

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼに係る食品健康影響評価（平成 26 年 10 月 17 日付け厚生労働省発食安 1017 第 2 号）については、平成 27 年 6 月 17 日に開催された第 138 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

審議結果（案）については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

2. *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼに係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成 27 年 7 月 14 日（火）開催の食品安全委員会（第 570 回会合）の翌日の平成 27 年 7 月 15 日（水）から平成 27 年 8 月 13 日（木）までの 30 日間。

2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

Aspergillus oryzae NZYM-SP 株を利用し
て生産されたアスパラギナーゼ

2015年7月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

＜審議の経緯＞	3
＜食品安全委員会委員名簿＞	3
＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞	3
要 約	4
Ⅰ. 評価対象添加物の概要	5
Ⅱ. 食品健康影響評価	5
第1 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに 遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違	5
1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料	5
2 宿主及び導入 DNA	6
3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料	6
4 宿主の構成成分等に関する資料	6
5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	7
6 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加 物及び組換え体と宿主等の相違点	7
第2 宿主に関する事項	7
1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項	7
2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項	8
3 寄生性及び定着性に関する事項	8
4 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項	8
5 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項	8
第3 ベクターに関する事項	8
1 名称及び由来に関する事項	8
2 性質に関する事項	8
第4 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項	9
1 挿入 DNA の供与体に関する事項	9
2 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項	9
3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する 事項	10
4 ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項	11
5 構築された発現ベクターに関する事項	11
6 DNA の宿主への導入方法に関する事項	12
7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	12
第5 組換え体に関する事項	12
1 宿主との差異に関する事項	12

2	遺伝子導入に関する事項	12
第6	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	13
1	添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること	13
2	添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること	13
第7	遺伝子組換え添加物に関する事項	13
1	諸外国における認可、食用等に関する事項	13
2	組換え体の残存に関する事項	13
3	製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	13
4	精製方法及びその効果に関する事項	13
5	含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項	13
第8	第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項	14
Ⅲ.	食品健康影響評価結果	14
<参照>		15

＜審議の経緯＞

2014 年 10 月 17 日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安 1017 第 2 号）、関係書類の接受

2014 年 10 月 21 日 第 534 回食品安全委員会（要請事項説明）

2014 年 11 月 19 日 第 132 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2015 年 3 月 20 日 第 136 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2015 年 6 月 17 日 第 138 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2015 年 7 月 14 日 第 570 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

（2015 年 6 月 30 日まで）

熊谷 進（委員長）

佐藤 洋（委員長代理）

山添 康（委員長代理）

三森 国敏（委員長代理）

石井 克枝

上安平冽子

村田 容常

（2015 年 7 月 1 日から）

佐藤 洋（委員長）

山添 康（委員長代理）

熊谷 進

吉田 緑

石井 克枝

堀口 逸子

村田 容常

＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞

澤田純一（座長）

小関良宏（座長代理）

宇理須厚雄

手島玲子

岡田由美子

中島春紫

橘田和美

飯 哲夫

児玉浩明

和久井信

近藤一成

要 約

「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼ」について申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、アスパラギナーゼの生産性を高めるために、*Aspergillus oryzae* BECh2 株を宿主として、*A. oryzae* IFO4177 株に由来するアスパラギナーゼ遺伝子を導入して作製された NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼである。本添加物は、アクリルアミド生成の起因となるアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素であり、食品の加熱加工におけるアクリルアミドの生成を抑制することができるとされている。

なお、本生産菌には、選択マーカーとして、*Aspergillus nidulans* に由来するアセトアミダーゼ遺伝子及び *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株に由来するオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が導入されている。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性等について確認した結果、従来の添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼ」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

なお、本添加物は、食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 11 条に基づく食品添加物としての規格基準の設定がなされていないことから、厚生労働省から同設定に係る食品健康影響評価の要請もなされており、厚生労働省における本添加物の取扱いについては、添加物としての食品健康影響評価の結果も踏まえる必要がある。

I. 評価対象添加物の概要

品 目：*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼ

性 質：アクリルアミドの生成抑制

申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S（デンマーク）

本添加物は、アスパラギナーゼの生産性を高めるために、*A. oryzae* BECh2 株を宿主として、*A. oryzae* IFO4177 株に由来するアスパラギナーゼ遺伝子を導入して作製された NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼである。本添加物は、アクリルアミド生成の起因となるアスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素であり、食品の加熱加工におけるアクリルアミドの生成を抑制することができるかとされている。なお、本生産菌には、選択マーカーとして、*Aspergillus nidulans* に由来するアセトアミダーゼ遺伝子（*amdS* 遺伝子）、*Saccharomyces cerevisiae* FL100 株に由来するオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子（*URA3* 遺伝子）が導入されている。

