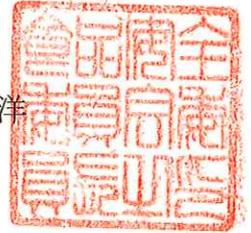




府食第477号
平成29年7月4日

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28年10月5日付け厚生労働省発生食1005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食品添加物「JPAo001株を利用して生産されたりパーゼ」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

「JPAo001株を利用して生産されたりパーゼ」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

JPAo001 株を利用して生産された
リパーゼ

2017年7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	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	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遺伝子を含む。）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	14
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	14
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>	17

<審議の経緯>

- 2016年10月5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（厚生労働省発生食1005第1号）、関係書類の接受
- 2016年10月11日 第625回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2016年10月19日 第154回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年3月27日 第158回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年5月23日 第650回食品安全委員会（報告）
- 2017年5月24日から6月22日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2017年6月28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7月4日 第656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>

2017年1月6日まで	2017年1月7日から
佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）	山添 康（委員長代理）
熊谷 進	吉田 緑
吉田 緑	山本 茂貴
石井 克枝	石井 克枝
堀口 逸子	堀口 逸子
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>

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

「JPAo001 株を利用して生産されたリパーゼ」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、リパーゼの生産性を高めるため、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主とし、変異導入した *Thermomyces lanuginosus* CBS 586.94 株由来のリパーゼ遺伝子及び *Fusarium oxysporum* DSM2672 株由来のリパーゼ遺伝子の融合遺伝子を導入することで作製した JPAo001 株を利用して生産されたリパーゼである。本添加物は、トリグリセライド等のエステル結合を加水分解して脂肪酸を遊離させる酵素であり、製パン及び油脂精製に使用される。

「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、「JPAo001 株を利用して生産されたリパーゼ」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：JPAo001 株を利用して生産されたリパーゼ
用 途：製パン及び油脂精製など
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、リパーゼの生産性を高めるため、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主とし、変異導入した *Thermomyces lanuginosus* CBS 586.94 株由来のリパーゼ遺伝子及び *Fusarium oxysporum* DSM2672 株由来のリパーゼ遺伝子の融合遺伝子を導入することで作製した JPAo001 株を利用して生産されたリパーゼである。本添加物は、トリグリセライド等のエステル結合を加水分解して脂肪酸を遊離させる酵素であり、製パン及び油脂精製に使用される。

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：リパーゼ（NOVOZYM677）

基 原：*Thermomyces lanuginosus* CBS 586.94 株

有効成分：Triacylglycerol lipase

IUB No.：EC 3. 1. 1. 3

CAS No.：9001-62-1

(2) 製造方法

NOVOZYM677 は、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

NOVOZYM677 は、パンの製造工程において乳化剤の代替として直接パン生地に添加され、パン生地の強度及び弾性の付加を目的として使用される（参照 1）。

(4) 摂取量

NOVOZYM677 が全てのパン類に含まれると仮定した場合の一日最大摂取量は、0.0003 mg TOS /日/kg 体重である（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、*A. oryzae* IFO4177 株である。*A. oryzae* IFO4177 株は、清酒麴から分離された野生株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

リパーゼ遺伝子 (*lipHL1232* 遺伝子) の供与体は、*T. lanuginosus* CBS 586.94 株及び *F. oxysporum* DSM2672 株である。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株及び *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

lipHL1232 遺伝子は、HL1232 をコードする。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子は、アセトアミダーゼ及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをそれぞれコードし、選択マーカーに用いた。

リパーゼの生産性を高めるために、*A. oryzae* IFO4177 株の α -アミラーゼをコードする *amyC* 遺伝子を含む 5 種類の遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させた (参照 3)。さらに、 γ 線照射による *cpa* 遺伝子クラスター及び *afl* 遺伝子クラスターの欠失により、シクロピアゾン酸及びアフラトキシン生産能が欠失されている (参照 4)。

lipHL1232 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pJPV004 をプロトプラスト形質転換法により宿主のゲノム DNA 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

A. oryzae は、長期にわたり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 (参照 5)。国内では、*A. oryzae* は、麴菌として味噌、醤油及び醸造酒などの発酵食品製造に広く利用されている。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

IFO4177 株のシクロピアゾン酸、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンの産生量を分析した結果、検出限界未満又は安全性上問題のないレベルにまで低減されていることが確認されている (参照 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

(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 : Lecitase® Ultra (液状品)、Lipopan H (顆粒品)

