

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAo004 株を利用して生産された
キシラナーゼ

2021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 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	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	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	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	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	14
<参照>	15

<審議の経緯>

2019年12月12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1212第7号）、関係書類の接受

2019年12月17日 第767回食品安全委員会（要請事項説明）

2020年1月24日 第197回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年1月28日 第207回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年3月2日 第806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>

中島 春紫（座長）

児玉 浩明（座長代理）

安達 玲子 近藤 一成

飯島 陽子 手島 玲子

岡田 由美子 樋口 恭子

小関 良宏 山川 隆

小野 竜一 吉川 信幸

橘田 和美

要 約

「JPAo004 株を利用して生産されたキシラナーゼ」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、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主とし、*Aspergillus aculeatus* CBS 101.43 株由来のキシラナーゼ遺伝子を導入することで作製した JPAo004 株を利用して生産されたキシラナーゼである。本添加物は、キシランの 1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、小麦デンプン製造における収量及び品質向上を目的として使用される。

「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、「JPAo004 株を利用して生産されたキシラナーゼ」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：JPAo004 株を利用して生産されたキシラナーゼ
用 途：小麦デンプン製造における収量及び品質向上
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、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主とし、*Aspergillus aculeatus* CBS 101.43 株由来のキシラナーゼ遺伝子を導入することで作製した JPAo004 株を利用して生産されたキシラナーゼである。本添加物は、キシランの 1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、小麦デンプン製造における収量及び品質向上を目的として使用される。

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：キシラナーゼ

基 原：糸状菌、放線菌

有効成分：キシラナーゼ

IUB No. : EC 3. 2. 1. 8

CAS No. : 9025-57-4

(2) 製造方法

キシラナーゼは、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

キシラナーゼは、小麦デンプンの原料となる小麦粉中のキシランに作用することで、キシランと結合していたタンパク質の分離が促進され、デンプンの歩留まり及び品質が向上する（参照 1）。

(4) 摂取量

キシラナーゼが全てのその他の小麦加工品に使用され、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、1.55 µg TOS (Total Organic Solids) / kg 体重/日である（参照 2、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. oryzae* IFO4177 株である。*A. oryzae* IFO4177 株は、清酒麴から分離された野生株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

キシラナーゼ (*xylAA*) 遺伝子の供与体は、*A. aculeatus* CBS 101.43 株である。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

xylAA 遺伝子は、*xylAA* をコードする。

amdS 遺伝子及び *URA3* 遺伝子は、それぞれ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コードし、選抜マーカーに用いた。

キシラナーゼの生産性を高めるために、*A. oryzae* IFO4177 株の α -アミラーゼをコードする *amyC* 遺伝子を含む 5 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た (参照 4)。さらに、 γ 線照射による *cpa* 遺伝子クラスター及び *afl* 遺伝子クラスターの欠失により、シクロピアゾン酸及びアフラトキシン生産能が欠失している (参照 5)。

xylAA 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pJPV015 をプロトプラスト法により宿主のゲノム DNA に導入した。

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. oryzae 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 (参照 6)。国内では、*A. oryzae* は、麴菌として味噌、醤油、醸造酒などの発酵食品製造に広く利用されている。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. oryzae でのアフラトキシンの産生は確認されていない。*A. oryzae* の中に、シクロピアゾン酸、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸を生産する株も報告されている (参照 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

(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 : *xylAA*

有効成分 : キシラナーゼ

IUB No. : EC 3.2.1.8

CAS No. : 9025-57-4

(2) 製造方法

xylAA は、JPAo004 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

xyIAA は、小麦デンプン製造時の収量及び品質を向上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

xyIAA は、従来のキシラナーゼと同じくキシランの1,4-β-Dキシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素である。

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

xyIAA と従来のキシラナーゼとの相違点は、基原並びに至適温度及びpHが異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAo004株と宿主との相違点は、JPAo004株には*xyIAA*遺伝子が複数コピー導入され、キシラナーゼの高産生性を獲得している点である。また、*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子の導入並びに*amyC*遺伝子を含む複数種類の内在性遺伝子を欠失している点である。

以上1から6までから、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、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. oryzae* IFO4177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. oryzae は、一般的に非病原性の微生物であると考えられ（参照6）、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（以下「BSL」という。）1に相当する（参照8）。*A. oryzae*の中には、シクロピアゾン酸、コウジ酸及びβ-ニトロプロピオン酸を生産する株が報告されている（参照7）。

