

手引注解

Ⅲ．安全性、Ⅳ．一日摂取量

手引注解は、「概要書」を作成する際に参考とする「食品添加物の指定及び使用基準改正要請資料作成に関する手引」をわかりやすくするため、注解を加えたものです。

手引注解は、以下の構成となっています。

全体的な注意

要請資料全体に関する注解

Ⅰ．添加物の概要

Ⅱ．有効性

Ⅲ．安全性、Ⅳ．一日摂取量



概要書作成に関する注解

別添：情報検索の案内、食品健康影響評価の考え方、
安全性試験を新たに実施する場合の注意事項

目次

手引注解Ⅲ、Ⅳで使用する略語等	3
手引注解Ⅲ、Ⅳの構成と注意点	4
本注解で説明する内容	4
概要書記載に当たっての注意点	5
Ⅲ．安全性	6
A．安全性に関する知見に盛り込む点	6
B．安全性に関する知見記載の注意点	8
C．必要な資料等の考え方	10
D．各項目の注意点	11
D- 1．基原生物の安全性	11
D- 2．酵素の消化管内での分解性に関連する事項	13
D- 3．酵素の毒性	14
(1)90 日間反復投与毒性試験（げっ歯類）	14
(2)遺伝毒性試験	16
(3)アレルゲン性	17
DI- 4．酵素の消化管内での分解性及びアレルゲン性に係る試験	20
D- 5．その他安全性に係る知見	21
Ⅳ．一日摂取量	22

手引注解Ⅲ、Ⅳで使用する略語等

安全性に関する用語については、①[食品安全委員会用語集](#)に説明がありますので、ご参照ください。

- GLP : Good Laboratory Practice、優良試験所基準
- [ICH](#) : International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use、医薬品規制調和国際会議
- MOA : Mode of Action、作用機序
- MOE : Margin of Exposure、ばく露マージン
- [NOAEL](#) : No Observable Adverse Effect Level、無毒性量
- OECD : Organisation for Economic Co-operation and Development、経済協力開発機構
- [OECD TG](#) : OECD Test Guideline、OECD試験法ガイドライン
- VSD : Virtually Safe Dose、実質安全量
- WHO/IPCS : World Health Organization/International Programme on Chemical Safety、世界保健機関/国際化学物質安全性計画
- [酵素評価指針](#) : 添加物（酵素）に関する食品健康影響評価指針
- [添加物評価指針](#) : 添加物に関する食品健康影響評価指針

手引注解Ⅲ、Ⅳの構成と注意点 [1/2]

【 本注解で説明する内容 】

- 1) 本注解では、**概要書案の「Ⅲ.安全性に関する知見」**及び**「Ⅳ. 一日摂取量の推計及び考察」**について説明します。
- 2) **「酵素」**について、各項目の記載の説明をします。
- 3) 各項目の詳細については、本注解とともに酵素評価指針をよく読んでください。
- 4) 必要な試験結果がなく、新たな試験を実施する場合には、[「手引注解 安全性試験を新たに実施する場合の注意事項」](#)を参照ください。

手引注解Ⅲ、Ⅳの構成と注意点 [2/2]

【 概要書記載に当たっての注意点 】

- 1) 要請品の安全性説明は、食品事業者の責務です。
- 2) *in silico*を活用した資料であっても、内容は要請者自身が確認してください。
- 3) 引用する各毒性試験については、原則として②[OECD試験法ガイドライン](#)※に準拠するものとします。
 - ※ 翻訳版のWebサイトをご案内していますが、OECD試験法ガイドラインは随時更新されますので、最新版については、③[OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects](#)からご確認ください。
- 4) 要請品の安全性に関連する資料については、当該資料の信頼性に係らず、提出してください。

Ⅲ. 安全性

A. 安全性に関する知見に盛り込む点 [1/2]

評価に際しての基本的な考え方 1

- 酵素を含め、加工助剤については、添加物とは別の規制枠組みを設けている国・地域もあります。
- 酵素量は総有機固形分（TOS）で示します。
$$\%TOS = 100 - (A + W + D)$$

A: %灰分、W: %水分、D: %賦形剤その他製剤成分)
- 基原生物の安全性、アレルゲン性、酵素の消化管内での分解性を検討します。
- 基原生物の安全性、酵素の消化管内での分解性と分解物を含めたたんぱく質、ペプチドのアレルギーを中心に、毒性に係る知見および一日摂取量を、総合的に判断してください。

A. 安全性に関する知見に盛り込む点 [2/2]

評価に際しての基本的な考え方 2

1. 妊婦、胎児、乳幼児、小児、高齢者等の特定の集団における評価は必要に応じて行うこととし、その際、**各集団における有害影響の知見**がある場合には、それらも考慮してください。
2. 酵素を複数摂取した場合の有害影響については、個々の酵素の評価を十分に行うことで、実質的な安全性を十分に確保することが可能と考えられています。

