



府 食 第 1 6 7 号
平成 31 年 3 月 26 日

厚生労働大臣
根本 匠 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 30 年 10 月 10 日付け厚生労働省発生食 1010 第 3 号をもって貴省から当委員会に意見を求められた *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラ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 1 のとおりです。

また、本件に関して行った国民からの意見・情報の募集において、別添 2 のとおり、貴省に関する意見・情報が寄せられましたので添付します。

記

Escherichia coli K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラゼについては、「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。また、添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、一日摂取許容量を特定する必要はない。

添加物・遺伝子組換え食品等評価書

Escherichia coli K-12 W3110
(pWKLP) 株を用いて生産された
プシコースエピメラーゼ

2019年3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
<食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>	3
要 約	5
I. 評価対象品目の概要	6
1. 用途	6
2. 名称等	6
3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法	6
(1) 基原	6
(2) 製造方法	6
(3) 成分	7
(4) 性状等	8
(5) 使用方法	8
4. 起源又は発見の経緯等	8
5. 我が国及び諸外国における使用状況	9
(1) 我が国における使用状況	9
(2) コーデックス委員会	9
(3) 米国における使用状況	9
(4) EUにおける使用状況	9
(5) その他の国における使用状況	9
6. 国際機関等における評価	9
(1) 我が国における評価等	9
(2) JECFAにおける評価	10
(3) 米国における評価	10
(4) EUにおける評価	10
(5) その他の機関における評価	10
7. 遺伝子組換え技術に係る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	10
(1) 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料	10
(2) 宿主及び導入 DNA	11
(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	11
(4) 宿主の構成成分等に関する資料	11
(5) 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	11
(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	12
8. 評価要請等の経緯、指定の概要	12

9. 評価に適用されるべき指針等	12
II. 安全性に係る知見の概要	13
1. 遺伝子組換えに係る安全性	13
(1) 宿主に関する事項	13
(2) ベクターに関する事項	13
(3) 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	14
(4) 組換え体に関する事項	16
(5) 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	16
(6) 遺伝子組換え添加物に関する事項	17
2. 酵素の消化管内での分解性に関連する事項	17
3. 酵素の毒性	19
(1) 遺伝毒性	19
(2) 反復投与毒性	20
(3) アレルゲン性	21
III. 一日摂取量の推計等	22
1. 国際機関等における推計	22
2. 我が国における推計	22
IV. 食品健康影響評価	25
<別紙：略称>	27
<参照>	28

<審議の経緯>

- 2018年10月11日 厚生労働大臣から添加物の指定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1010第3号）、関係書類の接受
- 2018年10月16日 第716回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年11月12日 第169回添加物専門調査会
- 2019年1月15日 第726回食品安全委員会（報告）
- 2019年1月16日から2月14日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2019年3月20日 添加物専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2019年3月26日 第736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>

（2018年7月1日から）

- 佐藤 洋 （委員長）
山本 茂貴 （委員長代理）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
吉田 充

<食品安全委員会添加物専門調査会専門委員名簿>

（2018年4月1日から）

- 梅村 隆志 （座長）
頭金 正博 （座長代理）
石井 邦雄
石塚 真由美
伊藤 清美
伊藤 裕才
宇佐見 誠
佐藤 恭子
杉山 圭一
祖父江 友孝
高須 伸二
高橋 智
塚本 徹哉
戸塚 ゆ加里

中江 大
西 信雄
北條 仁
松井 徹
森田 明美
山田 雅巳

〔調査審議に参加した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〕¹

児玉 浩明
手島 玲子
中島 春紫

¹ 「遺伝子組換え微生物を利用して製造された酵素を新たに添加物として指定すること等について、食品安全基本法第24条の規定に基づき意見を求められた場合の取扱いについて」（平成30年10月16日食品安全委員会決定）に基づき調査審議の際に招へいた遺伝子組換え食品等専門調査会の専門委員。

要 約

添加物として使用される遺伝子組換え技術を用いて生産された酵素「*Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ」について、「添加物（酵素）に関する食品健康影響評価指針」（平成 29 年 7 月 18 日食品安全委員会決定。以下「酵素指針」という。）及び「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。以下「評価基準」という。）に基づき、各種試験成績等を用いて食品健康影響評価を実施した。

評価に供した試験成績等は、*E. coli* K-12 株及び *Arthrobacter globiformis* の病原性及び毒素産生性に関するもの並びに *E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼを被験物質とした遺伝毒性、反復投与毒性、アレルギー性等に関するものである。

本委員会としては、本品目の組換え DNA 技術応用添加物の安全性審査に係る食品健康影響評価については、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と判断した。

また、本委員会としては、本品目の添加物としての指定及び規格基準設定に係る食品健康影響評価については、以下のように判断した。

本品目の製造を目的として適切に管理された生産菌株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような安全性の懸念はない。

本品目について、酵素指針における「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」を検討した結果、本品目の毒性については、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与による毒性及びアレルギー性に係る知見を用いて評価を行うこととした。

本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性及び反復投与による毒性の懸念はなく、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低い。

ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における最高用量から得られた NOAEL 2.0% (TOS 換算で雄：1.02 g TOS/kg 体重/日、雌：1.12 g TOS/kg 体重/日) と、本品目の推定一日摂取量（国民全体で 0.332 mg TOS/kg 体重/日、小児で 0.918 mg TOS/kg 体重/日）とを比較して得られる安全マージンは十分である。

以上を踏まえ、本委員会としては、本品目について、添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、ADI を特定する必要はないと判断した。

I. 評価対象品目の概要

1. 用途

製造用剤（参照 1）

2. 名称等

和名：*Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ

英名： Psicose Epimerase expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP)（参照 1）

