資料１

（案）

遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の食品健康影響評価に関する技術的文書

令和〇年〇月〇日

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目　　次

１　目的

内閣府食品安全委員会において、「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、これまで評価を行ってきた事例を踏まえ、個別評価の中で積み重ねた評価の考え方を整理するとともに、科学技術の進歩に即した新たな解析技術や評価手法への対応を明示的に示すことを目的として、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物に関する食品健康影響評価指針」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定（一部改正：令和６年６月 25 日）。以下「指針」という。）を補完する文書として、本文書を作成することとする。

なお、最新の科学的知見や国際的な安全性評価に係る動向等を踏まえ、適宜、見直しを行うこととする。

２　対象となる添加物について

指針の第１章第２の「目的及び対象となる添加物」に記載のとおり、指針の対象となる遺伝子組換え添加物は、食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）で認められている添加物の範囲内のものであり、これまでの評価事例では、酵素、香料、ビタミン類等が挙げられる。

なお、遺伝子組換え微生物を利用して製造された酵素の添加物としての指定要請又は規格基準改正については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された酵素を新たに添加物として指定すること等について、食品安全基本法第 24 条の規定に基づき意見を求められた場合の取扱いについて」（平成 30 年 10 月 16 日食品安全委員会決定）に基づき、添加物専門調査会において調査審議を行うこととされている。

> 事務局：本技術的文書は、主に、食品用酵素などの遺伝子組換え添加物を対象としています。高度精製添加物については、指針の別添「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性確認の考え方」に基づき、別途検討する方針でよろしいでしょうか。

３　遺伝子組換え添加物に関する食品健康影響評価

（１）食品健康影響評価において比較対象として用いる添加物、宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び遺伝子組換え体との相違に関する事項【指針第２章第２関係】

指針の第１章第４「遺伝子組換え添加物の食品健康影響評価に際しての原則と基本的な考え方」で示されているとおり、遺伝子組換え添加物に関しては、一般に、遺伝子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食品健康影響評価を行うことが適切である。

その際、当該添加物の製造に用いられる宿主に病原性、毒素又は他の代謝産物の産生に関して安全性上の問題がないことや、最終的に宿主に導入された遺伝子とその供与体について安全性の確認を行うことに加え、遺伝子組換え添加物の有効成分や遺伝子組換え体に由来する非有効成分を中心に安全性の確認を行うことが重要である。遺伝子組換え体の安全性の確認においては、遺伝子導入により、栄養阻害物質、内因性毒素、アレルギー誘発性物質及び生理学的活性物質の産生並びに遺伝子組換え体の代謝経路の変化に基づく二次的影響が認められないことを考慮すべきである。また、上記のほか、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についても考慮する必要がある。

事務局：指針の第１章第４「遺伝子組換え添加物の食品健康影響評価に際しての原則と基本的な考え方」で示されている、遺伝子組換え体の安全性の確認において考慮すべき形質を追記いたしました。

（２）従来の添加物の性質、用途等に関する事項【指針第２章第２の１関係】

ア　名称、基原及び有効成分【指針第２章第２の１（１）関係】

組換え DNA 技術により付与された形質等を明らかにするため、従来の添加物が設定され、その名称、生産菌/生物（基原）（学名）、有効成分等が明らかであることを確認する。

食品用酵素では、比較対象として用いる添加物は、食品衛生法で認められている添加物であり、原則として、既存添加物名簿（平成８年厚生省告示第 120

号）に収載されており、「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）で規格等が定められているものが該当する。なお、評価対象の酵素は、酵素番号（EC 番号）や酵素活性に関する情報から、比較対象となる酵素と類似の反応を触媒するものであることを確認する。

イ　製造方法【指針第２章第２の１（２）関係】

食品用酵素等の添加物の原体の製造工程について、図~~など~~等を用いて明らかにされていることを確認する。

通常、生産菌株から得られた有効成分と非有効成分を含む混合物を、ろ過、限外ろ過（精製・濃縮）その他の方法を用いて精製する。この精製では、単一の化学構造式で示される物質への高純度化を目的とするものとは異なり、比活性に基づく濃縮又は非有効成分の除去を目的に行われる。したがって、食品用酵素等の添加物の原体は、単一の化学構造式で示される物質ではなく、生物由来成分、培地由来成分その他の非有効成分を含む可能性がある。

ウ　摂取量【指針第２章第２の１（４）関係】

従来の添加物の摂取量の推計にあたっては、国民健康・栄養調査結果や行政機関が公表している食品摂取量データ、関連の生産量統計等を参考にし、原則として、使用対象食品の一日摂取量に添加物の使用量を乗ずることにより、日本人における平均一日摂取量が算出されていることを確認する。食品用酵素の使用量としては、全量がそのまま最終食品に移行して消費されることを想定する場合には、一般的に使用される条件下での最大添加量を用いて算定されていること。

なお、酵素等のタンパク質の場合、濃縮の程度によって重量が変動することから、酵素量を示す際には原則として総有機固形分（TOS）[1] を用いることとする。

[1] TOS を用いるに当たって、%TOS は以下の式で算出する。
%TOS=100-(A+W+D)（A：%灰分、W：%水分、D：%賦形剤その他の製剤成分）

（３）宿主に関する事項【指針第２章第２の２関係】

指針第２章第２の２「宿主に関する事項」の（１）から（６）までの事項について、適切な文献や資料により明らかにされていることを確認する。

ア　宿主の種名（学名）、株名等及び由来【指針第２章第２の２（１）関係】

宿主の種名（学名）、株名等及び由来（取得方法）が明らかであり、宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する事項や宿主の構成成分等に関する情報が明らかであることを確認する。

なお、宿主（微生物）の学名は変更されることがあるため、適切な文献や資料により当該微生物の由来が明らかであることを確認する。

中島先生：微生物の学名はしばしば変更されるので、その場合も適切な文献や資料により当該微生物の由来を明らかにすれば良いと読み取れるようにする必要があると思います。この技術的文書（案）もそのように読み取れると思いますが、改めて明記する必要はないでしょうか。 事務局：ご指摘の内容を追記いたしました。

イ　宿主の構成成分等に関する事項【指針第２章第２の２（３）関係】

宿主の構成成分について、例えば、国立感染症研究所病原体等安全管理規程の BSL レベル、病原性及び有害生理活性物質の生産に関する文献等報告、産生物質のアレルゲンデータベース検索等の情報を整理した上で、以下の内容を踏まえ、特に宿主由来の非有効成分の安全性に問題がないか確認する。

