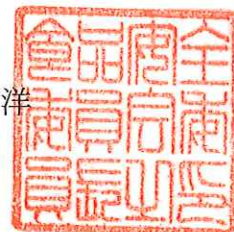




府食第607号
平成29年9月5日

厚生労働大臣
加藤 勝信 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10月25日付け厚生労働省発生食1025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食品添加物「PRF株を利用して生産されたホスホリパーゼC」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

「PRF株を利用して生産されたホスホリパーゼC」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

PRF 株を利用して生産された
ホスホリパーゼ C

2017年9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	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	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	11
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	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な 事項	14
1. 90日間経口投与毒性試験.....	14
2. 変異原性試験	14
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	15
<参照>	16

<審議の経緯>

- 2016年10月25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1025第1号）、関係書類の接受
- 2016年11月1日 第628回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2016年11月16日 第155回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年6月23日 第161回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年7月25日 第659回食品安全委員会（報告）
- 2017年7月26日から8月24日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2017年8月30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
- 2017年9月5日 第664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>

2017年1月6日まで	2017年1月7日から
佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）	山添 康（委員長代理）
熊谷 進	吉田 緑
吉田 緑	山本 茂貴
石井 克枝	石井 克枝
堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	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

「PRF 株を利用して生産されたホスホリパーゼ C」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 C の生産性を高めるため、*Pichia pastoris* SMD1168 株を宿主とし、土壌中の DNA ライブラリーから単離したホスホリパーゼ C 遺伝子に *Saccharomyces cerevisiae* 由来の α 接合因子分泌シグナル遺伝子を融合して導入することで作製した PRF 株を利用して生産されたホスホリパーゼ C である。本添加物は、リン脂質のリン酸ジエステル結合を加水分解する酵素であり、油脂精製に使用される。

「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、「PRF 株を利用して生産されたホスホリパーゼ C」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：PRF 株を利用して生産されたホスホリパーゼ C

用 途：リン脂質の加水分解(植物性油脂の工業的精製における脱ガムにて使用)

申請者：DSM 株式会社

開発者：DSM 社 (オランダ)

本添加物は、ホスホリパーゼ C の生産性を高めるため、*Pichia pastoris* SMD1168 株を宿主とし、土壤中の DNA ライブラリーから単離したホスホリパーゼ C 遺伝子に *Saccharomyces cerevisiae* 由来の α 接合因子分泌シグナル遺伝子を付加して導入することで作製した PRF 株を利用して生産されたホスホリパーゼ C である。本添加物は、リン脂質のリン酸ジエステル結合を加水分解する酵素であり、油脂精製に使用される。

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

ホスホリパーゼは、反応特異性によって A1、A2、B、C 及び D に分類される。本添加物はホスホリパーゼ C であるが、ホスホリパーゼ C の現行品が入手困難であったため、ホスホリパーゼ A2 の情報をもって代用した。

(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 : *Aspergillus niger* PLA-54 株

有効成分 : ホスホリパーゼ A2

IUB No. : EC 3. 1. 1. 4

CAS No. : 9001-84-7

(2) 製造方法

ホスホリパーゼ A2 は、*A. niger* PLA-54 株の培養液から抽出、除菌及び精製工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

ホスホリパーゼ A2 は、主に小麦粉や卵黄中のレシチン分解に使用される。

(4) 摂取量

ホスホリパーゼ C は、工業的植物油精製の脱ガム工程のみに使用され、推奨使用量(純酵素量として 10 ppm)を原油に添加した場合の残存酵素量は検出限界(1 ppb)以下となることが示されている(参照 1)。一般消費者が通常

の食品経由で植物原油の脱ガム工程で使用されたホスホリパーゼ C を摂取する可能性は低いと考えられる。なお、ホスホリパーゼ C が脱ガム推奨使用量添加された原油を摂取したと仮定した場合の一日最大摂取量は、0.083 mg/人/日である（参照 2）。

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、*P. pastoris* SMD1168 株である。*P. pastoris* SMD1168 株は、野生株 NRRL Y-11430 のヒスチジン生合成関与酵素（*HIS4*）遺伝子及びプロテイナーゼ A（*PEP4*）遺伝子が不活化された株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ホスホリパーゼ C（*PLC*）遺伝子は、土壌から採取された DNA から単離されたため、その供与体は、同定されていない。 α 接合因子分泌シグナル（ α MF）遺伝子の供与体は、*S. cerevisiae* である。選択マーカー遺伝子である *HIS4* 遺伝子の供与体は、宿主の *P. pastoris* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