B. 安全性に関する知見記載の注意点 [1/2]

- 毒性試験における知見については、酵素評価指針の項目順に従って、記載してください。
- 手引の各試験項目に該当する試験結果を示す際は、必ず引用元を記載してください。
- 引用文献として、対応する原著論文または最終報告書を引用するようにしてください。
- 報告書あるいは原著論文が入手できず、総説等から引用する場合は、その総説中に、具体的な試験条件やデータが示されている場合に限り、原著の入手が困難な場合は、「原著が公表されていないこと」、または「原著が見つからないこと」を、記載してください。
- 必要な情報が見つからなかった場合、単に「無し」等と記すだけでなく、Webサイト等で検索した内容を明記してください。
例えば、検索エンジン名（④[PubMed](#)、⑤[Google Scholar](#)等） 検索語、検索の日付、結果の画面等をPDF化し、それを引用文献としてください。

B. 安全性に関する知見記載の注意点 [2/2]

- 参照する各試験の試験報告書を引用文献とし、その記載内容に基づき、試験条件として、使用した動物種、系統、性別、各群動物数、投与方法、投与用量及び用量段階などを、記載してください。
- 各試験における要請品のNOAELを求めてください。（[手引注解 食品健康影響評価の考え方「1.NOAEL決定」](#)を参照）
- 要請品の摂取経路を踏まえ、原則として経口投与により実施されている試験資料を引用してください。
- 各項目では、参照した試験内容を記載するとともに、最後に要請者が考える結論を明記してください。
- JECFAでは⑥[EHC240](#)に基づいて評価されています。

C. 必要な資料等の考え方

1. 概要書の記述の論拠として引用する各種毒性試験については、GLP適用の有無を明記してください。GLP試験結果が望ましいのですが、非GLP試験であっても評価対象あるいは参照資料になり得ます。
2. 新たな非げっ歯類の試験実施を一律には求めてはいません。

D. 各項目の注意点

D- 1. 基原生物の安全性 [1/2]

(酵素評価指針抜粋 1/2)

基原生物（動物、植物、微生物等）の安全性について以下の事項を基に判断します。

（１）病原性及び有害物質（有害作用を示す物質であり、代謝物等を含む。以下同じ。）の産生性に関する事項

①病原性 原則として、添加物製造への利用経験又は食品としての食経験*等の必要な事項を確認し、また、基原生物の近縁種（微生物の場合は近縁株とする。以下第２章 第２ １「基原生物の安全性」において同じ。）における病原性 の知見も考慮した上で、当該酵素の生産種（微生物の場合は生産株とする。以下同じ。）について病原性がないと判断できること。

*食経験：具体的なデータを踏まえて判断し、評価に用いてください。

当該食品について、原料、製造・加工方法等を変えず、同じ製品（関与成分）が食生活の一環として長期にわたって食されてきた実績があると社会一般的に認められるような場合であって、かつ、これまで安全性上の問題がない場合には、（食経験ありとして）安全性評価を要しないと考えられる。

（特定保健用食品の安全性評価に関する基本的考え方より抜粋）

（次のスライドに続く）

D- 1 . 基原生物の安全性 [2/2]

(酵素評価指針抜粋 2/2)

(1)

②有害物質の産生性 食経験、文献等の十分な知見の下で、また、基原生物の近縁種における有害物質の産生性の知見も考慮した上で、当該酵素の生産種について有害物質を産生することが知られていないこと。有害物質を産生することが否定できないときは、生産種、酵素原体又は酵素製剤において、当該有害物質が検出されないこと（多量を摂取した場合に健康影響に及ぼす可能性がある物質については、当該物質が健康影響を与える範囲で検出されないことが確認されていることを意味します）。

(2) 寄生性及び定着性に関する事項 基原生物が、ヒトや他の生物に寄生又は定着しないこと。寄生又は定着することが否定できない場合、ヒトや他の生物に悪影響を与えるか否かを考慮した上で、当該基原生物を用いた製造に安全性上の問題がないと判断できる 理由があること。

(3) 病原性の外来因子（ウイルス等）に関する事項 基原生物が病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないこと。

D- 2 . 酵素の消化管内での分解性に関連する事項

(酵素評価指針抜粋)

以下の事項を基に判断する。

- (1) 消化管内で容易に分解されること。酵素の分解性は、原則として、4「酵素の消化管内での分解性及びアレルギー性に係る試験」を用いて、アレルギー誘発性の懸念がなくなる質量以下までの分解を確認すること。
- (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。
- (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。
- (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。
- (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。

D-3. 酵素の毒性

(1) 90 日間反復投与毒性試験（げっ歯類）[1/2]

