
**GUIDELINE FOR THE CONDUCT OF FOOD SAFETY ASSESSMENT OF FOODS
PRODUCED USING RECOMBINANT-DNA MICROORGANISMS**

CAC/GL 46-2003

SECTION 1 – SCOPE

1. This Guideline supports the Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology and addresses safety and nutritional aspects of foods produced through the actions of recombinant-DNA microorganisms.¹ The recombinant-DNA microorganisms that are used to produce these foods are typically derived using the techniques of modern biotechnology from strains that have a history of safe, purposeful use in food production. However, in instances where the recipient strains do not have a history of safe use their safety will have to be established.² Such food and food ingredients may contain viable or non-viable recombinant-DNA microorganisms or may be produced by fermentation using recombinant-DNA microorganisms from which the recombinant-DNA microorganisms may have been removed.

2. Recognizing that the following issues may have to be addressed by other bodies or other instruments, this document does not address:

- safety of microorganisms used in agriculture (for plant protection, biofertilizers, in animal feed or food derived from animals fed the feed etc.);
- risks related to environmental releases of recombinant-DNA microorganisms used in food production;
- safety of substances produced by microorganisms that are used as additives or processing aids, including enzymes for use in food production³;
- specific purported health benefits or probiotic effects that may be attributed to the use of microorganisms in food; or
- issues relating to the safety of food production workers handling recombinant-DNA microorganisms.

3. A variety of microorganisms used in food production have a long history of safe use that predates scientific assessment. Few microorganisms have been assessed scientifically in a manner that would fully characterize all potential risks associated with the food they are used to produce, including, in some instances, the consumption of viable microorganisms. Furthermore, the Codex principles of risk analysis, particularly those for risk assessment, are primarily intended to apply to discrete chemical entities such as food additives and pesticide residues, or specific chemical or microbial contaminants that have identifiable hazards and risks; they were not originally intended to apply to intentional uses of microorganisms in food processing or in the foods transformed by microbial fermentations. The safety assessments that have been conducted have focused primarily on the absence of properties associated with pathogenicity in these microorganisms and the absence of reports of adverse events attributed to ingestion of these microorganisms, rather than evaluating the results of prescribed studies. Further, many foods contain substances that would be considered harmful if subjected to conventional approaches to safety testing. Thus, a more focused approach is required where the safety of a whole food is being considered.

4. Information considered in developing this approach includes:

- A) uses of living microorganisms in food production;
- B) consideration of the types of genetic modifications likely to have been made in these organisms;
- C) the types of methodologies available for performing a safety assessment; and
- D) issues specific to the use of the recombinant-DNA microorganism in food production, including its genetic stability, potential for gene transfer, colonization of the gastrointestinal tract and persistence⁴ therein,

¹ The microorganisms included in these applications are bacteria, yeasts, and filamentous fungi. (Such uses could include, but are not limited to, production of yogurt, cheese, fermented sausages, natto, kimchi, bread, beer, and wine.)

² The criterion for establishing the safety of microorganisms used in the production of foods where there is no history of safe use is beyond the scope of the current document.

³ The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) is revising guidelines for General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in food processing. These guidelines have been used to evaluate enzyme preparations derived from genetically modified microorganisms.

⁴ Persistence connotes survival of microorganisms in the gastrointestinal tract longer than two intestinal transit times (International Life Science Institute, *The safety assessment of viable genetically modified microorganisms used as food*, 1999, Brussels; the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology- *Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms*, 24-28 September, 2001, Geneva, Switzerland).

interactions that the recombinant-DNA microorganism may have with the gastrointestinal flora or the mammalian host, and any impact of the recombinant-DNA microorganism on the immune system.

5. This approach is based on the principle that the safety of foods produced using recombinant-DNA microorganisms is assessed relative to the conventional counterparts that have a history of safe use, not only for the food produced using a recombinant-DNA microorganism, but also for the microorganism itself. This approach takes both intended and unintended effects into account. Rather than trying to identify every hazard associated with a particular food or the microorganism, the intention is to identify new or altered hazards relative to the conventional counterpart.

6. This safety assessment approach falls within the risk assessment framework as discussed in Section 3 of the Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology. If a new or altered hazard, nutritional or other food safety concern is identified by the safety assessment, the risk associated with it would first be assessed to determine its relevance to human health. Following the safety assessment and, if necessary, further risk assessment, the food or component of food, such as a microorganism used in production, would be subjected to risk management considerations in accordance with the Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology before it is considered for commercial distribution.

7. Risk management measures such as post-market monitoring of consumer health effects may assist the risk assessment process. These are discussed in paragraph 20 of the Principles for the Risk Analysis of Foods derived from Modern Biotechnology.

8. The Guideline describes approaches recommended for making safety assessments of foods produced using recombinant-DNA microorganisms, using comparison to a conventional counterpart. The safety assessment will focus on the safety of the recombinant-DNA microorganisms used in food production, and, where appropriate, on metabolites produced by the action of recombinant-DNA microorganisms on food. The Guideline identifies the data and information that are generally applicable to making such assessments. When conducting a comparison of a recombinant-DNA microorganism or a food produced using recombinant-DNA microorganism with their respective conventional counterparts, any identified differences should be taken into account, whether they are the result of intended or unintended effects. Due consideration should be given to the interactions of the recombinant-DNA microorganism with the food matrix or the microflora and to the safety of any newly-expressed protein(s) and secondary metabolic products. While this Guideline is designed for foods produced using recombinant-DNA microorganisms or their components, the approach described could, in general, be applied to foods produced using microorganisms that have been altered by other techniques.

SECTION 2 – DEFINITIONS

9. The definitions below apply to this Guideline:

“Recombinant-DNA Microorganism” - means bacteria, yeasts or filamentous fungi in which the genetic material has been changed through *in vitro* nucleic acid techniques including recombinant deoxyribonucleic acid (DNA) and direct injection of nucleic acid into cells or organelles.

“Conventional Counterpart”⁵ – means:

- a microorganism/strain with a known history of safe use in producing and/or processing the food and related to the recombinant-DNA strain. The microorganism may be viable in the food or may be removed in processing or rendered non-viable during processing; or
- food produced using the traditional food production microorganisms for which there is experience of establishing safety based on common use in food production.

SECTION 3 - INTRODUCTION TO FOOD SAFETY ASSESSMENT

10. Most foods produced as a result of the purposeful growth of microorganisms have their origins in antiquity, and have been deemed safe long before the emergence of scientific methods for assessing safety. Microorganisms possess properties, such as fast growth rates, that enable genetic modifications, whether employing conventional techniques or modern biotechnology, to be implemented in short time frames. Microorganisms used in food production derived using conventional genetic techniques have not customarily been systematically subjected to extensive chemical, toxicological, epidemiological, or medical evaluations prior to marketing. Instead microbiologists, mycologists, and food technologists have evaluated new strains of bacteria, yeasts and filamentous fungi for phenotypic characteristics that are useful in relation to food production.

11. Safety assessments of recombinant-DNA microorganisms should document the use of related microorganisms in foods, the absence of properties known to be characteristic of pathogens in the recombinant-DNA microorganisms or

⁵ It is recognized that for the foreseeable future, microorganisms derived from modern biotechnology will not be used as conventional counterparts.

the recipient strains used for constructing the recombinant-DNA microorganisms, and known adverse events involving the recipient or related organisms. In addition, when a recombinant DNA microorganism directly affects or remains in the food, any effects on the safety of the food should be examined.

12. The use of animal models for assessing toxicological effects is a major element in the risk assessment of many compounds, such as pesticides. In most cases, however, the substance to be tested is well characterized, of known purity, of no particular nutritional value, and human exposure to it is generally low. It is therefore relatively straightforward to feed such compounds to animals at a range of doses some several orders of magnitude greater than the expected human exposure levels, in order to identify any potential adverse health effects of importance to humans. In this way, it is possible, in most cases, to estimate levels of exposure at which adverse effects are not observed and to set safe intake levels by the application of appropriate safety factors.

13. Animal studies cannot readily be applied to testing the risks associated with whole foods, which are complex mixtures of compounds, and often characterized by a wide variation in composition and nutritional value. Due to their bulk and effect on satiety, they can usually only be fed to animals at low multiples of the amounts that might be present in the human diet. In addition, a key factor to consider in conducting animal studies on foods is the nutritional value and balance of the diets used, in order to avoid the induction of adverse effects that are not related directly to the material itself. Detecting any potential adverse effects and relating these conclusively to an individual characteristic of the food can therefore be extremely difficult. If the characterization of the food indicates that the available data are insufficient for a thorough safety assessment, properly designed animal studies could be requested on the whole food. Another consideration in deciding the need for animal studies is whether it is appropriate to subject experimental animals to such a study if it is unlikely to give rise to meaningful information.

14. Animal studies typically employed in toxicological evaluations also cannot be readily applied to testing potential risks associated with ingestion of microorganisms used for food production. Microorganisms are living entities, containing complex structures composed of many biochemicals, and therefore are not comparable to pure compounds. In some processed foods, they can survive processing and ingestion and can compete and, in some cases, be retained in the intestinal environment for significant periods of time. Appropriate animal studies should be used to evaluate the safety of recombinant-DNA microorganisms where the donor, or the gene or gene product do not have a history of safe use in food, taking into account available information regarding the donor and the characterization of the modified genetic material and the gene product. Further, appropriately designed studies in animals may be used to assess the nutritional value of the food or the bioavailability of the newly expressed substance in the food.

15. Due to the difficulties of applying traditional toxicological testing and risk assessment procedures to whole foods, a more focused approach is required for the safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms. This has been addressed by the development of a multidisciplinary approach for assessing safety that takes into account the intended effect, the nature of the modification and detectable unintended changes that may occur in the microorganism or in its action on the food, using the concept of substantial equivalence⁶.

16. While the focus of a safety assessment will be on the recombinant-DNA microorganism, additional information on its interaction with the food matrix should be taken into consideration when applying the concept of substantial equivalence, which is a key step in the safety assessment process. However, the concept of substantial equivalence is not a safety assessment in itself. Rather it represents the starting point that is used to structure the safety assessment of both a recombinant-DNA microorganism relative to its conventional counterpart and the food produced using recombinant-DNA microorganism relative to its conventional counterpart. This concept is used to identify for evaluation similarities and differences between a recombinant-DNA microorganisms used in food processing as well as the food produced using the recombinant-DNA microorganisms and their respective conventional counterparts as defined in paragraph 9. It aids in the identification of potential safety and nutritional issues and is considered the most appropriate strategy to date for safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms. The safety assessment carried out in this way does not imply absolute safety of the new product; rather, it focuses on assessing the safety of any identified differences so that the safety of the recombinant-DNA microorganism and the food produced using recombinant-DNA microorganism can be considered relative to their respective conventional counterparts.

UNINTENDED EFFECTS

17. In achieving the objective of conferring a specific target trait (intended effect) to a microorganism by the addition, substitution, removal, or rearrangement of defined DNA sequences, including those used for the purpose of DNA transfer or maintenance in the recipient organism, additional traits could, in some cases, be acquired or existing traits could be lost or modified. The potential for occurrence of unintended effects is not restricted to the use of *in vitro*

⁶ The concept of *substantial equivalence* as described in the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology- Safety aspects of genetically modified plants, 29 May – 2 June, 2000, Geneva, Switzerland, and Section 4.3 of the Joint FAO/WHO Expert Consultation of Foods Derived from Biotechnology, - Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms, 24-28 September, 2001, Geneva, Switzerland.

nucleic acid techniques. Rather, it is an inherent and general phenomenon that can also occur in the development of strains using traditional genetic techniques and procedures, or from exposure of microorganisms to intentional or unintended selective pressures. Unintended effects may be deleterious, beneficial, or neutral with respect to competition with other microorganisms, ecological fitness of the microorganism, the microorganism's effects on humans after ingestion, or the safety of foods produced using the microorganism. Unintended effects in recombinant-DNA microorganisms may also arise through intentional modification of DNA sequences or they may arise through recombination or other natural events in the recombinant-DNA microorganism. Safety assessment should include data and information to reduce the possibility that a food derived from a recombinant-DNA microorganism would have an unexpected, adverse effect on human health.

