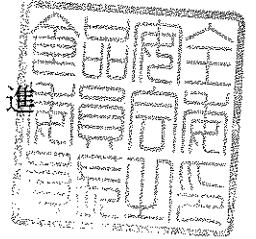




府食第865号
平成26年11月11日

厚生労働大臣
塩崎 恭久 殿

食品安全委員会
委員長 熊谷 進



食品健康影響評価の結果の通知について

平成25年4月10日付け厚生労働省発食安0410第1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「*Bacillus subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミラーゼ」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法(平成15年法律第48号)第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「*Bacillus subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミラーゼ」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、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

Bacillus subtilis MDT121 株を利用して生産
された α -アミラーゼ

2014年11月

食品安全委員会

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.....	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.....	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.....	11
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	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な事項	14
Ⅲ.	食品健康影響評価結果	14
<参照>		15

＜審議の経緯＞

- 2013年4月10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（厚生労働省発食安0410第1号）、関係書類の接受
- 2013年4月15日 第471回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2013年5月9日 第114回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年6月20日 第128回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年9月16日 第530回食品安全委員会（報告）
- 2014年9月17日から10月16日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2014年11月6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
- 2014年11月11日 第537回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣に通知）

＜食品安全委員会委員名簿＞

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森国敏（委員長代理）
石井克枝
上安平冽子
村田容常

＜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＞

2013年9月30日まで	2013年10月1日から	2014年4月1日から
澤田純一（座長）	澤田純一（座長）	澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）	鎌田 博（座長代理）	小関良宏（座長代理*）
五十君静信 手島玲子	小関良宏 手島玲子	宇理須厚雄 手島玲子
宇理須厚雄 中島春紫	宇理須厚雄 中島春紫	岡田由美子 中島春紫
橘田和美 飯 哲夫	橘田和美 飯 哲夫	橘田和美 飯 哲夫
児玉浩明 和久井信	児玉浩明 和久井信	児玉浩明 和久井信
澁谷直人	近藤一成	近藤一成

*2014年4月24日から

要 約

「*Bacillus subtilis* MDT121 株を利用して生産された α -アミラーゼ」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、 α -アミラーゼの品質を高めるために、*Bacillus subtilis* A164 Δ 5 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* C599 株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子を導入して作製した MDT121 株を利用して生産された α -アミラーゼである。本添加物は、グルコース重合体の α -1,4-結合を分解し、主にマルトースを生成させる酵素であり、パンの老化防止及びハイマルトースシロップ等のデンプン糖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、「*Bacillus subtilis* MDT121 株を利用して生産された α -アミラーゼ」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

品 目：*Bacillus subtilis* MDT121 株を利用して生産された α -アミラーゼ
用 途：グルコース重合体の α -1,4 結合の加水分解を触媒し、主にマルトースを生成させる酵素である。パンの老化防止及びハイマルトースシロップ等のデンプン糖の製造に使用される。

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、 α -アミラーゼの品質を高めるために、*Bacillus subtilis* A164 Δ 5 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* C599 株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子と *B. licheniformis* ATCC9789 株由来の分泌シグナル配列を融合させた *amyM62.7* 遺伝子を導入して作製した MDT121 株を利用して生産された α -アミラーゼである。

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：TS-25

基 原：*Geobacillus stearothermophilus* C599 株

有効成分： α -アミラーゼ

IUB 分類命名法による酵素番号及び CAS 番号は以下のとおり。

IUB No.： EC 3.2.1.1

CAS No.： 9000-90-2

(2) 製造方法

TS-25 は、*G. stearothermophilus* C599 株を生産菌として用い、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

TS-25 は、グルコース重合体の α -1,4-結合をエンド型で加水分解し、主にマルトースを生成させる酵素である。パンの老化防止のためパン生地に添加されたり、デンプンからマルトースやハイマルトースシロップ等のデンプン糖を製造するために用いられる。

(4) 摂取量

TS-25 は、製パンやデンプン糖の製造工程でパン生地やデンプンに添加されるが、最終段階で高温により失活する。一日最大摂取量は 0.006 mg TOS (Total Organic Solids)/ 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、*B. subtilis* A164Δ5 株である。*B. subtilis* A 164Δ5 株は、American Type Culture Collection (ATCC) から入手した *B. subtilis* ATCC6051a 株からアミラーゼ (*amyE*) 遺伝子、アルカリプロテアーゼ (*aprE*) 遺伝子、中性プロテアーゼ (*nprE*) 遺伝子、シグマ F (*spoIIAC*) 遺伝子及びサーファクチン C (*srfAC*) 遺伝子を欠失させた株である (参照 3)。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

