

※ 食品安全委員会における評価結果（案）パブリックコメント平成18年12月8日まで

動物用医薬品評価書

ケラチナーゼを有効成分とする洗剤（プリオザイム）の食品健康影響評価について（案）

2006年11月

食品安全委員会 動物用医薬品専門調査会

〈目次〉

	頁
1. 製剤について	2
2. サチライシンについて	3
3. プリオザイムの安全性について	4
4. プリオザイムの残留性について	5
5. 食品健康影響評価について	6
6. 参考文献	7

〈審議の経緯〉

平成18年 7月18日

農林水産大臣および厚生労働大臣から食品健康影響評価について要請、関係書類の接受

平成18年 7月20日

第153回食品安全委員会（要請事項説明）

平成18年10月20日

第62回動物用医薬品専門調査会

平成18年11月 9日

第167回食品安全委員会

平成18年11月 9日

—12月 8日

国民からの意見情報の募集

〈食品安全委員会委員〉

H18.7.1から

委員長	寺田	雅昭
委員長代理	見上	彪
	小泉	直子
	長尾	拓
	野村	一正
	畑江	敬子
	本間	清一

〈食品安全委員会動物用医薬品専門調査会専門委員〉

H17.10.1. から

座長	三森	国敏
座長代理	井上	松久
	青木	宙
	明石	博臣
	江馬	眞
	大野	泰雄
	小川	久美子
	渋谷	淳
	嶋田	甚五郎
	鈴木	勝士

津田	修治
寺本	昭二
長尾	美奈子
中村	政幸
林	眞
藤田	正一
吉田	緑

〈参考人(プリオン専門調査会)〉

堀内	基広
山本	茂貴

ケラチナーゼを有効成分とする洗浄剤(プリオザイム)の食品健康影響評価について (案)

食品安全委員会は、食品安全基本法(平成15年法律第48号)第24条第1項8号(農林水産省)及び第1号(厚生労働省)の規定に基づき、農林水産省及び厚生労働省より動物用医薬品「ケラチナーゼを有効成分とする洗浄剤(プリオザイム)」に係る食品健康影響評価について意見を求められた(平成18年7月18日、関係書類を接受)。

プリオザイムの主剤は特定の *Bacillus licheniformis* 菌株が産生する酵素(ケラチナーゼ)である。ケラチンたん白質は毛髪、羽毛、爪、角や鱗等の上皮や細胞の骨格を構成する主要な線維状のたん白質であり、一般に水に不溶性で、熱や酵素による変性や分解によく耐えるという性質を持つが、ケラチナーゼはこのケラチンたん白質を加水分解する酵素の俗称である。

プリオザイムの有効性は、BSE プリオンたん白質(PrP^{Sc}; UK7 株)及びマウススクレイピープリオン(たん白質)Obihiro 株が酵素的に加水分解され、ウエスタンブロットで検出できなくなることに基づく、「牛海綿状脳症由来の異常プリオンタンパク質の汚染除去」で、現時点では感染性の除去までの確認はされていない⁽¹⁾。現在想定されている本剤の主な使用目的は、解剖刀、脊髄を吸い出すチューブ及び破壊するニードル、前掛け、長靴、スパチュラ、メス、ハサミ、試験管等の実験器具等、通常のと畜処理あるいは検査等に使用された器具の洗浄であり、本剤の意見聴取の趣旨は、器具等に使用されたプリオザイム製剤に含有される成分が、食品を介してヒトの健康に与える影響の評価である。なお、と畜場における牛海綿状脳症(BSE)スクリーニング検査の時点で陽性の場合にあっては「伝達性海綿状脳症検査実施要領」(平成13年10月16日作成、平成18年6月23日最終改正)に従い、と畜場の施設設備、機械器具等については所定の消毒措置^aがとられることになっている。

また、酵素の性質は異なるが、プリオンたん白質を酵素分解する製剤が英国健康保護局と企業体において協同開発されており、2006年にヒトの手術器具の消毒を目的として欧州医療機器指令に基づくCEマークを取得している。