PLC 遺伝子は、ホスホリパーゼ C をコードする。*PLC* 遺伝子及び α MF 遺伝子は融合タンパク質（ α MF-*PLC*）として発現した後、菌体内の分解酵素によって α MF が切断され、成熟型タンパク質となって菌体外に分泌される。*HIS4* 遺伝子は、ヒスチジン生合成関与酵素をコードし、選択マーカーに用いた。

PLC 遺伝子発現カセットは、*P. pastoris* 由来のアルコールオキシダーゼ（*AOX1*）遺伝子のプロモーターを含む 5'上流配列（5'-*AOX1*）、 α MF-*PLC* 遺伝子及び *AOX1* 遺伝子のターミネーター（*AOX1_T*）から構成される。*PLC* 遺伝子発現カセット、*AOX1* 遺伝子の 3'下流配列（3'-*AOX1*）及び *HIS4* 遺伝子を含む挿入 DNA 断片を形質転換により宿主ゲノムに導入した。挿入 DNA 断片は相同組換えにより、*AOX1* 遺伝子座に挿入された。

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

P. pastoris は、医薬品及び飼料用タンパク質の生産に広く使用されている。米国では、飼料用タンパク質源としてブロイラー用飼料の 10%まで使用が認められている（参照 3）。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

P. pastoris は、有害生理活性物質を生産するという報告はなく、病原体等のバイオセーフティレベル（BSL）1 に相当すると考えられる（参照 4）。

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 : Purifine® PLC

有効成分 : ホスホリパーゼ C

IUB No. : EC 3. 1. 4. 3

CAS No. : 9001-86-9

(2) 製造方法

Purifine® PLC は、*P. pastoris* PRF 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。

(3) 用途及び使用形態

Purifine® PLC は、植物性油脂の工業的精製における脱ガム工程に使用され、不純物である非水溶性リン脂質をジアシルグリセリド及び水溶性リン酸化合物に加水分解する。水溶性リン酸化合物は水相の除去工程で除去されるが、ジアシルグリセリドは除去する必要のない成分である。Purifine® PLC による脱ガム工程は、非水溶性リン脂質を水溶性リン脂質にのみ変換するホスホリパーゼ A による脱ガム工程と比較して、原油中のジアシルグリセリド量を増加させ、収率を高めることができるとしている（参照 5）。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

Purifine® PLC は、リン脂質のグリセロール側のリン酸エステルを加水分解する。ホスホリパーゼ A2 は、リン脂質の 2 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

Purifine® PLC と従来の添加物ホスホリパーゼ A2 の相違点は、反応特異性が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

PRF 株と宿主との相違点は、PRF 株には *PLC* 遺伝子発現カセットが複数コピー導入され、ホスホリパーゼ C の高産生性を獲得している点及び *HIS4* 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、*P. pastoris* SMD1168 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

P. pastoris は、病原性及び有害生理活性物質を産生するという報告はなく、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 4）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

P. pastoris に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

P. pastoris にウイルス等に汚染されているとの報告はない。

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

P. pastoris が属する *Komagataella* 属に、病原性及び有害生理活性物質を産生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

遺伝子導入用ベクター pAO815-6xPLC の作製には、プラスミド pAO815 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 pAO815 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 6）。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pAO815 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 pAO815 の構造及び性質は明らかであり、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 pAO815 には、 β -ラクタマーゼ (*Amp*) 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 pAO815 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 pAO815 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

PLC 遺伝子は、土壌中の DNA ライブラリーのスクリーニングにより単離され、供与体は同定されていない。

α MF 遺伝子の供与体は *S. cerevisiae* である。*HIS4* 遺伝子の供与体は *P. pastoris* である。

(2) 安全性に関する事項

PLC 遺伝子の供与体が不明であるため、供与体の安全性は確認できない。

P. pastoris 及び *S. cerevisiae* は国立感染症研究所の病原体等安全管理規程における BSL2 及び 3 に相当する病原体等に分類されていない。また、ヒト及び動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられるので、同規定における BSL1 に相当すると考えられる（参照 4）。

