

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 JPBL002 株を利用して生産されたプルラナーゼに係る食品健康影響評価（平成 30 年 3 月 6 日付け厚生労働省発生食 0306 第 4 号）については、平成 30 年 3 月 28 日に開催された第 172 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。

2. JPBL002 株を利用して生産されたプルラ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 30 年 4 月 17 日（火）開催の食品安全委員会（第 693 回会合）の翌日の平成 30 年 4 月 18 日（水）から平成 30 年 5 月 17 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

JPBL002 株を利用して生産された
プルナーゼ

2018年4月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
<審議の経緯>	3
<食品安全委員会委員名簿>	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>	3
要 約	4
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 of 添加物の性質及び用途等に関する資料	5
2. 宿主及び導入 DNA	6
3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料	6
4. 宿主の構成成分等に関する資料	6
5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	6
6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物 及び組換え体と宿主等の相違点	7
第 2. 宿主に関する事項	7
1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項	7
2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項	7
3. 寄生性及び定着性に関する事項	7
4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項	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	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項	9
3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事 項	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	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	11
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	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	12

1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること.....	12
2. 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られている こと.....	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 な事項.....	13
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	13
<参照>.....	14

<審議の経緯>

- 2018年3月6日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0306第4号）、関係書類の接受
- 2018年3月13日 第688回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年3月28日 第172回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年4月17日 第693回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- 佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
吉田 緑
山本 茂貴
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>

- 中島 春紫（座長）
小関 良宏（座長代理）
児玉 浩明（座長代理）
岡田 由美子 手島 玲子
橘田 和美 樋口 恭子
近藤 一成 山川 隆
鈴木 秀幸 吉川 信幸
柘植 郁哉

<専門参考人>

- 澤田 純一（独立行政法人医薬品医療機器総合機構テクニカルエキスパート）
（第172回遺伝子組換え食品等専門調査会）

要 約

「JPBL002 株を利用して生産されたプルラナーゼ」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、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主として、*Bacillus acidopullulyticus* NCIMB 11639 株由来のプルラナーゼ遺伝子の一部領域及び *Bacillus deramificans* LMGP 13056 株由来の変異型プルラナーゼ遺伝子の一部領域の融合遺伝子を導入して作製した JPBL002 株を利用して生産されたプルラナーゼである。本添加物は、アミロペクチン、プルラン等の α -1,6-D-グルコシド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用される。

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

したがって、「JPBL002 株を利用して生産されたプルラナーゼ」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。

I. 評価対象添加物の概要

品 目：JPBL002 株を利用して生産されたプルラナーゼ
用 途：デンプン糖製造時の糖化効率の向上
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、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主として、*Bacillus acidopullulyticus* NCIMB 11639 株由来のプルラナーゼ遺伝子の一部領域及び *Bacillus deramificans* LMGP 13056 株由来の変異型プルラナーゼ遺伝子の一部領域の融合遺伝子を導入して作製した JPBL002 株を利用して生産されたプルラナーゼである。本添加物は、アミロペクチンやプルラン等の α -1,6-D-グルコシド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用される。

II. 食品健康影響評価

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

1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称：プルラナーゼ (SP962)

基 原：*Bacillus deramificans* LMGP 13056 株

有効成分：プルラナーゼ

IUB No. : EC 3. 2. 1. 41

CAS No. : 9075-68-7

(2) 製造方法

SP962 は、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、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

SP962 は、デンプン糖製造の糖化工程においてグルコアミラーゼとともに使用される。デンプン糖の液化後に生成したデキストリンの α -1,6-D-グルコシド結合（分枝鎖）を SP962 が分解することにより、グルコアミラーゼが分解する α -1,4-D-グルコシド結合（直鎖）を有するデキストリンが相対的に増加し、糖化効率を向上させることを目的として使用される。

(4) 摂取量

SP962 が全てのデンプン糖製造に使用され、最終製品中に 100% 残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.0045 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg

体重/日である（参照 1～3）。

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、*B. licheniformis* Ca63 株である。*B. licheniformis* Ca63 株は、自然界から分離された菌株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

プルラナーゼ (*Pul256*) 遺伝子の供与体は、*B. acidopullulyticus* NCIMB 11639 株及び *B. deramificans* LMGP 13056 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

Pul256 遺伝子は、SP962 の C 末端側の一部アミノ酸に置換を生じるよう変異導入し、N 末端側一部領域を *B. acidopullulyticus* 由来のプルラナーゼ (PulC) の N 末端側一部領域に置換したプルラナーゼ (JPUL256) をコードする。

Pul256 遺伝子発現カセットをインテグラーゼにより宿主ゲノムの複数の遺伝子座に導入した。その際、*Pul256* 遺伝子発現カセットが挿入された遺伝子座のうち、一部の遺伝子座において遺伝子欠失が確認された。

なお、生産菌の作製に当たり、*aprL* 遺伝子を含む複数種類の遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させた。

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

B. licheniformis は、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されている。*B. licheniformis* Ca63 株は、 α -アミラーゼの生産菌として使用されている。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

