

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

ZGL 株を利用して生産された
グルコースオキシダーゼ

2020年9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 |
| 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..... | 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..... | 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..... | 7 |
| 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..... | 7 |
| 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..... | 8 |
| 1. 挿入 DNA の供与体に関する事項..... | 8 |
| 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..... | 10 |
| 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項..... | 10 |
| 5. 構築された発現ベクターに関する事項..... | 10 |
| 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..... | 11 |
| 第5. 組換え体に関する事項..... | 11 |
| 1. 宿主との差異に関する事項..... | 11 |
| 2. 遺伝子導入に関する事項..... | 11 |
| 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 | 12 |
| 第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項 | 12 |
| 1. 諸外国における認可、食用等に関する事項 | 12 |
| 2. 組換え体の残存に関する事項 | 12 |
| 3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項 | 12 |
| 4. 精製方法及びその効果に関する事項 | 12 |
| 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 | 13 |
| 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 | 13 |
| Ⅲ. 食品健康影響評価結果 | 13 |
| <参照> | 14 |

<審議の経緯>

2019年9月26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0926第3号）、関係書類の接受

2019年10月1日 第759回食品安全委員会（要請事項説明）

2019年10月18日 第194回遺伝子組換え食品等専門調査会

2020年7月16日 第201回遺伝子組換え食品等専門調査会

2020年9月29日 第791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

「ZGL 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」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 niger* ISO-528 株を宿主として、*Penicillium chrysogenum* 由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子を導入して作製した ZGL 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼである。本添加物は、 β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへと酸化する酵素であり、製パン及び製菓工程において、生地 of 柔軟性を改善する目的で使用される。

「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、「ZGL 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」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：ZGL 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ
用 途：製パン及び製菓における生地柔軟性向上
申請者：DSM 株式会社
開発者：DSM (オランダ)

本添加物は、*Aspergillus niger* ISO-528 株を宿主として、*Penicillium chrysogenum* 由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子を導入して作製した ZGL 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼである。本添加物は、 β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへと酸化する酵素であり、製パン及び製菓工程において生地柔軟性を改善する目的で使用される。

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：グルコースオキシダーゼ

基 原：糸状菌 (*Penicillium* 属)

有効成分：グルコースオキシダーゼ

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

CAS No. : 9001-37-0

(2) 製造方法

グルコースオキシダーゼは、糸状菌の培養液から抽出し、除菌、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

グルコースオキシダーゼは、食品の加工貯蔵工程において、グルコースの存在による品質劣化を防ぐ目的で使用される。また、反応生成物の過酸化水素が製パン及び製菓用の生地中で酸化剤として作用することから、生地に柔軟性を持たせる目的で使用される。

(4) 摂取量

グルコースオキシダーゼが小麦・加工品のうちパン類（菓子パンを除く）、菓子パン類、その他の小麦加工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、0.0094 mg TOS (Total Organic Solids)/人/日である（参照 1）。

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* ISO-528 株である。*A. niger* ISO-528 株は、*A. niger* 野生株 NRRL3122 から変異原処理及びセルフクローニングにより構築された。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

グルコースオキシダーゼ (*ZGL*) 遺伝子の供与体は、*P. chrysogenum* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

ZGL 遺伝子は、*P. chrysogenum* 由来のグルコースオキシダーゼをコードし、シグナル配列が切断され、成熟型となる。

グルコアミラーゼ (*glaA*) 遺伝子のプロモーター、*ZGL* 遺伝子及び *glaA* 遺伝子のターミネーターを含む *glaA* 遺伝子の下流配列から構成される *ZGL* 遺伝子発現カセットを、プロトプラスト-PEG 法により宿主ゲノムの標的部位に導入した。

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. niger は、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されている。*A. niger* ISO-528 系列株は、アスパラギナーゼの生産菌として使用されている。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. niger が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産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 2）。