18. Unintended effects can result from the insertion of DNA sequences new to a microorganism into the microbial genome; they may be compared with those observed following the activity of naturally occurring transposable genetic elements. Insertion of DNA may lead to changes in expression of genes in the genome of the recipient. The insertion of DNA from heterologous sources into a gene may also result in the synthesis of a chimeric protein, also referred to as a fusion protein. In addition genetic instability and its consequences need to be considered.

19. Unintended effects may also result in the formation of new or changed patterns of metabolites. For example, the expression of enzymes at high levels or the expression of an enzyme new to the organism may give rise to secondary biochemical effects, changes in the regulation of metabolic pathways, or altered levels of metabolites.

20. Unintended effects due to genetic modification may be subdivided into two groups: those that could be predicted and those that are "unexpected." Many unintended effects are largely predictable based on knowledge of the added trait, its metabolic consequences or of the site of insertion. Due to the expanding knowledge of microbial genomes and physiology, and the increased specificity in function of genetic materials introduced through recombinant-DNA techniques compared with other forms of genetic manipulation, it may become easier to predict unintended effects of a particular modification. Molecular biological and biochemical techniques can also be used to analyse changes that occur at the level of transcription and translation that could lead to unintended effects.

21. The safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms involves methods to identify and detect such unintended effects and procedures to evaluate their biological relevance and potential impact on food safety. A variety of data and information is necessary to assess unintended effects, because no individual test can detect all possible unintended effects or identify, with certainty, those relevant to human health. These data and information, when considered in total, should provide assurance that the food is unlikely to have an adverse effect on human health. The assessment of unintended effects takes into account the biochemical, and physiological characteristics of the microorganism that are typically selected for improving strains for commercial food or beverage uses. These determinations provide a first screen for microorganisms that exhibit unintended traits. Recombinant-DNA microorganisms that pass this screen are subjected to safety assessment as described in Section 4.

FRAMEWORK OF FOOD SAFETY ASSESSMENT

22. The safety assessment of a food produced using a recombinant-DNA microorganism is based on determining the safety of using the microorganism, which follows a stepwise process of addressing relevant factors that include:

- A) Description of the recombinant-DNA microorganism;
- B) Description of the recipient microorganism and its use in food production;
- C) Description of the donor organism(s);
- D) Description of the genetic modification(s) including vector and construct;
- E) Characterization of the genetic modification(s);
- F) Safety assessment:
 - a) expressed substances: assessment of potential toxicity and other traits related to pathogenicity;
 - b) compositional analyses of key components;
 - c) evaluation of metabolites;
 - d) effects of food processing;
 - e) assessment of immunological effects;
 - f) assessment of viability and residence of microorganisms in the human gastrointestinal tract;
 - g) antibiotic resistance and gene transfer; and
 - h) nutritional modification.

23. In certain cases, the characteristics of the microorganisms and/or the foods produced/processed using these microorganisms may necessitate generation of additional data and information to address issues that are unique to the microorganisms and/or food products under review.

24. Experiments intended to develop data for safety assessments should be designed and conducted in accordance with sound scientific concepts and principles, as well as, where appropriate, Good Laboratory Practice. Primary data should be made available to regulatory authorities upon request. Data should be obtained using sound scientific methods and analysed using appropriate statistical techniques. The sensitivity of all analytical methods should be documented.

25. The goal of each safety assessment is to provide assurance, in the light of the best available scientific knowledge, that the food will not cause harm when prepared or consumed according to its intended use, nor should the organism itself cause harm when viable organisms remain in the food. Safety assessments should address the health aspects for the whole population, including immuno-compromised individuals, infants, and the elderly. The expected endpoint of such an assessment will be a conclusion regarding whether the new food and/or microorganisms are as safe as the conventional counterparts taking into account dietary impact of any changes in nutritional content or value. Where the microorganism is likely to be viable upon ingestion, its safety should be compared to a conventional counterpart taking into account residence of the recombinant-DNA microorganism in the gastrointestinal tract, and where appropriate, interactions between it and the gastrointestinal flora of mammals (especially humans) and impacts of the recombinant-DNA microorganism on the immune system. In essence, the outcome of the safety assessment process is to define the product under consideration in such a way as to enable risk managers to determine whether any measures are needed to protect the health of consumers and if so to make well-informed and appropriate decisions in this regard.

SECTION 4- GENERAL CONSIDERATIONS

DESCRIPTION OF THE RECOMBINANT-DNA MICROORGANISM

26. A description of the bacterial, yeast, or fungal strain and the food being presented for safety assessment should be provided. This description should be sufficient to aid in understanding the nature of the organism or food produced using the organism being submitted for safety assessment. Recombinant-DNA microorganisms used in food production or contained in food should be conserved as stock cultures with appropriate identification using molecular methods, and preferably, in established culture collections. This may facilitate the review of the original safety assessment. Such stock cultures should be made available to regulatory authorities upon request.

DESCRIPTION OF THE RECIPIENT MICROORGANISM AND ITS USE IN FOOD PRODUCTION

27. A comprehensive description of the recipient microorganism or microorganism subjected to the modification should be provided. Recipient microorganisms should have a history of safe use in food production or safe consumption in foods. Organisms that produce toxins, antibiotics or other substances that should not be present in food, or that bear genetic elements that could lead to genetic instability, antibiotic resistance or that are likely to contain genes conferring functions associated with pathogenicity (i.e., also known as pathogenicity islands or virulence factors) should not be considered for use as recipients. The necessary data and information should include, but need not be restricted to:

- A) identity: scientific name, common name or other name(s) used to reference the microorganism, strain designation, information about the strain and its source, or accession numbers or other information from a recognized culture repository from which the organism or its antecedents may be obtained, if applicable, information supporting its taxonomical assignment;
- B) history of use and cultivation, known information about strain development (including isolation of mutations or antecedent strains used in strain construction); in particular, identifying traits that may adversely impact human health;
- C) information on the recipient microorganism's genotype and phenotype relevant to its safety, including any known toxins, antibiotics, antibiotic resistance factors or other factors related to pathogenicity, or immunological impact, and information about the genetic stability of the microorganism;
- D) history of safe use in food production or safe consumption in food; and
- E) information on the relevant production parameters used to culture the recipient microorganism.

28. Relevant phenotypic and genotypic information should be provided not only for the recipient microorganism, but also for related species and for any extra-chromosomal genetic elements that contribute to the functions of the recipient strain, particularly if the related species are used in foods or involved in pathogenic effects in humans or other animals. Information on the genetic stability of the recipient microorganism should be considered including, as appropriate, the presence of mobile DNA elements, i.e. insertion sequences, transposons, plasmids, and prophages.

29. The history of use may include information on how the recipient microorganism is typically grown, transported and stored, quality assurance measures typically employed, including those to verify strain identity and production

specifications for microorganisms and foods, and whether these organisms remain viable in the processed food or are removed or rendered non-viable as a consequence of processing.

DESCRIPTION OF THE DONOR ORGANISM(S)

30. Information should be provided on the donor organism(s) and any intermediate organisms, when applicable, and, when relevant, related organisms. It is particularly important to determine if the donor or intermediate organism(s) or other closely related species naturally exhibit characteristics of pathogenicity or toxin production, or have other traits that affect human health. The description of the donor or intermediate organism(s) should include:

- A) identity: scientific name, common name or other name(s) used to reference the organism, strain designation, information about the strain and its source, or accession numbers or other information from a recognized culture repository from which the organism or its antecedents may be obtained, if applicable, and information supporting its taxonomic assignment;
- B) information about the organism or related organisms that concerns food safety;
- C) information on the organism's genotype and phenotype relevant to its safety including any known toxins, antibiotics, antibiotic resistance factors or other factors related to pathogenicity, or immunological impact; and
- D) information on the past and present use, if any, in the food supply and exposure route(s) other than intended food use (e.g., possible presence as contaminants).

DESCRIPTION OF THE GENETIC MODIFICATION(S) INCLUDING VECTOR AND CONSTRUCT

31. Sufficient information should be provided on the genetic modification(s) to allow for the identification of all genetic material potentially delivered to or modified in the recipient microorganism and to provide the necessary information for the analysis of the data supporting the characterization of the DNA added to, inserted into, modified in, or deleted from the microbial genome.

32. The description of the strain construction process should include:

- A) information on the specific method(s) used for genetic modification;
- B) information on the DNA used to modify the microorganism, including the source (e.g., plant, microbial, viral, synthetic), identity and expected function in the recombinant-DNA microorganism, and copy number for plasmids; and
- C) intermediate recipient organisms including the organisms (e.g., other bacteria or fungi) used to produce or process DNA prior to introduction into the final recipient organism.

33. Information should be provided on the DNA added, inserted, deleted, or modified, including:

- A) the characterization of all genetic components including marker genes, vector genes, regulatory and other elements affecting the function of the DNA;
- B) the size and identity;
- C) the location and orientation of the sequence in the final vector/construct; and
- D) the function.

CHARACTERIZATION OF THE GENETIC MODIFICATION(S)

34. In order to provide clear understanding of the impact of the genetic modification on the composition and safety of foods produced using recombinant-DNA microorganisms, a comprehensive molecular and biochemical characterization of the genetic modification should be carried out. To facilitate the safety assessment, the DNA to be inserted should be preferably limited to the sequences necessary to perform the intended functions.

35. Information should be provided on the DNA modifications in the recombinant DNA microorganism; this should include:

- A) the characterization and description of the added, inserted, deleted, or otherwise modified genetic materials, including plasmids or other carrier DNA used to transfer desired genetic sequences. This should include an analysis of the potential for mobilization of any plasmids or other genetic elements used, the locations of the added, inserted, deleted, or otherwise modified genetic materials (site on a chromosomal or extra-chromosomal location); if located on a multi-copy plasmid, the copy number of the plasmid;
- B) the number of insertion sites;
- C) the organisation of the modified genetic material at each insertion site including the copy number and sequence data of the inserted, modified, or deleted material, plasmids or carrier DNA used to transfer the desired genetic

sequences, and the surrounding sequences. This will enable the identification of any substances expressed as a consequence of the inserted, modified or deleted material;

- D) identification of any open reading frames within inserted DNA, or created by the modifications to contiguous DNA in the chromosome or in a plasmid, including those that could result in fusion proteins; and
- E) particular reference to any sequences known to encode, or to influence the expression of, potentially harmful functions.

36. Information should be provided on any expressed substances in the recombinant-DNA microorganism; this should include:

- A) the gene product(s) (e.g., a protein or an untranslated RNA) or other information such as analysis of transcripts or expression products to identify any new substances that may be present in the food;
- B) the gene product's function;
- C) the phenotypic description of the new trait(s);
- D) the level and site of expression (intracellular, periplasmic - for Gram-negative bacteria, organellar - in eukaryotic microorganisms, secreted) in the microorganism of the expressed gene product(s), and, when applicable, the levels of its metabolites in the organism;
- E) the amount of the inserted gene product(s) if the function of the expressed sequence(s)/gene(s) is to alter the level of a specific endogenous mRNA or protein; and
- F) the absence of a gene product, or alterations in metabolites related to gene products, if applicable to the intended function(s) of the genetic modification(s).

37. In addition, information should be provided:

- A) to demonstrate whether the arrangement of the modified genetic material has been conserved⁷ or whether significant rearrangements have occurred after introduction to the cell and propagation of the recombinant strain to the extent needed for its use(s) in food production, including those that may occur during its storage according to current techniques;
- B) to demonstrate whether deliberate modifications made to the amino acid sequence of the expressed protein result in changes in its post-translational modification or affect sites critical for its structure or function;
- C) to demonstrate whether the intended effect of the modification has been achieved and that all expressed traits are expressed and inherited in a manner that is stable for the extent of propagation needed for its use(s) in food production and is consistent with laws of inheritance. It may be necessary to examine the inheritance of the inserted or modified DNA or the expression of the corresponding RNA if the phenotypic characteristics cannot be measured directly⁸;
- D) to demonstrate whether the newly expressed trait(s) is expressed as expected and targeted to the appropriate cellular location or is secreted in a manner and at levels that is consistent with the associated regulatory sequences driving the expression of the corresponding gene;
- E) to indicate whether there is any evidence to suggest that one or more genes in the recipient microorganism has been affected by the modifications or the genetic exchange process; and
- F) to confirm the identity and expression pattern of any new fusion proteins.

