

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 *Rhodobacter sphaeroides* 168 株を利用して製造された香料バレンセンに係る食品健康影響評価（平成 31 年 2 月 13 日付け厚生労働省発生食 0213 第 2 号）については、令和元年 9 月 20 日に開催された第 192 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. *Rhodobacter sphaeroides* 168 株を利用して製造された香料バレンセン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

令和 2 年 3 月 31 日（火）開催の食品安全委員会（第 778 回会合）の翌日の令和 2 年 4 月 1 日（水）から令和 2 年 4 月 30 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

Rhodobacter sphaeroides 168 株を利用して製造された香料バレンセン

2020年3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	7
5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	7
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遺伝子を含む。）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	12
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	12

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	12
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＞

2019 年 2 月 14 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 0213 第 2 号）、関係書類の接受

2019 年 2 月 19 日 第 731 回食品安全委員会（要請事項説明）

2019 年 3 月 7 日 第 183 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2019 年 9 月 20 日 第 192 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2020 年 3 月 31 日 第 778 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

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＞

2019 年 3 月 31 日まで		2019 年 4 月 1 日から	
中島 春紫（座長）		中島 春紫（座長）	
小関 良宏（座長代理）		小関 良宏（座長代理）	
児玉 浩明（座長代理）		児玉 浩明（座長代理）	
岡田 由美子	手島 玲子	飯島 陽子	手島 玲子
橘田 和美	樋口 恭子	岡田 由美子	樋口 恭子
近藤 一成	山川 隆	橘田 和美	山川 隆
鈴木 秀幸	吉川 信幸	近藤 一成	吉川 信幸
柘植 郁哉		柘植 郁哉	

＜専門参考人＞

山崎 壮（実践女子大学生生活科学部食生活科学科教授）
（第 192 回遺伝子組換え食品等専門調査会）

要 約

「*Rhodobacter sphaeroides* 168 株を利用して製造された香料バレンセン」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、*Rhodobacter sphaeroides* 35053 株を宿主として、発現ベクター p-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt を導入して作製した *R. sphaeroides* 168 株を利用して生産された香料バレンセンである。発現ベクターは、*Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 株由来のメバロン酸合成遺伝子群、*Escherichia coli* DH5α 株由来のイソペンテニルニリン酸イソメラーゼ等をコードする遺伝子及び *Callitropsis nootkatensis* 由来の改変バレンセン合成酵素遺伝子を導入して構築した。本添加物は、香料の目的でジュース、チューインガムなどの飲食物に利用される。

本添加物について、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、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、アレルギー誘発性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、「*Rhodobacter sphaeroides* 168 株を利用して製造された香料バレンセン」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：*Rhodobacter sphaeroides* 168 株を利用して製造された香料バレンセン
用 途：香料
申請者：アイソバイオニクス株式会社
開発者：アイソバイオニクス株式会社

本添加物は、*Rhodobacter sphaeroides* 35053 株を宿主として、発現ベクター p-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt を導入して作製した *R. sphaeroides* 168 株を利用して生産された香料バレンセンである。発現ベクターは、*Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 株由来のメバロン酸合成遺伝子群、*Escherichia coli* DH5 α 株由来のイソペンテニル二リン酸イソメラーゼ等をコードする遺伝子及び *Callitropsis nootkatensis* 由来の改変バレンセン合成酵素遺伝子を導入して構築した。本添加物は、香料の目的でジュース、チューインガムなどの飲食物に利用される。

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

バレンセンは、柑橘類に含まれる香気成分で、食品添加物として、指定添加物リストに含まれるテルペン系炭化水素類中の具体的品目に分類される。

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原、有効成分等は、以下のとおりである。

名 称：バレンセン

基 原：オレンジ

有効成分：バレンセン

CAS No.：4630-07-3

(2) 製造方法

バレンセンは、オレンジ（ミカン科カンキツ属に属するバレンシアオレンジ等、*Citrus sinensis*）の圧搾汁の濃縮過程で回収されたオレンジオイルからリモネンなどを蒸留により除去することによって得られる（参照 1）。

(3) 用途及び使用形態

バレンセンは、香料として、ジュース、チューインガムなどの飲食物に使用される。

(4) 摂取量

EFSA は、MSDI^a法を用いて、バレンセンの推定摂取量を EU においては 53 µg/人/日、米国においては、26 µg/人/日としており、これはバレンセンが分類される構造クラス I の摂取許容値 (1,800 µg/人/日) の 1/30~1/70 程度である (参照 2)。

