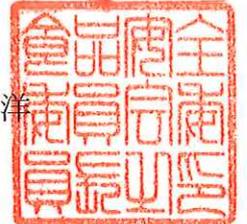




府食第672号
平成28年11月15日

厚生労働大臣
塩崎 恭久 殿

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成28年7月5日付け厚生労働省発食0705第1号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた添加物「NZYM-LP株を利用して生産されたホスホリパーゼ」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「NZYM-LP株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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。

遺伝子組換え食品等評価書

NZYM-LP 株を利用して生産された
ホスホリパーゼ

2016年11月

食品安全委員会

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 of 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	7
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	13
第 5. 組換え体に関する事項	13
1. 宿主との差異に関する事項	13
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	14

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	14
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	14
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項.....	14
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	14
2. 組換え体の残存に関する事項.....	14
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項.....	14
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	15
<参照>	16

<審議の経緯>

- 2016年7月5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0705第1号）、関係書類の接受
- 2016年7月12日 第614回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2016年7月29日 第152回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年9月27日 第623回食品安全委員会（報告）
- 2016年9月28日から10月27日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2016年11月9日 遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2016年11月15日 第629回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
熊谷 進
吉田 緑
石井 克枝
堀口 逸子
村田 容常

<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>

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

要 約

「NZYM-LP 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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、ホスホリパーゼの生産性を高めるため、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主とし、宿主由来のホスホリパーゼ遺伝子及び *A. nidulans* Glasgow 野生株由来のマーカージン遺伝子等を導入することで作製した NZYM-LP 株を利用して生産されたホスホリパーゼである。本添加物は、リン脂質の 1 位及び 2 位又はリゾリン脂質の 2 位エステル結合を加水分解し、グリセロリン脂質と脂肪酸を生成させるホスホリパーゼ B に分類される酵素であり、デンプン糖の製造に加工助剤として使用される。

「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、「NZYM-LP 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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：NZYM-LP 株を利用して生産されたホスホリパーゼ
用 途：デンプン糖製造時の加工助剤
申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社
開発者：Novozymes A/S (デンマーク)

本添加物は、ホスホリパーゼの生産性を高めるために、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、宿主由来のホスホリパーゼ遺伝子及び *A. nidulans* Glasgow 野生株由来のマーカー遺伝子等を導入して作製した NZYM-LP 株を利用して生産されたホスホリパーゼである。本添加物は、リン脂質の 1 位及び 2 位又はリゾリン脂質の 2 位エステル結合を加水分解し、グリセロリン脂質と脂肪酸を生成させるホスホリパーゼ B に分類される酵素であり、デンプン糖の製造に加工助剤として使用される。

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

(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：ホスホリパーゼ

基 原：動物のすい臓若しくはアブラナ科キャベツ、又は糸状菌 (*Aspergillus oryzae*、*Aspergillus niger*)、担子菌 (*Corticium*)、放線菌 (*Actinomadura*、*Nocardiosis*) 若しくは細菌 (*Bacillus*)

有効成分：Phospholipase A (1)、Phospholipase A (2)、Phospholipase B (Lysophospholipase)、Phospholipase C、Phospholipase D

IUB 分命名法による酵素番号及び CAS 番号は、以下のとおりである。

IUB No.： EC 3. 1. 1. 32、EC 3. 1. 1. 4、EC 3. 1. 1. 5、EC 3. 1. 4. 3、EC 3. 1. 4. 4

CAS No.： 9043-29-2、9001-84-7、9001-85-8、9001-86-9、9001-87-0

(2) 製造方法

微生物から生産されるホスホリパーゼは、培養液を抽出、除菌した後、濃縮、精製等の工程を経て製造される。基原が動植物の場合は、それ自身から水で抽出された後に製造される。

(3) 用途及び使用形態

ホスホリパーゼは、分類別に反応特異性が異なり、その分類によって様々な用途に使用される。

ホスホリパーゼ A1 (Phospholipase A (1)) は、植物油の精製及び製パンなどに使用され、ホスホリパーゼ A2 (Phospholipase A (2)) は、栄養学的に重要な脂肪酸の製造及びマヨネーズ製造等に使用される (参照 1)。ホスホリパーゼ B (Phospholipase B) は、植物油製造におけるリン成分の低減及びデンプン加水分解物の精製用膜透過性の向上に用いられる (参照 1、2)。ホスホリパーゼ C (Phospholipase C) 及びホスホリパーゼ D (Phospholipase D) は、医薬品製造及び分析に使用されるとしている (参照 1)。

