

キチングルカンの食品添加物新規指定のための概要書

令和2年1月24日

独立行政法人酒類総合研究所

目次	
用語の定義	p.3
序 キチングルカンの食品添加物指定の必要性	p.4
I. 添加物の概要	
1. 名称及び用途	p.4
2. 起源または発見の経緯	p.4
3. 諸外国における使用状況	p.5
(1) CODEX	p.5
(2) OIV	p.5
(3) EU	p.6
(4) アメリカ	p.6
(5) オーストラリア、ニュージーランド	p.7
(6) 日本	p.7
4. 国際機関等における安全性評価	p.8
5. 物理化学的性質	
(1) 構造式等	p.10
(2) 製造方法	p.10
(3) 成分規格案	p.13
(4) 食品添加物の安定性	p.27
(5) 食品中の食品添加物の分析法	p.28
6. 使用基準案	p.29
II. 有効性に関する知見	
1. 食品添加物としての有効性及び同種の添加物との効果の比較	p.30
2. 食品中での安定性	p.35
III. 安全性に係る知見	
1. 基原菌株 <i>Aspergillus niger</i> の安全性	p.36
2. <i>A.niger</i> 由来のキチングルカンの体内動態試験	p.51
3. <i>A.niger</i> 由来のキチングルカンの毒性試験	p.53
4. ヒトにおける知見	p.57
5. 一日摂取量の推計等	p.59
IV. 海外添加物取り扱い社	p.61
V. 引用文献一覧	p.62

用語の定義

この概要書で用いる用語の定義は、次による。

用語	定義
酒税法	昭和 28 年法律第 6 号
ワイン	酒税法第 3 条第 13 号に掲げる果実酒及び同条第 14 号に掲げる甘味果実酒
ぶどう酒	酒税法第 3 条第 13 号に掲げる果実酒及び同条第 14 号に掲げる甘味果実酒のうちぶどうを原料としたもの
果汁	果実を絞って得られる汁でアルコール発酵が終了していないもの。アルコール分の有無は問わない。本概要書では専らぶどう果汁を指す。
マスト	ブドウを除梗・破碎してできた、果汁に果皮、種子等の固形物が混合したものでアルコール発酵が終了していないものを指す。アルコール分の有無は問わない。
マロラティック発酵	ワインに乳酸菌の一種を添加して起こすリンゴ酸の乳酸へ変換させる発酵のこと。ワインの過剰な酸味を和らげるために行われることがある。
ADI	Acceptable Daily Intake：一日摂取許容量
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>
BSL	Biosafety Level
CAS	Chemical Abstracts Service
CMCG	Carboxymethyl-chitin-glucan
ECHA	European Chemicals Agency：欧州化学機関
EFSA	European Food Safety Authority：欧州食品安全機関
EU	European Union：欧州連合
FAS	WHO Food Additives Series：オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration.：米国食品医薬品局
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand
GMP	Good Manufacturing Practice：適正製造規範
GRAS	Generally Recognized As Safe
IARC	国際がん研究機関
JECFA	FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
NOAEL	無毒性量
OIV	Organisation internationale de la vigne et du vin：国際ブドウ・ワイン機構
TDI	耐容一日摂取量
TNO	Netherlands Organisation for Applied Scientific Research
WHO	World Health Organization

序 キチングルカンの食品添加物指定の必要性

この概要書により指定要請するキチングルカンは、その使用対象食品をぶどう酒とする。清澄剤（混濁液中の粒子を沈殿させる、過剰なタンパク質を沈殿させる）、重金属イオンの除去（主に鉄、鉛、カドミウム）、汚染物質、特にオクラトキシン A の除去に使用できる非常に有用な添加物である。

I. 添加物の概要

1. 名称及び用途

名称：（和名）キチングルカン [1] [2]

（英名）Chitin-glucan [3]

CAS 登録番号：キチン（Chitin）：1398-61-4 [3]

β -グルカン（ β -glucan）：9041-22-9 [3]

用途：ろ過助剤 [3]

2. 起源または発見の経緯

今回指定要請を行うキチングルカンは糸状菌（*Aspergillus niger*）由来の物である。*Aspergillus niger* は我が国でも食品添加物の起源として主に酵素産生に使用されている [4]。真菌の細胞壁はグルコース誘導体である N-アセチルグルコサミンが重合してできるキチンが主な成分である。植物の細胞壁の主成分であるセルロースと同様に微細繊維の束になっている [5]。細胞壁多糖類は熱水、フェノールまたはアルカリで処理することで一部は可溶化するが、多くはアルカリにさえ不溶である [6]。キチンはこのアルカリ不溶性の細胞壁の構成成分であり、 β -グルカンマトリックスに物理的に埋め込まれたマイクロフィブリルとして存在する [7]。糸状菌などの菌糸体では、キチンは β -グルカンと呼ばれる D-グルコース分子からなる多糖類と強く結合し、複合体を形成している。キチングルカンおよびキチンポリマーは多くの溶媒に不溶性だが、水性媒体では膨潤する可能性がある [8]。一方で特定の酵素の存在下で分解される性質をもつ。キチングルカンは糸状菌（*Aspergillus niger*）からのクエン酸産生の副産物である [9]。ワインの透明度は飲む人々にワインの品質を保証する印象を与えている。ワインが変質した時には何らかの沈殿と共に濁りを生じる場合がある。ワインの混濁の原因として考えられるのは、大きく分けて次の3つである。

①酸化酵素

②微生物

③化学的原因

①の酸化酵素による混濁はポリフェノールオキシダーゼによるものである。白ワインでは瓶内に茶褐色の濁りを生じるものがあり、赤ワインではアントシアニン色素が酸化してチョコレート色になるものがある。②の微生物による混濁は酵母、バクテリア、乳酸菌などによっておこる。③の化学的混濁には鉄や銅による混濁、タンパク質による混濁、酒石による混濁が挙げられる [10] [11]。

ワインの清澄剤はタンパク質とタンニンを結合させて、ワインの酸を利用して凝固させる作用である。古くから卵白等の動物性タンパク質が清澄剤として使用されている。ゼラチンは動物の骨、軟骨に含まれるコラーゲンに由来するため卵白同様に動物由来の清澄剤である[10]。クロイツフェルト・ヤコブ病の出現により食品産業で補助剤として使用される動物由来製品の安全性に疑問を感じる消費者や宗教、信条的な理由で動物由来の製品を忌避する消費者がいることから近年ワインを清澄化するための代替品が検討されてきた。その結果、既存の清澄剤と同等の効率をもつ非動物由来製品が次々と開発された [12]。その一つとしてベルギーの KitoZyme 社はこの糸状菌由来のキチングルカンを用いたワインの安定化と清澄化の目的での使用することに関し、2009 年に OIV からの承認を得た [13] [14] [15]。酸性 pH では、キチングルカンは正に帯電しているため、ワイン中で正に帯電したオクラトキシンと反応性は下がる。しかし、キチングルカンの表面上の細孔にオクラトキシンが沈着することでフロックを形成する [16]。

3. 諸外国における使用状況

ワインに関する国際機関である OIV（我が国は未加盟。）や EU を始め多くの国では、ワイン（ブドウ生産物）についてはその製造に関し、全ての操作や使用資材等をポジティブリストとしてまとめている。これは Oenological Practices（仏 Pratique oenologique）と呼ばれ、資材等については一般にその使用目的に応じ添加物又は加工助剤(Processing aid)に区別し、リストとして定めている。各国・地域が定めている Oenological Practices については国・地域により違いがあるが、ワインが国際性の高い商品であることから、相互に承認する協定(一方の国・地域でその Oenological Practices に従い製造されたワインは、他方の国・地域で市場流通させることができる)が締結されている例もある。

(1) CODEX

CODEX の GSFA (General Standard for Food Additives) では、キチングルカンは登録されていない [17]。

(2) OIV

日本は未加盟ではあるが、OIV の定めるワインに関する各種の定義やルール、特に製造方法に関する醸造規則を EU は 2017 年の REGULATION (EU) No 1308/2013 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL で (OIV) が推奨するワイン醸造慣行を考慮に入れる必要があると記載されている [18]。キチングルカンに関してはマストとワインで使用に関する最適なワイン醸造における実践規範を作成している [14] [15]。それによると以下のように書かれている。

マストでの使用 [14]

使用目的

a) 清澄化

b) タンパク質混濁の除去

使用量 100 g/hL

ワインでの使用 [15]

使用目的

- a) 重金属イオンの除去（鉄、鉛、カドミウム、銅）
- b) 鉄混濁と銅混濁を防止
- c) 汚染物質、特にオクラトキシン A を減らす

使用量

- ・ 目的 a),b) で使用する場合は 100 g/hL
- c) で使用する場合は 500 g/hL

(3) EU

EU 域内では新規の食品成分の指定について、現在は 2015 年 11 月 25 日の評議会の (EU)2015/2283 に則り行われているが、それまでは 1997 年 1 月 27 日の評議会の (EC) No 258/97 に則り行われていた [19]。キチングルカンは 2008 年 1 月 15 日、Kitozyme SA 社はベルギーの管轄当局にキチングルカンの新規食品成分として指定要請書を提出したところ、2010 年に EFSA による安全性に関する科学的な見解が発表された。これを受けてキチングルカンは EC No 258/97 の第 3 条 (1) で定められている基準を満たしていることが確認され、2011 年 2 月 2 日に新規の食品成分として指定された [20]。

その一方で、ワイン醸造時における使用については 2011 年 6 月 21 日の EC No 53/2011 に以下のようにまとめられている [21]。“菌由来のキチングルカンを清澄剤としてワインに使用する場合、100 g/hL を使用上限として定めている。しかし Appendix 13 に記載されているように汚染物質、特にオクラトキシン A を減らす目的で 500 g/hL までの使用が可能である。”

EU 域内で適用される醸造規則は、欧州委員会規則 2019/934 [22] の Annex I PART A に記載され、この中で TABLE 2 の 5 番目に清澄剤の項目がある。ここには 18 品目の記載があり、その中の 1 つにワインに使用できる加工助剤としてキチングルカンの記載されている。

なお、ワインに使用できる物品について、同じく欧州委員会規則 2019/934 [22] の Article 9 で「欧州委員会規則 231/2012 に記載があるものについては同規則でその純度及び仕様を定めるが、記載がないもの（E 番号がないものと同義）については欧州委員会規則 2019/934 に記載の OIV Codex file に従う」とあり、キチングルカンは欧州委員会規則 231/2012 [23] に記載のない物品であるため、EU 各国はキチングルカンの使用について、EU の醸造規則と OIV 規格の双方を遵守する必要があるということになる。

(4) アメリカ

アメリカで食品、食品加工に使用できる物質については、CFR（連邦規則集）Title 21 の中に纏められている [24]。食品医薬品局（FDA）は CFR 170.30 に沿って、キチングルカンを 2012 年 1 月 5 日に GRAS 通知番号 GRN 000412 において、申出に対し異論がないことから一般的に安全と認められる物質（GRAS）として指定している [25]。また、

アルコール飲料生産における微生物の安定化、汚染物質の除去、清澄化の目的では 10～500g/hL の範囲で使用を認めている [25]。

なお、2005 年より自国の醸造規則を満たしたワインの流通を相手国が認めるとする 2 国間協定が EU とアメリカで結ばれている。そのため、EU 域内からの輸入ワインについてはキチングルカンを EU の醸造規則（欧州委員会規則 606/2009 [85]）を遵守して使用したワインもアメリカ国内で流通できることとなっている¹ [26] [86]。

（５） オーストラリア、ニュージーランド

オーストラリアにおいては、食品添加物や加工助剤はポジティブリスト制となっており、食品添加物と加工助剤は別の法律にまとめられている。ワイン製造に使用可能な資材は一般食品に関する規則とは別に、ワイン製造についての規則（Oenological Practices）に記載されている [27]。キチングルカンはこのワイン製造についての規則の Table to clause 4 の Processing aid に記載されている。さらに Authorised Version F2017C01002 registered 27/10/2017 の Schedule 18 Processing aids ではキチングルカンはワイン、スパークリングワイン、酒精強化ワインの製造における脱色剤、清澄剤、ろ過剤、吸収剤としての目的で GMP での使用が可能と記載がある [28]。

（６） 日本

我が国においてキチングルカンは食品添加物として指定されていない。ただし、関連物質として *Aspergillus niger* 由来の酵素が挙げられ、指定添加物としてはアスパラギナーゼが登録されている。また、既存添加物としては α -アミラーゼ、アントシアナーゼ、イヌリナーゼ、インベルターゼ、エステラーゼ、カタラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、カルボキシペプチダーゼ、キシラナーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、グルコースイソメラーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルタミナーゼ、酸性ホスファターゼ、セルラーゼ、タンナーゼ、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、ヘスペリジナーゼ、ペプチダーゼ、ヘミセルラーゼ、ホスホジエステラーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、リパーゼが登録されている [4] [29] [30]。

¹ 当該 2 国間協定は欧州委員会決定 2011/751 において欧州委員会規則 606/2009 に記載されている添加物を対象に含めるよう変更されている。なお、当該規則は 2019 年 12 月 7 日に廃止され、欧州委員会規則 2019/934 に切り替わっており、当該 2 国間協定に反映されていないが、いずれの欧州委員会規則においてもキチングルカンの記載が存在する。

4. 国際機関等における安全性評価

(1) 国際機関における評価

キチングルカンについて、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)における評価は確認できない。

(2) 欧州連合における評価

キチングルカンについて、食品添加物としての欧州食品安全機関(EFSA)における評価は確認できない。

なお、EFSA専門家パネルは、2010年にNovel Food（新開発食品）成分として、キチングルカンの安全性についての評価を実施し、科学意見書を公表した。概要は次のとおり。「KiOnutrime-CG^(登録商標)」（KitoZyme社）という新規食品成分は、*Aspergillus niger* (*A.niger*) の細胞壁の主要成分であるキチングルカンを含む。

このキチングルカンの製造に用いられる*A.niger*株は、非病原性で非毒素産生性であり、また、食品成分（クエン酸）の製造に安全に使用されてきた歴史がある。組成データ及び製造工程による懸念はない。

この成分は、繊維質の一日摂取量を増加させるサプリメントとして販売されることが意図されている。意図されたキチングルカンの摂取量は、2～5 g/日である。ラットを用いた13週間亜慢性毒性試験では、最高用量である、キチングルカンとして約 6.6 g/kg 体重/日で有害影響は認められなかった。この用量は、意図されたヒトの g/kg 体重/日ベースによる最大摂取量の約 80 倍高いものである。

新開発食品成分「KiOnutrime-CG^(登録商標)」は、申請された使用条件及び摂取量において、食品成分として安全であると専門家パネルは結論づけた [31]。

(3) 米国における評価

米国食品医薬品庁(FDA)から企業(KitoZyme社)あて発出されたGRAS Notice No.GRN 000412によると、FDAは、企業から2011年11月に提出され、12月に受理した、*Aspergillus niger* (*A.niger*)由来のキチングルカン、アルコール飲料製造時に10～500 g / 100 Lの範囲で、微生物的な安定化、汚染物質の除去及び清浄化に使用することについてのGRAS (Generally Recognised as Safe、一般に安全と認められる)申請について、企業提出資料、FDAで利用可能な資料に基づき評価を行った。

企業内に設置されたGRASパネルでは、このキチングルカンについての特性、規格、製造方法、ばく露量推計及び安全性、*A.niger*とキチングルカンについての食品における経緯や現状について検討し、意図された使用方法でGRASと結論した。

企業は、次のように述べている。キチングルカンは、食品グレードのクエン酸の製造に用いられた*A.niger*から得られる不溶性で非消化性の繊維質である。クエン酸の製造に用いられる*A.niger*株は、非病原性で非毒素産生性であり、安全に使用されてきた長い歴史がある。キチングルカンについて、公開されているラットの13週間亜慢性毒性試験では、無毒性量(NOEL)は、最高用量である雄6,589 mg/kg 体重/日、雌7,002 mg/kg 体重/日であっ

た。キチングルカンは水とエタノールに不溶性で、また、処理後溶液から除去するため、吸収モデルを考える必要がない。キチングルカン処理されたワインについての高速液体クロマトグラフ法で、最終製品ではキチングルカンは検出限界未満である。キチングルカンは人の消化管において消化されず、吸収されない。

この GRAS Notice で FDA は、*A.niger* 由来のキチングルカンについて意図された使用方法で GRAS と考える企業の結論に対して、no questions と企業に通知している。また、企業がこの食品成分について安全を確保し、かつ、すべての適用される法や規制を遵守する責任が常にあるとしている [25]。

(4) オーストラリア・ニュージーランドにおける評価

オーストラリアと欧州連合とのワインについての合意に基づくオーストラリア側の義務に関係して、オーストラリアワイン製造協会から、ワイン製造に関する新規の加工助剤としてキチングルカンの使用許可申請があり、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) は評価を実施し、2017 年に評価結果を公表した。キチングルカンについて、ワイン製造における適正使用規範 (GMP) に基づく加工助剤としての使用を認めている。安全性評価の概要は次のとおり。

キチングルカンは *Aspergillus niger* (*A.niger*) の菌糸体の細胞壁の主要成分である。この *A.niger* 株は、食品及び医薬品産業でクエン酸の製造に用いられる。また、*A.niger* は α -アミラーゼなど多数の酵素の製造に用いられている。キチングルカンは、FSANZ が参照する規格の一つである国際ぶどう・ぶどう酒機構 (OIV) の規格に合致する。キチングルカンは、EU において加工助剤として許可され、EU とワインに関する合意をした多くの国で市販されている。

キチングルカンは天然の重合体であり、キチンと 1,3- β グルカンの重合体から構成されるが、ヒトの消化管でキチングルカンが分離するかどうかは知られていない。キチングルカンのラットの 13 週間亜慢性毒性試験では、NOAEL は、最高用量である雄 6.6 g/kg 体重/日、雌 7.0 g/kg 体重/日であった。キチングルカンのヒトへの 6 週間の投与試験で、4.5 g/日までの用量でヒトへの副作用はなかった。

毒性試験やヒトでのデータから、キチングルカンについて、特定できるハザード (有害性影響) はなく、一日摂取許容量 (ADI) を特定しないことが適切である。

ワインにおけるキチングルカンとその分解物の残留は無視できると予測されるため、ばく露評価は行わなかった。

この申請における、ワイン製造での加工助剤としてのキチングルカンの使用については、公衆衛生や安全性についての懸念はない [32] [33]。

(5) 食品安全委員会における評価

食品安全委員会において、キチングルカンは未評価である。

なお、*Aspergillus niger*については、添加物である酵素（ α -アミラーゼなど）の製造に用いられており、また、最近では、食品安全委員会は2014年1月に、添加物「*Aspergillus niger* ASP-72株を用いて産生されたアスパラギナーゼ」の評価結果を公表し、その産生菌株の非病原性や非毒素産生性の確認を行ったとしている [34]。

(6) 国際機関における評価のまとめ

国際機関におけるキチングルカンへの評価を表1にまとめた。菌株に関しては記載がなく不確定であった。オクラトキシン、アフラトキシン、フモニシンに関してはEFSAとFDAの評価対象では検出限界以下であった。

表1. 国際機関におけるキチングルカンへの評価表

	JECFA	EFSA	FDA	FSANZ	食安委員
キチングルカンへの評価	—	○	○	○	—
キチングルカンへの評価が場合に評価対象となった糸状菌	—	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	—
由来の菌株	—	記載なし	記載なし	記載なし	—
オクラトキシンの含有量	—	1 μ g/kg 未満	1 μ g/kg 未満	記載なし	—
Aflatoxin (B1,B2,G1,G2) の含有量	—	各 0.1 μ g/kg 未満	各 0.1 μ g/kg 未満	記載なし	—
Fumonisin(B1,B2)の含有量	—	100 μ g/kg 未満	100 μ g/kg 未満	記載なし	—
糸状菌由来の食品添加物の評価	○	○	○	○	○
評価された糸状菌由来の食品添加物に <i>Aspergillus niger</i> 由来の物があるか	○	○	○	○	○

5. 物理化学的性質

(1) 構造式等

示性式： $[C_6H_{10}O_5]_m - [C_8H_{13}NO_5]_n$

分子量： 水や有機溶剤に不溶のため測定できない [3]。

(2) 製造方法

ソースである *Aspergillus niger* の加水分解による消化、水性媒体での精製、および乾燥のプロセスによって製造される。詳細なフローを図1に示す。KitoZyme社：特許番号 WO / 2003/068824 [31] [35]。

また、キチングルカンの製造例として以下がある [35]。

例 1 :

クエン酸調製の副産物として得た *Aspergillus niger* バイオマス (水分 71%含有) 995g を水 2L と固形水酸化ナトリウム 93g と混合して 26 時間室温でインキュベートした結果、バイオマス最終濃度 3.4%(w/v)、NaOH 最終濃度 10.6%(w/v)、バイオマス (乾燥物換算) : NaOH 比率 32%となった。このインキュベート後の混合物をろ過し、不溶性画分を収集して pH が中性になるまで繰り返し洗浄を行い、乾燥させて質量 145g のキチンとグルカンのポリマー混合物を得ている。固体 ¹³C-NMR スペクトルから計算したキチンとグルカンの比率は 52:48±15 (w / w) であった。

