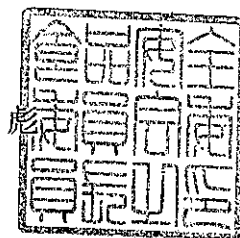




府食第312号
平成19年3月29日

厚生労働大臣
柳澤 伯夫 殿

食品安全委員会
委員長 見上



食品健康影響評価の結果について

平成15年10月30日付け厚生労働省発食安第1030002号をもって貴省から当委員会に対し意見を求められた添加物「SPEZYME FRED™」（申請者：ジェネンコア協和株式会社）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ものと判断しましたので通知します。

なお、審議結果については、別添のとおりです。

遺伝子組換え食品等評価書

SPEZYME FRED™

2007年3月

食品安全委員会

目 次

	頁
審議の経緯	1
食品安全委員会委員名簿	1
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	1
遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物 SPEZYME FRED™ に係る食品健康影響 評価に関する審議結果	2
. はじめに	2
. 評価対象添加物の概要	2
. 食品健康影響評価	2
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	2
1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料	2
2 宿主及び導入 DNA	3
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	3
4 宿主の構成成分等に関する資料	3
5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	3
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	4
第2 宿主に関する事項	5
1 分類学上の位置付け(種名(学名)・株名等)等に関する事項	5
2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項	5
3 寄生性及び定着性に関する事項	5
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	5
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	5
第3 ベクターに関する事項	6
1 名称及び由来に関する事項	6
2 性質に関する事項	6
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	6
1 挿入 DNA の供与体に関する事項	6
2 挿入 DNA 又は遺伝子(抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。)及びその遺伝子産物 の性質に関する事項	7
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	7

4	ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	8
5	構築された発現ベクターに関する事項	8
6	DNA の宿主への導入方法に関する事項	8
7	抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	9
第 5	組換え体に関する事項	9
1	宿主との差異に関する事項	9
2	遺伝子導入に関する事項	9
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	9
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	9
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	9
第 7	遺伝子組換え添加物に関する事項	9
1	諸外国における認可、食用等に関する事項	10
2	組換え体の残存に関する事項	10
3	製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	10
4	精製方法及びその効果に関する事項	10
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	10
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る事項	10
	評価結果	11
	参考文献	11

審議の経緯

平成15年10月30日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性の審査に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の受理
平成15年11月6日	第18回食品安全委員会（事項説明）
平成16年5月24日	第13回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成16年9月17日	第17回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成18年10月17日	第41回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成18年12月18日	第43回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成19年1月16日	第44回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成19年2月15日	第178回食品安全委員会（報告）
平成19年2月15日～3月16日	国民からの意見・情報の募集
平成19年3月26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へ報告
平成19年3月29日	第184回食品安全委員会（報告） 同日付で食品安全委員会委員長から厚生労働大臣へ通知

食品安全委員会委員

平成18年6月30日まで	平成18年12月20日まで	平成18年12月21日から
委員長 寺田雅昭	委員長 寺田雅昭	委員長 見上 彪
委員長代理 寺尾允男	委員長代理 見上 彪	委員長代理*1 小泉直子
小泉直子	小泉直子	長尾 拓
坂本元子	長尾 拓	野村一正
中村靖彦	野村一正	畑江敬子
本間清一	畑江敬子	本間清一
見上 彪	本間清一	

* 1:平成19年2月1日から

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

座長 早川堯夫	
座長代理 澤田純一	
五十君静信	手島玲子
池上幸江	丹生谷博
今井田克己	日野明寛*2
宇理須厚雄	室伏きみ子
小関良宏	山川隆
橘田和美*1	山崎壮
澁谷直人	渡邊雄一郎

* 1：橘田専門委員は平成18年10月1日から

* 2：日野専門委員は平成18年7月31日まで

遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物 SPEZYME FRED™ に係る 食品健康影響評価に関する審議結果

はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、改良型 α -アミラーゼ(以下「SPEZYME FRED™」という)の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。(平成 15 年 10 月 30 日、関係書類を受理)

評価対象添加物の概要

品 目 : SPEZYME FRED™
性 質 : 生産性向上
申請者 : ジェネンコア協和株式会社
開発者 : ジェネンコア・インターナショナル・インク(米国)

遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物 SPEZYME FRED™ は、 α -1,4-グルカン結合の加水分解に用いられる。この酵素は、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プルラナーゼと併用することにより、産業用のでん粉処理の条件の下で、でん粉を効率良く加水分解することができ、マルトデキストリン、マルトース、グルコース等のでん粉加水分解物及び異性化糖等の生産に用いられる。

SPEZYME FRED™ は、食品用 α -アミラーゼの生産菌として従来から使用されてきた *Bacillus licheniformis* に、*B. licheniformis* BRA7 株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子(以下「FRED 遺伝子」という)を導入することにより、 α -アミラーゼの生産性を高めたものであり、低 pH 域での熱安定性が向上し、カルシウム依存度が低くなっている。

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

名称 : α -アミラーゼ (既存添加物番号: 既存 - 20)
基原 : 特定の糸状菌、細菌、放線菌
有効成分 : α -アミラーゼ

IUB 分類命名法による系統名、EC 番号、CAS 番号及び EINECS 番号は以下のとおり。

IUB 分類名	: α -アミラーゼ
系統名	: 1,4- α -D-Glucan glucohydrolase
EC No.	: 3.2.1.1
CAS No.	: 9000-90-2
EINECS No.	: 232-565-6

(2) 製造方法

昭和 50 年ごろまでは、*Bacillus subtilis* や *Bacillus amyloliquifaciens* 由来の α -アミラーゼが利用されていたが、その後、耐熱性に優れている *B. licheniformis* の α -アミラーゼが広く使用されるようになってきた。製造方法は、発酵工程、回収及び精製工程、製剤化工程があり、商品化される。

生産菌を培養後、培養液をろ過し生産菌を除去後、濃縮し、製剤化する。

なお、生産菌は製造工程において 0.2 μm フィルターでろ過・除菌される。

(3) 用途及び使用形態

α -アミラーゼは、ブドウ糖・異性化糖などを製造する前処理としてのでん粉の液化に使用される。その典型的な使用量は、でん粉乾物に対し 0.04~0.08% である。

(4) 摂取量

α -アミラーゼは、でん粉の加水分解工程において使用されるが、加水分解物中の α -アミラーゼはイオン交換樹脂等で精製中に除去され、最終製品中には残存しない。

2 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名(学名)、株名等及び由来

宿主菌は、*B. licheniformis* BRA7 株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

供与体は、宿主菌と同じ *B. licheniformis* BRA7 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

挿入 DNA は、*B. licheniformis* BRA7 株由来の *FRED* 遺伝子であり、*B. licheniformis* BRA7 株由来のプロモーターとターミネーターを持つ。相同組換えにより宿主の染色体に組み込まれる。

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 1972 年以降、 α -アミラーゼの発酵生産に安全に用いられてきた歴史がある。同菌の食品用酵素生産菌としての安全性は確立されており(参考文献 1,2)、その組換え体は世界的に GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice:優良工業製造規範)の基準に合致していると認められている。産業上有用なタンパク質の遺伝子クローニング及び発現に関しても、いくつかの報告がある。(参考文献 3,4,5,6)

4 宿主の構成成分等に関する資料

一般に *B. licheniformis* 由来の組換え体は、世界的に GILSP の基準に合致していると認められており、人、動物、植物に非病原性で、有害生理活性物質の生産の報告もない。(参考文献 7)

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

製品名： SPEZYME FRED™

有効成分： -アミラーゼ

IUB 分類命名法による系統名、EC 番号、CAS 番号及び EINECS 番号は以下の通りである。

IUB 分類名	: -アミラーゼ
系統名	: 1,4- -D-Glucan glucanohydrolase
EC No.	: 3.2.1.1
CAS No.	: 9000-90-2
EINECS No.	: 232-565-6

(2) 製造方法

SPEZYME FRED™ は、遺伝子組換え技術により改変された *B. licheniformis* BML730 株を生産菌として製造される。製造方法は、通常の方法と同様であり、発酵工程、回収工程、製剤化工程の各工程を経て商品化される。