有効成分 : リパーゼ (HL1232)

EC No. : EC 3.1.1.3

CAS No. : 9001-62-1

(2) 製造方法

HL1232 は、JPAo001 株を生産菌として、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

HL1232 は、一般的なリパーゼの基質であるトリアシルグリセロール以外にリン脂質のエステル結合を加水分解する。

また、HL1232 は、乳化剤の代替として製パン工程で使用される。さらに、HL1232 がリン脂質を加水分解する性質を利用して、植物油精製工程の脱ガム工程において、不純物の水和除去の効率を高めるために使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来への添加物との比較

NOVOZYM677 は、トリアシルグリセロールの 1 及び 3 位のエステル結合を加水分解する。HL1232 は、従来への活性に加えて、リン脂質の 1 位のエステル結合も加水分解することができる（参照 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へ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への添加物

HL1232 と従来への添加物 NOVOZYM677 の相違点は、至適温度及び反応特異性が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAo001 株と宿主との相違点は、JPAo001 株には *lipHL1232* 遺伝子が複数コピー導入され、リパーゼの高産生性を獲得している点である。また、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の導入並びに *amyC* 遺伝子を含む 5 種類の遺伝子、*cpa* 遺伝子クラスター及び *afl* 遺伝子クラスターの欠失がなされている点も相違点である。

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添加物及び従来への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. oryzae* IFO4177 株である。

本株は、食品製造用酵素の生産菌として長年の使用実績がある。

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. oryzae は、一般的に非病原性の微生物であると考えられ（参照 5）、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（BSL）1 に相当する（参照 8）。また、IFO4177 株のシクロピアゾン酸、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシン産生量を確認した結果、シクロピアゾン酸及びコウジ酸については極めて低値ではあるもののその産生が確認され、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンは検出限界未満であることが確認された（参照 6）。

A. oryzae 由来の酵素であるアルカリ性セリンプロテアーゼ及び TAKA アミラーゼはアレルゲンデータベースに登録されている（参照 9）。これらの酵素は呼吸器系感作の報告があり、製パン現場、家畜飼料工場において使用され、喘息等との関連性も報告されている（参照 10、11）が、これらは特定職種での高頻度ばく露が起因と考えられる。一方で、*A. oryzae* は、国内では味噌、醤油、醸造酒等の製造に安全に使用されてきた経緯があることから、この二つの酵素を原因とする職業ばく露によるアレルギーが *A. oryzae* のアレルギー性のリスクを示すものとは言い難い。しかしながら、リスクの低減のため、他の糸状菌と同様、本菌を扱うときには孢子が飛散しないように十分に気をつける必要がある。

以上のことから、本菌が適切な環境で扱われている限り、*A. oryzae* によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. oryzae が腸管内に定着することは知られていない。

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. oryzae は、ヒトに対して病原性を示すような外来性因子は知られていない。

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. oryzae の近縁種である *A. fumigatus* は、日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られている。また、*A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* は、有害生理活性物質であるアフラトキシンを産生することが知られている。

第3章 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 pJPV004 の作製には、プラスミド pUC19 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 pUC19 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 pUC19 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 pUC19 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 pUC19 には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれている。
- (5) 伝達性に関する事項
プラスミド pUC19 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 pUC19 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
lipHL1232 遺伝子の供与体は、*T. lanuginosus* CBS586.94 株及び *F. oxysporum* DSM2672 株である。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株及び *S. cerevisiae* FL100 株である。
- (2) 安全性に関する事項
T. lanuginosus は、自然界に広く存在する高温菌であり、プーアル茶の発酵パイル中に存在することが知られている。
F. oxysporum は土壌中などに普遍的に生育しており、植物病原菌として知られているが、病原性が見られるのは本菌種の分化型であり、かつ限られた宿主植物種に対して病原性を示す（参照 12）。
A. nidulans の食経験は特に知られていないが、*amdS* 遺伝子は選抜マーカーとして長年にわたり利用されており、本遺伝子を導入された組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられている。
S. cerevisiae は、パン酵母及びアルコール発酵用酵母として食品製造において長年にわたり安全に使用されている。
T. lanuginosus、*F. oxysporum*、*A. nidulans* 及び *S. cerevisiae* は国立感染症研究所の病原体等安全管理規程における BSL2 及び 3 に相当する病原体等に分類されていない。また、ヒト及び動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられることから、BSL1 に相当すると考えられる（参照 8）。

