

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 JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼに係る食品健康影響評価（令和 4 年 9 月 27 日付け厚生労働省発生食 0927 第 1 号）については、令和 4 年 10 月 24 日に開催された第 229 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. JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダ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 5 年 1 月 24 日（火）開催の食品安全委員会（第 886 回会合）の翌日の令和 5 年 1 月 25 日（水）から令和 5 年 2 月 23 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

JPAo009 株を利用して生産された
グルコースオキシダーゼ

令和5年（2023年）1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.....	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.....	8
1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項.....	8
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.....	9
1. 名称及び由来に関する事項.....	9
2. 性質に関する事項.....	9
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.....	10
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.....	12
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.....	13
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	13
第 5. 組換え体に関する事項.....	13
1. 宿主との差異に関する事項.....	13
2. 遺伝子導入に関する事項.....	13
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.....	14

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	14
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	15
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	15
2. 組換え体の残存に関する事項	15
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	15
4. 精製方法及びその効果に関する事項	15
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	15
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	15
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	15
<参照>	16

<審議の経緯>

2022年9月27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0927第1号）、関係書類の接受

2022年10月4日 第874回食品安全委員会（要請事項説明）

2022年10月24日 第229回遺伝子組換え食品等専門調査会

2023年1月24日 第886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>

中島 春紫（座長）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子 近藤 一成

岡田 由美子 佐々木 伸大

小野 道之 樋口 恭子

小野 竜一 藤原 すみれ

<第229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）

手島 玲子（岡山理科大学獣医学部食品衛生講座教授）

要 約

「JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Aspergillus niger* BO-1 株由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼである。本添加物は、グルコースを酸化し、D-グルクノ-1,5-ラクトン及び過酸化水素を生じる酵素であり、パン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、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、「JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」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)

名称：JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ

用途：パン製造時の品質向上

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 oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Aspergillus niger* BO-1 株由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼである。本添加物は、グルコースを酸化し、D-グルクノ-1,5-ラクトン及び過酸化水素を生じる酵素であり、パンの製造においてパン生地品質向上のために使用される。

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：グルコースオキシダーゼ (goxAN)

生産菌：*Aspergillus niger*

有効成分：グルコースオキシダーゼ

EC No.：EC 1.1.3.4

CAS No.：9001-37-0

(2) 製造方法

goxAN は、培養工程、ろ過等の製造工程を経た上で、製剤化される。

なお、生産菌と菌体成分は、ろ過や精製工程を経て除去される。

(3) 用途及び使用形態

グルコースオキシダーゼは、グルコースを酸化して D-グルコノ- δ -ラクトン (D-グルコノ-1,5-ラクトン) と過酸化水素に変換する酵素の総称である。

パンの製造において、グルコースオキシダーゼの一種である goxAN を添加することで、反応生成物である過酸化水素が酸化剤として働き、グルテンネットワーク形成が強化されるため、パン生地の粘弾性を向上する目的で製パン改良剤として使用されている。なお、製パン工程に添加する用途では、焼成工程における加熱により酵素反応は停止し、酵素は失活する。

(4) 摂取量

既存のグルコースオキシダーゼ製品が全て本添加物を用いた製品に置き換わり、全ての「パン類・菓子パン類」^aの製造に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は 8.7 µg TOS (Total Organic Solids) / kg 体重/日である。

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* IFO4177 株である。*A. oryzae* IFO4177 株は、清酒麴から分離された野生株である (参照 1)。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

グルコースオキシダーゼ (*goxAN*) 遺伝子の供与体は、*A. niger* BO-1 株である。アセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

goxAN 遺伝子は、グルコースオキシダーゼ (*goxAN*) をコードする。アセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子はアセトアミダーゼをコードし、選択マーカーに用いられた。

セルフクロニングに該当しない一部の遺伝子座では、オープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) 検索を行い、安全性を検討した (第 5-2-(2) 参照)。

goxAN/amdS 遺伝子発現カセットをプロトプラスト形質転換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、食品や食品用酵素の製造において、長年にわたり安全に使用されている。また、日本において、麴菌として味噌、醤油、醸造酒等の発酵食品の製造に広く用いられている (参照 2、3)。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. oryzae においては、アフラトキシンの産生は確認されていない。*A. oryzae* の中に、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株の報告がある (参照 4)。