(4) 摂取量

ホスホリパーゼ B に関する流通品の情報がないことから、参考としてホスホリパーゼ A1 の摂取量を算出した。植物油におけるホスホリパーゼ A1 の最大摂取量及び製パンにおけるホスホリパーゼ A1 の最大摂取量を合計した一日最大摂取量は、0.007 mg /日/ kg 体重である。

なお、デンプン糖製造に用いられるホスホリパーゼ B が、100%残存すると仮定した場合の一日最大摂取量は、0.0002 mg /日/ kg 体重である (参照 3)。

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. niger* BO-1 株である。*A. niger* BO-1 株は、自然界から分離された *A. niger* C40-1 株の突然変異株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ホスホリパーゼ遺伝子 (*llpl2* 遺伝子) の供与体は、*A. niger* BO-1 株である。*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の供与体は、共に *A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

llpl2 遺伝子は、LLPL2 をコードする。LLPL2 は、野生型とアミノ酸配列が同一のホスホリパーゼ B である。*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子は、アセトアミダーゼ及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをそれぞれコードし、選択マーカーに用いた。

A. niger BO-1 株染色体の複数の遺伝子座に相同組換えにより *fcy1* を含む遺伝子発現カセット (FRT-F/FRT-F3 を含む) を挿入した後、インテグラーゼを発現する導入用ベクターを用いて FRT-F/FRT-F3 配列を介し *llpl2/amdS* 遺伝子発現カセット及び *pyrG* 遺伝子発現カセットを導入した。その際、遺伝子発現カセットの挿入された遺伝子座において遺伝子が有する機能が欠失された (参照 4)。

なお、ホスホリパーゼ B の生産性を高めるために、*A. niger* BO-1 株のシトシンデアミナーゼをコードする *fcy1* 遺伝子を含む 9 種類の遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させている (参照 5)。

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. niger は、長期にわたり食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. niger は、オクラトキシン A 及びフモニシンを産生する可能性があるが、BO-1 株がオクラトキシン A 及びフモニシンを産生しないことは分析により確認されている（参照 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

(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：Finizym® W

有効成分：ホスホリパーゼ B (LLPL2)

(EC 番号：EC 3.1.1.5、CAS 番号：9001-85-8)

(2) 製造方法

LLPL2 は、NZYM-LP 株を生産菌として、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は 2 回の除菌ろ過により、分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

LLPL2 は、デンプン糖製造時のろ過性向上のために使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来添加物との比較

LLPL2 は、リン脂質の 1 及び 2 の位置又はリゾリン脂質の 2 の位置にあるエステル結合を加水分解し、ホスホリパーゼの 5 種類のうち Phospholipase B (Lysophospholipase) に分類される。従来添加物ホスホリパーゼ A1 は、ホスホリパーゼの 5 種類のうち Phospholipase A (1) に分類され、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解する。

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添加物

ホスホリパーゼ B の現行流通品がないことから、ホスホリパーゼ A1 を従来の添加物として比較を行った。LLPL2 と従来添加物ホスホリパーゼ A1 の相違点は、至適温度及び至適 pH、並びに反応特異性が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

NZYM-LP 株と宿主との相違点は、NZYM-LP 株には *llpl2* 遺伝子が内在性

遺伝子に加えて複数コピー導入され、ホスホリパーゼ B の高産生性を獲得している点である。また、*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の導入並びに *fec1* 遺伝子を含む 9 種類の遺伝子の欠失及び遺伝子導入座での遺伝子欠失がなされている点が相違点である。

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添加物及び従来の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. niger* BO-1 株である。

本株は、土壌から単離された *A. niger* C40-1 株の突然変異株であり、グルコアミラーゼ等の生産菌として酵素生産に長年の使用実績がある。

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. niger は広く自然界に存在しており、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル 1 に相当する。また、BO-1 株はオクラトキシン A 及びフモニシンを産生しないことを確認している（参照 6）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. niger が腸管内に定着することは知られていない。

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. niger 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

A. niger の近縁種である *A. fumigatus* は、日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られている。また、*A. carbonarius* は、オクラトキシン産性能を有することが知られている。

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 pHUda1505 及び pHUda1306 の作製には、プラスミド pBluescript SK- 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 pBluescript SK- 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 pBluescript 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 pBluescript 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 pBluescript SK-には、アンピシリン耐性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 pBluescript 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 pBluescript SK-の複製開始配列は、*E. coli* で機能する。

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

llpl2 遺伝子の供与体は、*A. niger* BO-1 株である。*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(2) 安全性に関する事項

A. niger は、長期にわたり食品や食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。*A. niger* 及び *A. nidulans* は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に相当する。