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

lipHL1232 遺伝子は *TLLv* 遺伝子及び *FOL* 遺伝子の配列に基づいて合成されている。*TLLv* 遺伝子は、*T. lanuginosus* CBS586.94 株のゲノム DNA から NOVOZYM677 をコードする *TLL* 遺伝子を得た後、PCR を用いた位置特異的変異導入法にて NOVOZYM677 のアミノ酸配列に置換が生じるよう作製されている。また、*FOL* 遺伝子は、*F. oxysporum* DSM2672 株のゲノム DNA から *FOL* をコードする *FOL* 遺伝子を PCR により増幅することで得られている。*lipHL1232* 遺伝子は、アミノ酸置換を行った NOVOZYM677 の一部アミノ酸領域をコードする遺伝子断片及び *FOL* の一部アミノ酸領域をコードする遺伝子断片を融合して合成されており、HL1232 をコードする。

amdS 遺伝子は、*A. nidulans* Glasgow 野生株のゲノム DNA から、*URA3* 遺伝子は、*S. cerevisiae* FL100 株のゲノム DNA から、それぞれ PCR にて得られている。

（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 の塩基数及び塩基配列と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

・ *lipHL1232* 遺伝子

lipHL1232 遺伝子が発現する HL1232 は、トリアシルグリセロールの 1 及び 3 位のエステル結合及びリン脂質の 1 位にあるエステル結合を加水分解する。

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

T. lanuginosus 及び *F. oxysporum* は他の糸状菌と比べて特にアレルギー誘発性を有する菌種ではなく、また、*T. lanuginosus* 及び *F. oxysporum* のリパーゼのアレルギー誘発性に関する報告はないとしている。したがって、*T. lanuginosus* 及び *F. oxysporum* によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

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

HL1232 を有効成分とする酵素製剤について、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

HL1232 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 30

秒以内に HL1232 は分解されていることが確認された。また、ウェスタンブロット分析では、HL1232 よりも分子量が大きいバンドが確認され、当該バンドの分解性は HL1232 よりも低いことが確認された（参照 13、14）。

②人工腸液に対する感受性

HL1232 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、HL1232 は試験開始後 2 時間まで分解したものの、それ以上の時間では経時的にバンドが濃くなる傾向が示された。さらに、人工胃液試験で確認された HL1232 よりも分子量が大きいバンドについても、同様に存在が確認された（参照 13、14）。

人工胃液及び人工腸液処理の結果、ともに HL1232 よりも分子量が大きいバンドが確認されたが、当該バンドに相当する物質の本製剤中での存在量は低いと考えられること、また、HL1232 は人工胃液処理において速やかに分解されることを考慮すると、HL1232 は摂取後速やかに分解され、アレルギー誘発性を惹起する可能性は低いと考えられた。

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

・ *lipHL1232* 遺伝子

HL1232 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は検出されなかった。

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 15）。

・ *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを分解し、アセトアミドを唯一の窒素源として利用できることにより、選択マーカーとして使用された。アセトアミダーゼについて、アレルギー誘導性及び毒性を示す報告はない。また、*amdS* 遺伝子を含む導入領域に同定されたオープンリーディングフレーム (ORF) に、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すものがないことを確認している。

・ *URA3* 遺伝子

URA3 遺伝子はオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、ウリジン要求性を相補する選択マーカーとして使用されている。オロチジ

^a ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version 15)

ン 5'-リン酸デカルボキシラーゼについて、アレルギー誘導性及び毒性を示す報告はない。

以上のことから総合的に判断し、HL1232、アセトアミダーゼ及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼはアレルギー誘発性を有さないものと考えられる。

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

lipHL1232 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株の中性アミラーゼ II をコードする *amyB* 遺伝子のプロモーター断片に、*A. nidulans* Glasgow 野生株のトリオースリン酸異性化酵素をコードする遺伝子のプロモーター断片を連結させた *na2/tpi* 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 *amdS* 遺伝子の野生型プロモーター配列である。*URA3* 遺伝子のプロモーターは、*S. cerevisiae* に由来する *URA3* 遺伝子の野生型プロモーター配列である（参照 16）。

(2) ターミネーターに関する事項

lipHL1232 遺伝子のターミネーターは *A. niger* BO-1 株に由来する *AMG* 遺伝子の *AMG* ターミネーター配列である。*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子のターミネーターは、それぞれ自身の野生型ターミネーター配列である（参照 16）。