^a 平成 30 年国民健康・栄養調査 (厚生労働省 2018 年)。第 5 表の 1 (食品群別摂取量 - 食品群, 年齢階級別, 平均値, 標準偏差, 中央値 - 総数, 1 歳以上)。穀類、小麦・加工品、パン類 (食品群番号 4) 及び菓子パン類 (食品群番号 5)。

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：未定（便宜上「新 goxAN 製品」という）

有効成分：グルコースオキシダーゼ（遺伝子組換え goxAN）

EC No.：EC 1.1.3.4

CAS No.：9001-37-0

(2) 製造方法

新 goxAN 製品は、JPAo009 株を生産菌として、培養、ろ過、製剤化等の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

新 goxAN 製品は、従来のグルコースオキシダーゼと同様に、パンの製造において、パン生地粘弾性を向上する目的で加工助剤として使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

新 goxAN 製品は、従来のグルコースオキシダーゼと同様に、グルコースを酸化する。

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

本添加物の有効成分である遺伝子組換え goxAN と従来の goxAN のアミノ酸配列は同一である。

(2) 組換え体と宿主

JPAo009 株と宿主との相違点は、JPAo009 株は *goxAN* 遺伝子が複数コピー導入されており、それによりグルコースオキシダーゼの高産生能を獲得している点及び *amdS* 遺伝子を導入している点である。

1 から 6 までより、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、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* IFO4177 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. oryzae は、病原性が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（以下「BSL」という。）1に相当する。（参照 5、6）

A. oryzae の中には、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株が報告されている。（参照 4）

A. oryzae 由来の酵素であるアルカリ性セリンプロテアーゼ及び TAKA アミラーゼは、アレルゲンデータベース^bに登録されている（参照 7）。これらは、産業用酵素として使用された際に吸入性アレルゲンとして報告されていることから、*A. oryzae* 由来の酵素が原因として報告されたアレルギーは、特定職種における高頻度のばく露に起因すると考えられる。一方、*A. oryzae* は、国内では、味噌、醤油、醸造酒等の製造において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誘発性と *A. oryzae* によるアレルギー誘発性との関連を否定できないことから、リスク低減のため、本菌を扱うときは、他の糸状菌と同様、孢子が飛散しないように十分気をつける必要がある。

以上のことから、適切な環境で扱われる限り、*A. oryzae* IFO4177 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. oryzae には、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はない。

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. oryzae には、病原性を有する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. oryzae 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* 並びにアフラトキシン産性能を有する *A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* が知られているが（参照 8）、IFO4177 株においてアフラトキシン生合成遺伝子は転写機能を失っている（参照 9、10）。

^b WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee

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pJPV046の作製には、*Escherichia coli*由来のプラスミドpUC19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pUC19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pUC19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pUC19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pUC19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

プラスミドpUC19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

*goxAN*遺伝子の供与体は、*A. niger* BO-1株である。*amdS*遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(2) 安全性に関する事項

*A. niger*は、食品や食品用酵素の製造において、長年にわたり安全に使用されている。

*A. nidulans*は、食経験は知られていない。*amdS*遺伝子は、選択マーカールとして長年にわたり利用されてきた実績を有する。

*A. niger*及び*A. nidulans*は、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、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又は合成方法に関する事項

goxAN 遺伝子は、*A. niger* BO-1 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により得られた。

amdS 遺伝子は、*A. nidulans* Glasgow 野生株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により得られた。

(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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *goxAN* 遺伝子

goxAN 遺伝子がコードする *goxAN* は、グルコースを酸化する。（参照 11）

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

A. niger BO-1 株のアレルギー誘発性の可能性を調べるため、文献検索^cを行った。その結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見

goxAN 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。*A. niger* BO-1 株由来のグルコースオキシダーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるため、文献検索^cを行った。その結果、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) 人工胃腸液に対する感受性

goxAN は、我が国において 15 年以上の使用実績があり、従来のグルコースオキシダーゼとアミノ酸配列が同じであることから、消化性試験は実施しなかった。

(b) 加熱処理に対する感受性

goxAN の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH5.0 の各温度帯で 30 分処理した後の活性を測定した。その結果、80℃の処理によって完全に失活することが示された。（参照 12）