1. 製剤について

プリオザイムは *Bacillus licheniformis* が産生するケラチナーゼを主剤とする洗浄剤である。主剤は、マウススクレイピープリオン(たん白質)Obihiro 株の分解性を指標にスクリーニングされた酵素であるが、その酵素科学的特性が調査された結果、至適温度が50~70℃、至適pHが8~10の範囲にあるアルカリプロテアーゼの一種であり、基質として一般に難分解性であるカゼインやコラーゲン、エラスチンさらにはケラチンを分解する能力があることが明らかにされている。遺伝子

^a (1) 800℃以上の完全な焼却(と体、ゴム手袋、防護衣服等)
(2) 132~134℃、1時間の高圧蒸気滅菌(器具等)
(3) 水酸化ナトリウム1モル濃度以上、20℃、1時間の処理(施設、汚物等)
(4) 次亜塩素酸ナトリウム有効塩素濃度が最低2%溶液で1時間による処理(施設、汚物等)

解析では同様に *Bacillus* 属が産生するサチライシン^b Carlsberg と高い相同性を有し、サチライシン DY と最も高い相同性を示すとされている。

用法・用量は、緩衝剤 30g を 40～60℃ に加温した水道水 100L に溶解し、それに本体(酵素剤)35g を加え溶解した液に解剖刀、脊髓を吸い出すチューブ及び破壊するニードル、前掛け、長靴、スパチュラ、メス、ハサミ、試験管等の器具を 1 時間浸漬する。この間、水温は 40～60℃ を保つとされている。

酵素剤には顆粒化のためヒドロキシプロピルセルローズ(7.5mg/g)、白糖、着色のため黄色四号(5mg/g)が含有されており、緩衝剤には炭酸ナトリウム、塩化カリウム、ホウ酸(204mg/g)、二酸化ケイ素(シリカゲル; 19mg/g)、青色一号(3mg/g)が含有されている。これらはいずれも国内外で食品添加物あるいは医薬品の添加剤として利用されているものもしくは白糖や塩化カリウムのような食品そのものの成分である。酵素剤・緩衝剤の使用量と用法を考慮すると、これらの添加剤が器具を介して食品に残留し、ヒトの健康に悪影響を及ぼす可能性はほとんど考えられない。さらに物性から、上記添加剤はいずれも本製剤の使用上の注意に記載されている浸漬後の水洗により、器具等から容易に除去されると考えられる。洗浄器具におけるケラチナーゼの残留については、後述するようにメスを用いて、水洗浄により除去されることが実験的に確認されている。

2. サチライシンについて

プリオザイムの主剤であるケラチナーゼはサチライシンに属すると考えられる。サチライシンは古くから知られる酵素で、反応形式に従った分類ではペプチド結合を加水分解するセリンプロテアーゼである EC 番号^dEC3.4.21.62 に分類されている。サチライシン Carlsberg の CAS Number は 9014-01-1、サチライシン BPN は 1395-21-7 である。工業的に多用されることから、ACGIH^eにおいて労働環境中の天井値(ceiling) $6 \times 10^{-5} \text{mg/m}^3$ が設定され(ACGIH はサチライシンに限らずアルカリプロテアーゼについて吸入暴露による感作等を考慮に入れてこの天井値を設定している)、指摘されているのはいずれも眼、皮膚あるいは呼吸器系等への接触による直接的影響である。長期の吸入暴露による影響として asthma^fがあげられている。米国 NIOSH では ACGIH と同じ値を勧告暴露限界値(REL^g)としており、欧州諸国、南米諸国、オーストラリア、韓国等においても同様の値が設定されている。国内では労働安全衛生法で、接触による眼や皮膚の炎症、吸入によるアレルギー反応等の観点から「名称等を通知すべき有害物」^hに指定されているが、日本産業衛生学会による許容濃度は設定されていない。一方、マウスの腹腔内投与における LD₅₀ は 75mg/kg 体重(サチライシン BPN)、経口暴露による影響については、ラットの経口投与における LD₅₀ が 3700mg/kg 体重(サチライシン Carlsberg)体重と報告されている^{(2), (3)}。

