

平成31年3月20日

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋 殿

遺伝子組換え食品等専門調査会
座長 中島 春紫

遺伝子組換え食品等に係る食品健康影響評価に関する審議結果について

平成30年11月8日付け厚生労働省発生食1108第5号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた添加物「JPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼ」に係る食品健康影響評価について、当専門調査会において審議を行った結果は別添のとおりですので報告します。

遺伝子組換え食品等評価書

JPAN002 株を利用して生産された
ホスホリパーゼ

2019年3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	5
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	11
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	12
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	14
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項	14
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	14
2. 組換え体の残存に関する事項	14
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	14
4. 精製方法及びその効果に関する事項	14
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11月8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1108第5号）、関係書類の接受

2018年11月13日 第720回食品安全委員会（要請事項説明）

2018年11月30日 第180回遺伝子組換え食品等専門調査会

2019年1月22日 第727回食品安全委員会（報告）

2019年1月23日から2月21日まで 国民からの意見・情報の募集

2019年3月20日 遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長に報告

<食品安全委員会委員名簿>

佐藤 洋（委員長）

山本 茂貴（委員長代理）

川西 徹

吉田 緑

香西 みどり

堀口 逸子

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

「JPAN002 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Talaromyces leycettanus* CBS 398.68 株由来のホスホリパーゼ A1 遺伝子を導入して作製した JPAN002 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、植物油の精製工程において不純物除去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、「JPAN002 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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

名称：JPAN002 株を利用して生産されたホスホリパーゼ
用途：植物油の不純物除去による保存安定性の向上
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、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Talaromyces leycettanus* CBS 398.68 株由来のホスホリパーゼ A1 遺伝子を導入して作製した JPAN002 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、植物油の精製工程において不純物除去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：ホスホリパーゼ
基原：*Aspergillus oryzae*
有効成分：Phospholipase A1
IUB No.：EC 3. 1. 1. 32
CAS No.：9043-29-2

(2) 製造方法

ホスホリパーゼは、培養液から抽出し、除菌、濃縮、精製等の工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

ホスホリパーゼは、植物油の精製工程における不純物除去及び製パンにおける小麦粉の物性改良を目的として使用される（参照 1）。

(4) 摂取量

ホスホリパーゼが全ての植物油及びパンに使用され、100%最終製品中に残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.007 mg/ kg 体重/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、*A. niger* BO-1 株である。これは、自然界からグリコアミラーゼ生産

菌として分離された *A. niger* C40-1 株に突然変異誘導を行い、グルコアミラーゼの生産性を向上し、夾雑酵素である α -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能を欠失した株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ホスホリパーゼ A1 (*pla1*) 遺伝子の供与体は、*T. leycettanus* CBS 398.68 株である。選択マーカーであるアセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子及びオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *A. nidulans* NRRL1092 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

pla1 遺伝子は、*T. leycettanus* CBS 398.68 株の野生型ホスホリパーゼ A1 と同一のアミノ酸配列をもつホスホリパーゼ A1 (PLA1) をコードする。*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子は、アセトアミダーゼ及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、選択マーカーに用いた。

pla1 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む発現カセットを、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。

なお、生産菌の作製に当たり、あらかじめ 9 個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ているが、このうちセルフクローニングに該当しない 5 か所の遺伝子座では、オープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行い、安全性を検討した (第 5-2-(2) 参照)。

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. niger 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 (参照 3)。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. niger は、オクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生する可能性があるが、*A. niger* BO-1 株がオクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生しないことは分析により確認されている (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 : PLA1

有効成分 : ホスホリパーゼ A1

IUB No. : EC 3. 1. 1. 32

CAS No. : 9043-29-2

(2) 製造方法

PLA1 は、JPAN002 株を生産菌として、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

PLA1 は、植物油精製時の脱ガム工程に使用され、リン脂質等の不純物除去効率を高める。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

PLA1 は、従来のホスホリパーゼ A1 と同じくリン脂質の 1 位にあるエステル結合を加水分解する酵素である。

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

PLA1 と従来のホスホリパーゼ A1 との相違点は、構造遺伝子の基原が異なる点並びに至適温度及び pH が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAN002 株と宿主との相違点は、JPAN002 株には *pla1* 遺伝子が複数コピー導入されホスホリパーゼ A1 の高産生性を獲得している点、*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子を導入している点並びにホスホリパーゼ A1 の生産性を高めるため複数遺伝子を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、*A. niger* BO-1 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

