

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CIN株を利用して生産されたキモシンに係る食品健康影響評価（平成30年4月25日付け厚生労働省発生食0425第2号）については、平成30年5月25日に開催された第175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. CIN株を利用して生産されたキモシン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7月10日（火）開催の食品安全委員会（第704回会合）の翌日の平成30年7月11日（水）から平成30年8月9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

CIN株を利用して生産されたキモシン

2018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

	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 of 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	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	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	14
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>

- 2018年4月25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0425第2号）、関係書類の接受
- 2018年5月8日 第695回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年5月25日 第175回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年7月10日 第704回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

(2018年6月30日まで)	(2018年7月1日から)
佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）	山本 茂貴（委員長代理）
吉田 緑	川西 徹
山本 茂貴	吉田 緑
石井 克枝	香西 みどり
堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	吉田 充

<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	

要 約

「CIN 株を利用して生産されたキモシン」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行った。

本添加物は、*Kluyveromyces lactis* DS30216 株を宿主として、ウシ (*Bos primigenius taurus*) 由来の改変プロキモシン遺伝子を導入して作製した CIN 株を利用して生産されたキモシンである。本添加物は、乳の κ -カゼインを加水分解する凝乳酵素であり、主にチーズの製造に使用される。

「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、「CIN 株を利用して生産されたキモシン」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

名 称：キモシン
用 途：チーズ製造等
申請者：DSM 株式会社
開発者：DSM (オランダ)

本添加物は、*Kluyveromyces lactis* DS30216 株を宿主として、ウシ (*Bos primigenius taurus*) 由来の改変プロキモシン遺伝子を導入して作製した CIN 株を利用して生産されたキモシンである。本添加物は、乳の κ -カゼインを加水分解する凝乳酵素であり、主にチーズの製造に使用される。

なお、本生産菌には、プロキモシンを菌体外に分泌させることを目的とする α 接合因子分泌シグナルペプチド領域及びタンパク質のシステイン残基のジスルフィド結合形成を触媒することにより、キモシンの正常な機能を助けることを目的とするプロテインジスルフィドイソメラーゼ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：レンネット
基 原：ウシの第 4 胃
有効成分：キモシン
IUB No. : EC 3. 4. 23. 4
CAS No. : 9001-98-3

(2) 製造方法

反すう動物の第 4 胃から水又は酸性水溶液で抽出する。

(3) 用途及び使用形態

チーズ及び発酵乳製品を製造する際に、凝乳酵素として添加する。

(4) 摂取量

レンネットが、全てのチーズ及びヨーグルトを含む発酵乳・乳酸菌飲料の製造において推奨使用量の最大量添加され、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、0.134 mg TOS/人/日である (参照 1、2)。

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、*K. lactis* DS30216 株である。本株は、チーズから単離された *K. lactis* 野生株に由来し、遺伝子組換え添加物として安全性審査が終了しているキモシン（製品名：マキシレン、2001年3月30日官報掲載）の生産菌株に突然変異誘導及び導入遺伝子の欠失を行った株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

改変プロキモシン (*CHY*) 遺伝子の供与体は、ウシ (*Bos primigenius taurus*) である。

α 接合因子分泌シグナルペプチド (α -*MF_cpo1*) 領域及びプロテインジスルフィドイソメラーゼ (*MPD2*) 遺伝子の供与体は、*K. lactis* NRRL Y-1140 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

CHY 遺伝子は、ウシ由来プロキモシンの複数アミノ酸を置換することにより凝乳活性が向上したプロキモシンをコードする。プロキモシンは、低 pH 処理により、自己触媒的にプロ領域が切断されて成熟型キモシンとなる。

α -*MF_cpo1* 領域は、 α 接合因子分泌シグナル及びリーダー配列をコードし、プロキモシンを菌体外に分泌させる目的で *CHY* 遺伝子に連結させた。

MPD2 遺伝子は、プロテインジスルフィドイソメラーゼをコードし、キモシンのシステイン残基のジスルフィド結合形成を触媒する。

これらの遺伝子に、4種類のプロモーター及び4種類のターミネーターのうちそれぞれ任意の1つを結合した発現カセットを複数連結したコンカテマーを作製し、相同組換えにより宿主ゲノムの3つの遺伝子座に導入した。その際、1つの遺伝子座において内在性遺伝子の欠失が確認された。