改変 α-アミラーゼ遺伝子の供与体は *G. stearothermophilus* C599 株であり、分泌シグナル配列の供与体は *B. licheniformis* ATCC9789 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amyM62.7 遺伝子は、改変 α-アミラーゼ遺伝子と分泌シグナル配列からなり、α-アミラーゼを発現する。遺伝子導入用ベクターに組み込まれた後、二重交差相同組換えにより宿主の染色体に挿入された。

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、長期にわたり食品や食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。

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く、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 1 に相当する (参照 4,5)。

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 : NA62-7

有効成分 : α-アミラーゼ

IUB 分類命名法による酵素番号及び CAS 番号は以下のとおり。

IUB No. : EC 3.2.1.1

CAS No. : 9000-90-2

(2) 製造方法

NA62-7 は、MDT121 株を生産菌として製造される。製造方法は、従来の添加物と基本的に同様であり、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

NA62-7 は、従来の添加物と同様に製パンやデンプン糖の製造において使用され、用途及び使用形態は、従来の添加物と変わらない。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

NA62-7 は、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素であるが、耐熱性とスクロース耐性が向上している。

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

NA62-7 と従来の添加物との相違点は、アミノ酸が 4 個置換され、従来の添加物と比較して耐熱性とスクロース耐性が向上している点である。

(2) 組換え体と宿主

MDT121 株と宿主との相違点は、MDT121 株には改変 α -アミラーゼ遺伝子を含む *amyM62.7* 遺伝子が導入され、 α -アミラーゼ産生性を獲得している点である。

以上 1～6 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、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 *B. subtilis* A 164 Δ 5 株である。

B. subtilis は、広く自然界に存在し、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、ヒトは納豆等の食品を通じて多くの食経験がある。*B. subtilis* A 164 Δ 5 株を宿主として作製された菌株は、酵素生産に長年の使用実績がある。

また、経済開発協力機構（OECD）において、優良工業製造規範（GILSP）が適用できる宿主微生物として認定されている。

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 が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、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 1 に相当する（参照 4,5）。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis が腸管内に定着することは知られておらず、ヒトは納豆等の食品を通じた食経験を有することから、安全上問題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. subtilis には、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。

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、毒性物質を産生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

遺伝子導入用ベクター pNBT24 amyM62.7 の作製には、プラスミド pDG268 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 pDG268 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている(参照 6)。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pDG268 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)。

(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 pDG268 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 pDG268 にはアンピシリン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれている。なお、アンピシリン耐性遺伝子は宿主の染色体に導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は宿主に導入された後に部分欠失され、薬剤耐性の機能が失われる。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pDG268 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 pDG268 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

amyM62.7 遺伝子は、改変 α -アミラーゼ遺伝子と分泌シグナルペプチドをコードする DNA から構成される。改変 α -アミラーゼ遺伝子の供与体は *G. stearothermophilus* C599 株、分泌シグナルペプチド配列の供与体は *B. licheniformis* ATCC9789 株である。

(2) 安全性に関する事項

G. stearothermophilus 及び *B. licheniformis* 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 1 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

改変 α -アミラーゼ遺伝子は、*G. stearothermophilus* C599 株の α -アミラーゼ (*amyM*) 遺伝子の塩基配列に基づき成熟型タンパク質をコードする領域をクローニングした後、耐熱性及びスクロース耐性を高めるために塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子であり、従来の α -アミラーゼと比較して、4 個のアミノ酸が置換されている。また、*amyM* 遺伝子中の分泌シグナルペプチド配列を *B. licheniformis* ATCC9789 株由来の α -アミラーゼ (*amyL*) 遺伝子の分泌シグナルペプチド配列に置き換えて *amyM62.7* 遺伝子を構築した。

(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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

amyM62.7 遺伝子が発現する α -アミラーゼは、グルコース重合体の α -1,4-結合を加水分解し、主にマルトースを生成させる酵素である。従来の添加物と比較して、耐熱性及びスクロース耐性が向上している。

NA62-7 は、従来の α -アミラーゼと同様の反応を触媒する酵素であるが、アミノ酸配列が改変され耐熱性が向上していることから、アレルギー誘発性について「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（平成 20 年 6 月 28 日食品安全委員会決定）の第 2 章第 5 の 5 に準じて、検討された。

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

G. stearothermophilus のアレルギー誘発性に関する報告はない。

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

NA62-7 を有効成分とする酵素製剤及び *G. stearothermophilus* 由来の α -アミラーゼについて、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

3) 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

①人工胃液に対する感受性

NA62-7 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、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された (参照 7)。

②人工腸液に対する感受性

NA62-7 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、試験開始後 360 分後においても消化されないことが確認された (参照 7)。

③加熱処理に対する感受性

NA62-7 の加熱による免疫反応性の変化を ELISA 法を用いて分析した結果、pH7.0、90°Cの加熱処理により、基質非存在下では 15 分間、基質存在下では 30 分間で免疫反応性が消失することが確認された (参照 8)。

