

## 遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

## 1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められたカイマックス M (CHY-MAX M) に係る食品健康影響評価（平成 29 年 3 月 7 日付け生食 0307 第 1 号）については、平成 30 年 10 月 26 日に開催された第 179 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

## 2. カイマックス M (CHY-MAX M) に係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

## 1) 募集期間

平成 30 年 12 月 4 日（火）開催の食品安全委員会（第 723 回会合）の翌日の平成 30 年 12 月 5 日（水）から平成 31 年 1 月 3 日（木）までの 30 日間。

## 2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

## 3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

カイマックス M (CHY-MAX M)

2018年12月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## 目 次

	頁
<審議の経緯> .....	3
<食品安全委員会委員名簿> .....	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿> .....	3
要 約 .....	4
I. 評価対象添加物の概要 .....	5
II. 食品健康影響評価 .....	5
第 1. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺 伝子組換え添加物及び組換え体との相違 .....	5
1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料 .....	5
2. 宿主及び導入 DNA .....	6
3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料 .....	6
4. 宿主の構成成分等に関する資料 .....	6
5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料 .....	6
6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物 及び組換え体と宿主等の相違点 .....	7
第 2. 宿主に関する事項 .....	8
1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項 .....	8
2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項 .....	8
3. 寄生性及び定着性に関する事項 .....	8
4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項 ...	8
5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項 .....	8
第 3. ベクターに関する事項 .....	8
1. 名称及び由来に関する事項 .....	8
2. 性質に関する事項 .....	8
第 4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項 .....	9
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項 .....	9
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項 .....	9
3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事 項 .....	11
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項 .....	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項 .....	11
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項 .....	12
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項 .....	12
第 5. 組換え体に関する事項 .....	12
1. 宿主との差異に関する事項 .....	12
2. 遺伝子導入に関する事項 .....	13

第6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項 .....	13
1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること .....	13
2. 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること .....	13
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項 .....	13
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項 .....	13
2. 組換え体の残存に関する事項 .....	13
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項 .....	13
4. 精製方法及びその効果に関する事項 .....	14
5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項 .....	14
第8. 第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項 .....	14
Ⅲ. 食品健康影響評価結果 .....	14
<参照> .....	15

### <審議の経緯>

2017年3月7日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0307第1号）、関係書類の接受

2017年3月14日 第642回食品安全委員会（要請事項説明）

2017年3月27日 第158回遺伝子組換え食品等専門調査会

2018年10月26日 第179回遺伝子組換え食品等専門調査会

2018年12月4日 第723回食品安全委員会（報告）

### <食品安全委員会委員名簿>

（2018年6月30日まで）

佐藤 洋（委員長）

山添 康（委員長代理）

吉田 緑

山本 茂貴

石井 克枝

堀口 逸子

村田 容常

（2018年7月1日から）

佐藤 洋（委員長）

山本 茂貴（委員長代理）

川西 徹

吉田 緑

香西 みどり

堀口 逸子

吉田 充

### <食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

（2017年9月30日まで）

澤田 純一（座長）

小関 良宏（座長代理）

岡田 由美子      中島 春紫

橘田 和美      樋口 恭子

児玉 浩明      飯 哲夫

近藤 一成      山川 隆

柘植 郁哉      和久井 信

手島 玲子

（2017年10月1日から）

中島 春紫（座長）

小関 良宏（座長代理）

児玉 浩明（座長代理）

岡田 由美子      手島 玲子

橘田 和美      樋口 恭子

近藤 一成      山川 隆

鈴木 秀幸      吉川 信幸

柘植 郁哉

## 要 約

「カイマックス M (CHY-MAX M)」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus luchuensis* CBS 108914 株を宿主として、ヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*) 由来のプロキモシン遺伝子を導入し作製された *A. luchuensis* CBS 125278 株を利用して生産されたキモシンである。本添加物は、ミルクの主なタンパク質であるカゼインの特定部位を切断して疎水的カゼインミセルを形成させ、ミルクを凝集させるプロテアーゼであり、主にチーズ製造に使用される酵素である。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」(平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定)に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、遺伝子の導入後の塩基配列の解析等について確認した結果、従来の添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「カイマックス M (CHY-MAX M)」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

## I. 評価対象添加物の概要

品 目：カイマックス M (CHY-MAX M)