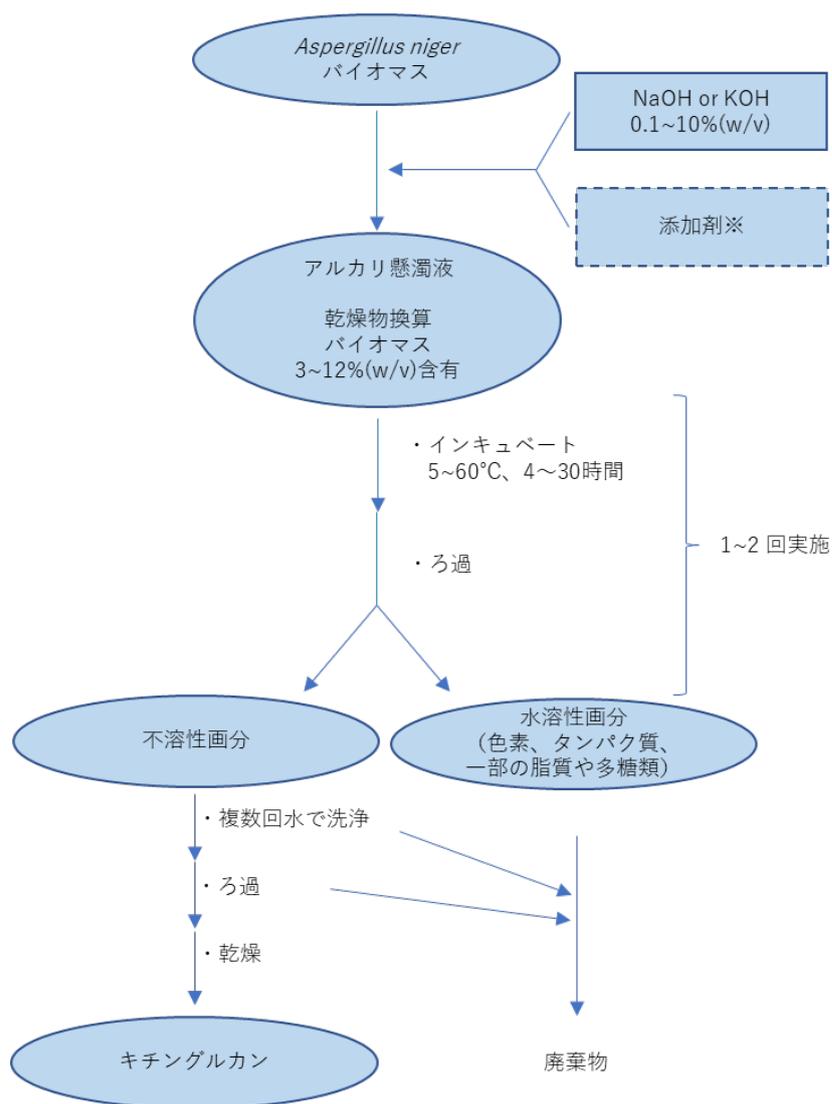


図 1.最適条件によるキチングルカン製造法フロー [35]

※フロー図中の添加剤の例として以下の物品を添加する場合があります、不溶性画分の抽出を改善する効果がある。

- ・消泡剤 (シクロヘキサン、酢酸エチル、メタノール、エタノール、ストロール等)

- ・界面活性剤（ドデシル硫酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、トウイーン、ポロキサマー等）
- ・酵素製剤（カルボキシエステラーゼ、カルボン酸エステル加水分解酵素、トリアシルグリセロールリパーゼ：全て酵素番号 EC3.1.1.3 の同義語）

例 2：

クエン酸調製の副産物として得た *Aspergillus niger* バイオマスを 1~6 の異なる条件で処理した。1~4 は 10L、5 と 6 は 30L の容器を用いた。また、NaOH によるアルカリ処理について、①3.4%②2.8%の 2 段階を用意し、1~5 は①のみの 1 段階、4' と 6 は①の処理後②で再度処理した。さらに 6 において、バイオマスを少量の NaOH に続いて多量の NaOH とともに反応器に連続的に入れ、2 つの画分に分けた。その結果、以下の表 2 のとおりのものが得られた。

表 2. バイオマス処理条件と得られた試料のキチン：グルカン比 [35]

試験番号	菌糸体重量 (g,乾燥物)	菌糸体濃度 (% ,w/v)	NaOH 濃度 (% ,w/v)	反応温度 (°C)	インキュベート時間 (時間)	不溶画分/菌糸体比 (% ,w/w)	キチン:グルカン比 (w/w)
1	289	10.6	3.4	26	25	50	41:59±3
2	505	9.2	1.5	25	26	57	未測定
3	580	10.7	1.5	40	26	57	44:56±2
4	313	5.2	1.7	25	24	50	32:68
4'	485	10.6	3.4/2.8	25	24/6	40	37:63
5	496	2.9	2.0	25	22	49	未測定
6	446/446	2.9/2.9	2.0/4.0	25	22/18	49	未測定

その他に *Aspergillus niger* の菌糸体バイオマスを水酸化ナトリウム水溶液 (2.5%)、室温、オーバーナイトすることでアルカリ処理を行う。その後、130°C で 4~6 時間、濃水酸化ナトリウム水溶液 (40~45%) による過剰なアルカリ処理を行うことで白色粉末が得られるという記載もある [33]。

(3) 成分規格

①成分規格案

項目	成分規格案	参照規格
① 名称	キチングルカン	1
② 英名	Chitin-glucan	2, 3
③ CAS 登録番号	キチン：1398-61-4 β -グルカン：9041-22-9	2, 3
④ 定義	本品は、糸状菌 (<i>Aspergillus niger</i>) の培養物から得られたものに限る。菌糸体の細胞壁の主成分で多糖類キチン (N-アセチル-D グルコサミン) と 1,3- β -グルカン (繰り返し単位 D-グルコース) で構成されている。2つのポリマーは共有結合し、3次元ネットワークを形成する。	2, 3, 4
⑤ 含量	本品は、キチングルカン 95%以上を含む。	2
⑥ 性状	本品は、白～淡黄褐色の粉末であり、においが無い。	2
⑦ 確認試験	キチンと β グルカンの比率 25:75～60:40(m/m) 試験方法： ^{13}C -solid state NMR により行う。 1. サンプルの準備 (1)塩酸 1 mol/L での洗浄：マイクロチューブミキサー用のフラスコで 2 g のキチングルカンと 40 mL の塩酸 1 mol/L を混合。この混合物を 320 rpm で 30 分間攪拌し、その後 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行うことを 2 回行う。 (2) 精製水での洗浄：上記の沈殿物に 40 mL の精製水をいれ混合する。混合物を 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行う。上清の導電率が 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満になるまで、このステップを繰り返す。 (3) エタノールでの洗浄：上記の沈殿物に 40 mL のエタノールを混合する。混合物を 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行う作業を 2 回行う。 (4) クロロホルム/メタノール洗浄：上記の沈殿物に 40 mL のクロロホルム/メタノール混合液(クロロホルム：メタノール=1:1)を混合する。この混合物を 320 rpm で 30 分間攪拌し、その後 4000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を取り除く。これを 2 回行う。 (5) アセトン洗浄と乾燥：上記で得られた沈殿物と 40 mL のアセトンを混合する。この混合物を 320 rpm で 30 分間攪拌し、その後 4000 rpm で 10 分間遠心分離する。上清を 30 μm フィルターに注ぎ、チューブ内の物質を、アセトンを加えながらすべてフィルターに注ぐ。フィルター上の物質を結晶皿に置き、乾燥させる。 2. Brücker Avance DSX 400WB 核磁気共鳴装置での分析	2

	磁場：9.04 Tesla ラーモア周波数：83 kHz 2つの磁気パルス間の時間間隔：5秒 磁気パルスが適用される期間：5.5 ms 磁気パルスシーケンスの数：3000	
⑧ 純度試験	鉛 Pbとして1μg/g以下(4.0g、第1法、比較液 鉛標準液 4.0mL、フレイム方式)	2, 3, 4
	ヒ素 1μg/g以下(1.0g、第2法、標準色 ヒ素標準液 2.0 mL、装置 B)	2, 3, 4
⑨ 乾燥減量	10%以下(105°C 恒量)	2, 3, 4
⑩ 灰分	3%以下(600°C 6時間)	2, 3, 4
⑪ 微生物限度	生菌数：1gにつき1000以下(公定書に定める方法。試料は第1法により調製する。)	2, 3, 4
	大腸菌：認めない(公定書に定める方法。前培養液は第1法により調製する。)	2, 3, 4
	サルモネラ：認めない(公定書に定める方法。前培養液は第1法により調製する。)	2, 3, 4
	真菌数：1gにつき200以下(公定書に定める方法。試料は第1法により調製する。)	2, 3, 4
⑫ 定量法	本品約5gを精密に量り、平底フラスコに入れ、これに水100mLを加え、2分間かき混ぜる。上澄液をメンブランフィルター(孔径1μm)でろ過し、ろ液50mLを正確に量り、あらかじめ精密に質量を量ったガラス製蒸発皿に入れ、蒸発乾固し、90°Cで3時間乾燥し、デシケーター中で放冷した後、質量を精密に量る。当該質量から求めた水可溶分の質量を元の質量から減じた質量の割合を含量とする。	2
参考規格 1. 美容健康 EXPO, “キチングルカン KiOtransine® [コーシャー、ハラル対応素材],” セティ株式会社, 2019. [2] 2. OIV INTERNATIONAL OENOLOGICAL CODEX-CHITIN-GLUCAN [3] 3. EFSA Scientific Opinion on the safety of “Chitin-Glucan” as a Novel Food ingredient. [31] 4. 厚生労働省 第9版食品添加物公定書 [4]		

②成分規格案と既存の規格の対照表

次表(表3)に類似添加物等の国際機関、及び指定添加物に係る食品添加物公定書の規格を示す。国際機関の規格では、OIVについてはInternational Oenological Codex [3]、EUではEFSAで定める参考となる食品としての規格 [20] [31]を記載した。また、表4には実際に欧州で流通しているキチングルカン商品で特許を取得しているKitoZymeの商品をLot別に5つ測定した結果を記載した。これはEFSAのレポート内で開示されている [31]。

表 3. 成分規格案と既存の規格の対照表

	本規格案	OIV 規格 [3]	EFSA 規格 [20] [31] ²	食品添加物公定書 [4]	
				カードラン	アスパラギナーゼ (A. niger ASP-72 株由来)
含量	本品は、キチングルカン 95%以上を含む。	無水換算で 95%以上のキチングルカンを含む。	キチングルカン 90%以上含む(※)	本品は、カードラン 80.0%以上を含む。	—
性状	本品は、白～淡黄褐色の粉末であり、においが無い。	白色の無臭粉末。	黄色がかった白色の無臭粉末	本品は、白～淡黄褐色の粉末であり、においは無い。	黄～褐色の澄明な液体又はごく薄い灰色若しくはごく薄い黄色を帯びた白色の顆粒
定義	本品は糸状菌 (<i>Aspergillus niger</i>) の培養物から得られたものに限る。菌糸体の細胞壁の主要成分で多糖類キチン (N-アセチル-D グルコサミン) と 1,3-β-グルカン (繰返し単位 D-グルコース) で構成されている。2つのポリマーは共有結合し、3次元ネットワークを形成する。	キチン-グルカンは真菌由来であり、 <i>Aspergillus niger</i> の細胞壁の主要成分である。菌糸体から抽出および精製され、食品および医薬品市場で生産されるクエン酸の副産物である。多糖類キチン (N-アセチル-D グルコサミン) と 1,3-β-グルカン (繰返し単位 D-グルコース) で構成されている。2つのポリマーは共有結合し、3次元ネットワークを形成する。キチン/グルカンの比率は、25:75~60:40 (m/m) の範囲で、コロイドの含有量と混濁を減らすために、ラッキング中にマストの清澄剤として使用される。また、アルコール発酵後の瓶詰め前のワインの安定化にも使用される。このポリマ	キチン-グルカンは糸状菌 [<i>Aspergillus niger</i> (A. niger)] の菌糸体の細胞壁の主要成分である。2つのポリマーは共有結合しており、3次元ネットワークを形成している。	本品は、アグロバクテリウム属細菌 (<i>Agrobacterium biovar 1</i> に限る。) 又はリゾビウム属細菌 (<i>Rhizobium radiobacter</i> に限る。) の培養液から得られた、β-1, 3-グルカンを主成分とするものである。	本品は、糸状菌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から得られた、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

² いずれも食品としてのキチングルカンの規格であるが、[20]は EFSA が採用した規格、[31]は事業者の EFSA に対する提案規格である。

本表ではこれらの規格を区別するため双方共通の項目については記載の末尾に(※)を付した。なお、(※)がないものは全て[31]のみに記載のある項目を示している。

		ーは鉄の破損に対して安定化能力を持っている。また、重金属（鉛、カドミウム）、マイコトキシンなどの望ましくない化合物の除去にも役立つ。			的に限る。)を含むことがある。
確認試験					
	キチンとβグルカンの比率 25:75~60:40(m/m) ¹³ C-solid state NMR により行う。			(1) 本品 0.2 g に水 5 mL を加えてよくかき混ぜた後、水酸化ナトリウム溶液 (3→25) 1 mL を加えて振り混ぜるとき、溶解する。(2) 本品の 2% 懸濁液 10mL を水浴中で 10 分間加熱するとき、ゲルを形成する。(3) 本品の 2% 懸濁液 10mL に硫酸 5 mL を加えて水浴中で 30 分間加熱した後、冷却する。この液 1 mL に水 100mL 及び炭酸バリウムを加えて中和した後、900×g で 10 分間遠心分離する。上澄液 5 mL にフェーリング試液 5 mL を加えて水浴中で 5 分間加熱するとき、赤色の沈殿を生じる。	
酵素活性	—	—	—	—	酵素活性測定法により試験を行うとき、活性を示す。
キチンとグルカンの比率	キチン：グルカン 25:75 ~ 60:40 (m/m)	キチン：グルカン 25:75 ~ 60:40 (m/m)	キチン：グルカン	—	—

			30:70 ~ 60:40 (m/m) (※)		
純度試験					
タンパク質	—	—	6 %以下(※)	—	—
脂質	—	—	1 %以下(※)	—	—
pH	—	—	—	pH 6.0~7.5 (1 %懸濁液)	—
亜鉛	—	50 mg/kg 以下	—	—	—
鉄	—	100 mg/kg 以下	—	—	—
銅	—	30 mg/kg 以下	—	—	—
鉛	1 µg / g 以下	1 mg / kg 以下	1ppm 以下	5 µg / g 以下	5 µg / g 以下
水銀	—	0.1 mg/kg 以下	0.2ppm 以下	—	—
カドミウム	—	1 mg / kg 以下	0.5ppm 以下	—	—
ヒ素	1 µg / g 以下	1 mg / kg 以下	1ppm 以下	3 µg / g 以下	3 µg / g 以下
クロム	—	10 mg/kg 以下	—	—	—
オクラトキシン A	—	5 µg/kg 以下	—	—	—
総窒素	—	—	—	0.3%以下	—
微生物限度					
生菌数	1 g につき、生菌数は 1000 以下	1000 CFU/g 以下	1000 CFU/g 以下	1 g につき、生菌数は 1000 以下	1 g につき、生菌数は 50000 以下
サルモネラ	認めない	認めない	認めない	認めない	認めない
大腸菌	認めない	100 CFU / g 以下	10 CFU / g 以下	認めない	認めない
真菌数	酵母	1 g につき、真菌数は 200 以下	100 CFU / g 以下	1000 CFU / g 以下	1 g につき、真菌数は 100 以下
	カビ		100 CFU / g 以下		
乾燥減量	10 %以下 (105°C 恒量)	10%以下 (100~105°C 1時間)	10%以下	10.0%以下 (減圧、 60°C、5時間)	—

			(100~105°C 1時間) (※)		
強熱残分	—	—	—	6.0%以下	—
灰分	3%以下 (600°C 6時間)	3%以下 (600°C 6時間)	3%以下(※)	—	—
定量法	<p>本品約 5 g を精密に量り、平底フラスコに入れ、これに水 100mL を加え、2 分間かき混ぜる。上澄液をメンブランフィルター（孔径 1μm）でろ過し、ろ液 50mL を正確に量り、あらかじめ精密に質量を量ったガラス製蒸発皿に入れ、蒸発乾固し、90°C で 3 時間乾燥し、デシケーター中で放冷した後、質量を精密に量る。当該質量から求めた水可溶分の質量を元の質量から減じた質量の割合を含量とする。</p>			<p>本品約 0.1 g を精密に量り、水酸化ナトリウム試液 (0.1mol/L) を加えて振り混ぜて溶かして正確に 100mL とする。この液 5 mL を正確に量り、水を加えて正確に 100mL とする。この液 1 mL を正確に量り、フェノール溶液 (1→20) 1 mL 及び硫酸 5 mL を加えて激しく振り混ぜた後、氷水中で冷やし、検液とする。別に D (+) - グルコース約 0.1 g を精密に量り、これを用いて検液の調製と同様に操作して標準液とする。検液及び標準液につき、水 0.1mL を用いて検液の調製と同様に操作して得た液を対照として波長 490nm における吸光度 A T 及び A S を測定し、次式により含量を求める。</p>	

				D(+)-グルコースの採取量 (g) / 試料の採取量 (g) × Ar / As × 0.900 × 100 = 含有量 (%)	
保存基準	—	冷暗所に保存	—	—	—

表 4. 実際の製品測定 [31]

Parameter	Batch N° L09093CG	Batch N° L09068CG	Batch N° L09070CG	Batch N° L09071CG	Batch N° L09072CG
Loss on drying (%)	5.0	8.0	7.0	7.0	10.0
Chitin-glucan content (%)	94.0	94.0	95.0	94.0	94.0
Ratio of chitin-glucan	30:70	35:65	30:70	30:70	32:68
Ash (%)	2.5	3.0	2.0	3.0	3.0
Lipids (%)	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7
Proteins (%)	3.0	3.5	3.0	3.4	3.5
Total heavy metals (ppm)	2.3	1.9	2.1	2.0	2.0
Mercury (ppm)	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
Lead (ppm)	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Arsenic (ppm)	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Cadmium (ppm)	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25	< 0.25
Aerobic count (cfu/g)	< 10	30	<10	10	<10
Yeast and mould count (cfu/g)	< 10	<10	<10	<10	<10

試験方法 [31]

	Methods
Loss on drying (%)	Gravimetric method
Chitin-glucan content (%)	Internal Method: total weight minus ash, minus protein
Ratio of chitin-glucan	Internal Method based on ¹³ C NMR
Ash (%)	Gravimetric method
Lipids (%)	Gravimetric method
Proteins (%)	Colorimetric method
Total heavy metals (ppm)	ICP-MS
Mercury (ppm)	ICP-MS

Lead (ppm)	ICP-MS
Arsenic (ppm)	ICP-MS
Cadmium (ppm)	ICP-MS
Aerobic count (cfu/g)	ISO 4833
Yeast and mould count (cfu/g)	ISO 7954

③成分規格案の設定根拠

本指定要請の背景において、EU域内において製造・流通している物品の利用を想定していることから、基本的には、EUの成分規格を採用することとした。表3で記載しているEFSAの規格はワイン醸造時に使用するキチングルカンと同等品を評価しているがその使用用途に健康食品としての利用も考慮されている。そのため過助剤として使用するよりもより安全性に留意した規格であると指定等要請者は考え、そちらを採用した [31]。

(イ) 分子量又は式量

キチングルカンは水や有機溶剤に不溶性のポリマーのため測定できない。そのため未設定にしている [3] [31]。

(ロ) 含量

OIVでは95%との記載があるが [3]、表4において実際に欧州で流通しているキチングルカン商品で特許を取得しているKitoZymeの商品をLot別に5つ測定してみると94%であるものも存在した [31]。これはEUでの測定方法では重量換算をする際に強熱残分で得られた値とタンパク質含有量を引いた値を含有量と換算し、OIVの測定方法では強熱残分のみを引いた値を含有量としているので異なる。そこで、本規格案ではタンパク質含有量を設定しないためOIV規格の95%を採用することにした。

(ハ) 性状

OIVでは「白色の無臭粉末」 [3]、EFSAでは「黄色がかった白色の無臭粉末」と設定されている [31]。このうちEFSA規格は食品としての規格であるから、EU域内でワイン製造用に流通するキチングルカンはOIV規格を遵守する必要があると考えられる。しかし、食品への利用という観点で共通していてもOIVとEFSAで色の規格が異なるように、許容される色の範囲は必ずしも明らかでない。そこで、EU域内での流通品の実態について製造メーカーに確認を取ったところ、「自然由来のものなので、色にばらつきが生じることもある」とし、淡黄褐色まで含める必要があるとの見解を入手している。そこで本基準案ではこのような実態に合わせ、「本品は、白～淡黄褐色の粉末であり、においが無い。」とした。

(ニ) 確認試験

- ・キチンとグルカンの比率

OIVのキチン：グルカン=25:75 ~ 60:40 (m/m)を採用した [3]。

OIVではキチン：グルカン=25:75 ~ 60:40 (m/m) [3]、EFSAではキチン：グルカン=30:70 ~ 60:40 (m/m)と規格されている [31]。表4の実際に欧州で流通しているキチングルカン商品で、特許を取得しているKitoZymeの商品をLot別に5点測定した結果、30:70~35:65が測定されているのでどちらの値を採用しても問題

ないと考えられる。我が国で類似する試験法が第9版食品添加物公定書に記載されていないため [4]、EFSA、OIV が使用している試験方法を用いる [3] [31]。EFSA は OIV の試験方法を採用していることから試験方法は OIV に記載されている ^{13}C -solid state NMR によって行う方法にした。そのため OIV の規格を採用することにした。試験方法： ^{13}C -solid state NMR により行う。

1. サンプルの準備

(1) 塩酸 1 mol/L での洗浄：マイクロチューブミキサー用のフラスコで 2 g のキチングルカンと 40 mL の塩酸 1 mol/L を混合。この混合物を 320 rpm で 30 分間攪拌し、その後 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行うことを 2 回行う。

(2) 精製水での洗浄：上記の沈殿物に 40 mL の精製水をいれ混合する。混合物を 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行う。上清の導電率が 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 未満になるまで、このステップを繰り返す。

(3) エタノールでの洗浄：上記の沈殿物に 40 mL のエタノールを混合する。混合物を 4000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去を行う作業を 2 回行う。

(4) クロロホルム/メタノール洗浄：上記の沈殿物に 40 mL のクロロホルム/メタノール混合液(クロロホルム：メタノール=1:1)を混合する。この混合物を 320 rpm で 30 分間攪拌し、その後 4000 rpm で 10 分間遠心分離した後、上清を取り除く。これを 2 回行う。