SAFETY ASSESSMENT

38. The safety assessment of the modified microorganism should be performed on a case by case basis depending on the nature and extent of the introduced changes. Conventional toxicology studies may not be considered necessary where the substance or a closely related substance has, taking into account its function and exposure, been consumed safely in food. In other cases, the use of appropriate conventional toxicology or other studies on the new substance may be necessary. Effects of the recombinant-DNA microorganism on the food matrix should be considered as well. If the characterisation of the food indicates that the available data are insufficient for a thorough safety assessment, properly designed animal or *in vitro* studies with the recombinant-DNA microorganism and/or the food produced using it could be considered necessary.

⁷ Microbial genomes are more fluid than those of higher eukaryotes; that is, the organisms grow faster, adapt of changing environments, and are more prone to change. Chromosomal rearrangements are common. The general genetic plasticity of microorganisms may affect recombinant DNA in microorganisms and must be considered in evaluating the stability of recombinant DNA microorganisms.

⁸ Modified strains should be maintained in a manner to enable verification of the genetic stability.

Expressed Substances: Assessment of Potential Toxicity and Other Traits Related to Pathogenicity

39. When a substance is new to foods or food processing, the use of conventional toxicology studies or other applicable studies on the new substance will be necessary. This may require the isolation of the new substance from the recombinant-DNA microorganism, the food product if the substance is secreted, or, if necessary, the synthesis or production of the substance from an alternative source, in which case the material should be shown to be structurally, functionally, and biochemically equivalent to that produced in the recombinant-DNA microorganism. Information on the anticipated exposure of consumers to the substance, the potential intake and dietary impact of the substance should be provided.

40. The safety assessment of the expressed substance should take into account its function and concentration in the food. The number of viable microorganisms remaining in the food should be also determined and compared to a conventional counterpart. All quantitative measurements should be analysed using appropriate statistical techniques. Current dietary exposure and possible effects on population sub-groups should also be considered.

- In the case of proteins, the assessment of potential toxicity should take into account the structure and function of the protein and should focus on amino acid sequence similarity between the protein and known protein toxins and anti-nutrients (e.g., protease inhibitors, siderophores) as well as stability to heat or processing and to degradation in appropriate representative gastric and intestinal model systems. Appropriate oral toxicity studies⁹ may be carried out in cases where the protein is present in the food, but is not closely similar to proteins that have been safely consumed in food, and has not previously been consumed safely in food, and taking into account its biological function in microorganisms where known.
- Potential toxicity of non-protein substances that have not been safely consumed in food should be assessed in a case-by-case basis depending on the identity, concentration, and biological function of the substance and dietary exposure. The type of studies to be performed may include evaluations of metabolism, toxicokinetics, chronic toxicity/ carcinogenicity, impact on reproductive function, and teratogenicity.

41. The newly expressed or altered properties should be shown to be unrelated to any characteristics of donor organisms that could be harmful to human health. Information should be provided to ensure that genes coding for known toxins or anti-nutrients present in the donor organisms are not transferred to recombinant-DNA microorganisms that do not normally express those toxic or anti-nutritious characteristics.

- Additional *in vivo* or *in vitro* studies may be needed on a case-by-case basis to assess the toxicity of expressed substances, taking into account the potential accumulation of any substances, toxic metabolites or antibiotics that might result from the genetic modification.

Compositional Analyses of Key Components

42. Analyses of concentrations of key components¹⁰ of foods produced by recombinant-DNA microorganisms should be compared with an equivalent analysis of a conventional counterpart produced under the same conditions. The statistical significance of any observed differences should be assessed in the context of the range of natural variations for that parameter to determine its biological significance. Ideally, the comparator(s) used in this assessment should be food produced using the near isogenic parent strain. The purpose of this comparison, in conjunction with an exposure assessment as necessary, is to establish that substances that can affect the safety of the food have not been altered in a manner that would have an adverse impact on human health.

Evaluation of Metabolites

43. Some recombinant-DNA microorganisms may be modified in a manner that could result in new or altered levels of various metabolites in foods produced using these organisms. Where altered metabolite levels are identified in foods, consideration should be given to the potential impacts on human health using conventional procedures for establishing the safety of such metabolites (e.g., procedures for assessing the human safety of chemicals in foods).

44. New or altered levels of metabolites produced by a recombinant-DNA microorganism may change the population of microorganisms in mixed culture, potentially increasing the risk for growth of harmful organisms or accumulation of harmful substances. Possible effects of genetic modification of a microorganism on other microorganisms should be

⁹ Guidelines for oral toxicity studies have been developed in international fora, for example the OECD Guidelines for the Testing of Chemicals.

¹⁰ Key nutrients or key anti-nutrients are those components in a particular food that may have a substantial impact in the overall diet. They may be major nutritional constituents (fats, proteins, carbohydrates), enzyme inhibitors as anti-nutrients, or minor compounds (minerals, vitamins). Key toxicants are those toxicologically significant compounds known to be produced by the microorganism, such as those compounds whose toxic potency and level may be significant to health. Microorganisms traditionally used in food processing are not usually known to produce such compounds under production conditions.

assessed when a mixed culture of microorganisms is used for food processing, such as for production of natural cheese, miso, soy sauce, etc.

Effects of Food Processing

45. The potential effects of food processing, including home preparation, on foods produced using recombinant-DNA microorganisms should also be considered. For example, alterations could occur in the heat stability of an endogenous toxicant or the bioavailability of an important nutrient after processing. Information should therefore be provided describing the processing conditions used in the production of a food. For example, in the case of yoghurt, information should be provided on the growth of the organism and culture conditions.

Assessment of Immunological Effects

46. When the protein(s) resulting from an inserted gene is present in the food, it should be assessed for its potential to cause allergy. The likelihood that individuals may already be sensitive to the protein and whether a protein new to the food supply will induce allergic reactions should be considered. A detailed presentation of issues to be considered is presented in the Annex to this guideline.

47. Genes derived from known allergenic sources should be assumed to encode an allergen and be avoided unless scientific evidence demonstrates otherwise. The transfer of genes from organisms known to elicit gluten-sensitive enteropathy in sensitive individuals should be avoided unless it is documented that the transferred gene does not code for an allergen or for a protein involved in gluten-sensitive enteropathy.

48. Recombinant-DNA microorganisms that remain viable in foods may interact with the immune system in the gastrointestinal tract. Closer examination of these interactions will depend on the types of differences between the recombinant-DNA microorganism and its conventional counterpart.

Assessment of Viability and Residence of Microorganisms in the Human Gastrointestinal Tract

49. In some foods produced using recombinant-DNA microorganisms, ingestion of these microorganisms and their residence¹¹ may have an impact on the human intestinal tract. The need for further testing of such microorganisms should be based on the presence of their conventional counterpart in foods, and the nature of the intended and unintended effects of genetic modifications. If processing of the final food product eliminates viable microorganisms (by heat treatment in baking bread, for example), or if accumulations of end-products toxic to the microorganism (such as alcohol or acids) eliminate viability, then viability and residence of microorganisms in the alimentary system need no examination.

50. For applications in which recombinant-DNA microorganisms used in production remain viable in the final food product, (for example, organisms in some dairy products), it may be desirable to demonstrate the viability (or residence time) of the microorganism alone and within the respective food matrix in the digestive tract and the impact on the intestinal microflora in appropriate systems. The nature of intended and unintended effects of genetic modification and the degree of differences from the conventional counterpart will determine the extent of such testing.

ANTIBIOTIC RESISTANCE AND GENE TRANSFER

51. In general, traditional strains of microorganisms developed for food processing uses have not been assessed for antibiotic resistance. Many microorganisms used in food production possess intrinsic resistance to specific antibiotics. Such properties need not exclude such strains from consideration as recipients in constructing recombinant-DNA microorganisms. However, strains in which antibiotic resistance is encoded by transmissible genetic elements should not be used where such strains or these genetic elements are present in the final food. Any indication of the presence of plasmids, transposons, and integrons containing such resistance genes should be specifically addressed.

52. Alternative technologies, demonstrated to be safe, that do not rely on antibiotic resistance marker genes in viable microorganisms present in foods should be used for selection purposes in recombinant-DNA microorganisms. In general, use of antibiotic resistance markers for constructing intermediate strains should pose no significant hazards that would exclude the use of the ultimate strains in food production, provided that the antibiotic resistance marker genes have been removed from the final construct.

53. Transfer of plasmids and genes between the resident intestinal microflora and ingested recombinant-DNA microorganisms may occur. The possibility and consequences of gene transfer from recombinant-DNA microorganisms and food products produced by recombinant-DNA microorganisms to gut microorganisms or human cells should also

¹¹ Permanent life-long colonization by ingested microorganisms is rare. Some orally administered microorganisms have been recovered in faeces or in the colonic mucosa weeks after feeding ceased. Whether the genetically modified microorganism is established in the gastrointestinal tract or not, the possibility remains that it might influence the microflora or the mammalian host (Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology – *Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganism*, 24-28 September, 2001, Geneva, Switzerland).

be considered. Transferred DNA would be unlikely to be maintained in the absence of selective pressure. Nevertheless, the possibility of such events cannot be completely discounted.

54. In order to minimize the possibility of gene transfer, the following steps should be considered:

- A) chromosomal integration of the inserted genetic material may be preferable to localization on a plasmid;
- B) where the recombinant-DNA microorganism will remain viable in the gastrointestinal tract, genes should be avoided in the genetic construct that could provide a selective advantage to recipient organisms to which the genetic material is unintentionally transferred; and
- C) sequences that mediate integration into other genomes should be avoided in constructing the introduced genetic material.

NUTRITIONAL MODIFICATION

55. The assessment of possible compositional changes to key nutrients, which should be conducted for all foods produced using recombinant-DNA microorganisms, has already been addressed under 'Compositional analyses of key components.' If such nutritional modifications have been implemented, the food should be subjected to additional testing to assess the consequences of the changes and whether the nutrient intakes are likely to be altered by the introduction of such foods into the food supply.

56. Information about the known patterns of use and consumption of a food and its derivatives should be used to estimate the likely intake of the food produced using the recombinant-DNA microorganism. The expected intake of the food should be used to assess the nutritional implications of the altered nutrient profile both at customary and maximal levels of consumption. Basing the estimate on the highest likely consumption provides assurance that the potential for any undesirable nutritional effects will be detected. Attention should be paid to the particular physiological characteristics and metabolic requirements of specific population groups such as infants, children, pregnant and lactating women, the elderly and those with chronic diseases or compromised immune systems. Based on the analysis of nutritional impacts and the dietary needs of specific population subgroups, additional nutritional assessments may be necessary. It is also important to ascertain to what extent the modified nutrient is bioavailable and remains stable with time, processing, and storage.

57. The use of modern biotechnology to change nutrient levels in foods produced using microorganisms could result in broad changes to the nutrient profile. The intended modification in the microorganism could alter the overall nutrient profile of the product, which, in turn, could affect the nutritional status of individuals consuming the food. The impact of changes that could affect the overall nutrient profile should be determined.

58. When the modification results in a food product with a composition that is significantly different from its conventional counterpart, it may be appropriate to use additional conventional foods or food components (i.e., foods whose nutritional composition is closer to that of the food produced using the recombinant-DNA microorganism) as appropriate comparators to assess the nutritional impact of the food.

59. Some foods may require additional testing. For example, animal-feeding studies may be warranted for foods produced using recombinant-DNA microorganisms if changes in the bioavailability of nutrients are expected or if the composition is not comparable to conventional foods. Also, foods designed for health benefits, may require an assessment beyond the scope of these guidelines such as specific nutritional, toxicological or other appropriate studies. If the characterization of the food indicates that the available data are insufficient for a thorough safety assessment, properly designed animal studies could be requested on the whole food.

REVIEW OF SAFETY ASSESSMENTS

60. The goal of the safety assessment is a conclusion as to whether the food produced using a recombinant-DNA microorganism is as safe as the conventional counterpart taking into account dietary impact of any changes in nutritional content or value. Nevertheless, the safety assessment should be reviewed in the light of new scientific information that calls into question the conclusions of the original safety assessment.

