

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（案）

第1章 総則

第1 評価基準作成に至る背景

厚生省（当時）の「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針（平成3年策定）」に基づき、平成6年に初めて遺伝子組換え技術を利用して製造された食品添加物の安全性の確認がなされ、平成8年には、種子植物に由来する遺伝子組換え食品の安全性の確認がなされた。以来、多くの遺伝子組換え食品及び添加物の安全性確認が行われてきた。さらに、食品衛生法の規定に基づく食品、添加物の規格基準の改正により、平成13年4月より、遺伝子組換え食品等の安全性審査が法的に義務付けられることとなった。平成15年7月、食品安全委員会の新設とともに、遺伝子組換え食品及び添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることとなった。

本基準は、食品安全委員会における遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物（以下、「遺伝子組換え添加物」という。）の安全性を評価するために必要とされる原則及び事項を、厚生労働省の安全性審査基準等を基に検討し、安全性評価基準として定めたものである。

第2 定義

1 組換えDNA技術

酵素等を用いた切断及び再結合の操作によって、DNAをつなぎ合わせた組換えDNA分子を作製し、それを生細胞に移入し、かつ、増殖させる技術（自然界における生理学上の生殖又は組換えの障壁を克服する技術であって伝統的な育種及び選抜において用いられない技術に限る。）

2 宿主

組換えDNA技術において、DNAが移入される生細胞及び個体

3 ベクター

目的とする遺伝子又はDNAを宿主に移入し、増殖させ、又は発現させるため当該遺伝子を運搬するDNA

4 挿入遺伝子

ベクターに挿入される遺伝子

5 挿入DNA

ベクターに挿入されるDNA

6 供与体

挿入DNAを提供する微生物又は動植物等

7 発現ベクター

新たな性質を賦与させるために構築された挿入遺伝子又はDNAを含むベクター

8 組換え体

組換えDNAを含む宿主

9 遺伝子産物

挿入遺伝子の塩基配列から予想されるRNA又はタンパク質

10 遺伝子組換え微生物

組換えDNA技術を応用して得られた微生物（細菌、酵母、糸状菌）

第3 対象となる添加物及び目的

本基準は、遺伝子組換え添加物の安全性評価を行うに当たって必要とされる評価の基準を定めることを目的とする。

本基準において対象とする遺伝子組換え添加物は、食品衛生法で認められている添加物の範囲内であるものとし、原則として、「組換えDNA技術によって最終的に宿主に導入されたDNAが、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物のDNAのみである場合」、又は「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当する微生物を利用して製造されたものは含めないものとする。但し、当該添加物のヒトの健康に及ぼす影響の内容及び程度が明らかでないと判断された場合には、必要に応じて、その影響を検討することとする。また、製造に用いられた遺伝子組換え微生物（組換え体）が残存する場合は、別途定める遺伝子組み換え食品（微生物）に係る安全性評価の基準を同時に満たす必要がある。

なお、遺伝子組換え添加物の研究開発・製造及び上市における環境、倫理、道徳、社会経済に係る事項の審査を目的とするものではない。

第4 遺伝子組換え添加物の安全性評価の原則と基本的な考え方

遺伝子組換え添加物に関しては、一般に、組換え体そのままを食する遺伝子組換え食品とは異なり、最終産物としての添加物製品の安全性評価を行うことが適切である。この点で、遺伝子組換え添加物に組換えDNA技術の応用に起因する新たな有害成分が存在していないことが重要である。

従って、遺伝子組換え微生物（組換え体）を利用して、微生物起源の添加物を製造するような場合には、従来の添加物に新たに加えられる組換え体由来成分を中心に安全性評価を行うことが合理的である。

しかし、遺伝子組換え微生物を利用して、動物性の酵素を製造するような例においては、従来の添加物と遺伝子組換え添加物の有効成分の比較に加えて、組換え体と安全な使用経験のある宿主のそれぞれに由来する夾雑物等の非有効成分の比較を行い、組換え体由来成分に係る安全性評価を行うことが必要である。

いずれにおいても、当該添加物の製造に用いられた組換え体（遺伝子組換え微生物）について、既存の宿主との比較における安全性評価を行う必要がある。その評価においては、意図的に生産された有効成分の質的及び量的な変化に加えて、非意図的に混入するおそれのある夾雑物等の非有効成分の質的及び量的な変化についても、考慮する必要がある。

一方、添加物は、その性質、用途、製法等の点において、極めて多岐に亘っているものである。また、高分子の添加物、特に食品用酵素に関しては、食品の製造過程で変性・失活する場合が多く、食品から最終的に除去されることも多い。このため、遺伝子組換え添加物に関しては、必要に応じて、当該添加物の精製の程度、その使用形態及び食品中での残存等も考慮し、ケースバイケースで安全性評価を行う必要がある。

