



府食第332号
平成28年5月24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27年9月30日付け厚生労働省発食安0930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「PLA-54株を利用して生産されたホスホリパーゼA2」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

「PLA-54株を利用して生産されたホスホリパーゼA2」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

PLA-54 株を利用して
生産されたホスホリパーゼ A2

2016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	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	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 of 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	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ーを含む。）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ー遺伝子の発現に関わる領域に関する 事項	10
4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	10
5 構築された発現ベクターに関する事項	10
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ー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	12
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	12
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	12
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	13
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	13
Ⅲ.	食品健康影響評価結果	13
<参照>		14

<審議の経緯>

- 2015年9月30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0930第1号）、関係書類の接受
- 2015年10月6日 第579回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2015年10月21日 第142回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年3月29日 第600回食品安全委員会（報告）
- 2016年3月30日から4月28日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2016年5月18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
- 2016年5月24日 第607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>

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
熊谷 進
吉田 緑
石井 克枝
堀口 逸子
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>

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

「PLA-54 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A2」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、ホスホリパーゼ A2 の生産性を高めるために、*Aspergillus niger* NRRL3122 株由来の GAM-53 株を宿主として、ブタ膵臓由来のプロホスホリパーゼ A2 遺伝子（プロ PLA2 遺伝子）を導入して作製された PLA-54 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A2 である。なお、本生産菌株の構築過程において、選択マーカーとして利用するために *Aspergillus nidulans* 由来のアセトアミダーゼ遺伝子 (*amdS* 遺伝子) が導入されたが、除去されており生産菌である PLA-54 株には存在しない。

ホスホリパーゼは、リン脂質を加水分解する酵素であり、油脂食品のリン脂質分解、パンの品質改良、めん類加工等に使用される。

「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、「PLA-54 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A2」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

名称：PLA-54 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A2
用途：リン脂質の加水分解
申請者：DSM ニュートリションジャパン株式会社
開発者：DSM 社（オランダ）

本添加物は、ホスホリパーゼ A2 の生産性を高めるために、*Aspergillus niger* NRRL3122 株由来の GAM-53 株を宿主として、ブタ膵臓由来のプロホスホリパーゼ A2 遺伝子（プロ PLA2 遺伝子）を導入して作製された PLA-54 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A2 である。なお、本生産菌株の構築過程において、選択マーカーとして利用するために *Aspergillus nidulans* 由来のアセトアミダーゼ遺伝子（*amdS* 遺伝子）が導入されたが除去されており、生産菌である PLA-54 株には存在しない。

ホスホリパーゼは、リン脂質を加水分解する酵素であり、油脂食品のリン脂質分解、パンの品質改良、めん類加工等に使用される。

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：ホスホリパーゼ

基原：動物の膵臓

有効成分：ホスホリパーゼ

(EC 番号：EC 3.1.1.4、CAS 番号：9001-84-7)

(2) 製造方法

ホスホリパーゼは、動物の膵臓の培養液から抽出し、除菌、精製工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

ホスホリパーゼは、食品中のリン脂質を加水分解する酵素であり、油脂食品のリン脂質分解、パンの品質改良、めん類加工等に使用されている。

(4) 摂取量

ホスホリパーゼは、リン脂質のエステル結合の作用位置に応じて数種類に分類される。そのうちホスホリパーゼ A2 は、主に小麦粉及び卵黄中のレシチン分解に使用されることから、小麦・加工品、菓子類及び調味料（マヨネーズ）に使用された場合の最終製品中の残存酵素量を算出し、ホスホリパーゼがこれ

らの食品全てに使用されたと仮定した場合の推定最大摂取量を、0.939 mg/人/日としている（参照 1）。

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. niger* NRRL3122 株の変異株 *A. niger* GAM-53 株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

プロ *PLA2* 遺伝子の供与体はブタであり、アセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子の供与体は *Aspergillus nidulans* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

プロホスホリパーゼ遺伝子（プロ *PLA2* 遺伝子）は、プロホスホリパーゼ A2 を発現し、その後プロ配列が切断され成熟型ホスホリパーゼ A2 となる。プロ *PLA2* 遺伝子は、合成 KEX2 タンパク切断部位（KEX2）がリンカーとして介在する形で、欠失型グルコアミラーゼ遺伝子（*glaAtr* 遺伝子）と結合させており、融合タンパク質として発現した後、内在性のケキシンプロテアーゼが KEX2 を切断することによりプロホスホリパーゼ A2 が分離される。プロ *PLA2* 遺伝子の塩基配列は、ブタ肝臓由来の野生型プロホスホリパーゼ遺伝子と同じである。

amdS 遺伝子は、アセトアミダーゼを発現し、選択マーカーとして使用されるが、生産菌である PLA-54 株では除去されている。

これらの遺伝子を含む DNA 断片を相同組換えにより菌株の染色体に組み込んだ。なお、宿主である *A. niger* GAM-53 株から、グルコアミラーゼ (*glaA*) 遺伝子の欠失、ペプシン (*pepA*) 遺伝子の不活性化を行った株に DNA 断片が挿入された。