サチライシンに分類される酵素には、家庭用洗剤に広く利用されるサチライシン Carlsberg を始

^b Subtilisin; ズブチリシン、スブチリシンとも表記される

^c 二酸化ケイ素については濾過助剤、固結防止剤としての使用

^d 国際生化学・分子生物学連合(IUBMB)が提唱する酵素をその反応形式に従って EC に続く 4 組の数字で表したものの。

^e American Conference of Governmental Industrial Hygienists; 米国産業衛生専門家会議

^f Reversible bronchoconstriction (narrowing of bronchioles) initiated by the inhalation of irritating or allergenic agents と注釈されている(NLM Haz-Map)

^g Recommended Exposure Limit

^h 官報公示整理番号; 安衛法: 11-(2)-111

め、すでに工業的なたん白質の酵素分解等、種々の用途に活用されているものがある。食品関係ではナットウキナーゼ(subtilisin NAT)がこれに含まれる。日本において *Bacillus licheniformis* の培養液から抽出されたプロテアーゼは、既存添加物名簿の「プロテアーゼ」に該当する。米国 FDA では適切に製造された非病原性、非毒素産生の *Bacillus subtilis*、もしくは *Bacillus amyloliquefaciens* 株由来のプロテアーゼを、直接食品に使用される物質の GRAS リストに掲載している⁽⁴⁾。

3. プリオザイムの安全性について

プリオザイムの主剤は *Bacillus licheniformis* が産生するケラチナーゼである。*Bacillus licheniformis* は環境中に広く存在し、生乳や粉乳からも検出される細菌であり、まれに免疫力の低下した患者の血液中から分離される場合もあるが、一般的に病原性は非常に弱いと考えられている。この原体あるいは酵素製剤等を用いた急性毒性試験、亜急性毒性試験、眼刺激、皮膚刺激、皮膚感作性試験が実施されている。

【急性毒性試験】

SD ラット(雌 6 匹)にケラチナーゼ原体ⁱ水溶液を、2000mg/kg 体重/10mL 用量で単回経口投与したところ、死亡例は認められなかった⁽⁵⁾。SD ラット(雌 3 匹)にケラチナーゼ原体水溶液を、300mg/kg 体重/10mL 用量で単回皮下投与したところ 2 匹が死亡したが、50mg/kg 体重/10mL では死亡は認められなかった(0/6)⁽⁶⁾。SD ラット(雌 6 匹)にケラチナーゼ原体水溶液を 50mg/kg 体重/10mL 用量で単回腹腔内投与したところ 3 匹が死亡したが、5mg/kg 体重/10mL では死亡は認められなかった(0/6)⁽⁷⁾。

【亜急性毒性試験】⁽⁸⁾

SD ラット (雌雄各 6 匹/群)を用いたケラチナーゼ原体^j水溶液の強制経口(0、40、200、1000mg/kg 体重/5mL/日)投与における 28 日間の亜急性毒性試験において認められた毒性所見は以下の通りであった。

一般的な臨床症状観察、体重変化、摂餌量、眼科検査については、特に被験物質の投与に伴う影響は認められなかった。

血液学的検査では、1000mg 投与群の雄でプロトロンビン時間の高値が認められた。ラットを用いた硫酸ナトリウムの 3 ヶ月間吸入毒性試験で血液凝固時間の延長が認められたとする報告があることから、これについては製剤中の無水硫酸ナトリウムの影響である可能性がある。

血液生化学的検査では、1000mg 投与群の雄で AST の高値、K⁺の低値、雌で TG の低値が認められた。

尿検査では、1000mg 投与群の雄で尿比重の高値が認められた。

病理組織学的検査については実施されていないが、剖検では、肉眼的には特に被験物質の投

ⁱ 無水硫酸ナトリウム 20%を含む

^j 無水硫酸ナトリウム 20%を含む

与に伴う影響は認められなかった。

【眼刺激性試験】

日本白色種ウサギの片眼に0.1gのケラチナーゼ原体^kを結膜のう内に投与し、角膜、虹彩及び結膜等の刺激性反応を調べたところ、投与1時間後には角膜の混濁、結膜及び瞬膜の赤色化、24時間後の検査では角膜の損傷が確認され、ケラチナーゼ原体が眼に強い刺激性を有することが示唆された⁽⁹⁾。緩衝液で使用濃度に調製したプリオザイム製剤0.1mLを投与した試験ではウサギの眼に変化は認められなかった⁽¹⁰⁾。

