



府食第494号
平成30年7月24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30年2月7日付け厚生労働省発生食0207第15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「JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ」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

「JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ」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

JPFV001 株を利用して生産された
プロテアーゼ

2018年7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	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 of 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	7
1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項	7
2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項	7
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	12
5. 構築された発現ベクターに関する事項	12
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項	13
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.....	15
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	15
<参照>	16

<審議の経緯>

- 2018年2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0207第15号）、関係書類の接受
- 2018年2月13日 第684回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年2月28日 第171回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年5月25日 第175回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年6月12日 第700回食品安全委員会（報告）
- 2018年6月13日から7月12日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2018年7月18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
- 2018年7月24日 第706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>

(2018年6月30日まで)	(2018年7月1日から)
佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）	山本 茂貴（委員長代理）
吉田 緑	川西 徹
山本 茂貴	吉田 緑
石井 克枝	香西 みどり
堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	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>

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

「JPFV001 株を利用して生産されたプロテアーゼ」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、*Fusarium venenatum* A3/5 株を宿主として、*Fusarium oxysporum* DSM2672 株由来のプロテアーゼ遺伝子を導入して作製した JPFV001 株を利用して生産されたプロテアーゼである。本添加物は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解してペプチドやアミノ酸を生成する酵素であり、乳製品の製造において乳由来タンパク質を適度に分解することにより、低アレルゲン化させることを目的として使用される。

なお、本生産菌には、選択マーカーとして、*Streptomyces hygroscopicus* 由来のホスフィノスリシンアセチル基転移酵素遺伝子及び *Aspergillus nidulans* 由来のアセトアミダーゼ遺伝子が導入されている。

「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、「JPFV001 株を利用して生産されたプロテアーゼ」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

名称：JPFV001 株を利用して生産されたプロテアーゼ
用途：乳製品の低アレルゲン化
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、*Fusarium venenatum* A3/5 株を宿主として、*Fusarium oxysporum* DSM2672 株由来のプロテアーゼ遺伝子を導入して作製した JPFV001 株を利用して生産されたプロテアーゼである。本添加物は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解してペプチドやアミノ酸を生成させる酵素であり、乳製品の製造において乳由来タンパク質を適度に分解することにより、低アレルゲン化させることを目的として使用される。

なお、本生産菌には、選択マーカーとして、*Streptomyces hygroscopicus* 由来のホスフィノスリシンアセチル基転移酵素遺伝子及び *Aspergillus nidulans* 由来のアセトアミダーゼ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：トリプシン (PTN)

基原：ブタ膵臓

有効成分：プロテアーゼ (トリプシン)

IUB No. : EC 3. 4. 21. 4

CAS No. : 9002-07-7

(2) 製造方法

PTN は、ブタ膵臓の抽出物を精製して製造される。

(3) 用途及び使用形態

PTN は、乳製品の製造において、乳由来ホエイタンパク質及びカゼインタンパク質を適度に分解することにより、低アレルゲン化させることを目的として使用される。PTN は、タンパク質の加水分解効率が比較的低く、また、切断部位に苦味を呈しやすいため疎水性アミノ酸残基ではなく親水性アミノ酸残基を露出する傾向にあるため、ほかのプロテアーゼと比較して苦味が出にくい。

(4) 摂取量

PTN が全ての乳製品の製造に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定

した場合の最大一日摂取量は、0.24 mg/kg 体重/日である（参照 1～4）。

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、英国の土壌から単離された *F. venenatum* A3/5 株である（参照 5～7）。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

プロテアーゼ (*tlpSP387*) 遺伝子の供与体は、*F. oxysporum* DSM2672 株である。選択マーカーであるホスフィノスリシンアセチル基転移酵素 (*bar*) 遺伝子及びアセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *Streptomyces hygroscopicus* ATCC21705 株及び *Aspergillus nidulans* Glasgow 野生株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

tlpSP387 遺伝子は、プロテアーゼ (SP387) をコードする。*tlpSP387/bar* 遺伝子発現カセットをプロトプラスト法により *F. venenatum* A3/5 株に導入した。

なお、*F. venenatum* A3/5 株のトリコテセン産生能を失わせるために、その合成経路における最初の酵素であるトリコジエン合成酵素をコードする遺伝子を、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、*amdS* 遺伝子と置換した。

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

F. venenatum A3/5 株は、ヒトによる摂食に適した微生物由来の食物タンパク質（マイコプロテイン）の生産に使用されている実績がある（参照 6、7）。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

