



府食第319号

平成29年5月9日

厚生労働大臣

塩崎 恭久 殿

食品安全委員会

委員長 佐藤 洋

食品健康影響評価の結果の通知について

平成25年6月12日付け厚生労働省発生食0612第3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食品「MDT06-228株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼ」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

「MDT06-228株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼ」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

MDT06-228 株を利用して生産された
エキソマルトテトラオヒドロラーゼ

2017年5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.....	5
I. 評価対象添加物の概要.....	6
II. 食品健康影響評価.....	6
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.....	6
1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料.....	6
2. 宿主及び導入 DNA 7	7
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.....	7
4. 宿主の構成成分等に関する資料.....	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.....	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.....	8
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.....	9
3. 寄生性及び定着性に関する事項.....	9
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.....	9
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.....	9
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.....	10
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	10
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.....	12
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.....	16
<参照>.....	16

＜審議の経緯＞

2013 年 6 月 13 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 0612 第 3 号）、関係書類の接受

2013 年 6 月 17 日 第 478 回食品安全委員会（要請事項説明）

2013 年 7 月 4 日 第 116 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2016 年 5 月 16 日 第 148 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2017 年 1 月 25 日 第 156 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2017 年 3 月 14 日 第 642 回食品安全委員会（報告）

2017 年 3 月 15 日から 4 月 13 日まで 国民からの意見・情報の募集

2017 年 5 月 2 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

2017 年 5 月 9 日 第 648 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＞

2015 年 6 月 30 日まで	2017 年 1 月 6 日まで	2017 年 1 月 7 日から
熊谷 進（委員長）	佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）	山添 康（委員長代理）	山添 康（委員長代理）
山添 康（委員長代理）	熊谷 進	吉田 緑
三森 国敏（委員長代理）	吉田 緑	山本 茂貴
石井 克枝	石井 克枝	石井 克枝
上安平 冽子	堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	村田 容常	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	2015 年 9 月 30 日まで
澤田 純一（座長）	澤田 純一（座長）
鎌田 博（座長代理）	小関 良宏（座長代理）
五十君 静信	手島 玲子
宇理須 厚雄	中島 春紫
橘田 和美	飯 哲夫
児玉 浩明	和久井 信
澁谷 直人	近藤 一成

2015 年 10 月 1 日から

澤田 純一（座長）

小関 良宏（座長代理）

岡田 由美子	中島 春紫
--------	-------

橘田 和美	樋口 恭子
-------	-------

児玉 浩明	飯 哲夫
-------	------

近藤 一成	山川 隆
-------	------

柘植 郁哉	和久井 信
-------	-------

手島 玲子	
-------	--

要 約

「MDT06-228 株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼ」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、エキソマルトテトラオヒドロラーゼの熱安定性を高めるために *Bacillus licheniformis* BRA7 株を宿主として、*Pseudomonas stutzeri* IAM 1504 株由来の改変エキソマルトテトラオヒドロラーゼ遺伝子 (*sas3* 遺伝子) を導入して作製された MDT06-228 株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼである。本添加物は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端からグルコース 4 分子ごとに加水分解する反応を触媒する酵素である。耐熱性が付与されていることから、高温での使用も可能となり、パンの品質維持やマルトテトラオースを含む糖質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、遺伝子の導入後の塩基配列の解析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、「MDT06-228 株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼ」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：MDT06-228 株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼ

用 途：パンの品質維持及びマルトテトラオースを含む糖質の製造

申請者：ダニスコジャパン株式会社

開発者：Danisco US, Inc. (米国)

本添加物は、エキソマルトテトラオヒドロラーゼの熱安定性を高めるために、*Bacillus licheniformis* BRA7 株を宿主として、*Pseudomonas stutzeri* IAM 1504 株由来の改変エキソマルトテトラオヒドロラーゼ遺伝子 (*sas3* 遺伝子) を導入して作製された MDT06-228 株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼである。本添加物は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端からグルコース 4 分子ごとに加水分解する反応を触媒する酵素である。耐熱性が付与されていることから、高温での使用も可能となり、パンの品質維持やマルトテトラオースを含む糖質の製造に使用される。