II. 食品健康影響評価

第 1 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称：アスパラギナーゼ

基 原：*A. niger* ASP-72 株

有効成分：アスパラギナーゼ

IUB 分類命名法による酵素番号及び CAS 番号は以下のとおり。

IUB No. : EC 3.5.1.1

CAS No. : 9015-68-3

(2) 製造方法

A. niger ASP-72 株を培養した後に不活化し、数段階のろ過により生産菌を除去することによって、製造される（参照 1）。

(3) 用途及び使用形態

アスパラギナーゼは、アスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解するための加工助剤として使用される。高温で加熱することによりアクリルアミドが生成されるパン類、シリアル食品、ポテト製品、調味料等の製造時に加熱工程の前に添加され、アクリルアミドの生成を低減させる。

(4) 摂取量

ヒト体重 1kg 当たりの一日の最大摂取量を算出した結果、0.549 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg 体重/日であった (参照 1)。

2 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名 (学名)、株名等及び由来

宿主は、*A. oryzae* BECh2 株である。*A. oryzae* BECh2 株は、*A. oryzae* IFO4177 株の *TAKA* アミラーゼ (*amyA*, *amyB* 及び *amyC*) 遺伝子、アルカリプロテアーゼ (*alpA*) 遺伝子及び中性プロテアーゼ (*Np I*) 遺伝子を欠失した株である。さらに、突然変異により、シクロピアゾン酸及びアフラトキシン生産能が欠失され、コウジ酸の合成能が低減している。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

アスパラギナーゼ (*asnA0*) 遺伝子の供与体は *A. oryzae* IFO4177 株、*amdS* 遺伝子の供与体は *A. nidulans*、*URA3* 遺伝子の供与体は *S. cerevisiae* FL100 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

asnA0 遺伝子は、アスパラギンをアスパラギン酸とアンモニアに加水分解する酵素であるアスパラギナーゼを発現する。

amdS 遺伝子は、アセトアミダーゼを発現する。本遺伝子を導入することにより、アセトアミドを栄養源として利用することが可能になることから、*asnA0* 遺伝子導入株の選択マーカーとして使用した。

URA3 遺伝子は、ピリミジン合成経路の 1 つの酵素であるオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼを発現し、遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の選択マーカーとして使用された。

asnA0 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pCaHj621 をプロトプラスト法により宿主のゲノム DNA に導入した。

3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

A. oryzae は、アルコール、水飴、果汁、パン等の製造に使用されるアミラーゼ等の酵素の生産菌として長期にわたり利用されている。また、味噌、日本酒等の発酵食品の製造に広く用いられている。

4 宿主の構成成分等に関する資料

A. oryzae は、シクロピアゾン酸、コウジ酸及びβ-ニトロプロピオン酸を産生することが知られているが、*A. oryzae* BECh2 株においては、シクロピアゾン酸産生能は失われており、コウジ酸産生能は低減されている。また、β-ニトロプロピオン酸の産生量は安全性を懸念する量ではない。

5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 製品名及び有効成分

製品名：AoASP 製剤

有効成分：アスパラギナーゼ (AoASP)

(2) 製造方法

AoASP 製剤は、*A. oryzae* NZYM-SP 株を生産菌として用いて製造される。培養工程、ろ過等の工程を経て製剤化され、生産菌は2回の除菌ろ過により分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

AoASP 製剤の用途及び使用形態は、従来の添加物と同様であり、食品製造における加熱工程の前に添加され、アクリルアミドの生成を低減させる。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素である。また、至適 pH は7であり、従来品と比較して高くなっている（参照2）。

6 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

AoASP と従来の添加物の有効成分であるアスパラギナーゼのアミノ酸配列の相同性は72%である。

また、従来品と比較して、至適 pH が高くなっている。

(2) 組換え体と宿主

A. oryzae NZYM-SP 株は、宿主である *A. oryzae* BECh2 株と比較して、*asnA0* 遺伝子の導入によってアスパラギナーゼを発現すること、選択マーカー遺伝子である *amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子が導入されていることが相違点である。

以上1～6より、本評価対象添加物及び本評価対象添加物の生産菌 *A. oryzae* NZYM-SP 株と比較対象となり得る既存の添加物及び宿主があると判断し、第2以下の各事項について評価を行った。

第2 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は、*A. oryzae* BECh2 株である。