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

A. niger 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。*A. niger* により生産されたプロテアーゼ等の酵素は米国で GRAS として扱われている（参照 2）。*A. niger* GAM-53 株は、これまでに酵素生産菌の構築に使用された実績がある（参照 3、4）。

4 宿主の構成成分等に関する資料

A. niger が有害生理活性物質を生産するという報告はない。*A. niger* は国立感染症研究所病原体等安全管理規定におけるバイオセーフティレベル 1 に相当する（参照 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：CAKEZYME™（顆粒又は液体）、MAXAPAL®A2（液体）、
GumZyme™（液体）

有効成分：ホスホリパーゼ A2

（EC 番号：EC 3.1.1.4、CAS 番号：9001-84-7）

（2）製造方法

ホスホリパーゼ A2 は、*A. niger* PLA-54 株を生産菌として用い、液体培養により生成される。生産菌は、精製工程におけるろ過により、除去される。

顆粒製品は、噴霧乾燥の後、小麦粉を添加して酵素活性が調整されている。液体製品は、クロマトグラフィーによる精製後、グリセロール及び塩化ナトリウムにて安定化させ、水で希釈することにより酵素活性が調整されている。

（3）用途及び使用形態

CAKEZYME™は、パン製品等の製造工程において、小麦粉などに含まれるリン脂質を分解し、パン等の物性改善に用いられる。MAXAPAL®A2 はマヨネーズや大豆製品等の製造工程において、卵黄や大豆に含まれるレシチンを加水分解するために用いられる。GumZyme™は、油脂食品において、リン脂質の分解のために用いられる。

（4）有効成分の性質及び従来の添加物との比較

本ホスホリパーゼ A2 は、既存のブタ膵臓由来ホスホリパーゼ A2 とアミノ酸配列及びタンパク質サイズが同一であるとされている（参照 6）。本ホスホリパーゼ A2 は、従来の添加物と同様に、食品中のリン脂質を加水分解する酵素である。

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

本ホスホリパーゼ A2 と従来の添加物は、アミノ酸配列が同一であり、相違点はないと考えられるとしている。

（2）組換え体と宿主

PLA-54 株と宿主との相違点は、PLA-54 株は、*glaA* 遺伝子の欠失、*pepA* 遺伝子の不活性化及びプロ *PLA2* 遺伝子の多重化によりホスホリパーゼ A2 の高生産能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 *A. niger* NRRL 3122 株の変異株 *A. niger* GAM-53 株である。

A. niger は、広く自然界に存在しており、食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験がある。

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. niger 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、*A. niger* は国立感染症研究所病原体等安全管理規定におけるバイオセーフティレベル 1 に相当する（参照 5）。

3 寄生性及び定着性に関する事項

A. niger に、寄生性及び定着性の報告はない。

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. niger GAM-53 株は、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

A. niger とその近縁種である *A. carbonarius* 及び *A. citricus* にオクラトキシン A を生産するものがあるとの報告がある（参照 7）。*A. niger* はオクラトキシン A 及びフモニシンを産生する遺伝子を有するが、本添加物の製造工程における限外濾過濃縮液を分析した結果、オクラトキシン A 及びフモニシンは確認されなかった（参照 8）。

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

導入用プラスミド pGBTOPPLA-1 及び pGBAAS-1 の作製には *E. coli* 由来のプラスミド pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R 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 pTZ18R にはアンピシリン耐性遺伝子が含まれている。なお、導入用プラスミドから生成された DNA 断片が形質転換に使用されるため、アンピシリン耐性遺伝子は生産菌に導入されない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pTZ18R 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 pTZ18R の複製開始配列は、*E. coli* で機能することが知られている。

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

プロ *PLA2* 遺伝子の供与体はブタであり、*amdS* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* である。

(2) 安全性に関する事項

動物の膵臓由来のホスホリパーゼは、既存添加物リストに収載されており、安全に使用されてきた経験がある。*A. nidulans* は、国立感染症研究所病原体等安全管理規定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

ブタの膵臓組織からプロホスホリパーゼ A2 をコードする mRNA を単離し、プラスミド pPG4 としてクローニングした。これを鋳型として PCR を行い、プロ *PLA2* 遺伝子を得た（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