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：エキソマルトテトラオヒドロラーゼ

基 原：*Pseudomonas stutzeri*

有効成分：エキソマルトテトラオヒドロラーゼ

系 統 名：Glucan 1,4- α -maltotetraohydrolase

IUB 番号：EC 3.2.1.60

CAS 番号：37288-44-1

(2) 製造方法

エキソマルトテトラオヒドロラーゼは、*P. stutzeri* を生産菌として用い、培養工程、回収・精製工程及び製剤化工程を経て製造される。生産菌は、ろ過により、除去される。

(3) 用途及び使用形態

エキソマルトテトラオヒドロラーゼは、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端からグルコース 4 分子ごとに加水分解する反応を触媒する酵素である。パンの品質維持やマルトテトラオースを含む糖質の製造に用いられる。

(4) 摂取量

パンに使用された場合、エキソマルトテトラオヒドロラーゼは焼成工程(80℃以上)で失活する。残存すると仮定した場合の一日最大摂取量は、0.022 mg/kg 体重/日とされている(参照 1)。異性化糖製造にエキソマルトテトラオヒドロラーゼが使用され、全て残存すると仮定した場合の一日最大摂取量は、0.003 mg/kg 体重/日とされている(参照 2)。したがって最大摂取量の合計値は、0.025 mg/kg 体重/日と試算されている。

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、*B. licheniformis* BRA7 株である。*B. licheniformis* は、土壌等、自然界にも広く認められる。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

sas3 遺伝子の供与体は、*P. stutzeri* IAM 1504 株である。*P. stutzeri* は、土壌や植物、水中などに広く存在する。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

sas3 遺伝子は、エキソマルトテトラオヒドロラーゼ(SAS3)を発現する。SAS3 は、C 末端領域を欠失している天然の欠失型エキソマルトテトラオヒドロラーゼと同様に C 末端領域を欠失し、更に耐熱性向上のため、16 個のアミノ酸残基が置換されている。

なお、宿主から α -アミラーゼ遺伝子(*amy*)、クロラムフェニコール耐性遺伝子(*catH*)、芽胞形成遺伝子(*spoIIAC*)、アルカリプロテアーゼ遺伝子(*aprL*)及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ遺伝子(*mpr*)を欠失させている。*sas3* 遺伝子を含む導入用ベクターを相同組換えにより宿主の欠失させた *catH* 座に導入した。

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

B. licheniformis 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。*B. licheniformis* BRA7 株は、遺伝子組換え添加物として安全性審査を終了している SPEZYME FRED™(有効成分： α -アミラーゼ)の宿主として用いられている(参照 3)。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

B. licheniformis 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 : Powerfresh、Powerflex、Powersoft Cake または Optimalt4G
有効成分 : エキソマルトテトラオヒドロラーゼ (SAS3)
系 統 名 : Glucan 1,4- α -maltotetraohydrolase
IUB 番号 : EC 3.2.1.60
CAS 番号 : 37288-44-1

(2) 製造方法

SAS3 は、MDT06-228 株を生産菌として製造される。製造方法は、従来の添加物と同様であり、培養工程、回収・精製工程及び製剤化工程を経て製造される。生産菌は、ろ過により、除去される。

(3) 用途及び使用形態

SAS3 は、パンの食感及び風味の改良等、品質維持のために使用される。SAS3 は耐熱性が付与されていることから、高温での使用が可能となり、製パン工程では小麦粉に対して 2.0~30 ppm 添加される。なお、パンの焼成過程において、その活性は消失する。このほか、マルトテトラオースを含む糖質の製造に用いられるが、SAS3 は酵素反応後の精製工程で除去される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

SAS3 は、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素であるが、酵素活性の耐熱性が向上している。

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

SAS3 と従来の添加物との相違点は、16 残基のアミノ酸が置換され、酵素活性の熱安定性が向上している点である（参照 4）。

(2) 組換え体と宿主

MDT06-228 株と宿主との相違点は、SAS3 産生性を獲得し、 α -アミラーゼ産生性、芽胞形成能、アルカリプロテアーゼ産生性及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ産生性を欠失している点である。

以上 1～6 から、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. 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 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のバイオセーフティレベル（BSL）1 に該当する。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis が寄生性及び定着性をもつこと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