【皮膚刺激性試験】

日本白色種ウサギの背部を除毛し、ケラチナーゼ原体^l0.5gを精製水でペースト状にし、2.5cm角のパッチを用いて貼付した。パッチを4時間後に除去し72時間後までの皮膚反応が観察されたが、刺激性反応は認められなかった⁽¹¹⁾。緩衝液で使用濃度に調製したプリオザイム製剤0.5mLをパッチした試験でも刺激性反応は認められなかった⁽¹²⁾。

【皮膚感作性試験】⁽¹³⁾

モルモットにおける皮膚感作性が guinea pig maximization test 法によって検討されている。感作はケラチナーゼ原体^mの0.01%液、0.02%液と等量のフロイントの完全アジュバントのエマルジョンそれぞれ0.1mLを皮内投与し、7日目に0.1%液0.2mLを2×4cmの布を用いて48時間閉塞貼付して行った。惹起は21日目に0.003%～0.03%液0.1mLを塗布したパッチテスト用絆創膏を用いて24時間閉塞貼付して行った。除去24及び48時間後の皮膚が観察されたが、紅斑、浮腫等の皮膚反応は認められなかった。

4. プリオザイムの残留性について

プリオザイムの用法は所定の緩衝液に溶解し、解剖刀、脊髓を吸い出すチューブ及び破壊するニードル、前掛け、長靴、スパチュラ、メス、ハサミ、試験管等の器具を浸漬して用いられる。このため、製剤が直接動物体に使用されることはないが、浸漬後のこれらの器具に製剤成分が残留した場合、器具を介して肉等に付着する可能性が考えられる。製剤成分のうちの添加剤についてはいずれも食品添加物あるいは食品そのものと考えられ、また水洗により容易に除去されると推定される。主剤のケラチナーゼも水溶性は高いと考えられるが、水洗処理により確実に除去されるかについて、メスを用いた擬似試験が実施されている。

【ケラチナーゼの残留性評価】

新品のメス刃で牛肉(モモもしくはバラ肉)を切断し、熱湯で消毒した後に乾燥処理することにより使用歴のある器具を擬似的に調製し、これを所定の濃度のプリオザイム溶液に1時間浸漬し

^k ケラチナーゼ：無水硫酸ナトリウム→1：0.7～0.8

^l ケラチナーゼ：無水硫酸ナトリウム→1：0.7～0.8

^m ケラチナーゼ：無水硫酸ナトリウム→1：0.7～0.8

た後、さらに水道水に浸して処理することによりと畜場等におけるプリオザイム処理を模したメスが調製されている。このメスについて、抗サチライシン抗体を用いたウエスタンブロットによりケラチナーゼの残留性が検討されたが、いずれのメスからもケラチナーゼは検出されなかった(検出限界 47ng/cm²)。一方、プリオザイム溶液をメス上に付着させ、そのまま乾燥させたメスを用いて同様のウエスタンブロットを行った場合では、メス上にケラチナーゼの残留が認められている。⁽¹⁴⁾

これらのことから、使用上の注意に記載されているようにプリオザイム処理後の器具を水洗した場合、ケラチナーゼはメス等にはほとんど残留しないものと考えられる。

5. 食品健康影響評価について

プリオザイムはケラチナーゼを主剤とする酵素製剤で、その有効性は「牛海綿状脳症由来の異常プリオンタンパク質の汚染除去」である。有効性の検証は、マウススクレイピープリオン(たん白質)Obihiro 株の酵素的加水分解をウエスタンブロットで確認する手法により実施されており、プリオンの感染性の失活の検証に多用されているマウスによるバイオアッセイは含まれていない。しかしながら、本剤の用途は通常のと畜処理に使用された器具等の洗浄であり、意見聴取の趣旨が、製剤に含有される成分が食品を介してヒトの健康に与える影響の評価であることから、本剤が適切に使用された場合について、酵素剤あるいは緩衝剤の成分が食品に付着し、ヒトが摂取した場合に関する評価を行った。