用 途：チーズ製造

申請者：株式会社 野澤組カルチャー

開発者：Chr. Hansen A/S (デンマーク)

本添加物は、*A. luchuensis* CBS 108914 株を宿主として、ヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*) 由来のプロキモシン遺伝子を導入して作製された *A. luchuensis* CBS 125278 株を利用して生産されたキモシンである。本添加物は、ミルクの主なタンパク質であるカゼインの特定部位を切断して疎水的カゼインミセルを形成させ、ミルクを凝集させるプロテアーゼであり、主にチーズ製造に使用される。

なお、本生産菌には、選択マーカーとして *Neurospora crassa* 由来のウリジン産生遺伝子が導入されている。

## II. 食品健康影響評価

### 第 1. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

#### 1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

##### (1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称 : レンネット

基 原 : 反すう動物の第 4 胃

有効成分 : キモシン

IUB No. : EC 3. 4. 23. 4

CAS No. : 9001-98-3

##### (2) 製造方法

従来品として、反すう動物の第 4 胃から抽出されたもの及び酵母菌等の培養により抽出されたものがある。仔牛由来のウシキモシンは、*A. luchuensis* にウシプロキモシン遺伝子を導入した生産菌を培養した後、酸の添加、除菌及び精製を経て製造される。

##### (3) 用途及び使用形態

レンネットは、液状として原料乳に添加される。レンネットの有効成分であるウシキモシンは、1mg 当たり 460 IMCU<sup>a</sup>であり、1 リットルの牛乳当たり 20~50 IMCU (最大 0.11mg) が添加される。

---

<sup>a</sup> 国際凝乳単位 : International Milk Clotting Units

#### (4) 摂取量

原料牛乳からのチーズの収量を 10% とすると、ウシキモシンは水溶性であるため水分含量の多い (約 60%) チーズの場合、6% の酵素がチーズに移行する。したがって熟成を終了したチーズ 1 kg 当たりのレンネット含有量は、キモシンに換算すると最大 0.067 mg となる。

日本人一人当たりのチーズ消費量は、約 6.5 g/日と算出されるため (参照 1)、一日当たりのキモシン摂取量は約 0.4 µg である。

## 2. 宿主及び導入 DNA

### (1) 宿主の種名 (学名)、株名等及び由来

宿主は、*A. luchuensis* CBS 108914 株である。本株は、2003 年に遺伝子組換え添加物として安全性審査が終了したカイマックスの生産株から挿入 DNA が除去され、更に突然変異によりプロテアーゼ低産生となった株である。

### (2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ラクダプロキモシン (*camel-Chy*) 遺伝子の供与体は、18 か月齢のヒトコブラクダ (*C. dromedarius*) である。

選択マーカーとして用いたウリジン産生 (*pyr4*) 遺伝子の供与体は *N. crassa* である。

### (3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

*camel-Chy* 遺伝子は、プロキモシンをコードする。*camel-Chy* 遺伝子は、プロキモシンの生合成及び分泌を促進するため、宿主のグルコアミラーゼ (*glaA*) 遺伝子と結合させており、融合タンパクとして発現させた後、低 pH 条件において、活性ラクダキモシンが分離される (参照 2、3)。

*pyr4* 遺伝子は、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼを発現し、選択マーカーとして働く。

導入 DNA 断片は宿主ゲノムの *glaA* 遺伝子のプロモーター領域に相同組換えにより導入した。

## 3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

*A. luchuensis* CBS 108914 株は、酵素製造に利用経験があり、長期にわたり安全に使用されている。

## 4. 宿主の構成成分等に関する資料

*A. luchuensis* は、GRAS に掲載されており、非病原性で毒性がないことが知られている。

## 5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

### (1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は以下のとおりである。

製品名：カイマックス M

有効成分：キモシン

IUB No. : EC 3. 4. 23. 4

CAS No. : 9001-98-3

## (2) 製造方法

カイマックス M は、CBS 125278 株を生産菌として製造される。製造方法は従来の添加物と同様であり、培養工程、回収・精製工程及び製剤化工程を経て製造される。生産菌は、不活性化した後、ろ過により、除去される。