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

K. lactis は、長期にわたり食品用酵素の生産菌として安全に使用されている（参照3）。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

K. lactis が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バイオセーフティレベル (BSL) 1 に相当する（参照4）。また、欧州食品安全機関 (EFSA) による Qualified Presumption of Safety (QPS) に適合している（参照5、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

(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：Maxiren XDS

有効成分：キモシン

IUB No.：EC 3. 4. 23. 4

CAS No.：9001-98-3

(2) 製造方法

Maxiren XDS は、CIN 株を生産菌として、従来のキモシンと同様に、培養工程、回収・精製工程等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、不活性化した後、ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

Maxiren XDS は、従来のキモシンと同様に凝乳酵素としてチーズ及び発酵乳製品の製造に使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

Maxiren XDS は、従来のキモシンと同様に、乳に含まれるカゼインの κ 鎖を切断する酵素であるが、従来のキモシンと比較して凝乳活性が向上している。

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

Maxiren XDS と従来のキモシンとの相違点は、Maxiren XDS が複数箇所のアミノ酸を置換することにより、凝乳活性が向上している点である。

(2) 組換え体と宿主

CIN 株と宿主の相違点は、CIN 株には α -*MF_cpo1* 領域を結合させた *CHY* 遺伝子及び *MPD2* 遺伝子が複数コピー導入されている点並びに遺伝子導入に伴い内在性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、*K. lactis* DS30216 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

K. lactis が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）。また、EFSA による QPS に適合している（参照 5、6）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

K. lactis には、ヒトに対する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

K. lactis 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

Kluyveromyces 属真菌が病原真菌となる事例がごく稀に報告されているが、これらのうち多くは *K. marxianus* によるものであり、その患者のほとんどは免疫不全やカテーテル処置を受けた状態であって、単離された *Kluyveromyces* 属真菌は抗真菌剤に対して感受性があることが示されている(参照 7~10)。したがって、これらの事例は非常に稀な日和見感染症であり、*Kluyveromyces* 属真菌が病原性を示すものではない(参照 11、12)。

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

遺伝子発現カセットライブラリーの作製に用いた RAV ベクター及び遺伝子導入用ベクター pCAV の作製に用いた pFAV ベクターは、いずれも *E.coli* 由来のプラスミド pUC18 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 pUC18 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pUC18 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 pUC18 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 pUC18 には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれるが、RAV ベクター及び pFAV ベクターの構築過程で、それぞれゼオシン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子に置き換えられた。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC18 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 pUC18 の複製開始配列は、大腸菌のみで機能する。

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

CHY 遺伝子の供与体は、ウシ (*Bos primigenius taurus*) である。

α -*MF_cpo1* 領域及び *MPD2* 遺伝子の供与体は、*K. lactis* NRRL Y-1140 株である。

(2) 安全性に関する事項

ウシは、従来 of キモシンの基原として用いられている。

K. lactis は、長期にわたり食品用酵素の生産菌として安全に使用されており (参照 3)、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)。また、EFSA による QPS に適合している (参照 5、6)

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

CHY 遺伝子は、ウシ由来プロキモシンの塩基配列を基に、複数箇所のアミノ酸置換が導入されるように化学合成した (参照 13)。

α -*MF_cpo1* 領域は、*K. lactis* NRRL Y-1140 株の塩基配列を基に化学合成した。

MPD2 遺伝子は、*K. lactis* NRRL Y-1140 株のゲノム DNA を鋳型として PCR 法により得た (参照 14)。

(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

CHY 遺伝子、 α -*MF_cpo1* 領域及び *MPD2* 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 (参照 15、16)。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *CHY* 遺伝子

CHY 遺伝子がコードするプロキモシンは、低 pH 処理を行うことにより、プロ領域が切断され活性化される。キモシンは、 κ -カゼインの特定部位を切断するプロテアーゼで、乳を凝固させる酵素である。本遺伝子は、凝乳活性を増加させる目的で、複数箇所のアミノ酸置換が導入されるよう改変が行われている。

a. 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

Maxiren XDS の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析を行った結果、試験開始後 60 分においても消化されなかった

(参照 17)。

(b) 人工腸液に対する感受性

Maxiren XDS 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 15 分で消化された (参照 17)。