EC²番号：未登録（参照 1）

CAS 登録番号：1618683-38-7（参照 2）

要請者：松谷化学工業株式会社

開発者：松谷化学工業株式会社

3. 基原、製造方法、成分、性状等及び使用方法

(1) 基原

今般、厚生労働省に添加物「*Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ」（以下「本品目」という。）の添加物としての指定及びそれに関連した規格基準の設定を要請した者（以下「指定等要請者」という。）によれば、本品目の基原は *Arthrobacter globiformis* M30 であるとされている。指定等要請者によれば、*A. globiformis* は第 9 版食品添加物公定書においてグルコースイソメラーゼの基原として掲げられており、アメリカ培養細胞系統保存機関（ATCC）における分類が Biosafety level 1（ヒトに疾病を起こすことが知られていないもの）であるとされている。（参照 3、4、5）

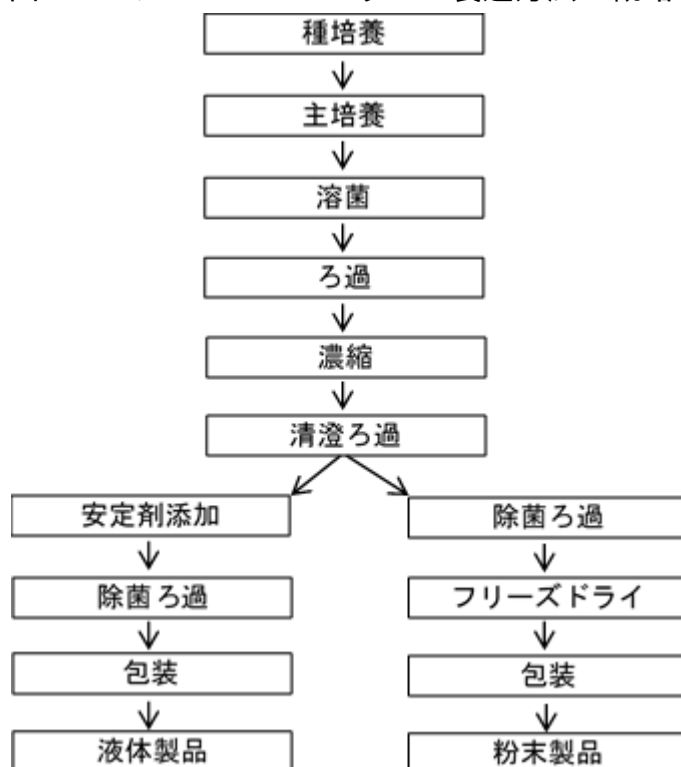
指定等要請者によれば、本品目の生産菌株である *E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株は *A. globiformis* が本来有するプシコースエピメラーゼ遺伝子を含む発現ベクター pWKLP を宿主である *E. coli* K-12 W3110 株に導入して得られたとされている。（参照 1）

(2) 製造方法

指定等要請者によれば、本品目の製造方法の概略は図 1 のとおりとされている。生産菌は、溶菌工程で不活化され、ろ過工程、清澄ろ過工程及び除菌ろ過工程で生産物から充分に分離除去されるため、本品目に残存することはないとされている。（参照 1）

² 本文中で用いられた略称については、別紙 1 に名称等を示す。

図1 プシコースエピメラーゼ製造方法の概略



(3) 成分

指定等要請者によれば、本品目の有効成分はホモテトラマーの酵素であり、サブユニットは 32 kDa、アミノ酸配列から予想される等電点は 4.86 であるとされている。サブユニットのアミノ酸残基数は 289 であり、その配列は図 2 に示すとおりであるとされている。(参照 1、6、7)

図2 有効成分のサブユニットのアミノ酸一次配列

1	MKIGCHGLVW	TGHFDAEGIR	YSVQKTREAG	FDLVEFPLMD	PFSFDVQTAK
51	SALAEHGLAA	SASLGLSDAT	DVSSDPAAVV	KAGEELLNRA	VDVLAELGAT
101	DFCGVIYSAM	KKYMEPATAA	GLANSKAAVG	RVADRASDLG	INVSLEVVNR
151	YETNVLNTGR	QALAYLEELN	RPNLGIHLDT	YHMNIEESDM	FSPILDTAEA
201	LRYVHIGESH	RGYLGTSVD	FDTFFKALGR	IGYDGPVVFE	SFSSSVVAPD
251	LSRMLGIWRN	LWADNEELGA	HANAFIRDKL	TAIKTIELH	

また、指定等要請者によれば、既知のタンパク質との相同性について、本品目のアミノ酸配列を基に National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BlastP プログラムで検索した結果、本品目は新規のタンパク質であることが確認されたとされている。(参照 8)

指定等要請者によれば、本品目の全タンパク質当たりのプシコースエピメラーゼ量は、65.0~71.7%に相当したとされている。(参照 9)

(4) 性状等

指定等要請者の成分規格案によれば、本品目の性状は、淡褐色から濃褐色の液体又は灰色の粉末であるとされている。(参照 1)

(5) 使用方法

指定等要請者によれば、本品目はプシコース³の製造用剤であり、プシコースの生産において、フルクトース⁴水溶液に本品目を添加して使用する又は本品目をイオン交換樹脂等の担体に吸着させて固定化したものにフルクトース溶液を通過させて使用するとされている。後者の場合、カラムに充填し固定化した後、そのカラムにフルクトース水溶液を通過させて連続的に使用することができ、この手法が実用的な使用形態であるとされている。プシコースエピメラーゼの異性化反応は平衡反応であり、例えば 30℃ではフルクトース：プシコース=76：24であって、プシコースの生産においては酵素反応時間を調整して平衡付近まで反応させるとされている。また、指定等要請者によれば、副反応は知られていないとされている。(参照 1、3、6)