(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

該当する配列はない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV004 は、プラスミド pUC19 に、*na2/tpi* プロモーター断片、*lipHL1232* 遺伝子断片、*AMG* ターミネーター断片、*amdS* 遺伝子断片及び *URA3* 遺伝子断片を挿入することによって作製された（参照 17）。

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 pJPV004 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 16）。

(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 pJPV004 について、六つの読み枠において 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 153 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結果、80 アミノ酸残基で 35%以上及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった（参照 18）。

さらに、これら 153 個の ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース（参照 19）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、2 個の ORF が MvirDB データベース中のタンパク質に相同性を示したが、これら二つのタンパク質が毒性を有するとの報告はない。したがって、本酵素製剤中に毒性タンパク質が含まれる可能性は低いと考えられる。

- (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 pJPV004 の全領域である。

- (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 pJPV004 は、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV004 を宿主ゲノムへプロトプラスト形質転換法を用いて環状のまま導入した。その結果、pJPV004 は宿主ゲノム上の任意の位置に、いずれかの位置を末端としてタンデムに複数コピー挿入されていると考えられる（参照 20、21）。

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 pJPV004 は抗生物質耐性マーカーを有していない。

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

JPAo001 株は、pJPV004 の挿入により *lipHL1232* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子が導入され、*amyC* 遺伝子等の遺伝子を欠失してい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

JPAo001 株の染色体上での pJPV004 の導入部位を調べるために、全ゲノム解析を行った。その結果、1 箇所 *lipHL1232* 遺伝子が複数コピー存在するこ

とが判明し、遺伝子導入領域の全配列の解読はできなかったが、遺伝子導入部位は、二つの機能未知の遺伝子の間に位置することから、内在性遺伝子は破壊されていないと考えられた。また、遺伝子導入領域近傍の制限酵素切断地図及び塩基配列はシーケンス解析により明らかになっている（参照 22、23）。さらに、定量 PCR 法を用いてコピー数を解析した結果、JPAo001 株の複数コピーの *lipHL1232* 遺伝子が導入されていることが確認されたとしている（参照 24）。

(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

JPAo001 株の遺伝子挿入領域と宿主ゲノムとの接合部位を跨ぐ領域における ORF 検索を行った。

その結果、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 ORF は、合計 219 個検出された。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結果、80 アミノ酸残基で 35%以上及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンはなかった（参照 25、26）。さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース（参照 19）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、1 個の ORF がクロコケグモの神経毒タンパク質と相同性を示したが、全長 1000 アミノ酸残基以上のうち、およそ 60 アミノ酸残基での相同性があるのみであり、タンパク質に翻訳されたとしても活性に必要な構造を有するとは考えられない（参照 25、27）。したがって、アレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられるとしている。

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

HL1232 の製造原料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、本製品の原料は、Food Chemical Codex (FCC) の食品酵素規格に適合している。また、製造器材は食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績がある。

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

HL1232 の製造原料及び製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に安全に用いられている実績を有する。

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

HL1232 は、2002 年から欧米において使用されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット分析により、HL1232 の製剤中には染色体 DNA が残存しないことが確認された（参照 28）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

HL1232 の製剤前の酵素サンプルは、JECFA の食品用酵素の規格値及び FCC の規格値を満たしている。また、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸、シクロピアゾン酸及びアフラトキシンの産生量を分析した結果、いずれも検出限界未満であることを確認している（参照 29、30）。製造原料は食品用酵素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

HL1232 製剤は、生産菌の培養物を、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経ることで得られる。これらの工程において安全性に問題のある物質が混入することはないと考えられる。

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

HL1232 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、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)

申請者から遺伝毒性及び反復投与毒性試験に関する試験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、HL1232 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細菌による復帰突然変異試験（参照 31）

細菌（*Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 株及び *E. coli* WP2uvrA 株）を用いた復帰突然変異試験（処理濃度：0、156、313、625、1,250、2,500 及び 5,000 $\mu\text{g/ml}$ ）を行った結果、代謝活性化系の有無に関わらず被験物質に関連した異常は認められなかった。

②染色体異常試験（参照 32）

ヒトの末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験（短時間処理濃度：0、3,200、4,000 及び 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 、連続処理濃度：0、3,613、4,250 及び 5,000 $\mu\text{g/ml}$ ）を行った結果、代謝活性化系の有無に関わらず被験物質に関連した異常は認め