F. venenatum A3/5 株は、動物試験における毒性及びヒト喫食試験におけるアレルギー反応のいずれも認められていない（参照 6）。*F. venenatum* を含む *Fusarium* 属は、A 型トリコテセン及びフザリン C 並びに動物への毒性が示唆されているブテノライド等のマイコトキシンを産生する可能性があるとしてされている（参照 8）。*F. venenatum* A3/5 株では、トリコジエン合成酵素遺伝子を欠失させた結果、いずれのマイコトキシンの産生も検出限界未満であることを確認している（参照 9）。

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：SP387

有効成分：プロテアーゼ（トリプシン）

IUB No. : EC 3. 4. 21. 4

CAS No. : 9002-07-7

(2) 製造方法

SP387 は、動物組織からの抽出物である従来の PTN と異なり、JPFV001 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

SP387 は、乳製品の製造において、乳由来ホエイタンパク質及びカゼインタンパク質を適度に分解することにより、低アレルギー化させることを目的として使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

SP387 は、従来の PTN と同じく基質タンパク質において Lys 又は Arg 残基の C 末端側のペプチド結合を加水分解するセリンプロテアーゼである（参照 10）。

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

SP387 と従来の PTN との相違点は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPFV001 株と宿主との相違点は、JPFV001 株には *tlpSP387* 遺伝子が導入され SP387 生産性を獲得している点、*bar* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子が導入されている点並びにトリコジエン合成酵素遺伝子が欠失している点である。

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。

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、*F. venenatum* A3/5 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

F. venenatum が病原性であ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けるバイオセーフティレベル (BSL) 1 に相当する（参照 11）。

F. venenatum A3/5 株の二次代謝産物として、トリコテセン等の有害生理活性物質が産生される可能性があることが報告されていることから、A3/5 株からトリコテセン合成に関わる第一酵素をコードするトリコジエン合成酵素遺伝子を欠失させた結果、これらの二次代謝産物は産生されないことが示された（参照 9）。

F. venenatum がアレルギーを誘発するという報告はなく、アレルゲンデータベース^aにおいて、*F. venenatum* に由来するアレルゲンは確認されなかった。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

F. venenatum 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

F. venenatum 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

F. venenatum の近縁種には、ヒトへの日和見感染が知られている *F. solani* 等や、エニアチンやトリコテセンを産生し得る *F. poa*、*F. langsethiae* 等が知られている（参照 12、13）。

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 pJPV005 及び欠失導入用ベクター pLC31b の作製には、*E. coli* 由来のプラスミド pUC19 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 pUC19 の塩基数及び塩基配列は、明らかになっている（参照 14）。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pUC19 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 pUC19 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 pUC19 には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれている。

^a WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee 検索日：2017年4月19日

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC19 には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない（参照 15）。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pUC19 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

tlpSP387 遺伝子の供与体は、*F. oxysporum* DSM2672 株である。

bar 遺伝子及び *amdS* 遺伝子の供与体は、それぞれ *S. hygroscopicus* ATCC21705 株及び *A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(2) 安全性に関する事項

F. oxysporum は植物病原菌として知られているが、その菌種の多くは土壌中の腐生菌であり、安全性に問題はない（参照 16、17）。

S. hygroscopicus に病原性があるとの報告はなく、その二次代謝産物が医薬品や除草剤として幅広く使用されている。また、*S. hygroscopicus* のホスフィンオスリシンアセチル基転移酵素をコードする *bar* 遺伝子は、選択マーカーとして長年使用されてきた実績がある

A. nidulans の食経験は知られていないが、*A. nidulans* のアセトアミダーゼをコードする *amdS* 遺伝子は、選択マーカーとして長年利用されてきた実績がある。

F. oxysporum、*S. hygroscopicus* 及び *A. nidulans* は、いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する（参照 11）。

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

tlpSP387 遺伝子は、*F. oxysporum* DSM2672 株のゲノムから PCR により得られた。*bar* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子は、それぞれ *S. hygroscopicus* ATCC21705 株及び *A. nidulans* Glasgow 野生型のゲノムから 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

tlpSP387 遺伝子、*bar* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子の塩基数、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

① *tlpSP387* 遺伝子

tlpSP387 遺伝子が発現する SP387 は、基質タンパク質において Lys 又は Arg 残基の C 末端側のペプチド結合を加水分解するセリンプロテアーゼである。

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

F. oxysporum について、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

SP387 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。*F. oxysporum* のプロテアーゼにおけるアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^bを行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

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

SP387 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、両試験において、試験開始後 2 分以内に分解されることが示された (参照 18)。

(b) 人工腸液に対する感受性

SP387 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、両試験において、試験開始後 6 時間においても分解されないことが示された (参照 18)。

(c) 加熱処理に対する感受性

SP387 の加熱処理に対する感受性について確認した結果、60°C 30 分で失活することが確認された。

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

SP387 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^cを用いて相同性検索を行った結果、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として、それぞれ 18 個及び 11 個検出された。

これらは、ハウスダストに含まれるダニ及びゴキブリのセリンプロテアーゼ等であり、SP387 のセリンプロテアーゼの活性中心として高度に保存されている部位において連続する 8 アミノ酸配列の一致が認められたが、当該部位は、既存添加物として使用されてきたブタ膵臓由来トリプシンに

^b PubMed、検索日：2016 年 11 月

^c The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) version 16

においても同一であり、構造相同性の比較の結果、アレルギー性の懸念は低いと考えられる。また、消化によるペプチド化もアレルギー性の低減に寄与すると考えられる（参照 19、20）。

② *bar* 遺伝子

bar 遺伝子がコードするホスフィノスリシンアセチル基転移酵素は、植物及び微生物のグルタミン合成酵素の阻害剤であるホスフィノスリシンをアセチル化して無毒化する酵素である。ホスフィノスリシンを遊離する除草剤ピアラホスを含む培養液中では、本遺伝子が導入された菌株のみが生育できることから、選択マーカーとして使用された。ホスフィノスリシンアセチル基転移酵素がアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

③ *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを加水分解する酵素であり、アセトアミドの存在下でのみ発現する。アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中では、本遺伝子が導入された菌株のみが生育できることから、選択マーカーとして使用された。アセトアミダーゼがアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

以上のことから総合的に判断し、SP387、ホスフィノスリシンアセチル基転移酵素及びアセトアミダーゼが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

tlpSP387 遺伝子のプロモーターは、*F. venenatum* A3/5 株由来のグルコアミラーゼ (*glaA*) 遺伝子プロモーター配列である。*bar* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* Glasgow 野生株の *amdS* 遺伝子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

tlpSP387 遺伝子のターミネーター (*SP387* ターミネーター) は、*F. oxysporum* DSM2672 株由来の *tlpSP387* 遺伝子ターミネーター配列の一部である。*bar* 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来のグルコアミラーゼ (*AMG*) 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 pUC19 に、*tlpSP387* 遺伝子及び *bar* 遺伝子断片等を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV005 を作製した。また、プラスミド pUC19 に、トリコジェン合成酵素遺伝子 5' 側配列、*amdS* 遺伝子及びトリコジェン合成酵素遺伝子 3' 側配列を挿入し、欠失導入用ベクター pLC31b 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

遺伝子導入用ベクター pJPV005 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 21）。

(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

遺伝子導入用ベクター pJPV005 から制限酵素処理によって分離される *tlpSP387/bar* 遺伝子発現カセットを含む領域の塩基配列について、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 183 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^cを用いて相同性検索を行った結果、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及び連続した 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンが、2 個の ORF に対して 17 個検出された（参照 22）。このうち、Cand a? 以外の既知アレルゲンは、SP387 のコード配列で検出されたものと同じであった（第 4-2-(3)）。Cand a? は、侵入性カンジダ症患者抗体反応を示す接触性抗原として登録されている（参照 23、24）が、全長での SP387 との相同性は 10%程度であった。

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 25）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、5 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（参照 22）が、いずれのタンパク質も機能から考えて、それ自体がアレルギー誘発性及び毒性を有する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

遺伝子導入用ベクター pJPV005 上の意図する挿入領域は、制限酵素で処理された *tlpSP387/bar* 遺伝子発現カセット断片である。

(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 pJPV005 は、目的外の遺伝子の混入がないように純化

されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

宿主ゲノムに、プロトプラスト形質転換法を用いて目的とする領域を挿入した。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV005 はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムには導入されないことをサザンブロット分析により確認している (参照 26)。

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

JPFV001 株は、*tlpSP387/bar* 遺伝子発現カセットが導入され、トリコジエン合成酵素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

tlpSP387/bar 遺伝子発現カセットの宿主ゲノム上の導入位置を確認するため、JPFV001 株の全ゲノム解析を行った結果、任意の 1 か所に多コピーでタンデムに導入されているとともに、宿主の遺伝子の欠失の可能性は低いことが示された。さらに、定量 PCR 法を用いた解析により、導入された *tlpSP387/bar* 遺伝子のコピー数が推定された (参照 27)。また、挿入領域近傍の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 28、29)。

(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

tlpSP387/bar 遺伝子発現カセット及び *amdS* 遺伝子発現カセット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、各挿入 DNA の 5' 近傍配列を含む領域及び 3' 近傍配列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 が合計 104 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^oを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸残基で 35%以上が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。また、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として、*tlpSP387/bar* 遺伝子発現カセット導入領域の ORF において hemocyanin が検出された。しかしながら、IgE との結合にはかなり高濃度の hemocyanin が必要であることが報告されていること、その主要なエピトープが高次構造レベルで免疫原性を示す可能性及び糖鎖等の修飾分子により覆われている可能性が示唆されていること等から、仮にこの ORF が生産菌内で翻訳された場合であっても、アレルギー性の懸念は低いと考えられた (参照 30、31)。

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 25）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機能から考えて、それ自体がアレルギー誘発性及び毒性を有する可能性は低いと考えられた（参照 32～34）。

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

SP387 の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績があり、また、本製品の原料は Food Chemicals Codex (FCC) の規格に適合している。

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

SP387 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

SP387 は、フランスでは食品用加工助剤のポジティブリストに記載され（参照 35）、米国では GRAS として認証されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット分析により、SP387 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 36）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

SP387 の製剤前の酵素サンプルは、JECFA の食品用酵素の規格値（参照 37）及び FCC の規定値（参照 38）を満たしている。また、製造原料は食品用酵素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

SP387 は、生産菌の培養物を粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の工程を経て製造されるため、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

SP387 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であり、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動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。

(参考)

SP387 の製造過程における除菌ろ過後の培養液を濃縮したものを被験物質に用いた変異原性試験及び13週間反復投与毒性試験のデータを確認した。

1. 変異原性試験

(1) 細菌を用いた復帰突然変異試験

細菌 (*Salmonella* Typhimurium TA98, TA100, TA1535, TA1537 株及び *E. coli* WP2uvrA 株) を用いた復帰突然変異試験 (処理濃度: 0、156、313、625、1,250、2,500 及び 5,000 µg/mL 又は µg/プレート(WP2uvrA)) を行った結果、代謝活性化系の有無にかかわらず被験物質に関連した異常は認められなかった (参照 39)。

(2) 染色体異常試験

ヒト末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (短時間処理濃度: 0、2,813、3,750 及び 5,000 µg/mL、連続処理濃度: 0、3,200、4,000 及び 5,000 µg/mL) を行った結果、代謝活性化系の有無にかかわらず被験物質に関連した異常は認められなかった (参照 40)。

2. 13週間反復投与毒性試験

SD ラット (一群雄雌各 10 匹) に、被験物質を 0、58、192 又は 581 mg TOS/kg 体重/日で13週間強制経口投与し、体重及び摂餌量/摂水量の測定、眼科学的検査、血液検査、血液生化学検査、病理組織学的検査等を行った。その結果、毒性学的意義のある変化はみられなかったことから、本試験の NOAEL (無毒性量) は、最高用量 581 mg TOS/kg 体重/日としている (参照 41)。

III. 食品健康影響評価結果

「JPFV001 株を利用して生産されたプロテアーゼ」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. Health & Nutrition: Low allergenic infant formulas (Application sheet).
(社内文書)
2. Typical composition: Pancreatic Trypsin Novo 6.0 S. (社内文書)
3. 厚生労働省, 国民健康・栄養調査報告 (平成27年)
4. 文部科学省, 日本食品標準成分表 2015 年版
5. Confirmation of parental and recipient strains as *F. venenatum*. (社内文書)
6. Trinci A P J., Myco-protein: A twenty-year overnight success story, Mycological Research, 1992, 96(1), p. 1-13
7. 'Donnell K, Cigelnik E and Casper H H. , Molecular phylogenetic, morphological, and mycotoxin data support reidentification of the Quorn mycoprotein fungus as *Fusarium venenatum*, Fungal Genet Biol, 1998, 23(1), p. 57-67
8. Thrane U and Hansen U, Chemical and physiological characterization of taxa in the *Fusarium sambucinum* complex, Mycopathologia, 1995, 129(3), p. 183-190
9. Analysis of selected *F. venenatum* strains for production of mycotoxins. (社内文書)
10. Specificity profile of trypsins. (社内文書)
11. 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 6 月
12. Salah H, Al-Hatmi A M, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, van Diepeningen A D, et al. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. J Infect. 2015, 71(6), p. 658-666
13. Kristensen R, Torp M, Kosiak B and Holst-Jensen A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. Mycol Res. 2005, 109(Pt 2), p. 173-186
14. Open Biotechnology:pUC19(data sheet)
15. 遺伝子組換え生物: バイオセイフティの指針 (Genetically Modified Organisms: A Guide to Biosafety (書籍) の和訳)
16. 浦嶋 泰, 唐澤 敏, 長岡 一, 橋本 知. *Fusarium oxysporum* のリアルタイム PCR による検出, 日本土壌肥料学雑誌, 2013, 84(4), p. 299-301
17. Mehrabi R, Bahkali A H, Abd-Elsalam K A, Moslem M, Ben M'barek S, Gohari A M, et al. Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. FEMS Microbiol Rev. 2011, 35(3), p. 542-554
18. Digestibility of SP387 protein in a product formulation. (社内文書)
19. Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy, Nat Rev Immunol, 2002, 2(6), p. 446-453
20. Goodman R E, Vieths S, Sampson H A, Hill D, Ebisawa M, Taylor S L, et al., Allergenicity assessment of genetically modified crops—what makes sense? Nature Biotechnology, 2008, 2673
21. 遺伝子導入ベクター pJPV005 の DNA 塩基配列並びに構成. (社内文書)

22. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV005 on the genome of JPFV001 to proteins from MvirDB and allergens. (社内文書)
23. 国立医薬品食品衛生研究所, "Allergen Database for Food Safety (検索: UniProt Accession # = P30575, 検索日 平成 29 年 6 月 6 日)
24. Mason A B, Buckley H R and Gorman J A. Molecular cloning and characterization of the *Candida albicans* enolase gene, *J Bacteriol.* 1993, 175(9), p. 2632-2639
25. Zhou C E, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer M D and Slezak T. MvirDB—a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Research.* 2007, 35(Database issue), p. D391-D394
26. 抗生物質耐性遺伝子の否定試験. (社内文書)
27. Copy number determination of the tlpSP387 gene in the GM production strain JPFV001. (社内文書)
28. 遺伝子導入領域の制限酵素地図. (社内文書)
29. 遺伝子導入領域の塩基配列. (社内文書)
30. Piboonpocanun S, Jirapongsananuruk O, Tipayanon T, Boonchoo S and Goodman R E, Identification of hemocyanin as a novel non-cross-reactive allergen from the giant freshwater shrimp *Macrobrachium rosenbergii*, *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(10), p. 1492-1498
31. Giomi F and Beltramini M, The molecular heterogeneity of hemocyanin: its role in the adaptive plasticity of Crustacea, *Gene*, 2007, 398(1-2), p. 192-201
32. Davey N E, Trave G and Gibson T J, How viruses hijack cell regulation, *Trends Biochem Sci.* 2011, 36(3), p. 159-169
33. Welch R A, Burland V, Plunkett G, 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, et al, Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(26), p. 17020-17024
34. Shanks J, Burtnick M N, Brett P J, Waag D M, Spurgers K B, Ribot W J, et al, *Burkholderia mallei* tssM Encodes a Putative Deubiquitinase That Is Secreted and Expressed inside Infected RAW 264.7 Murine Macrophages, *Infection and Immunity*, 2009, 77(4), p. 1636-1648
35. Légifran, 仏国の食品加工助剤ポジティブリスト
36. The analysis of residual DNA in SP387's product formulation by means of dot blot hybridization. (社内文書)
37. JECFA. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations. used in Food Processing, 2001
38. Monograp, "Enzyme Preparations" (section "general requirements"). *Food Chemicals Codex*, 7th Edition. 2010
39. SP387 /TL1, batch PPF 26813: Test for mutagenic activity with strains of

Salmonella typhimurium and *Escherichia coli*. (社内文書)

40.SP 387/TL1: Induction of chromosome aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. (社内文書)

41.SP 387/TL1: 3-months toxicity study in rats. (社内文書)