A. niger は、病原性で問題となる菌種ではないとされており、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 5）。

A. niger は有害生理活性物質であるオクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生する可能性が示唆されているが、*A. niger* BO-1 株はこれらのマイコトキシンを産生しないことが確認されている（参照 4）。

A. niger は、アレルギー性において特に問題となる菌種ではないとされているが、*A. niger* 由来の酵素として β-キシロシダーゼ、セリンプロテアーゼ及び 3-フ

イターゼ B がアレルゲンデータベース^aに登録されている。これらの酵素は吸入性アレルゲンとして報告されており、*A. niger* 由来の酵素によるアレルギーは、特定職種での高頻度暴露が起因と考えられる。*A. niger* は、国内では焼酎等の製造に安全に使用されてきた経験があるが、これらの酵素を原因とするアレルギーと *A. niger* のアレルギー性との関連性を否定できないことから、そのようなリスクの低減のため、他の糸状菌と同様、本菌を扱うときには孢子が飛散しないように十分に留意する必要がある（参照 3）。

以上のことから、適切な環境で扱われている限り、*A. niger* BO-1 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。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. niger 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

A. niger 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

A. niger の近縁種には、日和見感染及び気管支アレルギーの原因菌である *A. fumigatus* や、オクラトキシン産性能を有する *A. carbonarius* が知られている。

第3章 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 pJPV011 の作製には、プラスミド pBluescript SK-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 pBluescript SK-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 pBluescript SK-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 pBluescript SK-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

^a WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee 検索日：2016年4月14日

プラスミド pBluescript SK-には、アンピシリ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 pBluescript SK-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 pBluescript SK-の複製開始配列は、*E. coli* 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

pla1 遺伝子の供与体は *T. leycettanus* CBS 398.68 株、*amdS* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* Glasgow 野生株、*pyrG* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* NRRL1092 株である。

(2) 安全性に関する事項

T. leycettanus の食経験は知られていないが、高い耐熱性を有することから、産業上有用と考えられる酵素遺伝子がクローニングされ研究されている（参照 6）。

A. nidulans の食経験は知られていないが、*A. nidulans* のアセトアミダーゼをコードする *amdS* 遺伝子は、選択マーカーとして長年利用されてきた実績を有する。

T. leycettanus 及び *A. nidulans* は、いずれも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 5）。

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

pla1 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子は、それぞれ *T. leycettanus* CBS 398.68 株、*A. nidulans* Glasgow 野生株及び *A. nidulans* NRRL1092 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

挿入 DNA 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 7、8）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *pla1* 遺伝子

pla1 遺伝子が発現する PLA1 は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分

解する。

a. 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

T. leycettanus について、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

PLA1 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。また、*T. leycettanus* が産生するホスホリパーゼにおけるアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^b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。

c. 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

PLA1 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、SDS-PAGE 後の CBB 染色では、部分分解物は試験開始後 20 分以内に、ウェスタンブロット分析では、完全長鎖は試験開始後 0.5 分以内に分解されることが示された（参照 9）。

(b) 人工腸液に対する感受性

PLA1 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 6 時間においても分解物が残存することが示された（参照 9）。

(c) 加熱処理に対する感受性

PLA1 の加熱処理に対する感受性について確認した結果、85°C10 分で失活することが確認された。

d. 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

PLA1 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^c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で 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 10）。

② *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを加水分解する酵素であり、アセトアミドの存在下でのみ発現する。アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中では、本遺伝子が導入された菌株のみが生育できることから、長年選択マーカーとして使用されてきた。アセトアミダーゼがアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

^b PubMed、検索日：2017 年 12 月

^c The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) version17

③ *pyrG* 遺伝子

pyrG 遺伝子は、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、ウリジン要求性を相補する選択マーカー遺伝子として長年使用されてきた。オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼがアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

以上のことから総合的に判断し、PLA1、アセトアミダーゼ及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシ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

pla1 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amyB* 遺伝子のプロモーター配列である。*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *tef1* 遺伝子のプロモーター配列である。*pyrG* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子のプロモーター配列である（参照 7、8）。

(2) ターミネーターに関する事項

pla1 遺伝子及び *amdS* 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amg* 遺伝子のターミネーター配列である。*pyrG* 遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子のターミネーター配列である（参照 7、8）。