(c) 熱に対する感受性

Maxiren XDS の加熱による感受性を確認するため、45°C~70°C で 10 分間処理した後、キモシン活性を測定した結果、65°C で消失することが示された。

b. 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

Maxiren XDS 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^aを用いて検索を行った結果、プロキモシンの連続する 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として 4 個のタンパク質が、連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとしてペプシン A が検出された (参照 18)。それらはいずれも環境アレルゲンであり、また、従来のウシ由来プロキモシンの相同性検索でも検出されていることから、アミノ酸変異がアレルギー誘発性に影響を及ぼすことはないと考えられた。

② *α-MF_cpo1* 領域

α-MF_cpo1 領域がコードする α 接合因子分泌シグナルペプチドは、プロキモシンを細胞外に分泌させるためにプロキモシンに付加されている。本シグナルペプチドは、プロキモシンを細胞外に分泌させる過程でプロキモシンから分離される。

③ *MPD2* 遺伝子

MPD2 遺伝子がコードするプロテインジスルフィドイソメラーゼ (*MPD2*) は、キモシンのジスルフィド結合形成を促進して正常に機能させる。*MPD2* は、発現後は宿主内にとどまって機能する *K. lactis* 由来の内在性タンパク質であり、新規のタンパク質ではない。

以上のことから総合的に判断し、Maxiren XDS、 α 接合因子分泌シグナルペプチド及びプロテインジスルフィドイソメラーゼが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

CHY 遺伝子及び *MPD2* 遺伝子のプロモーターは、宿主由来の 3-ホスホグリ

^a AllergenOnline (検索日: 2013 年 2 月)

セレートキナーゼ (*PGK1*) 遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ (*LAC4*) 遺伝子、エノラーゼ (*ENO1*) 遺伝子又はアルコールデヒドロゲナーゼ 2 (*ADH2*) 遺伝子いずれかのプロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

CHY 遺伝子及び *MPD2* 遺伝子のターミネーターは、宿主由来のアスパラチルプロテアーゼ (*BARI*) 遺伝子、液胞カルボキシペプチターゼ Y (*PRC1*) 遺伝子若しくは β -ガラクトシダーゼ (*LAC4*) 遺伝子のいずれかのターミネーター又はウシ由来のプロキモシン遺伝子 3' 非翻訳領域 (3'UTR) 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
該当する配列はない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

α -*MF_cpo1* 領域と *CHY* 遺伝子を連結させた (α -*MF-CHY*) 遺伝子又は *MPD2* 遺伝子に、4 種類のプロモーターのうち 1 つ及び 4 種類のターミネーターのうち 1 つをランダムに結合させるよう RAV ベクターに組み込み、遺伝子発現カセットライブラリーを構築した。このライブラリーから切り出した遺伝子発現カセットを、指定の順序で複数連結したコンカテマーとして、宿主ゲノムの相同組換え領域の配列と選抜マーカーが異なる 3 種の pFAV ベクターに組み込み、pCAV ベクターライブラリーを作製した。

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

pCAV ベクター上の意図する挿入領域の塩基数、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 (参照 15)。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、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

pCAV ベクター上の意図する挿入領域は、制限酵素処理により切り出された *CHY* 遺伝子発現カセット、*MPD2* 遺伝子及びマーカー遺伝子を含む領域である。

(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

導入用 DNA 断片はゲル電気泳動で分離され、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

宿主ゲノムの 3 つの標的遺伝子座に、相同組換えにより pCAV ベクター上の目的とする領域を挿入した。各挿入領域に含まれるマーカー遺伝子が付与する抗生物質耐性及び高キモシン生産性を指標に形質転換体を選抜した後、pSH65 プラスミドを用いてマーカー遺伝子を除去し、CIN 株を得た。

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 pCAV は、クロラムフェニコール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、形質転換体の選抜のために各挿入領域にはハイグロマイシン B 耐性遺伝子、ノーセオスリシン耐性遺伝子又はジェネティシン (G418) 耐性遺伝子が含まれているが、pSH65 プラスミド (ブレオマイシン耐性遺伝子を持つ。) を用いて除去されている。pSH65 プラスミドは、ブレオマイシン非存在下での培養により脱落した。なお、生産菌はこれらの抗生物質に対して感受性を有することが確認されている。

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

CIN 株は、*CHY* 遺伝子発現カセット及び *MPD2* 遺伝子発現カセットが複数コピー導入され高キモシン生産性を獲得している点並びに遺伝子導入した 1 つの遺伝子座で内在性遺伝子が欠失している点で、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