## (3) 用途及び使用形態

カイマックス M は、従来の添加物と同様に、凝乳酵素としてチーズの製造に使用される。水に溶解し、適切な温度及び pH に調整され、原料乳に添加される。

## (4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

カイマックス M は、従来の添加物と比較して、乳凝固に必須である  $\kappa$ -カゼインの特定部位のアミノ酸結合を特異的に分解する活性が高い。したがって、原料乳量当たりのチーズ収量が高く、非特異的なランダム分解が生じにくいため、苦味ペプチドが少ない（参照 2）。

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

### (1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

従来の添加物とカイマックス M の相違点は、遺伝子の供与体が異なる点である。両添加物とも 323 アミノ酸残基から構成されているが、アミノ酸の相同性は 85% である。また、カイマックス M の凝乳活性は、ウシキモシンの 1.7 倍であること、非特異的なランダム分解が生じにくいため苦味ペプチドが産生されにくく、チーズの歩留まりが高いという相違点もある。

### (2) 組換え体と宿主

ラクダキモシンの生産株と宿主の相違点は、生産菌には *glaA* 遺伝子、*camel-Chy* 遺伝子及び *pyr4* 遺伝子が導入されている点である。

以上 1.~6. から、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、第 2 以下の各事項について評価を行った。

## 第2. 宿主に関する事項

### 1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は、*A. luchuensis* CBS 108914 株である。

### 2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

*A. luchuensis* CBS 108914 株は長年にわたり食用酵素の生産菌として安全に使用されており、GRAS に掲載されている。本宿主菌株については、カイマックス M の生産条件下では、オクラトキシン A 並びにフモニシン B<sub>1</sub> 及び B<sub>2</sub> の産生が検出限界以下であることが示されている（参照 4）。

### 3. 寄生性及び定着性に関する事項

*A. luchuensis* には、寄生性及び定着性があることを示唆する事実は認められていない。

### 4. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

*A. luchuensis* には、病原性の外来因子の存在を示唆する事実は認められていない。

### 5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

*A. niger* の一部の菌株に、オクラトキシン A 及びフモニシン B<sub>2</sub> の産生が報告されている（参照 5、6）。本生産菌はオクラトキシン A を産生しないことが確認されている（参照 7）。

## 第3. ベクターに関する事項

### 1. 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクター pCCEx3 は、プラスミド pGAMpR 及び pBluescriptII SK+ を基に作製された。なお、プラスミド pGAMpR はウシプロキモシン遺伝子を含み、2003 年に遺伝子組換え添加物として安全性審査が終了したウシキモシン（製品名：カイマックス）の生産に用いられた導入用ベクターである。

### 2. 性質に関する事項

#### (1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pGAMpR 及び pBluescriptII SK+ の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 8）。

#### (2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pGAMpR 及び pBluescriptII SK+ の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

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

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pGAMpR 及び pBluescriptII SK+はアンピシリン耐性遺伝子を含むが、宿主へ導入されない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pGAMpR 及び pBluescriptII SK+には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pGAMpR 及び pBluescriptII SK+は大腸菌及びその近縁種のみを宿主とする。

#### 第4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

##### 1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

camel-*Chy* 遺伝子の供与体は、18 か月齢のヒトコブラクダ (*C. dromedarius*) である。選択マーカーである *pyr4* 遺伝子の供与体は、*N. crassa* である。

(2) 安全性に関する事項

ヒトコブラクダ (*C. dromedarius*) は中東及び西アフリカの一部において、飲用乳、発酵乳、チーズ及び食肉などに利用されてきた経験がある。

*N. crassa* は、日和見性病原菌とされているが、カイマックス M では選択マーカーとしてウリジン産生遺伝子のみを用いているため、安全性に問題はないと考えられる。

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

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

18 か月齢のラクダ第4胃の上皮細胞から mRNA を分離し、camel-*Chy* 遺伝子をクローニングした。

*pyr4* 遺伝子は、プラスミド pGAMpR にクローニングされている遺伝子を用いた（参照 9）。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用 DNA 断片の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 10）。

### (3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

#### ① camel-*Chy* 遺伝子

ラクダキモシンは、 $\kappa$ -カゼインの特定部位を切断するプロテアーゼで、乳を凝固させる。

camel-*Chy* 遺伝子が発現するラクダプロキモシンは、*A. luchuensis* 由来の *glaA* 遺伝子がコードするグルコアミラーゼの C-末端と結合した融合タンパク質として産出される。その後、低 pH 条件下で、グルコアミラーゼ及びプロ配列の連結したタンパク質並びに活性ラクダキモシンが分離される。