宿主は、十分に特徴付けられ、かつ安全な菌株系統から派生したものであり、非病原性、非毒素産生性であることを確認する。

宿主が有害生理活性物質及び栄養阻害物質等を生産又は含有する場合は、その種類、作用及び量が明らかにされていること。

（４）挿入 DNA に関する事項【指針第２章第２の３関係】

挿入 DNA が複数ある場合には、食品健康影響評価のための資料において、各挿入 DNA の供与体の種名、株名又は系統名及び由来等の情報並びに挿入 DNA の性質

が表形式で示されていることを確認する。

（５）遺伝子組換え添加物の性質、用途等に関する事項【指針第２章第２の４関係】

ア　製品名及び有効成分【指針第２章第２の４（１）関係】

従来の添加物との違いが明らかになるように製品名等が示されていることを確認する。

イ　用途及び使用形態【指針第２章第２の４（３）関係】

従来の添加物と異なる場合には、その用途等の情報が明らかにされていることを確認する。

ウ　推定摂取量【指針第２章第２の４（４）関係】

評価対象の遺伝子組換え添加物が食品からどの程度摂取されるか推定することは、アレルギー誘発性等のリスクを評価する上で重要である。添加物は、食品の製造工程等で変性・失活する又は分解・除去されるものもあり、使用対象食品に全量が残留すると仮定して摂取量を推計すると、過剰な見積もりとなることがある。

食品用酵素は、食品又は食品原料を工業規模で製造するための様々な食品製造プロセスで使用されており、酵素が食品の製造工程で用いられる際の詳細情報を加味した精緻な摂取量推計を行うこともできる[2]。

~~具体的には、EFSA では、食品用酵素の食事ばく露を推定するための技術文書が示されている。食品喫食量データと各製造プロセスにおける酵素の使用量を用いて、食品中の原料割合など技術的な換算係数を適用して、摂取量を TOS/kg として算出する方法やそのための計算ツールが提供されている（https://zenodo.org/）。また、酵素が食品製造に用いられる場合の製造プロ~~

[2] 例えば、EFSA の「食品用酵素ドシエ（申請者）提出のための科学的ガイダンス」（2021）においては、食品用酵素の食事ばく露を推定する際、食品喫食量データと各製造プロセスにおける酵素の使用量を用い、食品中の原料割合等技術的な換算係数を適用して、推定摂取量を TOS/kg として算出する方法やそのための計算ツールが提供されている　（https://www.efsa.europa.eu/en/applications/food-improvement-agents/tools）。

~~セスの例もリスト化されており[3]、これらを参考に用途が限定される場合には、より精緻な摂取量推計を行うことが可能であり、~~その際には推計結果の詳細が示されていることを確認する。

（６）食品健康影響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遺伝子組換え体と宿主等の相違点に関する事項【指針第２章第２の５関係】

遺伝子組換え添加物と従来の添加物の比較について、項目ごとに行い、表形式で記載されていることを確認する。項目として、名称、至適 pH、至適温度、基原、アミノ酸残基数、反応特異性~~など~~等を確認する。

~~3~~ 4　遺伝子導入に用いる塩基配列（挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築）に関する事項

（１）ベクターの名称及び由来に関する事項【指針第２章第３の１関係】

遺伝子導入のために利用されたベクター及び遺伝子発現カセットの名称や由来、構造についてマップが示されていることを確認する。

（２）ベクターの性質に関する事項【指針第２章第３の２関係】

ア　ベクターの塩基数及びその塩基配列を示す事項

ベクターの塩基数、構成遺伝子要素、由来及び機能、塩基配列、制限酵素による切断地図~~など~~等が明らかであり、図として示されていることを確認する。

なお、サザンブロッティングを行った場合には、ベクターの切断地図が明らかであり、用いた制限酵素の名称のほか、断片の数、サイズ及び電気泳動パターンが明らかにされていることを確認する。

~~[3] EFSA の「食品用酵素ドシエ（申請者）提出のための科学的ガイダンス」(2021) の別添 D において、食品用酵素が食品製造に用いられる場合の製造工程の例がリスト化されている。食品用酵素の食事ばく露を推定する際、食品喫食量データと各製造プロセスにおける酵素の使用量を用いて、食品中の原料割合等技術的な換算係数を適用して、推定摂取量を TOS/kg として算出する方法やそのための計算ツールが提供されている (https://www.efsa.europa.eu/en/applications/food-improvement-agents/tools)。また、酵素が食品製造に用いられる場合の製造プロセスの例もリスト化されており 、これらを参考に用途が限定される場合には、より精緻な摂取量推計を行うことが可能であり、~~

イ　既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

ベクター~~や導入遺伝子の供与体の情報から、コンストラクト~~の配列に有害生理活性物質を産生する塩基配列が含まれていないことを確認する。

事務局：本項目及び次の項目は、指針第２章第３の２「ベクターの性質に関する事項」における確認事項であり、指針に合わせ、「コンストラクト」を「ベクター」に修正しました。

ウ　遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項

~~コンストラクト~~ベクター中に遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子が導入されている場合には、その導入遺伝子について、例えば、抗生物質耐性遺伝子、~~農薬耐性遺伝子~~栄養要求性遺伝子~~又は蛍光色素タンパク質遺伝子のような~~等の性質が明らかであり、機能の概略が示されていることを確認する。また、生産菌株に残存しない場合は、除去されていることを示すデータを確認する。

事務局：「ウ　遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項」の記述は、「遺伝子組換え食品（種子植物）の食品健康影響評価に関する技術的文書」と同様の記述としていましたが、遺伝子組換え微生物の選抜に関わる遺伝子については、これまでの評価実績を踏まえ、「農薬耐性遺伝子」を削除し、「栄養要求性遺伝子」を追記いたしました。ご確認をお願いいたします。

中島先生：ベクターに含まれる選択用遺伝子には、amdS（アセトアミド資化性）などの例もあります。「・・など」の文言が必要と思います。また、あまり列挙してもきりがないので、蛍光色素タンパク質遺伝子（特殊な場合に限られるため）は削除しても良いでしょう。

エ　伝達性等に関する事項

導入遺伝子がプラスミドとして染色体外に独立して維持される場合は、プラスミドの可動性（伝達性）を評価する。その際には、プラスミドの宿主内にお

けるコピー数及び安定性（伝達性）に関する情報が明らかであることを確認する。~~遺伝子の導入に用いられる~~当該プラスミドは、原則として、宿主となる微生物から他の菌株へ自ら移動ができる性質を有していないことを確認する。伝達性を有するプラスミドが用いられている場合には、その伝達域が明らかにされていることを確認する。また、プラスミドが、自律的可動性を示す配列を有する可能性がある場合には、その詳細について明らかにされていることを確認する。

~~導入遺伝子が、プラスミドとして染色体外に独立して維持される場合と導入遺伝子が染色体に組み込まれる場合に分けて確認を行う。~~

~~①　導入遺伝子がプラスミドとして存在する場合、プラスミドの可動性（伝達性）を評価する。その際には、プラスミドの宿主内におけるコピー数及び安定性（伝達性）に関する情報が明らかであること。~~

~~②~~ 導入遺伝子（発現カセットを含む。）が宿主の染色体に組み込まれる場合は、~~種子植物に準じて評価を行う。その際には、~~染色体上の導入座位等の情報及びコピー数に関する情報が明らかであること。また、標的遺伝子が宿主の染色体上に複数コピー~~が~~導入される場合、一般に、同一座位にタンデムコピーとして導入されることが知られていることから、導入された塩基配列に関する情報及び~~、~~コピー数に関する情報が明らかであることを確認する。なお、染色体への導入に用いたベクターの性質により、安定性及び伝達性の情報が必要な場合には、ベクター等に関する情報として示されていること。