(5) アセトン洗浄と乾燥：上記で得られた沈殿物と 40 mL のアセトンを混合する。この混合物を 320 rpm で 30 分間攪拌し、その後 4000 rpm で 10 分間遠心分離する。上清を 30 μm フィルターに注ぎ、チューブ内の物質を、アセトンを加えながらすべてフィルターに注ぐ。フィルター上の物質を結晶皿に置き、乾燥させる。

2. Brücker Avance DSX 400WB 核磁気共鳴装置での分析

磁場：9.04 Tesla

ラーモア周波数：83 kHz

2つの磁気パルス間の時間間隔：5 秒

磁気パルスが適用される期間：5.5 ms

磁気パルスシーケンスの数：3000

(ホ) 純度試験

次のとおり成分規格及び試験法を採用する。

(I) タンパク質量

EFSA の成分規格で 6%以下と設定がされているが [31]、OIV [3]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物に設定されていないことから [4]、定めないこととする。

(II) 脂質量

EFSA の成分規格で 1%以下と設定がされているが [31]、OIV [3]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物に設定されていないことから [4]、定めないこととする。

(III) pH

キチンゲルカン是不溶性の物質である事から定めないこととする。なお、OIV [3]、EFSA [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物に設定されていない [4]。

(IV) 亜鉛

2020 年の日本人の食事摂取基準で考えられる亜鉛の耐容上限量は摂取状況をはるかに下回り、サプリメントや亜鉛強化食品の不適切な利用がない限り過剰摂取が生じる可能性はない事から [36]、規格を設定しない事とした。なお、類似の指定添加物である我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には設定されていない [4]。

(V) 鉄

2020 年の日本人の食事摂取基準で考えられる亜鉛の耐容上限量は摂取状況をはるかに下回り、サプリメントや鉄強化食品の不適切な利用がない限り過剰摂取が生じる可能性はない事から [36]、規格を設定しない事とした。なお、OIV の成分規格には存在するが [3]、EFSA [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には設定されていないこと [4]。

(VI) 銅

2020 年の日本人の食事摂取基準で考えられる銅の耐容上限量は摂取状況をはるかに下回り、サプリメントの不適切な利用がない限り過剰摂取が生じる可能性はない事から [36]、規格を設定しない事とした。なお、OIV の成分規格には存在するが [3]、EFSA [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には設定されていない [4]。

(VII) 鉛

本品は Pb として 1 μ g/g 以下 (4.0g、第 1 法、比較液 鉛標準液 4.0mL、フレイム方式) とする。

OIV 規格では 1 mg / kg 以下 [3]、EFSA では 1ppm 以下 [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には 5 μ g / g 以下と設定されている [4]。

糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物とキチングルカンでは物性が異なるため、値は OIV と EFSA の規格を採用することにした。試験方法に関しては OIV 法と第 9 版食品添加物公定書に定める方法は同等の方法のため、第 9 版食品添加物公定書に定める方法を採用することにした。試料の調製については、類似の指定添加物に倣い、第 1 法に定める方法とする [4]。

(VIII) 水銀

2004 年の食品安全委員会の評価書では [37]、食品からの水銀摂取量は耐容摂取量の 5 割程度であり、食品からの摂取が健康に悪影響を及ぼす可能性は低いことから、規格を設定しない事とした。なお、OIV の成分規格には存在するが [3]、EFSA [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には設定されていない [4]。

(IX) カドミウム

2009 年の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会、食品規格部会報告書に記載されている我が国における食品からのカドミウム摂取量は耐容摂取量の 4 割程度であり、食品からの摂取が健康に悪影響を及ぼす可能性は低いことから [38]、規格を設定しない事とした。なお、OIV の成分規格には存在するが [3]、EFSA [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には設定されていない [4]。

(X) ヒ素

本品は As として 1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以下 (1.0g、第 2 法、標準色 ヒ素標準液 2.0mL、装置 B) とする。

OIV 規格では 1 mg/kg 以下 [3]、EFSA では 1ppm 以下 [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には 3 $\mu\text{g}/\text{g}$ 以下と設定されている [4]。糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物とキチングルカンでは物性が異なるため、値は OIV と EFSA の規格を採用することにした。試験方法に関しては OIV 法と第 9 版食品添加物公定書に定める方法 (装置 C) に相当するが、本邦においてほとんどの指定添加物において採用されている、第 9 版食品添加物公定書に定める装置 B を用いる方法を採用することにした [4]。試料の調製については、第 2 法に定める方法を採用する。

(XI) クロム

OIV の規格には存在するが [3]、我が国では 2013 年の食品安全委員会の報告から経口ばく露による健康リスクについては、現時点では作業は必要ないと考えられるとあるため設定しない [39]。

(XII) オクラトキシシン A

国際的に食品において基準値を定めている場合もあるが [40]、我が国では食品安全委員会によるハザード調査が行われている一方で基準は設けられていない [41]。また、本概要書では対象食品をぶどう酒としている。ぶどう酒には原料等に由来するオクラトキシシン A が含まれることが知られている [16] [55]。我が国でのぶどう酒でのオクラトキシシン A の測定値は、2014 年 10 月厚生労働省の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会資料によると 2004 年から 2009 年に国内で市販されているワイン 123 点の内 39 点が定量限界値以上であり、平均値は $0.11\mu\text{g}/\text{kg}$ 、最大値は $1.96\mu\text{g}/\text{kg}$ であった [88]。

「Ⅲ 安全性に係る知見」で後述するとおり、キチングルカンの製造に用いる *A.niger* 産業株はオクラトキシシン A を生産しない。さらに、クエン酸生産実績のある産業用株ではないがクエン酸生産培地中で最もオクラトキシシン A 生産量の多かった *A.niger* 株 (NRRL3122 株) からキチングルカンを生産した場合を仮定し、生産されたオクラトキシシン A が全量キチングルカンに移行 (このときのオクラトキシシン A 含有量は $27.4\text{ ng}/\text{g}$ となり、OIV の規格 ($5\mu\text{g}/\text{kg}$) を上回る。)、さらにはキチングルカンを使用したワインに移行し、除去もされないと仮定した場合であっても、ワインにおけるオクラトキシシン A の増加量は $137\text{ ng}/\text{L}$ となり、2014 年オクラトキシシン A 評価書における 20 歳以上のばく露量に、ぶどう酒を好んで摂取する者のオクラトキシシン A 推計摂取量 (国内流通ワインのオクラトキシシン A の最大値 + 上記増加量から推計) を加えても、TDI の 22.4 % に過ぎないと試算される。さらに、キチングルカンをワインに使用することにより、ワイン中のオクラトキシシン A が除去されることも知られており、その能力は上記の仮定におけるオクラトキシシン A の増加量を上回る。以上のことから、特に規格を設定しなくとも安全性に懸念はないと考えられるため、我が国では規格値を設定しないこととする。

(へ) 乾燥減量

EFSA のレポートと OIV の成分規格である 10.0 % 以下 (105°C 恒量) を採用することとする [3] [31]。

食品添加物公定書第 9 版の定める乾燥減量試験法と OIV で実施されている試験法は同等の方法であるため、第 9 版食品添加物公定書の定める試験法を採用した [4]。

(ト) 灰分

EFSA のレポートと OIV の成分規格である 3.0 % 以下 (600°C 6 時間) を採用することとする [3] [31]。食品添加物公定書第 9 版の定める灰分試験と OIV で実施

されている試験法は同等の方法であるため、温度や時間の条件を OIV が定める値とし [3]、第 9 版食品添加物公定書の定める試験法を採用した [4]。

(チ) 微生物限度

(I) 生菌数

OIV 規格と EFSA では 1000 CFU/g 以下 [3] [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には 1 g につき、生菌数は 50000 以下と設定されている [4]。OIV、EFSA の規格がよりシビアであるので規格値はそちらを採用することにした。OIV 試験法と第 9 版食品添加物公定書の定める試験法は、培地及び培養温度・時間が異なっているものの、非選択培地で前培養後のコロニー数を計測する点では共通しており、得られる試験結果の差異は軽微であると考えられる。そこで記載方法は我が国の (*Aspergillus niger*) 由来の添加物と合わせて、1 g につき、生菌数は 1000 以下と設定した。試験法については第 9 版食品添加物公定書に定める方法を採用することにした。なお、試料は第 1 法により調製することとした。

(II) 大腸菌

OIV 規格では 100 CFU/g 以下 [3]、EFSA では 10 CFU/g 以下 [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には「認めない」と設定されている [4]。OIV 試験法と第 9 版食品添加物公定書の定める試験法は、培地及び培養温度・時間が異なっているものの、非選択培地で前培養後のコロニー数を計測する点では共通しており、得られる試験結果の差異は軽微であると考えられる。そこで規格値は我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物と同様に「認めない」とし、試験方法は第 9 版食品添加物公定書に定める方法を採用することにした。なお、前培養液は第 1 法により調製することとした。

(III) サルモネラ菌

OIV 規格、EFSA、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物ともに「認めない」と設定されている [3] [4]。すべての規格が統一であるため本基準案もこれに沿って、「認めない」と設定した。OIV 試験法と第 9 版食品添加物公定書の定める試験法は、培地、培養温度・時間及び検出方法が異なっているが、試験方法性質上、第 9 版食品添加物公定書に定める方法の方が、誤検出が起こりにくいと考えられる。そこで試験法については第 9 版食品添加物公定書に定める方法を採用することにした。なお、前培養液は第 1 法により調製することとした。

(IV) 真菌数

OIV の試験方法では酵母及びカビを別々に測定しているが酵母及びカビを別々に測定する意義は小さいことから、第 9 版食品添加物公定書に定める方法により、酵母及びカビをまとめて真菌として測定することとした。OIV 規格では酵母 100 cfu/g 以下、カビ 100 cfu/g 以下であるので酵母とカビを合わせると 200 cfu/g 以下という規格値になる [3]。EFSA では 1000 cfu/g 以下 [31]、我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物は 1 g につき 100 以下と規格されている [4]。規格値はキチングルカンの規格の中で最も低い OIV の規格値を採用することにした。なお、試料は第 1 法により調製することとした。

(リ) 保存基準

EFSA のレポートの中で保存方法に関する記述がある [31]。精製したキチングルカンを二重層のポリエチレン袋に詰め、密封して室温で 2 年間と 40°C の環境下で 6 ヶ月保存試験を行っている。その結果は KitoZyme 社の機密となっているため詳しくデータはないが指定された ISO メソッドに従って、サンプルを収集し、乾燥減量、水分活性、微生物学的パラメーター（好気性微生物数、総酵母数およびカビ数、大腸菌、リステリア菌、腸内細菌科、サルモネラ）について分析した結果室温での保存で安定していることが示された。非常に安定した物質であり安全性の観点から細かな保存基準を記載しなくても問題ないと判断した。また、上記の EFSA のレポートと我が国の糸状菌 (*Aspergillus niger*) 由来の添加物には設定されていない。

④試験法の検証データ及び試験成績

本指定要請の背景において、EU 域内において製造・流通している物品の利用を想定しており、したがってこれら物品の試験成績を提出することとしたいが、物品の入手に時間を要したことから、これより試験を実施した上で、その結果を追って提出することとしたい。

(4) 食品添加物の安定性

キチングルカンの安定性は EFSA のレポートの中で保存方法に関する記述がある [31]。EFSA のレポートには精製したキチングルカンを二重層のポリエチレン袋に詰め、密封して室温と 40°C の環境下で 2 年間保存試験を行ったという記載がある。その結果は KitoZyme 社の機密となっているため詳しいデータはないが指定された ISO メソッドに従って、サンプルを収集し、乾燥減量、水分活性、微生物学的パラメーター（好気性微生物数、総酵母数およびカビ数、大腸菌、リステリア菌、腸内細菌科、サルモネラ）について分析した結果、規格値からの変化は見られず室温での保存で安定していることが示されたという記載がある [31]。

また、*Schizophyllum commune* の細胞壁から抽出したキチングルカンは 40%の NaOH と水に 1 時間 100°Cで処理しても 98.4%が残存し、不溶性であることが 1979 年の Sietsma らの研究で示された [7]。本概要書で指定要請するキチングルカンと抽出菌は異なるが、一般的に真菌の細胞壁はグルコース誘導体である N-アセチルグルコサミンが重合してできるキチンが主な成分でありそこに β -グルカンが強く結合し、複合体を形成しているものがキチングルカンである [5]。また、Sietsma らの研究の中で水に不溶であるがキチンを特異的に分解する酵素であるキチナーゼ処理を行ったところグルカンやグルコースが検出されたことから本概要書で指定要請するキチングルカンと同等品と考えられる [7]。

(5) 食品中の食品添加物の分析法

FDA に提出された、企業 (KitoZyme 社) の GRAS Notice において [25]、最終製品 (ワイン) におけるキチングルカン残存量に関する試験 (40 g/100L のキチングルカンで処理した後に沈殿物を除去した 500 mL のワインをろ過し、分離された固形物を洗浄、乾燥した後に IR 分析を実施) が実施されている。その結果、最終製品においてキチングルカンが検出されないことが確認されている。IR 分析の詳しい方法は記載されていない。

ワイン中の多糖類はペクチンのように部分的にメチル化されたガラクトuron酸やラムノースを主体とする酸性多糖類と、マンナン、アラビノガラクトンのようにガラクトース、ラムノース、キシロース等の中性糖からなる中性多糖類に分けられる。近年、多糖類に関して化学構造の解析が進んでいるが、定量的なデータは少なく、ワイン中の総量は 0.2~1.0 g/L と推測されている [42]。キチングルカンは先の「起源または発見の経緯」で述べたように糸状菌などの菌糸体でキチンと β -グルカンが強く結合し、複合体を形成したものである。これはワイン醸造で使用される酵母の菌糸体でも存在する [43]。さらにキチンは N-アセチルグルコサミン (グルコースの 2 位ヒドロキシル基がアセチルアミノ基に置換された単糖)、 β -グルカンは D-グルコース分子のポリマーであるため分解産物として得られた単糖はグルコースの基本構造を持っている。ブドウ果汁、ワイン中に含まれる単糖は主にグルコースとフルクトースであり、その他にも糖が存在している [42]。そのため仮に最終製品に残存し、溶解したとしても既存のワイン成分と添加物由来の物質を判別するのは非常に困難である。

通常の果汁及びワインの pH は 3.0~4.0 となっている [42]。キチングルカンの安定性や溶解をワイン中で調べたデータはないが、キチングルカンが細胞壁の主成分で指定要請物質の由来としている *Aspergillus niger* は pH 1.5~2 の酸性から pH 6.5 の幅広い条件で培養が可能で、pH に依存してクエン酸や乳酸などの様々な有機酸を産生する [44]。先の重金属の含有量試験方法にも挙げたように実際にキチングルカンを分解、溶液化して解析するには、硝酸、過酸化水素及び塩酸を混合した強酸とマイクロ波を組み合わせた過酷な条件によって処理する必要がある [3]。

以上の 2 点からワイン中でキチングルカンが分解される条件になるとは考えにくく、仮に分解され溶解したとしても分解産物とワイン中の成分の判別が困難である。

6. 使用基準案

(1) 使用基準案

キチングルカンは、ぶどう酒の製造に用いる果汁及びぶどう酒のろ過助剤以外の用途に使用してはならない。キチングルカンの使用量は、キチングルカンとして、ぶどう酒の製造に用いる果汁及びぶどう酒にあってはその 1 L につき 5 g 以下でなければならない。また、使用したキチングルカンは、最終食品の完成前に除去しなければならない。(キチングルカンを使用したぶどう酒の製造に用いる果汁を、ぶどう酒の製造に用いる場合、キチングルカンをぶどう酒に使用するものとみなす。)

(2) 使用基準案の設定根拠

本概要書では、原料果汁とワインへの使用を目的としているため、これを前提とした使用基準案を記載する。キチングルカンはその製法を踏まえるに、ワインに不溶であり、したがって本使用制限(ろ過助剤としてのみ使用可能)を適用する限りにおいて、キチングルカンはワインから除去される [31] [35]。これはワイン製造工程でろ過助剤は添加後 1 晩以上静置した上清をデプスシート 6-15 μ m 程度等でろ過後さらにデプスシート 1-7 μ m 程度でろ過、瓶詰め前にも除菌フィルター等でろ過をするなど、製成後の各種ろ過工程製造過程において除去されることに起因する [11]。ろ過助剤としての使用が目的とされているため、我が国のぶどう酒で清澄剤として使用されている PVPP の「ろ過助剤以外の用途に使用してはならない」「最終食品完成前に完全に除去しなければならない」という項目を設定した [4]。なお、最終製品で取り除くことを前提とする、すなわち「ろ過助剤としてのみ使用可能」との制限のもとにおいては、理論上、安全性を担保しつつ、最大使用量の緩和は可能と考えられるが、ワインの国際的な規格である OIV 規格で最大使用量を定めていること、当該使用制限内で十分効果を発揮することから、緩和しないこととした。使用最大量に関しては OIV 規格での最大使用量である「最終食品にあっては、その 1kg につき、その合計が 5g 以下でなければならない。」を採用した。詳しくは有効性に関する知見の項で述べるがオクラトキシシン A を有意に減少させ、安全性が担保された使用量である [16]。また、OIV の規格では使用用途によって細かに使用量を規定しているがこれは OIV がワインの品質に考慮して設定したものであり、安全性における観点によるものではない。

II. 有効性に関する知見

1. 食品添加物としての有効性及び他の同種の添加物との効果の比較

・ワイン中の無機成分

ワインやマストの無機成分はイオン形態か有機酸や多糖類等の他の化合物とコロイド錯体を形成した状態で存在する。ワイン中のカチオンとしてはカリウムが最も多く約 3/4 を占め、カルシウム、マグネシウム、ナトリウムがそれに続く。微量ないしは痕跡量含まれるものとしてはマンガン、鉄、銅、アルミニウム、鉛、亜鉛などがあげられる [42]。

Eder らの 2003 年の報告によると [45]、鉄、銅、亜鉛などの金属の含有量が多くなると、ワイン製造中に不快な味、褐変、沈殿物の形成など、さまざまな問題が発生する可能性がある。中でも鉄や銅の重金属は混濁を形成することが知られており、重金属の消長としては、①製法による影響、②酵母等の微生物による代謝、③吸着、結合等の作用によるオリや沈殿としての系外への除去が主たる要因として知られている [42]。

ワイン中の鉄はアミノ酸やポリフェノールなどと安定な複合体を形成したり、遊離のイオンとして存在したりする。それらの複合体はワインの貯蔵や熟成中に形成され、ワインの色や味と香りに影響を及ぼす。2010 年の田村の報告で [46]、世界各国で生産されたワイン中の鉄含有量の範囲と平均値、国産ワインの鉄含有量がまとめられている。これらの報告から鉄含有量は、非常に多様であることが示された。国産ワイン全体では白ワインも赤ワインも平均して 4.0mg/L 以上の鉄含有量を示している。

ワイン中の遊離の鉄イオンは酸化還元状態で Fe^{2+} と Fe^{3+} で存在している [47]。 Fe^{3+} がリン酸と結合すれば不溶性の複合体を作り、白色の混濁物を生じるほか、ポリフェノールと結合すると青色の混濁物を生じる。鉄混濁はワイン中の鉄イオンが 10 mg/L 以上存在すれば起こる可能性があるといわれている。一方で 25 mg/L でも清澄を保つワインもあり、一概にワイン中の鉄イオン濃度だけで鉄混濁の可能性を論じることはできない [11]。しかし、混濁を引き起こさない場合にも、ワイン中の成分の酸化還元反応に対して、ワイン中の鉄は触媒的な作用を示すことが知られている [47]。鉄はアセトアルデヒドとフェノール化合物の結合を触媒し、ポートワインにおいては硫酸鉄を添加すると酸化が早まるとされている [48]。そのため、鉄の除去はワインの品質を保持するために重要な工程と考えられる。我が国で使用ができる鉄の除去剤としてフィチン酸がある [49]。

ワイン中の鉛の含有量は 0.001~1.26 mg/L と鉄に比べて少ない [42]。カドミウムの量は鉛の 10 分の 1 程度であり、ごく微量である [16]。ブドウ果中の鉛は土壌由来と自動車の排気ガスが挙げられるが、それらは発酵でオリとして 69~90% が除去される [42]。

・我が国で使用を認められている清澄剤とキチングルカン

ワイン中には、酸化褐変、混濁、沈殿などの品質劣化を引き起こすタンパク質、ペプチド、タンニン、重金属などが存在している。これらを分離除去するために、目的に合った清澄剤が選択される [49]。ワインでの使用が行われ、我が国で使用を認められている清澄剤とキチングルカンについて表 5 に記載する。

表5 我が国で使用を認められている清澄剤とキチングルカン [11] [14] [15] [49] [50]

清澄剤	用途	推奨使用量	処理時間
卵白	① 赤ワインの清澄 ② 白ワインの香味改善 ③ 褐変物質の除去	2~3 個/100L 80~160g/kL	4日~6週間
	*我が国では一般飲食物添加物		
ゼラチン	① 清澄化 ② 色素の低減 ③ タンニンの低減 ④ タンパク質の除去 (コロイドシリカと併用時)	20~100g/kL	4日~6週間
	*我が国では一般飲食物添加物		
ベントナイト	① タンパク質の除去 ② 香味の改善 ③ アミン類の除去 ④ 銅の安定化と除去	50~2500g/kL	1~7日
	*我が国では指定添加物 使用基準 ベントナイトは食品の製造又は加工上必要不可欠な場合以外は食品に使用してはならない。酸性白土、カオリン、ベントナイト、タルク、砂、ケイソウ土及びパーライト並びにこれらに類似する不溶性の鉱物性物質の食品中の残存量は、2物質以上使用する場合であっても、食品の0.50%（チューインガムにタルクのみを使用する場合には、5.0%）以下でなければならない。		
活性炭	① 香味の改善 ② 褐変物質の除去	100~500g/kL	1~2日
	*我が国では指定添加物 使用基準 なし		
フィチン酸	① 過剰鉄の除去	除鉄量の5倍	1~3日
	*我が国では指定添加物 使用基準 なし		
PVPP	① 褐変物質の除去 ② ポリフェノールの除去 ③ タンパク質の除去 ④ ピンキングの防止	白ワイン 100~700mg/L 赤ワイン 100~200 mg/L	1~2日
	*我が国では指定添加物 使用基準 ポリビニルポリピロリドンは、ろ過助剤以外の用途に使用してはならない。また、使用したポリビニルポリピロリドンは、最終食品の完成前に除去しなければならない。		