4. 起源又は発見の経緯等

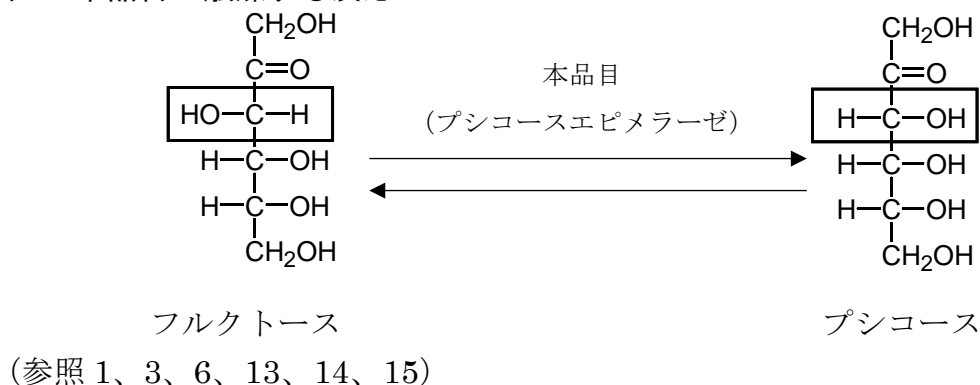
1994年、香川大学の何森らは、フルクトースを異性化してプシコースに変換する酵素を発見した。これによりプシコースの生産が可能となった。プシコースはフルクトースに類似の味質や物性を備え、エネルギー値はほぼゼロであり、食後の血糖上昇抑制作用を示すとされている。(参照 1、10、11、12)

指定等要請者によれば、工業的大量生産に有用な微生物由来のプシコース生産酵素の探索を開始したところ、プシコース及びフルクトースの異性化反応を触媒し、それ以外の副反応がない *A. globiformis* M30 株由来のケトース 3-エピメラーゼを 2011年に発見したとされている。2012年、*A. globiformis* M30 株由来のプシコースエピメラーゼ遺伝子がクローニングされたことから、当該遺伝子を *E. coli* K-12 W3110 株に導入して生産された酵素製品が本品目である。本品目が触媒する異性化反応は、図 3 に示すとおりである。

³ 以降全て D 体を指す。

⁴ 以降全て D 体を指す。

図3 本品目が触媒する反応



5. 我が国及び諸外国における使用状況

(1) 我が国における使用状況

我が国において、本品目の添加物としての使用は認められていない。

(2) コーデックス委員会

コーデックス委員会の策定したコーデックス食品添加物一般基準 (GSFA) では、加工助剤 (酵素を含む) は対象とされていない。

(3) 米国における使用状況

米国では、指定等要請者がプシコースについて一般に安全とみなされる (GRAS) 物質としての届出を行ったところ、2014年、FDA から当該届出に異議がない旨の回答がなされており、このプシコースを生成する酵素として本品目を使用できるとされている。(参照 1、16、17、18)

(4) EU における使用状況

指定等要請者によれば、欧州連合 (EU) (フランス及びデンマークを除く。) では、加工助剤として用いる食品用酵素について、2018年9月現在で規制がないため、本品目は法令上使用可能であるが、使用された実績はないとされている。また、フランス及びデンマークでは、酵素に関する独自の規制が実施され、本品目は法令上使用不可とされており、使用された実績はない。(参照 1)

(5) その他の国における使用状況

指定等要請者によれば、オーストラリア及びニュージーランドでは、本品目は法令上使用不可とされており、使用された実績はない。(参照 1)

6. 国際機関等における評価

(1) 我が国における評価等

我が国において、本品目の食品健康影響評価は行われていない。

(2) JECFAにおける評価

FAO/WHO 食品添加物専門家会議 (JECFA) において、本品目の評価は行われていない。

(3) 米国における評価

本品目は FDA に対して GRAS 物質としての届出がなされ、2016 年、当該届出に異議がない旨の回答が出されている。(参照 19、20、21)

(4) EU における評価

欧州食品安全機関 (EFSA) において、本品目の評価は行われていない。(参照 1)

(5) その他の機関における評価

オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) において、本品目の評価は行われていない。(参照 1)

7. 遺伝子組換え技術に係る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

プシコースエピメラーゼは未指定の添加物であるため、我が国において、比較対象とされる従来の添加物がない。本品目のような遺伝子組換え技術を利用した未指定添加物の評価においては、比較対象となる添加物はないものの、通常の添加物としての評価に必要な資料に基づく検討に加え、評価基準に基づき評価可能な項目を検討することにより、安全性の評価が可能であると考えられた。

なお、同基準における比較対象とはならないが、参考として米国において GRAS 認定されている *A. globiformis* 由来のプシコースエピメラーゼとの比較について記載した。(参照 16)

① 名称、基原及び有効成分

名称：プシコースエピメラーゼ

基原：*A. globiformis*

有効成分：プシコースエピメラーゼ

CAS No. : 1618683-38-7

② 製造方法

培養液から菌体を回収し、ビーズミルを用いて細胞破碎後、遠心分離して上清を採取する。

③ 用途及び使用形態

フルクトースに本品目を作用させることで、フルクトースを異性化してプシコースが生成されるため、本品目はプシコースの製造用剤として使用される。フルクトース水溶液に本品目を直接添加し、イオン交換樹脂などに本品目を固定した後、フルクトース水溶液を通過させて使用する。

④ 摂取量

プシコースが添加される対象食品群の一日摂取量（参照 22）にプシコースの最大添加量を乗じることで、プシコースの推定一日摂取量を算出した（20.34 g/日）。この値にプシコースに残存するプシコースエピメラーゼの全有機固形分（Total Organic Solids (TOS)）の割合を乗じることによりプシコースエピメラーゼの推定一日摂取量を算出したところ、429.1 µg TOS/kg 体重/日であった。

（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、*E. coli* K-12 W3110 株である。

② DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

プシコースエピメラーゼ遺伝子の供与体は、*A. globiformis* M30 株である。

③ 挿入 DNA の性質及び導入方法

プシコースエピメラーゼ遺伝子はプシコースエピメラーゼをコードする。当該酵素は、フルクトースをプシコースに変換するエピマー化反応を触媒する異性化酵素である。発現ベクター pWKLp を塩化カルシウム法により *E. coli* K-12 W3110 株に導入し、形質転換を行った。

（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

E. coli K-12 株は、添加物の製造に用いられた実績がある。（参照 23）

（4）宿主の構成成分等に関する資料

E. coli K-12 株及びその由来株に有害生理活性物質を産生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いて Biosafety level 1 に相当する。（参照 24）

（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：マツラーゼ FE

有効成分：プシコースエピメラーゼ

② 製造方法

3. (2) に記載のとおりである。

③ 用途及び使用形態

7. (1) ③ に記載のとおりである。

④ 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

有効成分は同一である。なお、*E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株は、*A. globiformis* M30 株に比較して数百倍の生産性を有する。(参照 25)

(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

従来の添加物の生産菌は *A. globiformis* M30 株であり、本品目の生産菌は *E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株である点である。なお、アミノ酸配列は同一である。(参照 6、7)

② 組換え体と宿主

E. coli K-12 W3110 (pWKLP) 株と宿主との相違点は、*E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株には発現プラスミド pWKLP が導入され、プシコースエピメラーゼ産生能を有する点である。

8. 評価要請等の経緯、指定の概要

今般、本品目について、指定等要請者から厚生労働省に、添加物としての指定及び規格基準の設定並びに本品目における組換え DNA 技術に関する安全性について、関係書類が取りまとめられたことから、食品安全基本法（平成 15 年法律第 48 号）第 24 条第 1 項第 1 号並びに同法第 24 条第 1 項第 14 号、食品安全委員会令（平成 15 年政令第 273 号）第 1 条第 1 項及び食品安全委員会令第 1 条第 1 項の内閣府令で定めるときを定める内閣府令（平成 15 年内閣府令第 66 号）第 1 号の規定に基づき、食品安全委員会に対して、食品健康影響評価の要請がなされたものである。

なお、厚生労働省は、本品目に使用基準は設けないこととしている。

9. 評価に適用されるべき指針等

本品目について、本委員会としては、酵素指針に基づき評価を行うこととした。また、必要に応じて、評価基準に基づき評価を行った。

II. 安全性に係る知見の概要

1. 遺伝子組換えに係る安全性

(1) 宿主に関する事項

① 分類学上の位置づけ（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は *E. coli* K-12 W3110 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

E. coli K-12 株誘導体は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られておらず、Biosafety level 1 に相当する。（参照 24）

③ 寄生性及び定着性に関する事項

E. coli K-12 株誘導体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

E. coli K-12 株誘導体には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

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

E. coli は、環境中に存在するバクテリアの主要な種の 1 つであり、ヒト等の腸内細菌でもある。*E. coli* の多くは無害であるが、病原性大腸菌の存在が知られている。

(2) ベクターに関する事項

① 名称及び由来に関する事項

発現ベクター pWKLP の作製には、pBR322 由来のプラスミド pKK223-3 が用いられた。

② 性質に関する事項

a. DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pKK223-3 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。（参照 26）

b. 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pKK223-3 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

c. 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 pKK223-3 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。

d. 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pKK223-3 にはアンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐

性遺伝子が含まれている。

e. 伝達性に関する事項

プラスミド pKK223-3 には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。(参照 27)

f. 宿主依存性に関する事項

プラスミド pKK223-3 の複製開始配列は、*E. coli* で機能する。(参照 28)

(3) 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

a. 名称、由来及び分類に関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子の供与体は *A. globiformis* M30 株である。*A. globiformis* M30 株は、指定等要請者によって、工業的な大量生産に有用なプシコース生産酵素を産生する微生物として、土壌から単離された微生物である。

b. 安全性に関する事項

A. globiformis は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られておらず、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において Biosafety level 1 に相当する。(参照 24)

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

a. 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

A. globiformis M30 株の全ゲノム配列を決定し、プシコースエピメラーゼ遺伝子の塩基配列を同定した。プシコースエピメラーゼ遺伝子は、*A. globiformis* M30 株のゲノムを鋳型にして PCR 法により得た。(参照 15)

b. 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

プシコースエピメラーゼ遺伝子の塩基数、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。

c. 挿入遺伝子の機能に関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子が発現するプシコースエピメラーゼは、フルクトースを異性化してプシコースを生成する。

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

a. プロモーターに関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子のプロモーターは *tac* プロモーター配列である。*tac* プロモーターは、*E. coli* 由来の *trp* プロモーター及び *lac* プロモーターのそれぞれ一部を連結させたハイブリッドプロモーターである。(参照 29)

b. ターミネーターに関する事項

プシコースエピメラーゼ遺伝子のターミネーターは、*E. coli* 由来の *rrnB* ターミネーター配列である。(参照 30)

c. 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

プシコースエピメラーゼ遺伝子の翻訳効率を向上させるため、シャイン・ダルガノ (SD) 配列をプシコースエピメラーゼ遺伝子上流に挿入した。(参照 31)
また、*E. coli* 由来の改変 *lacI* 遺伝子を導入して、プシコースエピメラーゼ遺伝子の転写を適切に制御した。(参照 32)

④ ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項

発現ベクター pWKLP は、プラスミド pKK223-3 に改変 *lacI* 遺伝子を挿入して中間ベクターを作製し、プシコースエピメラーゼ遺伝子及び SD 配列を挿入することにより作製された。(参照 33)

⑤ 構築された発現ベクターに関する事項

a. 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

発現ベクター pWKLP の塩基数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 34)

b. 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

発現ベクター pWKLP について、6 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、開始コドンから終止コドンで終結される連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 105 個見いだされた。(参照 35)