国内で流通しているオレンジ精油はほぼ輸入品であることから、日本人のバレンセン摂取量を、2016 年のオレンジ精油 (バレンセン濃度 : 0.04~0.15%) の輸入量を基に MSDI 法により推定した結果、665 µg/人/日であり、構造クラス I の摂取許容値の 1/2.7 であった (参照 3、4)。

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、*R. sphaeroides* 35053 株である。*R. sphaeroides* は、非メバロン酸経路のみによって、テルペン類生合成の中間生成物であるイソペンテニルピリン酸 (IPP) を生成する (参照 5、6)。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

メバロン酸合成遺伝子群の供与体は、*P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 株である。イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ遺伝子及びファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子 (ゲラニルトランスフェラーゼ遺伝子) の供与体は *E. coli* DH5α 株である。改変バレンセン合成酵素遺伝子の供与体は、*C. nootkatensis* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

メバロン酸合成遺伝子群は、メバロン酸合成経路に関与する酵素をコードし、メバロン酸経路の生成物である IPP 及びジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) の供給量を向上させる。

イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ遺伝子及びファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子は、それぞれの酵素をコードし、フェルネシルニリン酸 (FPP) の供給量を向上させる。改変バレンセン合成酵素遺伝子は、改変バレンセン合成酵素をコードし、FPP からバレンセンを合成する。

R. sphaeroides の形質転換は、細菌の接合現象を利用して行った (第 4 - 6 に詳述)。

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

R. sphaeroides は従来 Coenzyme Q10 を生産する菌であり、食品の製造に利用されている (参照 7)。

^a 香料の年間生産量を人口の 10% 及び補正係数で割ることによる推計法である。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

R. sphaeroides は、有害生理活性物質を生産するという報告はない^b。

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、有効成分等は、以下のとおりである。

製 品 名 : バレンセン 80

基 原 : *R. sphaeroides* 168 株

有効成分 : バレンセン

CAS No. : 4630-07-3

(2) 製造方法

バレンセン 80 は、*R. sphaeroides* 168 株を生産菌として、培養、濃縮及びろ過等の工程を経て製造される。精製過程で、複数の蒸留及び濃縮工程を経ることで、濃度が 80% 以上のバレンセンが生産される。

(3) 用途及び使用形態

バレンセン 80 は、香料としてジュースやチューインガムなどの飲食物に使用される。また、濃度 80 wt% の疎水性のオイル状製品として販売される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

バレンセンは、食品等に添加されることで柑橘系の芳香を付与する。バレンセン 80 及び従来のバレンセンの有効成分は同一である。

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

バレンセン 80 と従来のバレンセンの相違点は、バレンセン 80 は、生産菌を用いて発酵後精製工程を経て得られる一方、従来のバレンセンは天然オレンジ果実由来のオレンジオイルを蒸留して得られることである。

(2) 組換え体と宿主

R. sphaeroides 168 株と宿主との相違点は、*R. sphaeroides* 168 株がメバロン酸経路の遺伝子群及び改変バレンセン合成酵素遺伝子の導入によりバレンセン産生能を獲得している点である。

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。

^b PubMed (検索日 : 2017 年 11 月)

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、*R. sphaeroides* 35053 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

R. sphaeroides は、病原性及び有害生理活性物質を生産するという報告はなく（参照 8）、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル（以下「BSL」という。）1に相当する（参照 9）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

R. sphaeroides には、腸管内への寄生性及び定着性の報告はない。

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

R. sphaeroides には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

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

R. sphaeroides が属する *Rhodobacter* 属に病原性及び有害生理活性物質を生産するとの報告はない。

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

発現ベクター p-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt の作製には、プラスミド pBBR1MCS-2 が用いられた。

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 pBBR1MCS-2 の塩基数及び塩基配列は、明らかになっている。

（2）制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pBBR1MCS-2 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）。

（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 pBBR1MCS-2 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 pBBR1MCS-2 には、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ

° GenBank Accession No. U23751

(*NeoR/KanR*) 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pBBR1MCS-2 には、接合伝達を可能とする *mob* タンパク質をコードする *Mob* 遺伝子が含まれている。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pBBR1MCS-2 は広宿主域ベクターであり、*E. coli* 及び *R. sphaeroides* などの様々なグラム陰性菌で複製することが確認されている（参照 10）。