ANNEX: ASSESSMENT OF POSSIBLE ALLERGENICITY

SECTION 1 – INTRODUCTION

1. All newly expressed proteins¹² produced by recombinant-DNA microorganisms that could be present in the final food should be assessed for their potential to cause allergic reactions. This should include consideration of whether a newly expressed protein is one to which certain individuals may already be sensitive as well as whether a protein new to the food supply is likely to induce allergic reactions in some individuals.
2. At present, there is no definitive test that can be relied upon to predict allergic response in humans to a newly expressed protein, therefore, it is recommended that an integrated, stepwise, case by case approach, as described below, be used in the assessment of possible allergenicity of newly expressed proteins. This approach takes into account the evidence derived from several types of information and data since no single criterion is sufficiently predictive.
3. The endpoint of the assessment is a conclusion as to the likelihood of the protein being a food allergen.

SECTION 2 - ASSESSMENT STRATEGY

4. The initial steps in assessing possible allergenicity of any newly expressed proteins are the determination of: the source of the introduced protein; any significant similarity between the amino acid sequence of the protein and that of known allergens; and its structural properties, including but not limited to, its susceptibility to enzymatic degradation, heat stability and/or, acid and enzymatic treatment.
5. As there is no single test that can predict the likely human IgE response to oral exposure, the first step to characterize newly expressed proteins should be the comparison of the amino acid sequence and certain physicochemical characteristics of the newly expressed protein with those of established allergens in a weight of evidence approach. This will require the isolation of any newly expressed proteins produced by recombinant-DNA microorganisms, or the synthesis or production of the substance from an alternative source, in which case the material should be shown to be structurally, functionally and biochemically equivalent to that produced by recombinant-DNA microorganisms. Particular attention should be given to the choice of the expression host, since post-translational modifications allowed by different hosts (i.e.: eukaryotic vs. prokaryotic systems) may have an impact on the allergenic potential of the protein.
6. It is important to establish whether the source is known to cause allergic reactions. Genes derived from known allergenic sources should be assumed to encode an allergen unless scientific evidence demonstrates otherwise.

SECTION 3 – INITIAL ASSESSMENT

SECTION 3.1 - SOURCE OF THE PROTEIN

7. As part of the data supporting the safety of foods produced using recombinant-DNA microorganisms, information should describe any reports of allergenicity associated with the donor organism. Allergenic sources of genes would be defined as those organisms for which reasonable evidence of IgE mediated oral, respiratory or contact allergy is available. Knowledge of the source of the introduced protein allows the identification of tools and relevant data to be considered in the allergenicity assessment. These include: the availability of sera for screening purposes; documented type, severity and frequency of allergic reactions; structural characteristics and amino acid sequence; physicochemical and immunological properties (when available) of known allergenic proteins from that source.

SECTION 3.2 – AMINO ACID SEQUENCE HOMOLOGY

8. The purpose of a sequence homology comparison is to assess the extent to which a newly expressed protein is similar in structure to a known allergen. This information may suggest whether that protein has an allergenic potential. Sequence homology searches comparing the structure of all newly expressed proteins with all known allergens should be done. Searches should be conducted using various algorithms such as FASTA or BLASTP to predict overall structural similarities. Strategies such as stepwise contiguous identical amino acid segment searches may also be performed for identifying sequences that may represent linear epitopes. The size of the contiguous amino acid search should be based on a scientifically justified rationale in order to minimize the potential for false negative or false

¹² This assessment strategy is not applicable for assessing whether newly expressed proteins are capable of inducing gluten-sensitive or other enteropathies. The issue of enteropathies is already addressed in Assessment of immunological effects, paragraph 47 of the Guideline for the Conduct of Food Safety Assessment of Foods Produced using Recombinant-DNA Microorganisms. In addition, the strategy is not applicable to the evaluation of foods where gene products are down regulated for hypoallergenic purposes.

positive results¹³. Validated search and evaluation procedures should be used in order to produce biologically meaningful results.

9. IgE cross-reactivity between the newly expressed protein and a known allergen should be considered a possibility when there is more than 35% identity in a segment of 80 or more amino acids (FAO/WHO 2001) or other scientifically justified criteria. All the information resulting from the sequence homology comparison between the newly expressed protein and known allergens should be reported to allow a case-by-case scientifically based evaluation.

10. Sequence homology searches have certain limitations. In particular, comparisons are limited to the sequences of known allergens in publicly available databases and the scientific literature. There are also limitations in the ability of such comparisons to detect non-contiguous epitopes capable of binding themselves specifically with IgE antibodies.

11. A negative sequence homology result indicates that a newly expressed protein is not a known allergen and is unlikely to be cross-reactive to known allergens. A result indicating absence of significant sequence homology should be considered along with the other data outlined under this strategy in assessing the allergenic potential of newly expressed proteins. Further studies should be conducted as appropriate (see also sections 4 and 5). A positive sequence homology result indicates that the newly expressed protein is likely to be allergenic. If the product is to be considered further, it should be assessed using serum from individuals sensitized to the identified allergenic source.

SECTION 3.3 – PEPSIN RESISTANCE

12. Resistance to pepsin digestion has been observed in several food allergens; thus a correlation exists between resistance to digestion by pepsin and allergenic potential¹⁴. Therefore, the resistance of a protein to degradation in the presence of pepsin under appropriate conditions indicates that further analysis should be conducted to determine the likelihood of the newly expressed protein being allergenic. The establishment of a consistent and well-validated pepsin degradation protocol may enhance the utility of this method. However, it should be taken into account that a lack of resistance to pepsin does not exclude that the newly expressed protein can be a relevant allergen.

13. Although the pepsin resistance protocol is strongly recommended, it is recognized that other enzyme susceptibility protocols exist. Alternative protocols may be used where adequate justification is provided¹⁵.

SECTION 4 – SPECIFIC SERUM SCREENING

14. For those proteins that originate from a source known to be allergenic, or have sequence homology with a known allergen, testing in immunological assays should be performed where sera are available. Sera from individuals with a clinically validated allergy to the source of the protein can be used to test the specific binding to IgE class antibodies of the protein in *in vitro* assays. A critical issue for testing will be the availability of human sera from sufficient numbers of individuals¹⁶. In addition, the quality of the sera and the assay procedure need to be standardized to produce a valid test result. For proteins from sources not known to be allergenic, and which do not exhibit sequence homology to a known allergen, targeted serum screening may be considered where such tests are available as described in paragraph 17.

15. In the case of a newly expressed protein derived from a known allergenic source, a negative result in *in vitro* immunoassays may not be considered sufficient, but should prompt additional testing, such as the possible use of skin test and *ex vivo* protocols¹⁷. A positive result in such tests would indicate to a potential allergen.

SECTION 5 – OTHER CONSIDERATIONS

16. The absolute exposure to the newly expressed protein and the effects of relevant food processing will contribute toward an overall conclusion about the potential for human health risk. In this regard, the nature of the food product intended for consumption should be taken into consideration in determining the types of processing which would be applied and its effects on the presence of the protein in the final food product.

¹³ It is recognized that the 2001 FAO/WHO consultation suggested moving from 8 to 6 identical amino acid segment searches. The smaller the peptide sequence used in the stepwise comparison, the greater the likelihood of identifying false positives, inversely, the larger the peptide sequence used, the greater the likelihood of false negatives, thereby reducing the utility of the comparison.

¹⁴ The method outlined in the U.S. Pharmacopoeia (1995) was used in the establishment of the correlation (Astwood *et al.*, 1996).

¹⁵ Reference to Joint FAO/WHO Expert Consultation (2001).

¹⁶ According to the Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology (22-25 January 2001, Rome, Italy) a minimum of 8 relevant sera is required to achieve a 99% certainty that the new protein is not an allergen in the case of a major allergen. Similarly, a minimum of 24 relevant sera is required to achieve the same level of certainty in the case of a minor allergen. It is recognized that these quantities of sera may not be available for testing purposes.

¹⁷ Reference to Joint FAO/WHO Expert Consultation (2001) on description of *ex vivo*.

17. As scientific knowledge and technology evolves, other methods and tools may be considered in assessing the allergenicity potential of newly expressed proteins as part of the assessment strategy. These methods should be scientifically sound and may include targeted serum screening (i.e. the assessment of binding to IgE in sera of individuals with clinically validated allergic responses to broadly-related categories of foods); the development of international serum banks; use of animal models; and examination of newly expressed proteins for T-cell epitopes and structural motifs associated with allergens.

組換えDNA微生物利用食品の安全性評価の
実施に関するガイドライン

(CAC/GL 46-2003)

セクション1 —適用範囲

1. 本ガイドラインは「モダンバイオテクノロジー応用食品のリスク分析に関する原則」を支持し、組換えDNA 微生物の作用を利用して製造した食品の安全性および栄養的的局面を扱う¹。こうした食品の製造に用いる組換えDNA 微生物は、一般的に食品製造において安全かつ意図的に使用されてきた歴史を有する株に由来するモダンバイオテクノロジー技術を用いて得られる。しかし、受容体株に安全に使用されてきた歴史がない場合は、その安全性が確立されるべきである²。こうした食品・食品成分には生存能力のある組換えDNA 微生物を含む場合または生存能力のない組換えDNA 微生物を含む場合がある。また、組換えDNA 微生物を利用し発酵により製造されるが、組換えDNA 微生物は既に除去されている可能性もある。

2. 以下の問題は、他の組織でまたは他の手段によって検討する必要があることを考慮し、本文書では扱わない。
 - ・ 農業に利用される微生物（植物保護を目的とした利用、バイオ肥料、動物飼料への利用またはその飼料が投与された動物に由来する食品等）の安全性
 - ・ 食品製造に用いられる組換えDNA 微生物の環境への放出に関わるリスク
 - ・ 食品製造に用いる酵素を含み添加物や加工補助剤として用いられる微生物によって製造された物質の安全性³
 - ・ 食品への微生物利用に起因するであろう特定の趣旨の保健効果または健康に効果的作用
 - ・ 組換えDNA 微生物を扱う食品製造作業者の安全性に関わる問題

¹ こうした場合に含まれる微生物には細菌・イースト・線維状真菌などがある（こうした利用の例としてはヨーグルト・チーズ・発酵ソーセージ・納豆・キムチ・パン・ビール・ワインの製造などが挙げられるがそれに限定されない）。

² 食品に安全に使用されてきた歴史のない場合、食品の製造に用いられる微生物の安全性を立証する基準については、本文書では扱わない

³ FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議（JECFA）において食品加工に用いる「酵素製剤のための一般規格と検討事項」に関するガイドラインを改訂中である。このガイドラインは、遺伝子組換え微生物由来酵素製剤の評価に用いられてきた。

3. 食品製造に用いられている多様な微生物は、科学的な評価が実施される以前から長年亘って安全に利用されてきた。例えば、生存微生物の摂食を含み、それらを用いて製造される食品に関連する潜在的リスクの全てを完全に明らかにする方法で科学的に評価されて来た微生物はほとんどない。さらに、リスク分析に関するコーデックス原則、特にリスク評価に関する原則は主に、食品添加物や残留農薬等の化学物質、または同定可能な危害やリスクを有する特定の化学・微生物汚染物質等の識別のために用いることを目的としている。則ち、それらは、本来、微生物発酵によって変化した食品や食品加工に微生物を意図的に利用することを目的としていない。実施されている安全性評価は、規定された試験の結果を評価することよりも、これらの微生物の病原性に関連する特性が無いこと、またはこうした微生物の摂取に起因する有害作用の報告が無いことに重点を置いている。さらに、多くの食品には、従来安全性試験手法を用いた場合有害と見なされるであろう物質が含まれている。従って、丸ごとの食品の安全性を検討する場合は、よりの絞った方法が必要となる

4. この手法の策定において検討する情報には以下のものが含まれる。
 - A) 食品製造における生存微生物の利用
 - B) こうした生物において生じた可能性の高い遺伝子組換えの種類⁴の検討
 - C) 安全性評価の実施に利用できる方法の種類
 - D) 遺伝的安定性、遺伝子伝達の可能性、胃腸管のコロニー形成とその持続性⁴、組換えDNA 微生物における胃腸内フローラ（細菌叢）や哺乳類宿主との相互作用、組換えDNA 微生物の免疫系への影響など食品製造で用いる微生物に固有の問題