B. licheniformis が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル (BSL) 1 に相当する（参照 4）。

5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は、以下のとおりである。

製品名：JPUL256

有効成分：プルラナーゼ

IUB No.：EC 3. 2. 1. 41

CAS No.：9075-68-7

(2) 製造方法

JPUL256 は、JPBL002 株を生産菌として、従来の添加物と同様に、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、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

JPUL256 は、デンプン糖製造の糖化工程において、グルコアミラーゼとともに使用することでグルコース収量を向上させる。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

JPUL256 は、従来の SP962 と同じくアミロペクチンやプルラン等の α -1,6-D-グルコシド結合をエンド型で加水分解する。JPUL256 は SP962 と比較して高い比活性（酵素タンパク質単位重量当たりの酵素活性）を示す。

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

JPUL256 と従来の SP962 との相違点は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なることにより、JPUL256 は SP962 と比べ高いプルラーゼ比活性を示す点である（参照 5、6）。

(2) 組換え体と宿主

JPBL002 株と宿主との相違点は、JPBL002 株には *Pul256* 遺伝子が複数コピー導入され JPUL256 生産性を獲得している点及び JPUL256 の生産性を高めるため *aprL* 遺伝子を含む複数種類の遺伝子が欠失している点である。

以上 1～6 から、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、第 2 以下の各事項について評価を行った。

第 2. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は、*B. licheniformis* Ca63 株である。

2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

B. licheniformis が病原性及び有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する（参照 4）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis には、腸管内への寄生性及び定着性の報告はない。

4. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

B. licheniformis には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

B. licheniformis の近縁種である *Bacillus subtilis* 及び *Bacillus pumilus* が知られているが、毒性物質を産生する *Bacillus cereus* 等とは明確に区別されている。

第3. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクターpJPV006の作製には、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pE194 が用いられた。

2. 性質に関する事項

(1) DNAの塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pE194 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照7）。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pE194 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pE194 の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pE194 には、エリスロマイシン耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pE194 には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pE194 の複製開始配列は、*Bacillus* 属で機能する。

第4. 挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入DNAの供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

Pul256 遺伝子の供与体は、*B. acidopullulyticus* NCIMB 11639 株及び *B. deramificans* LMGP 13056 株である。

(2) 安全性に関する事項

B. acidopullulyticus 及び *B. deramificans* はともに、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する（参照 4）。

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

Pul256 遺伝子は、*sp962v* 遺伝子の 5' 側に *pulCv* 遺伝子を連結させた融合遺伝子である。

sp962v 遺伝子は、*B. deramificans* LMGP 13056 株のゲノムから PCR により得られた SP962 の C 末端側約 600 アミノ酸をコードする塩基配列について、十数アミノ酸に置換が生じるよう位置特異的に変異導入して得られた。

pulCv 遺伝子は、*PulC* の N 末端側約 200 アミノ酸をコードし、*B. acidopullulyticus* NCIMB 11639 株のゲノムから PCR により得られた。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

Pul256 遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

Pul256 遺伝子が発現する JPUL256 は、アミロペクチンやプルラン等の α -1,6-D-グルコシド結合をエンド型で加水分解するプルラナーゼである。

① 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

B. acidopullulyticus 及び *B. deramificans* のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^aを行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

② 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

JPUL256 を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。なお、SP962 及び *PulC* を有効成分とする酵素製剤についても、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

また、*B. acidopullulyticus* 及び *B. deramificans* のプルラナーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^aを行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

③ 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

a. 人工胃液に対する感受性

JPUL256 の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-

^a データベース：PubMed、2017年6月

PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後 2 分以内に分解されることが示された（参照 8）。

b. 人工腸液に対する感受性

JPUL256 の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後 4 時間以内に分解されることが示された（参照 8）。

④ 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

JPUL256 と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^bを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった（参照 9）。

以上のことから総合的に判断し、JPUL256 はアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

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

Pul256 遺伝子のプロモーターは、*amyL4199* プロモーター、*amyQsc* プロモーター及び *cry3A* プロモーターで構成される P3 プロモーター配列である。*amyL4199* プロモーター及び *amyQsc* プロモーターは、それぞれ *B. licheniformis* Ca63 株由来の *amyL* プロモーター及び *B. amyloliquefaciens* DSM 7 株由来の *amyQ* プロモーターに変異を導入したものである。*cry3A* プロモーターは、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525 株に由来する *cry3A* 遺伝子の野生型プロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

Pul256 遺伝子のターミネーターは、*amyL* ターミネーター及び *aprH* ターミネーターであり、それぞれ *B. licheniformis* Ca63 株由来の *amyL* 遺伝子ターミネーター及び *Bacillus clausii* DSM8716 株由来の *aprH* 遺伝子のターミネーター配列である。

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

挿入遺伝子の翻訳に必要な *B. clausii* DSM 8716 株由来の *aprHRBS* 配列及び mRNA を安定化させるため *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525 株由来の *cry3A* mRNA 安定化配列を付加した。*cry3A* mRNA 安定化配列は、

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version 17)

殺虫活性を示すタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域に存在する配列であるが、タンパク質をコードする領域は含まれない。