*A. oryzae*由来の酵素であるアルカリ性セリンプロテアーゼ及びTAKAアミラーゼは、アレルゲンデータベース（参照9）に記載されており、いずれも呼吸器系感作が報告されているが、これは特定の職種での高頻度ばく露が起因と考えられる。*A. oryzae* IFO4177株は食品添加物の生産菌として長年使用され、安全性に問題を生じる事例は報告されておらず、アレルギーを誘発する可能性は低いと考えられる。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. oryzae 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

A. oryzae 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. oryzae 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. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* は、有害生理活性物質であるアフラトキシンを産生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 pJPV015 の作製には、*Escherichia 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。

(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。

(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。

(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

xylAA 遺伝子の供与体は、*A. aculeatus* CBS 101.43 株である。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *S. cerevisiae* FL100 株である。

(2) 安全性に関する事項

A. aculeatus は、従来のキシラナーゼの基原の一つであり、また、食品分野においてクエン酸等の有機物の生産菌として使用されてきた（参照 10）。

A. nidulans の食経験は特に知られていないが、*amdS* 遺伝子は選抜マーカーとして長年利用されてきた実績を有する。

S. cerevisiae は、パン酵母やアルコール発酵用酵母として食品製造において長年にわたり安全に使用されてきた。

A. aculeatus、*A. nidulans* 及び *S. cerevisiae* 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 に相当すると考えられる（参照 8）。

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

xylAA 遺伝子は、*A. aculeatus* CBS 101.43 株のゲノムから PCR により得られた。

amdS 遺伝子及び *URA3* 遺伝子は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *S. cerevisiae* 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

挿入 DNA の塩基数及び塩基配列と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 *xylAA* 遺伝子

xylAA 遺伝子がコードする *xylAA* は、キシランの 1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する。

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

A. aculeatus は他の糸状菌と比べて特にアレルギー誘発性を有する菌種ではなく、*A. aculeatus* のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^a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。

^a PubMed 検索日：2018 年 9 月

- b. 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
xylAA 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。
- 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
xylAA の人工胃液中での消化性について確認するため、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 30 秒以内にバンドが消失したため、分解されることが示された (参照 11)。
- (b) 人工腸液に対する感受性
xylAA の人工腸液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、SDS-PAGE 分析では、パンクレアチンを示すバンドと重なったため判定ができなかったが、ウェスタンブロット分析では試験開始後 30 分以内に完全長のバンドに加えて約 42 kDa の分解物が認められ、試験開始後 6 時間においても両バンドは消失しないため、分解されないことが示された (参照 11)。
- (c) 加熱処理に対する感受性
xylAA の加熱処理に対する感受性を確認した結果、80°C・30 分の処理で活性が消失することが示された。
- 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
xylAA 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、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、連続する 80 アミノ酸配列以上で 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 12)。

② *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、選抜マーカーとして使用された。アセトアミダーゼについて、アレルギー誘導性及び毒性を示す報告はない。

③ *URA3* 遺伝子

URA3 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、ウリジン要求性を相補する選抜マーカーとして長年使用されてきた。オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼのアレルギー誘発性及び毒性を示す報告は

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version18)

ない。

以上のことから総合的に判断し、*xylAA*、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

xylAA 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株の中性アミラーゼ II をコードする *na2* 遺伝子のプロモーター断片に、*A. nidulans* Glasgow 野生株のトリオースリン酸異性化酵素をコードする *tpi* 遺伝子のプロモーター断片を連結させた *na2/tpi* プロモーター配列である。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子のプロモーターは、それぞれ自身の野生型プロモーター配列である（参照 13）。

(2) ターミネーターに関する事項

xylAA 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。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子のターミネーターは、それぞれ自身の野生型ターミネーター配列である（参照 13）。

(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

(1) 及び (2) の他に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は組み込まれていない。

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、*na2/tpi* プロモーター断片、*xylAA* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*amdS* 遺伝子断片及び *URA3* 遺伝子断片を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV015 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 pJPV015 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 13）。

(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 pJPV015 に、*xylAA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子以外のオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）の有無を確認するために全領域の 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 147 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 アミノ酸配列以上で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとしてタバコの葉由来のアクチン結合タンパク質の一種 (villin 2, partial) が検出された (参照 14)。仮に本 ORF がタンパク質に翻訳されたとしても、本製剤の純度は高いため安全性への影響は低いと考えられる。なお、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 15) 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、いずれも毒性を有するとは考え難いタンパク質であった (参照 16)。したがって、遺伝子導入用ベクター pJPV015 には、アレルギー誘発性及び毒性をコードする ORF が含まれ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

意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクター pJPV015 全領域である。

(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 pJPV015 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