A. oryzae BECh2 株を宿主として作製された菌株は、食品用酵素の生産菌として利用されている。

2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

A. oryzae は食品中に常在し、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において、バイオセーフティレベル 1 に相当する非病原性の微生物である。*A. oryzae* がシクロピアゾン酸、コウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸を産生することが知られている。宿主のシクロピアゾン酸合成遺伝子は欠失されているため、シクロピアゾン酸を産生しない。また、宿主のコウジ酸産生能は低減されている。

Aspergillus 属が生産する酵素である α -アミラーゼはアレルゲンデータベースに収載されており、*A. oryzae* 由来の α -アミラーゼの経口摂取による感作成立やアレルギー症状の惹起の報告があるが、*A. oryzae* BECh2 株は *TAKA* 遺伝子を欠失しており α -アミラーゼ産生性を失っている。そのため、*A. oryzae* BECh2 株によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるとしている。

3 寄生性及び定着性に関する事項

A. oryzae の腸管内への寄生性や定着性は知られていない。

4 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

A. oryzae のウイルス感染等の報告はされていない。

5 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

A. oryzae の近縁種には、*Aspergillus fumigatus*、*Aspergillus flavus*、*Aspergillus sojae* 及び *Aspergillus parasiticus* がある。その中で、*A. flavus* は、有害生理活性物質であるアフラトキシンを産生することが知られている。宿主である *A. oryzae* BECh2 株は、アフラトキシン合成遺伝子クラスターホモログが欠失しているため、アフラトキシンを産生することはない。

A. fumigatus は、日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られている。

第3 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

asnA0 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pCaHj621 は、プラスミド pUC19 を基に構築された。

2 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pUC19 の塩基数及び塩基配列は明らかとなっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pUC19 の制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pUC19 は、塩基配列が明らかとなっており、既知の有害塩基配

列を含まない。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pUC19 には、*E. coli* 由来のアンピシリン耐性遺伝子が含まれているが、遺伝子導入用ベクター構築の過程で除去されるため、宿主菌に当該遺伝子が導入されない。

(5) 伝達性に関する事項

pUC19 には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

pUC19 は、*E. coli* のコリシン E1 複製開始点を含むため、*E. coli* では複製可能であると考えられる。

第4 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

asnA0 遺伝子の供与体は、*A. oryzae* IFO4177 株である。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* 及び *S. cerevisiae* FL100 株である。

(2) 安全性に関する事項

挿入 DNA の供与体である *A. oryzae*、*A. nidulans* 及び *S. cerevisiae* は、いずれも国立感染症研究所の病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル 1 に該当し、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。

2 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

asnA0 遺伝子は、*A. oryzae* IFO4117 株の cDNA ライブラリーを作成し、アスパラギナーゼ活性を指標として選抜・単離後、塩基配列を決定した。

amdS 遺伝子はプラスミド p3SR2 から、*URA3* 遺伝子はプラスミド pYES2 から、それぞれの断片を得た。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

asnA0 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかとなっている（参照 3）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・ *asnA0* 遺伝子

asnA0 遺伝子は、アスパラギンを加水分解し、アスパラギン酸を生成する反応

を触媒する酵素であるアスパラギナーゼ (AoASP) を発現する。AoASP について、アレルギー誘発性を示すという報告はない。*asnA0* 遺伝子を含む導入領域に同定された ORF に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すものがないことが確認されている。

また、遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見は、以下のとおりである。なお、試験には最終製品の AoASP 製剤が用いられた。

①人工胃液に対する感受性

AoASP の人工胃液中での消化性について確認するために SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 0.5 分以内に消化されることが確認された。

②人工腸液に対する感受性

AoASP の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析を行った結果、試験開始後 2.5 分以内に消化されることが確認された。

・ *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子は、アセトアミドを分解する酵素であるアセトアミダーゼを発現する遺伝子である。当該遺伝子を導入することによって、アセトアミドを単一の炭素源及び窒素源として利用することが可能になることから、*asnA0* 遺伝子導入株の選択マーカーとして使用された。アセトアミダーゼについて、アレルギー誘発性を示す報告はない。*amdS* 遺伝子を含む導入領域に同定された ORF に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すものがないことが確認されている。

・ *URA3* 遺伝子

URA3 遺伝子は、ピリミジン合成経路の 1 つの酵素であるオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼを発現する遺伝子である。遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の選択マーカーとして使用された。オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼについて、アレルギー誘発性を示す報告はない。*URA3* 遺伝子を含む導入領域に同定された ORF に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すものがないことが確認されている。