プリオザイムは主剤の他に酵素剤中に結合剤、賦形剤、着色剤、緩衝剤中に無機塩類の緩衝剤、流動化剤、賦形剤、着色剤が使用されているが、いずれも国内外で食品添加物に使用されているものや食品成分そのものであり、用法に規定された使用量も微量である。さらに、使用上の注意において洗浄後の器具の水洗が規定されているが、添加剤等は物性からこの水洗によって容易に除去されると考えられ、適切に使用される限りにおいてヒトが食品を通じてこれらの物質を摂取する可能性はほとんど無いと考えられる。主剤であるケラチナーゼについては、急性毒性試験、亜急性毒性試験、眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験が実施されているが、急性毒性試験や刺激性、感作性試験で示された結果は他のサチライシンの例と大きな差はなく、特に本ケラチナーゼに特異的あるいは顕著に強いと考えられる影響は認められなかった。28 日間の亜急性毒性試験で認められた影響は、1g/kg 体重/日の投与で血液生化学的検査と尿比重に軽度な変化が認められたのみで、これについても関連する臓器の剖検では特段の影響は認められなかった。さらに、限定的ではあるが器具に対するケラチナーゼの残留性についてメスを用いた試験が実施され、使用上の注意にある洗浄後の水洗によって検出限界以下に除去されることが示されている。これらのことから、用法・用量及び使用上の注意を順守する限り、ケラチナーゼや添加剤等がメス等に残留し、食品を汚染することはほとんどないものと考えられる。

これらのことを総合的に考慮すれば、ケラチナーゼを有効成分とする洗浄剤(プリオザイム)については、適切に使用される限りにおいて、製剤に含有される成分が食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できるものと考えられる。

6. 参考文献

1. 動物用医薬品製造承認申請書(プリオザイム) (未公表)
2. NIOSH Pocket guide to chemical hazards
3. Griffith JF et. al. (1969) ; Safety evaluation of enzyme detergents. Oral and cutaneous toxicity, irritancy and skin sensitization studies.
Fd Cosmet. Toxicol. 1969 vol.7:581-593
4. 21CFR §184.1150
5. ME4611 のラットを用いる経口投与による急性毒性試験 (未公表)
6. ME4611 のラットを用いる皮下投与による急性毒性試験 (未公表)
7. ME4611 のラットを用いる腹腔内投与による急性毒性試験 (未公表)
8. ME4611 のラットを用いる 28 日間反復経口投与による亜急性毒性試験 (未公表)
9. PDE のウサギを用いる眼刺激性試験 (未公表)
10. ME4611 酵素製剤および ME4611 緩衝製剤のウサギを用いる眼刺激性試験 (未公表)
11. PDE のウサギを用いる皮膚刺激性試験 (未公表)
12. ME4611 酵素製剤および ME4611 緩衝製剤のウサギを用いる皮膚刺激性試験 (未公表)
13. PDE 原末のモルモットにおける皮膚感作性試験 (未公表)
14. 使用履歴のある器具におけるケラチナーゼの残存性評価 (未公表)

ケラチナーゼを有効成分とする洗浄剤 (プリオザイム) (案)

1. 概要

(1) 品目名：ケラチナーゼを有効成分とする洗浄剤

商品名：プリオザイム

(2) 用途：牛海綿状脳症由来の異常プリオンタンパク質の汚染除去

本剤は、*Bacillus licheniformis* 株が産生するケラチナーゼを主剤とする器具等の洗浄剤であり、酵素剤には、結合剤としてヒドロキシプロピルセルロース、着色剤として黄色四号、賦型剤として白糖が、また、緩衝剤には、炭酸ナトリウム、塩化カリウム、ホウ酸、流動化剤として二酸化ケイ素（シリカゲル）、着色剤として青色一号、賦型剤として白糖が使用されている。

(3) 有効成分：*Bacillus licheniformis* 株由来ケラチナーゼ

(4) 適用方法及び用量

緩衝剤 30 g を 40～60℃ に加温した水道水 100L に溶解し、それに酵素剤 35 g を加え溶解した液に解剖刀、脊髄を吸い出すチューブ及び破壊するニードル、前掛け、長靴、スパチュラ、メス、ハサミ、試験管等の器具を 1 時間浸漬する。この間の水温は 40～60℃ に保つ。

(5) 諸外国における使用状況

本剤の諸外国における承認等はないが、同様のプロテアーゼを主剤としたプリオンタンパク質を酵素分解する製剤が英国健康保護局と企業体において協同開発されており、2006 年にヒトの手術器具の消毒を目的として欧州医療機器指令に基づく CE マーク¹を取得している。