なお、生産菌である BML730 株は製造工程において 0.2 μm フィルターでろ過・除菌される。

(3) 用途及び使用形態

SPEZYME FRED™ は、通常の -アミラーゼと同様、ブドウ糖・異性化糖などを製造する際の前処理であるでん粉の液化工程に用いられるが、SPEZYME FRED™ は、低 pH 領域での熱安定性の向上、低カルシウム濃度での生産性の向上を目的として開発されており、このような条件下で使用される。

SPEZYME FRED™ を含み、規格に適合するように調製された FRED 製剤(以下「FRED」という)の一般的な使用量は、でん粉乾物に対し 0.04 ~ 0.08%(w/w)である。FRED は、ブドウ糖、異性化糖などの製造中にイオン交換樹脂等で精製中に除去されるため、最終製品中には残存しない。

なお、SPEZYME FRED™ は、高耐熱性酵素であることから、本酵素が食品中に残存する可能性のあるパン、ビール、清酒の製造に使用されることは、ほとんどないと考えられる。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

SPEZYME FRED™ は、従来の添加物である -アミラーゼ(SPEZYME AA)と比べ、低 pH 域での熱安定性が向上し、カルシウム依存度を低下させた -アミラーゼである。

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

SPEZYME FRED™ は、野生型 -アミラーゼ(SPEZYME AA)に比べ、10 個の塩基(4 個のアミノ酸残基)が置換されている点が異なっている。また、SPEZYME FRED™ では低 pH 域での熱安定性が向上し、カルシウム依存度が低くなっている点が相違点である。

(2) 組換え体と宿主

生産菌である BML730 株は、SPEZYME FRED™ の産生性を新たに獲得している点が相違点である。

以上 1 ~ 6 より、SPEZYME FRED™ 及び生産菌である BML730 株と比較対象となり得る既存の添加物及

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)等に関する事項

宿主菌は Bacillaceae 科 *Bacillus* 属の *licheniformis* BRA7 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 は広く自然界に存在し、土壌、海水、淡水、乾燥食品、香辛料、豆類、コンポスト等に見られる。ヒト、動物又は植物に対して非病原性であると認められており、植物の疾病又は作物への病害に関連するという報告はされていない(参考文献7)。

B. licheniformis の安全性は最近レビューされており、文献上安全な食品用酵素の生産菌として受け入れられている。(参考文献2)。また、*B. licheniformis* は、Bergey's Manual、ATCC 等の菌株リストに病原性を有するという記載はされていない。

宿主菌である *B. licheniformis* BRA7 株は、ジェネンコア・インターナショナルにおいて1989年以来、 α -アミラーゼの生産に用いられている古典的な工業用菌株である。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis について、米国環境庁(EPA)の「最終結論報告書:TSCA セクション5(H)(4) *Bacillus licheniformis* における免除事項」(Final Decision Document: TSCA Section 5(H)(4) Exemption for *Bacillus licheniformis*)の9ページの「セクションC:危険性の概要」で、*B. licheniformis* について有害の可能性を検討した結果、*B. licheniformis* がヒトや動物に対して「明らかな病原体」ではなく、ヒトや環境に重大な危害を及ぼさないことを明確に述べている。

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

宿主菌である *B. licheniformis* BRA7 株に、病原性の外来因子が存在しないことを示すために、プラスミドDNAの存在についてBRA7株とBML7株(BRA7株にプラスミドpBS7を持たせた株)について、抗生物質を入れずに培養を行った結果、BML7株についてはプラスミドの存在が確認されたのに対し、BRA7株については検出限界(10ng)を超える量のプラスミドは検出されなかった。

また、BRA7株のファージの有無について各種指標菌(ATCC9945A, ATCC11946, BG283, W23)を用いてプラーク形成能及び形質導入能の検定を行った結果、BRA7株にプラーク形成能及び形質導入能は認められなかったが、SP15ファージに感染させたBRA7株にプラーク形成能及び形質導入能が認められたことから、BRA7株はSP15ファージを持たないことが確認され、その他のファージも存在しないことが示唆された。