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性を調査するため、データベース⁵を用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸配列が 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。また、タンパク質データベース⁶を用いて、E-value<0.01 を指標

⁵ AllergenOnline v16 (January 27, 2016)

⁶ Virulence BLAST Interface

として相同性検索を行った結果、相同性を示す 14 個のタンパク質が検出されたが、いずれも毒性タンパク質との報告はなかった。(参照 36、37)

c. 発現ベクター上の意図する挿入領域に関する事項

意図する挿入領域は、発現ベクターpWKLP の全領域である。

d. 挿入遺伝子の純化に関する事項

発現ベクターpWKLP 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

発現ベクターpWKLP を用いて、塩化カルシウム法により宿主を形質転換した後、アンピシリンを含む寒天培地で選抜することにより、*E. coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を得た。なお、発現ベクターpWKLP は染色体外にプラスミドとして存在している。

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pWKLP はアンピシリン耐性遺伝子を持つ。アンピシリン耐性遺伝子はβ-ラクタマーゼをコードする遺伝子であり、β-ラクタマーゼは一般細菌、放線菌及び真菌でも生産されることが知られている。(参照 38) これまで安全に使用されてきた実績がある。なお、本品目の製造のための生産菌培養過程においてアンピシリンは使用されていない。

(4) 組換え体に関する事項

① 宿主との差異に関する事項

E. coli K-12 W3110 (pWKLP) 株は、発現ベクターpWKLP をプラスミド DNA として有する点で宿主と異なる。

② 遺伝子導入に関する事項

a. 制限酵素による切断地図に関する事項

発現ベクターpWKLP の塩基配列及び制限酵素地図は明らかである。

b. 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

(3) ⑤ b に記載のとおりである。

(5) 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

本品目の製造原料は食品原料及び食品添加物を用いており、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

本品目の製造原料は食品原料及び食品添加物を用いており、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ため、安全であると考えられる。

(6) 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

I. 5. 及び6. に記載のとおりである。

② 組換え体の残存に関する事項

本品目中の発現ベクターpWKLP由来のDNA残存について、定量PCR法にて解析した結果、検出されたDNA量は約10ppbと低い結果であったため(参照39)、安全性には問題はないと考えられた。

③ 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

E. coli K-12株誘導体は、添加物製造に使用されている実績があり、問題のある非有効成分が含まれることは考えにくい。

④ 精製方法及びその効果に関する事項

本品目の精製は、溶菌、ろ過、除菌等の工程を経て行われ、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

本品目のプシコースエピメラーゼ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。

2. 酵素の消化管内での分解性に関連する事項

酵素指針に基づき、以下の(1)から(5)までについて検討した。

(1) 消化管内で容易に分解されること。

指定等要請者によれば、本品目の酵素原末(Lot番号:3T-2)を、人工胃液又は人工腸液中において、37℃でインキュベーションを行った後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法に供する試験が実施されている。インキュベーション時間は人工胃液では15若しくは30秒又は1、2、5、10、30分間、人工腸液では1、10、30、60、120又は180分間とされている。その結果、人工胃液処理では反応1分間で当該酵素バンドは完全に消失したが、当該酵素の分解に伴い10kDa以下

に低分子のペプチドのバンドが認められたとされている。一方、人工腸液処理では反応 60 分間で当該酵素バンドは完全に消失し、かつ低分子ペプチドのバンドは認められなかったとされている。(参照 40)

指定等要請者によれば、加熱処理による本品目の分解性については、プシコースの製造工程で加熱過程がないこと、ヒトが経口摂取する際に加熱過程がない場合があること等の理由により、実施していないとされている。(参照 1)

人工胃液処理では、本品目の 10kDa 以下までの分解が確認され、部分分解物が認められたものの、人工腸液処理では認められなかったことから、本委員会としては、本品目は、消化管内で容易に分解されると考えた。

(2) 消化管内での分解に関わる主要な因子 (pH、酵素等) が明らかであること。

指定等要請者によれば、2. (1) の消化試験において、本品目の分解に関わる主要な因子は pH 1.1 でのペプシン及び pH 6.9 でのパンクレアチン (膵液に含まれる多種の酵素の混合物であり、トリプシン及びキモトリプシン等の酵素を含む) であるとされている。(参照 40)

(3) 酵素の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、当該酵素又はその分解物の体内への吸収が食品成分と同程度であり、他の栄養成分の吸収を阻害しないこと。

本委員会としては、指定等要請者の考察を基に、以下を踏まえ、本品目が他の栄養成分の吸収を阻害する懸念はないと考えた。(参照 1)

- ・本品目は消化管内で容易に分解され、他の食品由来のタンパク質と同じように体内へ吸収されると考えられること。
- ・本品目はプシコースの生産に利用される酵素であり、プシコースの生産過程の精製工程で十分に除去されるため、本品目が食品中に含まれる可能性はほぼないこと。

(4) 酵素を使用した食品を摂取したとき、当該酵素及びその分解物が当該酵素の主要な成分の過剰摂取の問題を起こさないこと。

指定等要請者によれば、本品目の一日摂取量はⅢ. 2. に記載のとおり、国民全体及び小児 (1~6 歳) でそれぞれ 18.29 mg TOS/人/日及び 15.15 mg TOS/人/日と推定され、これは国民全体のタンパク質の平均摂取量 68.5 g の約 0.027% 及び小児のタンパク質の平均摂取量 44.1 g の約 0.034% に過ぎないことから、本品目を使用した食品を摂取することにより、当該酵素及びその分解物が当該酵素の主要な成分の過剰摂取の問題を起こす懸念はないとされている。(参照 1、22)

(5) 摂取された酵素が消化管内で分解されないまま、未分解物又は部分分解物として大量に糞便中に排泄されないこと。また、未分解物又は部分分解物が生体組織中に蓄積しないこと。