^c PubMed（検索：2021年5月）

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

goxAN と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べるため、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、皮膚常在真菌であるマラセチア由来のアレルゲン (Mala s 12.0101) が検出されたが、接触をばく露経路とするアレルゲンであり、食物アレルゲンではない。一方、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。(参照 13)

詳細は、第 4-5-(2) に記載のとおりである。

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、選択マーカーとして使用された。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。

以上のことから、*goxAN* 及びアセトアミダ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

goxAN 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株の中性アミラーゼ II をコードする *na2* 遺伝子のプロモーター断片に、*A. nidulans* Glasgow 野生株のトリオースリン酸異性化酵素をコードする *tpi* 遺伝子のプロモーター断片を連結させた *na2/tpi* プロモーターである。*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* の *amdS* 遺伝子の野生型プロモーターである。(参照 14)

(2) ターミネーターに関する事項

goxAN 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である。*amdS* 遺伝子のターミネーターは、自身の野生型ターミネーターである。(参照 14)

(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

^d ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(The Food Allergy Research and Resource Program; FARRP, version 21) (検索: 2022 年 3 月)

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

プラスミド pUC19 に、*na2/tpi* プロモーター断片、*goxAN* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片及び *amdS* 遺伝子断片を挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV046 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

遺伝子導入用ベクター pJPV046 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 15)

(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

遺伝子導入用ベクター pJPV046 について、*goxAN* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子以外の ORF の有無を確認するため、全領域の 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までで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 167 個検出された。(参照 13)

次いで、上記の ORF と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べる目的で、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示すアレルゲンとして、マラセチア由来のアレルゲン (Mala s 12.0101)、ヤケヒョウダニ由来のアレルゲン (Der p 15.0102) 及びタイセイヨウサケ由来のアレルゲン (Sal s 6) が検出された。Mala s 12.0101 及び Der p 15.0102 は、それぞれ接触及び吸入をばく露経路とするアレルゲンである。Mala s 12.0101 は *goxAN* をコードする ORF と部分的に相同性を示したが、連続する 8 アミノ酸配列の一致はなかった。Der p 15.0102 と Sal s 6 は *goxAN* をコードする配列上の異なる読み枠で検出された。また、Sal s 6 は、I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖及び $\alpha 2$ 鎖タンパク質であり、魚類アレルゲンタンパク質に分類されるが (参照 15)、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。(参照 13)

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調べる目的で、NCBI データベース^eを用いて E-value $<1.0 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。その結果、1 個の ORF がデータベース中の既

^d ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (The Food Allergy Research and Resource Program; FARRP, version 21) (検索: 2022 年 3 月)

^e NCBI データベース (検索: 2022 年 3 月)

知のタンパク質と相同性を示したが、pJPV046 から *goxAN/amdS* 遺伝子発現カセットを制限酵素処理により調製した際に除去される pUC19 由来の配列に含まれる。(参照 13)

したがって、遺伝子導入用ベクターpJPV046 には、アレルギー誘発性及び毒性をコードする ORF が含まれる可能性は低いと考えられた。

(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、遺伝子導入用ベクターpJPV046 を制限酵素で消化して調製した *goxAN/amdS* 遺伝子発現カセットを含む全領域である。

(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pJPV046 の全塩基配列は、設計どおりに構築されていることが確認されている(参照 14)。この発現ベクターは大腸菌を用いて調製・精製されており、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

遺伝子導入用ベクターpJPV046 を制限酵素で消化して調製した *goxAN/amdS* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムへプロトプラスト形質転換法を用いて導入した。その結果、*goxAN/amdS* 遺伝子発現カセットは、宿主ゲノム上の任意の位置に、タンデムに複数コピー挿入されていると考えられる。(参照 16、17)

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pJPV046 は、アンピシリン耐性遺伝子を持つが、制限酵素消化により調製した消化断片には含まれない。このことは、シーケンス解析により確認している。

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

JPAo009 株は、*goxAN/amdS* 遺伝子発現カセットの挿入により *goxAN* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子が導入されている。

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

JPAo009 株の染色体上での pJPV046 の導入位置を確認する目的で、シーケンス解析を行った。その結果、1箇所 *goxAN* 遺伝子が挿入されたことを確認した(参照 18)。さらに、定量 PCR 法を用いてコピー数

