

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 *Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼに係る食品健康影響評価（令和4年2月21日付け厚生労働省発生食0221第3号）については、令和4年3月23日に開催された第223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. *Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラ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

令和4年6月28日（火）開催の食品安全委員会（第864回会合）の翌日の令和4年6月29日（水）から令和4年7月28日（木）までの30日間。

2) 受付体

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

Bacillus subtilis NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

令和4年(2022年)6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.....	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.....	7
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.....	7
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.....	10
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>

- 2022年2月21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0221第3号）、関係書類の接受
- 2022年3月1日 第849回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2022年3月23日 第223回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2022年6月28日 第864回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

山本 茂貴（委員長）
浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹（委員長代理 第二順位）
脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり
松永 和紀
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>

2022年3月31日まで		2022年4月1日から	
中島 春紫（座長）		中島 春紫（座長）	
山川 隆（座長代理）		山川 隆（座長代理）	
安達 玲子	小野 竜一	安達 玲子	佐々木 伸大
岡田 由美子	近藤 一成	岡田 由美子	近藤 一成
小関 良宏	樋口 恭子	小野 道之	樋口 恭子
小野 道之	藤原 すみれ	小野 竜一	藤原 すみれ

<第223回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

要 約

「*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Bacillus subtilis* ISW1214 株を宿主として、*Paenibacillus campinasensis* 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pHYT2Aopt を導入して作製した *B. subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。本添加物は、アミロースなどの α -1,4-グルカンに作用し、環状 α -1,4-グルカンを生成する酵素として、シクロデキストリンの製造に用いられる。

「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、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、「*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」については、人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

(申請内容)

品 目：*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

用 途：シクロデキストリンの製造

申請者：日本食品化工株式会社

開発者：日本食品化工株式会社

本添加物は、*Bacillus subtilis* ISW1214 株を宿主として、*Paenibacillus campinasensis* 由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (*pccgt*) 遺伝子を含む発現プラスミド pHYT2Aopt を導入して作製した *B. subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。

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：CDA

基 原：*Paenibacillus campinasensis*

有効成分：シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

IUB No. : EC 2.4.1.19

CAS No. : 9030-09-5

(2) 製造方法

CDA は、*P. campinasensis* を生産菌として用い、培養、精製、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、精製工程で分離、除去される。

(3) 用途及び使用形態

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼは、アミロースなどの α -1,4-グルカンに作用し、環状 α -1,4-グルカンを生成する酵素であり、主にデンプンに作用させてシクロデキストリンの製造に用いられる。

(4) 摂取量

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの我が国における流通量の全てが、食品用途のシクロデキストリン製品の製造に使用され、その食品中に本酵素が 100% 残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、2.03 mg / kg 体重/日である (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、*B. subtilis* ISW1214 株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

pccgt 遺伝子の供与体は *P. campinasensis*、*trpS* 遺伝子の供与体は *B. subtilis* ISW1214 株である。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (*cat*) 遺伝子の供与体は *Staphylococcus aureus* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

pccgt 遺伝子は、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (PcCGT) をコードし、*trpS* 遺伝子はトリプトファン tRNA 合成酵素をコードする。

これらの遺伝子を含む発現プラスミド pHYT2Aopt を宿主に導入した。

cat 遺伝子は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードし、二重交差相同組換えによりゲノムに導入された。

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

B. subtilis は、食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験があり、長期にわたり食品製造に安全に使用されている（参照 2）。

4 宿主の構成成分等に関する資料

B. subtilis が有害生理活性物質を生産するという報告はない。

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

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：T2-CDA

有効成分：シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (PcCGT)

IUB No. : EC 2.4.1.19

CAS No. : 9030-09-5

(2) 製造方法

T2-CDA は、*B. subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を生産菌として用い、製造される。製造方法は、従来の添加物と同様であり、培養、精製、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、精製工程において分離、除去される。

(3) 用途及び使用形態

T2-CDA の有効成分である PcCGT は、従来の添加物と同様にシクロデキストリンの製造に使用され、反応後、精製工程等により除去される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

PcCGT は、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素である。

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

PcCGT と従来の添加物のアミノ酸配列は同一である。

(2) 組換え体と宿主

B. subtilis NTI05 (pHYT2Aopt) 株と宿主との相違点は、*B. subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ産生能、テトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性を有している点である。

1 から 6 までより、本添加物又は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、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. subtilis* ISW1214 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. subtilis の病原性は知られておらず、有害生理活性物質を生産するという報告はない。また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に定めるバイオセーフティレベル（以下「BSL」という。）1 に該当する（参照 3）。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis ISW1214 株に寄生性や定着性は報告されていない。

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

B. subtilis ISW1214 株は、病原性の外来因子の存在を示唆する事実は認められていない（参照 4）。

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. subtilis の近縁種である *Bacillus cereus* 及び *Bacillus anthracis* は、毒性物質を生産することが知られているが、*B. subtilis* 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