2. 残留試験結果

使用上の注意に記載されている本剤処理後の器具の水洗処理により製剤成分が確実に除去されるかについて、メスを用いた擬似試験が実施されている。

新品のメス刃で牛肉（モモもしくはバラ肉）を切断し、熱湯で消毒した後に乾燥処理することにより使用歴のある器具を擬似的に調製し、これを所定の濃度のプリオザイム溶液に 1 時間浸漬した後、さらに水道水に浸して処理することによりと畜場等におけるプリオザイム処理を模したメスが調製されている。このメスについて、抗サチライシン²抗体を用いてケラチナーゼの残留性が検討されたが、

¹ EU 域内で流通する製品に対して、その使用者及び消費者の健康及び安全を保護すること等を目的として欧州委員会が発令したニューアプローチ指令に適合していることを示すマーク。

² 枯草菌が産生するアルカリプロテアーゼ。ケラチナーゼはサチライシン属に分類される。

いずれのメスからもケラチナーゼは検出されなかった（検出限界 47ng/cm²）。

このことから、使用上の注意に記載されているように本剤処理後の器具を水洗した場合、ケラチナーゼはメス等にはほとんど残留しないものと考えられる。

3. 許容一日摂取量（ADI）評価

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18年7月14日付け厚生労働省発食安第0714001号により、食品安全委員会あて意見を求めたケラチナーゼを有効成分とする洗浄剤（プリオザイム）に係る食品健康影響評価については、以下のとおり評価されている。

プリオザイムはケラチナーゼを主剤とする酵素製剤で、その有効性は「牛海綿状脳症由来の異常プリオンタンパク質の汚染除去」である。有効性の検証は、マウススクレイピープリオン（タンパク質）Obihiro株の酵素的加水分解をウエスタンブロットで確認する手法により実施されており、プリオンの感染性の失活の検証に多用されているマウスによるバイオアッセイは含まれていない。しかしながら、本剤の用途は通常のと畜処理に使用された器具等の洗浄であり、意見聴取の趣旨が、製剤に含有される成分が食品を介してヒトの健康に与える影響の評価であることから、本剤が適切に使用された場合について、酵素剤あるいは緩衝剤の成分が食品に付着し、ヒトが摂取した場合に関する評価を行った。

プリオザイムは主剤の他に酵素剤中に結合剤、賦形剤、着色剤、緩衝剤中に無機塩類の緩衝剤、流動化剤、賦形剤、着色剤が使用されているが、いずれも国内外で食品添加物に使用されているものや食品成分そのものであり、用法に規定された使用量も微量である。さらに、使用上の注意において洗浄後の器具の水洗が規定されているが、添加剤等は物性からこの水洗によって容易に除去されると考えられ、適切に使用される限りにおいてヒトが食品を通じてこれらの物質を摂取する可能性はほとんど無いと考えられる。主剤であるケラチナーゼについては、急性毒性試験、亜急性毒性試験、眼刺激性試験、皮膚刺激性試験、皮膚感作性試験が実施されているが、急性毒性試験や刺激性、感作性試験で示された結果は他のサチライシンの例と大きな差はなく、特に本ケラチナーゼに特異的あるいは顕著に強いと考えられる影響は認められなかった。28日間の亜急性毒性試験で認められた影響は、1g/kg体重/日の投与で血液生化学的検査と尿比重に軽度な変化が認められたのみで、これについても関連する臓器の剖検では特段の影響は認められなかった。さらに、限定的ではあるが器具に対するケラチナーゼの残留性についてメスを用いた試験が実施され、使用上の注意にある洗浄後の水洗によって検出限界以下に除去されることが示されている。これらのことから、用法・用量及び使用上の注意を順守する限り、ケラチナーゼや添加剤等がメス等に残留し、食品を汚染することはほとんどないものと考え

えられる。

これらのことを総合的に考慮すれば、ケラチナーゼを有効成分とする洗浄剤（プリオザイム）については、適切に使用される限りにおいて、製剤に含有される成分が食品を通じてヒトの健康に影響を与える可能性は無視できるものと考えられる。

4. 残留基準の設定

食品安全委員会における評価結果を踏まえ、残留基準を設定しないこととする。