以上のような原則に立って、以下の基本的な考え方に従って、安全性の評価を行う。

- 1 遺伝子組換え添加物の安全性評価が可能とされる範囲は、原則として、添加物製造への利用経験又は食品としての食経験のある非病原性の宿主に由来する組換え体の利用に限り、食品衛生法で認められている添加物との比較が可能である場合とする。
- 2 遺伝子組換え添加物の安全性に関しては、組換えDNA技術によって宿主に賦与されることが予想される全ての形質の変化について、これらがヒトの健康に対し予期せぬ有害影響を与える可能性がないことを明らかにするための評価を行う。

このような組換え体の安全性評価において考慮すべき形質としては、栄養阻害物質、内因性毒素、アレルギー誘発性物質、生理学的活性物質、遺伝子導入に起因する組換え体における代謝経路の変化に基づく二次的影響等が挙げられる。

- 3 原則で述べたように、遺伝子組換え添加物においては、組換え体をそのまま食する訳ではなく、その製造方法、利用の方法及び形態が、それ自体を食する遺伝子組換え食品の場合とは異なっていることから、安全性評価において重点を置くべき点も異なってくる。すなわち、必要に応じて、遺伝子組換え添加物の精製の程度、その使用形態及び非意図的に混入するおそれのある夾雑物等の非有効成分も含めた食品中での残存等も考慮し、製品毎にケースバイケースで安全性評価を行うことが合理的である。

例えば、組換え体が添加物の製造に使用されるものの、遺伝子産物そのものが添加物の有効成分でなく、代謝産物が有効成分である場合(リボフラビン等)には、組換え体に由来する有効成分以外の新たな成分が添加物に残存しないか、又はその成分の安全性に問題がないことを明らかにすることが重要である。

また、有効成分以外の新たなタンパク質が組換え体で産生され、最終的に、遺伝子組換え添加物より除去されない場合には、当該タンパク質の毒性やアレルギー誘発性等の有害作用についても安全性評価を行う必要がある。

また、遺伝子組換え添加物が食品用酵素に該当する場合で、当該遺伝子組換え添加物が、アミノ酸置換を伴うような場合には、必要に応じて、毒性やアレルギー誘発性等の有害作用についても評価する必要がある。

- 4 安全性評価のために行う試験は、科学的に信頼できる概念と原則に従うと共に、必要に応じGLPに従って計画・実施されるべきである。また、原データは要求に応じて提出されるべきである。安全性評価に必要とされるデータ又は情報としては、

開発者等が作成する実験データの他に、既に公開された科学論文や、第三者からの情報等があるが、それらのデータは科学的に信頼できる方法を用いて入手し、適切な統計学的技術を用いて解析されている必要がある。また、分析方法には可能な限り定量下限値が示されるべきである。

- 5 現在、抗生物質耐性マーカーとして使われているカナマイシン耐性遺伝子等は、適切に安全性の評価がなされたものであり、直ちに安全性上問題となるものではない。なお、今後の遺伝子組換え添加物の製造に利用される遺伝子組換え微生物の開発においては、安全性が十分に評価され、かつ抗生物質耐性マーカー遺伝子を用いない形質転換技術を容易に利用できる場合には、その技術を用いることも考慮されるべきである。
- 6 組換えDNA技術については、日々進歩しているものであり、本安全性評価基準に関しても、技術の進歩に伴って、必要に応じた見直しを行っていく必要がある。

第2章 遺伝子組換え添加物の安全性評価基準

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

次の1から6までの事項の概略を記し、遺伝子組換え添加物の安全性評価を行う上で必要とされる比較対象として食品衛生法で認められている添加物が存在すること、また、その製造に用いられる組換え体の由来する宿主の性質が明らかであること、並びに、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が明確であることを示すことが必要である。

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
- (2) 製造方法
- (3) 用途及び使用形態
- (4) 摂取量

2 宿主及び導入DNA

- (1) 宿主の種名(学名)、株名等及び由来
- (2) DNA供与体の種名、株名又は系統名等及び由来
- (3) 挿入DNAの性質及び導入方法

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

4 宿主の構成成分等に関する資料

宿主に含まれる有害生理活性物質・栄養阻害物質(栄養素の消化・吸収等を阻害する物質)等がある場合は、その種類及び量の概要

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
- (2) 製造方法

(3) 用途及び使用形態

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

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

当該遺伝子組換え添加物及び組換え体と比較対象となり得る従来の添加物及び宿主等があると判断されれば、それらとの比較において、第2以下の各事項に掲げられた項目に沿って審査を行う。

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)等に関する事項

学名、株名等が明らかであり、その宿主(微生物)が添加物製造に安全に利用されてきた経験、食用に利用されてきた歴史(食文化)又は産業上の使用経験等が明らかであること。