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

プロ *PLA2* 遺伝子は、プロホスホリパーゼ A2 をコードする。プロホスホリパーゼ A2 は KEX2 部位を介して欠失型グルコアミラーゼと結合した融合タンパク質として発現し、*A. niger* 内在性ケキシプロテアーゼが合成 KEX2 に作用し、欠失型グルコアミラーゼとプロホスホリパーゼ A2 が切り離される。さらに、*A. niger* 内在性タンパク質分解酵素により、N-末端のプロ配列が切断さ

れ、酵素活性を有するホスホリパーゼ A2 となる。

本ホスホリパーゼ A2 は既存のブタ膵臓由来のホスホリパーゼ A2 と同様の反応を触媒し、リン脂質を加水分解してリゾリン脂質を生成し、食品加工等に使用される。

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

プロ *PLA2* 遺伝子のプロモーターは、宿主 *A. niger* GAM-53 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子の *glaA* プロモーター配列である。

amdS 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* のグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素をコードする *gdpA* 遺伝子のプロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

プロ *PLA2* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子のターミネーターは、宿主 *A. niger* GAM-53 株由来のグルコアミラーゼをコードする *glaA* 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

ホスホリパーゼ A2 を効率的に発現させ、分泌経路に移行させるため *A. niger* 由来の *glaAtr* 遺伝子を付加した (参照 10)。また、プロホスホリパーゼ A2 と *glaAtr* 遺伝子がコードする欠失型グルコアミラーゼの融合タンパク質を正確に分離させるために、*A. niger* 内在性のケキシプロテアーゼが作用する部位であるリジンとアルギニンの 2 アミノ酸をコードする KEX2 を組み込んだ。

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 pTZ18R に、KEX2 を介して結合させたプロ *PLA2* 遺伝子及び *glaAtr* 遺伝子並びにプロモーター配列及び宿主由来の *glaA* 遺伝子の下流に位置する隣接配列 (3' *glaA* 領域及び 3" *glaA* 領域) を挿入することによって、導入用プラスミド pGBTOPPLA-1 を作製した。

プラスミド pTZ18R に *amdS* 遺伝子、プロモーター配列、3' *glaA* 領域及び 3" *glaA* 領域を挿入することによって、導入用プラスミド pGBAAS-1 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

導入用プラスミド pGBTOPPLA-1 及び pGBAAS-1 より、プロ *PLA2* 遺伝子発現ユニット及び *amdS* 遺伝子発現ユニットを制限酵素を用いて切り出し、単離された直鎖状の DNA 断片を形質転換に用いた。プロ *PLA2* 遺伝子発現ユニットは、3" *glaA* 領域、プロモーター配列、KEX2 を介して結合させたプロ *PLA2*

遺伝子及び *glaAtr* 遺伝子及び 3'*glaA* 領域から構成される。*amdS* 遺伝子発現ユニットは、3''*glaA* 領域、プロモーター配列、*amdS* 遺伝子及び 3'*glaA* 領域から構成される。

挿入 DNA 断片であるプロ *PLA2* 遺伝子発現ユニット及び *amdS* 遺伝子発現ユニットの塩基数、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 11、12)。

- (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

最終的に宿主ゲノムに挿入されるのはプロ *PLA2* 遺伝子発現ユニットのみであることから、プロ *PLA2* 遺伝子発現ユニットの配列について、六つの読み枠において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、プロ *PLA2* 遺伝子発現ユニットの挿入により宿主に新たに生じる 3ヶ所の接合部に 13 個、プロ *PLA2* 遺伝子配列に 3 個の ORF が検出された。これら ORF と既知のアレルゲンとの相同性を調査するために、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、既知のアレルゲンと 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す ORF 及び連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する ORF は検出されなかった。また、タンパク質データベース^bを用いた相同性検索の結果、1 個の ORF がヘビ毒の一つと分類されるホスホリパーゼ A2 と相同性を示したが、接合部に跨っておらずプロ *PLA2* 遺伝子内部の配列であった。それ以外には、相同性を示す既知の毒性タンパク質は検出されなかった (参照 13)。

- (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

挿入 DNA 断片に含まれる 3'*glaA* 及び 3''*glaA* 領域は、宿主から *glaA* 遺伝子の欠失及び *pepA* 遺伝子の不活性化を行った中間株の Δ *glaA* 座位に相同組換えで直接組み込まれる。よって、意図する挿入領域は、3'*glaA* 及び 3''*glaA* 領域に挟まれたプロ *PLA2* 遺伝子発現ユニット及び *amdS* 遺伝子発現ユニットである。なお、ベクター由来の DNA は存在しないことがサザンブロット分析により確認されている。