キチングルカン	① 清澄化	マスト	2日
	② 重金属イオンの除去	1g/L 未満	
	③ 汚染物質オクラトキシン A の除去	ワイン 5g/L 未満	

(1) 清澄化

ろ過で除去が難しい $0.01\mu\text{m}$ 以下の粒子をコロイド状粒子と呼び、タンパク質、色素、タンニンなどが含まれる [10]。こうしたコロイド状粒子は清澄剤を用いた後にろ過を行うことで完全な清澄化を行うことができる。清澄剤はタンパク質とタンニンを結合させて、ワインの酸を利用して凝固させる作用である。古くから卵白等の動物性タンパク質が清澄剤として使用されている。ゼラチンは動物の骨、軟骨に含まれるコラーゲンに由来するため卵白同様に動物由来の清澄剤である。クロイツフェルト・ヤコブ病の出現により食品産業で補助剤として使用される動物由来製品の安全性に疑念を感じる消費者や宗教、信条的な理由で動物由来の製品を忌避する消費者がいることから近年ワインを清澄化するための代替品が検討されてきた。その結果、既存の清澄剤と同等の効率をもつ非動物由来製品が次々と開発された [12]。この観点から、真菌由来のキチングルカンは有望な代替品だと考えられた。実際の測定値は非公開であるがキチングルカンを使用した産業試験をシャルドネ、テレル、ソーヴィニヨンのブドウ品種で行った。その結果が表 6 に記載されている [51]。この結果によるとキチングルカンはこれまで使用されている清澄剤と比較して、同等の効果が得られた。さらに消費者の心理的な忌避を鑑みるとキチングルカンはこれまでの清澄剤よりも多様な消費者に受け入れられるという利点がある。以上のことから指定等要請者は本概要書で指定要請キチングルカンが指定されることで新たな消費者のニーズに合わせた製造が可能になると考えられる。

表 6 シャルドネとテレルとソーヴィニヨンを混ぜたマストに対する異なる清澄化処理の有効性 [51]

清澄剤	濃度	濁度減少率 (%)
ペクチン分解酵素 1	1g/hL	83
ペクチン分解酵素 2	2g/hL	93
PVPP	50 g/hL	96
ベントナイト	50g/hL	97
シリカゲル	25 mL/hL	86
アイシングラス	2g/hL	98
カゼイン	40g/hL	97
キチングルカン	50g/hL	93
	70 g/hL	93
	30 g/hL	92
	50 g/hL	95

(2) 重金属イオンの除去

序でも述べたようにワインは醸造過程で鉄、銅などの重金属イオンが過剰にあると混濁の原因になる可能性がある。我が国では鉄の除去には清澄剤ではフィチン酸、銅の除去にはベントナイトなどが有用である。

2008年のBornetとTeissedreの報告によるとキチングルカンはワイン中で鉄、鉛、カドミウムの含有量を有意に減少させることが示された [16]。表7はキチングルカンを赤ワイン、白ワイン、甘味ワインそれぞれに処理し、鉄、鉛、カドミウムの含有量がどのように変化するか調べた。ワインにキチングルカンを処理、2日静置した後にろ過を行い含有量の測定をした。表5を見るとすべての種類のワインでキチングルカンによって含有量が減少している。鉄に関してはキチングルカンの濃度依存的に含有量が増加しているが鉛とカドミウムはこれに当てはまらない。これは鉛とカドミウムのワイン含有量が鉄に比べて非常に少ないことに起因すると考えられる。

表7 キチングルカンによる重金属の除去 [16]

ワイン種類	鉄 (mg/L)			鉛 (μg/L)			カドミウム (μg/L)		
	赤	白	甘味	赤	白	甘味	赤	白	甘味
基本値	23	6	5	150	111	110	19	18	10
キチングルカン (2g/L)	6	4	1	101	47	68	8.8	15.2	7
キチングルカン (0.5g/L)	6	4	3	104	79	82	8.5	16	9
キチングルカン (0.1g/L)	7	5	4	118	100	75	8.2	14.8	8.8

赤：赤ワイン、白：白ワイン、甘味：甘味ワイン

(3) 汚染物質オクラトキシン A の除去

オクラトキシン A は糸状菌の *Aspergillus Xavus* と *Aspergillus ochraceus* を含む *Penicillium* 属のいくつかの菌によって産生される既知のネフロトキシン及び発がん性の物質である [52]。オクラトキシン A はジヒドロイソクロメンの基本骨格に、7位のカルボキシル基を介してフェニルアラニン分子がアミド結合した化合物であり、オクラトキシン A 産生菌の *Aspergillus* 属は主に温帯から熱帯にかけて、*Penicillium* 属は温帯から寒冷地域まで生育している [52]。オクラトキシン A は、発ガン性については WHO の国際がん研究機関 (IARC) においてグループ 2B (ヒトに発ガン性を示す可能性がある) に分類されている [53]。オクラトキシン A 産生菌は熱帯地域から冷涼な地域まで広い範囲に分布するため、ライムギ、コムギなどのムギ類、穀類加工品、豆類、コーヒー豆、カカオ、ワイン、ブドウジュース、乾燥果実、ビール、香辛料など大変多くの食品が汚染されることが特徴である。オクラトキシン A は、多くの国で規制が行われている。EU では、穀類およびその加工品で 3 μg/kg、干しぶどうで 10 μg/kg、ワインで 2 μg/kg、その他焙煎コーヒー等に規制値が設定されている [40]。

我が国では 2011 年に輸入食品等の摂取等による健康影響に係る緊急時に対応するために実施する各種ハザード (微生物・ウイルスを除く。) に関する文献調査報告書においてリス

クに関する考察があるが規制はない [41]。さらに 2014 年に食品安全委員会が規格基準を定めるか評価を行った。その結果、「食品からのオクラトキシン A の摂取が一般的な日本人の健康に悪影響を及ぼす可能性は低いものと考えられる。なお、オクラトキシン A の主な産生菌は、異なる生育条件では異なる種類の農作物及び食品に生育し、また、オクラトキシン A の汚染の程度は、気候等の影響を受けやすいことから、リスク管理機関において汚染状況についてのモニタリングを行うとともに、規格基準について検討することが望ましいと考える。」との記載があった [54]。

ワインでは微生物の増殖を行うときに汚染物質であるオクラトキシン A が産生される可能性がある。2010 年の堀井らの報告によると国産ワイン 59 点（赤ワイン 31 点、白ワイン 28 点）の分析を行ったところ、赤ワイン 5 点、白ワイン 5 点からオクラトキシン A が検出された。しかし、その検出濃度は、最高値がそれぞれ、赤ワインで 0.03 µg/L、白ワインで 0.022 µg/L といずれも極低濃度であった [55]。2008 年の Bornet と Teissedre の報告によるとキチングルカンはワイン中のオクラトキシン A の含有量を有意に減少させることが示された [16]。表 8 はキチングルカンを処理した場合のワイン中のオクラトキシン A の量を調べた結果である。2008 年の Bornet と Teissedre の報告では [16]、南フランス産 2003 年製造の無濾過ワイン（シャルドネを使用した白ワイン、メルローを使用した赤ワイン、およびグルナッシュとマカベウを使用した天然甘味ワイン）を使用してキチングルカンにオクラトキシン A 除去能が調べられた。ワインの化学的特性（pH、アルコール含有量、総フェノール含量、総酸度、残留糖分、総硫酸塩）を表 8-1 に示す。表 8.1 のワインにそれぞれオクラトキシン A を添加し、HPLC（励起波長= 333 nm、発光波長= 460 nm）で測定すると表 8 の基本値（赤：3.7µg/L、白：4.3µg/L、甘味：4.7µg/L）が得られた。このサンプルに KitoZyme 社のキチングルカン（キチン：グルカン=46:54）を 2 g/L または 5g/L 添加し、2 日間室温で穏やかに振盪した。その後、遠心分離（3000 g×30min）を行い、上澄み液 50mL を HPLC（励起波長= 333 nm、発光波長= 460 nm）の測定に用いた。本試験におけるワイン中のオクラトキシン A の測定は OIV の測定方法を使用しており、一般的なワイン中オクラトキシン A 濃度の分析法である [94]。OIV ではオクラトキシン A に関して CAS 番号 303-47-9 と記載している [95]。これは 2010 年の堀井らが国産ワインでのオクラトキシン A を測定した時に使用した標準液と同じであり [55]、2014 年に食品安全委員会が規格基準を定めるか評価した対象物質の CAS 番号とも同じである。本試験で添加したオクラトキシン A に関する CAS 番号や製造元は不明であるが、本試験でキチングルカンによって除去が確認されているオクラトキシン A は一般的にぶどう酒で汚染物質として懸念されるオクラトキシン A と同じであることから、一般的なワイン製造におけるキチングルカンのオクラトキシン除去の効果は表 8 に示されるものと変わらないものと指定等要請者は考えた。表 8 を見ると全ての種類のワインでキチングルカン（5g/L）を処理すると含有量が減少していることが分かる。

表 8 キチングルカンによるオクラトキシン A の除去 ($\mu\text{g/L}$) [16]

ワイン種類	赤	白	甘味
基本値	3.7	4.3	4.7
キチングルカン (2g/L)	2.6	3.3	3.6
ワイン種類	赤	白	甘味
基本値	3.7	4.3	4.7
キチングルカン (5g/L)	1.3	1.6	2.6

表 8-1 実験に使用したワインの化学的特性 [16]

	総フェノール含量	アルコール (% vol)	総酸度	残留糖分	総硫酸塩	pH
赤	2075	13.55	2.8	2	82	3.88
白	273.3	12.85	3.01	2	121	3.55
甘味	370.8	15.95	2.63	120	127	3.86

2. 食品中での安定性

キチングルカンは糸状菌などの菌糸体でキチンと β -グルカンが強く結合し、複合体を形成したものである。これはワイン醸造で使用される酵母の菌糸体でも存在する [43]。さらにキチンはN-アセチルグルコサミン(グルコースの2位ヒドロキシル基がアセチルアミノ基に置換された単糖)、 β -グルカンはD-グルコース分子のポリマーであるため分解産物として得られた単糖はグルコースの基本構造を持っている。キチングルカンは40%のNaOHと水に1時間100°Cで処理しても97%以上が残存し、不溶性であることが1979年のSietsmaらの研究で示された [7]。通常の果汁及びワインのpHは3.0~4.0となっている [42]。キチングルカンの安定性や溶解性をワイン中で調べたデータはないがキチングルカンが細胞壁の主成分で指定要請物質の由来としている *Aspergillus niger* はpH 1.5~2の酸性からpH 6.5の幅広い条件で培養が可能で、pHに依存してクエン酸や乳酸などの様々な有機酸を産生する [44]。先の重金属の含有量試験方法にも挙げたように実際にキチングルカンを分解、溶液化して解析するには、硝酸過酸化水素及び塩酸を混合した強酸とマイクロ波を組み合わせた過酷な条件によって分解する必要がある [3]。

以上の事からキチングルカンはワインもしくは果汁内で非常に安定に存在すると考えられる。

III. 安全性に係る知見

キチングルカン (Chitin-glucan) は *Aspergillus niger* (*A. niger*) の菌糸体の細胞壁由来の成分であることから本物質の安全性に関しては、本基原菌株 *A. niger* の安全性を評価するとともに、キチングルカンの安全性を評価した。

1. キチングルカン製造における基原菌株 *Aspergillus niger* の安全性

(1) *Aspergillus niger* の報告

当該指定要請を行うキチングルカンは、OIV の規格[3]によれば、食品及び医薬品市場で生産されるクエン酸の副産物とされていることから、キチングルカン製造における基原菌株 *Aspergillus niger* (*A. niger*) は、クエン酸産生株であって、かつクエン酸産生推奨条件下で培養されるものと想定している。

A. niger は、国立感染症研究所が取扱う病原体等の安全管理について定めた国立感染症研究所病原体等安全管理規程の別冊 1 病原体等の BSL 分類において、バイオセーフティレベル (BSL) 1 に分類されている [56]。

また、本品目の産生菌株である *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及びクエン酸を産生するために何十年も使用されてきている [57]。

EFSA journal (2010 年) に Frisvad ら (2007 年) が *A. niger* でオクラトキシン及びフモニシンを産生することを指摘していることに基づき、*A. niger* 由来のキチングルカンを開発食品成分として使用するに当たり、その規格の中で *A. niger* 菌株とキチングルカンのマイコトキシンの分析が行われている。その結果、下表の通り *A. niger* 及びキチングルカンのサンプルからアフラトキシン (B1、B2、G1、G2)、オクラトキシン及びフモニシン (B1、B2) のようなマイコトキシンは検出限界以下であり、マイコトキシンは安全上の懸念を示していないと考えられたと報告している [31] [58]。

表 9 マイコトキシン分析値

マイコトキシン\サンプル	<i>A. niger</i> (µg/kg)	キチングルカン (µg/kg)
アフラトキシン B1	<0.1	<0.1
アフラトキシン B2	<0.1	<0.1
アフラトキシン G1	<0.1	<0.1
アフラトキシン G2	<1	<1
オクラトキシン	<1	<1
フモニシン B1	<100	<100
フモニシン B2	<100	<100

(表中の数値は検出限界値)

2007 年の Frisvad らの報告によると [58]、NRRL 3122 株は Czapek 酵母自己消化寒天培地、ライスコーンステープ寒天培地、酵母抽出スクロース培地、ジクロラン 18%グリセロール培地、酵母抽出スクロース培地、グルコース最小寒天培地、20%スクロース添加 Czapek 酵母自己消化寒天培地及び 5%塩化ナトリウム添加 Czapek 酵母自己消化寒天培地で 25°C、7 日間生育

させるとフモニシン B2 を産生すると記載がある。NRRL 3122 株 (IBT 23538) は菌株 CBS 513.88 (= ATCC 22343) に由来する酵素産生に使用される菌株である。同じ報告の中でクエン酸産生に古くから使用されている NRRL 328 = IBT seisann27878 (= ATCC 1015 = CBS 113.46)、NRRL 3 = IBT 23539 (= ATCC 9029 = CBS 120.49) 及び NRRL326=IBT27876 (ATCC16888=CBS554.65) に関してもフモニシン B2 の産生に関して確認しているが同様に Czapek 酵母自己消化寒天培地、酵母抽出スクロース培地及び 5%塩化ナトリウム添加 Czapek 酵母自己消化寒天培地で 25°C、7日間生育させるとフモニシン B2 を産生するが麦芽エキス寒天培地では産生されないことが示されている。このことから *A. niger* は生育条件によってフモニシン B2 を産生する可能性がある事が示された。2010 年の EFSA の報告で使用されている *A. niger* の使用株は記載がないため判断できない。また、2012 年の FDA 及び 2017 年の FSANZ の報告についても *A. niger* の使用株の記載はないため、これらについても同様に判断できない。マイコトキシンの産生は菌株よりも使用培地等の生育環境に大きく影響される可能性がある。表 9 で示した EFSA に提出された KitoZyme 社の使用した *A. niger* 菌株とキチングルカンでのオクラトキシシン A やフモニシンを含むマイコトキシンを測定した結果検出限界以下であることから、KitoZyme 社の *A. niger* 菌株由来の食品としてのキチングルカンにおいてマイコトキシンは安全性の懸念はないと EFSA の評価の中で考察している。この EFSA の報告はキチングルカンそのまま飲食する新規食品としての安全性の評価であり、食品添加物としての評価とは異なる。有効性に関する知見の項で述べたように我が国ではマイコトキシンに関する規制はないが EU では、特定の食品において規制値が設定されている³。EU の特定の食品におけるフモニシンとオクラトキシシン A の規制値を表 10 に表す [40] [59]。この表から今回の対象食品に係る項目を探すとオクラトキシシン A に関してワイン (15%以上のリキュール)、果実ワインにおいて最大基準値が 2.0 µg/kg と記載がある。仮にキチングルカンにおけるオクラトキシシン A の値が検出限界である 1 µg/kg と仮定すると、本概要書における使用基準にあるぶどう酒に対するキチングルカンの最大使用量使用した場合のぶどう酒に移行するオクラトキシシン A の値は 0.005 µg/kg (1 µg/kg × 5g/L) と換算できる。

これらのことから指定等要請者は菌株が指定されていないがマイコトキシンを測定した結果検出限界以下であり食品としてキチングルカンの安全性が EFSA で認められていること、仮に検出限界である値がキチングルカンに残っていても本概要書の使用最大量でも対象食品中に EU で定めるオクラトキシシン A の値の 0.25%しかないことから安全性の懸念がないと考えられる。

³ EFSA の評価書では新規の食品としてキチングルカンの安全性を評価していることから、特定の食品のように検出される場合は規制値を設定する必要があるので表でまとめられているものと思われる。これらは食品添加物としての規制値ではないので、指定等要請者は本要請において規制値を設ける必要はないと考えている。

表 10. EU におけるマイコトキシンの規制値 [40] [59]

		基準最大値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
マイコトキシン	食品	個別	総量
フモニシン類	未加工トウモロコシ	—	4000
	直接消費用トウモロコシ及び加工品(トウモロコシが主原料の朝食用シリアル・スナック、加工食品及び乳幼児用トウモロコシ加工食品を除く)	—	1000
	トウモロコシが主原料の朝食用シリアル・スナック	—	800
	トウモロコシが主原料の加工食品・乳幼児用トウモロコシ加工食品	—	200
	直接消費用以外の 500 μm より大きい製粉画分	—	1400
	直接消費用以外の 500 μm 以下の製粉画分	—	2000
オクラトキシン A	未加工穀類 (コメ及びソバを含む)	—	5
	穀類加工品 (ベビーフード及び幼児向け穀類加工食品、乳児向け医療用食品並びに小売以外の小麦グルテンを除く)	—	3
	干しブドウ	—	10
	焙煎したコーヒー豆及び粉 (水溶性コーヒーを除く)	—	5
	水溶性コーヒー (インスタントコーヒー)	—	10
	ワイン (15%以上のリキュール)、果実ワイン	—	2
	アロマワイン、ワインベース飲料	—	2
	ブドウジュース	—	2
	ベビーフード及び幼児向け穀類加工食品	—	0.5
	乳児向け医療用食品	—	0.5
	香辛料 (コショウ類、ナツメグ、ショウガ、ターメリック)	—	15
	トウガラシ類 (唐辛子、唐辛子粉、カイエンペッパー、パプリカ)	—	15
	上記香辛料を含む混合物	—	15
	甘草(甘草根、お茶用等)	—	20
	甘草抽出液(飲料及び菓子類用)	—	80

一方、*A.niger* の安全性に関しては食品安全委員会が、「添加物評価書 *Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて産生されたアスパラギナーゼ (2014 年 1 月)」 [34]において、次のようにまとめている。

『(引用開始)

(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 [60]。

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* の胞子のばく露を受けているが、それにより感染症に罹患するということはないとされている。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ているとされている [57]。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ばく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たり、皮膚表面を傷つけたりした症例にみられたものが多く、健康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* を利用した酵素産生条件下において、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* を産生菌株として食品に使用される酵素を産生するに当たっては、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 [57]。

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 B2、B4 又は B6 のいずれかが検出されたとされている [61]。

指定等要請者は、当該産生菌株 *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ラ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。

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 [62]。

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 B2、B4 及び B6 は検出されなかったとされている。

また、指定等要請者委託試験報告（2013b）によれば、*A. niger* ASP-72 株を用いて産生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 B1 及び B2(5)は検出されなかったとされている。以上より、指定等要請者は、*A. niger* ASP-72 株について、標準的な酵素産生に用いられる培養条件下ではフモニシン類を産生することはないと考察している。

（5）フモニシン B1 及び B2 のほか、3-AC-デオキシニバレノール、アフラトキシン B1、B2、G1 及び G2、デオキシニバレノール、ジアセトキシシルベノール、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 B1 及び B2 の検出限界は 5 µg/kg、オクラトキシンの検出限界は 1 µg/kg であったとされている。

（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 α-アミラーゼ、アントシアナーゼ、イヌリナーゼ、インベルターゼ、カタラーゼ、α-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、β-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 [30]。また、米国 FDA は、*A. niger* 由来の α-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、β-ガラクトシダーゼ、カルボヒドラーゼ、プロテアーゼ及びカタラーゼについて、非病原性・非毒素産生性の産生菌株を用いて適正使用規範（GMP）の下で産生される限りにおいては GRAS 物質とみなされるとの認識を示している [57] [63]。

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産生菌株については、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。（引用終わり）』

A. niger ASP-72 は *A. niger* のアスパラギナーゼ遺伝子を増幅させて産生性を向上させた糸状菌であり、その宿主株及び導入遺伝子の供与体は *A. niger* であること [34]から、*A. niger* ASP-72 株に対する上記の評価に記載がある、一般的な *A. niger* 株に関する評価は本概要書にも適用できるが（引用文の該当する箇所を下線をしている）、引用文だけでは不十分と考えこれらを用いながら基原菌株 *A. niger* の安全性に関して記載した。

我が国において主要なマイコトキシンに関する食品の規制値は設定されていないが 2006 年に高鳥らはアフラトキシン、オクラトキシン、フモニシンに関しては CODEX や EU などの特

定食品に対して規制値が設けられていること、有害性が高いことから規制値の検討が必要であると記載されている [64]。オクラトキシン A に関しては 2014 年 1 月 [41]、フモニシンに関しては 2017 年 9 月 [65]、総アフラトキシンに関しては 2009 年 3 月 [66] に食品安全委員会によって評価がなされているが、我が国ではいずれも食品に規制値は定められていない。