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：Bakezyme GO Pure

有効成分：グルコースオキシダーゼ

IUB No.：EC 1. 1. 3. 4

CAS No.：9001-37-0

(2) 製造方法

Bakezyme GO Pure は、*ZGL* 株を生産菌として、従来のグルコースオキシダーゼと同様に、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、不活化され、ろ過により分離除去される。

(3) 用途及び使用形態

Bakezyme GO Pure は、顆粒製剤として、製パン及び製菓の工程において生地に柔軟性をを持たせる目的で使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

Bakezyme GO Pure の有効成分は、従来のグルコースオキシダーゼと同様に、 β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化させる。

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

Bakezyme GO Pure と従来のグルコースオキシダーゼとの相違点はない。Bakezyme GO Pure のアミノ酸配列と *P. chrysogenum* 由来の従来のグルコースオキシダーゼのアミノ酸配列は同一である。

(2) 組換え体と宿主

ZGL 株と宿主との相違点は、ZGL 株に *ZGL* 遺伝子が複数コピー導入されグルコースオキシダーゼ産生性を獲得している点、また、グルコースオキシダーゼの生産性を高めるために生産性に関与する遺伝子を欠失している点及びその過程で挿入された *lox* 及び *nicB* リンカー配列が残存している点である。

以上から、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、*A. niger* ISO-528 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. niger が病原性を有したり有害生理活性物質を産生するという報告はなく（参照3）、国立感染症研究所病原体等安全管理規定においてBSL1に相当する。

A. niger はオクラトキシンA及びフモニシン合成遺伝子を有するが（参照4）、*A. niger* ISO-528 株はこれらのマイコトキシンを産生しないことが確認されている（参照5）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. niger 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. 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 の近縁種には、オクラトキシン A 産性能を有する *A. carbonarius* や *A. citricus* 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 pGBTOPZGL-1 の作製には *E. coli* 由来のプラスミド pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R の複製開始配列は、*E. coli* のみにおいて機能する。

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

ZGL 遺伝子の供与体は、*P. chrysogenum* である。

(2) 安全性に関する事項

Penicillium 属は、グルコースオキシダーゼの基原として安全に使用されている。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2）。

2. 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカを含む。）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

ZGL 遺伝子は、*P. chrysogenum* 由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子の配列を基にコドンの最適化を行い、化学合成された。

（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

ZGL 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（参照 6）。

（3）挿入遺伝子の機能に関する事項

ZGL 遺伝子がコードする Bakezyme GO Pure は、細胞内でシグナル配列が切断される。

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

P. chrysogenum のアレルギー誘発性を示唆する報告はない。

② 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

Bakezyme GO Pure 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

a. 人工胃液に対する感受性

Bakezyme GO Pure の人工胃液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及を行った。その結果、試験開始後 15 分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 7）。

b. 人工腸液に対する感受性

Bakezyme GO Pure の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及を行った。その結果、試験開始後 15 分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 7）。

c. 加熱処理に対する感受性

Bakezyme GO Pure の加熱処理に対する感受性について確認するため、残存活性を測定した。その結果、70°C・2 分で失活することが示された（参照 8）。

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

Bakezyme GO Pure 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、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

^a Allergen Online 検索日 2019 年 11 月

酸配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして mala s 12 (*Malassezia sympodialis* (皮膚常在菌) 由来のグルコース-メタノール-コリン酸化還元酵素) が検出された。mala s 12 は接触アレルゲンとして登録されている。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見いだされなかった (参照 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

(1) プロモーターに関する事項

ZGL 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* 由来の *glaA* 遺伝子の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

ZGL 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* 由来の *glaA* 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 pTZ18R に、*ZGL* 遺伝子発現カセットを挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pGBTOPZGL-1 を作製した (参照 6)。

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 pGBTOPZGL-1 より、制限酵素処理を行い *ZGL* 遺伝子発現カセットを分離し、単離された DNA 断片を形質転換に用いた。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 6)。