プラスミド pBBR1MCS-2 をベクター骨格要素として含む生産菌は、閉鎖系タンクでの発酵に用いられ、発酵後は加熱処理、蒸留等が実施されることから、菌の系外への漏出は防止されている。

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

メバロン酸合成遺伝子群の供与体は、*P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 株である。イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ遺伝子及びファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子の供与体は *E. coli* DH5α 株である。改変バレンセン合成酵素遺伝子の供与体は、*C. nootkatensis* である。

(2) 安全性に関する事項

P. zeaxanthinifaciens ATCC 21588 株は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において BSL1 に相当する（参照 9）。

E. coli DH5α 株は、非病原性の K12 株由来であり、一般に非病原性に分類されている。

C. nootkatensis は、心材から抽出される油及びその成分が高い抗菌活性及び防虫活性を示し、材の耐腐食性が高いことから船の甲板や寺社の建築材として用いられており、病原性及び毒性については知られていない（参照 10）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）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

ValC 断片（改変 *lac* プロモーター+MBP+*valC*）は、コドン *R. sphaeroides* 用に最適化し、*valC* 遺伝子は酵素活性向上の目的で 2 アミノ酸が置換されるように改変した（参照 11）。

mev 断片（メバロン酸合成遺伝子群）は、プラスミド pBBR-K-*mev*-op-wt を鋳型として PCR 法により得た。

mpmii 断片（*mvk+pmk+mvd+idi+ispA*）は、コドン *R. sphaeroides* 用に

最適化し合成した。

(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

挿入 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 12）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

13 種類の遺伝子の機能を表 1 に示した。

表 1 挿入遺伝子の機能

略号	名称	機能
<i>mvaA</i>	ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ遺伝子	ヒドロキシメチルグルタリル CoA を L-メバロン酸と CoA-SH にする化学反応を触媒する酵素をコード。
<i>hcs</i>	ヒドロキシメチルグルタリル CoA 合成酵素遺伝子	アセチル CoA+水+アセトアセチル CoA $\rightleftharpoons$ (S)-3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA+CoA-SH の化学反応を触媒する酵素をコード。
<i>Idi</i> <i>Ec-idi-alt</i>	イソペンテニルニリン酸イソメラーゼ遺伝子	IPP を異性体である DMAPP に変換する化学反応を触媒する酵素をコード。
<i>mvk*</i> <i>Pz-mvk-alt</i>	メバロン酸キナーゼ遺伝子	メバロン酸をホスホメバロン酸に変換するリン酸化反応を触媒する酵素をコード。
<i>mvd*</i> <i>Pz-mvd-alt</i>	ジホスホメバロン酸カルボキシラーゼ遺伝子	ジホスホメバロン酸を IPP と二酸化炭素に変換する化学反応を触媒する酵素をコード。
<i>pmk*</i> <i>Pz-pmk-alt</i>	ホスホメバロン酸キナーゼ遺伝子	ホスホメバロン酸をジホスホメバロン酸に変換するリン酸化反応を触媒する酵素をコード。
<i>Ec-ispA-alt</i>	ゲラニルトランストランスフェラーゼ遺伝子 又はファルネシルニリン酸合成酵素遺伝子	2 段階の反応を触媒して FPP を合成する酵素をコードする。①DMAPP と IPP を縮合してゲラニルニリン酸 (GPP) を生成。②GPP と IPP を縮合して FPP を生成。
<i>valC</i>	改変バレンセン合成酵素遺伝子	FPP をセスキテルペンであるバレンセンに環状化する化学反応を触媒する酵素をコード。
MBP	マルトース結合タンパク質遺伝子	酵素活性を向上させる目的で用いられるタグタンパク質をコードする。MBP 及び ValC は融合タンパク質として発現する。

*: *R. sphaeroides* 用にコドン最適化したものを重複して挿入

導入された遺伝子が発現し、二次代謝産物としてバレンセンが合成される。バレンセンは、揮発性の化合物で蒸留を繰り返して精製されるため、タンパク質及び DNA は除去される。仮に全てのバレンセンを本添加物に置き換えて撰

取した場合、製品中の窒素含有量を考慮しても、アレルギーを惹起しうる量であるとは考えられなかった。

したがって、人工胃腸液消化試験等によるアレルギー誘発性の検討は行われていない。

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

ValC 断片のプロモーターは、*E. coli* DH5α 由来のラクトースオペロン遺伝子のプロモーターで、リボソーム結合部位 (RBS) を *R. sphaeroides* 用に改変している (参照 13)。

mev 断片には、メバロン酸オペロンの推定プロモーター領域が含まれている。

(2) ターミネーターに関する事項

ターミネーターは用いていない。

(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

In-Fusion クローニング法を用いて mpmii 断片、ValC 断片及び mev 断片をプラスミド pBBR1MCS-2 に導入して発現ベクター p-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt を作製した。