事務局：「種子植物に準じて評価を行う」という部分と、「エ　伝達性等に関する事項」の最初の段落の内容に重複がありましたので、記載を整理しました。

中島先生：植物の場合は導入遺伝子がプラスミドとして染色体外に維持されることはなく、原案のように、「遺伝子の導入に用いられるプラスミドは・・・」と伝達性について記述して良いと思います。一方、細菌などの微生物については、導入したプラスミドがそのまま維持される場合と、導入プラスミドの一部（標的遺伝子の領域）が宿主の染色体に組み込まれて維持される場合の2通りがありますので、原案の記述は分かりにくいと思います。

修正案ですが、「伝達性等に関する事項」では、まず「導入遺伝子がプラスミドとして染色体外に独立して維持される場合は、プラスミドの可動性（伝達性）を評価する。・・・」を記述します。プラスミドのコピー数に関する情報は、標的遺伝子のコピー数と発現量を推定するために有益な情報です。

次に、「導入遺伝子が宿主の染色体に組み込まれる場合は、」を説明するのが良いでしょう。微生物の場合、「遺伝子の導入に用いられるプラスミド」の伝達性について確認する必要はないと考えます。微生物の場合は、標的遺伝子が染色体に組み込まれて導入用のプラスミドが除かれた 1 匹の菌を選んで増殖させて用います。植物のように組換え体が根や葉をもつ個体に生育する間の、一過性プラスミドの伝達性を心配する必要はありません。Line 199 – 203 は微生物の場合は削除して良いと考えます。

次に、「また、複数コピーが導入される場合、タンデムコピーとして導入されることが知られていることから、・・・」とありますが、複数の選択マーカーを用いて染色体の複数の座位に導入することもありますので、誤解のないように記述を工夫する必要があるかと思います。修正案ですが、「また、標的遺伝子が宿主の染色体上に複数コピー導入される場合、一般に同一座位にタンデムコピーとして導入されることが知られていることから、導入された塩基配列に関する情報、コピー数に関する情報について確認する」で良いでしょう。できれば、挿入座位についての情報も欲しいところですが（隣接遺伝子への影響が評価できる）、必ずしも必須ではないでしょう。

（３）挿入 DNA の供与体に関する事項【指針第２章第３の３関係】

挿入 DNA ごとの供与体の安全性が明らかであることを確認する。これまでに遺伝子組換え食品又は遺伝子組換え添加物の製造に用いられた実績や文献等の情報を整理した上で、安全性に関する懸念がない旨が明らかにされていることを確認する。

事務局：挿入 DNA の供与体の安全性に関する確認において、「遺伝子組換え添

加物の製造に用いられた実績」に加え、「遺伝子組換え食品の製造に用いられた実績」に関する情報でも差し支えないでしょうか。

児玉先生：供与体のところであれば、差し支えないです。

中島先生：挿入 DNA の供与体については、「GM 添加物」の製造実績に加えて、「GM 食品」の製造に用いられた実績に関する情報で良いと考えます。

事務局：「遺伝子組換え食品又は遺伝子組換え添加物の製造に用いられた実績」に修正いたしました。

（４）導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項【指針第２章第３の４関係】

導入遺伝子及び遺伝子産物の機能が適切な文献や資料により明らかにされていることを確認する。食品用酵素の場合、導入遺伝子の塩基配列に基づくアミノ酸配列から、比較対象とされた酵素のアミノ酸配列（活性中心の配列等）との相同性、酵素活性や基質特異性に関する情報~~など~~等を確認する。

（５）導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の発現に関わる領域に関する事項【指針第2章第3の5関係】

プロモーター、ターミネーター、その他導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、性質が明らかであること。遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子には、~~従来の~~抗生物質耐性マーカー遺伝子等に加え、栄養要求性遺伝子~~など~~等に関する事項が整理されていることを確認する。

（６）ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項【指針第２章第３の６関係】

宿主へ導入するコンストラクトについて、挿入 DNA のクローニング又は合成方法が明らかであることを確認する。ベクター及び発現カセットの各構成要素から、最終的なコンストラクトを作製した方法が明らかであり、図等を用いてわかりやすく整理されていることを確認する。

なお、各段階の詳細な説明は、コンストラクト名、カセット名、プラスミド名~~など~~等で明確に区別されていることを確認する。

（７）構築されたコンストラクトに関する事項【指針第２章第４の７関係】

　原則として、コンストラクトの構成要素ごとに略号、コンストラクト上の位置、サイズ、配列、由来及び機能について、主に表形式で整理されており、完成したコンストラクトの全体構成が把握できる記載となっていることを確認する。コンストラクトの構成要素ごとの配列及び機能が記載されていれば、その由来等の確認は省略できる場合[4]もある。略号については、原則として学術的及び一般的に広く用いられているものがある場合には、それが記載されていることを確認する。なお、サザンブロッティングを行った場合には、制限酵素の名称、断片の数及びサイズ~~など~~等が明らかにされていることを確認する。

５~~４~~　遺伝子組換え体に関する事項

（１）宿主との差異に関する事項【指針第２章第４の１関係】

　生産菌と宿主との差異について、~~発現遺伝子や他の機能など~~遺伝子改変の内容~~から~~が明らかであることを確認する。遺伝子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を確認する。~~遺伝子導入により、栄養阻害物質、内因性毒素、アレルギー誘発性物質及び生理学的活性物質の産生並びに遺伝子組換え体の代謝経路の変化に基づく二次的影響が認められないことを確認する。~~

児玉先生：他の機能というのがよくわからないので、「差異について、遺伝子改変の内容から明らか」、「差異について宿主から生産菌までの過程で起こる遺伝子改変の全体の内容から明らか」などではどうでしょうか。欠失も多く行われるので、その影響も考慮する必要があるので、遺伝子改変というワードの方が適しているように思います。 事務局：修正いたしました。

[4] 例えば、環境から直接単離されるDNA断片等が使用される場合。

事務局：令和６年８月 29 日開催第２５３回遺伝子組換え食品等専門調査会でのご議論を踏まえ、修正いたしました。

事務局：指針第２章第４の１「宿主との差異に関する事項」における記載と整合するよう、確認内容の記載を修正いたしました。

（２）遺伝子導入に関する事項【指針第２章第４の２関係】

ア　コピー数及び挿入近傍配列に関する事項【指針第２章第４の２（１）関係】

コンストラクト、遺伝子発現カセット又は欠失導入用カセットを宿主に導入する方法が明らかであり、複数段階で DNA を宿主に導入する場合には、宿主から生産菌までの過程で起こる遺伝子改変の全体をフロー図~~など~~等で確認する。

遺伝子組換え体に係る安全性の評価においては、挿入配列及びその近傍配列について、原則として全ての塩基配列が明らかにされており、導入遺伝子の構造、コピー数、大きさ及びオープンリーディングフレーム（以下「ORF[5]」という。）解析により目的外のタンパク質を遺伝子組換え体内で発現する ORF が含まれないこと等を明らかにしていることを確認する。