3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

asnA0 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* DSM12665 株由来の中性アミラーゼ II 遺伝子の *NA2* プロモーター及び *A. nidulans* Glasgow 野生株に由来するトリオースリン酸イソメラーゼ遺伝子の *TPI* リーダー配列から構成される *NA2/TPI* プロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

asnA0 遺伝子のターミネーターは *A. niger* DSM12665 株由来のアミログルコシダーゼ遺伝子の *AMG* ターミネーターである。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は、組み込まれていない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項

遺伝子導入用ベクター pCaHj621 は、プラスミド pUC19 に *NA2/TPI* プロモーター、*asnA0* 遺伝子及び *AMG* ターミネーターからなる *asnA0* 遺伝子発現カセット、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を挿入することにより作製された。

5 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかとなっている（参照 3）。

(2) 目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームに関する事項

遺伝子導入用ベクター pCaHj621 について、Getorf を用いて、六つの読み枠において終止コドンから終止コドンに収束される連続する 30 アミノ酸以上の ORF を検索した結果、152 個の ORF が検出された（参照 4）。

152 個の ORF がコードするアミノ酸配列と既知のアレルゲンとの相同性について、データベース^aを対象に、80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性の有無及び連続する 8 アミノ酸の相同性検索を行った結果について検索を行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった。（参照 4）。

また、152 個の ORF がコードするアミノ酸配列と既知の毒性タンパク質との相同性について、MvirDB データベース（参照 5）を用いて検索を行った。その結果、6 個の ORF に対して、Evalue が 0.2 以下の相同性を示す既知のタンパク質または仮想タンパク質が 11 個検出されたが、いずれも、毒性を持つとの報告はなく、毒性タンパク質とは考えられなかった（参照 6、7）。

(3) 発現ベクター上の意図する挿入領域に関する事項

意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の全塩基配列である。

(4) 挿入遺伝子の純化に関する事項

遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の塩基配列は明らかであり、目的外の遺伝子の混入はないことが確認されている。

^a The Food Allergen Research and Resource Program (FARRP) version 14

6 DNA の宿主への導入方法に関する事項

asnA0 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pCaHj621 全体をプロトプラスト法により宿主の染色体に導入した。宿主が *A. oryzae* 等の場合、ベクターDNA がタンデムに多コピー繋がって染色体に組み込まれる場合が多いと報告されている（参照 8、9）。これにより、遺伝子導入用ベクター pCaHj621 が宿主の染色体の任意の位置にタンデムに複数コピー導入されることが考えられる。

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクター pCaHj621 に抗生物質耐性遺伝子は、含まれていない。

第5 組換え体に関する事項

1 宿主との差異に関する事項

生産菌である *A. oryzae* NZYM-SP 株は、*asnA0* 遺伝子の導入によって AoASP が発現すること、選択マーカー遺伝子である *amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子が導入されていることが宿主との相違点である。

2 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の染色体上の導入位置を調べるために、NZYM-SP 株の全ゲノム解析を行った結果、遺伝子導入用ベクター pCaHj621 が挿入されている染色体上の位置が特定された。導入領域全体の塩基配列の決定はできなかったが、宿主ゲノムと遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の両端接合部近傍配列は解析可能であったことから、これら領域の制限酵素による切断地図は明らかとなっている（参照 10）。

NZYM-SP 株に導入された *asnA0* 遺伝子のコピー数を調べるために、サザンブロット分析を用いて、内在性 *asnA0* 遺伝子によるバンドと導入された *asnA0* 遺伝子によるバンドの濃さを比較した結果、複数コピー挿入されていると推察された（参照 11）。

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

宿主に挿入された遺伝子導入用ベクター pCaHj621 と宿主ゲノムとの接合部位に新たに生じる ORF の有無を調べるために、3'末端近傍配列（1,327 bp）及び 5'末端近傍配列（2,534 bp）における ORF 検索を行った。その結果、3'末端近傍配列に 44 個、5'末端近傍配列に 45 個及び接合部を跨ぐ 7 個の ORF が検出された。これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性について、MvirDB データベース（参照 5）を用いて検索を行った結果、第 4-5-（2）にて遺伝子導入用ベクター pCaHj621 に見いだされた ORF と相同性を示した

タンパク質以外に、1 個の ORF が既知タンパク質との相同性を示したが、毒性タンパク質ではなかった。また、既知のアレルゲンとの相同性は見いだされなかった（参照 12）。

第 6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

1 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

AoASP の製造原料及び製造器材は、長年安全に食品用酵素の製造に用いられたものと同等のものを使用している。

2 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること

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

第 7 遺伝子組換え添加物に関する事項

1 諸外国における認可、食用等に関する事項

AoASP 製剤は、2007 年に販売が開始され、デンマーク等において使用されている。米国では、米国食品医薬品庁（FDA）の届出 GRAS リストに収載されている。なお、欧州では、欧州食品安全機関（EFSA）における食品酵素としての安全性審査の申請中である。