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

発現ベクター p-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt 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 12)。

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、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 生産菌を閉鎖系タンクで発酵させた後、生産物は蒸留等の工程により精製され、その際タンパク質等は除去されることから、オープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) 解析は行わなかった。

(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

意図する挿入領域は、発現ベクター p-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt 全体である。プラスミドとして導入されることから宿主ゲノムへは挿入されない。

(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

発現ベクターp-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt には、目的外の遺伝子の混入がないことをシーケンス解析によって確認しており、導入した *E. coli* は、ネオマイシンを含む培地で、クローンの選抜を行った。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

R. sphaeroides の形質転換は、細菌の接合現象を利用して行った（参照 14）。発現ベクターp-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt を導入した中間宿主株 *E. coli* S17-1 を *R. sphaeroides* と共存させ、ネオマイシンを含む培地でクローンを選抜後、PCR 法にて目的の発現ベクターが導入されていることを確認した。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

発現ベクターp-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii alt には、プラスミド pBBR1MCS-2 に由来するネオマイシンホストランスフェラーゼ遺伝子が含まれる。中間宿主株 *E. coli* S17-1 及び *R. sphaeroides* 168 株の選抜時並びにバレンセン 80 製造における発酵時にネオマイシンを用いている。バレンセン 80 にネオマイシンの混入がないことを窒素含有量分析により確認している（第 7-2 参照）。

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

R. sphaeroides 168 株は、発現ベクターp-m-Pppa-MBP-ValC-mpmii al をプラスミド DNA として有し、メバロン酸経路に関わる遺伝子群及び改変バレンセン合成酵素遺伝子が導入され、バレンセン産生能及びネオマイシン耐性を有する点で宿主と異なる。

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

第 4-2-(2) に記載のとおりである。

(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

第 4-5-(2) に記載のとおり、ORF 解析は行わなかった。

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

バレンセン 80 の製造原料及び製造器材は、食品又は食品添加物の製造に安全に使用されてきた実績がある。

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

バレンセン 80 の製造原料及び製造器材は、上記のとおり安全に使用されてきた実績を有することから、有害性はないと考えられる。

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

バレンセン 80 は、米国では 2016 年に米国食品香料製造業者協会 (FEMA) により GRAS として認証され (参照 12)、欧州では遺伝子組換え添加物の許可対象外とされていることから、欧米では流通実績が認められている。

2. 組換え体の残存に関する事項

バレンセン 80 中の組換え DNA の残存量を PCR 法により分析した結果、検出限界 (0.5 ng/ml) 以下であった (参照 12)。

バレンセン 80 中の残存タンパク質を、バレンセン 80 に含まれる窒素含有量から残存タンパク質を推定する方法を用いて解析した結果、窒素は検出限界 (0.01 mg/l) 以下であったことから、タンパク質含有量は 0.0625 mg/l^d以下であると考えられた。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

バレンセン 80 に含まれる成分をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) にて分析した結果、バレンセンは、平均で 85.3 (%Area) であった。本添加物には、非有効成分として 8 つのピークが検出され、7 つはいずれもバレンセンの構造異性体 (セスキテルペン化合物) と特定され、1 つは他の非有効成分との保持指標 RI 値の比較からセスキテルペン化合物の混合物と推察された (参照 12)。

本添加物と 3 種類の市販品を GC-MS 及びガスクロマトグラフ水素炎イオン化検出器 (GC-FID) を用いて分析した結果、バレンセンの含量は他社市販品と同等以上であった (参照 12、15)。

他社市販品に含まれない又は含量が増加していた非有効成分は、導入した改変バレンセン合成酵素遺伝子の供与体である *C. nootkatensis* の抽出液にも含まれることから、導入した改変バレンセン合成酵素による副産物と推察された (参照 16)。また、申請者はこれらのうち 6 種類は Cramer の構造クラス^eⅠ又はⅡに分類され则认为られ、残る未知の混合物は仮に構造クラスⅢに分類されたとしても推定摂取量は構造クラスⅢに対する摂取許容値 90 µg/人/日を超えないとしている。