また、ベクターのうち導入遺伝子以外の領域（ベクターバックボーン[6]）が宿主のゲノムに挿入されているかどうかに関して解析を行い、その結論が明らかであることを確認する。

その際の解析技術の例として、最新の手法等を用いた DNA シーケンシングによる、全ゲノム塩基配列解析、導入遺伝子及び近傍領域の塩基配列解析、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を応用した導入遺伝子領域の解析、サザンブロッティング法やその原理を取り入れた配列捕捉法による解析（Southern-by-Sequencing（SbS）解析等）~~など~~等がある。

---

5 ORF とは、終止コドン（タンパク質合成行程の終了を指定する塩基配列）に中断されずにタンパク質へと転写・翻訳される可能性のある塩基配列。分子生物学では一般的に、開始コドンから終止コドンの領域を ORF とするが、遺伝子組換え食品等に関する食品健康影響評価指針においては、様々な翻訳開始の可能性を考え、終止コドンから終止コドンの領域とする。（出典：食品安全委員会「食品の安全性に関する用語集」）

6 ベクターバックボーンとは、遺伝子組換え体作製に使われたベクターに存在する塩基配列またはベクターに挿入された塩基配列であって、導入を目的とする遺伝子発現機能を有する領域の外側部分に存在する配列。これまで、食品安全委員会の遺伝子組換え食品等評価書において「外骨格領域」と記載していたものと同一。（出典：食品安全委員会「食品の安全性に関する用語集」）

実施した各解析について、そのプロトコール、データ処理方法及び結論が明らかであることを確認する。DNA シーケンシングによる解析については、使用した機器名、プロトコール、生データを評価解析データに変換する際に用いたアルゴリズムの概略やバージョン、解析対象ゲノム領域等が明らかであることに加えて、解析結果の信頼性に関する説明が妥当であることを確認する（詳細は別添参照）。

イ　ORF の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項【指針第２章第４の２（１）関係】

挿入配列及びその近傍配列において、既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び有害な生理活性タンパク質と相同性のある新規 ORF が形成されていないことを確認する。ORF 検索では、当該領域について６通りの読み枠（表３通り、裏３通り）について終止コドンと終止コドンに挟まれた領域を検索していることを確認する。ORF の検索条件は、目安として連続する 30 アミノ酸以上とし、それより少ない連続するアミノ酸数以上（例えば、連続する８アミノ酸以上）という条件でも差し支えない。ORF 検索の結果、確認された ORF について、Allergen Online[7]、Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE)[8]、Allergen Database for Food Safety (ADFS)[9]等のデータベースの最新版（最新バージョン）を用いて FASTA アルゴリズム等により相同性検索が行われていることを確認する（35%以上[10]の相同性を示す 80 アミノ酸以上の配列及び連続する８アミノ酸配列[11,12]との相同性）。また、NCBI protein database[13]等のデータベースを用いて、「allergy」、「toxicity」及び栄養阻害物質に関連するキー

---

[7] Allergen Online データベースは、ネブラスカ大学食品科学技術学部の食物アレルギー研究資源プログラム（FARRP）によって開発され、管理されているもの。
Allergen Online の URL: http://www.allergenonline.org/
[8] Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) の URL: https://comparedatabase.org/
[9] Allergen Database for Food Safety (ADFS)の URL：https://allergen.nihs.go.jp/ADFS/
[10] FAO/WHO: Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods _Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology 22 - 25 January 2001
[11] JECFA 第 80 回会合報告書である WHO Technical Report Series 995(2016)において、8 アミノ酸配列の連続一致検索が推奨されている。
[12] 連続アミノ酸の一致検索を行うことで、IgE 抗体との結合に関与する B 細胞エピトープに加えて、感作性に関与する T 細胞エピトープとの相同性についても確認を行うことが可能である。
[13] NCBI protein database の URL： https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/

ワードを用いて BLASTP 検索等で確認する。

~~また、ベクターのうち導入遺伝子以外の領域（ベクターバックボーン[14]）が宿主のゲノムに挿入されているかどうかに関して解析を行い、その結論が明らかであることを確認する。~~

これらの領域に目的以外のタンパク質を発現する可能性のある ORF が含まれる場合は、当該 ORF 及びその ORF が発現するタンパク質の安全性に問題ないと判断できる合理的な理由があることを確認する。

（３）遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合には、その遺伝子産物（抗生物質代謝酵素等）についても評価すること）【指針第２章第４の４関係】

遺伝子産物（タンパク質）は、そのアレルギー誘発性について評価を行う必要がある。その際、新たに発現したタンパク質は、特定個人が既に感受性を持つ可能性があるかどうか、また、食品を介して摂取することで、アレルギー反応を引き起こす可能性が高いかどうかを考慮する。

新たに発現したタンパク質のヒトへのアレルギー反応の予測において、以下の①から④までの事項に関して、総合的、かつ、段階的に安全性を判断することは、根拠となる情報の重要性に基づいて評価を行う WOE（weight of evidence） の考えに基づいている。これは、単一の情報や実験方法からではアレルギー誘発性を予測するための十分な証拠が得られないからである。従って、①から④までの事項により安全性が判断できない場合には、⑤の事項を含め、総合的に判断して安全性を確認する必要がある。一方で、合理的な理由がある場合には、①から④までの事項の一部を省略することができる。

①　導入遺伝子の供与体（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の供与体を含む。）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎[15]誘発性を含む。以下同じ。）

~~[14] ベクターバックボーンとは、遺伝子組換え体作製に使われたベクターに存在する塩基配列またはベクターに挿入された塩基配列であって、導入を目的とする遺伝子発現機能を有する領域の外側部分に存在する配列。~~
~~これまで、食品安全委員会の遺伝子組換え食品等評価書において「外骨格領域」と記載していたものと同一。~~
~~（出典：食品安全委員会「食品の安全性に関する用語集」）~~

[15] グルテン過敏性腸症又はセリアック病は、もともと遺伝的にその素因をもっている患者がグルテン（グリアジ

に関する事項【指針第２章第４の４（１）関係】

導入遺伝子の供与体に関して、アレルギー反応を誘発することが知られているかどうかを明らかにすることが重要である。当該情報が得られれば、アレルギー誘発性の評価において考慮すべき方法及び関連データが明らかになる。例えば、スクリーニングを目的とする血清の利用可能性、アレルギー反応の種類・程度・頻度に関する情報、タンパク質の構造的な特徴及びアミノ酸配列、供与体に由来する既知のアレルギー誘発性タンパク質の物理化学的特性~~など~~等があげられる。

なお、複数の導入遺伝子がある場合には、各々の供与体について安全性に関する事項が明らかであることを確認する。

②　遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギー誘発性に関する事項【指針第２章第４の４（２）関係】

遺伝子産物（タンパク質）について、そのアレルギー誘発性に関する知見を文献検索等により収集した情報をもとに明らかにされていることを確認する。

③　遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項【指針第２章第４の４（３）関係】

ア　人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理【指針第２章第４の４（３）①関係】

いくつかの食物アレルゲンでは、ペプシン処理に対する耐性が認められており、ペプシン処理（消化に対する安定性）は、アレルギー誘発性の指標の一つになるとされている[16]。適切な条件下でペプシンが存在する場合に分解に対するタンパク質の耐性が認められれば、新たに発現したタンパク質がア