5. この手法は、組換えDNA 微生物を用いて製造した食品の安全性について、組換えDNA微生物を用いて製造した食品のみならず微生物そのものについても、安全使用の歴史を有する既存の対応物との関連で評価するという原則に基づいている。この手法は意図的な影響と非意図的な影響の両方を考慮に入れたものである。その目的は特定食品や微生物に関わる危害のすべてを明らかにするというよりはむしろ、既存の対応物との比較において新規のまたは改変した危害を明らかにすることである。

6. この安全性評価手法は、「モダンバイオテクノロジー応用食品のリスク分析に関する原則」のセクション3 で述べられたリスク評価の枠組みにはいる。新たなまたは改変され

⁴ 持続性は、微生物が2つの腸内移動時間より長く胃腸管に生存することを意味する（国際生命科学研究所、*The safety assessment of viable genetically modified microorganisms used as food*, 1999, ブラッセル；バイオテクノロジー応用食品に関するFAO/WHO 合同専門家会議—遺伝子組換え微生物由来食品の安全性評価、2001年9月24-28日、スイス・ジュネーブ）。

た危害や、栄養学的なまたはその他の食品安全性の問題を安全性評価によって明らかにする場合には、それに関わるリスクをまず評価してヒトの健康との関連を調べる。安全性評価、また必要に応じ追加リスク評価を行った後、食品または製造過程で用いた微生物などの食品成分は市販を検討する前に「モダンバイオテクノロジー応用食品のリスク分析に関する原則」に沿って、リスク管理に関する検討を行う。

7. 消費者の健康影響に関する上市後モニタリング等のリスク管理措置はリスク評価過程の助けとなりうる。これについては、「バイオテクノロジー応用食品のリスク分析に関する原則」のパラグラフ20 に述べられている。

8 本ガイドラインでは、既存の対応物との比較に基づき、組換えDNA 微生物を用いて製造した食品の安全性を評価するために推奨された手法を示している。安全性評価は、食品製造に用いる組換えDNA 微生物の安全性、さらに、必要に応じて、食品に組換えDNA 微生物を作用させることによって生成された代謝産物に注目することとなる。このガイドラインでは、こうした評価の際に一般的に適用されるデータと情報を明示している。組換えDNA 微生物または組み換えDNA 微生物を利用して製造された食品を個別の既存の対応物と比較する時は、それらが意図した影響の結果であるかどうかに関わらず、確認される如何なる相違性についても考慮すべきである。組み換えDNA 微生物と食品基質や腸内フローラとの相互作用並びに新たに発現したタンパク質や二次代謝産物の安全性について十分な検討がなされる必要がある。このガイドラインは組換えDNA 微生物を用いて製造した食品またはその成分を対象としたものであるが、ここに示した手法は一般的に、その他の技術で改変された微生物を用いて製造された食品にも適用できる。

セクション2 -定義

9. このガイドラインでは以下の定義を用いる。

「組換えDNA 微生物」とは、細菌、イーストまたは糸状菌であって、その遺伝物質を組換えデオキシリボ核酸（DNA）や核酸の細胞・細胞小器官への直接注入などのインビトロ核酸技術により変化させたものを指す。

「既存の対応物」⁵とは、以下のいずれかを指す。

- ・ 食品の製造または加工において、安全に使用されてきた既知の歴史を有し、組換えDNA 株に関わる微生物または株である。微生物は食品中で生存能力を有する場合は

⁵ モダンバイオテクノロジー応用微生物は当分の間は既存の対応物として使用しないことで合意が得られている。

ある、または加工中に除去されあるいは生存不能になる場合がある。

- ・ 食品製造における一般的使用に基づき安全性が実証されている従来の食品製造微生物を用いて製造した食品

セクション3 - 食品安全性評価の導入

10. 微生物を意図的に成長させることにより製造された食品のほとんどは古来株に由来し、科学的な安全性評価方法が登場するずっと以前から安全と考えられている。微生物は、従来の技術を用いるかモダンバイオテクノロジーを用いるかに関わらず、成長速度が早いなど短時間で遺伝子組換えを可能にする性質を有する。従来の遺伝子技術による食品製造で用いられる微生物は、一般的に、上市前に広範な化学的、毒性学的、疫学的または医学的な評価が体系的に実施されることはなかった。しかし微生物学者、菌学者および食品技術者は食品製造において有効な表現型の特徴について細菌、イーストおよび糸状菌の新しい菌株を評価してきた。
11. 組換えDNA 微生物の安全性評価では、食品における関連微生物の使用、組換えDNA微生物または組換えDNA 微生物を構築するために用いられる受容体株内に病原体の特徴であることが分かっている特性を有しない旨、受容体・関連生物に起因する既知の副作用に関して記録すべきである。さらに、組換えDNA 微生物が直接食品に影響を及ぼしまたは残留する場合は、食品の安全性への如何なる影響も調べる必要がある。
12. 毒性学的な指標の評価において動物モデルを用いることは、農薬など多くの化合物のリスク評価において主要な要素である。しかしほとんどの場合、被試験物質の特徴は十分に明らかにされており、純度が既知で、特別な栄養的価値がなくそれに対するヒトの曝露は一般的に低い。従って、ヒトに重点を置いた潜在的な健康上の有害影響を明らかにするために、こうした化合物をヒトの予想曝露量より数段階多い一定範囲内の用量で動物に投与することは比較的簡単である。この方法ではほとんどの場合、有害影響が認められない曝露量を概算し、適切な安全性係数の適用によって安全な摂取量を設定することは可能である。
13. 丸ごとの食品に関するリスク試験については、それが化合物の複雑な混合物であり、しばしば組成や栄養価において多様であるため、動物試験を容易には適用できない。量が多く満腹になるため、動物に与えることのできる量は通常はヒトの食事に含まれると考えられる量の数倍でしかない。さらに、食品に関する動物試験の実施に当たり、物質そのものには直接関係しない有害影響の誘発を避けるため、使用される食餌の栄養価とバランスを考慮することが重要である。従って、潜在的な有害影響を判定し、食品の個々の特性との関係を確実に示すことは非常に困難であろう。特性判定の結果、

十分な安全性評価を行うにはデータが不十分であることが示唆された場合は、適切に計画された動物実験を実施するよう要求することもできる。動物試験の必要性を判断する際に考慮すべきもう1つの事項は、有意義な情報を生み出す可能性が低い場合に、動物をこうした試験に使用することが妥当であるかどうかということである。

14. 一般的に毒性学的評価で用いる動物試験は、食品製造に用いられる微生物の摂取に関わる潜在的なリスクの判定試験には容易には適用できない。微生物は生命体であり、多くの生化学物質で構成される複雑な構造を持つため、純粋な化合物と比較することはできない。いくつかの加工食品においては、微生物が加工や摂取の後も生き延び、競争し、またいくつかの場合は、腸内環境でかなりの期間生存することが可能である。その供与体または遺伝子・遺伝子産物が食品において安全に使用された歴史がない場合は、修飾された遺伝物質と遺伝子産物の特徴付けおよび供与体に関する入手可能な情報を考慮し、組換えDNA 微生物の安全性を評価するために、適切な動物試験を使用すべきである。さらに、食品の栄養価や食品中に新たに発現した物質の生体利用率を評価するためには、適切に計画された動物試験であれば使用することができる。
15. 微生物を用いて製造した丸ごとの食品について従来の毒性学的試験やリスク評価法を適用することは難しいため、組換えDNA 微生物を用いて製造した食品の安全性評価にはよりの絞った手法が要求される。これには、実質的同等性の概念を用い、意図した影響、修飾の本質、微生物におけるまたは食品に及ぼすその作用において生じる可能性のある検出可能な非意図的变化を考慮に入れた、安全性評価のための学際的手法を開発することによって対処してきた⁶。
16. 安全性評価は組換えDNA 微生物を対象として行われるが、安全性評価過程の主要段階である実質的同等性の概念を適用する際は食品基質との相互作用に関する補足的情報も考慮すべきである。しかし、実質的同等性の概念は安全性評価そのものではない。むしろ、既存の対応物に応じた組換えDNA 微生物と既存の対応物に応じた組換えDNA を利用して製造した食品の両方の安全性評価を構築するために使用される出発点である。この概念は、食品加工において使用される組換えDNA 微生物や組換えDNA 微生物を使用して製造された食品と、パラグラフ 9 に定義された個々の既存の対応物における評価上の類似点および相違点を明らかにするために用いられる。これは潜在的な安全性や栄養学的な問題の確認において助けとなる、また組換えDNA 微生物を使用して製造された食品の安全性評価において、現在のところ最善の方法であるとみなされている。

⁶ 実質的同等性の概念については、バイオテクノロジー応用食品に関するFAO/WHO 専門家会議—遺伝子組換え植物の安全性（2000年5月29日～6月2日、スイス、ジュネーブ）と、バイオテクノロジー応用食品に関するFAO/WHO 合同専門家会議—遺伝子組換え微生物由来食品の安全性評価（2000年9月24

この方法で実施した安全性評価は、新しい製品の絶対的安全性を意味するものではなく、むしろ組換えDNA 微生物と組換えDNA 微生物を使用して製造された食品の両方の安全性を既存の対応物との比較において考慮できるように、同定された相違点の安全性を評価することに重点を置いている。

非意図的影響

17. 受容体生物におけるDNA 伝達や維持のために用いるものを含めて同定されたDNA 配列の追加・置換・除去・再配列によって微生物に特定の標的形質（意図的影響）を導入する際、余分な形質が得られたり、既存の形質が失われたり修飾される場合がある。非意図的影響が発生する可能性は、インビトロの核酸技術の使用に限られるものではない。むしろ、従来の遺伝子技術や手法を用いた菌株の開発において、または微生物が意図的・非意図的な選択的圧力に曝露されることによって起きる可能性のある本質的で一般的な現象である。非意図的影響は、他の微生物との競争、微生物の生態学的適応性、摂取後の微生物のヒトに対する影響または微生物を用いて製造した食品の安全性の観点で、有害である場合、有益である場合、またはどちらでもない場合がある。組換えDNA 微生物における非意図的影響は、DNA 配列の意図的組換えによって生じる場合もあり、組換えまたは組換えDNA 微生物におけるその他の自然事象によって起きる場合もある。安全性評価には、組換えDNA 微生物由来食品がヒトの健康に対して予期せぬ有害影響をもたらす可能性を軽減するためのデータ・情報を含むべきである。
18. 非意図的影響は、ある微生物にとって新たなDNA 配列を微生物ゲノムに挿入することによって、生じる可能性がある。これらは自然界に存在する転移性の遺伝的要素の活性後に認められる影響と比較することができる。DNA の挿入によって、受容体のゲノムの遺伝子発現に変化が起きる可能性がある。非相同供給源のDNA を遺伝子に挿入することにより、融合タンパク質と呼ばれるキメラタンパク質が合成される場合もある。さらに遺伝的不安定性およびその影響も検討すべきである。
19. 非意図的影響から新たなまたは改変された形態の代謝産物が形成されることもある。例えば、高濃度での酵素の発現や当該生物にとって新規の酵素の発現が二次的な生化学的影響を及ぼし、または代謝経路の調整に変調を来したり、若しくは代謝産物の量が増えたりする。
20. 遺伝子組換えによる非意図的影響は、2 種類に分類できる。「予測可能」な影響と「予期せぬ」影響である。多くの非意図的な影響は加えられた形質、その代謝的影響、ま

～28 日、スイス、ジュネーブ) のセクション4.3 を参照。

た入部位が分かれば、大部分が予測可能である。微生物ゲノムや生理学に関する知識が増大していること、また遺伝子操作の他の形態と比較して組換えDNA 技術によって導入された遺伝物質の機能の特異性が高まっていることにより、特定の修飾による非意図的な影響の予測が容易になる可能性がある。分子生物学および生化学技術を利用して、非意図的な影響を招く恐れのある転写や翻訳の段階において起きる変化を解析することもできる。