B. licheniformis BRA7 株には、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. licheniformis の近縁種である *Bacillus cereus* 及び *Bacillus anthracis* は、哺乳動物の病原体として知られているが、*B. licheniformis* 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

導入用ベクターpICatHの作製には、プラスミドpBR322が用いられた。欠失導入用ベクターtsJM103Kan及びpUCtsKanの作製には、プラスミドpBR322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

導入用ベクターpICatH、欠失用ベクターtsJM103Kan及びpUCtsKanの塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照5、6、7）。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用ベクターpICatH、欠失用ベクターtsJM103Kan及びpUCtsKan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

導入用ベクターpICatH、欠失用ベクターtsJM103Kan及びpUCtsKan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

導入用ベクターpICatHにはクロラムフェニコール耐性遺伝子及びネオマイシン耐性遺伝子が含まれている。欠失導入用ベクターtsJM103Kanにはアンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺

伝子が含まれている。欠失導入用ベクターpUCtsKan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含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

導入用ベクターpICatH、欠失導入用ベクターtsJM103Kan 及び pUCtsKan 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

導入用ベクターpICatH、欠失導入用ベクターtsJM103Kan 及び pUCtsKan の複製開始配列は、*S. aureus*、*E. coli* 及び *B. licheniformis* を含む *Bacillus* 属で機能することが知られているが、MDT06-228 株には導入されない。

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

sas3 遺伝子の供与体は、*P. stutzeri* IAM 1504 株であり、欠失導入用ベクター中の DNA 断片の供与体は、*B. licheniformis* BRA7 株である。

(2) 安全性に関する事項

P. stutzeri は日和見感染菌であると考えられるが、*P. stutzeri* IAM 1504 株における、健康なヒトへの寄生性又は感染性については報告はない。なお、*P. stutzeri* は国立感染症研究所病原体等安全管理規程において BSL1 に相当する。

B. licheniformis BRA7 株は本添加物生産菌の宿主であり、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の BSL1 に該当する。

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

sas3 遺伝子は、*P. stutzeri* IAM 1504 株のエキソマルトテトラオヒドロラーゼ遺伝子 (*mta* 遺伝子) をクローニングし、終止コドンを導入して C 末端欠失型とした後、耐熱性を付与するために塩基置換し、人工合成した遺伝子である (参照 8)。

B. licheniformis BRA7 株に内在する *amy* 遺伝子、*catH* 遺伝子、*spoIIAC* 遺伝子、*aprL* 遺伝子及び *mpr* 遺伝子をクローニングし、それぞれの欠失型遺伝子を作製した (参照 9)。

(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

sas3 遺伝子及び欠失導入用 DNA 断片の塩基数、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

sas3 遺伝子が発現する SAS3 は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端からグルコース 4 分子ごとに加水分解する反応を触媒する酵素であることが確認されている（参照 10）。

SAS3 は、天然の欠失型エキソマルトテトラオヒドロラーゼと比較して、16 残基のアミノ酸が置換されていることにより、酵素活性の熱安定性が向上している。

SAS3 は、天然の欠失型エキソマルトテトラオヒドロラーゼと比較して、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

P. stutzeri 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

SAS3 は欧米等で使用されており、アレルギーの誘発を含む健康被害の報告はない。

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

SAS3 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。その結果、SDS-PAGE 分析では試験開始後 1 分以内に SAS3 は分解され、2~5 kDa のバンドが認められた。ウェスタンブロット分析では、試験開始後 1 分以内に SAS3 は消化されることが確認された（参照 11）。

さらに、人工胃液処理中に観察された 2~5 kDa 断片の消化性について確認するため、人工胃液で 30 分間処理後に人工腸液で消化を行った。SDS-PAGE 分析の結果、人工胃腸液処理中に観察された 2~5 kDa の断片は人工腸液処理開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 11）。

②人工腸液に対する感受性

SAS3 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。その結果、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析ともに、試験開始後 360 分においても SAS3 は消化されなかった（参照 11）。