ン）に反応して引き起こされるＴ 細胞性免疫反応である。この疾患で顕著なのは小腸の炎症で、罹患すると吸収不良を起こし体力消耗・貧血・下痢・骨痛その他の症状が現れる。患者は、一生を通じて小麦・ライ麦・大麦~~など~~等の穀物に含まれるグルテ ンの摂取を避けなくてはならない。(EFSA2022)

[16] 近年、ペプシン耐性試験に加えて、ヒトの生理学的条件を模倣した他の *in vitro* 消化性試験を用いて、新規発現タンパク質の消化に対する耐性を評価することが推奨されている（EFSA 2010)。現在使用されているペプシン耐性試験は、胃消化の生理学的条件を模倣するように設計された *in vitro* 消化性試験ではないが、ペプシンに対する感受性/耐性の識別の指標の一つであり、証拠の重み付けアプローチによる安全性評価の一部として、無傷の発現タンパク質による潜在的なばく露の最も有用な評価法として残っている（EFSA 2022)。

レルギー誘発性である可能性を調べるために更なる検討を行う必要がある。

人工胃液試験の結果生じたタンパク質断片の分子量を電気泳動等の分析結果によって確認する。分析結果については、酵素処理後の試料の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）による分離に続くタンパク質染色（CBB 染色等）、免疫反応性による可視化（特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法、ELISA 法等）、あるいはこれらと同等又は類似の方法によって示されていることを確認する。

その際、試験に供したタンパク質試料の初期量が示されているとともに、消化による試料タンパク質及びその低分子化断片（分子量約 3.5kDa 以上[17,18]）の経時的変化等が定性的又は定量的に示されていることが望ましい[19]。なお、本試験における酵素と基質の濃度や pH ~~など~~等の反応条件が試験結果に大きく影響する場合には、実施した試験条件と結果を確認する。

イ　人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理【指針第２章第４の４（３）②関係】

FAO/WHO(2001)及び Codex(2003)において、ペプシン処理以外にその他の酵素感受性試験も用いても良いとされており、人工腸液単独による感受性試験を実施してあるか確認する。酵素として、一般的なパンクレアチン又はトリプシンが使用されており、その試験条件と結果の詳細が明示されていることを確認する。

人工腸液試験の結果生じたタンパク質断片の分子量を電気泳動等の分析結果によって確認する。分析結果については、SDS-PAGE による分離に続くタンパク質染色（CBB 染色等）、免疫反応性による可視化（特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法、ELISA 法等）、あるいはこれらと同等又は類似

[17] Codex_CAC/GL 45-2003_GUIDELINE FOR THE CONDUCT OF FOOD SAFETY ASSESSMENT OF FOODS DERIVED FROM RECOMBINANT-DNA PLANTS

[18] Report of Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology (2001): Section "6.4 Pepsin Resistance"

[19] EFSA (2010) において、ペプシン耐性試験では、被験タンパク質の無傷性に加えて、安定なタンパク質断片の発生もリスクファクターとして考慮する必要がある。そのため、ゲル電気泳動~~など~~等の検出方法では、低分子化したタンパク質の断片の検出が不十分な場合は、HPLC や LC-MS ~~など~~等の代替方法を実施する必要があるとされている。

の方法によって示されていることを確認する。

その際、試験に供したタンパク質試料の初期量が示されているとともに、消化による試料タンパク質及びその低分子化断片（分子量約 3.5　kDa 以上）の経時的変化が定性的又は定量的に示されていることが望ましい。

ウ　人工胃腸液試験の連続処理

アで試験に供したタンパク質及び低分子化断片が所定の時間内でも観察される場合には、人工胃腸液試験を連続して実施することを推奨する。

その際には、試験に供したタンパク質試料について胃液処理前及び胃液処理後並びに腸液処理前のそれぞれの初期量が示されているとともに、消化による試料タンパク質及びその低分子化断片（分子量約 3.5kDa 以上）の経時的変化が定性的又は定量的に示されていることが望ましい。

エ　加熱処理[20]【指針第２章第４の４（３）③関係】

タンパク質のアレルギー誘発性に影響を与える項目の一つとして、加熱~~・~~加工に対する安定性がある。被験試料を適切な温度、処理状態（溶液 pH、湿度、粉末~~など~~等）、時間~~など~~等の条件で処理し、その後の試料の状態を物理化学的（SDS-PAGE 法、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法、ELISA 法等）及び生物学的（酵素活性試験等）又はいずれかの方法で確認する。試料の状態が温度によってどのように変化したのかが確認できるデータであること。なお、加熱処理試験の条件にはヒトが経口摂取する際に処理される場合と同等の条件を含むことを確認する。

爲廣先生：加熱・加工という記載だと、加工に対する安定性についても提起しているような印象を受けました。この項目は加熱処理ですので「加工（加熱）」あるいは「加熱加工」の方が良いのではないかと思いました。

[20] 食品の加工、特に熱処理は化学的/物理的修飾を誘発し、酵素消化の安定性に影響を与える可能性があり、その結果、時間と温度に応じてさまざまな程度で食物タンパク質のアレルギー誘発性に影響を与える可能性があるとされている。一部のアレルゲン（牛乳カゼイン、Ara h 1 ~~など~~等）の物理的安定性（凝集能力）は、それらのアレルゲン能力を説明するパラメーターである（EFSA 2022）。

事務局：修正いたしました。

中島先生：加熱試験実施後の「試料の状態を物理化学的及び生物学的又はいずれかの方法で確認する」ことについて、「物理化学的試験」はSDS-PAGEによる当該タンパク質の残存性、「生物学的試験」とは酵素活性のあるタンパク質についてはその活性でしょうか。この場合、「又はそのいずれかの方法」とあるので熱処理により酵素活性が失われていることが確認できれば良いと読み取れますが、それで良いでしょうか。それとも、「生物学的試験」がWestern Blot 解析を意味するのでしょうか？　この文章では「物理化学的試験」と「生物学的試験」が何を意味するのかあいまいです。私は酵素活性の失活などによる立体構造の破壊を確認できれば良いと考えています。

爲廣先生：この物理化学的とは脚注20に記載されているようなものを対象としていると思います。ですので、評価手法としてはSDS-PAGEだけではありません。またこの文章では「又はいずれかの方法で確認する」となっているため、酵素活性等の生物学的手法のみでも良いという記載になっています。
生物学的（酵素活性試験等）
物理化学的（特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法、ELISA法等）
とする対応もあるかもしれません。

手島先生：中島先生の”加熱試験実施後の「試料の状態を物理化学的及び生物学的又はいずれかの方法で確認する」ことについて、「物理化学的試験」はSDS-PAGEによる当該タンパク質の残存性、「生物学的試験」とは酵素活性のあるタンパク質についてはその活性でしょうか。この場合、「又はそのいずれかの方法」とあるので熱処理により酵素活性が失われていることが確認できれば良いと読み取れますが、それで良いでしょうか。”のご質問に対しては、この解釈で概ね問題ないと思います。すなわち、「物理化学的試験」については、（SDS-PAGE法、ウェスタンブロット法又はELISA法等）、「生物学試験」については、（酵素活性等）と考えて、両方またはいずれかの方法でよい