21. 組換えDNA 微生物を用いて製造した食品の安全性評価には、こうした非意図的な影響を同定し検出する方法や、その生物学的関連や食品の安全性に対する潜在的影響を評価する手法が含まれる。個別の試験で、起こりうる非意図的な影響を全て検出したりはヒトの健康に対するそれらの関連を確実に同定することはできないため、非意図的な影響の評価には多様なデータと情報が必要である。総合的な検討の結果、こうしたデータや情報により当該食品がヒトの健康に対して有害な影響を及ぼす可能性がないことが保証されるべきである。非意図的な影響の評価においては、市販を意図した食品・飲料向けの菌株の改善のために一般的に選択される微生物の生化学的・生理学的特徴が考慮される。こうした判定は、非意図的な形質を発現する微生物についての最初のスクリーニングとなる。このスクリーニングを通過した組換えDNA 微生物はセクション4に示す安全性評価が課せられる。

食品安全性評価の枠組み

22. 組換えDNA 微生物利用食品の安全性評価は、当該微生物の使用における安全性の判断に基づき、以下を含む関連要因を扱う段階的過程に従う。
 - A) 組換えDNA 微生物の記述
 - B) 受容体微生物と食品製造におけるその利用の記述
 - C) 供与体の記述
 - D) ベクターと構成体を含む遺伝子組換えの記述
 - E) 遺伝子組換えの特徴付け
 - F) 安全性評価
 - a. 発現物質：潜在的毒性および病原性に関わるその他の形質の評価
 - b. 主要成分の組成分析
 - c. 代謝産物の評価
 - d. 食品加工の影響
 - e. 免疫学的影響の評価
 - f. ヒトの胃腸管における微生物の生存可能性および定着に関する評価
 - g. 抗生物質耐性と遺伝子伝達

h. 栄養的修飾

23. 特定の場合には、微生物および微生物を利用して製造または加工した食品の特徴によっては、検討中の微生物および製品に固有の問題を扱うために、データ・情報をさらに整備することが必要となる場合がある。
24. 安全性評価のためのデータの整備を目的とする試験は、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・実施すべきである。一次データは、要請があれば規制当局が利用できるようにすべきである。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すべきである。分析方法では全て感度を示すべきである。
25. 安全性評価の最終目標は、利用できる最善の科学的知識に照らして、その食品が意図した使用目的に従って調製または消費された場合に有害とならないこと、生存可能な生物が食品中に残存する際に当該生物そのものが有害とならないことを保証することである。安全性評価では、免疫障害を持つ個人、乳児、および高齢者を含めた母集団全体の保健問題を扱うべきである。こうした評価において期待される指標は、栄養成分含量や栄養価の変化が食事に及ぼす影響を考慮に入れた上で、新規食品および微生物が既存の対応物と同程度に安全であるかどうかの結論を得ることである。微生物が摂取時点で生存の可能性がある場合は、胃腸管における組換えDNA 微生物の定着や、必要に応じ、微生物とほ乳類（特に人）の胃腸内フローラとの相互作用や組換えDNA微生物の免疫系への影響を考慮に入れて、微生物の安全性を既存の対応物と比較すべきである。基本的に、安全性評価過程の最終目標は、リスク管理者が人の健康保護を目的として何らかの措置が必要かどうかを判断することができ、またそれが必要な場合には十分な情報の入手が可能で、この点に関し適切な決定を下すことができる方法で、検討中の製品を明確にすることである。

セクション4 - 一般検討事項

組換えDNA微生物の記述

26. 安全性評価の対象となる細菌、イーストまたは真菌の菌株と食品について記述すべきである。この記述は、生物または安全性評価の対象となる当該生物を使用して製造された食品の本質を理解する際に役立つものであることが望ましい。食品製造に使用されるかまたは食品中に含まれる組換えDNA 微生物は、分子学的方法を用いて適切に同定を行い保管培養基として、できれば確立された培養コレクションで保管すべきである。これは、当初の安全性評価を見直す際に役立つであろう。こうした保管培養基は、

要請があれば規制当局が利用できるようにすべきである。

受容体微生物および食品製造におけるその使用の記述

27. 受容体微生物または組換え対象となる微生物について包括的に記述すべきである。受容体微生物は、食品製造における安全な使用または食品中での安全な消費の歴史を有すべきである。毒素、抗生物質、またはその他、食品に存在すべきではない物質を生成する、遺伝的に不安定となるか抗生物質耐性に至る恐れのある、または病原性に関わる機能を伝達する遺伝子（病原性島（pathogenicity island）または病原性因子（virulence factor）として知られる）を含む可能性がある遺伝的要因を有する、といった生物については、受容体としての使用を検討すべきではない。必要なデータと情報には以下のものを含むが、それに限定されない。
- A) 本体確認：学名、一般名、微生物を示すその他の名称、株の名称、株やその起源に関する情報、当該生物やその前身物質の入手が可能な公認培養保管庫の取得番号やその他の情報、必要に応じて分類に役立つ情報
 - B) 利用・培養歴、菌株の開発に関する既知の情報（突然変異の分離または菌株の構築に用いた先祖株など）、特にヒトの健康に有害な影響を及ぼす可能性のある形質の同定に関する情報
 - C) 既知の毒素、抗生物質、抗生物質耐性要因または病原性に関する他の要因もしくは免疫学的影響を含み、安全性に関わる受容体微生物の遺伝子型と表現型に関する情報、および微生物の遺伝的安定性に関する情報
 - D) 食品製造において安全に用いられたかまたは食品中で安全に消費された歴史。
 - E) 受容体微生物の培養に用いられる関連する製造要因についての情報
28. 関連する表現型・遺伝子型の情報は、特に関連種が食品に用いられ、ヒトや他の動物における病的影響に関わる場合は、受容体微生物についてのみならず、関連種および受容体株の機能に影響を及ぼす染色体外の遺伝的要素についても提供すべきである。必要に応じ、挿入配列・トランスポゾン・プラスミド・プロファージなど可動性DNA要素の存在を含め、受容体微生物の遺伝的安定性に関する情報を考慮すべきである。
29. 使用歴には、受容体微生物が一般的にどのように増殖・輸送・保管されるのか、菌株の本体や微生物・食品の製造仕様を確認するための方法など一般的に採用されている品質保証法、またこうした生物が加工後も食品中に生存できるかどうか、加工の結果除去されたり生存が不可能になるかどうか、などに関する情報が含まれる。

供与体の記述

30. 供与体および適用可能なら中間生物、必要に応じ関連生物に関する情報を提示すべきである。供与体または中間生物、その他密接に関連する種が自然に病原性または毒素生成の特徴を示すか否か、ヒトの健康に影響するその他の形質を有するか否かを決定することは、特に重要である。供与体または中間生物の記述には以下を含むべきである。
- A) 本体確認：学名、一般名、生物を示すその他の名称、株の名称、株やその起源に関する情報、当該生物やその前身物質の入手が可能な公認培養保管庫の取得番号やその他の情報、必要に応じて分類に役立つ情報
 - B) 食品の安全性に関わる生物または関連生物に関する情報
 - C) 既知の毒素、抗生物質、抗生物質耐性要因・病原性に関わる他の要因、または免疫学的影響を含み、安全性に関わる微生物の遺伝子型と表現型に関する情報
 - D) 可能なら食品供給および意図した食品用途以外の曝露経路（汚染物質としての存在の可能性など）における、過去および現在の使用に関する情報

ベクターおよび構成体を含む遺伝子組み換えの記述

31. 遺伝子組換えに関する十分な情報を提供して、受容体微生物に伝達されまたはその中で組換えられた可能性のある遺伝物質の同定を可能にすると共に、微生物ゲノムに添加れ、挿入され、その中で組換えられまたはそこから除去されたDNA の特徴付けを裏付けるデータの解析のために必要な情報を提供すべきである。
32. 株の構築過程の記述には以下を含むべきである。
- A) 遺伝子組換えに用いる特定の方法に関する情報
 - B) 供給源（植物、微生物、ウイルス、合成など）、組換えDNA 微生物における同定と期待される機能、プラスミドについてのコピー数など微生物組換えに用いるDNA に関する情報
 - C) 最終受容生物への導入前にDNA を製造・加工するために用いる生物（他の細菌や真菌など）を含む中間受容体生物
33. 以下を含めて、添加され、挿入され、削除され、または組換えられたDNA に関する情報を提供すべきである。
- A) マーカー遺伝子、ベクター遺伝子、DNA の機能に影響を及ぼす調整およびその他の

要素を含み遺伝的構成成分のすべてに関する特徴付け

- B) サイズと同定
- C) 最終ベクター・構成体における配列の位置と方向
- D) 機能

遺伝子組換えの特徴の明示

34. 組換えDNA 微生物を利用して製造した食品の組成や安全性に対する遺伝子組換えの影響に関し、明確な理解に資するため、遺伝子組換えについての包括的な分子的・生化学的特徴付けを実施すべきである。安全性評価を円滑化するため、挿入するDNA は望ましくは意図した機能の発現に必要な配列に限定すべきである。

35. 組換えDNA 微生物におけるDNA 組換えに関する情報を提示すべきである。これには以下を含むべきである。

- A) プラスミドや目標とする遺伝子配列の伝達に用いられるその他のキャリアーDNA など、添加・挿入・削除されたかまたはその他の修飾が行われた遺伝物質の特徴付けと記述。これには、使用されたプラスミドまたはその他遺伝的要素の流動化の可能性に関する解析、添加・挿入・削除されまたはその他組換えが行なわれた遺伝物質（染色体または染色体外の部位）の位置、多重コピープラスミドに位置する場合はそのプラスミドのコピー数を含むべきである。
- B) 挿入部位の数。
- C) 各挿入部位における組換え遺伝物質の構成および周囲配列、これには、挿入・組換え・削除された物質、プラスミド、または目標とする遺伝子配列を伝達するために使用されるキャリアーDNA のコピー数および配列データを含む。これは、挿入・組換え・削除された物質の結果として発現した如何なる物質の同定をも可能にするであろう。
- D) 融合タンパク質を生じるものを含め、挿入されたDNA 内のオープンリーディングフレームまたは染色体・プラスミド内の連続DNA に対する組換えによって生成されたオープンリーディングフレームの同定。
- E) 潜在的な有害機能をコード化しまたは有害機能の発現に影響することが知られている配列に関する特記。

36. 組換えDNA 微生物中の発現物質に関する情報を提示すべきである。これには以下を含むべきである。

- A) 遺伝子産物（タンパク質や非翻訳RNA など）または食品に存在する可能性のある新

規物質を同定するため転写または発現産物の分析などを含むその他の情報。

- B) 遺伝子産物の機能
- C) 新形質の表現型に関する記述
- D) 発現遺伝子産物の微生物における発現の量と部位（細胞内、グラム陰性細菌の場合ペリプラスム間隙、真核微生物内では細胞小器官（organelle）、菌体外へ分泌）および、可能な場合は生物中の代謝産物の濃度
- E) 発現配列や遺伝子の機能が特定の内因性mRNAやタンパク質の濃度を変化させる可能性がある場合、挿入遺伝子産物の量
- F) 遺伝子組換えの意図する機能に適用可能な場合は、遺伝子産物がない旨、または遺伝子産物に関わる代謝産物の変化

37. さらに、以下を目的として情報を提供すべきである。

- A) 細胞への導入後に組換え遺伝物質の配列が保持されているかどうか⁷や顕著な配列の転換が起きているかどうかを示す、また食品製造における使用に必要とされる程度まで組換え株が伝播しているかどうかを示す。これには、現行の技術に従った貯蔵の期間中に起こりうることを含む。
- B) 発現タンパク質のアミノ酸配列を意図的に修飾することによって、翻訳後の修飾に変化が生じたり、構造・機能に不可欠な部位に影響を与えるかどうかを示す。
- C) 修飾の意図する効果が達成されたかどうか、また発現した形質のすべてが食品製造における使用に必要とされる程度の伝播において安定でありかつ遺伝の法則に則った方法で発現され受け継がれているかどうかを示す。表現型の特徴が直接計測できない場合は、挿入または組換えDNAの遺伝または対応するRNAの発現を調べることが必要となる場合もある⁸。
- D) 新たに発現した形質が予想された通りに適切な細胞内の位置を標的として発現しているかどうか、または対応する遺伝子の発現を促進する関連調節配列に一致する方法・濃度で分泌されているかどうかを示す。
- E) 受容体微生物における1つまたはそれ以上の遺伝子が修飾または遺伝的交換過程の影響を受けていることを示す根拠があるかどうかを示す。
- F) 新規の融合タンパク質の本体と発現パターンを確認する。