本委員会としては、指定等要請者の考察を基に、以下を踏まえ、本品目の未分解物又は部分分解物が大量に糞便中に排泄される懸念及び生体組織中に蓄積される懸念はないと考えた。(参照 1)

- ・ 2. (1) の消化試験において、本品目の酵素原末は、人工胃液では 10kDa 以下までの分解が確認され、部分分解物が認められたものの、人工腸液では未分解物や部分分解物は確認されていないこと。
- ・ 本品目はプシコースの生産に利用される酵素であり、プシコースの生産過程の精製工程で十分に除去されるため、本品目が食品中に含まれる可能性はほぼないこと。

以上を踏まえ、本委員会としては、本品目は酵素指針第 2 の 2 の「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」の (1) から (5) までを満たすと判断した。

3. 酵素の毒性

(1) 遺伝毒性

本品目の酵素原末 (Lot 番号 : 3T-2) に関する遺伝毒性の試験成績は、表 1 のとおりである。

表 1 本品目に関する遺伝毒性の試験成績

指標	試験種類	試験対象	用量等	試験結果概要	参照
遺伝子突然変異	復帰突然変異試験 (<i>in vitro</i> , GLP)	細菌 (<i>Salmonella typhimurium</i> TA98, TA100, TA1535, TA1537 及び <i>E. coli</i> WP2 <i>uvrA</i>)	最高用量 5 mg/plate	陰性 (代謝活性化系の有無に関わらず)	社内資料 (2015a) (参照 41)
染色体異常	小核試験 (<i>in vitro</i> , GLP)	ヒト末梢血リンパ球	最高用量 2,000 µg/mL (代謝活性化系存在下及び非存在下、細胞毒性のため 500 µg/mL まで観察) (4 時間処理)	陰性 (代謝活性化系の有無及び処理時間に関わらず)	社内資料 (2015b) (参照 42)
			最高用量 800 µg/mL (代謝活性化系非存在下、細胞毒性のため 75 µg/mL まで観察) (24 時間処		

			理)		
--	--	--	----	--	--

以上の結果に加え、2. のとおり、本品目は消化管内で容易に分解され、他の食品由来のタンパク質と同じように体内へ吸収されると考えられる。したがって、本委員会としては、*in vivo* の試験成績はないものの、本品目には生体にとって特段問題となる遺伝毒性はないと判断した。

(2) 反復投与毒性

① ラットを用いた 13 週間経口投与試験（社内資料（2015c）、GLP）

Wistar ラット（雌雄各群 10 匹）に、本品目の酵素原末（Lot 番号：3T-2）を、表 2 のような投与群を設定して、13 週間混餌投与する試験が実施されている。

表 2 試験群の設定

用量設定	0、0.5、1.0、2.0%
酵素原末摂取量	雄：0、0.28、0.55、1.14 g/kg 体重/日 雌：0、0.31、0.63、1.25 g/kg 体重/日
TOS 換算 ⁷ 摂取量	雄：0、0.25、0.49、1.02 g TOS/kg 体重/日 雌：0、0.28、0.56、1.12 g TOS/kg 体重/日

その結果、以下の所見が認められたとされている。

- ・1.0%投与群：赤血球数の増加（雌）、尿の pH の上昇（雌）
- ・0.5%以上投与群：摂水量の減少（雄、39～40 日）
- ・0.5%投与群及び 1.0%投与群：卵巣の絶対及び相対重量の減少（雌）
- ・0.5%投与群：摂水量の減少（雄、73～74 日）、脾臓の絶対重量の減少（雌）

試験実施者は、それぞれの所見について以下のように考察し、いずれも偶発的なものであり、投与の影響によるものではないとしている。

- ・摂水量の減少については、用量依存性がなく、投与期間を通じた摂水量に影響が認められていない。
- ・赤血球数の増加及び尿の pH の上昇については、高用量群で認められていない。
- ・脾臓の絶対重量の減少については、相対重量が減少しておらず、高用量群で認められていない。
- ・卵巣の絶対及び相対重量の減少については、用量依存的でなく、病理組織学的な変化によって裏付けられていない。

以上の結果から、試験実施者は、本試験における NOAEL を最高用量である

⁷ 酵素原末の TOS 値 89.4%から、指定等要請者が換算したとされている。

2.0 %としている。(参照 43)

本委員会としては、試験実施者の判断を妥当と考え、本試験における NOAEL を最高用量である 2.0 % (TOS 換算で雄 : 1.02 g TOS/kg 体重/日、雌 : 1.12 g TOS/kg 体重/日) と判断した。

(3) アレルゲン性

① 宿主のアレルゲン性に関する事項

指定等要請者によれば、*E. coli* K-12 株誘導体がアレルゲン性を有するとの報告はないとされている。(参照 1)

② 酵素のアレルゲン性に関する事項

指定等要請者によれば、本品目のアレルゲン性に関する知見は特に知られていないが、③及び④に記載するとおり、本品目がアレルギー反応を誘発する可能性は非常に低いと考えられるとされている。(参照 1)

③ 酵素の物理化学的性状の変化に関する事項

本委員会としては、指定等要請者の考察を基に、2. (1) の酵素原末を用いた人工胃液及び人工腸液による消化性試験において、人工胃液処理では本品目の 10kDa 以下までの分解が確認され、部分分解物が認められたものの、人工腸液処理では未分解物や部分分解物が確認されていないことを踏まえ、本品目がアレルギー誘発性の懸念がなくなる質量⁸以下まで分解されることが確認されたと考えた。(参照 1)

④ 酵素と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

本品目と既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性について、8 アミノ酸配列の連続一致検索及び 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示すものの検索を実施したところ、既知のアレルゲンとの相同性は検出されなかったとされている。(参照 44)

以上を踏まえ、指定等要請者は、本品目がアレルギー反応を誘発する可能性は非常に低いと考察している。(参照 1)