2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

宿主は非病原性であること。また、有害生理活性物質を産生する場合、その種類、作用及び量が明らかであること。必要に応じて、宿主のアレルギー誘発性に関する知見が明らかであること。

3 寄生性及び定着性に関する事項

宿主が、ヒトや他の生物に寄生又は定着するか否かが明らかであり、寄生・定着する場合、ヒトや他の生物に悪い影響を与えるか否かが明らかであること。

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

当該組換え体の開発に用いた宿主が病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないこと。

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

宿主の近縁株において、病原性がある場合や有害生理活性物質を産生するものがある場合、遺伝子組換え添加物の製造に用いた当該微生物においては、同様の病原性や有害生理活性物質の産生等の有無について明らかであること。なお、有害生理活性物質等の産生が認められる場合には、当該微生物を用いた製造に安全性上の問題がないと判断できる合理的な理由があること。

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

遺伝子導入のために利用されたプラスミド等のベクターの名称及び由来が明らかであること。また、ヒトに対する有害性が知られていないこと。

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

DNAの塩基数、塩基配列が明らかであること。さらにその塩基配列が公開されている場合には、公開データベースにおける登録番号が明らかであること。

- (2) 制限酵素による切断地図に関する事項
ベクターの切断地図が明らかにされていること。この場合、用いた制限酵素の名称の他、断片の数、サイズなどが明らかにされていること。
- (3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項
既知の有害なタンパク質を産生する塩基配列が含まれていないこと。
- (4) 薬剤耐性に関する事項
ベクター中に、薬剤耐性遺伝子が含まれている場合は、その遺伝子の性質が明らかであること。
- (5) 伝達性に関する事項
原則として、伝達性(ベクターが宿主となる微生物から他の菌株へ自ら移動(水平伝播)できる性質)がないこと。伝達性がある場合は、伝達域が明らかであること。
- (6) 宿主依存性に関する事項
組換えに用いられたベクターが、他の微生物又はヒトでは増えないこと。他の微生物で増える場合は、宿主域が明らかであること。

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
名称、由来及び分類が明らかであること。
 - (2) 安全性に関する事項
 - ・挿入DNAの供与体は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性が知られていないものであること。また、大腸菌(E.coli)のように病原性がある株が知られている場合、病原性がない株に由来することが明らかであること。
 - ・供与体に病原性又は毒素産生性があることが知られている場合、挿入DNA自身に毒素産生性がなく、挿入DNA由来のタンパク質に病原性がないことが明らかであること。
 - ・挿入遺伝子の供与体に関して、安全な摂取の経験の有無が明らかにされていること。
- 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
挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法が明らかであること。
 - (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
宿主に導入しようとするDNA断片について、塩基数及び塩基配列が明らかであること。また切断地図が明らかにされ、制限酵素の名称、断片の数・サイズなどが明らかにされていること。
 - (3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

挿入遺伝子の機能及び挿入遺伝子から産生される遺伝子産物（RNA及びタンパク質）の性質、機能等が明らかであり、そのタンパク質が有害作用をもたないと判断できる合理的な理由があること。

特に、当該遺伝子産物（タンパク質）がアミノ酸置換等を伴い、食品用酵素としてそのまま使用されるような場合には、必要に応じ、食品製造工程での使用形態や最終食品における推定残存量等を考慮した上で、当該遺伝子産物（タンパク質）の毒性やアレルギー誘発性等の有害作用について安全性上の問題がないと判断できる合理的な理由があること。

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

用いたプロモーターの由来、性質等が明らかであること。

(2) ターミネーターに関する事項

用いたターミネーターの由来、性質等が明らかであること。

(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。

4 ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項

ベクターへの挿入DNAの組込方法が明らかであること。具体的には、

- ・宿主へ導入する発現ベクターの作製方法。特に複数の遺伝子及び遺伝子断片を結合しようとする場合には、その作製方法も記載すること。
- ・ベクターにプロモーター、オープンリーディングフレーム、ターミネーター、並びに抗生物質耐性マーカー遺伝子を導入した順序及び方法が明らかであること。

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

構築された発現ベクターについて、挿入DNAの塩基数及び塩基配列が明らかであること。また切断地図が明らかにされ、制限酵素の名称、断片の数・サイズなどが明らかにされていること。

(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。仮に、目的以外のタンパク質を発現する可能性のある遺伝子が含まれている場合は、当該遺伝子及びその遺伝子が発現するタンパク質は安全性に問題のないと判断できる合理的な理由があること。

(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。

(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。

6 DNAの宿主への導入方法に関する事項

発現に用いるプラスミドやDNA構築物等、挿入遺伝子の宿主への導入方法が明らかであること。具体的には、

- ・ DNAの宿主への導入方法（相同組換えなどの技術を利用することにより、必要とされるDNAのみを残し、組換え体から最終的にベクターを排除する場合は、その方法）
- ・ 選抜方法（DNAが導入された宿主を選抜する方法）が明らかであること。