⁷ 微生物ゲノムは真核より流動性が高い。つまり、微生物の成長が早く環境の変化に順応しやすければそれだけ変化に弱い。染色体再配列は一般的である。微生物の一般的遺伝子可塑性が微生物における組換えDNAに影響することもあるので、組換えDNA微生物の安定性評価において考慮しなければならない。

⁸ 組換え株は、遺伝的安定性を実証することができる方法で保持すべきである。

安全性評価

38. 組換え微生物の安全性評価は、導入された変化の本質や程度に応じ、個別に実施すべきである。当該物質または密接に関連する物質は、その機能と曝露を考慮して安全に食品中で消費している場合は、従来の毒性学試験を必要としない場合がある。その他の場合は、新規物質に関し通常のしかるべき毒性学やその他の試験の使用が必要な場合がある。同様に組換えDNA 微生物の食品基質に対する影響を考慮すべきである。食品の特徴付けの結果、利用可能なデータでは総合的な安全性評価の実施には不十分であることが分かった場合は、組換えDNA 微生物および／またはそれを使用して製造された食品を用い、適切に計画された動物試験やインビトロ試験が必要であると考えられる場合がある。

発現物質：潜在的毒性および病原性に関わるその他の形質に関する評価

39. 物質が、食品にとってまたは食品加工において新規である場合は、従来の毒性学試験やその他当該新規物質に適用可能な試験の実施が必要となる。このことは、当該新規物質を組換えDNA 微生物から、もし当該物質が分泌される場合は食品から、分離することが必要となる場合もあり、また物質を別の供給源から合成もしくは製造することが必要となる場合がある。いずれの場合も、物質が構造的・機能的・生化学的に組換えDNA 微生物中で生成されたものと同等であることを証明すべきである。消費者のこの物質に対する想定される曝露、当該物質の潜在的摂取や食事に及ぼす影響に関し情報を提示すべきである。

40. 発現物質の安全性評価では、食品における機能と濃度を考慮すべきである。食品に残留する生存微生物数を測定し、既存の対応物と比較すべきである。全ての定量値は、適切な統計学的手法を用いて解析すべきである。現在の食事由来の曝露および母集団中の小グループに対する影響の可能性も考慮すべきである。

- ・ タンパク質の場合、潜在的な毒性に関する評価では、当該タンパク質の構造および機能を考慮すべきである、また当該タンパク質と既知のタンパク質毒素や抗栄養素（プロテアーゼ阻害因子、シデロフォアなど）におけるアミノ酸配列類似性ならびに熱・加工安定性やしかるべき代表的な消化器系モデルにおける分解に対する安定性に注目すべきである。当該タンパク質は食品中に存在するが、これまで食品において安全に消費されてきたタンパク質と極めて類似しているものではなく、またこれまで食品において安全に消費されたことがない場合、既に明らかとなっている微生物の生物学的機能を考慮して、適切な経口毒性試験⁹を実施する場合もある。

- ・ これまで食品において安全に消費されたことがない非タンパク物質の潜在的な毒性

は、当該物質の本体、濃度、生物学的機能および食事由来の曝露に基づき個別に評価すべきである。実施する試験の種類には、代謝、毒性動態、慢性毒性／発癌性、生殖機能に対する影響および催奇形性に関する評価が含まれる。

41. 新たに発現したり改変された特性は、ヒトの健康に有害である可能性のある供与体生物の特性に無関係であることを示すべきである。供与体生物に存在する既知の毒素や抗栄養素を合成するコードを指定する遺伝子が、通常はこうした毒性や抗栄養素の特徴を発現しない組換えDNA 微生物に伝達されることがないことを担保するために、情報を提供すべきである。

・ 遺伝子組換えによって生じる恐れのある如何なる物質、毒性代謝産物または抗生物質についても蓄積の可能性を考慮して、発現物質の毒性評価のためにインビボまたはインビトロの補足的試験が個別に必要な場合もある。

主要要素の組成分析

42. 組換えDNA 微生物によって製造された食品の主要要素¹⁰ の濃度分析は、同じ条件下で製造された既存の対応物のための同等の分析と比較すべきである。観察された相違点の統計学的有意性は、生物学的有意性を判断するためにそのパラメータに関する自然の変動の範囲で評価すべきである。理想的には、この評価に用いられる比較対象は、ほぼ同一遺伝系親種を用いて製造された食品であるべきである。この比較の目的は、必要に応じて曝露評価と併せ、食品の安全性に影響を与える可能性のある物質がヒトの健康に有害な影響を与える恐れがある方法では変化していないことを明らかにすることである。

代謝産物の評価

⁹ 経口毒性試験に関するガイドラインは、国際学会で策定されており、例えば、化学物質の試験に関する OECD ガイドラインがある。

¹⁰ 主要栄養素または主要抗栄養素は、食事全体に大きな影響を与える可能性のある特定食品の成分である。これらは主要栄養素（脂肪・タンパク質・炭水化物）、抗栄養素としての酵素阻害因子、非主要栄養素（無機質、ビタミン）である。主要毒素は毒性と量が健康に重大な影響を与える可能性のある化合物など、微生物によって製造されることが分かっている毒性学的に重要な化合物である。食品加工に伝統的

43. いくつかの組換えDNA 微生物については、結果的に、その生物を用いて製造した食品において多様な代謝産物が新たに生じ、またはその量を変化させる恐れがある方法で組換えが起こる可能性がある。代謝産物の量の変化が食品において明らかになった場合、こうした代謝産物の安全性を確立するための従来の方法を用いてヒトの健康に対する潜在的な影響を考慮すべきである（食品中の化学物質のヒトに対する安全性の評価手法など）。
44. 組換えDNA 微生物によって新たな代謝産物が生成されまたは代謝産物量が変わることによって、混合培地に共存する微生物数を変化させ潜在的に有害生物の成長や有害物質の蓄積に関するリスクが高まることが考えられる。ナチュラルチーズ、みそ、しょうゆの製造など、複数微生物の共存する混合培地を食品加工に使用する場合は、ある微生物の遺伝子組換えが他の微生物に及ぼす潜在的影響を評価すべきである。

食品加工の影響

45. 組換えDNA 微生物を使用して製造された食品については、家庭での調理を含め、食品加工がこれらの食品に及ぼす潜在的な影響も考慮すべきである。例えば、内因性毒素の熱安定性や重要な栄養素の加工後の生体利用率に変化が起きる恐れがある。従って、食品製造に用いられる加工条件を示す情報が必要である。例えば、ヨーグルトの場合、当該生物の成長と培養条件に関する情報が必要である。

免疫学的影響の評価

46. 挿入遺伝子に由来するタンパク質が食品中に存在する場合、アレルギーを誘発する可能性を評価すべきである。個人が既にそのタンパク質に感受性がある可能性について、また食品供給に新しいタンパク質が加えられた場合、それがアレルギー反応を誘発するかどうかについて検討すべきである。検討すべき問題の詳細はこのガイドラインの添付資料に示した。
47. 既知のアレルギー源から得られた遺伝子はアレルゲンをコード化するものと見なし、他に科学的根拠が示されない限り使用を避けるべきである。感受性のある個人にグルテン過敏性腸疾患を引き起こすことが既知の生物から得られた遺伝子の伝達は、伝達された遺伝子がアレルゲンやグルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質に対し暗号指定しないことが実証されない限り避けるべきである。

に用いられている微生物は通常は、製造条件下でこうした化合物を生成することは知られていない。

48. 食品中で生存し続ける組換えDNA 微生物は、胃腸管の免疫系と相互作用を持つ場合がある。こうした相互作用に関する詳細な試験は、組換えDNA 微生物と既存の対応物における相違点の種類によって異なる。

ヒトの消化器官における微生物の生存能力と定着に関する評価

49. 組換えDNA 微生物を利用して製造する食品の中には、こうした微生物の摂取や定着¹¹がヒトの腸管に影響を与えるものもある。こうした微生物をさらに調べる必要があるか否かは、食品中の既存の対応物の存在および遺伝子組換えの意図的・非意図的影響の本質に基づいて判断する。最終食品の加工によって生存微生物が除去される場合（製パン時の加熱処理など）、または微生物に対して毒性のある最終製品が蓄積（アルコールや酸など）することによって生存能力が排除される場合、消化器系における微生物の生存能力および定着については調べる必要はない。
50. 製造に用いる組換えDNA 微生物が最終食品中で生存し続ける場合は（一部の乳製品中の生物など）、微生物単独のまた消化管における個々の食品基質内での生存能力（または定着時間）および腸内フローラに対する影響に関し、適切な実験系の中で提示すべきである。遺伝子組換えの意図的・非意図的影響の本質および既存の対応物との相違の程度により、こうした試験の範囲を決定することになる。

抗生物質体制と遺伝子伝達

51. 一般的に、食品加工を目的として開発された微生物の従来株は、これまで抗生物質耐性について評価されたことがない。食品製造に用いられる多くの微生物には、特定抗生物質に対する耐性が内在する。こうした特性を有する場合、組換えDNA 微生物の構築における受容体としてこうした株を検討の対象から除外する必要はない。しかし、抗生物質耐性が伝達性の遺伝的要素によってコード化されている株は、このような株や遺伝的要素が最終食品中に存在する場合は、使用すべきではない。こうした耐性遺伝子を含むプラスミド、トランスポゾン、インテグロンの存在が暗示される場合、特別に対処すべきである。
52. 安全性が実証されており、食品中に存在する生存微生物の抗生物質耐性マーカー遺伝子に頼らない代替技術は、組換えDNA 微生物の選択を目的として使用すべきである。

¹¹ 摂取した微生物による永久的コロニー形成はまれである。経口摂取微生物の中には投与終了から数週間後に糞や直腸粘膜で回収されるものもある。遺伝子組換え微生物が胃腸管内に生息しているか否かに関わらず、それが腸内フローラまたはほ乳類宿主に影響与える可能性が残る。

一般的に、抗生物質耐性マーカー遺伝子が最終構成体から除外されていれば、中間株の構築のために抗生物質耐性マーカーを使用することで、食品製造において最終株の使用を排除しうる有意な危害をもたらすことはない。

53. 定着する腸内フローラと摂取された組換えDNA 微生物の間で、プラスミドおよび遺伝子の伝達が起こる可能性がある。組換えDNA 微生物および組換えDNA 微生物によって製造された食品から消化管微生物またはヒト細胞への遺伝子の伝達の可能性およびその影響も検討すべきである。伝達されたDNA は選択的圧力がなければ残留する可能性は低い。しかし、こうした事象の可能性を完全に無視することはできない。
54. 遺伝子伝達の可能性を最小化するために、以下の段階を検討すべきである。
 - ・ 挿入遺伝物質が染色体に組込まれることがプラスミドに局在するより望ましい場合がある。
 - ・ 組換え微生物が胃腸管で生存し続ける場合は、非意図的に遺伝物質が伝達される受容体生物に対し選択的優位性をもたらす可能性がある遺伝子は、遺伝子構築においては避けるべきである。
 - ・ 他のゲノムへの融和を媒介する配列は、導入遺伝物質の構築においては避けるべきである。