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 [57]。このことから本概要書において指定要請を行うキチングルカンの基原菌株においてアフラトキシンに関する懸念はないと指定等要請者は考える。

同じく Schuster ら (2002) の報告によれば、*Aspergillus* 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* を産生菌株として食品に使用される酵素を産生するに当たっては、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 [57]。さらに、Frisvad ら (2011) の報告によれば、*Aspergillus* 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 B2、B4 又は B6 のいずれかが検出されたとされている [61]。そこで指定等要請者はクエン酸産生に使用される工業用菌株において、キチングルカンの基原菌株としてオクラトキシン A とフモニシンに考察する必要があると考えた。

Frisvad ら (2011) の報告によれば、産業株として知られている 69 株について 5% の NaCl を含む酵母エキス (CYA) 寒天培地で 25°C、7 日間生育させ、マイコトキシンの産生を確認したところ 83% がフモニシン B2 を産生し、33% がオクラトキシン A (OTA) を産生し、26% が両方の産生が確認された。論文に頻出する NRRL3 = IBT 23539 (= ATCC 9029 = CBS 120.49)、NRRL2270 = IBT 26391 (= ATCC 11414)、NRRL599 = IBT 26389 (= ATCC 9142 = ATCC 74337) はフモニシン産生が確認された。また、産業用として人気が高い糸状菌株の NRRL 337 = ATCC 10254 (= CBS 126.48 = CBS 618.78 = IBT 3277 = IBT 25294 = IBT 23679 = IBT 23680 = IBT 23681 = IFO 6428)、NRRL 3112 = ATCC 22342 (= CBS 115988 = IBT 23540)、NRRL 3122 = ATCC 22343 (= CBS 115989 = IBT 23538) の 3 つの株はオクラトキシン A とフモニシン両方の産生が見られた。*A. niger* に属し、論文に頻出する菌株の 3 つはクエン酸産生に用いることが Frisvad ら (2011) の報告の Supporting Information の Table S1 から確認できた。産業用として人気が高い糸状菌株の NRRL 337 は *A. foetidus*、または *A. citricus* に属し、NRRL 3112 は *A. awamori* に分類されクエン酸産生ではなく酵素産生株として用いられると Frisvad ら (2011) の報告の Supporting Information の Table S1 で記載がある [61]。

2007 年の Frisvad らの報告によると、*Aspergillus* は生育条件によってフモニシン B2 を産生する可能性がある事が示された [58]。このことから *Aspergillus* に属する産業用菌株がクエン酸産生においてマイコトキシンの産生を行うのか調べるために Frisvad ら (2011) では *Aspergillus* に属する菌株をクエン酸産生推奨培地 (CIT4) pH4.1 で培養した場合、マイコトキシン産生が行われるかを調べている。実験では *Aspergillus* (NRRL 337、CBS 101705、IBT 19558、NRRL 3、NRRL 330、NRRL 350、NRRL 567、NRRL 599、NRRL 3122) の 9 株が使用された。静置培養の場合は 300 mL フラスコに 100 mL の培地をいれ、104 分生子/mL の孢子懸

濁液を使用し、25° C で 8 日間培養した。振とう培養の場合はバツフル付き 300 mL フラスコに 100 mL の培地をいれ、104 分生子/ mL の孢子懸濁液を使用し、30°C で 8 日間、75rpm で培養した。培養後、クエン酸産生量、マイコトキシン産生量を測定した。その結果を表 11 に記す [61]。

表 11 の結果から、オクラトキシン A に関しては CBS101705、NRRL337 の培地と菌糸体双方で NRRL3122 の静置培養条件の菌糸体に確認された。その他の菌株では産生が確認されなかった。その他の菌体は Frisvad ら (2011) の報告の Supporting Information で異なった pH のクエン酸産生推奨培地 (CIT2:pH3.0、CIT5:pH5.0) Table S6、S7 でもオクラトキシン A の産生は確認されなかった。オクラトキシン A が確認された CBS101705、NRRL337、NRRL3122 について由来と産業利用を確認した結果、CBS101705 はカナダの室内の空気由来の菌株で産業用に使用されているものではない。NRRL3122 については酵素産生株であり、クエン酸産生に使用実績はない株となっている [61]。NRRL337 に関してはクエン酸産生実績のある株であるが NRRL の 2020 年のデータベースで *Aspergillus foetidus* に分類されているため [87]、本概要書で指定要請を行うキチングルカンの由来菌 (*Aspergillus niger*) とは異なる。そのため、クエン酸産生培地においてクエン酸産生に使用される主な *Aspergillus niger* 産業株はオクラトキシン A の産生は低いと考えられる。

表 11. *A. niger* 菌株のクエン酸産生推奨培地 (CIT4) でのマイコトキシン産生 [61]

菌株	培養条件	クエン酸 (g/L)	オクラトキシン A (ng/mL) 培地 / 菌糸体	フモニシン B2 (ng/mL)	菌糸体のフモニシン B2 (ng/g)	フモニシン B4 (ng/mL)
<u>CBS^a</u> <u>101705</u>	静置	24.6 ^b	0 / 28 ^c	63 ^c	131 ^c	+ ^d
	振とう	24.2	0 / 68	2	308	+
<u>CBS</u> <u>101705</u>	静置	16.7	14 / 1101	66	1021	+
	振とう	22.8	90 / 1352	6	526	+
IBT 19558	静置	12.7	0 / 0	0	0	-
	振とう	11.8	0 / 0	0	3.5	-
<u>NRRL</u> <u>3122</u>	静置	23.6	0 / 4	0	0	-
	振とう	19.8	0 / 0	0	0	-
NRRL 3	静置	22.3	0 / 0	27.3	506	+
	振とう	23.8	0 / 0	39.5	876	+
<u>CBS</u> <u>126.48=</u> <u>NRRL337</u>	静置	1.8	115 / 2228	0	1.5	-
	振とう	1.7	71 / 2085	0	0	-
NRRL 567	静置	19.5	0 / 0	6382	225	+
	振とう	16	0 / 0	160	3352	+
	静置	27.3	0 / 0	12.5	382	+

NRRL 599	振とう	33.9	0 / 0	0	550	+
NRRL 330	静置	27.1	0 / 0	3.5	337	-
	振とう	19.8	0 / 0	4.2	298	-
NRRL 350	静置	25.1	0 / 0	34.5	868	+
	振とう	24.8	0 / 0	0	673	+

- a. 下線が引かれた株は、YES 寒天培地および他のいくつかの寒天培地でオクラトキシン A が確認された株である。
- b. クエン酸の測定は 1 度しか行わなかった。
- c. 2 度測定を行い平均を記載している。
- d. 標準が不十分であるため定量化は行わなかった。

同じく表 11 の結果から、フモニシンに関しては NRRL 3122 株を除く、すべての菌株で産生が確認された。しかし、NRRL 3122 株は Frisvad ら (2011) の報告の Supporting Information で異なった pH のクエン酸産生推奨培地 (CIT2:pH3.0、CIT5:pH5.0) Table S6、S7 ではフモニシン産生が確認されたことからクエン酸産生に使用される主な産業株を含む今回試験した株でフモニシン産生が行われると考えられる [61]。

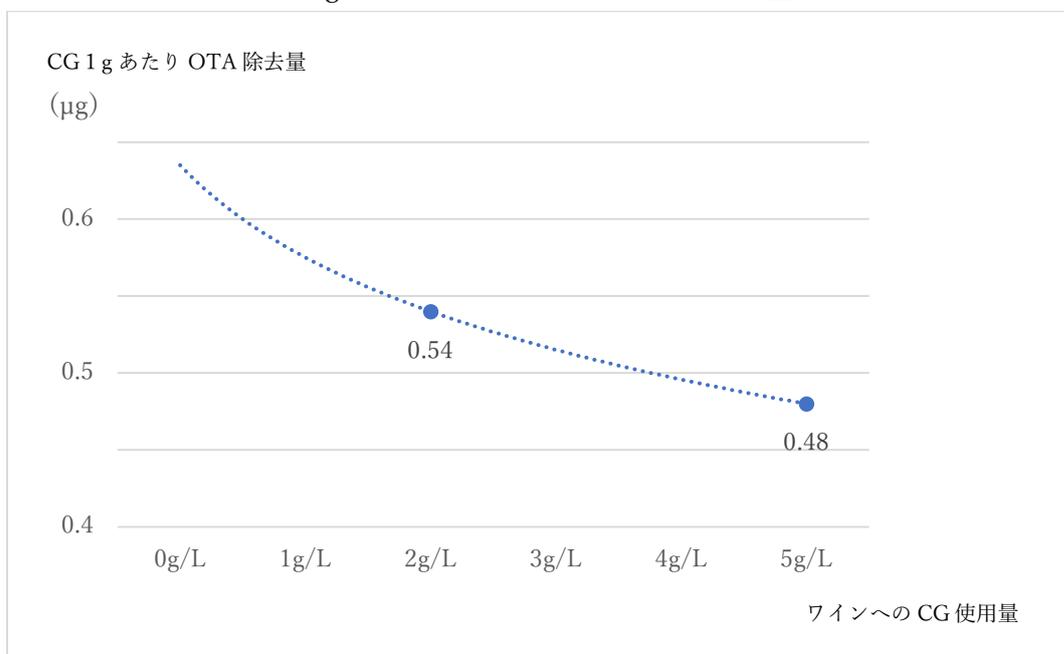
これらの報告をうけて指定等要請者はキチングルカン製造における基原菌株 *Aspergillus niger* の安全性について以下のように考察した。

Schuster ら (2002) の報告によると [57]、*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及びクエン酸を産生するために何十年も使用されてきているほか、自然界に広く存在して一般的に非病原性と考えられている。しかし、Frisvad ら (2011) の報告から [61]、産業用の *Aspergillus* 菌株を酵母エキスの培地で生育させるとオクラトキシン A とフモニシン産生が確認された。この報告からオクラトキシン A とフモニシン産生に関して安全性の検討を行う必要があると考えた。

2007 年の Frisvad らの報告によると [58]、*Aspergillus* は生育条件によってマイコトキシンの産生が異なると記載がある。指定等要請者はキチングルカン製造工程においてクエン酸調製の副産物として得た *Aspergillus niger* バイオマスを使用する事から [35]、Frisvad ら (2011) の報告にあるクエン酸産生培地でのマイコトキシン産生の結果 (表 11) をもとに安全性の検討を行った [61]。オクラトキシン A に関してはクエン酸産生培地においてクエン酸産生に使用される *A. niger* 産業株からの産生は確認されず、産生の可能性は低い (表 11)。また、仮に産生菌株においてオクラトキシン A が産生されたとしても有効性に関する知見で述べたようにキチングルカンはワイン中のオクラトキシン A を除去する [16]。表 8 からキチングルカン 5g/L でのワインのオクラトキシン A の除去量は 2.1~2.7 $\mu\text{g}/\text{L}$: 平均除去量 2.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ (赤ワイン : 3.7-1.3 = 2.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、白ワイン : 4.3-1.6 = 2.7 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、甘味ワイン : 4.7-2.6 = 2.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、平均除去量 (2.4+2.7+2.1) \div 3 = 2.4 $\mu\text{g}/\text{L}$)、除去率は 45~65% : 平均除去率 58% (赤ワイン : (3.7-1.3) \div 3.7 \times 100 = 65%、白ワイン : (4.3-1.6) \div 4.3 \times 100 = 63%、甘味ワイン : (4.7-2.6) \div

4.7×100=45%)、平均除去率：(65+63+45) ÷ 3 =58%)、このときキチングルカン 1 g あたりのオクラトキシシン A の除去量は 0.48µg/g (2.4 µg/L ÷ 5g/L) で、2 g/L でのワインのオクラトキシシン A の除去量は 1.0~1.1µg/L：平均除去量 1.07 µg/L (赤ワイン：3.7-2.6=1.1µg/L、白ワイン：4.3-3.3=1.0µg/L、甘味ワイン：4.7-3.6=1.1 µg/L、平均除去量 (1.1+1.0+1.1) ÷ 3 =1.07µg/L)、除去率は 23~30%：平均除去率 25 % (赤ワイン：(3.7-2.6) ÷ 3.7 ×100=30%、白ワイン：(4.3-3.3) ÷ 4.3×100=23%、甘味ワイン：(4.7-3.6) ÷ 4.7×100=23%、平均除去率：(30+23+23) ÷ 3 =25 %)、また、このときキチングルカン 1 g あたりのオクラトキシシン A の除去量は 0.54µg/g (1.07 µg/L ÷ 2 g/L) である[16]。表 8 の結果から、キチングルカンのオクラトキシシン A 除去は用量依存的であると考えられる。そこで表 8 の結果から、キチングルカン 1 g あたりのオクラトキシシン A 除去量は使用量によって図 2 のように推移すると考えられる。

図 2. キチングルカン 1 g あたりのオクラトキシシン A 除去量の推移推計



2010年の堀井らの報告によると[55]、国産ワイン 59 点 (赤 31 点、白 28 点) を対象としオクラトキシシン A を測定した結果、定量限界値以上の値は 10 点 (赤 5 点、白 5 点) であった。最大値は 0.03µg/L、平均値は約 0.02µg/L であり非常に低い事が分かった。2014 年 10 月厚生労働省の薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会資料によると 2004 年から 2009 年に国内で市販されているワイン 123 点のオクラトキシシン A を調べたところ 39 点が定量限界値以上であり、平均値は 0.11µg/kg、最大値は 1.96µg/kg であった[88]。図 2 の推計に用いたワインはキチングルカン処理を行う前にオクラトキシシン A を添加しており(詳しくは有効性に関する知見の項目に前述)、一般的なワインよりもオクラトキシシン A の含有量が極端に多くなっている(最もオクラトキシシン A 濃度の低い赤ワインで 3.7µg/L であるが、この値は国内の流通ワインの平均値(0.11µg/kg)の 34 倍、最大値(1.96µg/kg)の 1.9 倍に相当する。) [16]。実際に

市場で流通するワインに含まれる程度のオクラトキシシン A に対しては、図 2 に示すようなキチングルカンの効果が期待できない（すなわち、処理前のワインに含まれるオクラトキシシン A が少ない場合には、除去量も少なくなる）可能性があることから、以下これについて検証する。

表 8 の結果から、キチングルカン処理前のワインのオクラトキシシン A 含有量に対し、キチングルカン処理によるオクラトキシシン A 除去量を求めた。ワインのオクラトキシシン A 含有量は表 8 の基本値（3.7 $\mu\text{g/L}$ ：赤ワイン、4.3 $\mu\text{g/L}$ ：白ワイン、4.7 $\mu\text{g/L}$ ：甘味ワイン）を使用した。それぞれの基本値でのワイン除去量を換算すると、次の関係になる。

キチングルカン（2g/L）処理時

含有量 3.7 $\mu\text{g/L}$ 1.1 $\mu\text{g/L}$ (3.7-2.6)

含有量 4.3 $\mu\text{g/L}$ 1.0 $\mu\text{g/L}$ (4.3-3.3)

含有量 4.7 $\mu\text{g/L}$ 1.1 $\mu\text{g/L}$ (4.7-3.6)

キチングルカン（5 g/L）処理時

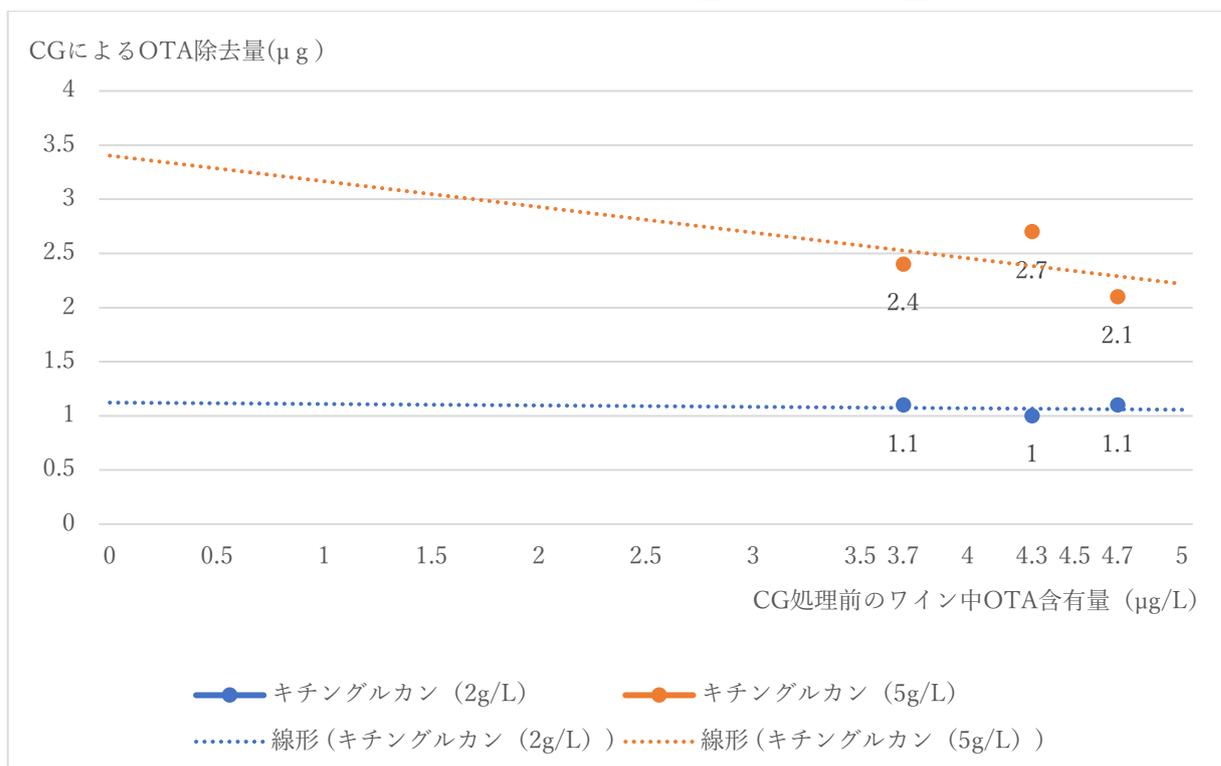
含有量 3.7 $\mu\text{g/L}$ 2.4 $\mu\text{g/L}$ (3.7-1.3)

含有量 4.3 $\mu\text{g/L}$ 2.7 $\mu\text{g/L}$ (4.3-1.6)

含有量 4.7 $\mu\text{g/L}$ 2.1 $\mu\text{g/L}$ (4.7-2.6)

以上をプロットすると、図 3 のとおりとなり、これより、キチングルカンによるオクラトキシシン A 除去量は処理前のワイン中オクラトキシシン A 含有量に対する明確な依存性は見られないか、むしろ低濃度ほど除去量が増える可能性が示唆される。したがって、指定等要請者は処理前のワインに含まれるオクラトキシシン A が少ない場合には除去量が少なくなる可能性はなく、図 2 の推移は処理前のワイン中オクラトキシシン A 含有量にかかわらず適用できると考えた。

図 3.キチングルカン処理前のオクラトキシシン A 含有量に対する除去量の推移



ぶどう酒を好んで摂取した場合、ぶどう酒の1日摂取量は49.3 mLと推計される。(詳しい計算式は一日摂取量の推計の項目で記載している。)これにわが国で流通しているワイン中でのオクラトキシン A 最大値 1.96 µg/kg をかけ、食品安全委員会が定める食品健康影響評価に用いる平均体重である 55.1 kg で割るとオクラトキシン A のぶどう酒からの一日最大摂取量は 1.75 ng/kg 体重/日 (1.96 ng/mL × 49.3 mL ÷ 55.1 kg) である [89]。これは 2014 年に食品安全委員会が設定したオクラトキシン A の TDI である 15 ng/kg 体重/日の約 12% であり、安全性に懸念はない [54]。

本概要書で指定要請を行うキチングルカンについては、国際ブドウ・ワイン機構 (OIV) の使用方法の記載において、オクラトキシン A を除去する目的では 5g/L 以下、清澄化や重金属イオンの除去を目的では 1g/L 以下使用するとされている [15]。これらの使用量はワインの品質に考慮して設定したものであり、使用実態に沿ったものと考えられる。そこで使用目的別に一般的な使用量を考え、それぞれの使用量における対象食品でのオクラトキシン A の除去量から生産菌株においてオクラトキシン A が産生された場合での安全性に関して考察する事にした。

我が国においては設定されていないが、EU にはワインのオクラトキシン A に表 10 に示したように 2 µg/L の規制値が定められている [40]。表 8 で使用したワインのようにオクラトキシン A の値が 2 µg/L を超えるワインではオクラトキシン A の除去を行う必要がある。このオクラトキシン A を除去する目的では 5g/L 以下で使用するものとされている。しかし、実際の EU ではもともとのワインに含まれるオクラトキシン A のリスクに応じて、経済的な理由も鑑み、規制値の 2 µg/L を下回るよう適宜使用するものであり、必ずしも最大量の 5g/L 使用することが一般的ではないと考えられるが、リスクを考慮して最大量使用した場合の安全性を考察する。表 8 の結果より、5g/L の使用ではワインに含まれるオクラトキシン A が平均 58% 除去される。また、図 2 からキチングルカン 1 g あたりのオクラトキシン A の除去量は 0.48 µg/g である。ここから考えられる生産菌株由来のオクラトキシン A によりワインのオクラトキシン A が増加する条件は、キチングルカン 1 g あたり 0.48 µg 以上のオクラトキシン A が含まれることである。しかし、2011 年の Frisvad らの報告によると、表 11 に記載がある *Aspergillus* の菌株を調べた結果、クエン酸生産実績のある *A.niger* 産業株でオクラトキシン A の生産は確認されておらず [61]、最大限安全側に推定した場合でも高々 27.4 ng/g であることから (成分規格の設定根拠の項で既述)、指定等要請者は、クエン酸生産実績のある *A.niger* 産業株由来のキチングルカンに *A.niger* 産業株由来オクラトキシン A は含まれないと考えられるのでキチングルカンを、オクラトキシン A 除去の目的でワインに 5g/L の濃度で使用したとしてもワイン中のオクラトキシン A は増加することはないと考える。