香料バレンセンは JECFA 及び EFSA において、脂肪族炭化水素及び脂環式炭化水素の化合物群として評価されており、これらの化合物群では、遺伝毒性を含

^d 一般的な窒素－タンパク質換算係数 (6.25) を用いた。

^e Toxtree(<http://toxtree.sourceforge.net/>)を用いた化学物質の構造に基づく分類

め安全性の懸念はないと判断されている。検出された非有効成分はバレンセンに類似のセスキテルペン化合物と特定又は推定されることから、遺伝毒性の懸念はないと考えられる（参照 2、17～21）。このことに加え、それぞれの含有量を勘案すると、バレンセン 80 の香料としての使用において、これらの非有効成分は安全性の懸念をもたらす量ではないと考えられた。

なお、バレンセン 80 中のバレンセン含有量をプロトン定量核磁気共鳴（¹H-qNMR）分析及び GC-MS 分析によりそれぞれ算出し、比較した結果、ほぼ一致していることから、非揮発性及び低揮発性化合物がバレンセン 80 に存在する可能性はないと推察された（参照 16）。

以上のことから、バレンセン 80 に含まれる非有効成分について、安全性に問題はないと考えられた。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

第 1－5－（2）に記載のとおりである。

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

バレンセン 80 において、含有量の変動により有害性が示唆される常成分は知られていない。

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

「*Rhodobacter sphaeroides* 168 株を利用して製造された香料バレンセン」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. Bovill H (1996) Natural Aroma Chemicals from Oranges and Other Botanical Sources. *Perfumer & Flavorist* 21, May/June 9-11.
2. EFSA (2015) Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 78, Revision 2 (FGE.78Rev2): Consideration of aliphatic and alicyclic and aromatic hydrocarbons evaluated by JECFA (63rd meeting) structurally related to aliphatic hydrocarbons evaluated by EFSA in FGE.25Rev30. *EFSA Journal* 2015;13(4):4067
3. 香料輸入統計 (2016)
4. 日本香料工業会 (2009) 「香料の初歩知識」 日本香料工業会
5. Berry *et al.* (2005) Improved production of Coenzyme Q-10, WO/2005/005650, 2005-01-20
6. Achkar and Sonke (2011) Valencene Synthase, WO/2011/074954, 2011-6-23
7. Wu *et al.* (2013) Fermentation method for producing co-enzyme Q10, US 2013/0302862 A1, 2013-11-14.
8. Kawata T, Bristol JR, Rose JR, Rossignol DP, Christ WJ, Asano O, Dubuc GR, Gavin WE, Hawkins LD, Kishi Y (1995) Anti-endotoxin activity of a novel synthetic lipid A analog. *Prog Clin Biol Res.* 392:499-509.
9. 国立感染症研究所 (2010) 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」
10. Kovach ME, Elzer PH, Hill S, Robertson GT, Farris MA, Roop RM II and Peterson KM (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166: 175-176
11. Sonke and de Jong (2012) Valencene Synthase, WO/2012/177129, 2012-12-27
12. Safety assessment application for flavoring substance Valencene produced via a biotechnology route (社内文書)
13. OptimumGene™ Codon Optimization Analysis (社内文書)
14. Leung M and Beatty JT (2013) Bacterial Conjugation in *Rhodobacter capsulatus*. bio-protocol 3, Iss 13.
15. Comparison of fermentatively obtained Valencene to commercial products (社内文書)
16. バレンセン 80 の分析 (社内文書)
17. JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives), 2006. Safety evaluation of certain food additives. WHO Food Additives Series, No. 54.
18. EFSA(2009) Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food (AFC) related to Flavouring Group Evaluation 78: Consideration of Aliphatic and

- alicyclic and aromatic hydrocarbons evaluated by JECFA (63rd meeting) structurally related to aliphatic and aromatic hydrocarbons evaluated by EFSA in FGE.25. The EFSA Journal (2009) 931, 1-59.
19. Adams T.B., Gavin C.L., McGowen M.M., Waddell W.J., Cohen S.M., Feron V.J., *et al.* 2011. The FEMA GRAS assessment of aliphatic and aromatic terpene hydrocarbons used as flavour ingredients. Food and Chemical Toxicology. 49, 2471.
 20. Gonçalves O., Pereira R., Gonçalves F., Mendo S., Coimbra M.A., Rocha S.M. 2011. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. Mutation Research 723(2011):18-25.
 21. Genotoxicity of constituents in Valencene 80 (社内文書)