③加熱処理に関する感受性

SAS3 の加熱処理による免疫反応性の変化を ELISA 法を用いて分析した結果、基質存在下及び基質非存在下ともに、90℃10 分間の加熱により免疫

反応性が失われることが確認された（参照 11）。

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

本項目については、本評価書 14 ページ、第 5 の 2 (2) を参照。

以上のことから総合的に判断し、SAS3 にはアレルギーの誘発性を示唆する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

sas3 遺伝子のプロモーターは、*B. licheniformis* 由来の α -アミラーゼ (LAT) のプロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

sas3 遺伝子のターミネーターは、*B. licheniformis* 由来の LAT 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

sas3 遺伝子上流に *B. licheniformis* 由来の LAT のシグナル配列が付加されている。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用ベクター pICatH に *sas3* 遺伝子、LAT プロモーター、LAT ターミネーター及び LAT シグナル配列を挿入することによって、導入用ベクター pICatH-LATpMS382 が作製された。

欠失用ベクター tsJM103Kan 及び pUCtsKan に欠失導入用 DNA 断片を挿入することにより、各種欠失導入用ベクターが作製された。

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

導入用ベクター pICatH-LATpMS382 及び各種欠失導入用ベクターの塩基数、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 12、9）。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、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

導入用ベクターである pICatH-LATpMS382 において、宿主に導入される *sas3* 遺伝子発現カセット領域に目的以外のタンパク質を発現する ORF が含まれるか否か検索を行ったところ、有害性が示唆される ORF は検出されなかつ

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

導入用ベクターpICatH-LATpMS382上の意図する挿入領域は、*sas3* 遺伝子発現カセットである。また、欠失導入用ベクター上の意図する挿入領域は明らかになっている。

- (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

導入用ベクターpICatH-LATpMS382 及び欠失導入用ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないように構築され、宿主に導入されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

プロトプラスト法を用いて欠失導入用ベクターを宿主に導入し、形質転換により *amy* 遺伝子、*catH* 遺伝子、*spoIIAC* 遺伝子、*aprL* 遺伝子及び *mpr* 遺伝子を欠失させた株に、導入用ベクターpICatH-LATpMS382 を導入し、クロラムフェニコール及びネオマイシンを含む培地で選抜した。その後、*sas3* 遺伝子発現カセットを増幅させて MDT06-228 株が得られた（参照 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

欠失導入用ベクターには、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子が存在するが、これらの遺伝子は宿主染色体に導入されない。

導入用ベクターpICatH-LATpMS382 にはクロラムフェニコール耐性遺伝子（*catH* 遺伝子）及びネオマイシン耐性遺伝子（*neo* 遺伝子）が存在するが、*neo* 遺伝子は MDT06-228 株に含まれていないことが確認されている。また、*catH* 遺伝子は宿主に存在する遺伝子を欠失させた後、再導入している。したがって、新たに抗生物質耐性マーカー遺伝子は導入されておらず、安全上問題ないものと考えられる。

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

宿主との差異は、生産菌 MDT06-228 株に導入された *sas3* 遺伝子が SAS3 を発現すること、 α -アミラーゼ産生性、芽胞形成能、アルカリプロテアーゼ産生性及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ産生性を欠失していることである。

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

MDT06-228 株に導入された *sas3* 遺伝子の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

MDT06-228 株に導入された *sas3* 発現カセット領域及びその近傍、並びに欠失された 4 つの遺伝子座とその近傍配列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 30 アミノ酸以上の ORF が合計 64 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、欠失された *mpr* 遺伝子座の 1 つの ORF に、ゴキブリのアルギニンキナーゼと連続する 8 アミノ酸配列の一致が認められた。しかし、この一致を示した領域は宿主ゲノムの遺伝子配列に対応していた。欠失された *aprL* 遺伝子座の 1 つの ORF が、内在性のセリンプロテアーゼ (サチライシン) と 80 アミノ酸で 35% 以上の相同性を示し、かつ連続する 8 アミノ酸配列が一致することが示された。*aprL* 遺伝子の欠失によりこのセリンプロテアーゼのプロペプチド及びコード配列の一部が除去されていることから仮に翻訳されたとしても本来の機能は有しないと考えられるとしている。