発現プラスミド pHYT2Aopt の作製には *Escherichia coli* 由来のプラスミド pACYC177 と *Streptococcus faecalis* 由来のプラスミド pAM α 1 から構築されたプラスミド pHY300PLK が用いられた (参照 5)。

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 pHY300PLK の塩基数及び塩基配列は明らかになっている (参照 5)。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pHY300PLK 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 pHY300PLK 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 pHY300PLK にはテトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が含まれている (参照 5)。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pHY300PLK 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 pHY300PLK の複製開始配列は、*Bacillus* 属、*Escherichia* 属及び *Streptococcus* 属で機能することが知られている。

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

pccgt 遺伝子の供与体は *P. campinasensis* 株、*trpS* 遺伝子の供与体は *B. subtilis* ISW1214 株である。*cat* 遺伝子の供与体は *S. aureus* である

(2) 安全性に関する事項

P. campinasensis 株及び *B. subtilis* ISW1214 株は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。また、これらは BSL 1 に相当する (参照 3)。*S. aureus* は BSL2 に該当するが、*cat* 遺伝子及び *cat* 遺伝子の産物に病原性等は知られていない。

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

pccgt 遺伝子は、*P. campinasensis* 株のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列に基づき、*B. subtilis* での発現を最適化するための塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子である。

trpS 遺伝子は、*B. subtilis* ISW1214 株の *trpS* 遺伝子をクローニングした後、塩基変異を導入した遺伝子である。

cat 遺伝子は、pC194 プラスミド上の配列を使用した。

(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 6）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

pccgt 遺伝子がコードする PcCGT は、デンプン加水分解物に作用し、シクロデキストリン合成反応を触媒する酵素である。

① 遺伝子産物の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

pccgt 遺伝子の供与体である *P. campinasensis* 株に関して、アレルギー誘発性について検索^aした結果、その報告はない。

② 遺伝子産物についてのアレルギー誘発性に関する知見

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼに関して、アレルギー誘発性について検索^aした結果、その報告はない。

③ 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

a. 人工胃液に対する感受性

PcCGT の人工胃液中における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。その結果、SDS-PAGE 分析では試験開始後 5 秒以内に、ウェスタンブロット分析では試験開始後 15 秒以内に消化されることが確認された（参照 7）。

b. 人工腸液に対する感受性

PcCGT の人工腸液中における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 時間を経過しても消化されなかった（参照 7）。

c. 加熱処理に対する感受性

PcCGT の加熱による免疫反応性の変化について ELISA 法を用いて分析

^a Google Scholar 及び PubMed（検索日：2021 年 10 月）

した結果、酵素失活工程の条件である pH 4.0 及び 6.0、80°C の加熱処理により 1 時間で抗 PcCGT 抗体への相対結合能が加熱前の 3% 以下にまで低下した（参照 8）。

- ④ 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関する事項

PcCGT 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、80 アミノ酸配列で 35% 以上の相同性を示す既知アレルゲンが検出されたが、PcCGT のアミノ酸配列は従来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼと同一であることから、上記既知アレルゲンは従来の添加物との相同性検索にも同様に検出された。連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 9）。

以上から、PcCGT のアレルギー誘発の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

pccgt 遺伝子のプロモーターは *Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナナーゼ遺伝子のプロモーター配列由来である。

- (2) ターミネーターに関する事項

pccgt 遺伝子のターミネーターは *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株由来の α -アガラーゼ遺伝子のターミネーター配列由来である。

- (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

本酵素を菌体外に分泌させるため、*Bacillus* sp. JAMB750 株由来マンナナーゼのシグナル配列に変異を導入して *pccgt* 遺伝子の上流に付加した。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの発現プラスミド pHYT2G のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子及びシグナル配列を *pccgt* 遺伝子及び上記シグナル配列に置換することによって、発現プラスミド pHYT2Aopt が作製された（参照 6）。

^b AllergenOnline version 21（検索日：2021 年 9 月）

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

発現プラスミド pHYT2Aopt 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 6）。

(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

発現プラスミド pHYT2Aopt の全塩基配列について、6 つの読み枠においてオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）検索を行った結果、終止コドンから終止コドンまでで終結する連続する 30 アミノ酸以上の目的以外の ORF が挿入遺伝子領域に 78 個見いだされた。これらの ORF についてタンパク質データベース^cを用いて blastp による相同性検索を $E\text{-value}<10$ を指標として行った結果、26 個の ORF に相同性が認められたが、既知の毒性タンパク質との相同性は見られなかった。また、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、80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す ORF 及び連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 6）。