清澄化や重金属イオンの除去を目的とする場合は 1g/L 以下での使用が一般的な使用量と考えられる。ワインに 1g/L 使用した場合、キチングルカン 1 g あたりのオクラトキシン A 除去量は図 2 の近似曲線からキチングルカンを 5g/L 使用した場合の値 (0.48 µg/g) よりも大きい。このことから、清澄化や重金属イオンの除去を目的とする場合では生産菌株由来のオクラトキシン A の許容量は 5g/L 使用時よりも大きくなる。以上のことからいずれの使用目的におい

てもキチングルカンの使用によって対象食品のオクラトキシシン A が上昇する可能性は考えにくく、指定等要請者はキチングルカンを使用する事でオクラトキシシン A の一日最大摂取量は 1.75 ng/kg 体重/日よりもさらに減少すると考え、安全性に懸念はないと考える。

我が国においてオクラトキシシン A に関しては 2014 年 1 月に安全性の評価がなされている [54]。その中で 2004 年から 2009 年にかけてオクラトキシシン A の汚染実態調査結果より、オクラトキシシン A の基準値を設定しない場合又は基準値を 5 µg /kg と設定するシナリオを想定して、日本人におけるオクラトキシシン A のばく露量をモンテカルロ法を用いたシミュレーションにより推計されている [54]。本概要書における対象食品であるぶどう酒（ワイン）は年齢層別に食品摂取量を調査し、摂取量が全体の 1 %未満であったのでシミュレーションから除かれている。2014 年オクラトキシシン A 評価書で 20 歳以上のばく露量の算出が行われているが規制の有無に摂取量は左右されない（95 パーセンタイル値の 20 歳以上規制なし：upper bound は 1.49 ng/kg 体重/日、20 歳以上規制あり：upper bound は 1.49ng/kg 体重/日） [54]。これに先に計算したぶどう酒を好んで摂取し、国内流通ワインのオクラトキシシン A の最大値が含まれていた場合のぶどう酒からのオクラトキシシン A の摂取量である 1.75 ng/kg 体重/日をたすと 3.24 ng/kg 体重/日 (1.49 ng/kg 体重/日+1.75 ng/kg 体重/日) となる。これは TDI の 21.6%(3.24 ng/kg 体重/日÷15 ng/kg 体重/日×100)であり、安全性に懸念はない。

当該指定要請を行うキチングルカンは、OIV の規格 [3]によれば、食品及び医薬品市場で生産されるクエン酸の副産物とされていることから、指定等要請者はキチングルカンの基原菌株 *A.niger* は、クエン酸産生株であって、かつクエン酸産生推奨条件下で培養されるものと想定している。Frisvad ら (2011) の報告によると *A.niger* に分類される産業用株をクエン酸生産培地で生育させた場合、オクラトキシシン A の生産を示したのは酵素生産実績のある NRRL3122 株だけである (表 11) [61]。(表 11 では NRRL3122 株以外においてもオクラトキシシン A が検出されたが、CBS101705 はカナダの室内の空気由来の菌株で産業用に使用されていない。NRRL337 は NRRL の 2020 年のデータベースで *Aspergillus foetidus* に分類されているため [87]、本概要書で指定要請を行うキチングルカンの由来菌 *A.niger* とは異なる。) 指定等要請者は基原菌株 *A.niger* は、クエン酸産生株であって、かつクエン酸産生推奨条件下で培養されるものと想定しているため表 11 での該当菌株は NRRL 3、NRRL 567、NRRL 599、NRRL 350 である。いずれの菌株においてもオクラトキシシン A の生産は確認されていないことから [61]、指定等要請者はキチングルカンに *A.niger* 産業株由来オクラトキシシン A は含まれないと考えている。しかし、安全側に評価を行う視点から、(クエン酸生産実績のある産業用株ではないが) クエン酸生産培地中で最もオクラトキシシン A 生産量の多かった *A.niger* である NRRL3122 株が産生するオクラトキシシン A (4 ng/mL 菌糸体) の値をもって、*A.niger* 産業株が産生するオクラトキシシン A の量と仮定し、これが全量キチングルカンに移行、さらにはキチングルカンを使用したワインに移行し、除去もされないと仮定した場合のオクラトキシシン A の摂取量を推計した。詳しくは製造方法の項目に前述しているが、*A.niger* バイオマス 995g (水分含有量 71%) から 145g (乾燥) のキチングルカンが得られている [35]。バイオマスの密度は 1 g/mL を超えるものと容易に想像されるが、ここでは (安全側に評価する観点から) 密度が 1 g/mL と仮定し、この中のオクラト

キシシ A の濃度を 4 ng/mL (NRRL3122 株で生産されるオクラトキシシ A) とすると、得られるキチングルカンにおけるオクラトキシシ A の濃度は 27.4 ng/g となる (4 ng/mL×995g ÷ 1g/mL ÷ 145g)。使用基準案にある最大使用量である 5g/L を使用し、NRRL3122 株で生産されるオクラトキシシ A が全量キチングルカンに残存したと想定するとキチングルカンによってワイン中に増加するオクラトキシシ A は 137 ng/L (27.4 ng/g×5g/L) となる。本概要書における使用基準案において対象食品に全てのキチングルカンが残存した場合、ぶどう酒を好んで摂取する人のキチングルカンの摂取量は 246.5 mg/人/日である。(詳しい摂取量の計算式は 1 日の摂取量の推計の項目に記載) この値に食品安全委員会が定める食品健康影響評価に用いる平均体重である 55.1 kg で割ると 4.47 mg/kg 体重/日である [89]。ぶどう酒を好んで摂取する人のキチングルカンの摂取量 4.47 mg/kg 体重/日に、単純にキチングルカンにおけるオクラトキシシ A の濃度として求めた値 (27.4 ng/g) を乗ずると 0.12 ng/kg 体重/日 (27.4 ng/g×4.47 mg/kg 体重/日) である。これは TDI の 0.8 % (0.12 ng/kg 体重/日 ÷ 15 ng/kg 体重/日 × 100) であり、2014 年オクラトキシシ A 評価書の 20 歳以上のばく露量とぶどう酒を好んで摂取し、国内流通ワインのオクラトキシシ A の最大値が含まれていた場合のぶどう酒からのオクラトキシシ A の摂取量を全て合わせると 22.4 % {(0.12+3.24) ng/kg 体重/日 ÷ 15 ng/kg 体重/日 × 100} である。

なお実際にはキチングルカンのワインへの使用によりオクラトキシシ A は除去されるので、その効果もあわせて検証する。図 2 よりキチングルカン 5g/L を使用した場合、キチングルカン 1 g 当たり 0.48µg/L のオクラトキシシ A が除去されると推計できることから最大使用量ではおよそ 2.4µg/L のオクラトキシシ A が除去される。仮に国内流通ワインのオクラトキシシ A の最大値である 1.96µg/kg のワインにキチングルカンを最大使用量で処理すると、NRRL3122 株で生産されるオクラトキシシ A (4 ng/mL 菌糸体) が全量キチングルカンに残存したと想定した値である 137 ng/L がワインに追加されるが、キチングルカンによって 2.4µg/L のオクラトキシシ A が除去されたためワイン中のオクラトキシシ A は 0 µg/L {(1.96+0.137) µg/L - 2.4µg/L = -0.3µg/L} となる。

以上のことから、仮に国内流通ワインのオクラトキシシ A の最大値である 1.96µg/kg のワインにクエン酸生産培地でオクラトキシシ A の生産量が最大値であった *A.niger* の NRRL 3122 (酵素生産実績のある産業株) で生産されたオクラトキシシ A が全量キチングルカンに残存したと想定し、2014 年オクラトキシシ A 評価書の 20 歳以上のばく露量 (1.49 ng/kg 体重/日) と合わせた場合でも TDI の 22.4 % {(0.12+3.24) ng/kg 体重/日 ÷ 15 ng/kg 体重/日 × 100} であり、安全性に懸念はない。さらにキチングルカン製造における基原菌株 *A.niger* からオクラトキシシ A は産生よりもキチングルカンによって除去されるオクラトキシシ A の量の方が大きいため、対象食品からのオクラトキシシ A は更に減少するので安全性への懸念はより少なくなると指定等要請者は考えた。

これらのことからキチングルカン製造における基原菌株 *Aspergillus niger* の安全性において指定等要請者はキチングルカンに *A.niger* 産業株由来オクラトキシシ A は含まれず、仮に想定外の範囲外の酵素生産実績のあるクエン酸生産培地でオクラトキシシ A 生産量が最大である

A.niger 産業株のオクラトキシン A が全量対象食品に移行しかつ除去もされないとしても安全性に懸念はないと考えた。

フモニシンに関してはクエン酸産生培地においてクエン酸産生に使用される主な産業株からも産生が確認された (表 11)。我が国においてフモニシンに関しては 2017 年 9 月に安全性の評価がなされている [65]。食品安全委員会はフモニシン (B1、B2、B3) に関して単独もしくは合計で TDI を $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日と設定した。その上で 2004 年から 2015 年の国内に流通する市販食品のフモニシン汚染の結果から規制を検討した。規制値を設定する場合 (加工食品： $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、未加工品： $4000 \mu\text{g}/\text{kg}$) としない場合で 20 歳以上のばく露量の算出が行われているが規制の有無に摂取量は左右されないという結果が出ている。さらに高リスク消費者 (幼児と子供) においても TDI を下回っているため、規制値を設定しないとしている [65]。この報告書では基準値 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ より大幅に少なかったため、本概要書で指定要請するキチングルカンを使用するシミュレーションに用いたデータに、対象食品であるぶどう酒のデータは含まれていない。2016 年 3 月に食品安全委員会によるフモニシン B1、B2 及び B3 に関する食品等の汚染実態調査 [90] で市販されているブドウ果汁 25 点、ワイン 25 点から測定をした結果、ブドウ果汁からはフモニシン汚染は認められなかった。ワインからはフモニシン B1 が検出限界 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) 以上の測定値が検出できたのが 3 点、測定最大値が $2 \text{ ng}/\text{g}$ 、平均値が $0.20 \text{ ng}/\text{g}$ であり、B2 と B3 に関して汚染は認められなかった。ここで、この平均の測定値 ($0.20 \text{ ng}/\text{g}$) に本概要書におけるぶどう酒を好んで摂取する人の 1 日の摂取量 49.3 mL を乗じると 9.86 ng となり、この値を食品安全委員会が定める食品健康影響評価に用いる平均体重である 55.1 kg で除するとワインからのフモニシン一日摂取量は $0.18 \text{ ng}/\text{kg}$ 体重/日 ($9.86 \text{ ng} \div 55.1 \text{ kg}$) となる [89]。また、2017 年 9 月に安全性の評価によると 99 パーセントイル値の 20 歳以上規制なし：upper bound は $5.26 \text{ ng}/\text{kg}$ 体重/日、20 歳以上規制あり：upper bound は $5.28 \text{ ng}/\text{kg}$ 体重/日である [65]。それぞれに算出したワインからのフモニシンの一日摂取量 $0.18 \text{ ng}/\text{kg}$ 体重/日を加えると、20 歳以上規制なし：upper bound は $5.44 \text{ ng}/\text{kg}$ 体重/日、20 歳以上規制あり：upper bound は $5.46 \text{ ng}/\text{kg}$ 体重/日となる。以上のことからワインを計算に含めても規制の有無によりフモニシン摂取量は左右されないと考えた。また、本概要書で指定要請するキチングルカンは対象食品をぶどう酒とするためフモニシン高リスク消費者と考えられる幼児や子供が消費することはない。

また、*A. niger* のバイオマスに対し、水酸化ナトリウム等のアルカリを濃度 0.1~10(w/v)% として 4~30 時間作用させ、水で複数回洗浄するというキチングルカン製造方法 [35] から、フモニシン B1、B2 は水溶性 (B1： $20 \text{ g}/\text{L}$ [65]、B2： $25 \text{ g}/\text{L}$ [67]) であるので、水溶性画分に移行したフモニシン B1、B2 は製品には残らないと考えられる。製品中に生菌が残りフモニシン類の産生が行われる可能性に関しては規格基準に生菌数と真菌数を設けることで、我が国で流通している *A.niger* 由来の他の食品添加物と同程度の微生物限界を確保できると考察する。

Frisvad ら (2011) の報告で *A.niger* のクエン酸生産実績のある産業用株で最もフモニシン生産量の多かったのは NRRL567 株のフモニシン B2 ($3.4 \text{ mg}/\text{kg} \div 3352 \text{ ng}/\text{g}$) であり、Frisvad ら (2011) の報告の Table S3 に記載のある各フモニシン生産量の測定結果から、産業用株で総フモニシン量 (B2、B4 および B6) についても生産量が最も多いのは NRRL567 株である [61]。

仮にこれが全量キチングルカンに残ったとする場合の摂取量を推計した。本概要書における使用基準案において対象食品に全てのキチングルカンが残存した場合、ぶどう酒を好んで摂取する人のキチングルカンの摂取量は 246.5 mg/人/日である（詳しい摂取量の計算式は 1 日の摂取量の推計の項目に記載）。この値に食品安全委員会が定める食品健康影響評価に用いる平均体重である 55.1 kg で割ると 4.47 mg/kg 体重/日である [89]。フモニシン B1、B2 は水溶性（B1：20g/L [65]、B2：25 g/L [67]）であるので、製造工程中に複数回水で洗浄することでフモニシン B1、B2 は水溶性画分に移行し、製品としてのキチングルカンには残存しないと指定等要請者は考えているが、仮に産業用株 NRRL567 株（総フモニシン量についても生産量が最も多い）で生産されたフモニシンが全てキチングルカンに移行したとしてキチングルカンに含まれるフモニシン量を考えた。詳しくは製造方法の項目に記載しているが、*Aspergillus niger* バイオマス 995g（水分含有量 71%）から 145g（乾燥）のキチングルカンが得られている [35]。バイオマスの密度は 1 g/mL を超えるものと容易に想像されるが、ここでは（安全側に評価する観点から）密度が 1 g/mL と仮定すると、得られるキチングルカンにおけるフモニシン B2 の濃度は 23.3 mg/kg となる（ $3.4 \text{ mg/kg} \times 995 \text{ g} \div 1 \text{ g/mL} \div 145 \text{ g}$ ）。ぶどう酒を好んで摂取する人のキチングルカンの摂取量 4.47 mg/kg 体重/日に、単純にキチングルカンにおけるフモニシン B2 の濃度として求めた値（23.3 mg/kg）を乗ずると 0.1 μg /kg 体重/日（ $23.3 \text{ mg/kg} \times 4.47 \text{ mg/kg 体重/日}$ ）である。Frisvad ら（2011）の報告の中で NRRL567 では B1、B3 の生産は確認されず、B4 は B2 生産量の約 8 分の 1、B6 は約 200 分の 1 の生産が考えられると記載がある [61]。そこでキチングルカンからぶどう酒を通じて摂取される可能性があるその他のフモニシン量を B1、B3 を 0 μg /kg 体重/日、B4 を 0.01 μg /kg 体重/日（ $0.1 \mu\text{g}/\text{kg 体重/日} \div 8$ ）、0.5 ng/kg 体重/日（ $0.1 \mu\text{g}/\text{kg 体重/日} \div 200$ ）と考えた。キチングルカンからぶどう酒を通じて摂取される可能性がある総フモニシン量の最大値は 0.11 μg /kg 体重/日（ $0 + 0.1 + 0 + 0.01 + 0.0005$ ）と考えられる。これは 2017 年に食品安全委員会が設定した TDI の 5.5%（ $0.11 \mu\text{g}/\text{kg 体重/日} \div 2 \mu\text{g}/\text{kg 体重/日} \times 100$ ）であり、同報告で規制値を設定していない場合のばく露量 5.26ng/kg 体重/日（20 歳以上規制なし：upper bound）と合算しても TDI の 5.76%（ $(110 + 5.26) \text{ ng}/\text{kg 体重/日} \div 2000 \text{ ng}/\text{kg 体重/日} \times 100$ ）である。さらに、総フモニシンの推定最大摂取量 0.11 μg /kg 体重/日のうち 90.9%（ $0.1 \mu\text{g}/\text{kg 体重/日} \div 0.11 \mu\text{g}/\text{kg 体重/日} \times 100$ ）を占めるフモニシン B2 は水溶性であり、前述のとおりキチングルカンの製造工程にある複数回の水による洗浄で除去されると考えられるので推定最大摂取量は 0.01 μg /kg 体重/日（ $0.11 - 0.1$ ）と考えられる。これは 2017 年に食品安全委員会が設定した TDI の 0.5%（ $0.01 \mu\text{g} \div 2 \mu\text{g} \times 100$ ）であり、同報告で規制値を設定していない場合のばく露量 5.26ng/kg 体重/日（20 歳以上規制なし：upper bound）と合算しても TDI の 0.76%（ $(10 + 5.26) \text{ ng}/\text{kg 体重/日} \div 2000 \text{ ng}/\text{kg 体重/日} \times 100$ ）である。

これまでの計算から、水溶性のフモニシン B1、B2 がキチングルカンの製造において、水溶性画分に移行することなく製品に全て移行すると仮定した場合において、キチングルカン製造における基原菌株から懸念されるフモニシンの推定摂取量は最大値が残存した場合でも、TDI の 5.5% であり、2017 年に食品安全委員会が報告した 20 歳以上のばく露量と合算しても TDI の

5.76%であることから、実際のフモニシンの摂取量はこれよりもさらに低くなるため、安全性に懸念はないと指定等要請者は考えた。

その他 2017 年以降の産業用の基原菌株 *Aspergillus niger* に病原性及び毒素産生性に関する知見は確認されなかった[91]。

以上のことからキチングルカン製造を目的として適切に管理された基原菌株 *Aspergillus niger* については本概要書に記す、対象食品での使用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。

2. *A.niger* 由来のキチングルカンの体内動態試験

本項目において *A.niger* 由来のキチングルカンについての体内動態を検討するにあたり、指定等要請者は検討の対象とする物質について考えた。製造工程においては *A. niger* のバイオマスに対し、水酸化ナトリウム等のアルカリを濃度 0.1~10(w/v)%として 4~30 時間作用させ、水で複数回洗浄して、たんぱく質、脂質や色素が分解除去される [35]。その一方で、アルカリによってキチングルカンが構成成分である β -グルカン及びキチンに分解されるかは不明である。キチングルカンは食品中の安定性の項で記載したとおり、40%の NaOH と水に 1 時間 100°C で処理しても 97%以上が残存し、不溶性であることが 1979 年の Sietsma らの研究で示された [7] こと、分解、溶液化して解析するには、硝酸過酸化水素及び塩酸を混合した強酸とマイクロ波を組み合わせた過酷な条件によって分解する必要がある [3] ことから、製造後に一般的な保存条件で分解し、 β -グルカン及びキチンを放出することはないと考えられる。その一方で上記製造工程から不純物として β -グルカン及びキチンがキチングルカン製品に含まれる可能性を否定することはできないが、我が国においては、 β -グルカンを主成分としたアウレオオバシジウム培養液とキチンはいずれも既存添加物として長年利用されてきた物質である [30]。また、EFSA(2010)によれば、 β -グルカンは発酵により水素、二酸化炭素、メタン、揮発性脂肪酸といった無害な化合物が生じると予想される。その一方でキチンは発酵で分解されにくい性質があるため、糞便中にそのまま排泄されるとも予想されている [31]。これらのことから指定等要請者は β -グルカン及びキチンに関して体内動態において特段の懸念がないものと考えた。

さらに、キチングルカンは真菌の細胞壁に構成され [9]、きのこ類からの精製も報告される食品常在成分である [68] [69]。(独法) 国立健康・栄養研究所による平成 22 年度食品摂取頻度・摂取量調査報告において [70]、20 歳以上の国民の真菌(きのこ類⁴と酵母⁵)の 1 日の平均的な摂取量は 1 人あたり 16.357 g (マッシュルーム 0.299 g、酵母 0.011 g) である。酵母の細胞壁の

⁴ えのきたけ、えのきたけ (ゆで)、えのきたけ味付け缶詰、乾燥あらげきくらげ、乾燥あらげきくらげ (ゆで)、乾燥きくらげ、乾燥きくらげ (ゆで)、乾燥白きくらげ、乾燥白きくらげ (ゆで)、黒あわびたけ、生しいたけ、生しいたけ (ゆで)、干しいたけ、干しいたけ (ゆで)、はたけしめじ、ぶなしめじ、ぶなしめじ (ゆで)、本しめじ、たもぎたけ、なめこ、なめこ (ゆで)、なめこ水煮缶詰、ぬめりすぎたけ、うすひらたけ、エリンギ、ひらたけ、ひらたけ (ゆで)、まいたけ (舞茸)、舞茸 (ゆで)、乾燥まいたけ、マッシュルーム、マッシュルーム (ゆで)、マッシュルーム水煮缶詰、まつたけ (松茸)、まつたけ水煮缶詰、やなぎまつたけを含む。

⁵ 压榨パン酵母、乾燥パン酵母を含む。

重量は菌体の 20~25%であり [43]、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) からは 1kg のバイオマスから 200g、すなわち 20%のキチングルカン繊維を精製でき [68]、その他きのこ類の *Termitomyces albuminosus* (Berk.)では 13.46%のキチングルカンの収率となっていることから [69]、真菌の重量に対して 18 %⁶程度キチングルカンが含まれると指定等要請者は考えた。この値を使ってキチングルカンの 1 日の平均的な摂取量を下記のように推計した。

$$16.357 \text{ g} \times 0.18 = 2.94 \text{ g/人/日}$$

また、キチングルカンは最終製品として真菌の除去を行わないみそや米こうじなどにも含まれるが含まれる真菌重量を算出できなかったため、実際の摂取量はこの値よりも多くなる。

以上のことから製造工程においてキチングルカンの構成成分であるキチンと β -グルカンが含まれるかは不明であるが、キチングルカンが食品常在成分であり、 β -グルカンを主成分としたアウレオオバシジウム培養液とキチンはいずれも既存添加物であることから、本項ではキチングルカンの体内動態試験のみを考察することとした。

