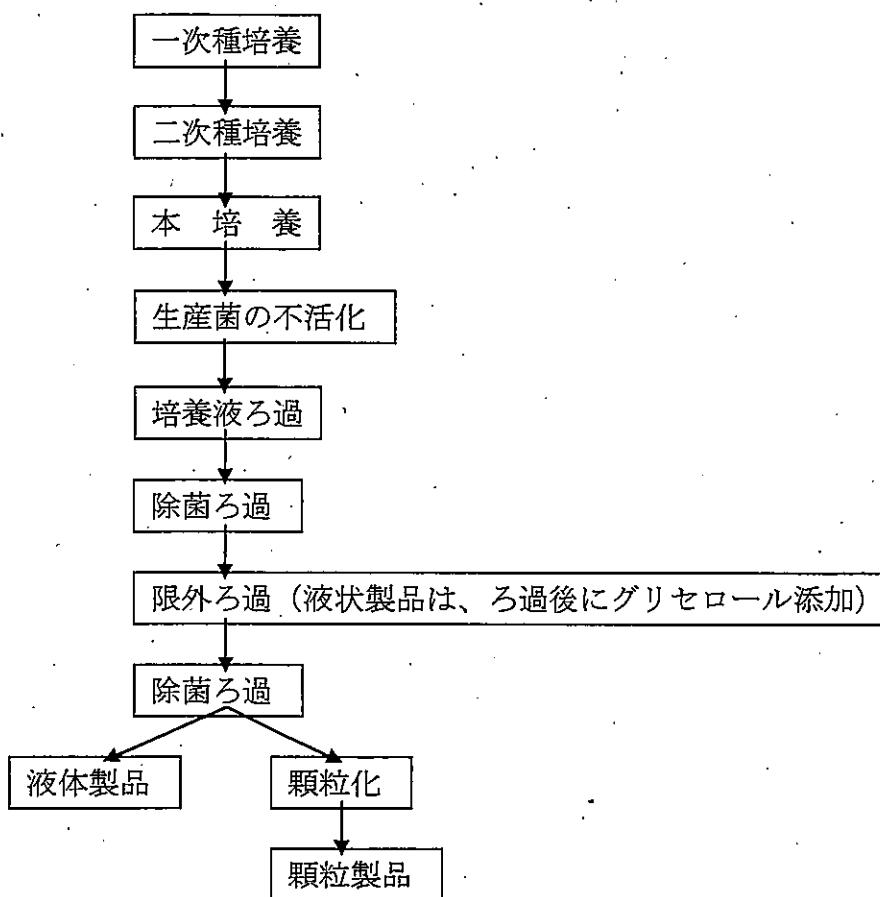
#### (2) 製造方法

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）

1 本文中で用いられた略称については、別紙 1 に名称等を示す。

2 指定等要請者によれば、L-アスパラギンを基質とし、pH 5.0、37°C 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ブルシド等と反応させる方法により測定したとき、1 分間にアンモニア 1 μmol に相当する吸光度（波長 600 nm）の増加を与える酵素量が 1 ASPU であるとされている。

図1 本品目の製造方法の概略（参照2）



### (3) 成分

指定等要請者によれば、本品目の有効成分は、生産菌株により菌体外に產生される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°C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
TQMNTTLVPNVTIFATGGTIAGSDSSSTATTGYTSGAVGVL	80
SLIDAVPSMLDVANVAGVQVANVGSEITSIDLISMSKKL	120
NRVVCEDPTMAGAVITHGTDLLETAFFLDATVNCGKPIV	160
IVGAMRPSTAISADGPFNLLEAVTVAASTSARDRGAMVVM	200
NDRIASAYYVTKTNANTMDTFKAMEMGYLGEMISNTPFFF	240
YPPVKPTGKVAFDITNVTEIPRVDILFSYEDMHNDTLYNA	280
ISSGAQGIVIAGAGAGGVTTSFNEAIEDVINRLEIPVVQS	320
MRTVNGEVPLSDVSSDTATHIASGYLNPQKS RILLGLLLS	360
QGKNITEIADVFA LGTDA	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。（参考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る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。（参考2）

### 4. 評価要請の経緯

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。（参考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 パーセンタイル）に摂取する人口集団を考慮して、本品目の一日摂取量を最大 4.1 mgTOS/kg 体重/日と推定している。なお、JECFA は、この推定は過小推計を避けたもの (conservative) であると言及している。（参照 10）

### 2. 我が国における摂取量

指定等要請者によれば、本品目が使用される可能性のある食品（群）に対する本品目の最大使用量及び最終製品中の残存量は、別紙 3 の表 1 に掲げたとおりとされている。その残存量及び平成 21 年国民健康・栄養調査から得られる食品（群）の一日摂取量から、本品目の推定一日摂取量は、体重を 50 kg として、別紙 3 の表 2 のとおり、0.549 mgTOS/kg 体重/日と算出される（参照 2）。本委員会としては、指定等要請者による推計は適切であると判断し、本品目の推定一日摂取量を、0.549 mgTOS/kg 体重/日と判断した。

## 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言われている。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る、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> ツアペック酵母エキス寒天培地、麦芽エキス寒天培地及び酵母エキス・スクロース寒天培地とされている。

及びB<sub>6</sub>は検出されなかつたとされている。(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>は検出されなかつたとされている。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產生すること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、インペルターゼ、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・非毒素產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GRAS物質とみなさ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產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、他の食品由來のたん白質の場合と同様に体内へ吸収されると考えられる。このこ

5 フモニシン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、ジアセトキシスルペノール、HT-2トキシン、ニバレノール、オクラトキシンA、ステリグマトシスチン、T-2トキシン並びにゼアラレノンが確認されており、フモニシンB<sub>1</sub>及びB<sub>2</sub>の検出限界は5 µg/kg、オクラトキシンAの検出限界は1 µg/kgであつたとされている。

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°C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°C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と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°Cに温めた人工胃液中に本品目を添加し、混和し、37°C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られたとされている。