以上の結果から、プラスミド及びファージも存在しないことが、確認された。

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

EPAの「最終結論報告書:TSCA セクション5(H)(4) *Bacillus licheniformis* における免除事項」(Final Decision Document: TSCA Section 5(H)(4) Exemption for *Bacillus licheniformis*)の「付属文書 -*Bacillus licheniformis* のリスク評価の最終報告書」(Attachment -Final Risk Assessment of *Bacillus licheniformis*)において、*B. licheniformis* が *Bacillus* 属の中で病原性

を有する *B. anthracis* 及び *B. cereus* から区別されたことが明記されている。また、この報告書中の有害性評価では、この菌株に関して病原性が多角的に検討され、「ヒトに対し病原性を有さず毒性もない。(*B. anthracis* や *B. cereus* などの) 関連菌株と容易に区別できる」と結論づけている。

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

FRED 遺伝子導入のために利用されたベクターは、*B. licheniformis* 由来の pre6-2 である。

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

pre6-2 の塩基数及び塩基配列は明らかとなっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

pre6-2 の制限酵素切断地図は明らかとなっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

pre6-2 の機能、構造及び性質は明らかであり、既知の有害塩基配列を含むという報告はない。

(4) 薬剤耐性に関する事項

pre6-2 は、クロラムフェニコール耐性遺伝子 *CAT* 遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子 *kan* 遺伝子を持つが、これらの薬剤耐性遺伝子の形質に有害性は報告されていない。SPEZYME FRED™ の生産菌である BML730 株には、宿主菌である BRA7 株由来の *CAT* 遺伝子のみが残存する。

(5) 伝達性に関する事項

pre6-2 は、接合遺伝子がないため、伝達性はない。

(6) 宿主依存性に関する事項

pre6-2 が増殖可能な宿主は、このベクターが保持する複製開始点 (pUC ori) の起源から、*Escherichia coli*、*Bacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Geobacillus* 属、*Saccharomyces* 属、*Candida* 属、*Aspergillus* 属と広範囲にわたるが、組換え体株 BML730 には、pre6-2 上に存在する *CAT* カセット領域以外のベクター配列は残存しないため、ベクター上の遺伝子が他の宿主で増殖する可能性はない。

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

FRED 遺伝子は、*B. licheniformis* BRA7 株由来である。

(2) 安全性に関する事項

供与体である *B. licheniformis* BRA7 株は、第 2.2 に記述したとおり、ヒトに対する有害性等は知

られていない。

2 挿入 DNA 又は遺伝子(抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。)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

FRED 遺伝子は、供与体である *B. licheniformis* BRA7 株からクローニングされ、部位特異的突然変異法により 10 塩基を変異させた。このうち、5 塩基が 4 アミノ酸残基の変異を引き起こし、残る 5 塩基は、サイレント変異である。この 4 アミノ酸残基の変異により、低 pH 域での熱安定性が向上し、カルシウム依存度が低くなった α -アミラーゼが得られた。

(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

FRED 遺伝子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となっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

FRED 遺伝子は、低 pH 域での熱安定性が向上し、カルシウム依存度が低下した α -アミラーゼを産生させる。

SPEZYME FRED™ は、でん粉処理において、炭水化物の α -1,4-グルカン結合の加水分解に用いられるが、イオン交換樹脂等で精製中に除去される。ELISA 法により最終製品中の SPEZYME FRED™ を確認したところ、検出(検出限界 8ng/g)されなかった。

α -アミラーゼには Baker's asthma (パン屋喘息) のアレルゲンとしての報告があること及び SPEZYME FRED™ はアミノ酸置換が行われていることから、これのアレルギー誘発性について、既知アレルゲンとの相同性検索を行った。

1) 連続する 6 アミノ酸との検索結果について

SPEZYME FRED™ について、連続する 6 アミノ酸の領域で検索した結果、ダニ抗原、ナガハグサ成分、ラテックス成分、*Aspergillus* 属リボゾームタンパク質と一致する部分が確認されたが、これらの箇所はいずれも、野生型 α -アミラーゼにも存在する配列であった。

2) 連続する 80 アミノ酸残基との検索結果について

SPEZYME FRED™ について、連続する 80 アミノ酸残基について、35%以上相同性のある既知アレルゲンを検索した結果、この条件を満たすアレルゲンは存在しなかった。