1. 要請品のげっ歯類（通常、ラット、マウス又はハムスター）または非げっ歯類（通常、イヌ）の反復投与毒性試験の結果を記載してください。
2. 反復投与毒性試験の期間は90日間または、それ以上の投与期間があります。
3. 試験条件として、使用した動物種、系統、性別、各群動物数、投与方法、投与用量及び用量段階などを、記載してください。
4. 設定した投与群についてはその設定根拠を明示するとともに、NOAELを記載してください。（[手引注解 食品健康影響評価の考え方「1.NOAEL決定」](#)を参照）
5. 通常、濃度 5 %（W/W）を超える投与量の結果は必要ありません。また、強制投与の場合には、通常、技術的に投与できる最大量、又は 1,000 g/kg 体重で何らかの毒性影響が認められないときはそれ以上の投与量の結果は必要ありません。
6. 対照群にも観察される自然発生性病変の頻度又は程度が投与により増加した場合、背景データの範囲内であっても、その頻度又は程度に用量相関性がみられる等の毒性学的意義のある変化である場合には、原則として投与による影響と評価してください。

D-3. 酵素の毒性

(1) 90 日間反復投与毒性試験（げっ歯類） [2/2]

7. 毒性試験において認められた所見のヒトへ外挿性
エンドポイントを、機能的変化、退行性変化、増殖性変化、生殖機能への影響等に分けて、慎重な取扱いをしてください。
8. 投与前後における被験物質の酵素活性を確認し、被験物質の安定性に関する資料も必要です。

【試験方法の例】

- [OECD TG 408](#)（げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験）
- [OECD TG 409](#)（非げっ歯類における 90 日間反復経口投与毒性試験）
- [OECD TG 452](#)（慢性毒性試験）

D-3. 毒性試験 (2) 遺伝毒性試験

1. 「微生物を用いる復帰突然変異試験」の結果が陽性である場合には、遺伝子突然変異又は DNA 損傷を指標とする *in vivo* 試験（コメット試験、*in vivo* トランスジェニック動物突然変異試験等）の結果をもとに、総合的に判断します。
2. 遺伝毒性発がん物質との評価がなされた添加物については、承認されません。
3. 狭義の「変異原性」に限定されることなく、「遺伝毒性」に係る試験結果を記載ください。
4. 要請品の標準的組合せ（「微生物を用いる復帰突然変異試験([OECD TG 471](#))」、「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験([OECD TG 473](#))」及び「げっ歯類を用いる小核試験([OECD TG 474](#))」）の試験結果が必要です。
5. 微生物を用いる復帰突然変異試験に加えて構造活性相関の結果も参考にすることが望ましいです。
6. 「哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験([OECD TG 473](#))」については、マウスリンフォーマ TK 試験(MLA)([OECD TG 490](#))又は *in vitro* 小核試験([OECD TG 487](#))をもって、代えることができます。
7. 標準的な組合せに関しては、ICH S2(R1)遺伝毒性試験ガイドライン 2012 を参照してください。

D- 3 . 酵素の毒性（3） アレルゲン性 [1/3]

- ① 次の a . から d . までの事項を基に、アレルゲン性について懸念がないか、総合的に判断します。また合理的な理由がある場合には、一部を省略することができます。
- a . 基原生物のアレルゲン性に関する事項
基原生物のアレルゲン性に関する知見が明らかにされていること。
 - b . 酵素のアレルゲン性に関する事項
酵素のアレルゲン性に関する知見が明らかにされていること。
 - c . 酵素の物理化学的性状の変化に関する事項
酵素が、分子量、酵素活性、免疫反応性等の変化から、アレルギー誘発性の懸念がなくなるまで分解されることが明らかにされること。方法は、原則として、4「酵素の消化管内での分解性及びアレルゲン性に係る試験」を用いて、アレルギー誘発性の懸念がなくなる質量以下までの分解を確認すること。
[Huby \(2000\) Why Are Some Proteins Allergens? | Toxicological Sciences | Oxford Academic \(oup.com\)](#)
アレルゲンは最低 2 つのIgE結合部位を持ち、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。アレルゲンは30アミノ酸残基以上、おおよそ、おおよそ3kDaとされている。

D- 3 . 酵素の毒性（３） アレルゲン性 [2/3]

d . 酵素と既知のアレルゲン（アレルゲン性を示すタンパク質をいい、グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関する事項

- 酵素について、既知のアレルゲン等と一次構造を比較し、既知のアレルゲン等と構造相同性を有しないこと。
- 抗原決定基（エピトープ）を示す可能性のある配列を明らかにするためには、アミノ酸配列に関する相同性検索などを実施する必要がある。その際、用いたアレルゲンデータベースの名称、検索条件、検索方法及び検索結果を明らかにする。
- 既知のアレルゲン等との一次構造の比較は、原則として in silico で 8 アミノ酸配列の連続一致検索¹⁾及び 80 残基中 35%以上のホモロジー解析²⁾を行う。