本委員会としては、加熱処理に関するデータが提出されていないものの、本品目の宿主及び本品目について、アレルゲン性に関する知見が特に知られていないこと、人工胃腸液でアレルギー誘発性の懸念がなくなる質量以下まで分解されることが確認されたこと、及び既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性が検出されな

⁸ 酵素指針の脚注 7 において「Huby (2000) によれば、アレルゲンは最低 2 つの IgE 結合部位をもち、1 つの部位は最低でも 15 アミノ酸残基であるとされている。このため、アレルゲンは 30 アミノ酸残基以上でなければならず、おおよそ 3 kDa とされる。」と記載されている。

ったことを踏まえ、添加物として適切に使用される場合、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低いと判断した。

Ⅲ. 一日摂取量の推計等

1. 国際機関等における推計

国際機関等において、本品目の一日摂取量の推計は行われていない。

2. 我が国における推計

指定等要請者は、本品目の一日摂取量を以下のように推計している。(参照 1)

本品目はプシコースの生産に使用する酵素であるため、まず、プシコースの一日摂取量を推計した。プシコースは砂糖や異性化糖を代替する食品素材として利用されると考えられる。そこで、砂糖や異性化糖が使用されている食品群⁹をプシコースが使用される可能性のある使用対象食品群とし、各食品群の一日摂取量を平成 28 年国民健康・栄養調査報告から得て、それぞれ想定されるプシコースの最大添加率(%)を乗じ、それらの総和を求めて、表 3 のとおりプシコースの一日摂取量を推計した。推計は、国民全体及び小児(1~6 歳)の 2 つの集団を対象として行った。

なお、プシコースの最大添加率(%)は、米国でプシコースについて指定等要請者が GRAS 物質としての届出を行った際に提案した添加率(米国での調査結果を踏まえたもの)を基にしている。(参照 16)

その結果、プシコースの一日摂取量は、国民全体及び小児で、それぞれ 20.34 g/人/日及び 16.84 g/人/日と推計された¹⁰。(参照 45)

表 3 プシコースの推定一日摂取量

使用対象食品群			プシコースの最大添加率 (%)	国民全体		小児	
				食品摂取量 (g/人/日)	プシコースの一日摂取量 (g/人/日)	食品摂取量 (g/人/日)	プシコースの一日摂取量 (g/人/日)
穀類	小 麦・ 加工	パン類 (菓子 パンを	5.0 ¹¹	33.8	1.69	24.2	1.21

⁹ 指定等要請者独自の調査に基づいて選択したとされている。

¹⁰ 2016 年 2 月、食品安全委員会は、プシコースを関与成分とする特定保健用食品「レア スイート」について、「本食品一日当たりの摂取目安量 5 g 中に含まれる関与成分は、D-プシコース 5 g である。」、「本食品の特定保健用食品としての安全性を確保するためには、少なくとも次の事項について、使用者への情報提供の徹底が必須であると判断した。①本食品を摂取した場合に LDL-C が上昇する可能性があり、特に、高 LDL-C 血症及び境界域高 LDL-C 血症の人は注意すべきこと。②本食品の一日摂取目安量を守り、過剰摂取は行わないこと。③D-プシコースを原材料として含む他の食品との併用は避けること。」としている。

¹¹ 指定等要請者によれば、米国での GRAS 届出において対応する食品群がないことから、「Confections & Frostings」の値を用いたとされている。

	品	除く)					
		菓子パ ン類	5.0 ¹¹	4.8	0.24	4.7	0.24
砂糖・甘味料類			10.0 ¹²	6.5	0.65	3.6	0.36
野菜 類	野菜ジュース		3.5	12.2	0.43	10.0	0.35
果実 類	ジャム		10.0	1.3	0.13	1.0	0.10
	果汁・果汁飲料		3.5	10.7	0.37	25.6	0.90
魚介 類	魚介 加工 品	魚介(佃 煮)	50.0 ¹³	0.2	0.10	0.0	0
乳類	牛 乳・ 乳製 品	発酵乳・ 乳酸菌 飲料	5.0	38.4	1.92	40.8	2.04
		その他 の乳製 品	5.0	8.4	0.42	17.8	0.89
菓子 類	和菓子類		5.0	10.4	0.52	7.5	0.38
	ケーキ・ペスト リー類		5.0	7.0	0.35	5.8	0.29
	ビスケット類		5.0	2.0	0.10	3.3	0.17
	キャンディー 類		50.0	0.3	0.15	1.5	0.75
	その他の菓子 類		10.0	6.6	0.66	12.4	1.24
嗜好 飲料 類	その 他の 嗜好 飲料	コーヒ ー・ココ ア	3.5	133.3	4.67	1.7	0.06
		その他 の嗜好 飲料	3.5	134.7	4.71	169.1	5.92
調味 料・ 香辛 料類	調味 料	その他 の調味 料	5.0	64.5	3.23	39.2	1.96

¹² 指定等要請者によれば、米国での GRAS 届出においては、「Sugar」の最大添加率は 10%、「Sugar substitutes」の最大添加率は 100%とされており、本推計では前者の値を用いたとされている。

¹³ 米国での GRAS 届出において対応する食品群がないことから、指定等要請者独自の調査に基づく値としたとされている。

ブシコースの一日摂取量の合計			20.34		16.84
----------------	--	--	-------	--	-------

次に、使用された本品目が最大限ブシコースに残存すると仮定した場合の、残存する本品目の TOS の割合を求めたところ、表 4 のとおり 0.090% となった。(参照 46、47)

表 4 ブシコースに最大限残存すると仮定した場合の本品目の割合

本品目の TOS ¹⁴	2.57 %
ブシコース 1kg の調製に用いる本品目の量 ¹⁴	0.035 kg/kg ブシコース
TOS に換算した、ブシコース 1kg の調製に用いる本品目の量	$0.035 \times 0.0257 = 0.00090$ kg TOS/kg ブシコース
ブシコースに残存する本品目の TOS の割合	0.090 %