栄養学的な装飾

55. 主要栄養素に起こりうる組成の変化に関する評価は、組換えDNA 微生物を利用して製造した食品の全てについて実施すべきであるが、これは既に「主要成分の組成分析」で扱っている。こうした修飾が行なわれた場合は、当該食品に関し、変化の影響ならびにこうした食品が食品供給に導入されることによって、栄養摂取に変化をきたす可能性があるかどうかを評価するために、さらに試験を実施すべきである。
56. 食品およびその派生物の使用と消費についての既知のパターンに関する情報を用い、組換えDNA 微生物を用いて製造した食品の想定摂取量を概算すべきである。こうした食品の予測摂取量を用いて、通常の消費量と最大消費量の両方について改変された栄養特性の栄養学的意味を評価すべきである。消費の可能性が最も高いものの概算値を基盤とすることにより、望ましくない栄養学的影響の可能性を判定することができる。乳児・小児・妊産婦・授乳婦・高齢者・慢性疾患や免疫系疾患を有する人など特定母集団における特定の生理学的特性および代謝条件に注目すべきである。母集団中の特定小集団の栄養学的影響や食事に対する必要性の解析に基づき、栄養学的評価がさらに必要となる場合もある。修飾された栄養素は、どの程度まで生体利用性があり、時

間・加工・保存に対し安定性を維持するかを確認することも重要である。

57. 微生物を利用して製造した食品の栄養レベルを変えるためにモダンバイオテクノロジーを使用すると、栄養特性に大きな変化が生じる可能性がある。微生物を意図的に修飾することにより、製品の全体的栄養特性が変化し、食品を消費する個人の栄養状態に影響を与えることもあり得る。全体的栄養特性に影響を及ぼす可能性がある変化によって生じる影響を調べるべきである。
58. 修飾によって既存の対応物とは組成が大きく異なる食品が生じる場合、食品の栄養学的影響を評価するための適切な比較対象として、通常の食品または食品成分（栄養学的組成が組換えDNA 微生物を利用して製造した食品に近い食品）を追加して用いることは適切であろう。
59. 食品によっては追加試験が必要な場合もある。例えば、栄養素の生物学的利用性の変化が予測されたり、組成が通常食品とは異なる場合は、組換えDNA 微生物を利用して製造した食品について動物給餌試験が当然必要となるであろう。また健康増進を目的とする食品については、特定の栄養学的・毒性学的試験またはその他適切な試験など、こうしたガイドラインの適用範囲を超えた評価が必要な場合がある。食品の特徴付けの結果、利用可能なデータでは総合的な安全性評価の実施には不十分であることが示唆された場合は、丸ごとの食品を対象とする、適切に計画された動物試験が必要となる場合がある。

安全性評価の見直し

60. 安全性評価の目標は、栄養量や栄養価の変化が食事に及ぼす影響を考慮に入れた上で、組換えDNA 微生物を利用して製造した食品が既存の対応物と同程度に安全であるかどうかの結論を得ることである。しかし安全性評価は、当初の安全性評価の結論を左右しうるような新たな科学的情報が得られた場合は、見直すべきである。

アレルギー誘発性に関する評価

セクション1 —はじめに

1. 組換えDNA 微生物によって生成された新たに発現したタンパク質¹ であって、最終食品に存在する可能性があるものはいずれも、アレルギー誘発性について評価すべきである。その際、新たに発現したタンパク質は特定の個人が既にそれに対して感受性を有する可能性があものであるかどうか、また食品供給において新規のタンパク質がある人々に対してアレルギー反応を引き起こす可能性があるかどうかを考慮すべきである。
2. 現在、新たに発現したタンパク質のヒトにおけるアレルギー反応の予測において信頼できる確実な試験はないため、下記に示すような総合的かつ段階的な個別の手法を用いて、新たに発現したタンパク質のアレルギー誘発性を評価する様報告されている。単一の判断基準では十分な予測ができないため、この手法では数種類の情報・データに由来する根拠を考慮している。
3. 評価指標は、当該タンパク質が食品アレルギーである可能性があるかどうかの結論を得ることである。

セクション2 —評価方法

4. 新たに発現したタンパク質のアレルギー誘発性評価における第1 段階は、導入タンパク質の供給源、当該タンパク質と既知のアレルゲンのアミノ酸配列における有意な類似性、および構造的特性を調査することである。これには酵素分解に対する感受性、熱安定性、酸・酵素処理などが含まれるが、これに限定されない。
5. 単一の試験では経口曝露に対するヒトIgE 反応の可能性を予測できないため、新たに発現したタンパク質の特徴を明らかにするための第1 段階は、新たに発現したタンパク質

¹ この評価方法は、新たに発現したタンパク質にグルテン感受性またはその他の腸疾患の誘発能があるかどうかを評価するために適用することはできない。腸疾患の問題は既に、「組換えDNA 微生物利用食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」の paragraph 47 「免疫学的影響の評価」で扱っている。またこの方法は、低アレルギー誘発性を目的とし遺伝子産物が抑制されている場合は食品の評価に適用することはできない。

と既に確立されているアレルゲンにおけるアミノ酸配列および特定の物理化学的性質について、根拠を重視して比較することである。このためには、組換えDNA 微生物を用いて生成された新たに発現したタンパク質を分離し、または別の供給源からそのタンパク質を合成・製造する必要がある。どちらの場合においても、その物質が組換えDNA 微生物で生成されるものと構造的・機能的・生化学的に同等であることを示すべきである。宿主が異なること（真核系に対し原核系）により起こりうる翻訳後修飾が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ため、発現宿主の選択には特に注意を払うべきである。

6. タンパク質の供給源に関しては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。既知のアレルギー誘発性物質に由来する遺伝子は、科学的根拠に基づきそうでない旨が実証されない限り、アレルゲンをコード化するものと仮定すべきである。

セクション3 —最初の評価

セクション3.1 —タンパク質の供給源

7. 組換えDNA 微生物利用食品の安全性を裏付けるデータの一部として、供与体に関するアレルギー誘発性に関する報告は全て情報として示すべきである。これにより、遺伝子のアレルギー誘発性供給源は、IgE 媒介性経口または呼吸性・接触性アレルギーの合理的根拠が入手できる供与体として定義されるであろう。導入タンパク質の供給源についての情報が得られれば、アレルギー誘発性評価において考慮すべき手段や関連データが明らかになる。これには、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・頻度の記載、構造的特徴およびアミノ酸配列、また（可能なら）その供給源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・免疫学的特性が含まれる。

3.2 —アミノ酸配列相同

8. 配列相同比較の目的は、新たに発現したタンパク質の構造がどの程度既知のアレルゲンと類似しているかを評価することである。この情報は、当該タンパク質がアレルギー誘発性を有するかどうかを示唆することになる。新たに発現した全てのタンパク質の構造を全ての既知のアレルゲンと比較することによる配列相同の調査を実施する必要がある。FASTA またはBLASTP など様々なアルゴリズム（段階的手法）を用いて検査を行い、包括的な構造的類似性を予測すべきである。直線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、連続する同一のアミノ酸鎖の段階的な手法による検査などを実施する場合もある。連続するアミノ酸の検査の規模は、偽陰性または偽陽性結果が生じる可能性を最低限に抑えるために科学的正当性に基づくべきである²。生物学的に意味のある結果を得るため、検証済みの調査・評価手法を用いるべきである。

9. 80 コ以上のアミノ酸鎖で35%以上の同一性（2001年FAO/WHO）が認められるか、またはその他の科学的に正当な基準がある場合は、新たに発現したタンパク質と既知のアレルゲンの間のIgE 交差反応の可能性を考慮すべきである。個別の科学的評価を可能にするため、新たに発現したタンパク質と既知のアレルゲンの間の配列相同比較から得られた情報はすべて報告すべきである。

10. 配列相同研究にはある種の限界がある。特に、比較においては一般に利用できるデータベースと科学文献に掲げる既知のアレルゲンの配列に限定される。IgE 抗体と特異的に結合可能な非連続エピトープの検出においてもその比較能力に限界がある。

11. 配列相同検査でマイナスの結果が出ると、新たに発現したタンパク質は既知のアレルゲンではなく、既知のアレルゲンに対する交差反応性が低いことがわかる。有意な配列相同がないことを示す結果が得られた場合は、新たに発現したタンパク質のアレルギー誘発性評価においてこの方法でまとめたその他のデータと合わせて考慮すべきである。必要に応じ、更なる研究を実施すべきである（セクション4 および5 参照）。配列相同検査でプラスの結果がでた場合、新たに発現したタンパク質はアレルギー誘発性である可能性が高いことを示す。この製品をさらに検討する必要がある場合は、同定されたアレルギー誘発性供給源に対して感作された個人の血清を用いて評価すべきである。

セクション3.3 –ペプシン耐性

12. いくつかの食品アレルゲンにおいて、ペプシン消化に対する耐性が認められており、ペプシン消化に対する耐性とアレルギー誘発性には相関関係がある³。従って、適切な条件下でペプシンが存在する場合にタンパク質の分解に対する耐性が認められた場合は、さらに分析を行い新たに発現したタンパク質がアレルギー誘発性である可能性を調べる必要がある。整合性があり十分に検証されたペプシン分解プロトコールが確立されれば、この方法の有効性が高まる可能性がある。しかし、ペプシン耐性がない場合も新たに発現したタン

²2001年FAO/WHO 会議は検査で使用する同一アミノ酸鎖を8 から6 に減らすことを示唆したと認識されている。段階的比較で用いるペプチド配列が少なければ少ないほど偽陽性となる可能性が高い。逆に、用いるペプチド配列が多ければ多いほど偽陰性の可能性が高くなり、比較の有効性が下がる。

パク質が関連アレルゲンである可能性を排除することにはならないことを考慮すべきである。

13. ペプシン耐性プロトコールは強く推奨されるが、他の酵素感受性プロトコールがあることも認識されている。正当性が示されれば、別のプロトコールを用いてもよい⁴。

セクション4 -特定血清スクリーニング

14. アレルギー誘発性であることが明らかな供給源に由来するかまたは既知のアレルゲンと配列相同性を有するタンパク質については、血清が利用できる場合は免疫学的検査における試験を実施すべきである。当該タンパク質の供給源に対するアレルギーが臨床的に検証された個人の血清を用いて、インビトロアッセイにおいてタンパク質のIgEクラス抗体との特異的結合を調べることができる。この試験において重要な問題は、十分な数の個人から血清が得られるかどうかである⁵。さらに、有効な試験結果を出すために、血清の質とアッセイ手順を標準化する必要がある。供給源のアレルギー誘発性が不明であり、既知のアレルゲンに対する配列相同性を示さないタンパク質については、パラグラフ17 に示したような試験が利用できる場合は、標的血清スクリーニングを考慮することができる。

15. 既知のアレルギー誘発性供給源に由来する新たに発現したタンパク質の場合、インビトロの免疫学的検査における陰性結果だけでは十分ではないと考えられ、皮膚テストやエキスピボプロトコールなど補足的試験を促すべきである⁶。こうした試験における陽性結果はアレルゲンの可能性を示す。

セクション5 -その他の検討事項

16. 新たに発現したタンパク質に対する絶対曝露および関連する食品加工の影響は、ヒト

³ 相関関係の確立において米薬局方（1995年）に概説する方法を用いた（Astwood 他、1996年）。

⁴ FAO/WHO 合同専門家会議報告書（2001年）。

⁵ バイオテクノロジー応用食品のアレルギー誘発性に関するFAO/WHO 合同会議（2001年1月22~25日、イタリア・ローマ）の報告書によれば、主要アレルゲンの場合、新たなタンパク質がアレルゲンではないことを99%確実にするためには最低8つの関連血清が必要である。同様に、非主要アレルゲンについて同じ確実性を期すためには最低24の関連血清が必要である。これだけの量の血清は試験のためには利用できないことが認識されている。

⁶ エクスピボの概要に関するFAO/WHO 合同専門家会議(2001)を参照。

の健康に対するリスクの可能性に関する総合的な結論に影響を与えることとなる。その際、適用される加工の種類やそれが最終食品中のタンパク質の存在に及ぼす影響を判断する上で、対象食品の本質を考慮すべきである。

17. 科学的知識と技術の進歩に伴い、評価方法の一環としての新たに発現したタンパク質のアレルギー誘発性評価においてその他の方法や手段も考慮しても差し支えない。こうした方法は科学的に信頼できるものであるべきである。これには、標的血清スクリーニング（広範に関連する食品分類に対するアレルギー反応が臨床的に確認されている個人の血清におけるIgE 結合の評価）、国際血清バンクの開発、動物モデルの使用、T 細胞エピトープやアレルゲンに関わる構造的モチーフについての新たに発現したタンパク質に関する研究などが含まれる。

—