CIN 株の全ゲノム解析を行った結果、*CHY* 遺伝子発現カセット及び *MPD2* 遺伝子発現カセットは各標的遺伝子座に導入されていることが確認された。また、各挿入領域における導入 DNA の構造及び制限酵素による切断地図は明らかになっていないが、それぞれ複数コピー導入されていることが推定された。さらに、遺伝子導入に伴い、1 つの遺伝子座で内在性遺伝子が欠失していることが確認された (参照 16)。

(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、挿入 DNA の 5' 近傍配列を含む領域、3' 近傍配列を含む領域及び各構成要素間の接合部位で生じ得る想定配列における 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440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又は連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンが6種類検出されたが、いずれも食物アレルゲンではなかった（参照18）。

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、タンパク質データベース^cを用いてblast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。

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

Maxiren XDSの製造原料及び製造器材は、従来から食品又は食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績がある。

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

Maxiren XDS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があることから、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

Maxiren XDSは、オランダ、フランス、ロシア、アルゼンチン、デンマーク、カナダ等において認可されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

定量PCR法（検出限界< 0.1 ng/mL）により、Maxiren XDS中に組換え体のDNAが検出されないことが確認された（参照19）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

Maxiren XDS製剤前の酵素サンプルは、JECFAの食品用酵素の規格値を満たしている（参照20）。したがって、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

Maxiren XDS製剤は、圧搾ろ過、濃縮除菌ろ過等の精製工程を経ることで得ら

^b AllergenOnline（検索日：2017年9月）

^c NCBI database（検索日：2017年9月）

れる。これらの工程において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

Maxiren XDS 製剤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

「CIN 株を利用して生産されたキモシン」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. 厚生労働省「欧米諸国等におけるレンネットに関する調査」報告書、2011
2. キモシンの推奨使用量（社内文書）
3. Bonekamp FJ and Oosterom J. On the safety of *Kluyveromyces lactis*- a review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 41(1), 1-3.
4. 国立感染症研究所 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊 1 「病原体等の BSL 分類等」 平成22 年
5. EFSA. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the, “Introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA”. EFSA Journal, 2007, 587, 1-16.
6. EFSA. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA Journal, 2013, 11 (11), 3449.
7. Lutwick LI, Phaff HJ and Stevens DA. *Kluyveromyces fragilis* as an opportunistic fungal pathogen in man. Sabouraudia, 1980, 18 (1), 69-73.
8. Corpus K, Hegeman-Dingle R and Bajjoka I. *Candida kefyr*, an uncommon but emerging fungal pathogen: report of two cases. Pharmacotherapy, 2004, 24 (8), 1084-1088.
9. Reuter CW, Morgan MA, Bange FC, Gunzer F, Eder M, Hertenstein B and Ganser A. *Candida kefyr* as an emerging pathogen causing nosocomial bloodstream infections in neutropenic leukemia patients. Clin. Infect. Dis., 2005, 41 (9), 1365-1366.
10. Gomez-Lopez A, Pan D, Cuesta I, Alastruey-Izpuierdo A, Rodriguez-Tudela JL and Cuenca-Estrella M. Molecular identification and susceptibility profile in vitro of the emerging pathogen *Candida kefyr*. Diagn. Microbiol. Dis., 2010, 66 (1), 116-119.
11. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. Clin. Microbiol. Rev., 1995, 8 (4), 462-478.
12. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O; the ESCMID EFISG study group and ECMM. ESCMID/ECMM Joint Clinical Guideline for the Diagnosis and Management of Rare Invasive Yeast Infections. Clin. Microbiol. Infect. 2013, doi: 10.1111/1469-0691.12360.
13. Harris TJ, Lowe PA, Lyons A, Thomas PG, Eaton MA, Millican TA, Patel TP *et al*. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA coding for calf preprochymosin. Nucl. Acids Res., 1982, 10 (7), 2177-2187.
14. Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J *et al*. Genome evolution in yeasts. Nature, 2004, 430 (6995), 35-44.
15. Nucleotide sequence and functional annotation of the vectors and genetic

elements used in the construction of the *Kluyveromyces lactis* GMM strain CIN
(社内文書)

16. Genomic sequencing of the *Kluyveromyces lactis* strain *** (社内文書)
17. In vitro digestibility of Maxiren XDS (社内文書)
18. Bioinformatics testing for putative allergenicity (社内文書)
19. Recombinant DNA analyses in the food enzyme (社内文書)
20. Certificates of Analysis of three different batches (社内文書)