(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

意図する挿入領域は、発現プラスミド pHYT2Aopt の全塩基配列であり、宿主においてはプラスミドの状態では保持される。

(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

発現プラスミド pHYT2Aopt は目的外の遺伝子の混入がないように構築されている。

6 DNA の宿主への導入方法に関する事項

発現プラスミド pHYT2Aopt をプロトプラスト法により中間株に導入後、テトラサイクリン耐性及びカナマイシン感受性を示す形質転換体を選抜することによって *B. subtilis* NTI04 (pHYT2Aopt) 株を得た。続いて、酵素生産性の安定化を企図し、宿主 *B. subtilis* ISW1214 株の相同組換えにより、*B. subtilis* NTI04 (pHYT2Aopt) と同じ遺伝子型を有する *B. subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を得た（参照 10）。

^c NCBI Non-redundant protein sequences (nr) （検索：2020年9月）

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項

発現プラスミド pHYT2Aopt 上にアンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子が存在し、*B. subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株のゲノム DNA 上にクロラムフェニコール耐性遺伝子である *cat* 遺伝子が存在する。アンピシリン耐性遺伝子は NTI05 (pHYT2Aopt) 株において発現しない。テトラサイクリン耐性遺伝子がコードする膜タンパク質は、細胞内からテトラサイクリンを能動的に排出することで耐性を付与する。*cat* 遺伝子はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) をコードし、アセチル CoA のアセチル基をクロラムフェニコールの水酸基へ転移させることで宿主にクロラムフェニコール耐性を付与する。これらの遺伝子産物の有害性に関する報告はない^d。

(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項

T2-CDA 中のテトラサイクリン耐性遺伝子産物及びクロラムフェニコール耐性遺伝子産物の含有量を ELISA 法で測定した結果、それぞれ 0.05 µg/mL 未満及び 0.025 µg/mL 未満であった (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

B. subtilis NTI05 (HYT2Aopt) 株と宿主の相違点は、PcCGT 産生能、テトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性を獲得している点である。

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

発現プラスミド pHYT2Aopt の制限酵素による切断地図は明らかになっている (参照 6)。

(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

宿主のゲノムに挿入された *cat* 領域、その上流及び下流の接合領域について、ORF 検索を行った結果、23 個検出された。これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性を検索するためタンパク質データベース^eを用いて *E-value*<10 を指標として検索した結果、既知の毒性物質との相同性は認められなかった。また、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を用いて検索を行った結果、80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す ORF 及び連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった (参照 12)。

^d Google Scholar 及び PubMed (検索：2021年10月)

^e NCBI Non-redundant protein sequences (nr) (検索：2021年6月)

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

T2-CDA 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。

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

T2-CDA 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

T2-CDA は、海外での販売及び使用実績はない。

2 組換え体の残存に関する事項

T2-CDA に生産菌の残存がないことを培養法により確認している（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

発酵培地原料は従来の食品用酵素の製造に用いられてきた原料である。また、宿主である *B. subtilis* ISW1214 株が有害生理活性物質を生産するという報告はない。したがって、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、製造に由来する非有効成分の安全性に問題はないと考えられる。

4 精製方法及びその効果に関する事項

T2-CDA は、生産菌の培養物から、ろ過、濃縮等の工程を経ることで得られる。適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

T2-CDA 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と同様であり、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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事項

第2から第7までにより、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」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、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 佐藤恭子、西島基弘、上田要一「生産量統計調査を基にした食品添加物摂取量の推定に関わる研究 その2 既存添加物品目（第7回最終報告）」、令和元年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）、「食品添加物の安全性確保に資する研究」
2. Anne Sietske de Boer A. S., Diderichsen B., On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36** (1991) 1-4
3. 国立感染症研究所「病原体等安全管理規程」
4. Ikawa S., Shibata T., Matsumoto K., Iijima T., Saito H., Ando T., Chromosomal loci of genes controlling site-specific restriction endonucleases of *Bacillus subtilis*, *Mol Gen Genet.* **183** (1981) 1-6
5. Ishiwa H., Shibahara-Sone H., New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. IV. The nucleotide sequence of pHY300PLK and some properties in relation to transformation, *Jpn J Genet.* **61** (1986) 515-528
6. 日食研究報告書（2021）*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書（その1 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの発現プラスミド pHYT2Aopt の DNA シーケンス）（社内文書）
7. 日食研究報告書（2021）*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書（その5 人工胃液及び人工腸液に対するシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの消化性）（社内文書）
8. 日食研究報告書（2021）*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書（その6 加熱処理によるシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの抗原抗体反応への影響）（社内文書）
9. 日食研究報告書（2021）*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書（その7 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼのアレルギー誘発性に関する調査）（社内文書）
10. 日食研究報告書（2021）*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書（その2 *Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株の作製）（社内文書）
11. 日食研究報告書（2021）*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書（その8 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ製剤中の抗生物質耐性遺伝子及びその遺伝子産物の含有量）（社内文書）
12. 日食研究報告書（2021）*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書（その9 ゲノム DNA 上のクロラムフェニコール耐性遺伝子およびその周辺

配列のシーケンス解析と ORF 検索) (社内文書)

13. 日食研究報告書 (2021) *Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書 (その 3 T2-CDA の調製) (社内文書)