(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

pla1 遺伝子の転写を安定化させるため、*A. niger* BO-1 株由来の *payA* 遺伝子の 5' 側非翻訳領域 (*payA* 5'UTR 配列) を用いた。また、*pla1* 遺伝子の転写産物を安定化させ遺伝子発現量を向上させるため、Tabacco mosaic virus の coat protein 遺伝子の 3' 側非翻訳領域 (*CP* 3'UTR 配列) を用いた（参照 11）。

そのほか、インテグラーゼ認識配列 (FRT-F / FRT-F3 配列) が用いられている。

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 pBluescript SK-に、インテグラーゼ認識配列を両端に配した *pla1* 遺伝子断片、*FLP* 遺伝子等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV011 を作製した（参照 12）。

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pJPV011の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照8）。

(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pJPV011上の意図する挿入領域は、FRT-F配列からFRT-F3配列までの *pla1/amdS* 遺伝子発現カセットを含む領域である。

(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

遺伝子導入用ベクターpJPV011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

あらかじめインテグラーゼ認識配列を導入した宿主に遺伝子導入用ベクターpJPV011を導入し、ベクター上の *FLP* 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間にある *pla1/amdS* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した。この際、*amdS* 遺伝子による選抜を行った後に、ホスホリパーゼ A1 活性を指標として形質転換体を選択した。

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pJPV011はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主の染色体には導入されない。このことは、全ゲノムシーケンズ解析により確認されている。

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

JPAN002株は、*pla1/amdS* 遺伝子発現カセットが導入され、ホスホリパーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失させている。

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

pla1/ amdS 遺伝子発現カセットの標的遺伝子座への導入を確認するためにサザンブロット解析及びシーケンズ解析を行った結果、各遺伝子座に1コピー

一導入されていることが確認された（参照 13、14）。また、遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(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 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 725 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^c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は検出されなかった。また、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、Ara h 3 が検出されたが、一致する配列についてアレルゲンデータベース^dで検索した結果、エピトープとして報告されておらず、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられた。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 15）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、3 個の ORF がデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれのタンパク質も毒性を有するとの報告はなかった（参照 16～19）。

遺伝子の欠失操作を行い、異種遺伝子断片が染色体上に残存する 5 つの遺伝子座において、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ついて 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 462 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^c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 15）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見いだされなかった（参照 20～24）。

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

PLA1 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

^d Allergen Database for Food Safety (ADFS、国立医薬品食品衛生研究所) 2018 年 2 月 28 日版

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

PLA1 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

PLA1 は、2017 年以降カナダで使用されているほか、米国では 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

ドットブロット解析により、PLA1 製剤中には組換え DNA が検出されないことが確認された（参照 25）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

PLA1 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ことは考えにくい。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

PLA1 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るため、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

PLA1 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

「JPAN002 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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. 酵素剤 ホスホリパーゼ A1 (三菱化学フーズ株式会社)
<http://www.mfc.co.jp/product/kouso/phospholipase/index.html>
2. 厚生労働省 平成27年 国民健康・栄養調査報告
3. Schuster, E. et al., Applied Microbiological Biotechnology, **59**, 426-435 (2002)
On the safety of *Aspergillus niger* – a review
4. Analysis of selected strains derived from *A. niger* C40-1 for production of mycotoxins (社内文書)
5. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (平成22年6月)
6. Wang, C. et al., Journal of Bioscience and Bioengineering 121, 7-12 (2016)
Biochemical characterization of a novel thermophilic α -galactosidase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 with significant transglycosylation activity.
7. *A. niger* BO-1株における欠失導入用ベクターを用いたDNA欠失の概要 (社内文書)
8. 遺伝子導入用ベクターpJPV011の塩基配列及び構成 (社内文書)
9. Purity and Digestibility of PLA1 protein in a product formulation (社内文書)
10. Sequence homology of phospholipase expressed by JPAN002 to allergens (社内文書)
11. Goelet P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 5818-5822(1982) Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA
12. Outline of pJPV011 construction (社内文書)
13. JPAN002株の遺伝子導入領域におけるDNA塩基配列 (社内文書)
14. Genome sequence analysis on genes of concern (社内文書)
15. C. E. Zhou *et. al.*, Nucleic Acids Research, **35**, Database issue, D391-D394 (2007). MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications.
16. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN002 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
17. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN002 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
18. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN002 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
19. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN002 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
20. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
21. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
22. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of C2218 to

- proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
23. Sequence homology of ORFs in the fcy1 locus on the genome of C2218 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
 24. Sequence homology of ORFs in the fum locus on the genome of C2218 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
 25. The analysis of residual DNA in a PLA1 product formulation by means of dot blot hybridization (社内文書)

「JPAN002 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」に係る食品健康影響評価に関する審議結果（案）についての意見・情報の募集結果について

1. 実施期間 平成31年1月23日～平成31年2月21日
2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送
3. 提出状況 2件
4. 意見・情報の概要及び食品安全委員会の回答

	意見・情報の概要	遺伝子組換え食品等専門調査会の回答
1	<p>欧州で子育てをし、欧米人の友人たちと意見交換をしています。</p> <p>今回、精油と準主食であるパンに使用される、「遺伝子組み換えの添加物」であることで、その申請を国がどのような姿勢で精査しているのかを知ろうと、コメントを送ることにしました。</p> <p>欧米では食品添加物への規制が厳しく、許可されている物質は二桁ほど、翻って日本では三桁です。米国はとくに遺伝子組み換えには寛容ですが、日本在住のアメリカ人にはなぜかとよく聞かれます。来るオリンピックでは、日本の食品に、あまりに添加物や残留農薬が多いので、欧米の選手団は食材まで持参すると聞いています。</p> <p>有名な小麦の遺伝子組み換えは、人体に対する影響をほとんど検証しなかったために、小麦アレルギーが世界中に広がってしまいました。今回の添加物は、カナダと米国で許可されているとありますが、日本は三桁にのぼる膨大な添加物があり、それらとの複合作用は検証されていないようです。</p> <p>「適切な環境で扱われている限り」「既知の有害塩基配列は含まれていない」「安全に</p>	<p>食品安全委員会は、国民の健康の保護が最も重要であるという基本的認識の下、規制や指導等のリスク管理を行う関係行政機関から独立して、科学的知見に基づき客観的かつ中立公正に食品に含まれる可能性のある危害要因が人の健康に与える影響について食品健康影響評価を行っています。</p> <p>また、申請者の提出した資料による評価に際しては、その記載の妥当性についても検討し、科学的見地から審議を行っています。さらに、審議において安全性を評価するための資料が不足していると判断された場合は、試験等のデータを含め必要な追加資料の提出を求めています。</p> <p>複合影響については、現段階では国際的にも確立した評価方法はなく、個別のリスク評価を十分に行うことで安全性が確保できると考えています。</p>

	<p>使用されてきた実績があり」など、製造業者からの判断が列記されているだけです。第三者機関の検証を経ることを要望します。</p>	
2	<p>「II. 食品健康影響評価 第2. 宿主に関する事項 2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」において、「A. niger は、国内では焼酎等の製造に安全に使用されてきた経験があるが、これらの酵素を原因とするアレルギーと A. niger のアレルギー性との関連性を否定できないことから、そのようなリスクの低減のため、他の糸状菌と同様、本菌を扱うときには胞子が飛散しないように十分に留意する必要がある」としておきながら、「適切な環境で扱われている限り、A. niger B0-1 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。」と結論づけていますが、適切な環境は必ず担保されるのでしょうか？製造者任せではあまりに無責任です。</p> <p>「3. 寄生性及び定着性に関する事項」にて「A. niger には、腸管内への寄生性及び定着性の報告はない。」とか「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」でも「A. niger には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。」のように「報告はない」ということで、暗に安全であるかのような表現がされています。あるいは「第3. ベクターに関する事項 2. 性質に関する事項 (3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項」にて「プラスミド pBluescript SK-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。」ということで「知られていない有害塩基配列が含まれている可能性がないわけではないことが想定されます。長い人類の歴史はありますが遺伝子組替え物質そのものものの歴史も浅く、知見が少ない状況で「ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。」との結論は国民を大きなリスクに晒すと言わざるを得</p>	<p>① 添加物の製造に関する御意見は、リスク管理に関するものと考えられることから、厚生労働省へお伝えします。なお、食品関連事業者は、自らが食品の安全性の確保について第一義的責任を有しています(食品安全基本法第8条第1項)。</p> <p>② 本添加物については、「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、評価を行った結果、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、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断しました。なお、食品安全委員会はその時点において到達されている水準の科学的知見に基づいて食品健康影響評価を行っています(食品安全基本法第11条第3項)。</p>