##### a. 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

ヒトコブラクダ (*C. dromedarius*) は第4-1-(2)の経緯から、アレルギー誘発性の報告はない。

##### b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

カイマックス M は、既に米国、カナダ、フランス及びデンマークで使用されており、これまでにアレルギー誘発性を示唆する報告はない。

##### c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

###### (a) 人工胃液に対する感受性

カイマックス M の人工胃液中での消化性について確認するために SDS-PAGE 分析を行った結果、試験開始後 120 分以内に分解され、約 10 kDa のポリペプチドを生じることが示された。

###### (b) 人工腸液に対する感受性

カイマックス M の人工腸液中での消化性について確認するために SDS-PAGE 分析を行った結果、試験開始後 120 分以内に分解された。

##### d. 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

カイマックス M と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース<sup>b</sup>を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして、ペプシン A 及び aspartyl endopeptidase が検出されたが、これらの配列にはエピトープとしての報告はない<sup>c</sup>。また、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35% 以上の相同性を示す既知のアレルゲンとしてペプシン A 及び aspartyl endopeptidase を含め 6 個のタンパク質が検出された。これらはいずれも、ウシキモシンとも同等の相同性を示しているが、ウシキモシンに起因するアレルギー誘発性を示す報告はない。

#### ② *pyr4* 遺伝子

<sup>b</sup> ネブラスカリンカーン大学により公開されているデータベース :

<http://www.allergenonline.org.version 15> (検索日 : 2017 年 2 月 21 日)

<sup>c</sup> Allergen Database for Food Safety (ADFS、国立医薬品食品衛生研究所)

*pyr4* 遺伝子が発現するオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼは、RNA の構成要素であるウリジンを合成する酵素であり、ウリジン無添加培地にて形質転換体を選抜するマーカーとして働く。*pyr4* 遺伝子は、マーカー遺伝子として長年使用されてきた実績があり、アレルギー誘発性を示す報告はない。

以上から総合的に判断し、カイマックス M 及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼは、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

### 3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

#### (1) プロモーターに関する事項

*camel-Chy* 遺伝子のプロモーターは、宿主由来のグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター配列である。

#### (2) ターミネーターに関する事項

*camel-Chy* 遺伝子のターミネーターは、宿主由来のグルコアミラーゼ遺伝子のターミネーター配列である。

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

該当する塩基配列はない。

### 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pGAMpR のウシプロキモシン遺伝子を *camel-Chy* 遺伝子と置換するため、グルコアミラーゼをコードする遺伝子の下流に *camel-Chy* 遺伝子を組み込むことでプラスミド pCCEX3 を作製した。その後、pCCEX3 を酵素処理して導入用 DNA 断片を得た。

### 5. 構築された発現ベクターに関する事項

#### (1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用 DNA 断片の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 10）。

#### (2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

導入 DNA 断片領域についてオープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行った。その結果、6 つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 187 個検出された。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース<sup>b</sup>を用いて相同性検索を行った結果、第 4-2-(3) に

記載した以外に、スエヒロダケのグルコアミラーゼ、セリンプロテアーゼ及び *Blomia tropicalis* の Blo t 3 アレルゲンが検出された。これらと同一性を有する配列は、それぞれ *glaA* 遺伝子及び *pyr4* 遺伝子領域に位置しており、これらの遺伝子が組み込まれた生産菌由来の食品酵素は長年使用されてきた実績があることから、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられた。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース<sup>d</sup>を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、3 個の ORF がデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれのタンパク質も、その機能から考えてヒトに毒性を示す可能性は低いと考えられた。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

プラスミド pCCEx3 の特定の制限酵素サイトに挟まれた *glaA* 遺伝子及び *pyr4* 遺伝子を含む camel-*Chy* 遺伝子発現カセット領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用 DNA 断片は、ゲル電気泳動で分離され、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

## 6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

導入用 DNA 断片は、宿主ゲノムの *glaA* 遺伝子プロモーター部位に、相同組換えにより組み込まれ、ウリジン産性能を指標に形質転換体を選抜した。サザンブロット分析法を用いた解析により、*glaA* 遺伝子座に複数コピー挿入されていることが確認された（参照 11）。また、定量 PCR により複数コピー導入されていることも確認された（参照 12）。