A.niger 由来のキチングルカンについての体内動態試験は見出すことができなかった [71] [72]。ただし、キチングルカンの経口毒性に関する試験は報告されており、Jonker ら(2010)の報告によると、基礎飼料に 0,1,5,10%キチングルカンを混合した飼料を Wistar ラット(各投与群雌雄 20 匹ずつ)に 13 週間与えた際の経口毒性を調査した結果、最大投与量の 10%においても、一般的な状態、外観、神経行動に関するエンドポイント、成長、食餌及び水の摂取量、検眼鏡検査、血液、臨床化学、尿検査、臓器重量及び病理学的所見のいずれにおいても悪影響は見られなかった。その際、経口ばく露後にキチンまたは β -グルカンが胃腸管内でキチングルカンコポリマーから放出されるかは明らかになっていないとしている [73]。この報告を受けて、FSANZ(2017)は、経口ばく露後にキチンまたは β -グルカンが胃腸管内でキチングルカンコポリマーから放出されるかは知られていないとした。その一方で、キチングルカンコポリマー自体及びキチンは、水に不溶性であるとも述べている。

さらに EFSA(2010) によれば、キチングルカンは不溶性で、ヒトの酵素で消化されることはそれほどない。不溶性繊維の消化は小腸では起こらない。したがって、大部分の消化管を通して結腸まで消化されずに達し、常在細菌叢により発酵されると推測している。なお、 β -グルカンは発酵により水素、二酸化炭素、メタン、揮発性脂肪酸といった無害な化合物が生じると予想される。その一方でキチンは発酵で分解されにくい性質があるため、糞便中にそのまま排泄されるとも予想されている [31]。結腸以後の動態については、Marzorati ら(2017)は培養系ヒト腸管モデル(SHIME)を用いてキチングルカンの大腸内における動態を検討し、キチングルカンの一部は大腸内で短鎖脂肪酸に発酵され、ヒトや腸内細菌のエネルギーとして使用されると考察している [74]。

⁶ 先に記述した収率の平均値(20+20+13.46)/3=17.8%を採用した。

キチングルカンは前述のとおりキチンと β -グルカンが強く結合し複合体を形成してできているが、キチンはグルコースの-ヒドロキシ基がアセチルアミノ基に置換された構造をもったN-アセチルグルコサミンが β -1,4-グリコシド結合を、 β -グルカンはグルコースが β -1,3-グリコシド結合をそれぞれ形成してできている [33][92]。また、これらに類似した構造をもっているのが、グルコースが β -1,4-グリコシド結合して形成してできているセルロースで、糖鎖間、糖鎖内で水素結合の安定なネットワークを形成している。そのため、セルロース加水分解酵素であるセルラーゼをもたないヒトを含む大部分の脊椎動物はセルロースを酸性の胃やアルカリ性の小腸といった消化管中で分解することができない[92]。このことからセルロースと同様の β -グリコシド結合を有するキチングルカンはヒト消化管中でも分解される可能性は低いものと考えられる。

以上のことから、指定等要請者は *A.niger* 由来のキチングルカンは EFSA や FSANZ が指摘するように不溶性繊維であり、消化酵素活性の観点からも結腸以前では消化・分解はおこらず、結腸まで消化されずに達するという考えを支持する。また、結腸以後は Marzorati らの報告から、他の不溶性食物繊維同様腸内細菌叢により一部発酵され、発酵産物はエネルギーとして使用されることが考えられることから、ヒトへ悪影響を及ぼす可能性は低いと結論付けた。その上で EFSA の考察にある発酵は「微生物が有機物からエネルギーを得る過程」であり、キチングルカンは β -グルカンとキチンに分解されることを指しているものではないととらえ、キチングルカンは体内で分解されずに糞便中に排泄されるものと考えた。また、*Schizophyllum commune* の細胞壁から抽出したキチングルカンは 40%の NaOH と水に 1 時間 100°C で処理しても 98.4% が残存し、不溶性であることが 1979 年の Sietsma らの研究で示された [7]。本概要書で指定要請するキチングルカンと抽出菌は異なるが、一般的に真菌の細胞壁はグルコース誘導体である N-アセチルグルコサミンが重合してできるキチンが主な成分でありそこに β -グルカンが強く結合し、複合体を形成しているものがキチングルカンである [5]。また、Sietsma らの研究の中で水に不溶であるがキチンを特異的に分解する酵素であるキチナーゼ処理を行ったところグルカンやグルコースが検出されたことから本概要書で指定要請するキチングルカンと同等品と考えられる [7]。さらに、キチングルカンは多くの溶媒に不溶性であることから、ワイン中でキチングルカンが分解される条件になるとは考えにくく、製造過程において加水分解による消化、水性媒体での精製等を経ることから *A.niger* 由来のキチングルカンは生体内で分解されず生物学的蓄積はないと考えられる。

3. *A.niger* 由来のキチングルカンの毒性試験

本項目において *A.niger* 由来のキチングルカンについての毒性を検討するにあたり、指定等要請者は検討の対象とする物質について考えた。前項 *A.niger* 由来のキチングルカンの体内動態試験に記載のとおり、キチングルカンは製造後に一般的な保存条件で分解し、構成成分である β -グルカン及びキチンを放出することはないと考えられる。その一方で製造方法から不純物として β -グルカン及びキチンがキチングルカン製品に含まれる可能性を否定することは

きないが、我が国においては、 β -グルカンを主成分としたアウレオオバシジウム培養液とキチンはいずれも既存添加物として長年利用されてきた物質である [30]。また、EFSA(2010)によれば、 β -グルカンは発酵により水素、二酸化炭素、メタン、揮発性脂肪酸といった無害な化合物が生じると予想される。その一方でキチンは発酵で分解されにくい性質があるため、糞便中にそのまま排泄されるとも予想されている [31]。これらのことから指定等要請者は β -グルカン及びキチンに関して毒性において特段の懸念がないものと考えた。

A.niger 由来のキチングルカンは体内動態試験に記載した通り、食品常在成分である。そこで「添加物に関する食品健康影響評価指針」に基づき、毒性試験の一部について省略し検討を行う事にした。

(1) 急性毒性試験

EFSA が引用している未公表資料によると、ラット (n = 6、性別不明) に 990～5000 mg/kg 体重のキチングルカンを単回経口投与した結果 LD₅₀値は 5000 mg/kg 体重以上と報告されている [31]。

(2) 反復投与毒性試験

1) ラットを用いた 28 日間経口投与毒性試験 (EFSA 2010)

EFSA が TNO (2009 年) の報告 (未公表) を引用しているので参考として記載する。雌雄のラット (匹数不明) に 0 (対照群)、1、5 及び 10% (0、0.8、4 及び 8 g/kg 体重/日) のキチングルカンを含む飼料を 28 日間経口投与した。

その結果、体重、摂餌量、臓器重量、血液及び血漿の生化学的検査項目に有意差は見られなかった。統計学的に有意な盲腸の拡張が、10%群の雄及び 5%及び 10%群の雌で認められた。大量の線維/難消化性炭水化物による盲腸の拡張は珍しくなく、毒性影響ではなく生理的反応であると考えられた。臓器に組織学的異常は観察されなかった。この試験から、キチングルカンは 10% (8 g/kg 体重/日) でも、毒性影響はないと結論付けられている [31]。

2) ラットを用いた 13 週間経口投与毒性試験

2010 年の Jonker らの報告によると [73]、雌雄各群各 20 匹の Wistar ラット (試験開始時おおよそ 6 週齢) にキチングルカンを下記の様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。なお、用量と雌雄でのキチングルカン摂取量の対応表 (表 12) は Jonker らの報告の Table 2 の記載を引用した。

表 12 13 週間試験投与量

用量設定	0 (対照群)、1、5、10%
キチングルカン摂取量 (g/kg 体重/日として換算 ⁷⁾)	雄：0、0.63、3.2、6.6 g/kg 体重/日 雌：0、0.68、3.4、7.0 g/kg 体重/日

その結果、臨床観察、機能観察および運動能の評価において、動物の外観、全身状態あるいは行動に被験物質と関連した影響はみられず、早期に死亡するラットもみられなかった。また、検眼鏡検査で投与と関連した変化は明らかにされなかった。

対照群とキチングルカン群との平均体重に統計学的有意差はなかったが、雌雄の10%群のラットでは対照群のラットより摂餌量がわずかに増加した。10%群での摂餌量の増加は対照群のエネルギー密度よりも低いエネルギー密度の食餌に対する反応であり、毒性学的意義はないとしている。飲水量は全ての用量レベルの雄及び5%および10%群の雌において増加したが、対照群と比べ統計的に有意ではなかった。

血液学的検査では、唯一雌の10%群において血小板数が統計学的に高値を示したが、背景データの範囲内であった。臨床化学的検査では、被験物質と関連した明らかな変化は見られなかった。尿検査では、雄の5および10%で尿pHの高値が観察されたが用量相関性がなく、偶発所見と考えられた。

臓器重量で、5%以上のキチングルカンを摂取した雄及び10%のキチングルカンを摂取した雌において充満した盲腸及び空の盲腸重量が統計学的に有意に増加したが、組織学的検査ではキチングルカン投与に起因した変化は明らかに出来なかった。盲腸の拡張は、消化または吸収が不十分な多量の炭水化物を含む飼料を摂取したラットの一般的な反応であり、毒性学的に懸念される変化とはみなさないとしている。その他の臓器重量に投与の影響はみられず、いずれの臓器においてもキチングルカンの投与に起因した肉眼的または顕微鏡的变化はなかった。但し、10%群の雄の下垂体でラトケ嚢遺残の発生率が統計学的に有意に増加した(対照群：0/20、10%群：5/20)。

しかし2001年のQuintanar-Stephanoらの報告によると、ラトケ嚢は頭蓋咽頭管の遺残で、背景病変としても認められている[75]。これを受けてJonkerらはラトケ嚢遺残の発生はキチングルカンの摂取とは関係ないと考察した。結論として、本試験

⁷ キチングルカン摂取量の推計方法は2010年のJonkerらの報告[73]には週ごとにグループ毎の平均体重と飼料摂取量から求めたと記載があるが詳しい計算式は不明である。そこでこの換算式の妥当性に関して以下のように考えた。

雄の10%群では平均飼料摂取量 21.6g/rat/日、20匹の平均体重0~28日： $(152+300) \div 2 = 226$ g、28~90日： $(300+426) \div 2 = 363$ g、と考えられる。この値から90日間の平均体重は $(226 \times 28 + 363 \times 62) \div 90 = 320.3$ gと考えられる。キチングルカン摂取量は $21.6 \times 0.1 \div 0.32 = 6.75$ g/kg 体重/日となり、はJonkerらの6.6 g/kg 体重/日と近似値であるので妥当性があると考えた。

は、*A.niger* 由来のキチングルカン を 10% (雄：6.6 g/kg 体重/日、雌：7.0 g/kg 体重/日) まで含有した飼料を 13 週間摂取してもラットに毒性学的影響が発現しないことを明らかにした [73]。

FSANZ は上記の試験結果を基に、10%のキチングルカン をラットに 13 週間混餌投与しても被験物質に起因した毒性影響はみられないと判断し、本試験における NOAEL を 10% (雄：6.6 g/kg 体重/日、雌：7.0 g/kg 体重/日) としている [33]。

3) ハムスターを用いた 13 週間経口投与毒性試験

2009 年の Berecochea-Lopez らの報告によると [93]、雄各群 12 匹の Syrian golden ハムスター (試験開始時、離乳期で体重 60~80 g) に高脂肪食 (コレステロール含有量 0.5% でラード 15%) と共にキチングルカン (0、21.4、42.8 g/kg 体重/日) を、12 週間混水強制経口投与する試験が実施されている。42.8 mg / kg 体重/日群では、給餌効率と体重増加はそれぞれ 35% と 30% 減少したが、21.4 mg / kg 体重/日群では有意な差は観察されなかった。投与期間終了時に血液検査を実施し、血漿総コレステロールを調べたところ、キチングルカンの投与量による HDL-C に影響を及ぼさなかったが血漿トリグリセリドは 21.4 mg / kg bw / 日では 20%、42.8 mg / kg bw / 日群では 39% 減少した。心臓の活性酸素生成を測定すると 42.8 mg / kg bw / 日群でのみ対照群と比較して 25% 減少した。大動脈脂肪線条蓄積 (AFSA) は 21.4 mg / kg bw / 日では 87%、42.8 mg / kg bw / 日群では 97% 減少した。さらに肝臓グルタチオンペルオキシダーゼ活性、スーパーオキシドジスムターゼ活性は 21.4 mg / kg bw / 日では 37%、7%、42.8 mg / kg bw / 日群では 120%、45% の増加が確認された。以上の事からキチングルカン を投与した場合、高脂肪食による大動脈コレステロールおよび大動脈脂肪線条の蓄積を大幅に減少させ、肝臓グルタチオンペルオキシダーゼ活性、スーパーオキシドジスムターゼ活性を増幅させる。以上の事から筆者らは高脂肪食でのキチングルカン を与えることで心血管および酸化ストレス保護効果が認められ、キチングルカンによる効果は有害ではなく有益であると考えた。

以上の報告を受けて FSANZ は 2017 年の報告で [33]、この研究は主に有効性を示すために設計されたが、シリアのゴールデンハムスターにおけるキチングルカンの NOAEL は 42.8 mg / kg 体重/日であると結論付けている。

これらのことから指定等要請者は 2009 年の Berecochea-Lopez らの報告で高脂肪食でのキチングルカンの有効性を示されているが、高脂肪食という特殊な条件での投与である事から NOAEL は設定できないと考えた。

○反復投与毒性試験のまとめ

A.niger 由来のキチングルカン を含有した飼料をラットに最高用量の 10% (雄：6.6 g/kg 体重/日、雌：7.0 g/kg 体重/日) に 13 週間経口投与した場合 [73]、最高用量の

10% (8.0 g/kg 体重/日) を 28 日間経口投与した場合 [31]両方で毒性学的影響が発現しないことを明らかになった。

FSANZ はラットを用いた 13 週間試験結果を基に、本試験における NOAEL を 10% (雄: 6.6 g/kg 体重/日、雌: 7.0 g/kg 体重/日) と判断しており [33]、EFSA はこの結果を受けて 6.6 g/kg 体重/日の使用は安全であると記載している。指定等要請者も本試験における NOAEL に関しては FSANZ を支持する。しかし、共に最高用量で毒性試験結果が得られていないことから *A.niger* 由来のキチングルカンの NOAEL はこれらを上回るものと判断した。

(3) 遺伝毒性試験

2010 年の EFSA の報告によると [31]、KiOnutrime-CG (登録商標) に類似すると報告されている被験物質 Chitin-glucan KiOfine について、細菌による復帰突然変異試験 (最高用量 2.5 mg/plate) が実施され、代謝活性化系の有無にかかわらず陰性の結果が得られたことを記載している。

関連物質として 1998 年の Chorvatovicova らの報告によると [76]、Carboxymethyl-chitin-glucan (CMCG) についての遺伝毒性試験成績があり、CMCG についてのマウス骨髄による小核試験 (24 時間毎に 3 回腹腔内投与、100 mg/kg 体重及び 200 mg/kg 体重) において陰性の結果が報告されている。

○遺伝毒性試験まとめ

A. niger 由来のキチングルカンに関する遺伝毒性試験成績は極めて限られている。2010 年の EFSA の報告では [31]、OECD ガイドライン 471 [77] に沿って細菌による復帰突然変異試験を行い陰性であった。このことから、キチングルカンには生体において特段問題となるような遺伝毒性はないと指定等要請者は判断した。

(4) 毒性試験まとめ

以上の結果からキチングルカンの毒性試験の結果をまとめる。キチングルカンに関する遺伝毒性試験成績は極めて限られているが陰性を示しており、キチングルカンには生体において特段問題となるような遺伝毒性はないものと判断される。

反復投与毒性試験では *A.niger* 由来のキチングルカンを含有した飼料をラットに 13 週間 [73]、または 28 日間 [31]最高用量の 10%を投与しても毒性学的影響が発現しないことが示された。そこで指定等要請者は FSANZ と同様にラットを用いた 13 週間試験結果を基に、本試験における NOAEL を 10% (6.6 g/kg 体重/日) と判断することとした [33]。しかし、*A. niger* 由来のキチングルカンの NOAEL は雌雄ともに最高用量であったため実際はこれ以上の値であると考えられる。

4. ヒトにおける知見

2017 年の FSANZ の報告 には以下のように記載がある [33]。2013 年の Bays らの報告によると [78]、*A. niger* 菌糸体に由来するキチングルカンの二重盲検プラセボ対照研究

として実施された。本研究は、地理的に異なる 3 個所で実施された。被験者は、病歴及び身体測定により一般に健康と見なされる者で、21 歳から 70 歳、体積指数 (body mass index: BMI) は 18.5~34.9 kg/m²、LDL-C の空腹時血清レベルは 3.37~4.92 mmol/L、サプリメントを 1 日 3 回、6 週間摂取することに同意する者とされた。除外基準は、糖尿病、がん、胃腸疾患、心血管疾患、妊娠、授乳、4 週間のスクリーニング期間中に脂質を変動させるような薬またはサプリメントの使用、期間中の体重の変動が 5% 以上、または線維または線維含有製品への過敏症または不寛容の者、とされた。被験者は、キチングルカン 4.5 g/日 (n=34)、1.5 g/日 (n=33)、1.5 g/日キチングルカンとオリーブ抽出物 135 mg/日 (n=3) またはプラセボとして米粉 (n=35) の 4 群のどれかにランダムに配分された。投与はカプセルを用いて行われ、毎食事前に水で 1 回に 3 カプセルずつ、1 日 3 回、6 週間カプセルを服用するよう指示された。試験前の血液検査では、TSH、血球数、妊娠試験及び空腹時血清脂質 (トリグリセリド、LDL-C、総コレステロール及び HDL-C) が測定された。被験者には、治療開始の 2 週間前から試験終了まで、維持食事規則に従うように求められた。研究中に他のサプリメントは使用されなかった。

試験開始時、第 4 週及び第 6 週での評価においては、体重、血圧、空腹時血清脂質、酸化 LDL、インスリン及び脂質過酸化や酸化ストレスの指標である尿中 F2-イソプロスタンを測定した。被験者は、有害事象、治療遵守及び食事遵守の状況についてインタビューを受けた。

6 週間のキチングルカン摂取の認容性は一般的に良好であった。一部の被験者では軽度から中等度の胃腸の愁訴を報告したが、その頻度は 3 摂取群のいずれもプラセボ対照群との間に有意差はなかった。キチングルカン 4.5 g/日を服用した被験者の 1 人は、逆流性胃腸炎 (gastroesophageal reflux disease) の悪化を報告し、キチングルカン及びオリーブ抽出物を服用した被験者の 1 人は、便通頻度 (bowel movement) の増加とガス過剰の 2 件の事象を報告した。心拍数、体重、血球像、血液化学、または収縮期血圧、及び拡張期血圧に有意な投与に関連した変化はなかった。4.5 g/日のキチングルカンの投与は、血清中の酸化 LDL をプラセボと比較して有意に減少させた。他の 2 つの用量は、血清中の酸化 LDL に有意な影響を及ぼさなかった。キチングルカンの補充は、総コレステロール、HDL-C、トリグリセリド、グルコース、及びインスリンの血清レベルに有意に影響を及ぼすことはなく、また尿中の F2-イソプロスタんに影響を及ぼさなかった [78]。

FSANZ はこの研究で報告された軽度から中等度の消化器障害は一定量の繊維を摂取した後によく見られることから有害作用ではないと考えられる。本研究は安全性あるいは忍容性の研究を意図したものではないが、4.5 g/日のキチングルカンは健康な被験者におけるいかなる副作用とも関連していないことがこの研究から結論づけることができると考察している [33]。

2010 年の EFSA の報告ではリエージュ大学で実施された 4.5 g/日のキチングルカンを健康な男性被験者 20 人に 4 週間与える未公開データが記載されている。評価書の中で EFSA は試験がランダム化か、盲検かについて記載がなく、プラセボの内容が不明であるため、信

頼性が低いと考察している [31]。また、同評価書で 2004 年の KitoZyme 社の Study Report からヒトにおけるパッチテストで「非感作性」を示したと記載がある [31]。

2017 年以降のキチングルカンのヒトにおける知見を確認することはできなかった [79]。

指定等要請者は FSANZ の 4.5 g/日のキチングルカンは健康な被験者におけるいかなる副作用とも関連していないことと EFSA のヒトにおいて「非感作性」であるという考察を支持する。

5. 一日摂取量の推計等

(1) 食品常在成分としての摂取量

添加分「キチングルカン」は我が国で未指定であるため、我が国における摂取量のデータはない。しかし、キチングルカンは真菌の細胞壁に含まれる食品常在成分である。体内動態試験の項目で述べたように 20 歳以上のキチングルカンの 1 日の平均摂取量は 2.94 g/人/日と考えられる。

(2) 対象食品由来の摂取量

今回申請しているキチングルカンは、使用基準としてぶどう酒の製造にあたり、キチングルカンとして、ぶどう酒の製造に用いる果汁及びぶどう酒にあっては 1 L につき 5 g 以下でなければならない。また、最終食品の完成前に除去しなくてはならない、ということ提案している。

仮にキチングルカンが上記最大使用量で使用され、そのすべてがぶどう酒に残存したと考えた場合我が国でのぶどう酒消費量から以下のようにキチングルカンの最大摂取量を推計した。