と解釈してよいと思います。中島先生のコメントにありますように、「物理化学的試験」「生物学的試験」が何を意味するかあいまいとのことですので、具体例をかっこがきで本文中に入れた方がよいように思います。

事務局：修正いたしました。

事務局：物理化学的試験の具体例のうち、特異的抗体を用いたウェスタンブロッティング法及びELISA法につきましては、抗体を用いた手法ではありますが、抗体との結合性を利用した試験法であることから、物理化学的試験に分類されるという理解でよろしいでしょうか。

オ　その他

遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理が省略可能であると判断する場合、その判断の根拠について合理的な理由が示されていることが重要である。

例えば、既に食品健康影響評価を終了し、安全性が確認された遺伝子産物とアミノ酸配列が同一であることが確認でき、かつ、糖鎖修飾等に変化が生じていないと考えられる場合が該当する。

④　遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関する事項【指針第２章第４の４（４）関係】

遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン等の一次構造を比較し、既知のアレルゲン等と構造相同性を有しないことを確認する。抗原決定基（エピトープ）を示す可能性のある配列を明らかにするためには、アミノ酸配列に関する相同性検索~~など~~等を実施する必要がある。遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子等）を用いている場合にはその遺伝子産物についても既知のアレルゲン等と構造相同性を有しないことを確認する。

遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン等の一次構造の比較について、

Allergen Online、Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE)、Allergen Database for Food Safety (ADFS)等のデータベースの最新版（最新バージョン）を用いて FASTA アルゴリズム等により相同性検索（35%以上の相同性を示す 80 アミノ酸以上の配列及び連続する８アミノ酸配列との相同性検索）を行っていることを確認する。

さらに、遺伝子導入用コンストラクトに含まれる挿入予定配列が宿主のゲノムに予定通りに整然と挿入されなかった等の理由により目的とする遺伝子産物以外の遺伝子産物の存在が否定できない場合、遺伝子導入用コンストラクトの挿入により生じた目的外の ORF から産生される可能性のあるタンパク質についても、既知のアレルゲンとの相同性検索を行っていることを確認する。

加えて、挿入配列と宿主のゲノムとの境界領域に生じ得る ORF 産物についても、既知のアレルゲンとの相同性検索を行っていることを確認する。

その際、検索に用いたデータベースとそのバージョンが示されており、最新の検索結果であることが明確であること。評価期間中にデータベースの更新があれば、それを用いて再検索を行っていることを確認する。

また、上記の遺伝子産物（タンパク質）及び ORF 産物（タンパク質又はペプチド）について、NCBI protein database 等のデータベースを用いて、BLASTP 検索等により相同性のあるタンパク質の検索が行われていることとともに、「allergy」、「toxicity」及び栄養阻害物質に関連するキーワードを用いてデータベース検索を行われていることを確認する。

⑤　遺伝子産物（タンパク質）の IgE 結合能に関する事項【指針第２章第４の４（５）関係】

①から④までの事項を総合的に確認した結果、人の健康を損なうおそれがないと判断できない場合は、遺伝子産物（タンパク質）の IgE 結合能を検討する。

当該遺伝子産物（タンパク質）及び類似性の高いタンパク質のアレルゲン性が既知であり、そのアレルゲンに反応する IgE が患者血清~~など~~等から利用可能である場合は、遺伝子産物（タンパク質）の IgE 結合能を確認する。

使用するアレルギー患者血清[21]の選択は、下記の a から d までのいずれかで行っていること。

a　導入遺伝子の供与体がアレルギー誘発性を持つ場合は、その供与体に対する特異的 IgE 抗体価が高値な血清

b　既知のアレルゲンとの構造相同性が認められた場合は当該アレルゲンを含む生物に対する特異的 IgE 抗体価が高値な血清

c　既知のアレルゲンとの構造相同性が示されないが、上記①から③までの項目で、アレルギー誘発性を否定しきれない場合は、遺伝子供与体の近縁種生物に対して特異的 IgE 抗体価が高値な血清

d　a から c までで適切な血清が得られない場合は、主要なアレルゲン[22]（卵、乳、大豆、米、小麦、そば、たら、えび、かに及び落花生）に対して特異的 IgE 抗体価が高値な血清

爲廣先生：(「特異的 IgE 抗体価が高値な血清」について）例示した主要アレルゲン 10 種全てに対し反応性の高い血清を使って検討するのか、そこまでは求めていないのか、趣旨をご教示いただきたい。

事務局：「遺伝子組換え食品（種子植物）の食品健康影響評価に関する技術的文書」（令和６年６月 28 日遺伝子組換え食品等専門調査会決定）においては、「優先的なアレルゲン」と表記されていますが、評価指針において「主要なアレルゲン」と記載されていますので、評価指針の表現に合わせました。
中島先生：「主要なアレルゲン」という表現で良いと思います。
爲廣先生：「d」における書きぶりとしては修正のとおりでよろしいかと思いますが、ここでの主要アレルゲンとは優先的アレルゲンにリストされているも

[21] 要件を満たすために、よく特徴付けられたアレルギー患者から血清を収集する必要がある。これらの個人は、特定の食品に対するアレルギーの病歴と、その食品の消費との因果関係を提示する必要がある。またプールされた血清ではなく、個々の血清を使用する必要がある(EFSA GMO Panel, 2010, 2011)。(EFSA 2022)

[22] ~~主要な~~優先アレルゲンリスト（Priority Allergen List）に含まれる、非公式に「Big 8」と呼ばれる品目は以下の品目群である（FAO/WHO2022)。1.グルテンを含む穀類、すなわち小麦、ライ麦、大麦、オート麦、スペルト小麦、またはそれらの雑種系統及びこれらの製品、2.甲殻類及びこれらの製品、3.卵及び卵製品、4.魚及び魚製品、5.落花生、大豆及びこれらの製品、6.牛乳及び乳製品（乳糖を含む)、7.木の実及び木の実製品、8.10mg/kg 以上の濃度の亜硫酸塩。

のを含むという意味合いかと受け取りました。この場合、注釈は、優先アレルゲンリストのままでよろしいかと思います。
事務局：修正いたしました。

導入遺伝子の供与体がアレルギー誘発性を持つ場合で、遺伝子産物（タンパク質）に対するアレルギー患者血清を用いた IgE 結合能の検討で陰性結果が得られたものの、なお安全性の証明が十分ではないと考えられた場合は、好塩基球活性化試験~~など~~等細胞を用いた *in vitro* 試験又は皮膚テストや経口負荷試験~~など~~等の臨床試験データも考慮して総合的に判断することが必要である。

６~~５~~　遺伝子組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項【指針第２章第５関係】

添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績が明らかであること。また、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の知見が明らかであること。