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

土壌から精製した DNA をベクターに挿入してライブラリーを構築した。ホスホリパーゼ C 活性及び非溶血活性を指標としてスクリーニングを行い、*PLC* 遺伝子を含む DNA 断片を取得した。本断片の塩基配列を決定し、オープンリーディングフレーム（ORF）に相当する配列を PCR にて取得し、*PLC* 遺伝子を得た。

α MF 遺伝子はプラスミド pPICZ α A から、5'-*AOX1* DNA 断片、*AOX1_T* DNA 断片及び *HIS4* 遺伝子はプラスミド pAO815 から得た。

(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 7）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *PLC* 遺伝子

PLC 遺伝子がコードするホスホリパーゼ C は、リン脂質のリン酸ジエステルのグリセロール側のリン酸エステルを加水分解する。本遺伝子は、ホスホリパーゼ C の活性を指標にスクリーニングされており、本遺伝子がコードするタンパク質のホスホリパーゼ C 以外の酵素活性の有無は確認されていない。

a. 遺伝子産物の有害タンパク質との構造相同性に関する知見

既知のタンパク質との相同性を検索するために、*PLC* 遺伝子の塩基配列について *blast* 検索を行った結果、相同性を示す配列は見いだされなかった（参照 8）。アミノ酸配列についても *blast* 検索を行った結果、*Streptococcus pneumoniae* 及び *Bacillus* 属の様々な種のホスホリパーゼ C と 78~85% の相同性が示された（参照 9）。*B. cereus* 由来の溶血毒（*cereolysin*）とホスホリパーゼ C との相同性が示されたが（参照 10）、本ホスホリパーゼ C は溶血活性を有しない。

b. 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

既知のアレルゲンとの相同性を調査するために、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 アミノ酸以上で 35% 以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった（参照 11）。

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

人工胃液中での消化性を確認するために、*SDS-PAGE* 分析を行った結果、試験開始後 30 秒以内に分解されることが確認された（参照 12）。また、90°C にて 2 分間加熱することにより酵素活性が失われることが認められた。

② α MF 遺伝子

α MF 遺伝子は α 接合因子の分泌シグナルとリーダー配列をコードする。*PLC* 遺伝子に付加されており、ホスホリパーゼ C を菌体外に分泌させる。アミノ酸配列内に菌体内の分解酵素による切断部位を持ち、分泌の過程でホスホリパーゼ C から切断される。

なお、 α MF 切断後のホスホリパーゼ C タンパク質についてマスマスペクトロメトリーを用いて分析した結果、期待された分子量が示されたことから、 α MF とホスホリパーゼ C は正しく切断されていると考えられた。

α MF 遺伝子を含む *PLC* 遺伝子発現カセット領域に同定された ORF に、既知のアレルゲン及び有害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（参照 13）。

③ *HIS4* 遺伝子

HIS4 遺伝子はヒスチジン生合成関与酵素をコードし、選択マーカーとして使用されている。*HIS4* 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有害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（参照 13）。

以上のことから総合的に判断し、ホスホリパーゼ C、融合タンパク質である α MF-*PLC* 及び *HIS4* はアレルギー誘発性を有さないものと考えられた。

^a AllergenOnLine (Version 14, 検索日：2014 年 7 月 16 日)

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

PLC 遺伝子のプロモーターは、*P. pastoris* 由来の *AOX1* 遺伝子のプロモーターを含む 5'側上流配列 (5'-*AOX1*) である。

(2) ターミネーターに関する事項

PLC 遺伝子のターミネーターは、*P. pastoris* 由来の *AOX1* 遺伝子の *AOX1_T* 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 pPICZ α A に、*PLC* 遺伝子断片を挿入して pPICZ α A-*PLC* を構築した。次に、pPICZ α A-*PLC* から切り出した α MF-*PLC*-*AOX1_T* をプラスミド pAO815 に挿入して、pAO815-1x*PLC* を作製した。遺伝子導入用ベクター pAO815-6x*PLC* は、pAO815-1x*PLC* に *PLC* 遺伝子発現カセット複数コピーを追加挿入して作製された。

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

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 7)。

(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 第 5-2-(2) に記載のとおりである。

(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、*PLC* 遺伝子発現カセット及び *HIS4* 遺伝子を含む領域である。