(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

遺伝子導入用ベクター pGBTOPZGL-1 上の意図する挿入領域は、*ZGL* 遺伝子発現カセット領域である。

(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、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

宿主 ISO-528 株の親株に複数箇所存在する *glaA* 遺伝子座を、プロモーター領域及びコード配列を欠失させ制限酵素で標識したプラグ部位とし、さらに、複数の遺伝子の欠失等を行い宿主 ISO-528 株を得た（参照 10）。プラグ部位に、*ZGL* 遺伝子発現カセットをプロトプラスト-PEG 法にて導入し、*ZGL* 遺伝子発現カセットが多重化した *ZGL* 株を得た。さらに、グルコースオキシダーゼの生産性を高めるために、Cre-lox システムを用いた遺伝子の欠失を行った（参照 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

導入用 DNA 断片には、抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれておらず、*ZGL* 株には挿入されない。生産菌構築に用いたベクターに含まれる抗生物質耐性マーカーの残存のないことを PCR 法により確認している（参照 12）。

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

ZGL 株は、*ZGL* 遺伝子の導入によりグルコースオキシダーゼ生産能を有している点、遺伝子の欠失並びに欠失の過程で挿入された *lox* 及び *nicB* リンカー配列が残存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

ZGL 遺伝子発現カセットの宿主ゲノムへの導入を確認するために PCR 法及びサザンブロット分析を行った結果、プラグ部位に複数コピー導入されていることが確認された。また、標的遺伝子が完全に欠失していることがシーケンス解析により確認された（参照 11）。

(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 と宿主ゲノムの接合部位に生じる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、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いて 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 36 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、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、第 4-2-(3)-④

^b Allergen Online 検索日 2018 年 3 月

に記載した mals 12 以外に、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、NCBI データベース^cを用いて E-value<0.01 を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は検出されなかった（参照 13）。

欠失させた遺伝子の lox 及び nicB リンカー配列の残存領域においても同様の検索を行った結果、相同性を示すアレルゲン及び毒性タンパク質は検出されなかった（参照 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

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

Bakezyme GO Pure の製造原料は、食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用している。

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

Bakezyme GO Pure 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

Bakezyme GO Pure は、オランダ、カナダ、デンマーク、フランス、メキシコ等の国で添加物として使用が認められ、使用されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

Bakezyme GO Pure の製造工程における不活性化工程後の培養液を用いて培養試験を行った結果、生産菌は確認されなかった（参照 14）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

Bakezyme GO Pure 製剤前のサンプルは、FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）の食品用酵素の規格値に適合している（参照 5）。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

Bakezyme GO Pure は、生産菌の培養物を不活性化後、圧搾ろ過、限外ろ過等

^c NCBI データベース 検索日 2018 年 3 月

の精製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

Bakezyme GO Pure 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、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。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「ZGL 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」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. グルコースオキシダーゼの推奨使用量（社内文書）
2. 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」国立感染症研究所, 平成22年6月
3. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW., On the Safety of *Aspergillus niger* -a review: Appl Microbiol biotechnol Vol.59, 426-435, 2002
4. Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ *et al*, Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88, nature biotechnology, 2007
5. Certificate of Analysis（社内文書）
6. pGBTOPZGL-1 map, sequence and annotation（社内文書）
7. In vitro digestability of Bakezyme GoPure（社内文書）
8. Temperature, pH and stability profile of PenGox（社内文書）
9. Bioformatics testing for putative allergenicity（社内文書）
10. *****d
11. Nucleotide sequence of ZGL insert at *** Δ *glaA*-locus and DNA scar insert at *** locus（社内文書）
12. The absence of *E. coli* vector and amdS selection marker DNA（社内文書）
13. Analysis of sequence elements introduced within *A. niger* strain ZGL（社内文書）
14. Efficacy of killing the *Aspergillus niger* strain ZGL（社内文書）

d 参照した論文を明らかにすることにより、本申請品の内容が推測されることで、企業の知的財産等が開示され特定の者に不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため、伏せ字とした。