７~~６~~　遺伝子組換え添加物に関する事項【指針第２章第６関係】

（１）諸外国における認可、食用等に関する事項【指針第２章第６の１関係】

海外当局における申請・認可、食用等に関する事項が明らかであることを確認する。また、海外当局へ申請中である場合には、申請年や審査状況について、可能な範囲で明らかにされていることを確認する。

（２）遺伝子組換え体の残存に関する事項【指針第２章第６の２関係】

生産菌~~の DNA~~が評価対象品目の製品中に残存しないことを確認する。確認方法の例として、PCR 法~~など~~等がある。また、遺伝子組換え体の残存を調べるための試料 DNA を調製する方法としては、ゲノム DNA だけでなくプラスミド DNA も調製できる方法を用いていることを確認する。

事務局：遺伝子組換え体が残存するか否かの確認について、これまでの評価実績において、培養法により実施された事例があることから、「DNA」の文言を

削除いたしました。ご確認をお願いいたします。

（３）製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項【指針第２章第６の３関係】

評価対象品目が、「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の製造基準」（平成 12 年 ~~5 月~~厚生省告示第 234 号）に基づき、適切な製造管理の下、製造が行われ~~てい~~ることが、食品健康影響評価の前提となっている。

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、製品ごとにケースバイケースで安全性を検討することが重要である。

最終製品が適合している成分規格（「食品、添加物等の規格基準」（昭和 34 年厚生省告示第 370 号）、JECFA、Food Chemicals Codex ~~など~~等）が明らかであり、製造実績等から安全性に懸念がある非有効成分の有無について考察されていることを確認する。

（４）精製方法及びその効果に関する事項【指針第２章第６の４関係】

生産菌の培養物を用いて限外ろ過等の精製工程を経て製造されることについて、具体的に示されていること。この際に、安全性に懸念のある物質が混入する可能性は低いことが明らかであること。製品に実質的に同一である複数の分子形（糖鎖修飾体~~など~~等）がある場合~~など~~等は、それについての分析結果を示すとともに、安全性に懸念がないことを確認する。

８~~７~~　安全性の知見が得られていない場合に必要な事項【指針第２章第７関係[23,24]】

指針の第２章第２から第６までの事項により安全性の知見が得られていないと判断される場合には、当該遺伝子組換え体の安全性を確認するために必要と考えられる試験を実施し、その結果から添加物として安全性を確認する。

[23] Codex_CAC/GL 45-2003_GUIDELINE FOR THE CONDUCT OF FOOD SAFETY ASSESSMENT OF FOODS DERIVED FROM RECOMBINANT-DNA PLANTS

[24] EFSA Journal 2011; 9(5):2150_ SCIENTIFIC OPINION Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO)

別添　次世代シーケンシングに係る解析データを評価する際の留意点

１　概要

遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の食品健康影響評価のための資料において、近年、最新の技術[25]を用いた次世代シーケンシング（next generation sequencing）（以下「NGS」という。）による解析結果が提出されることが多くなっており、本文書は、導入遺伝子領域の解析データを評価する際に考慮されるべき留意点を示すものである。

なお、解析の手法としては、DNA シーケンシングによる、全ゲノム、導入遺伝子及び近傍領域の塩基配列解析、PCR（ポリメラーゼ連鎖反応）法を様々なプロトコールで利用した導入遺伝子領域の解析、サザンブロッティングやその原理を取り入れた解析などがあり、標的の DNA 配列又は遺伝子領域の特性に応じて、単独又は複数の解析手法が用いられる。

２　ライブラリーの調製と配列決定戦略

各ライブラリー[26]の構築方法の詳細な説明が必要であり、配列捕捉法を用いる場合は、全ての実験手順やプローブデザインとそれらによる捕捉効率等について確認することが重要である。

３　データセットの品質

各実験で生成されたリード（読み取り配列）の数及び品質統計情報、データ生成に使用したシーケンシングプラットフォームに関する情報が必要である。この情報は、リードがリファレンスゲノムにマッピングされていない場合に特に重要である。例えば、FASTQC[27]は、データセットの品質をチェックするために広く使用されてい

---

[25] DNA 配列の解析技術（DNA シーケンシング法）は、日進月歩であり、今後とも新規技術の研究開発と実用化が進むと考えられるが、現時点での網羅的配列解析技術としては、次世代シーケンシング（NGS）がある。NGS は、超並列シーケンシング（massively parallel sequencing: MPS）や大規模並列シーケンシングとも呼ばれ、同原理を使った全ゲノムシーケンシング（whole genome sequencing: WGS）、サザンブロッティング法の原理を取り入れた Southern-by-Sequencing 法などの解析手法がある。また、これを補完する特定配列解析技術としては、PCR 法を利用した quantitative PCR（real-time PCR）や digital PCR などが挙げられる。

[26] NGS 解析のためのサンプル調製により、各断片の末端にアダプター等が結合したゲノム断片の集合体。

[27] FASTQC：http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/

るツールである。

各サンプルについて、総シーケンスリード数の確認が必要であり、シーケンストリミングやクオリティフィルタリングが行われている場合には、実施前及び実施後の総リード数、トリミングの方法等についての確認が必要である。

４　リード深度

現在、導入遺伝子領域の配列解析に利用可能なシーケンシング技術では、さまざまな品質と長さのリードが生成される。

最終的に確度の高いシーケンス情報を得るために特定の配列をカバーすべきリードの数（リード深度）は、リードの品質、長さ及びシーケンス実験の目的により異なる。提出されたNGSデータを評価するために、リード深度に関する情報、特に、導入遺伝子領域における平均リード深度及び最浅リード深度に関する情報が提供されるべきである[28]。

５　挿入DNA及び近傍領域の特性解析のための配列決定

挿入DNAの配列及び近傍領域の解析においては、NGS手法として、全ゲノムシーケンシングや配列決定前に標的 DNA 断片を濃縮する配列捕捉法などを使用することもできる[29]。例えば、遺伝子座内の挿入DNA又は導入遺伝子の配列の重複の存在、配列内に長い繰り返し配列の存在を含む場合などでは、ウルトラロングリードや、クローン化されたゲノム断片又はPCRアンプリコンの配列決定（サンガー法による配列決定を含む。）などのアプローチを組み合わせることも考慮する必要がある。

[28] 全ゲノムシーケンシング技術が挿入DNA及びベクター由来配列に起きている可能性のある挿入の同定に使用される場合、全ゲノムにわたる平均リード深度を推定することが必要。参照ゲノムがある場合は、リードを全配列にアラインメントして、平均リード深度を算出する。ゲノムリソースが存在しない場合、以下のLander-Waterman式（Lander and Waterman, 1988）を用いる。

カバレッジ（平均リード深度）＝　リード数　×　リード長　／　推定ゲノムサイズ

Lander-Waterman式については、プラットフォームや配列固有のバイアスを考慮しておらず（Ross *et al.*, 2013）平均リード深度の推定値を提供するが、リード深度は必ずしもゲノム全体で均一ではないため限界がある（Sims *et al.*,2014）。また、使用する技術や各GM植物のゲノムが平均リード深度の計算に影響を与える可能性があるため、申請者はミトコンドリアやプラスチドDNAに対応するリード数の評価や核DNAのリード深度の正当化を検討する必要がある（Lutz *et al.*, 2011）。