1. 酒税課税実績からのぶどう酒摂取量

酒税課税実績から我が国のぶどう酒摂取量を推計した。ぶどう酒はブドウ又はブドウ果汁を発酵させたアルコール飲料であるが、国内においては酒税法上、果実酒（果実を原料として発酵させたもの（アルコール分 20 度未満）、若しくは、果実、糖類を原料として発酵させたもの（アルコール分 15 度未満）と、甘味果実酒（果実酒に糖類、ブランデー、香味成分などを混和したもの、ポートワイン、シェリー、ベルモット、サングリアなど）の 2 種類に大別される（以下、果実酒と甘味果実酒を合わせて果実酒類と総称する。）。果実酒にはブドウのほかリンゴ、ナシなどの果実を原料とするものもあるが、ブドウを原料としたものが主である。甘味果実酒は、製法が異なる多品種のものが含まれるが、果実酒に比べ消費量は果実酒の 2~3%程度である。果実酒の国内消費量は近年増加、また、国内生産量も少しずつ増加してきたものの、消費量の約 7 割は外国からの輸入品である [80]。国税庁は、酒税法に基づき酒類の課税実績及び販売（消費）数量を調査・公表している。直近の平成 29 年分販売数量の資料に報告されている成人 1 人当たりの果実酒及び甘味果実酒の販売数量の全国総計から算定された成人 1 人、年間販売（消費）量は以下の通りである [81]。若干過大にはなるが、この数量をもってぶどう酒の年間飲酒量と見なすこととする。

果実酒 3.5 L; 甘味果実酒 0.1 L 果実酒類合計 3.6 L (成人人口 104.011 千人)

したがって、果実酒類由来のキチングルカンの平均 1 人一日摂取量は、キチングルカンの使用基準案最大値、5g/L より、下記の通りに推計した。

果実酒類 1 人一日飲酒量 9.86 mL ($3600 \div 365 = 9.86$)

キチングルカン

$5000 \text{ mg} / 1000 \text{ mL} \times 9.86 \text{ mL} = 49.3 \text{ mg} / \text{人} / \text{日}$

2. ぶどう酒を好んで摂取する場合の摂取量

ぶどう酒が特定の集団で好んで摂取され、摂取量に差が生じる可能性を考慮し、平成 29 年国民健康・栄養調査において、飲酒習慣のある者（週に 3 度以上、飲酒日 1 日あたり清酒換算で 1 合以上すると回答した者）の割合（20.0%）を成人人口にかけて計算した場合、当該対象者すべてがぶどう酒を摂取したと仮定した 1 人当たりのぶどう酒推定摂取量は 49.3mL/人/日と推計される [82] 単純にこの量にキチングルカンの最大使用量をかけた場合下記の式となる。

キチングルカン

$5000 \text{ mg} / 1000 \text{ mL} \times 49.3 \text{ mL} = 246.5 \text{ mg} / \text{人} / \text{日}$

3. 対象食品由来の摂取量のまとめ

ぶどう酒が特定の集団で好んで摂取される可能性を考慮し、飲酒習慣がある者から算出した 49.3mL/人/日をぶどう酒の推定摂取量とする。キチングルカンが上記最大使用量で使用され、そのすべてがぶどう酒に残存したと考えた場合、キチングルカンの推定摂取量は 246.5 mg/人/日となる。

(3). 1 日の摂取量のまとめ

対象食品であるぶどう酒からのキチングルカンの推定摂取量は 246.5 mg/人/日である。これは (1) の我が国において食品常在成分として 20 歳以上の国民が摂取しているキチングルカン (2.94 g/人/日) の 10% 以下である。加えて先に記述した通り、キチングルカンはろ過助剤であり、ワインに不溶であることから [25]、例えば酒石 (主成分は L-酒石酸水素カリウム) といった不溶物とともに、ワイン中で沈降する (「おり」と呼ばれる。)。おりは製品ワインに残存すると商品としての価値を損なうことから、製成後の各種ろ過工程において徹底的に除去される。キチングルカンの場合は添加後 1 晩以上静置した上清をデプスシート 6-15 μm 程度等でろ過後さらにデプスシート 1-7 μm 程度でろ過、瓶詰め前にも除菌フィルター等でろ過をする [11]。製品ワイン中に (キチングルカンを含む) おりが残存しないことは目視等で確認される [25]。以上のことから指定等要請者はキチングルカン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た。

IV. 海外添加物取り扱い社

- A) KiOnutrime-CG:Kitozym(Parc Industriel des Hauts Sarts Zone 2 Rue de Milmort, 680 4040 Herstal Belgium) [83]
- B) KTS CLEAR : MARTIN VIALATTE (79, av. A.A. Thévenet CS 11031 - 51530 MAGENTA - France) [84]

V. 参考文献

[1]	食品安全委員会, “欧州食品安全機関(EFSA)、新開発食品成分としての「キチン-グルカン」の安全性に関する科学的意見書を公表,” 30 7 2010. [オンライン]. Available: http://www.nihs.go.jp/hse/food-info/foodinfonews/2010/foodinfo201017c.pdf .
[2]	美容健康 EXPO, “キチングルカン KiOtransine® [コーシャー、ハラル対応素材],” セティ株式会社, 2019. [オンライン]. Available: https://www.e-expo.net/materials/015565/0139/index.html .
[3]	OIV, “INTERNATIONAL OENOLOGICAL CODEX-CHITIN-GLUCAN,” 2009. [オンライン]. Available: http://www.oiv.int/public/medias/4122/e-coei-1-chitgl.pdf .
[4]	厚生労働省, “第9版食品添加物公定書,” [オンライン]. Available: http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/kouteisho9e.html .
[5]	Michael T. Madigan, John M Martinko, Jack Parker, Black 微生物学, オーム社, 2003.
[6]	I. R. Johnston, “The composition of the cell wall of <i>Aspergillus niger</i> ,” <i>Biochem J.</i> , 1965.
[7]	J. H. SIETSMA AND J. G. H. WESSELS, “Evidence for Covalent Linkages between Chitin and g-Glucan in a Fungal Wall,” <i>Journal of General Microbiology</i> , 1979.
[8]	Aurélie BORNET ¹ and P.-L. TEISSEDRE, “Applications and interest of chitin, chitosan and their derivatives in enology,” See discussions, stats, and author profiles for this publication at, 2005.
[9]	Kulev, D. Negrutza, I., “CHITIN-GLUCAN COMPLEX - FOOD ADDITIVE WITH SORBENT PROPERTIES,” All-Russia Research Institute for Food Additives (former VNIIPAKK), 55, Liteyny Pr., 191014 St. Petersburg, Russia., 2015.
[10]	岩野 貞雄, “ワイン辞典,” 柴田書店, 1979.
[11]	山梨県ワイン酒造組合, 山梨県ワイン製造マニュアル 2016年版, 山梨県ワイン酒造組合, 2016.
[12]	Marchal R, Lallement A, Jeandet P, Establet G., “Clarification of Muscat musts using wheat proteins and the flotation technique.,” <i>J Agric Food Chem.</i> , 2003.
[13]	“KitoZyme wins OIV approval for animal, allergen free wine agents,” <i>NUTRA</i> , 6 9 2009 . [オンライン]. Available: https://www.nutraingredients.com/Article/2009/09/07/KitoZyme-wins-OIV-approval-for-animal-allergen-free-wine-agents .
[14]	OIV, “2.1.23 FINING USING CHITIN-GLUCAN (OIV-OENO 336B-2009),” OIV, 2009 .
[15]	OIV, “3.4.17. TREATMENT USING CHITIN-GLUCAN (OIV-OENO 338B/2009) ,” OIV, 2009.
[16]	A. Bornet · P. L. Teissedre, “Chitosan, chitin-glucan and chitin effects on minerals (iron, lead, cadmium) and organic (Ochratoxin A) contaminants in wines,” <i>Eur Food Res Technol</i> , 2008.

[17]	FAO/WHO Food Standards, “GSFA Online—FOOD ADDITIVE INDEX,” 2019. [オンライン]. Available: http://www.fao.org/gsfaonline/additives/index.html#C .
[18]	Official Journal of the European Union, “REGULATION (EU) No 1308/2013 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL,” 17 12 2013. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1535696899857&uri=CELEX:32013R1308 .
[19]	EC, “Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients,” 14 2 1997. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/1997/258/oj .
[20]	EC, “authorising the placing on the market of a chitin-glucan from <i>Aspergillus niger</i> as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council,” Official Journal of the European Union, 2011.
[21]	European Union, “COMMISSION REGULATION (EU) No 53/2011,” Official Journal of the European Union, 2011.
[22]	EU, “COMMISSION REGULATION (EC) No 2019/934,” 12 3 2019. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R0934&from=EN..
[23]	EU, “Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council (Text with EEA relevance),” 3 2012. [オンライン]. Available: https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/a42dd9b2-b63f-438b-a790-1fa5995b7d41/language-en..
[24]	Office of the Federal Register, “Electronic Code of Federal Regulations (CFR TITLE 21—Food and Drugs),” 8 1 2020. [オンライン]. Available: https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=3ee286332416f26a91d9e6d786a604ab&mc=true&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21tab_02.tpl .
[25]	FDA, “GRN No. 412,” FDA, 5 1 2012. [オンライン]. Available: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GrASNotices&id=412 .
[26]	Official Journal of the European Union, “AGREEMENT between the European Community and the United States of America on trade in wine,” 2006. [オンライン]. Available: http://ec.europa.eu/world/agreements/downloadFile.do?fullText=yes&treatyTransId=2541..
[27]	Australia government, “Australia New Zealand Food Standards Code - Standard 4.5.1 - Wine Production Requirements (Australia Only),” 2019. [オンライン]. Available: https://www.legislation.gov.au/Details/F2019C00225 .
[28]	Australia New Zealand, “Australia New Zealand Food Standards Code – Schedule 18 – Processing aids,” 27 10 2017. [オンライン]. Available: https://www.legislation.gov.au/Details/F2017C01002/Controls/ .

[29]	日本食品化学研究振興財団, “指定添加物リスト,” 2019. [オンライン]. Available: https://www.ffcr.or.jp/tenka/list/post-11.html#list_30 .
[30]	日本食品添加物協会技術委員会編, 既存添加物名簿取載品目リスト注解書, 日本食品添加物協会, 1999.
[31]	EFSA, “Scientific Opinion on the safety of “Chitin-Glucan” as a Novel Food ingredient.,” 2010. [オンライン]. Available: https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1687 .
[32]	FSANZ, “ Processing Aids in Wine. Approval report – Application A1127. 21 August 2017.,” 21 8 2017. [オンライン]. Available: http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/A1127-ProcessingAidsForWine.aspx .
[33]	FSANZ, “Processing Aids in Wine. Supporting document 1: Risk and technical assessment – Application A1127. 26 April 2017.,” 26 4 2017. [オンライン]. Available: http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/A1127-ProcessingAidsForWine.aspx .
[34]	食品安全委員会:, “ 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,” 1 2014 . [オンライン]. Available: http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20120927657 .
[35]	WIPO, “(WO2003068824) CELL WALL DERIVATIVES FROM BIOMASS AND PREPARATION THEREOF,” 2003. [オンライン]. Available: https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2003068824 .
[36]	「日本人の食事摂取基準」策定検討会, “日本人の食事摂取基準（2020 年版）,” 12 2019. [オンライン]. Available: https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586553.pdf . [アクセス日: 1 2020].
[37]	食品安全委員会, “魚介類に含まれるメチル水銀について,” 7 2004. [オンライン]. Available: http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-hyouka-methylmercury.pdf . [アクセス日: 1 2020].
[38]	薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会, “食品中のカドミウムの規格基準の一部改正について,” 10 2009. [オンライン]. Available: https://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/cadmium/pdf/mcadmium01.pdf . [アクセス日: 1 2020].
[39]	食品安全委員会, “クロム,” 17 6 2013. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/130617_chromium.pdf . [アクセス日: 10 2019].
[40]	EC, “COMMISSION REGULATION (EC) No 123/2005,” 26 7 2005. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R0123&qid=1570768500838&from=EN . [アクセス日: 2 0 1 9].
[41]	食品安全委員会, “オクラトキシン A,” 2011. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/sonota/hazard/kabi_1.pdf .
[42]	日本醸造協会, 醸造物の成分, 新日本印刷株式会社, 1999.
[43]	I. Hornsey, The chemistry and biology of winemaking, RSC, 2007.

[44]	Mikael R Andersen, Linda Lehmann, and Jens Nielsen corresponding author, “Systemic analysis of the response of <i>Aspergillus niger</i> to ambient pH,” <i>Genome Biol.</i> , 2009.
[45]	R. EDER, A. SCHREINER, G. SCHLAGER, S. WENDELIN, “Metal reduction of wines,” <i>Bull. OIV (Off. Int. Vigne Vin)</i> 76, 243-260., 2003.
[46]	田村 隆幸, “ワイン中の鉄は, 魚介類とワインの組み合わせにおける不快な生臭み発生の一因である,” <i>日本醸造協会誌</i> , 2010.
[47]	P. Ribéreau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, D. Dubourdieu, Christine Rychlewski, <i>Handbook of Enology: The Chemistry of Wine</i> , John Wiley & Sons Ltd., 2006.
[48]	J. E. C. A. E. B. L. N. S. Juan Cacho, “Iron, Copper, and Manganese Influence on Wine Oxidation,” <i>Am J Enol Vitic</i> , 1995.
[49]	ワイン学編集委員会, <i>ワイン学</i> , 産調出版, 1991.
[50]	Australian Wine Research Institute, “The Australian Wine Research Institute—FINING AGENTS,” [オンライン]. Available: https://www.awri.com.au/industry_support/winemaking_resources/frequently_asked_questions/fining_agents/ . [アクセス日: 1 2020].
[51]	Se-Kwon Kim, <i>Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications</i> , CRC Press, 2011.
[52]	本山 聖子, 小山 典子, “オクラトキシン A のリスク評価,” 2016. [オンライン]. Available: https://www.jstage.jst.go.jp/article/myco/66/1/66_31/_pdf/-char/ja .
[53]	IARC, “IAC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS,” 1993. [オンライン]. Available: https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono56.pdf . [アクセス日: 10 2019].
[54]	食品安全委員会, “かび毒評価書 オクラトキシン A,” 1 2014. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya200903190ks . [アクセス日: 10 2019].
[55]	堀井幸江・橋口知一・伊木由香理・須藤茂俊, “LC/MS/MS による国産ワイン中のオクラトキシン A の分析,” <i>J. ASEV Jpn.</i> , Vol. 21, No. 1, 3-7, 2010.
[56]	国立感染症研究所, “: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 BSL 分類等」.,” 6 2010. [オンライン]. Available: http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/Kanrikitei3_1006_1.pdf#search=%27%E5%9B%BD%E7%AB%8B%E6%84%9F%E6%9F%93%E7%97%87%E7%A0%94%E7%A9%B6%E6%89%80%E7%97%85%E5%8E%9F%E4%BD%93%27 .
[57]	Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW, “ On the safety of <i>Aspergillus niger</i> - a review,” <i>Appl Microbiol Biotechnol</i> , 2002; 59(4-5): 426-435..
[58]	Frisvad JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane U., “Fumonisin B2 production by <i>Aspergillus niger</i> .,” <i>J Agric Food Chem.</i> , 2007.
[59]	EC, “COMMISSION REGULATION (EC) No 1126/2007,” 28 9 2007. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1126&from=EN . [アクセス日: 4 2020].

[60]	Nyiredy I, Etter L, Fesus I and Mayer G, “The fate of mould "spores" in the digestive tract of chicks.,” <i>Acta Vet Acad Sci Hung</i> , 1975; 25: 123-8.
[61]	Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Meijer M, Varga J, Samson RA , “Fumonisin and ochratoxin production in industrial <i>Aspergillus niger</i> strains.,” <i>PLoS One</i> , 2011.
[62]	Pel HJ, de Wintle JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ et al, “Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory <i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88.,” <i>Nat Biotechnol</i> , 2007.
[63]	FDA, “GRAS Notice No. GRN 000089,” 3 4 2002. [オンライン]. Available: https://wayback.archive-it.org/7993/20171031032622/https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm154613.htm .
[64]	高鳥浩介. 相原真紀・小西良子, “食品危害真菌とマイコトキシン規制の現状と今後,” <i>Bull. Natl. Inst. Health Sci.</i> , 124, 21-29, 2006.
[65]	食品安全委員会, “フモニシン,” 9 2017. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20170926001 . [アクセス日: 4 2020].
[66]	食品安全委員会, “総アフラトキシン,” 3 2009. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20080903001 . [アクセス日: 2020].
[67]	サンタクルーズバイオテクノロジー, “Fumonisin B2 (CAS 116355-84-1),” サンタクルーズバイオテクノロジー, [オンライン]. Available: https://www.scbt.com/p/fumonisin-b2-116355-84-1 . [アクセス日: 4 2020].
[68]	Nawawi WMFW, Lee KY, Kontturi E, Bismarck A, Mautner A , “Surface properties of chitin-glucan nanopapers from <i>Agaricus bisporus</i> .,” <i>Int J Biol Macromol</i> , 2020.
[69]	Hong Y and Ying T, “Characterization of a chitin-glucan complex from the fruiting body of <i>Termitomyces albuminosus</i> (Berk.) Heim.,” <i>Int J Biol Macromol.</i> , 2019.
[70]	独立行政法人 国立健康・栄養研究所, “食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務報告書追加資料,” 独立行政法人 国立健康・栄養研究所, 平成 22 年.
[71]	PubMed, “Chitin Glucan 安全性関連文献検索 - PubMed,” 22 10 2018. [オンライン]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed .
[72]	Toxline, “Chitin Glucan 安全性関連文献検索 - Toxline,” [オンライン]. Available: https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2 . [アクセス日: 24 10 2018].
[73]	Jonker D, Kuper CF, Maquet V, Nollevaux G, Gautier S, “ Subchronic (13-week) oral toxicity study in rats with fungal chitin-glucan from <i>Aspergillus niger</i> ,” <i>Food and Chemical Toxicology</i> , 2010; 48: 2695-2701..
[74]	Marzorati.M, Maquet.V, Possemiers.S, <i>Journal of Functional Foods</i> , 2017.
[75]	Quintanar-Stephano A, Muñoz Fernández L, Quintanar JL, Kovacs K, “ Cysts in the rat adenohypophysis: incidence and histology.,” <i>Endocr Pathol</i> , 2001; 12(1): 63-71..

[76]	Chorvatovicova D, Machova E, Sandula J, “Ultrasonication: the way to achieve antimutagenic effect of carboxymethyl-chitin-glucan by oral administration,” Mutation Research ; 412: 83-89., 1998.
[77]	OECD, “経済協力開発機構（OECD）の化学物質の試験に関するガイドライン 471,” 7 1997. [オンライン]. Available: http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/tgj/tg471j.pdf . [アクセス日: 1 2020].
[78]	Bays HE, Evans JL, Maki KC, Maquet V, Cooper R, Anderson JW, “ Chitin-glucan fiber effects on oxidised low-density lipoprotein: a randomized controlled trial,” European Journal of Clinical Nutrition , 2013; 67: 2-7..
[79]	NCBI, “PUBMED,” NCBI, [オンライン]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ . [アクセス日: 1 2020].
[80]	国税庁, “国税庁平成 29 年度分酒税課税実績等の状況表 第 1、2、4 表,” [オンライン]. Available: https://www.nta.go.jp/taxes/sake/tokei/kazeikankei2017/01.htm .
[81]	国税庁, “国税庁平成 29 年度分酒類販売（消費）数量等の状況表,” [オンライン]. Available: https://www.nta.go.jp/taxes/sake/tokei/kazeikankei2017/01.htm .
[82]	厚生労働省, “平成 29 年国民健康・栄養調査報告,” 厚生労働省, 2018.
[83]	Kitozym, “Vegetal Chitin-glucan,” Kitozym, [オンライン]. Available: https://www.kitozyme.com/en/ingredients/chitin-glucan/ . [アクセス日: 11 10 2019].
[84]	MARTIN VIALATTE, “KTS CLEAR,” MARTIN VIALATTE, [オンライン]. Available: https://www.martinvialatte.com/en/produit/kts-clear/ . [アクセス日: 26 9 2019].
[85]	EC, “Regulation (EC) No 606/2009 of 10 July 2009 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions” 17 8 2018. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02009R0606-20180303
[86]	EU, “2011/751/EU: Commission Implementing Decision of 13 September 2011 on the notification of a proposal for amendment to the Annexes to the EC-US Agreement on trade in wine” 24 11 2011. [オンライン]. Available: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1590461966299&uri=CELEX:32011D0751
[87]	ARS (NRRL) Culture Collection “Online Catalog,” [オンライン]. Available: https://nrml.ncaur.usda.gov/cgi-bin/usda/index.html . [アクセス日: 21 05 2020].
[88]	厚生労働省, “薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品規格部会資料,” 21 10 2014. [オンライン]. Available: https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000062010.html
[89]	食品安全委員会, “食品健康影響評価に用いる平均体重の変更について,” 31 3 2014. [オンライン]. Available: https://www.fsc.go.jp/iinkai/heikintaijyu_260331.pdf .
[90]	一般財団法人日本食品分析センター, “ フモニシンに係る食品健康影響評価に関する調査,” 食品安全委員会, 2016.
[91]	NCBI, “PUBMED,” NCBI, [オンライン]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ . [アクセス日: 5 2020].

[92]	Albert L. Lehninger, David L. Nelson, Michael M. Cox, 第2版 レーニンジャーの生化学, 1993.
[93]	Arlet Berecochea-Lopez , Kelly Decordé, Emilie Ventura, Marlène Godard, Aurélie Bornet, Pierre-Louis Teissèdre, Jean-Paul Cristol, Jean-Max Rouanet. “Fungal Chitin-Glucan From <i>Aspergillus Niger</i> Efficiently Reduces Aortic Fatty Streak Accumulation in the High-Fat Fed Hamster, an Animal Model of Nutritionally Induced Atherosclerosis,” <i>EJ Agric Food Chem.</i> 2009 Feb 11;57(3)
[94]	OIV, “COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS - OIV Ochratoxin A” 2011. [オンライン]. Available: http://www.oiv.int/public/medias/2539/oiv-ma-as315-10.pdf . [アクセス日: 2020].
[95]	OIV, “RESOLUTION OIV-OENO 578-2017,” 2017. [オンライン]. Available: http://www.oiv.int/public/medias/5372/oiv-oeno-578-2017-en.pdf . [アクセス日: 2020]