(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 挿入 DNA 断片は、制限酵素処理後、電気泳動により単離・純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

挿入 DNA 断片を形質転換により宿主ゲノムに導入し、ヒスチジン非要求性を

マーカーとして PRF 株を選抜した。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

プラスミド pAO815 には *Amp* 遺伝子が含まれているが、生産菌 PRF 株には含まれていない。*Amp* 遺伝子が PRF 株に挿入されていないことは、ゲノムシーケンスで確認している（参照 14）。

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

PRF 株は、*PLC* 遺伝子発現カセットが複数コピー導入され、ホスホリパーゼ C の高生産能を有している点に加え、*HIS4* 遺伝子が挿入され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

制限酵素による制限酵素地図は明らかとなっている（参照 15）。また、ザンブロット分析及びゲノムシーケンス解析の結果、宿主ゲノムの *AOX1* 遺伝子座の下流に複数コピーの *PLC* 遺伝子発現カセットが挿入されていることが推察されている（参照 14）。

(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 断片と宿主ゲノムとの接合部位に新たに生じる ORF の有無を調べるため、5'近傍配列を含む領域、3'近傍配列を含む領域、*PLC* 遺伝子発現カセット領域及び *PLC* 遺伝子発現カセットと *HIS4* 遺伝子の接合部における 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 は、合計 155 個検出され、そのうち挿入 DNA 断片と宿主ゲノムとの境界にかかる ORF は 17 個であった。

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^b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認められなかった（参照 13）。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、タンパク質データベース^cを用いて blastp 検索を行った。その結果、2 個の ORF がヒットし、それぞれテトラサイクリン耐性タンパク質及び *Bacillus cereus* 由来のホスホリパーゼ C (Bc-PLC) と高い相同性を示した。テトラサイクリン耐性タンパク質はベクター由来であり、ORF との相同領域は 49%であった。それ自体は毒性を有するものではないと

^b AllergenOnLine (Version 16, Released on January 27, 2016)

^c Swiss-prot database (September 25, 2016)

考えられる。Bc-PLC は細胞膜のリン脂質を分解することから溶血活性が示唆されているが（参照 10）、PRF 株で生産されたホスホリパーゼ C に溶血活性はないことが確認されている（参照 16）。

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

Purifine® PLC の製造原料及び製造器材は、食品及び食品添加物規格のものであり、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

Purifine® PLC 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

Purifine® PLC の諸外国での許可状況は、表 1 のとおりである。

表 1 諸外国における認可

国名	許可状況
米国	2006 年 12 月に GRAS として認定
アルゼンチン	2009 年 2 月に許可
カナダ	2008 年 2 月に加工助剤として許可
タイ	2013 年 5 月に許可
中華人民共和国	2009 年に許可
フランス	2009 年 5 月に許可
ブラジル	2009 年 5 月に許可
メキシコ	2013 年 1 月に加工助剤として許可

2. 組換え体の残存に関する事項

Purifine® PLC の製剤における組換え DNA の残存を定量 PCR により分析した結果、検出限界（0.1-1 ng/mL）以下であった（参照 17）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

Purifine® PLC の製剤は、JECFA の食品用酵素の規格値への適合を定期的に確認している。微生物及び培地由来の物質が含まれる可能性があるが、いずれも有害な成分ではない。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

発酵工程で、ホスホリパーゼ C 酵素タンパク質は培養液中に分泌される。回収工程において、バイオマスを除去した後、除菌ろ過、限外ろ過、透析等を行い、濃縮精製される。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

Purifine® PLC 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が得られている。

(参考)