## 7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用 DNA 断片には、抗生物質耐性マーカー遺伝子が含まれておらず、したがって、生産菌には存在していない。

## 第 5. 組換え体に関する事項

### 1. 宿主との差異に関する事項

*A. luchuensis* に導入された DNA 断片により、ラクダキモシン及びグルコアミラーゼを発現し、また、選抜のために、ウリジン産性能を有することが宿主との差異である。

---

<sup>d</sup> 検索日：2017 年 2 月 21 日

## 2. 遺伝子導入に関する事項

### (1) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用 DNA 断片の制限酵素による切断地図は明らかになっている(参照 10)。

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

挿入 DNA と宿主ゲノムの接合部位に生じる ORF の有無を調べるために、導入 DNA の 5' 近傍領域及び 3' 近傍領域を含む領域における ORF 検索を行った。その結果、6 つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 12 個検出された。これらはいずれも *glaA* 遺伝子プロモーター領域の配列と一致したことから、アレルギー誘発性を有しないと考えられた(参照 13)。

また、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース<sup>d</sup>を用いて検索を行った結果、相同性を示す既知のタンパク質は認められなかった。

## 第 6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

### 1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

カイマックス M の製造原料は、従来の酵素の製造原料と同じものが使用され、製造器材も、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものが使用される。

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

カイマックス M の製造原料は、食品又は食品酵素製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材も、従来から食品酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

## 第 7. 遺伝子組換え添加物に関する事項

### 1. 諸外国における認可、食用等に関する事項

カイマックス M は、2007 年に米国において GRAS として認定されている。またデンマーク及びフランスにおいては、それぞれ 2010 年及び 2011 年に承認されている。カナダにおいては、2010 年に食品利用が許可されている。

### 2. 組換え体の残存に関する事項

PCR 法(検出限界<0.1 ng/μl)により、カイマックス M には組換え体の DNA が検出されないことが確認された。

### 3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

HPLC 分析により、カイマックス M には非有効成分が検出されないことが確認された。

#### **4. 精製方法及びその効果に関する事項**

カイマックス M の精製は、酸の添加、粗ろ過、イオン交換樹脂処理及び限外ろ過等の精製工程を経ることで得られる。これらの工程において、安全性に問題のある物質が混入することは考えられない。

#### **5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項**

カイマックス M の製造原料及び製造方法は、従来食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、含有量の変動により有害性が示唆される常成分が変動することはないと考えられる。

#### **第8. 第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項**

第2から第7までの事項により安全性の知見は得られている。

### **Ⅲ. 食品健康影響評価結果**

「カイマックス M (CHY-MAX M)」については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

## <参照>

1. チーズの需給表：農林水産省生産局畜産部牛乳乳製品課（2012）
2. Kappeler, et al.: Biochemical and Biophysical Research Communication (BBRC)342, 647-654(2006): Characterization of recombinant camel chymosin reveals superior properties for the coagulation bovine and camel milk
3. Jensen, et al. : Acta Cryst. D49,901-913(2013) : Camel and bovine chymosin: the relationship between their structures and cheese-making properties
4. Analytical report（3ロットの分析結果）（社内文書）
5. Abarca, et al.: Appl. Env. Microbiol., 60, 2650-2652(1994): 「Ochratoxin A Production by Strains of *Aspergillus var niger*」
6. Frisvad, et al.: J. Agric. Food Chem., 55, 9727-9732(2007) : Fumonisin B<sub>2</sub> Production by *Aspergillus niger*
7. 山田 修 : 日本醸造協会誌、107, 200-204(2012) : 「黒麹菌の分類と安全性について」－その分子生物学的な解析－
8. カイマックスの審査資料（塩基配列）（社内文書）
9. Ward, et al.: Appl Microbiol Biotechnol., 39,738-743(1993): Use of *Aspergillus* overproducing mutants, cured for integrated plasmid, to overproduce heterologous proteins」
10. ANNEX 2.1 :Sequence of pCCEX3（社内文書）
11. CYMAX M : Southern analysis（社内文書）
12. Determination of chymosin copy number using qPCR（社内文書）
13. Allergen Online /University of Nebraska-Lincoln