以上の 1) 及び 2) から総合的に判断し、SPEZYME FRED™ は野生型 α -アミラーゼ(SPEZYME AA) と比較して、変異を導入したことによるアレルゲン性の顕著な変化は予想されなかった。また、本製品は、1998 年以来諸外国で使用されているが 1 件もアレルギー誘発の報告実績がないことから、SPEZYME FRED™ については、アレルギーを誘発する可能性は低いと判断される。

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

FRED 遺伝子カセットに使用したプロモーターは、宿主菌である *B. licheniformis* BRA7 株に内在

するプロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

FRED 遺伝子カセットに使用したターミネーターは、宿主菌である *B. licheniformis* BRA7 株に内在するターミネーターである。

(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

プロモーター、ターミネーターとも宿主菌である *B. licheniformis* BRA7 株由来であり、発現制御に関わる新たな塩基配列は組み込まれていない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

FRED 遺伝子は、プロモーターとターミネーターを持つ遺伝子断片（発現カセット）として発現ベクター上に構築されている。

実際には、*FRED* 遺伝子発現カセットを持つ発現ベクターを用いて、相同組換えにより組み込んでいる。

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

構築された発現ベクター pAmyAmp 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となっている。

(2) 目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームに関する事項

構築された発現ベクターには、生産菌である BML730 株で発現するものとしては、*FRED* 遺伝子と、宿主由来の *CAT* 遺伝子がある。発現ベクター pAmyAmp には、カナマイシン耐性遺伝子 *kan* が存在するが、本抗生物質耐性遺伝子は、生産菌である BML730 株には導入されていないことが確認されている。

(3) 発現ベクター上の意図する挿入領域に関する事項

発現ベクター上での *FRED* 遺伝子とプロモーター及びターミネーターから成る発現カセットは、両端に宿主由来の相同組換え部位を持つ。この相同組換え部位によって挟まれる発現カセット領域が意図する挿入領域であり、挿入部分の発現ベクター上での位置は明らかとなっている。

(4) 挿入遺伝子の純化に関する事項

発現ベクターの構築に用いた、挿入しようとする DNA 断片は全て純化されたものであり、その配列は明らかとなっている。

6 DNA の宿主への導入方法に関する事項

発現ベクターを接合法により宿主菌である BRA7 株の改良株である BML612 株に導入し、目的の *FRED* 遺伝子発現カセットを、相同組換えにより染色体の特定の遺伝子座に導入した。

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

発現ベクターpAmyAmpには、カナマイシン耐性遺伝子 *kan* が存在するが、本抗生物質耐性遺伝子は、生産菌である BML730 株には導入されていない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

生産菌である BML730 株は、SPEZYME FRED™ の産生性を新たに獲得しているほか、野生型 α -アミラーゼ産生性、野生型クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ産生性、孢子形成性を欠失している。

これら形質の違いは、組換え体と宿主の非病原性、毒素及び有害生理活性物質の非生産性に影響しないと考えられる。

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

宿主である BRA7 株の改良株である BML612 株に導入される *FRED* 遺伝子の塩基数及び制限酵素切断地図は明らかとなっている。

(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

宿主に挿入される DNA 断片に存在する ORF を 200bp 以上の領域で検索したところ、16 個の ORF が見つかった。これらの ORF のアミノ酸配列について、BLAST Ver. 2.2.12 の blastp を使用し既知配列との同源性検索を行った結果、*B. subtilis* のアデノシンデアミナーゼに相同な配列が 2 箇所見つけたが、これは宿主である *B. licheniformis* にもあり、有害なタンパク質をコードする ORF でない。

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

SPEZYME FRED™ の製造原料及び製造器材は、いずれもこれまで問題のない信頼できるものを使用しており、また、ジェネンコア・インターナショナルの生産設備を含む製造工程は IS09001 適合の認証を受けている。(参考文献 8)

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

製造原料はいずれもこれまで食品グレード又は使用目的に適していると判断された材料であり、食品衛生法上使用が認められている食品添加物、また食品化学物質コーデックスの基準が存在するものは、これに適合しているものを使用している。製造器材も食品用酵素製造に使用の実績があり、安全に問題のないものを用いている。製造過程も IS09001 に準拠している。

以上、1、2 から、SPEZYME FRED™ の製造において安全性上問題はないものと考えられる。

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

SPEZYME FRED™は、米国、ヨーロッパ等世界各国において使用されており、ベルギー、フランス、韓国での使用許可認定が得られている。(参考文献 9,10,11,12)

また、米国において、ジェネンコア・インターナショナルが提出した SPEZYME FRED™に関する資料について食品安全性の専門家が検討した結果、*B. licheniformis* から得た α -アミラーゼが GRAS(Generally Recognized as Safe)に該当すると結論している。(参考文献 13)

2 組換え体の残存に関する事項

FRED は製造工程において 0.2 μm フィルターでろ過・除菌されることから、FRED 中には生産菌である BML730 株の残存はないと考えられる。FRED における生産菌混入確認試験を行ったところ、生産菌である BML730 株の存在は検出限界 (1 CFU/ml) 以下であった。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

FRED の製造工程に由来する非有効成分は、発酵過程より生産される非有効成分及び生産菌である BML730 株の代謝生産物が考えられるが、いずれについても安全性が確認されている。

4 精製方法及びその効果に関する事項

FRED は、培養液処理、一次ろ過及び UF 濃縮工程を経て製剤化される。この工程を経た酵素濃縮物中には生産菌である BML730 株及びその他の培地組成に由来する不溶性物質は存在しない。

従って、FRED の製造・精製工程は明らかであり、原材料にも一般に有害物質が混入するとは考えがたい。

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

本製品の製造に用いられる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、本製品の製品規格は、JECFA 及び米国 Food Chemicals Codex(第 5 版)の食品酵素規格を満たしている。

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

以上、第 2 から第 7 までにより安全性の知見が得られており、次に示された試験は必要ないと判断される。なお、ラットを用いた 91 日間経口毒性試験で毒性を示さないこと、また、細菌復帰突然変異原性試験、哺乳類染色体異常試験で変異原性、染色体異常誘発性を持たないことが明らかとなっている。

1 急性毒性に関する試験

2 亜急性毒性に関する試験

3 慢性毒性に関する試験

4 生殖に及ぼす影響に関する試験

5 変異原性に関する試験

6 がん原性に関する試験

7 その他必要な試験 (腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等)

評価結果

-アミラーゼ SPEZYME FRED™ 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」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ものと判断された。

参考文献

- 1 FDA. § 184.1027 Mixed carbohydrase and protease enzyme product. *Code of Federal Regulations*, (1996)21:441-442.
- 2 de Boer AS, Priest E, Diderichsen B. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1994)40:595-598.
- 3 Yuuki T, Nomura T, Tezuka H, Tsuboi A, Yamagata H, Tsukagoshi N, Udaka S. Complete Nucleotide Sequence of a Gene Coding for Heat- and pH-Stable α -Amylase of *Bacillus licheniformis*: Comparoson of the Amino Acid Sequences of Three Bacterial Liquefying α -Amylases Deduced from the DNA Sequences. *J. Biochem.* (1985)98:1147-1156.
- 4 Henkel. Hybridplasmid for Expression of Subtilisin Carlsberg in *Bacillus*. *Patent Application* DE 3821491, Germany, (1988).
- 5 Henkel. *Genetic Modifications Improve Production of New Detergent Enzyme (Subtilisin from B. lentus Expressed in B. licheniformis)*. Genetic Technology News 10, 1990
- 6 van Leen RW, Bakhuis JG, van Beckhoven RFWC, Burger H, Dorssers LCJ, Hommers RWJ (Gist Brocades). Production of Human Interleukin-3 Using Industrial Microorganisms. *Bio/Technol.* 9:47-52, 1991
- 7 Bradbury JF. *Bacillus. Guide to Plant Pathogenic Bacteria.* (1986)18-33.
- 8 FRED 製造工場の ISO 認証
- 9 FRED のセルフクローニング認定書 (ベルギー)
- 10 FRED の Class 組換え微生物該当証明書 (ベルギー)
- 11 FRED のセルフクローニング認定通知 (フランス)
- 12 FRED のセルフクローニング証明書 (韓国)
- 13 SPEZYME FRED の GRAS 認定通知 (アメリカ)