られなかった。

(2) 13 週間強制経口投与試験 (参照 33)

CD ラット (1 群雄雌各 10 匹) に、被験物質を 0、0.102、0.337 及び 1.020 g TOS/kg 体重/日で 13 週間強制経口投与し、体重及び摂餌量/摂水量の測定、眼科学的検査、血液検査、血液生化学検査及び病理組織学的検査等を行った。

その結果、最高用量投与群の雄で総コレステロールの減少が認められたが、肝臓等に関連する病理組織学的所見が認められないことから毒性学的意義のある変化とは考えられなかったとしている。したがって、本試験の NOAEL (無毒性量) は、1.020 g TOS/kg 体重/日としている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPAo001 株を利用して生産されたリパーゼ」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. 社内文書 1 : Baking: Dough strengthening (Application sheet)
2. 平成26 年 国民健康・栄養調査報告 (厚生労働省)
3. 社内文書 3 : 欠失導入用ベクターを用いたDNA 欠失の概要
4. 社内文書 4 : *Aspergillus oryzae* BECh2 株に関する情報
5. Barbesgaard, Peder, et al., On the Safety of *Aspergillus oryzae*: a Review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 569-572. (1992)
6. 社内文書 5 : Analysis of selected strains derived from *A. oryzae* A1560 for production of mycotoxins
7. Mustranta, A. et al., Modification of phospholipids with lipases and phospholipases. Biocatalysis 9, 181-194 (1994)
8. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (平成 2 2 年 6 月)
9. Search Results with *Aspergillus oryzae* from Allergen Nomenclature (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee)
10. Baur, X. et al., Isolation and denomination of an important allergen in baking additives: α -amylase from *Aspergillus oryzae* (Asp o II). Clin. Exp. Allergy, 24, 465-470 (1994)
11. Shen, Horng-Der et al., Alkaline serine proteinase: A major allergen of *Aspergillus oryzae* and its cross-reactivity with *Penicillium citrinum*. Int. Arch. Allergy Immunol., 116, 29-35 (1998)
12. Mehrabi, Rahim et al., Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. FEMS Microbiol. Rev, 35, 542-554 (2011)
13. 社内文書 7 : Digestibility of HL1232 protein in a product formulation
14. 社内文書 : 回答書添付資料 1 Digestibility of HL1232 protein in a product formulation, January 20, 2017
15. 社内文書 8 : Sequence homology of lipase expressed by JPAo001 to allergens
16. 社内文書 9 : 遺伝子導入ベクター-pJPV004 及びJPAo001 株の遺伝子導入領域におけるDNA 塩基配列並びに構成
17. 社内文書 1 0 : Outline of pJPV004 construction
18. 社内文書 1 1 : Sequence homology of ORFs in the expression plasmid pJPV004 to proteins
19. Zhou et. al., 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)
20. 五味勝也、カビの形質転換系の開発とその利用 化学と生物 28 91-100 (1990)
21. Kelly, J. M. et al., Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* The EMBO J. 4(2) 475-479 (1985)
22. 社内文書 1 2 : 遺伝子導入領域の制限酵素地図
23. 社内文書 1 3 : 遺伝子導入領域の塩基配列

24. 社内文書 1 4 : Copy number determination of the lipHL1232 gene in the GM production strain
25. 社内文書 1 5 : Sequence homology of ORFs in the flanking regions of the inserted expression plasmid on the genome of JPAo001 to proteins from MvirDB and allergens
26. 社内文書 1 6 : Sequence homology of ORFs in the AmyC locus on the genome of JPAo001 to proteins from MvirDB and allergens
27. Graudins, A. et al., Cloning and activity of a novel α -latrotoxin from re-back spider venom. *Biochemical Pharmacology* 83 170-183 (2012)
28. 社内文書 1 7 : The analysis of residual DNA in HL1232's product formulation by means of dot blot hybridization
29. 社内文書 1 8 : Extract from "Food enzyme application: Lipase from *Aspergillus oryzae*" (EFSA (European Food Safety Authority)に提出した安全性審査資料)
30. 社内文書 1 9 : 試験成績証明書 ((一財) 食品環境検査協会)
31. 社内文書 2 1 : Lipase (Batch Number: PPW 7023): Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*
32. 社内文書 2 2 : Induction of chromosome aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes
33. 社内文書 2 3 : Lipase, PPW 7023 Toxicity study by oral gavage administration to CD rats for 13 weeks