- (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

挿入遺伝子は、制限酵素処理後、電気泳動による単離により純化されている。

^a Allergen online, Version 15

^b SWISS-PROT 検索日 2015 年 8 月 10 日、11 月 30 日

6 DNAの宿主への導入方法に関する事項

宿主である GAM-53 株の 7 箇所の *glaA* 遺伝子座において、*glaA* 遺伝子のプロモーター領域 (*PglaA*) 及びコード配列を欠失した Δ *glaA* 座を構築し、制限酵素部位で標識し、プラグ部位とした。さらに、生産菌のタンパク質分解能を低下させるために、タンパク質分解酵素ペプシンをコードする遺伝子 (*pepA*) の不活性化を行い、中間株を得た。この中間株の Δ *glaA* 座位に相同組換えによりプロ *PLA2* 遺伝子発現ユニット及び *amdS* 遺伝子発現ユニットを挿入し、*amdS* マーカー遺伝子を用いて一次形質転換体を選抜した。次に、フルオロアセタミドを含む培地により二次形質変換体である *amdS* 遺伝子除去株を選択し、菌体内での自然な遺伝子転換によって、プロ *PLA2* 遺伝子が多重化した PLA-54 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

最終生産菌である PLA-54 株に、抗生物質耐性マーカー遺伝子は挿入されない。

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

PLA-54 株に導入されたプロ *PLA2* 遺伝子が多重化され、ホスホリパーゼ A2 を高発現すること、*pepA* 遺伝子が不活性化され生産菌のタンパク質分解能を低下させていることが宿主との差異である。

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

PLA-54 株に導入されたプロ *PLA2* 遺伝子発現ユニット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

第 4-5- (2) に記載のとおりである。

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

本ホスホリパーゼ A2 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。

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

本ホスホリパーゼ A2 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ことから、有害性はないと考えられる。

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

本ホスホリパーゼ A2 は、アメリカ、オーストラリア及びニュージーランド、カナダ、デンマーク、中国、ブラジル、フランス、メキシコ並びにロシアで添加物として使用が認められている。

2 組換え体の残存に関する事項

製品中に、生産菌由来の組換え DNA が存在するかどうかを定量 PCR 法を用いて確認した結果、組換え DNA は検出されなかった（検出限界：1 ng/mL 以下。参照 14）。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

発酵培地原料は従来の食品用酵素の製造に用いられてきた原料である。また、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

ホスホリパーゼ A2 の精製方法は明らかであり、有害物質が混入することは考えられない。

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

ホスホリパーゼ A2 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までにより、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「PLA-54 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A2」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. 平成24年国民健康・栄養調査報告より抜粋：厚生労働省，平成26年3月
2. Agency Response Letter: GRAS Notice No. GRN000089: U.S. Food and Drug Administration, 3 Apr. 2002
3. 遺伝子組換え食品等評価書 プロテアーゼ（2007年），同アスパラギナーゼ（2013年）食品安全委員会
4. van Dijck PW, Selten GC, and Hempenius RA, On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains: Regulatory Toxicology and Pharmacology Vol.38, 27-35, 2003
5. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊1「病原体等のBSL分類等」平成22年6月 国立感染症研究所
6. SDS-PAGE分析によるPLA-54株由来ホスホリパーゼA2の安定性試験結果（社内資料）
7. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, and Van Dijck PW, On the Safety of *Aspergillus niger* - a review: Appl Microbiol biotechnol Vol.59, 426-435, 2002
8. Certificate of analysis: Test Report No. EX13B-0220 (1)（社内資料）
9. de Geus P, van den Bergh CJ, Kuipers O, Verheij HM, Hoekstra WP, and de Haas GH, Expression of porcine pancreatic phospholipase A2. Generation of active enzyme by sequence-specific cleavage of a hybrid protein from *Escherichia coli*: Nucleic Acid Res Vol.15, No.9, 3743-3759, 1987
10. Jeenes DJ, Marczinke B, MacKenzie DA, and Archer DB, A truncated glucoamylase gene fusion for heterologous protein secretion from *Aspergillus niger*: FEMS Microbiology Letters Vol.107, 267-272, 1993
11. プロPLA2遺伝子を含む発現ユニットの塩基配列（社内資料）
12. amdS遺伝子を含む発現ユニットの塩基配列（社内資料）
13. オープンリーディングフレーム、アレルゲンおよび毒性タンパク質の検索結果（社内資料）
14. Memo: recDNA detection in Maxapal A2 sample, July 30, 2012, DSM Food Specialties B.V.（社内資料）