2 組換え体の残存に関する事項

AoASP の生産菌の残存の有無を確認するため、AoASP の製剤化前の酵素サンプルを用いてドットブロット分析を行った。その結果、DNA は検出されなかった（参照 13）。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

AoASP の製剤化前の酵素サンプルは、製造に由来する有害物質成分について規定値を定めている JECFA の食品用酵素の規格値及び Food Chemical Codex の規定値に適合している。

4 精製方法及びその効果に関する事項

AoASP の精製は、培養物の固液分離、除菌濾過等の工程で行われており、AoASP の製造・精製工程は明らかである。また、安全性が確認されている製造原料を使用していることから、AoASP 中に有害物質が混入する可能性はないと考えられる。

5 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項

AoASP の製造原料は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様で

あり、また、本製品は、JECFA 及び Food Chemical Codex の食品酵素規格に適合しており、有害性はないと考えられる。

AoASP の製剤化前の酵素サンプル中のコウジ酸及びβ-ニトロプロピオン酸は、検出限界（コウジ酸：1.4 mg/kg、β-ニトロプロピオン酸：0.6 mg/kg）未満であった。

第8 第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項

申請者から変異原性試験及び亜急性毒性試験に関するデータが提出されたことから、このデータを確認した。被験物質は、AoASP の製剤化前の酵素サンプルが用いられた。

(1) 変異原性試験

①復帰突然変異試験（参照 14）

細菌（*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び *E. coli* WP2uvrA pKM101）を用いた復帰突然変異試験（最高用量 5 mg/plate）を行った結果、代謝活性化系の有無にかかわらず被験物質に関連した異常は認められなかった。

②染色体異常試験（参照 15）

ヒトの末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験（最高用量 5 mg /mL）を行った結果、代謝活性化系の有無にかかわらず被験物質に関連した異常は認められなかった。

(2) 13 週間反復強制経口投与試験（参照 16）

CD ラット（各群雄雌各 10 匹）に、被験物質を 1.0、3.3、10.0 mL/kg 体重/日（0.088、0.29、0.88 g TOS/kg 体重/日）の用量で 13 週間強制経口投与し、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査病理組織学的検査等を行った。

その結果、最高用量においても被験物質投与に関連する変化は認められず、本試験の NOAEL（無毒性量）は、最高用量である 10.0 mL/kg 体重/日としている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼ」については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

なお、本添加物は、食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 11 条に基づく食品添加物としての規格基準の設定がなされていないことから、厚生労働省から同設定に係る食品健康影響評価の要請もなされており、厚生労働省における本添加物の取扱いについては、添加物としての食品健康影響評価の結果も踏まえる必要がある。

<参照>

1. 食品安全委員会 添加物評価書「*Aspergillus niger* ASP-72 株を用いて生産されたアスパラギナーゼ」 (2014 年 1 月)
2. Optimal pH of AoASP (Acrylaway®) (社内文書)
3. 遺伝子導入用ベクター pCaHj621 の DNA 塩基配列と構成要素の配列 (社内文書)
4. Sequence homology of ORFs of the inserted expression plasmids on the genome of NYZM-SP to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
5. Zhou C E, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer M D and Slezak T MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. Nucleic Acids Research, 35, Database issue, D391-D394 (2007)
6. pCaHj621_6 及び subtilisin-like protein のアミノ酸配列の比較 (社内文書)
7. pCaHj621_6 及び EBNA-3C のアミノ酸配列の比較 (社内文書)
8. カビの形質転換系の開発とその利用 化学と生物 28 91-100 (1990)
9. Kelly J M and Hynes M J Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. The EMBO J. 4 475-479 (1985)
10. Flanking regions of pCaHj621 inserted on the genome of NZYM-SP (社内文書)
11. Southern blot analysis of the production strain of asparaginase, *Aspergillus oryzae* (*A. oryzae*) NZYM-SP strain, and the host strain, *A. oryzae* BECh2 (社内文書)
12. Sequence homology of ORFs in the flanking regions of the inserted expression plasmids on the genome of NZYM-SP to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
13. Analysis of residual DNA in the Acrylaway® PPV 24743 (社内文書)
14. Asparaginase, PPV 24743: Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (社内文書)
15. Asparaginase, PPV24743, Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes (社内文書)
16. Asparaginase, PPV 24743, Toxicity Study by Oral Administration to CD Rats for 13 Weeks (社内文書)