最浅リード深度は、使用されるアプローチを含む様々な要因に依存するため、一律の閾値を適用するのは困難であるが、EFSA（2024)では、挿入DNA及びその周辺領域の配列決定にNGS技術が使用される場合、最浅リード深度は40以上であることが推奨されるとの記載がある。

[29] Ekblom and Wolf, 2014; Inagaki *et al.* 2015

使用するアプローチとその理由について詳細な説明が示されていること。

決定された配列の確からしさを確認することは安全性確認上、大変重要である。新規シーケンス技術を用いた配列決定においては、標的とするDNA試料の生物的特性、純度、用いる技術の種類や解析原理などによって、信頼性を担保するために必要な条件を一律に定めることは困難であるものの、以下の①から⑦に示すような解析結果の信頼性を担保する記載により、決定された配列の確からしさを確認できると考えられる。また、必要に応じて以下の⑧を確認する。

＜申請要旨における記載例＞

・ DNA シーケンス解析で生成されるデータの品質管理が以下のように行われており、その品質が保証されている。

① 微生物ゲノムのショートリード（若しくは、ロングリード等）による NGS 解析である。
② 挿入 DNA 及びその周辺領域における測定したクリーンリード数
③ 挿入 DNA 及びその周辺領域における平均リード深度（カバレッジ）
④ 挿入 DNA 及びその周辺領域における最浅リード深度
⑤ ライブラリー調製方法とサイズ分布（平均サイズ）
⑥ リードデータ生成の機器の名称
⑦ 挿入 DNA 及びその周辺領域における de novo アセンブリのプロトコール
⑧ 全ゲノムシーケンシングの場合：ゲノム全体における平均リード深度（カバレッジ）及び最浅リード深度、また、全ゲノムアセンブリを実施した場合にはそのプロトコール

６　検出可能な挿入部位及びその数並びに挿入コピー数の決定

検出可能な全ての挿入 DNA のゲノムへの挿入部位及びその数並びに挿入コピー数を決定することは、遺伝子組換え添加物の評価の中で重要であり、多くの方法で達成できる。

（１）挿入部位及びその数の決定

挿入部位及びその数を決定するためのアプローチは、挿入 DNA 又はベクター配

列と宿主のゲノムとの配列の同一性を示す接合リード（キメラリード）を計算的に同定するものであり、これらのリードは、挿入 DNA 又はベクター配列と宿主のゲノムの両方に部分的に一致するため、接合部位を正確に同定するには、十分な長さのリード（約 100 bp）が必要である。

接合部位の配列の解析のためのリードの深さは、データの質を評価するための重要な要素であり、（平均）リード深度に関する詳細な情報を確認するべきである。これは、ゲノムの特性や使用したシーケンシング技術に依存するが、接合リードを検出するためのリード深度が十分に高く、その正当性が説明されている必要がある[30]。

（２）挿入コピー数の決定

宿主のゲノムに挿入された DNA の挿入コピー数を決定するためには、NGS を含め、様々なアプローチがあり、PCR 法などのその他のアプローチを組み合わせることも考慮する必要がある。使用するアプローチとその妥当性について詳細な説明が示されていることを確認する。

７　NGS に係る提出データ

挿入 DNA や近傍配列の解析において、データを表や図にどのように表示するかは、標的となる配列の特性によって異なる。申請の際に提出するデータは、結論を支持し、その根拠を説明するものでなければならず、例えば、以下の①から⑦のような情報がある。

申請要旨においては、上記５に示した記載例を参考に、解析結果の信頼性を担保する説明が記載され、詳細なデータが資料として添付されることが望ましい。

①　リードの品質の分布図

②　ライブラリー調製法とライブラリー（インサートサイズ）の分布とリードの長さ

[30] Willems ら（2016）は、意図的に挿入された DNA と宿主のゲノムの間の接合部にまたがるリードについて、一定程度の確からしさで導入遺伝子の配列を検出するために必要なリード数を推定する統計的アプローチを提案しており、これを考慮することも有用である。また、複数のアプローチを組み合わせて使用することも可能である。

③　カバレッジの分布図
④　統計情報一覧
⑤　解析ソフトと使用したパラメーター
⑥　マッピング IGV 図と表示設定
⑦　用いた参照ゲノム情報（バージョンなど）

なお、評価において、提出データに不足があると判断された場合は、生データなどの必要な情報の追加提出を求めることがある。

８　その他

DNA シーケンシングのデータの取扱いなどに関しては、必要に応じて、以下の技術的文書も参考にすることができる。

・EFSA, 2011 Guidance for risk assessment of food and feed from genetically modified plants. EFSA Journal 2011; 9(5):2150

・EFSA, 2024. Technical Note on the quality of DNA sequencing for the molecular characterization of genetically modified plants. EFSA Journal 2024;22(4):e8744

・OECD, 2016. High-throughput DNA sequencing in the safety assessment of genetically engineered plants: proceedings of the OECD workshop (April 2016), OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.29

・ISO/DIS 20397-2, 2021. Biotechnology – General requirements for massively parallel sequencing – Part 2: Methods to evaluate the quality of sequencing data

・JRC Technical Reports, 2016. Guideline for the submission of DNA sequences and associated annotations within the framework of Directive 2001/18/EC and Regulation (EC) No 1829/2003

（参考資料）

１　食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会（第 231 回）資料３「次世代シ

ークエンスについて」
2　食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会（第231回）参考資料2「遺伝子組換え食品等（種子植物）に係るリスク評価における次世代シークエンサーの取り扱いに関する資料」
3　平成 28 年度食品安全確保総合調査「次世代シークエンサーの活用状況等に関する調査」報告書（平成29年3月一般財団法人化学物質評価研究機構）

参考文献

EFSA Journal 2010; 8(7):1700
Scientific Opinion on the assessment of allergenicity of GM plants and microorganisms and derived food and feed

EFSA Journal 2022;20(1):7044
Scientific Opinion on development needs for the allergenicity and protein safety assessment of food and feed products derived from biotechnology
(ADOPTED: 2 December 2021   doi: 10.2903/j.efsa.2022.7044)

FAO/WHO, 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a Joint FAO, WHO Expert Consultation on Allergenicity of Food Derived from Biotechnology, 22-25, January 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Italy, Rome.

FAO/WHO MEETING REPORT
RISK ASSESSMENT OF FOOD ALLERGENS
PART 1: REVIEW AND VALIDATION OF CODEX ALIMENTARIUS PRIORITY ALLERGEN LIST THROUGH RISK ASSESSMENT
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
WORLD HEALTH ORGANIZATION
ROME, 2022

FAO/WHO MEETING REPORT
RISK ASSESSMENT OF FOOD ALLERGENS
PART 2: REVIEW AND ESTABLISH THRESHOLD LEVELS IN FOODS FOR THE PRIORITY ALLERGENS
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
WORLD HEALTH ORGANIZATION

ROME, 2022

Codex Alimentarius, 2003-2008.
Foods derived from modern biotechnology. Second edition.
WORLD HEALTH ORGANIZATION
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
Rome, 2009