表 3 のブシコースの推定一日摂取量に、本品目の残存する TOS の割合 0.090 % を乗じて、本品目の一日摂取量を表 5 のとおり算出したところ、国民全体及び小児で、それぞれ 18.29 mg TOS/人/日 (0.332 mg TOS/kg 体重/日) 及び 15.15 mg TOS/人/日 (0.918 mg TOS/kg 体重/日) と推計された。なお、平均体重として国民全体で 55.1 kg 及び小児で 16.5 kg を用いた。

表 5 本品目の推定一日摂取量

由来となる食品群			国民全体			小児		
			ブシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)	ブシコースの一日摂取量 (g/人/日)	本品目の一日摂取量 (mg TOS/人/日)	本品目の一日摂取量 (体重あたり、mg TOS/kg 体重/日)
穀類	小麦・加工品	パン類 (菓子パンを除く)	1.69	1.52	0.028	1.21	1.09	0.066

¹⁴ 指定等要請者による測定値に基づく。

		菓子パン類	0.24	0.22	0.004	0.24	0.21	0.013
砂糖・甘味料類			0.65	0.58	0.011	0.36	0.32	0.020
野菜類	野菜ジュース		0.43	0.38	0.007	0.35	0.31	0.019
果実類	ジャム		0.13	0.12	0.002	0.10	0.09	0.005
	果汁・果汁飲料		0.37	0.34	0.006	0.90	0.81	0.049
魚介類	魚介加工品	魚介（佃煮）	0.10	0.09	0.002	0	0	0
乳類	牛乳・乳製品	発酵乳・乳酸菌飲料	1.92	1.73	0.031	2.04	1.83	0.111
		その他の乳製品	0.42	0.38	0.007	0.89	0.80	0.049
菓子類	和菓子類		0.52	0.47	0.008	0.38	0.34	0.020
	ケーキ・ペストリー類		0.35	0.31	0.006	0.29	0.26	0.016
	ビスケット類		0.10	0.09	0.002	0.17	0.15	0.009
	キャンディー類		0.15	0.13	0.002	0.75	0.67	0.041
	その他の菓子類		0.66	0.59	0.011	1.24	1.12	0.068
嗜好飲料類	その他の嗜好飲料	コーヒー・ココア	4.67	4.20	0.076	0.06	0.05	0.003
		その他の嗜好飲料	4.71	4.24	0.077	5.92	5.32	0.323
調味料・香料類	調味料	その他の調味料	3.23	2.90	0.053	1.96	1.76	0.107
合計			20.34	18.29	0.332	16.84	15.15	0.918

本委員会としては、指定等要請者の推計を妥当なものと考え、本品目の一日摂取量を、国民全体で 0.332 mg TOS/kg 体重/日及び小児で 0.918 mg TOS/kg 体重/日と判断した。

IV. 食品健康影響評価

本委員会としては、本品目の組換え DNA 技術応用添加物の安全性審査に係る食品健康影響評価については、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と判断した。

また、本委員会としては、本品目の添加物としての指定及び規格基準設定に係る食品健康影響評価については、以下のように判断した。

本品目の製造を目的として適切に管理された生産菌株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような安全性の懸念はない。

本品目について、酵素指針における「酵素の消化管内での分解性に関連する事項」を検討した結果、本品目の毒性については、同指針に基づき、遺伝毒性、反復投与による毒性及びアレルギー性に係る知見を用いて評価を行うこととした。

本品目の毒性に係る知見を検討した結果、本品目については、遺伝毒性及び反復投与による毒性の懸念はなく、本品目のアレルギー性の懸念は極めて低い。

ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における最高用量から得られた NOAEL 2.0 % (TOS 換算で雄 : 1.02 g TOS/kg 体重/日、雌 : 1.12 g TOS/kg 体重/日) と、本品目の推定一日摂取量 (国民全体で 0.332 mg TOS/kg 体重/日、小児で 0.918 mg TOS/kg 体重/日) とを比較して得られる安全マージンは十分である。

以上を踏まえ、本委員会としては、本品目について、添加物として適切に使用される場合、安全性に懸念がないと考えられ、ADI を特定する必要はないと判断した。

<別紙：略称>

略称	名称等
ATCC	American Type Culture Collection : アメリカ培養細胞系統保存機関
EC	Enzyme Commission : 国際生化学・分子生物学連合酵素委員会
EFSA	European Food Safety Agency : 欧州食品安全機関
EU	European Union : 欧州連合
FSANZ	Food Standards Australia New Zealand : オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関
GRAS	Generally Recognized As Safe : 一般的に安全とみなされる
GSFA	General Standard for Food Additives : コーデックス食品添加物一般基準
JECFA	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives : FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議
LDL-C	低比重リポタンパク質コレステロール
NCBI	National Center for Biotechnology Information : 米国国立生物工学情報センター
ORF	Open Reading Frame : オープンリーディングフレーム
PCR	Polymerase Chain Reaction : ポリメラーゼ連鎖反応
TOS	Total Organic Solids : 総有機固形分

<参照>

- 1 松谷化学工業株式会社, プシコースエピメラーゼ概要書
- 2 CAS Registry Number (CAS RN): 1618683-38-7
- 3 松谷化学工業株式会社, *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼ 安全性審査申請書類
- 4 厚生労働省 消費者庁, 第9版食品添加物公定書, 2018
- 5 American Type Culture Collection, Product Sheet. *Arthrobacter globiformis*
- 6 Yoshihara A, Kozakai T, Shintani T, Matsutani R, Ohtani K, Iida T et. al., Purification and characterization of D-allulose 3-epimerase derived from *Arthrobacter globiformis* M30, a GRAS microorganism. J Biosci Bioeng 2016; 123(2): 170-6
- 7 社内資料, