



府食第1020号

平成17年10月13日

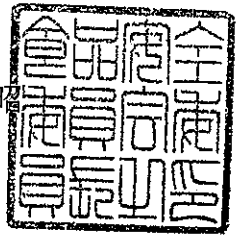
厚生労働大臣

尾辻 秀久 殿

食品安全委員会

委員長 寺田

雅昭



食品健康影響評価の結果について

平成16年8月12日付け厚生労働省発食安第0812001号をもって貴大臣から当委員会に対し意見を求められた食品の安全性のうち、「 α -アミラーゼ LE399」(ノボザイムズジャパン株式会社)に係るものについては「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

- アミラーゼ LE399

2005年10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
- アミラーゼ LE399 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
. 評価食品の概要	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遺伝子組換え体との相違	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	4
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)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	5
1 名称及び由来に関する事項	5
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	8
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	9
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機材に関する事項	10
1 添加物の製造原料又は製造機材としての使用実績があること	10
2 添加物の製造原料又は製造機材としての安全性について知見が得られていること	10
第7 遺伝子組換え添加物に関する事項	10
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	11
4 精製方法及びその効果に関する事項	11
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	11
第8 第2から第7までにより安全性の知見が得られていない場合に必要事項	11
評価結果	12
参考文献	12

審議の経緯

平成16年8月12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、関係書類の接受
平成16年8月19日	第58回食品安全委員会（事項説明）
平成16年8月26日	第16回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年3月11日	第24回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年4月25日	第26回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年9月1日	第108回食品安全委員会（報告）
平成17年9月1日～10月3日	国民からの意見・情報の募集
平成17年10月12日	遺伝子組換え食品等専門調査会から食品安全委員会委員長へ報告
平成17年10月13日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣に通知

食品安全委員会委員

委員長	寺田雅昭
委員長代理	寺尾允男
	小泉直子
	見上彪
	坂本元子
	中村靖彦
	本間清一

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

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

遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物 - アミラーゼ LE399 に係る食品健康影響評価

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、 - アミラーゼ LE399 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 8 月 19 日、関係書類を接受)

評価対象添加物の概要

品 目 : - アミラーゼ (社内識別名 : LE399)
性 質 : 生産性向上
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)

遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物 LE399 は、endo 型の -アミラーゼであり、アミロースやアミロペクチン等の -1,4-D-グルコシド結合をランダムに加水分解し、デキストリンやオリゴ糖の生成反応を触媒する。食品分野では加工助剤として主にでん粉の加工に用いられる。

本 LE399 は、食品用 -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* 及び *Bacillus amyloliquefaciences* 由来の改変 -アミラーゼ遺伝子を導入することにより、 -アミラーゼの生産性を高めたものである。なお、LE399 は、*B. licheniformis* ATCC(The American Type Culture Collection)9789 由来の アミラーゼ (TMG アミラーゼ) を改良したもので、低 pH 域、低カルシウム濃度、高温下での安定性が高くなっている。

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 : -アミラーゼ (既存添加物番号 : 既存 - 2 0)

基原 : 特定の糸状菌、細菌、放線菌

有効成分 : -アミラーゼ

IUB 分類命名法による系統名及び酵素番号、並びに CAS 番号、EINECS 番号は以下のとおり。

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

なお、TMG アミラーゼは、「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」(平成 12 年 5 月 1 日付け生衛発第 825 号-1、厚生省生活衛生局長通知)に基づき、平成 13 年 3 月、厚生労働

省において安全性が確認されている。

(2) 製造方法

TMG アミラーゼは、遺伝子組換え技術により改変された *B. licheniformis* ATCC9789 系統株を用いて製造される。製造は、通常の方法と同様であり、「食品の製造、包装及び保管のための優良製造規範（食品 GMP）」（参考文献 1）に則って行われる。また、ISO9001 の品質システムにより管理されている。

なお、生産菌は精製工程で生産物より分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

TMG アミラーゼは、主にでん粉の加工（でん粉の液化）に用いられる。（参考文献 2、3）生成された液化でん粉はイオン交換処理等の精製工程、加熱濃縮処理等を経て製品化され最終食品に用いられるか、又はさらに糖化、異性化などの工程を経て精製され最終食品に用いられる。

(4) 摂取量

TMG アミラーゼは、食品の加工工程において加工助剤として使用される。最終食品であるシロップ中の TMG アミラーゼ残存量は、ELISA 法による測定では、検出限界以下であった。（参考文献 4）

2 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主菌株は、*B. licheniformis* ATCC9789 系統株から得られた孢子非形成突然変異株 DN2717 の改良株 SJ1707 である。SJ1707 株は、DN2717 の高アルカリ領域での安定的なプロテアーゼ生産能並びに -アミラーゼ生産能を欠失している。

(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* ATCC9789 系統株の孢子非形成突然変異株 DN2717 と *B. amyloliquefaciences* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

挿入 DNA は、*B. licheniformis* 及び *B. amyloliquefaciences* 由来の改変 -アミラーゼ遺伝子であり、*B. licheniformis* 由来の改良型プロモーターと野生型ターミネーターを持つ。二重交差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 は自然界に広く分布し、食品中にも存在している微生物であり、長期にわたり食品製造工程に使用された歴史を持つ。（参考文献 5）また、*B. licheniformis* ATCC9789 系統株は、1972 年以来、食品用 -アミラーゼの生産菌として使用されてきた実績がある。

4 宿主の構成成分等に関する資料

一般に *B. licheniformis* が、有害生理活性物質を生産するという報告はない。宿主である *B. licheniformis* ATCC9789 系統株は、1972 年以来、酵素の工業的生産に用いられてきた菌株である。また、OECD の GILSP 微生物基準(参考文献 6)を満たしている。

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： LE399 (社内識別番号)

有効成分： - アミラーゼ

IUB 分類命名法による系統名及び酵素番号、並びに CAS 番号、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
IUB No.	:	3.2.1.1
CAS No.	:	9000-90-2
EINECS No.	:	232-565-6

(2) 製造方法

LE399 は、遺伝子組換え技術により改変された *B. licheniformis* MOL399 を生産菌として製造される。(参考文献 7)製造は、通常の方法と同様であり、「食品の製造、包装及び保管のための優良製造規範(食品 GMP)」(参考文献 1)に則って行われる。また、ISO9001 の品質システムにより管理されている。(参考文献 8)

なお、生産菌 MOL399 は精製工程で生産物より分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

LE399 は、通常の - アミラーゼと同様、主にでん粉の加工(液化でん粉の製造)において、加工助剤(でん粉液化酵素)として使用される。(参考文献 2,9)

LE399 は、低 pH 領域における耐熱性の向上、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。

なお、仮に LE399 をでん粉の液化以外の、例えば、製パンや製菓の用途として用いた場合、工程で本酵素は失活しないことから、最終製品であるパンや菓子の形状が保たれず、メリットはないと考えられる。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

LE399 は、従来の添加物である TMG アミラーゼと比べ、低 pH 領域、低カルシウム濃度、高温下での安定性が改良されている - 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

LE399 は、従来の - アミラーゼである TMG アミラーゼに比べ、2 個のアミノ酸が欠損し、18 個のアミノ酸置換が新たに導入されている点が異なっている。また、LE399 では低 pH 領域、低力

ルシウム濃度、高温下における安定性が改良されている点が相違点である。

(2) 組換え体と宿主

本組換え体 MOL399 は、改良型 α -アミラーゼ (LE399) の産生性を新たに獲得し、宿主の C-プロテアーゼ産生性を欠失している点が相違点である。

以上 1 ~ 6 より、LE399 及び組換え体 MOL399 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) に関する事項

宿主は *Bacillaceae* 科 *Bacillus* 属の *licheniformis* ATCC9789 系統株から得られた孢子非形成突然変異株 DN2717 の改良株 SJ1707 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、一般に、多くの食品に通常的に存在する非病原性、非毒素産生性微生物とみなされており、有害生理活性物質の生産に関する報告はない。また、国立感染症研究所の「病原体等安全管理規程」(平成 15 年)によるバイオセーフティレベル分類では、レベル 1 の微生物であり、米国 NIH の Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules の定義ではリスクグループ 1 に分類される。

B. licheniformis ATCC9789 系統株は、1972 年以来、酵素の工業的生産に用いられてきた菌株である。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis は、食品用酵素の生産菌株として長期にわたり安全に使用されてきており、宿主菌株には寄生性や定着性はないと考えられる。

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

B. licheniformis ATCC 9789 系統株 SJ1707 は、宿主菌株として、GMP 等に則り管理されており、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。

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

米国 EPA の「Decision Document」によると、*B. licheniformis* と分類学的に非常に近い近縁株は、非病原性及び非毒素産生性とされている *Bacillus subtilis* や、*Bacillus pumilus* である。なお、毒性物質の生産が知られている *Bacillus cereus* とは分類学的に明確に区別されるとしている。

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

改良型 α -アミラーゼ (LE399) 遺伝子導入のために利用されたベクターは、*Staphylococcus aureus* 由来の pE194、pUB110 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

pE194 の塩基数は 3,728bp であり、pUB110 の塩基数は 4,548bp であり、いずれの配列も L08862、M19465 として、European Molecular Biology Laboratory (EMBL) に登録されている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

pE194、pUB110 とともに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

pE194、pUB110 の機能、構造及び性質は明らかであり(参考文献 10)、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

pE194 は、*ermC* (メチラーゼ) 遺伝子を持ち、エリスロマイシンなどのマクロライド系抗生物質に対する耐性を付与する。pUB110 は *neo* 遺伝子を持ち、カナマイシンやネオマイシン耐性を付与する。なお、発現ベクターの発現カセットの部分のみが宿主の染色体遺伝子に導入されるため、本抗生物質耐性遺伝子を含むベクター部分は、いずれも LE399 生産菌には導入されていないことが確認されている。

(5) 伝達性に関する事項

pE194 並びに pUB110 は、*S. aureus* 由来のプラスミドであるが、広く *Bacillus* 属で複製可能であることが知られており、*Bacillus* 属菌へのクローニングベクターとして菌体内で安定的に用いられている。Britain's Health and Safety Commission のガイドラインでは、伝達性のない *B. subtilis* 用のベクターとして記載されている。(参考文献 11)

(6) 宿主依存性に関する事項

pE194 並びに pUB110 の複製開始配列は、グラム陽性細菌である *Staphylococcus* 属菌、*Bacillus* 属菌内で機能することが知られているが、それ以外の菌で機能することは知られていないことから、宿主依存性は高いと考えられる。

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

改良前の野生型 -アミラーゼ遺伝子は、*B. licheniformis* ATCC9789 系統株 DN2717 由来である。なお、本挿入遺伝子の N 末端側は、*B. amyloliquefaciens* 由来である。

(2) 安全性に関する事項

供与体 *B. licheniformis* ATCC9789 系統株 DN2717 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

改良前の野生型 -アミラーゼ遺伝子 *amyL* は、供与体である *B. licheniformis* ATCC 9789 系統株 DN2717 からクローニングし、さらに、*B. amyloliquefaciens* 由来の -アミラーゼから *amyQ* 遺伝子をクローニングし、これらの遺伝子を基に、位置特異的変異、ランダム変異の手法により、アミノ酸置換が導入された。（参考文献 12）

（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

-アミラーゼ（LE399）遺伝子の塩基数は 1,530bp である。また、その塩基配列と、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

-アミラーゼ（LE399）遺伝子は、低 pH 域、低カルシウム濃度、高温での安定性がより高い endo 型の -アミラーゼを産生させる。

LE399 はアミノ酸置換が施されており、また、TMG アミラーゼと ELISA inhibition Assay 法によるアフィニティ（生物学的親和性）に違いが見られた。このため、LE399 のアレルギー誘発性について、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」第 2 章、第 6 の 4 に従って、整理・考察した。

1）挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

供与体の *B. licheniformis* や *B. amyloliquefaciens* について、アレルギー誘発性があることは知られていない。

2）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

-アミラーゼは、一般的にアレルギー誘発性を持つとは考えられていないが、文献検索の結果、いずれも感作されたヒトが -アミラーゼを摂食したことでアレルギー反応が起こったとする数件の報告があった。（参考文献 13）

3）遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性に関する知見

人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

ペプシンを含む人工胃液（SGF）に LE399 を加え、0～60 分間処理したところ、LE399 は SGF 内で 15 秒後に完全に消化された。（参考文献 14）

人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

米国薬局方に基づく人工腸液（SIF）に LE399 を加え、0～4 時間処理したところ、LE399 は SIF 中で 4 時間後でも消化されなかった。（参考文献 15）

加熱処理

加熱処理による LE399 の抗体との結合能の変化を調べるため、異なった pH 条件（pH3.8、pH5.5）における加熱処理前後の抗体と LE399 の結合活性について ELISA 法を用いて測定したところ、30%基質の存在下では 95 /pH5.5 における結合能は 120 分処理後においても 84%残存し、比較的安定的であったが、95 /pH3.8 では 30 分処理後において検出限界（50ng/g）以

下になることが示された。(参考文献 16)

また、基質の非存在下では、95 /pH5.5 で 60 分、95 /pH3.8 で 30 分処理後に検出限界以下になることが示された。(参考文献 17)

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与するタンパク質を含む)との構造相同性

SWALL (SWISSPROT や TREMBL を含むデータベース)、ADFS (Allergen Database for Food Safety) 及び SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) の 3 つのデータベースを用いて、LE399 と既知のアレルゲンとの構造相同性を調べたところ、80 残基のウィンドウでスライドした結果では、唯一 Asp_o_21 と 35% 一致する配列が 2 か所見られたが、80 残基より広い相同性検索では、35% 一致する配列がなかった。(参考文献 18, 19, 20)

いずれのデータベースを用いて相同性検索をしても、連続する 8 個のアミノ酸配列が一致する箇所はみつからなかった。

以上の 1) ~ 4) から総合的に判断し、LE399 については、アレルギーを誘発する可能性は低と判断される。

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

LE399 遺伝子の発現に使用したプロモーターは、*B. licheniformis* ATCC9789 の DN2717 株の - アミラーゼ遺伝子由来の発現力を強化した改良型プロモーター *Pamy* である。(参考文献 21)

(2) ターミネーターに関する事項

ターミネーターは *B. licheniformis* ATCC9789 の DN2717 株の野生型 - アミラーゼ *amyL* の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 *B. licheniformis* ATCC9789 の DN2717 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 の組み込み方法に関する事項

LE399 遺伝子は、 - アミラーゼ改良型プロモーター *Pamy* と野生型 - アミラーゼのターミネーター *amyL* 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、LE399 遺伝子発現カセットを持つ発現ベクターを用いて、二重交差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

導入された遺伝子の構築された発現ベクターの名称、塩基配列並びに制限酵素による切断地図は明らかであり、用いた制限酵素の名称、断片の数・サイズなどが明らかとなっている。(参考

文献 12)

(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、宿主菌内で発現しうるものとして、LE399 遺伝子と、ベクター pE194 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子 *ermC* 並びにプラスミドの複製に関わる遺伝子 *pre* 及び *repF* のオープンリーディングフレームが存在する。本抗生物質耐性遺伝子は、いずれも LE399 生産菌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 LE399 遺伝子とプロモーター並びにターミネーターから成る発現カセットは、合成リンカーを介して両端に宿主染色体由来の二重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。(参考文献 22) 目的遺伝子以外の、機能や由来が不明な遺伝子の混入はない。

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 *B. licheniformis* ATCC9789 系統株 DN2717 の改良株である SJ5501 に導入し、目的の LE399 遺伝子発現カセットを、温度感受性の pE194 を利用した二重交差相同組換えにより染色体の特定の遺伝子座に導入した。

なお、得られた組換え体について、C-プロテアーゼ遺伝子の一部を二重交差相同組換えにより欠失させ、不活化させた。(参考文献 23,24)

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

発現ベクターには、pE194 由来のエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子並びに pUB110 由来のカナマイシン耐性遺伝子が含まれるが、いずれも二重交差相同組換え法を用いて目的の遺伝子を挿入するため、宿主の染色体には、抗生物質耐性マーカー遺伝子は挿入されていない。

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

組換え体 MOL399 は、改良型 - アミラーゼ LE399 の産生性を新たに獲得したほか、アルカリプロテアーゼ (Apr) 産生性、野生型 - アミラーゼ産生性、C-プロテアーゼ産生性を欠失している。

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

宿主に導入される LE399 遺伝子の塩基数は 1,530bp であり、その制限酵素切断地図は明らかとなっている。(参考文献 12)

(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

LE399 発現ベクターの挿入 DNA 断片には、*Bacillus* 内で働くプロモーターの下流に改良型 - アミラーゼ LE399 のオープンリーディングフレームが存在する。これ以外に *Bacillus* 内でタンパク質を発現するオープンリーディングフレームがこの DNA 断片により導入されるとは考えにくい。

なお、染色体の特定遺伝子座に遺伝子が挿入されたことは、サザンハイブリダイゼーション並びに染色体上の遺伝子座と挿入遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR 反応と PCR 断片の塩基配列解読により確認されている。(参考文献 25)

第6 組換え体以外の製造原料及び製造機材に関する事項

1 添加物の製造原料又は製造機材としての使用実績があること

発酵培地用原料は、社内品質システム (ISO9001 認証取得) (参考文献 8) に従って、受け入れ時に品質検査を行い、規格に合致していることを確認している。

製剤化に用いる原料は、いずれもノボザイムズ社で食品用酵素の製造に常用されているもの、あるいは長年用いてきた品質規格 FCC (Food Chemicals Codex) 等の規格に基づいて設定された社内規格に適合するものである。

また、発酵用器材は、ノボザイムズ社において、従来から食品用酵素剤の製造に使用されているものである。

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

添加物製造の個々の原料の社内規格は、米国 FCC 等の規格に基づいて設定している。また、社内品質システムに従って受入時に品質検査を行い、規格に合致していることを確認している。(参考文献 7)

また、製造器材は、これまで、食品用酵素の製造に長期間安全に用いられてきたものである。

本生産物は、これらの原料、機材を用い、食品 GMP (参考文献 1,7) に則って、従来の食品用酵素と同じ方法で製造され、ISO9001 の認証取得品質システムによって品質の確保がなされている。

以上、1、2 から、LE399 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

LE399 は、米国、ヨーロッパ諸国において 2002 年、販売が開始され、従来の - アミラーゼと同様、でん粉糖生産などの食品製造過程で加工助剤として使用されている。米国では 2001 年、GRAS (GRN000079) に認定 (参考文献 26) されている。フランス、デンマークでは、2003 年、食品用酵素 (でん粉加工用) としての許可を得ている。

2 組換え体の残存に関する事項

製品の規格項目として、生産菌の混入がないことを定め、製品中に生産菌の混入がないことを確認している。(参考文献 27)また、LE399 を用いて、組換え DNA の検出をドットプロットハイブリダイゼーション分析によって行ったところ、検出限界 0.1ngDNA/g で組換え DNA は検出されなかった。(参考文献 28)

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

LE399 は、製造に由来する有害物質成分として規定値を定めている JECFA の Compendium of Food Additive Specifications 及び FCC の Monograph on Enzyme Preparations に示されている要求事項を満たしている。(参考文献 27)

4 精製方法及びその効果に関する事項

LE399 の精製では、固液分離、UF ろ過、除菌ろ過等の精製・濃縮工程を経て製剤化される。(参考文献 7)この工程を経た酵素濃縮物中には組換え体である生産菌およ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。

これに加えて、LE399 は、JECFA ならびに FCC の食品用酵素剤に対する一般要求事項並びに追加の要求事項を満たしており、また、その製造は、食品用途での使用が認められている原料を用い、制御された発酵工程で食品 GMP に則り行われる。

従って、LE399 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食品用酵素の製造に使用されているものであり、生産物の純度規格値も従来と同じである。また、遺伝子組換え技術を用いて得られた生産菌により産生される本生産物の構成・成分の変動の範囲は、従来の酵素剤の変動の範囲と同じである。

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

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、本 -アミラーゼ酵素剤(培養後の精製・濃縮産物)を用いた毒性試験が、EU Scientific Committee for Food (SCF) の定める「食品用酵素の安全性評価ガイドライン(1991)」(参考文献 29)に従って行われており、変異原性試験(エームス・テスト)、染色体異常試験、ラットを用いた 13 週間経口毒性試験の結果、変異原性、染色体異常誘発性を持たないこと、また、試験条件下で経口毒性を示さないことが明らかとされている。(参考文献 7)

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 LE399 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. GMP-Statement (社内報告書):1999
2. Making sweeteners from starch (社内報告書):2002
3. Product sheet (社内報告書):2001
4. Termamyl residues in syrup samples (社内報告書):2003
5. IFBC (International Food Biotechnology Council) “Safety evaluation of foods and food ingredients derived from microorganisms”.Chapter 4 of Biotechnologies and Food: Assuring the Safety of Foods Produced by Genetic Modification *Regulatory Toxicology and Pharmacology* .(1990)12:S1-S196
6. OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) “Safety Consideration for Biotechnology, 1992” *OECD s report derestricted by OECD Council*(1991)
7. LE399 A Petition for approval of the use of an alpha-amylase expressed by *Bacillus licheniformis* carrying the protein engineered gene coding for an alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* (社内報告書):2002
8. ISO 9001:2000 Certificate (デンマーク標準協会)
9. Product Sheet and Application Sheet (社内報告書):2001
10. Villafane R,Bechhofer D,Narayanan CS,Dabanu D.Replication control of genes of plasmid pE194.*Journal of Bacteriology*(1987)169:4822-4829
11. Examples of host-vector systems and access factors (*Britain s Health and Safety Commission のHP*)
12. LE399 遺伝子の構築と発現ベクターの構成と構築(社内報告書)
13. Allergenicity of alpha-amylases in general(社内報告書):2005
14. Liquezyme X (LE399) in a Simulated Gastric Fluid (SGF) (社内報告書):2003
15. Digestion test of LE399 and HL1232 with Simulated Intestinal Fluid (SIF) (社内報告書):2004
16. Temperature stability of Liquezyme X with substrate (社内報告書):2005
17. Temperature stability of Liquezyme X(社内報告書):2005
18. Sequence homology between a PE *Bacillus licheniformis* alpha-amylase (LE399, Liquezyme) and known allergens where identical fragments of length 5, 6 or 7 are found(社内報告書):2004
19. Sequence alignment(社内報告書):2004
20. *Bacillus licheniformis* PE ・-amylase (LE399, Liquezyme) allergenicity assessment using “The Allergen Database for Food Safety (ADFS) database (社内報告書):2005
21. -アミラーゼ改変型プロモーターPamy の構築(社内報告書):2003
22. Expression cassettes integrated into the chromosome *LE399 Expression Cassette Integrated at the amyL Position*(社内報告書):2002
23. Construction of the recombinant strain and used plasmids (社内報告書):2002

24. LE399:生産菌株の構築 (社内報告書)
25. DNA sequencing of inserted genes (社内報告書):
26. Agency response letter GRASS Notice No.GRN00079 (*U.S. Food and Drug Administration(FDA) のHP*):2001
27. Certificate of analysis: LE399 (社内報告書):2002
28. ドットハイブリダイゼーション分析による組換え DNA の検出結果 (社内報告書):2001
29. EU Scientific Committee for Food.Reports of the scientific committee for food, 27th series.*Food science and techniques* (1991)