1) 8 アミノ酸配列の連続一致検索：連続アミノ酸の一致検索を行うことで、IgE抗体との結合に関与するB細胞エピトープに加えて、感作性に関与する関与するT細胞のエピトープとの相同性についても確認を行うことが可能。JECFAが推奨している。

2) 80 残基中 35%以上のホモロジー解析：既知のアレルゲンとの一次構造との比較に関するバイオインフォマティクス評価手法は、科学技術の進歩に応じ、その時点で適切な手法に基づくこと。

参考文献：[Evaluation of certain food additives and contaminants: eightieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives](#)

D- 3 . 酵素の毒性（３） アレルゲン性 [3/3]

- ② ①により、既存のアレルゲンと交差反応性を示すことが否定できないなど、アレルゲン性の懸念がないと判断できない場合は、酵素の IgE 結合能を検討します。
使用するアレルギー患者血清の選択は、下記の a . 及び b . に従い行います。
ただし、a . 及び b . で適切な血清が得られない場合は、基原生物の近縁種生物に対して特異的 IgE 抗体価が高値な血清を選択し、なお、適切な血清が得られない場合は、主要なアレルゲン（卵、乳、大豆、米、小麦、そば、たら、えび、かに及び落花生）に対して特異的 IgE 抗体価が高値な血清を選択します。
- a . 基原生物がアレルゲン性を持つ場合は、その生物に対する特異的 IgE 抗体価が高値な血清
 - b . 酵素について既知アレルゲンとの構造相同性が認められた場合は、当該アレルゲンを含む生物に対する特異的 IgE 抗体価が高値な血清
- ③ ①及び②を踏まえ、なおアレルゲン性の懸念がないと判断できない場合は、皮膚テストや経口負荷試験などの臨床試験データも考慮して総合的に判断します。

D-4． 酵素の消化管内での分解性及びアレルギー性に係る試験

- 以下の（１）から（３）までの処理によって、酵素の分子量、酵素活性、免疫反応性等が変化するかどうかを確認します。
- これらの確認に当たっては、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ウエスタンブロット法又は ELISA 法あるいはこれらと同等の方法を用います。
 - （１）人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理
 - （２）人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理
 - （３）加熱処理（加熱条件はヒトが経口摂取する際に処理される場合と同等の条件で行う。）

D- 5 . その他安全性に係る知見

D-1からD- 3 の何れの項目にも収載されなかった資料（安全性に関する知見）がある場合は、併せて評価しますので、提出してください。

IV. 一日摂取量 [1/3]

一日摂取量の推計

- 原則として、使用対象食品の一日摂取量に酵素の使用量を乗じて求めます。
- 食品の一日摂取量は、国民健康・栄養調査の食品群別摂取量又はその他の資料等により適切に推定します。
- 酵素の使用量としては、全量がそのまま最終食品に移行して消費されるとした場合を想定し、一般的に使用される条件下での最大添加量を用いて一日摂取量を推定します。ただし、酵素が最終食品内で変性・失活する又は分解・除去される場合（食品の製造工程等を含む）には、過剰な見積もりになることがあります。
- 推定一日摂取量は、最新の食品安全委員会決定（平成26年3月31日）に基づく平均体重（国民平均であれば55.1kg）を用いて推定してください。

IV. 一日摂取量 [2/3]

食品健康影響評価の留意事項

- 混在する不純物を含め、分解性に関連する5事項までを満たす場合には、90日間反復投与毒性、遺伝毒性およびアレルギー性試験で評価し、**NOAEL** を決定した後、摂取量と比較してMOEを評価します。
- 酵素の反復投与毒性試験は最高用量でも毒性がでないことが多いので、その場合には最高用量を**NOAEL** として、MOEを評価します。
- 酵素の一日摂取量の推計は全量がそのまま最終食品に移行して消費される場合を想定しています。酵素が変性・失活または分解・除去される場合には過剰な見積もりとなります。

IV. 一日摂取量 [3/3]

食品健康影響評価の参考資料

評価にあたっては、過去の酵素における食品影響評価および調査報告書が参考になります。

1. [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](#)
2. [添加物評価書 Aspergillus Oryzae NZYM-SP 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ](#)
3. (株) 三菱テクニサーチ、[「添加物のうち、加工助剤\(殺菌剤、酵素、抽出溶媒等\) 及び栄養成分に関するリスク評価手法の開発に関する 調査・研究」報告書](#)

「Ⅲ．安全性」、「Ⅳ．一日摂取量」を、これで終わります。

ほか、

全体的な注意

Ⅰ．添加物の概要

Ⅱ．有効性

をご参照ください。