そのほか、インテグラーゼ認識配列が用いられた。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pE194 に、インテグラーゼをコードする *int* 遺伝子、*aprHRBS* 配列、*cry3A* mRNA 安定化配列、インテグラーゼ認識配列及び *Pul256* 遺伝子断片等を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV006 を作製した（参照 10）。

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 pJPV006 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと 第 5-2-(2) に記載のとおりである。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

遺伝子導入用ベクター pJPV006 上の意図する挿入領域は、*Pul256* 遺伝子発現カセット等の領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

遺伝子導入用ベクター pJPV006 は、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

あらかじめ宿主ゲノムの各標的遺伝子座に、マーカー遺伝子発現カセット（P3 プロモーター、*cry3A* mRNA 安定化配列及びインテグラーゼ認識配列を含む。）を相同組換えにより導入し、各マーカーにより形質転換体を選択した。

続いて、遺伝子導入用ベクター pJPV006 を導入し、ベクター上の *int* 遺伝子が発現するインテグラーゼの作用により、ベクター上のインテグラーゼ認識配列と宿主ゲノム上の同配列の間で DNA 挿入が起こり、ベクターの全配列が宿主ゲノムに挿入された。形質転換体はエリスロマイシン耐性により選択した。

その後、マーカー遺伝子発現カセット内の *cry3A* mRNA 安定化配列と *Pul256* 遺伝子発現カセット内の同配列の間でループアウトが起こり、マーカー遺伝子、*int* 遺伝子及びインテグラーゼ認識配列が宿主ゲノムから脱落した。

なお、マーカー遺伝子発現カセット内の P3 プロモーター及び *cry3A* mRNA 安

定化配列はそのまま宿主ゲノム上に残り、*Pul256* 遺伝子発現カセットの一部として機能する。

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pJPV006 はエリスロマイシン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムには導入されない。また、一箇所の遺伝子座にマーカー遺伝子としてカナマイシン耐性遺伝子が導入されているが、相同組換えにより脱落している。抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことを標的遺伝子座のシーケンス解析により確認している（参照 11）。

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

JPBL002 株は、*Pul256* 遺伝子発現カセットが導入され、複数の遺伝子を欠失している点で宿主と異なる。

2. 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

Pul256 遺伝子発現カセットの標的遺伝子座の導入位置を確認するためにシーケンス解析を行った結果、各遺伝子座に 1 コピー挿入されていることが確認された（参照 11）。また、遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素切断地図はシーケンス解析により明らかになっている（参照 12）。

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

挿入 DNA と宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレーム (ORF) の有無を調べるために、挿入 DNA の 5' 近傍配列を含む領域及び 3' 近傍配列を含む領域における ORF 検索を行った。その結果、6 つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 615 個検出された。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^bを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース（参照 13）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められなかった（参照 14）。

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

JPUL256 の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績があり、また、本製品の原料は Food Chemicals Codex (FCC) 等の規格に適合している。

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

JPUL256 の製造原料及び製造器材は、上記のとおり安全に使用されてきた実績を有することから、有害性はないと考えられる。

第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項

1. 諸外国における認可、食用等に関する事項

JPUL256 は、米国で 2016 年に GRAS として認証されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット分析により、JPUL256 製剤中には組換え DNA が残存しないことが確認された（参照 15）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

JPUL256 の製剤前の酵素サンプルは、JECFA の食品用酵素の規格値及び FCC の規定値を満たしている。また、製造原料は食品用酵素への使用が認められた品質のものが用いられ、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えにくい。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

JPUL256 は、生産菌の培養物を粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経て製造され、安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。

5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項

JPUL256 の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものであり、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられる。

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

第2から第7までの事項により安全性の知見は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPBL002 株を利用して生産されたプルラナーゼ」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。

<参照>

1. 平成27年 国民健康・栄養調査報告（厚生労働省）
2. Typical Composition: Extenda Peak 1.5X.（社内文書）
3. Application Sheet: Extenda Peak 1.5X.（社内文書）
4. 平成22年6月 国立感染症研究所病原体等安全管理規定 別冊1「病原体等のBSL分類等」
5. JPUL256 とPulC のアミノ酸配列の比較（社内文書）
6. The comparison of specific activity of SP962 and JPUL256 proteins（社内文書）
7. S Horinouchi and B Weisblum, Nucleotide Sequence and Functional Map of pE194, a Plasmid That Specifies Inducible Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Type B Antibiotics, *Journal of Bacteriology*, 1982, 150(2), 804-814.
8. Digestibility of PUL256 protein in PPY 38874.（社内文書）
9. Assessment of sequence homology of pullulanase expressed by JPBL002 to allergens.（社内文書）
10. Outline of pJPV006 construction.（社内文書）
11. Genome sequence analysis on genes of concern.（社内文書）
12. DNA sequences ***.（社内文書）
13. C.E.Zhou, J.Smith, M. Lam, A.Zemla, M.D.Dyer and T.Slezak, MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence actors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications, *Nucleic Acids Research*, 2007, Vol 35, Database issue D391-D394.
14. ***JPBL002（社内文書）
15. The analysis of residual DNA in PPY 38874 by mean of dot blot hybridization.（社内文書）