を解析した結果、複数コピーの *goxAN* 遺伝子が導入されたことが確認された（参照 19）。また、挿入領域近傍の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) 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 の有無を調べる目的で、標的遺伝子導入座における挿入 DNA 並びにこれらの 5'近傍配列領域を含む領域及び 3'近傍配列を含む領域について、ORF 検索を行った（参照 20、21）。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までで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 58 個検出された。

次いで、上記の ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を調べる目的で、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示すアレルゲン及び連続する 8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは、いずれも検出されなかった。（参照 20、21）

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調べる目的で、NCBI データベース^eを用いて E-value $<1.0 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。その結果、データベース中の既知の毒性関連タンパク質と相同性を示した ORF は認められなかったことから、毒性を有する可能性は低いと考えられた。（参照 20、21）

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

新 *goxAN* 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利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

新 *goxAN* 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利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。また、本製品の原料は、Food Chemicals Codex 等の規格に適合している。

^d ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(The Food Allergy Research and Resource Program; FARRP, version 21)（検索：2022年3月）

^e NCBI データベース（検索：2022年3月）

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

従来の goxAN 製品は、日本では 15 年以上前から食品用加工助剤として用いられている。新 goxAN 製品は、2002 年から世界各国で販売されており、フランス及びカナダでは食品用加工助剤のポジティブリストに掲載されている（参照 22、23）。米国では、GRAS として認証されている（参照 24）。

2. 組換え体の残存に関する事項

新 goxAN 製品中に組換え DNA が残存しないことを PCR 分析により確認した。（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

遺伝子組換え goxAN の製品化前の酵素サンプルは、食品衛生法の規格基準を満たしている。（参照 26）

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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

遺伝子組換え goxAN は、生産菌の培養物が、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製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

遺伝子組換え goxAN 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

「JPAo009 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」について、「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. 坂口謹一郎, 山田浩一: 麹菌の形態と其の分類に就て (其の1)。日本農芸化学会誌 1944 ; 20(1): 65-73
2. Wood BJB. Oriental Food Uses of *Aspergillus*. In: Smith JE, Pateman JA (editors). The British Mycological Symposium. London: Academic Press; 1977. 481-498
3. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol. 1992; 36(5): 569-72
4. Frisvad JC, Møller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. Appl Microbiol Biotechnol. 2018;102(22):9481-9515
5. 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」 [accessed July 1, 2021]
6. 国立感染症研究所病原体等安全管理規定 (改定第三版) [accessed May 31, 2021]
7. WHO/IUIS Allergen Nomenclature. Search Results with *Aspergillus oryzae* from Allergen Nomenclature.
8. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. Food Technology and Biotechnology 2003; 41 (1) : 29-36
9. Tominaga M, Lee YH, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O et al. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. Appl Environ Microbiol 2006;72(1):484-490.
10. Kusumoto K, Nogata Y, Ohta H. Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. Curr Genet 2000;37(2):104-111.
11. 食品用酵素データ集—取り扱い手法と実践— : 株式会社シーエムシー出版 ; 2013年7月31日
12. Analytical method for temperature and pH activity profile and

- temperature stability of glucose oxidase (社内文書)
13. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV046 on the genome of JPAo009 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
 14. 遺伝子導入ベクターpJPV046のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
 15. Kalic T, Kamath SD, Ruethers T, Taki AC, Nugraha R et al. Collagen—An Important Fish Allergen for Improved Diagnosis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2020;8(9):3084-3092.e3010
 16. 五味勝：カビの形質転換系の開発とその利用。化学と生物1990；28: 91-100
 17. Kelly JM, Hynes MJ. Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 1985;4(2):475-479
 18. JPAo009 株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
 19. Copy number determination of the *goxAN* gene in the GM production strain (社内文書)
 20. 社内文書8. Sequence homology of ORFs in the 5'flanking region of the insertion on the genome of JPAo009 to toxin proteins from NCBI and allergens
 21. Sequence homology of ORFs in the 3'flanking region of the insertion on the genome of JPAo009 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
 22. 仏国の食品用加工助剤ポジティブリスト
<https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000271061>
[accessed Dec18, 2020]
 23. List of Permitted Food Enzymes (Lists of Permitted Food Additives)
<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/5-enzymes.html> [accessed May 11, 2020]
 24. FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS) Notice Inventory.
https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=
[accessed May 11, 2020]
 25. Absence of residual DNA in the product (社内文書)

26. Characterization of Representative Batches and Toxbatch from
JPAo009 (社内文書)