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

llpl2 遺伝子は、*A. niger* BO-1 株のゲノム DNA から、*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子は *A. nidulans* Glasgow 株のゲノム DNA から、それぞれ PCR により得られた。

(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 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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・ *llpl2* 遺伝子

llpl2 遺伝子が発現する LLPL2 は、リン脂質の 1 位及び 2 位又はリゾリン脂質の 2 位にあるエステル結合を加水分解する。

1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

A. niger によるアレルギー誘発性の可能性は低いとしている。

2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見

LLPL2 を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

3) 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

①人工胃液に対する感受性

LLPL2 の人工胃液中での消化性について確認するために SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 3 時間以内に消化されることが確認された (参照 7)。

②人工腸液に対する感受性

LLPL2 の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された (参照 7)。

4) 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

LLPL2 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^aを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンはなかった。

また、抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった (参照 8)。

・ *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを分解し、アセトアミドを唯一の窒素源として利用できることにより、選択マーカーとして使用された。アセトアミダーゼについて、アレルギー誘導性を示す報告はない。また、*amdS* 遺伝子を含む導入領域に同定されたオープンリーディングフレーム (ORF) に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すものがないことを確認している。

^a ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version 15)

- ・ *pyrG* 遺伝子

pyrG 遺伝子はオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、ウリジン非要求性を相補する選択マーカーとして使用されている。オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼについて、アレルギー誘導性を示す報告はない。また、*pyrG* 遺伝子を含む導入領域に同定された ORF に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すものがないことを確認している。

以上のことから総合的に判断し、LLPL2、アセトアミダーゼ及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼはアレルギー誘発性を有さないものと考えられる。

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

llpl2 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株に由来する *NA2* 遺伝子の *NA2* プロモーター配列である。*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株に由来する *tefl* 遺伝子の *tefl* プロモーター配列である。*pyrG* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* Glasgow 野生株に由来する *pyrG* 遺伝子の *pyrG* プロモーター配列である（参照 9）。

(2) ターミネーターに関する事項

llpl2 遺伝子及び *amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株に由来する *AMG* 遺伝子の *AMG* ターミネーター配列である（参照 9）。

(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

llpl2 遺伝子の転写を安定化させるため、*A. niger* BO-1 株に由来する *payA* 遺伝子の 5' 側非翻訳領域を付加した（参照 9）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

遺伝子導入用ベクター pHUda1505 は、プラスミド pBluescript SK-に、*llpl2/amdS* 遺伝子発現カセット、FRT-F/FRT-F3 配列断片及びインテグラーゼ遺伝子発現カセットを挿入することによって作製された。遺伝子導入用ベクター pHUda1306 は、プラスミド pBluescript SK-に、*pyrG* 遺伝子発現カセット、FRT-F/FRT-F3 配列断片及びインテグラーゼ遺伝子発現カセットを挿入することによって作製された（参照 10）。

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

遺伝子導入用ベクター pHUda1505 及び pHUda1306 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 11）。

- (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

生産菌に挿入されるのは、遺伝子導入用ベクター pHUda1505 の *llpl2/amdS* 遺伝子発現カセット及び FRT-F/FRT-F3 配列断片領域、並びに遺伝子導入用ベクター pHUda1306 の *pyrG* 遺伝子発現カセット及び FRT-F/FRT-F3 配列断片領域である。生産菌のそれぞれの遺伝子座における挿入 DNA 断片及びその上流と下流の近傍配列を含む領域について、六つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、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 695 個見いだされた。

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^aを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸残基で 35%以上及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

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（参照 12）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、データベースにあるタンパク質と相同性を有する ORF が見つかったものの、これらは各遺伝子座で重複していたため、5 個の ORF に集約され、それぞれ 1~18 個のタンパク質がヒットした。これら各々のタンパク質は、毒性を有するとの報告はなく、したがって、本酵素製剤中に毒性タンパク質が含まれる可能性は低いと考えられたとしている（参照 13、14、15、16）。

- (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、遺伝子導入用ベクター pHUda1505 の *llpl2/amdS* 遺伝子発現カセット及び FRT-F/FRT-F3 配列断片領域、並びに遺伝子導入用ベクター pHUda1306 の *pyrG* 遺伝子発現カセット及び FRT-F/FRT-F3 配列断片含む領域である。

- (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

遺伝子導入用ベクター pHUda1505 及び pHUda1306 は、目的外の遺伝子の混入がないように構築されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

宿主ゲノムの標的遺伝子座を相同組換えによって *fcy1* を含む遺伝子発現カセットに置換し、FRT-F/FRT-F3 配列断片を導入した。次に、遺伝子導入用ベクター pHUda1505 及び pHUda1306 を用いて、インテグラーゼによる FRT-F/FRT-