Purifine® PLC を用いた 90 日間経口投与毒性試験及び変異原性試験に関するデータを確認した。

1. 90 日間経口投与毒性試験

SD ラット (1 群雄雌各 20 匹) に、被験物質を 0、500、1,000 又は 2,000 mg/kg 体重/日で 90 日間強制経口投与した。試験期間中、500 mg/kg 体重/日投与群雌 1 匹及び 2,000 mg/kg 体重/日投与群雌雄各 1 匹の計 3 匹の死亡が確認されたが、いずれも投与過誤によるものと考えられた。その結果、被験物質投与に起因した一般状態の変化は観察されなかった。全投与群の雄で試験開始第 1 週の体重増加量が統計学的に有意な低値を示したが、第 2 週には体重増加量が増加し、第 2 週以降、投与群の平均体重は対照群と有意な差は認められなかった。したがって、一過性の体重増加量低値については、被験物質投与の毒性影響ではないと考えられた。摂餌量において、雌雄の投与群に有意な低値が散見されたが、用量相関性はなく、被験物質投与の毒性影響ではないと考えられた。その他、眼科学的検査、血液学的及び血液生化学的検査、肉眼検査、臓器重量並びに病理組織学的検査結果に、いずれの投与群でも被験物質に起因する毒性影響は認められなかった。したがって、本試験の NOAEL (無毒性量) は、雌雄ともに最高用量の 2,000 mg/kg 体重/日であった (参照 18)。

2. 変異原性試験

(1) 復帰突然変異試験

細菌を用いた復帰突然変異試験を、*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株並びに *Escherichia coli* WP2uvrA(pKM101)株を用いてプレート法により実施した。S9 mix 存在下及び非存在下で、*S. typhimurium* 各菌株を用いて 154~7,690 µg/mL プレート処理量 (100~5,000 µg/plate に相

当)の用量で、また、WP2 $uvrA$ (pKM101)株を用いて15.4~7,690 $\mu\text{g}/\text{mL}$ プレート処理量(10.0~5,000 $\mu\text{g}/\text{plate}$ に相当)の用量で試験を行った。1条件1用量当たり3枚のプレートを用いた。いずれの検査においても、復帰変異コロニー数/プレートに有意な上昇及び用量相関性は認められなかった。代謝活性化系の存在下及び非存在下にかかわらず、試験した菌株において、変異原性を示す結果は認められなかった(参照19)。

(2) *in vitro* 染色体異常試験

哺乳動物細胞遺伝子突然変異試験では、*in vitro* ヒトリンパ球細胞に対して最高用量5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として数濃度、代謝活性化の存在下(3時間処理)及び非存在下(3時間及び22時間処理)で暴露した。陽性対照は妥当な反応を誘発した。いずれの試験のいずれの試験用量においても、染色体異常出現細胞数及び倍数体の有意な増加は認められなかった。その結果、代謝活性化系の存在下及び非存在下にかかわらず、*in vitro* ヒトリンパ球細胞において、染色体異常及び倍数体の誘発性は認められなかった(参照20)。

III. 食品健康影響評価結果

「PRF株を利用して生産されたホスホリパーゼC」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. James Garrett, Geogg Hazlewood, “Analysis of Enzyme Residues following the Use of BD16449 Phospholipase C for Degumming Vegetable Oils in Preparation for Chemical and Physical Refining” 2006 (社内書類)
2. 平成26年国民健康・栄養調査報告：厚生労働省2016
3. US Code of Federal Register 21 § 573.750. *Pichia pastoris* dried yeast. Federal Register, 58, 59170., 1993.
4. 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」”平成22年
5. 八木隆、“搾油、脱ガムの開発動向”オレオサイエンス第6巻第3号、2006.
6. pAO815 restriction map and nucleotide sequence.
7. Restriction map and Nucleotide sequence of DNA construct used for integration (社内書類)
8. Search for homologues nucleotide sequence in BLAST (社内書類)
9. Search for homologues amino acid sequence in BLAST (社内書類)
10. Gilmore MS, Cruz-Rodz AL, Leimeister-Wächter M, Kreft J, Goebel W., “A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage.” J. Bacteriol, 1989.
11. Bioinformatics testing for putative allergenicity (社内書類)
12. Purifine® Gastric Stability Study, 2010 (社内書類)
13. PLC ORF, allergen & tox analysis (社内書類)
14. Genetic analysis of strain PRF (社内書類)
15. Restriction map and Nucleotide sequence of insert (社内書類)
16. WHO/FAO, “Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives(JECFA) Report TRS-952-JECFA69/36,” 2008.
17. Recombinant DNA analysis (社内書類)
18. Fogleman, Jill L, “A 90-day Oral Toxicity Study of DV16449 in Rats. 0470RD30.002,” 2005.
19. Mecchi, Michael S., “Salmonella-Escherichia Coli/ Mammalian Microsome Reverse Mutation Assay with a Confirmatory Assay Treat and Plate Method with DV16449 (社内書類) ,” 2005.
20. Murli, Hemalatha, “Chromosomal Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes (社内書類)