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^bを用いて E-value<0.2 を指標として検索を行った。その結果、欠失された *aprL* 遺伝子座の 1 つの ORF に、*Candida albicans* のセリンプロテアーゼ KEX2 及び *Nereis japonica* のセリンペプチダーゼとの相同性が見られたが、いずれも安全性上問題があるとは考えられなかったとしている (参照 14)。

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

SAS3 の製造原料は、従来の酵素の製造原料と同じものが使用され、製造器材も、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものが使用される。

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

SAS3 の製造原料は、Food Chemicals Codex (FCC) の食品酵素規格に適合している。

^a Food allergy research and resource program (FARRP v15)

^b DuPont Pioneer 社内毒性データベース (UniProKB/Swiss Prot タンパク質データにより構成)

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

SAS3 は、2009 年に米国において GRAS として認定されている。また、ヨーロッパの一部の国々において、加工助剤としての使用実績がある。

2. 組換え体の残存に関する事項

SAS3 に生産菌の残存がないことが、培養を用いた手法により確認された（参照 15）。また、PCR 法により、生産菌に由来する DNA 断片は検出されなかった（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

SAS3 を含む酵素製剤は、JECFA の食品用酵素剤の一般規格に準拠している。また、宿主である *B. licheniformis* は、食品用酵素の生産菌として長期にわたり食品製造に安全に使用されており、有害な物質を生産するという報告はないことから、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

SAS3 の精製方法及びその効果は明らかであり（参照 17）、安全性上に問題のある物質が混入するとは考えにくい。

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

製造用原体の製造に用いられる原料及び製造器材は、従来の食品用酵素の製造に使用されているものであり、その品質は FCC の規格を満たしている。よって、本製品の規格及び使用方法に準拠する限りにおいて、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が得られている。

（参考）

申請者から SAS3（製造用原体）の亜急性毒性試験及び変異原性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。

（1）90 日間ラット経口毒性試験（参照 18）

Wister 系ラット（1 群雌雄各 10 匹）に、0、23.7、47.4 及び 79 mg total protein/kg 体重/日の用量で製造用原体を 90 日間強制経口投与した結果、被験物質投与に関連した異常は認められなかった。

（2）遺伝毒性試験

①復帰突然変異試験（参照 19）

細菌 (*Salmonella typhimurium* TA1535、TA1537、TA98、TA100 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、S-9mix の有無に関わらず、全て陰性であった。

②染色体異常試験 (参照 20)

ヒトの末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (最高用量 625 µg /ml) を行った結果、S-9mix の有無に関わらず染色体異常を示さないことが確認された。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「MDT06-228 株を利用して生産されたエキソマルトテトラオヒドロラーゼ」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. 総務省統計局：家計調査、一世帯当たりのパンの消費量 (2011～2013)
2. 農林水産省：平成 26 砂糖年度における砂糖及び異性化糖の需給見通し
3. 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
4. SAS3 加熱不活化試験報告書 (社内報告書)
5. ベクター tsJM103Kan の DNA 塩基配列 (社内報告書)
6. ベクター pUCtsKan の DNA 塩基配列 (社内報告書)
7. ベクター pICatH の DNA 塩基配列 (社内報告書)
8. sas3 遺伝子挿入断片の作製方法 (社内報告書)
9. 欠失用ベクターに挿入した遺伝子の作製方法 (社内報告書)
10. SAS3 のマルトテトラオース生成能の検討 (社内報告書)
11. SAS3 のアレルギー誘発性に関する実験報告書 (社内報告書)
12. sas3 遺伝子導入用ベクター pICatH-LATpMS382 の DNA 塩基配列 (社内報告書)
13. sas3 遺伝子カセットの MDT06-228 株におけるコピー数 (社内報告書)
14. ***. SAS3 Reading Frame Report (社内報告書)
15. 生産菌混入確認試験 (社内報告書)
16. MDT06-228 株に由来する DNA 断片の残存の検討 (社内報告書)
17. SAS3 酵素の精製工程の検討 (社内報告書)
18. ラットでの 90 日間経口投与毒性試験 (社内報告書)
19. 細菌復帰突然変異試験 (社内報告書)
20. 哺乳類染色体異常試験 (社内報告書)