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

抗生物質耐性マーカー遺伝子が使用されている場合は、当該遺伝子及び遺伝子産物の構造及び機能が明らかであること。

また、添加物の製造工程において遺伝子及びその産物が安全性に問題のない程度まで除去されることが明らかでない場合は、次の事項について組換え体内における変化等の考察も含め、総合的に判断して、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性が確認されること。

(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項

・ 構造及び機能

挿入した抗生物質耐性マーカー遺伝子については塩基配列が明らかであり、これ以外の有害塩基配列を含まないこと。

遺伝子産物（タンパク質）については機能が明らかであること。また、必要に応じ、基質特異性が明らかであること。

遺伝子産物について、既知のアレルゲン等と一次構造を比較し、構造相同性を有しないこと。

・ 耐性発現の機序、使用方法及び関連代謝産物

抗生物質の使用方法（経口、静注等）が明らかであること。耐性発現の機序が明らかであること。耐性発現に関連する代謝物質が安全性に問題のないものであると判断できる合理的な理由があること。

・ 同定及び定量方法

抗生物質耐性遺伝子由来の遺伝子産物（タンパク質）の同定及び定量方法があり、発現量が明らかであること。

・ 遺伝子産物（タンパク質）の各種処理に対する感受性

人工胃液による酸及び酵素処理、人工腸液によるアルカリ及び酵素処理、加熱等の物理的処理によって、遺伝子産物（タンパク質）の分子量、酵素活性、免疫反応性等が変化するかが明らかにされており、安全性に問題ないものであると判断できる合理的な理由があること。

・ アレルギー誘発性

遺伝子産物（タンパク質）について、アレルギー誘発性に関する知見が明らかにされていること。

(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項

- ・ 耐性の対象となる抗生物質の使用状況（使用方法、使用量、使用目的等）が明らかであること。

- ・挿入された抗生物質耐性マーカー遺伝子の由来は、通常存在する抗生物質耐性菌と同様のものであること。
- ・抗生物質耐性マーカー遺伝子の遺伝子産物（タンパク質）の摂取量、調理過程及び消化管内における分解量、抗生物質の使用状況等から、検討した抗生物質の不活化に伴う問題がないと判断できる合理的な理由があること。

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

組換え体と宿主等を比較したデータにより、非病原性及び有害生理活性物質の非生産に関する差異が明らかであり、安全性に問題のないものであること。

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

宿主に導入されたDNA断片について、切断地図が明らかにされていること。なお、この場合、用いた制限酵素の名称、断片の数、サイズ及びサザンブロットング解析パターンが明らかにされていること。

(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

- ・原則として、導入したDNAには、目的以外のタンパク質を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と判断できる合理的な理由があること。なお、その確認に当たっては、目的のタンパク質以外のタンパク質を発現する可能性がないことが、ノーザンブロットング法、RT-PCR法等を用いて確認できていること。
- ・仮に、目的以外のタンパク質を発現する可能性のある遺伝子が含まれている場合は、当該遺伝子及びその遺伝子が発現するタンパク質はアレルギー誘発性を含め、安全性に問題のないと判断できる合理的な理由があること。

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

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。

(1及び2について確認できない場合は、食品又は添加物の製造原料又は製造器材についての安全性が明らかであること。)

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

諸外国における認可状況に関する情報が明らかにされていること。また、添加物として利用されているか否かに関する情報が明らかにされていること。

2 組換え体の残存に関する事項

組換え体が残存するか否かの確認は、最も適切な工程における試料を用いてドッ

トブロットハイブリダイゼーション法等の適切な試験により実施すること。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

製造に由来する非有効成分の含有量が、従来の添加物に比べ有意に増加しておらず、かつ、従来の添加物には存在しない非有効成分を含有しないこと。それ以外の場合においては、非有効成分について安全性に問題がないと判断できる合理的な理由があること。

4 精製方法及びその効果に関する事項

添加物の精製方法及びその効果が明らかであり、製造工程において混入する可能性のある有害物質の種類及び量を予測することができ、安全性の上から問題がないと判断できる合理的な理由があること。

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

含有量の変動により有害性が示唆される常成分にあっては、その濃度の変動について、従来の添加物と同等であること。仮に変動があっても、安全性の上から問題がないと判断できる合理的な理由があること。

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
次のうち、必要と考えられる試験成績に基づき、添加物としての安全性が確認できること。

(1) 急性毒性に関する試験

(2) 亜急性毒性に関する試験

(3) 慢性毒性に関する試験

(4) 生殖に及ぼす影響に関する試験

(5) 変異原性に関する試験

(6) がん原性に関する試験

(7) その他必要な試験(腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等)