ません。

「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 2. 挿入 DNA 又は遺伝子(抗生物質耐性マーカを含む。)及びその遺伝子産物の 性質に関する事項 (3)挿入遺伝子の機能に関する事項」内の 3 ヶ所で「アレルギー誘発性を示唆する報告はない」とここでも「報告がない」ことで安全であるかのような言い回しがされています。今回の審査に当たって参照された報告やデータ(18 個が社内文書で第三者作成と思われるものはわずか 4 つ)はほとんど申請者が作成したものです。人の健康影響を検証するのに申請者のデータをもとにするのは極めて危険です。通したいがために、都合の悪いデータには触れなかったり、都合のいいデータだけ強調している可能性もあります。改めて人への影響を第三者のデータのみ使って検証するようお願いします。

「(b)人工腸液に対する感受性」にて「PLA1 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 6 時間においても分解物が残存することが示された」ことについてリスクはないと判断されたのでしょうか?その根拠をお示してください。

「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」及び「2. 添加物の製造原料又は製造器材と

③ 申請者が提出した資料による評価に際しては実施された試験や記載の妥当性についても検討し、科学的見地から審議を行っています。また、審議において安全性を評価するための資料が不足していると判断された場合は、試験等のデータを含めさらに必要な追加資料の提出を求めています。食品関連事業者は自らが食品の安全性の確保について第一義的責任を有するとともに(食品安全基本法第 8 条第 1 項)、国が実施する食品の安全性の確保に関する施策に協力する責務を有しています(同法第 8 条第 3 項)。食品安全委員会はその時点において到達されている水準の科学的知見に基づいて、客観的かつ中立公正に食品健康影響評価を行っています(同法第 11 条第 3 項)。

④ PLA1 については、文献情報に基づくアレルギー誘発性の有無だけではなく、挿入遺伝子が産生するタンパク質や、組換え体において新たに生じたオープンリーディングフレームから転写・翻訳される可能性のあるタンパク質の配列を、データベースに登録されている既知のアレルゲンの配列情報と網羅的に比較することに加え、物理化学的処理(人工胃液・腸液、加熱処理等)に対する感受性試験の結果も勘案し、総合的にアレルギー誘発性を有する可能性が低いと判断しています。

① 及び③でお答えしたとおりです。

しての安全性について知見が得られていること」にて「PLA1 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」とされています。「安全に使用されてきた」と断言されていますが、これも知見がないだけでリスクが皆無と言い切れるのでしょうか？

「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」にて「PLA1 は、2017 年以降カナダで使用されているほか、米国では 2016 年に GRAS として認証されている。」ことが日本でも認可しているとは繋がりません。日本で認可されている遺伝子組換え物質は 300 を超えており米国やカナダの比ではありません。さらには添加物の種類も多く、そのような物質の複合影響を検証していない現状で他の 2 か国で使用・認可されていることは日本での使用を許可する理由にはならないのでは？

「3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」では「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ことは考えにくい。」とされ「4. 精製方法及びその効果に関する事項」でも「安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。」と「考えにくい」という表現がされています。これでは申請者寄りの判断とみなされてもしょうがないです。客観的

⑤ 食品安全委員会は、国民の健康の保護が最も重要であるという基本的認識の下、規制や指導等のリスク管理を行う関係行政機関から独立して、科学的知見に基づき客観的かつ中立公正に食品に含まれる可能性のある危害要因が人の健康に与える影響について食品健康影響評価を行っています。複合影響については、現段階では国際的にも確立した評価方法はなく、個別のリスク評価を十分に行うことで安全性が確保できると考えています。なお、食品の安全性の確保は、国際動向に十分配慮しつつ科学的知見に基づいて講じられるものであり(食品安全基本法第5条)、食品健康影響評価に当たっては、他国の評価結果も参考にしています。

添加物の規制に関する御意見は、リスク管理に関するものと考えられることから、厚生労働省へお伝えします。

③でお答えしたとおりです。

	証拠をもつての判断をお願いします。	
--	-------------------	--

※ 頂いた意見・情報はそのまま掲載しています。