F3 配列を介した相同組換えにより、*llpl2/amdS* 遺伝子発現カセット又は *pyrG* 遺伝子発現カセットを導入して NZYM-LP 株を得た。なお、*llpl2/amdS* 遺伝子発現カセット及び *pyrG* 遺伝子発現カセットの導入は、*fcy1* 遺伝子の脱落による 5-フルオロシトシン耐性で選抜後、シーケンスにより確認した（参照 9）。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクター pHUda1505 及び pHUda1306 はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主の染色体には導入されない。生産菌の遺伝子挿入領域のシーケンス解析により、抗生物質耐性マーカーを含むマーカー遺伝子は存在していないことを確認しているとしている。

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

NZYM-LP 株は、*llpl2/amdS* 遺伝子発現カセット及び *pyrG* 遺伝子発現カセットの導入並びに *fcy1* 遺伝子等の遺伝子を欠失してい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

NZYM-LP 株の遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素切断地図は、挿入領域の塩基配列のシーケンス解析により明らかになっている（参照 9）。

(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

NZYM-LP 株に挿入された *llpl2/amdS* 遺伝子発現カセットを含む断片及び隣接する配列並びに *pyrG* 遺伝子発現カセットを含む断片及び隣接する配列の ORF 検索の結果は、第 4-5- (2) のとおりである。

欠失させた遺伝子のうち、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子の全長又はターミネーター配列が残存する複数の遺伝子座において、挿入 DNA 断片及びその上流と下流の近傍配列を含む領域について、ORF 検索を行った。その結果、六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 462 個見いだされた。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^a を用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸残基で 35%以上及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

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（参照 12）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、6 個の ORF にデータベースのタンパク質との相同性が認められたが、全てが宿主のゲノムの塩基配列からの ORF であることから、毒性を有するとは考えられないとしている（参照 17、18、19、20、21）。

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

LLPL2 の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、また、本製品の原料は、Food Chemical Codex (FCC) の食品酵素規格に適合していることから、有害性はないと考えられる。

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

LLPL2 の製造原料及び製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に安全に用いられている実績を有する。

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

LLPL2 は、2004 年から欧米及びオーストラリア・ニュージーランドにおいて使用されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットプロット分析により、LLPL2 の製剤中には組換え DNA が残存しないことが確認された（参照 22）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

LLPL2 の製剤前の酵素サンプルは、JECFA の食品用酵素の規格値及び FCC の規定値を満たしている。また、製造原料は食品原料への使用が認められた品質のものが用いられ、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えにくい。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

LLPL2 製剤は、生産菌の培養物を、粗ろ過、除菌ろ過、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にくい。

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

LLPL2 の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、有害性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

「NZYM-LP 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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. Ramrakhiani, L. and Chand, S., Recent Progress on Phospholipases: Different Sources, Assay Methods, Industrial Potential and Pathogenicity. Applied Biochemistry and Biotechnology, 164, 911-1022 (2011).
2. Slominska, L. and Niedbach, J., Study on the influence of the so-called filtration enzyme action on the membrane filtration process of wheat starch hydrolysates. Desalination, 241, 296-301 (2009).
3. 平成25年国民健康・栄養調査報告（一部抜粋、厚生労働省 平成27年3月）
4. *fcy1*/* * * 遺伝子発現カセットの挿入（社内文書）
5. *A. niger* BO-1株における欠失導入用ベクターを用いたDNA欠失の概要（社内文書）
6. Analysis of selected strains derived from *A. niger* C40-1 for production of mycotoxins（社内文書）
7. Artificial digestion test of Finizym® W (LLPL2) in Simulated Gastric Fluid (SGF) and Simulated Intestinal Fluid (SIF)（社内文書）
8. Sequence homology of lysophospholipase expressed by NZYM-LP to allergens（社内文書）
9. NZYM-LP株の遺伝子導入領域におけるDNA塩基配列（社内文書）
10. Outline of pHUda1505 and pHUda1306 construction（社内文書）
11. 遺伝子導入用ベクター-pHUda1505及びpHUda1306の塩基配列及び構成（社内文書）
12. Zhou C. E. et. al., MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence application. Nucleic Acids Research, 35, Database issue, D391-D394 (2007)
13. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of NZYM-LP to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
14. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of NZYM-LP to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
15. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of NZYM-LP to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
16. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of NZYM-LP to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
17. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of NZYM-LP to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
18. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of NZYM-LP to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
19. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of * * * to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
20. Sequence homology of ORFs in the * * * locus on the genome of * * * to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）

21. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
22. Analysis of residual DNA in Finizym®W (社内文書)