遺伝子導入用ベクター pJPV015 を宿主ゲノムへプロトプラスト法を用いて導入した。その結果、pJPV015 は宿主ゲノム上の任意の位置に、タンデムに複数コピー挿入されていると考えられる (参照 17、18)。

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 pJPV015 は抗生物質耐性マーカーを有していない。

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

JPAo004 株は、pJPV015 が導入され、*amyC* 遺伝子等の複数種類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

JPAo004 株の染色体上での pJPV015 の導入位置を確認するためにシークエ

^c ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version18)

ンス解析を行った結果、1箇所挿入されたことを確認した。さらに、ドットブロット解析にてコピー数を解析した結果、複数コピーの *xylAA* 遺伝子が導入されていることが確認された（参照 19、20）。

(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

JPAo004 株の遺伝子挿入領域と宿主ゲノムとの接合部位を跨ぐ領域、並びに欠失導入用ベクターを導入した *amyC* 遺伝子座（異種遺伝子断片の残存）及び両接合近傍配列における 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 175 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^d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なかった（参照 21～23）。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 15）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った結果、相同性を示す ORF は認められなかった。したがって、アレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられた。

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

xylAA 製品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

xylAA 製品の製造原料及び製造器材は、安全に使用されてきた実績を有していること、本製品の個々の原料は Food Chemicals Codex (FCC) 等の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。

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

xylAA 製品は、フランス、カナダにおいて、食品用加工助剤のポジティブリストに収載されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット解析により、*xylAA* 製品中には組換え DNA が検出されないこ

^d ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version18)

とが確認された（参照 24）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

xylAA の製剤前の酵素サンプルは、食品、添加物等の規格基準（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）に定めるキシラナーゼの純度試験及び微生物限度を満たしている。また、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸、シクロピアゾン酸及びアフラトキシンの産生量を分析した結果、いずれも検出限界未満であることを確認している（参照 25）。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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

xylAA 製品は、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。適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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ないと考えられる。

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

xylAA 製品の製造原料及び製造方法は従来 of 食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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が得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「JPAo004 株を利用して生産されたキシラナーゼ」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. Hardt NA, Chauhan H, Boom RM, van der Goot AJ. Shear-induced starch-gluten separation at very low water content aided by xylanases. *Journal of Food Engineering* 2014;141:51-57.
2. 厚生労働省、平成 28 年国民健康・栄養調査報告.
3. Typical Composition: Shearzyme 2X (社内文書)
4. 欠失導入用ベクターを用いた DNA 欠失の概要 (社内文書)
5. *Aspergillus oryzae* BECh2 株に関する情報 (社内文書)
6. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;36(5):569-572.
7. Frisvad JC, Moller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018;102(22):9481-9515.
8. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程
(http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/Kanrikitei3_1006_1.pdf,
http://www0.nih.go.jp/niid/Biosafety/kanrikitei3/Kanrikitei3_1006.pdf)
9. Search Results with *Aspergillus oryzae* from Allergen Nomenclature (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee).
10. Park H, Jun S, Han K, Hong S, Yu J. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi. *Advances in Applied Microbiology* 2017;100:161-202.
11. Digestability and Purity of xylAA protein in a product formulation (社内文書)
12. Assessment of Sequence homology of beta-xylanase expressed by JPAo004 to allergens (社内文書)
13. 遺伝子導入ベクター-pJPV015 の DNA 塩基配列並びに構成 (社内文書)
14. Mittermann I, Voronin V, Heberle-Bors E, Valenta R. Identification of a villin-related tobacco protein as a novel cross-reactive plant allergen. *FEBS Lett* 2005;579(17):3807-3813.
15. Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD et al. MvirDB—a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D391-394.
16. Sequence homology of ORFs in the expression plasmid pJPV015 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
17. 五味 勝也. カビの形質転換系の開発とその利用. *化学と生物* 1990;28:91-100.
18. Kelly JM, Hynes MJ. Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 1985;4(2):475-479.
19. JPAo004 株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
20. Copy number determination of the *xylAA* gene in the GM production strain NZYM-FB (社内文書)

21. Sequence homology of ORFs in the 5'flanking regions of the inserted expression plasmid on the genome of JPAo004 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
22. Sequence homology of ORFs in the 3'flanking regions of the the inserted expression plasmid on the genome of JPAo004 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
23. Sequence homology of ORFs in the AmyC locus on the genome of JPAo004 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
24. The analysis of residual DNA in a xylAA product formulation by means of dot blot hybridization (社内文書)
25. Characterization of Representative Enzyme Preparation Batches and Toxbatch from JPAo004 (社内文書)