4) 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

NA62-7 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^aを用いて相同性検索を行った結果、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が 2 個見いだされた。一つは、*Aspergillus oryzae* 由来の TAKA アミラーゼで、 α -アミラーゼファミリーに保存されている触媒領域に NA62-7 と高い相同性がみられたが、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する領域はなかった (参照 9)。他の一つは、*A. fumigatus* 由来のセリンプロテアーゼであり、吸入による感作の報告があり、エピトープ領域も同定されているが、このエピトープ領域に NA62-7 と高い相同性はなかった (参照 10)。また、NA62-7 に導入された 4 個のアミノ酸置換により、既に安全性評価が終了しているアミノ酸未置換の TS-25 (アミラーゼ) と比較してこれらの相同性が高まることはなかった。

また、抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った結果、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 11)。

以上のことから総合的に判断し、NA62-7 にはアレルギー誘発性を示唆する

^a ネブラスカ大学アレルゲンデータベースに登録された 1471 種及び WHO/IUIS Allergen Nomenclature のアレルゲンデータベースに登録された 718 種を含むデータベース

データがないことを確認した。

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

amyM62.7 遺伝子のプロモーターは *Bacillus amyloliquefaciens* WR28 株由来の *amyQ* 遺伝子のプロモーター配列に変異を導入した *amyQ_{sc}* プロモーターである (参照 12)。

(2) ターミネーターに関する事項

amyM62.7 遺伝子のターミネーターは *Bacillus clausii* PP159 株由来の *aprH* 遺伝子のターミネーター配列である。

(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

目的遺伝子の翻訳に必要な *B. clausii* PP159 株由来の *aprH* の SD 配列及び mRNA を安定化させるため *B. thuringiensis ssp. tenebrionis* DSM5526 株由来の *cry3A stab* 配列を付加した。*cry3A stab* 配列は、殺虫活性を示すタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域に存在する配列であり、タンパク質をコードする領域は含まれない。

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 pDG268 に、pUB110 に由来するカナマイシン耐性遺伝子を組み込み、*amyE5'* 及び *amyE3'* 配列の間に、プロモーター配列、*cry3A stab* 配列、*aprH* SD 配列、*amyM62.7* 遺伝子及びターミネーター配列を挿入することによって、遺伝子導入用ベクター pNBT24 *amyM62.7* が作製された。

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 pNBT24 *amyM62.7* 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。

(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 pNBT24 *amyM62.7* の *amyE* 遺伝子 5' 末端側領域 (*amyE5'*) 及び *amyE* 遺伝子 3' 末端側領域 (*amyE3'*) に挟まれた領域のみが宿主の *amyE* 遺伝子座に挿入される。最終的に宿主に導入される *amyM62.7* 遺伝子発現カセットを含む断片、*amyE5'* 及び *amyE3'* の合計 5,280 bp について、六つの読み枠においてオープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンで終結する連続する 10 アミノ酸以

上の ORF が 272 個見いだされた。

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^aを用いて相同性検索を行った。その結果、第 4-2-(3)-4) で既に述べた TAKA アミラーゼ及び *Aspergillus fumigatus* 由来のセリンプロテアーゼ以外には、*amyM62.7* 遺伝子の ORF と相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒素タンパク質との相同性の有無を確認するために、データベース (参照 13) を用いて E-value<0.2 を指標として検索を行った。その結果、NA62-7 を含む ORF と相同性を示すタンパク質が 4 個検出されたが、いずれもそれ自体毒性を有するものではないと考えられた (参照 14)。

- (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 pNBT24 *amyM62.7* の *amyE3'* 及び *amyE3'* 配列に挟まれた *amyM62.7* 遺伝子発現カセットとクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む領域である。

- (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 pNBT24 *amyM62.7* 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

相同組換えにより *amyM62.7* 遺伝子を *B. subtilis* A164Δ5 株に導入し、クロラムフェニコール耐性及び α-アミラーゼ活性により選抜した。さらに、クロラムフェニコール耐性遺伝子を欠失させ、*B. subtilis* MDT121 株を得た。

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 pNBT24 *amyM62.7* には、アンピシリン耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子が存在するが、宿主の染色体には導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は宿主に導入された後に部分欠失させるため、生産菌はクロラムフェニコール耐性を示さない。

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

B. subtilis MDT121 株は、NA62-7 を生産する点で宿主と異なる。

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

B. subtilis MDT121 株に導入された DNA 断片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（参照 15）。

(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

B. subtilis MDT121 株に挿入された *amyM62.7* 遺伝子発現カセットを含む断片、*amyE5'* 及び *amyE3'* 遺伝子のオープンリーディングフレーム検索の結果は、第 4-5- (2) のとおりである。

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

NA62-7 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、また、本製品の製品規格は、JECFA 及び Food Chemical Codex の食品酵素規格に適合していることから、有害性はないと考えられる。

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

NA62-7 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

NA62-7 は、2009 年から欧州において販売されている。そのほか、オーストラリア、ブラジル、中国等においても食品添加物として認められており、製パン・製菓用及びデンプン糖製造用酵素として使用されている。

2 組換え体の残存に関する事項

サザンブロット分析により、NA62-7 の精製前の試験サンプルには組換え DNA が残存しないことが確認された（参照 16）。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

NA62-7 は、JECFA の食品用酵素の規格値及び Food Chemical Codex の規定値を満たしている。また、製造原料は食品原料又は食品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とは考えにくい。

4 精製方法及びその効果に関する事項

NA62-7 の精製は、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の工程で行われ、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

NA62-7 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、有害性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。

(参考)

申請者から変異原性及び亜急性毒性試験に関するデータが提出されたことから、このデータを確認した。被験物質は、NA62-7 の製造過程における除菌ろ過後の培養液を濃縮したものが用いられた。

(1) 遺伝毒性試験

①復帰突然変異試験 (参照 17)

細菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び *E. coli* WP2uvrA) を用いた復帰突然変異試験 (最高用量 5,000 µg/plate) を行った結果、代謝活性化系 (S-9mix) の有無にかかわらず、全て陰性であった。

②小核試験 (参照 18)

ヒトの末梢血リンパ球を用いた小核試験 (最高用量 5,000 µg/ml) を行った結果、染色体異常を示さないことが確認された。

(2) 13 週間ラット反復経口投与毒性試験 (参照 19)

CD ラット (1 群雄雌各 10 匹) に被験物質を 0、0.11、0.37 又は 1.13 g TOS/kg 体重/日の用量で 13 週間強制経口投与し、一般状態の観察、体重測定、眼科学的検査、血液学的検査、血液生化学検査、病理組織学的検査等を行った。その結果、最高用量群の雌で血液学的検査においてリンパ球、好酸球、単球、大型非染色性白血球の減少及びそれに伴う総白血球数の減少が認められ、最高用量群の雄で腎臓相対重量の増加が認められた。したがって、本試験の NOAEL (無毒性量) は 0.37 g TOS/kg 体重/日であると考えられた。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「*Bacillus subtilis* MDT121 株を利用して生産された α -アミラーゼ」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、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

- 1 Typical Composition Novamyl 10000 BG (ノバミル 10000 BG (TS-25) –製品組成) (社内報告書)
- 2 The Role of Novavmyl® in Extended Shelf Life Bread (ノバミル (TS-25) –製パン試験レポート) (社内報告書)
- 3 宿主 *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) A164Δ5 株の作製方法 (社内報告書)
- 4 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (平成22年6月) 国立感染症研究所
- 5 NIH Guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules. March 2013
- 6 基本ベクターpDG268 の配列 (社内報告書)
- 7 Artificial digestion test of OptiCake® Fresh (NA62-7) in Simulated GastricFluid (SGF) or Simulated Intestinal Fluid (SIF) (社内報告書)
- 8 ELISA Report: Determination of residual NA62-7 – the active component of OptiCake® Fresh 50 BG – after incubation at 90°C for up to 45 minutes by means of ELISA (社内報告書)
- 9 NA62-7、TS-25 及びTAKA アミラーゼ (TAKA) のアミノ酸配列の比較 (社内報告書)
- 10 NA62-7、TS-25 及びA. fumigatus 由来セリンプロテアーゼのアミノ酸配列の比較 (社内報告書)
- 11 Sequence homology of ORF's in NA62-7@amyE locus to known toxins and allergens (社内報告書)
- 12 Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R and Sloma A
Development of Marker-free Strains of *Bacillus subtilis* Capable of Secreting High Levels of Industrial Enzymes. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 204-212 (2000)
- 13 Zhou C E, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer M D and Slezak T MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Research*, 35, Database issue, D391-D394 (2007)
- 14 Sequence homology of ORF's in NA62-7@amyE locus to proteins from the MvirDB database - Comparison between amyE_111 (NA62-7) and the 7 hit (社内報告書)
- 15 *Bacillus subtilis* MDT121 株 amyE 遺伝子座のDNA 塩基配列 (社内報告書)
- 16 Recombinant DNA in Maltogenic amylase batch PPY29413 (社内報告書)
- 17 Maltogenic amylase, batch PPY 29413: Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (PPY 29413 の変異原性毒性試験レポート) (社内報告書)
- 18 Induction of micronuclei in cultured human peripheral blood lymphocytes (PPY 29413 の染色体異常試験レポート) (社内報告書)
- 19 Maltogenic amylase, PPY 29413: Toxicity Study by Oral Administration to CD

Rats for 13 Weeks (PPY 29413 の13 週間ラット経口毒性試験レポート) (社内
報告書)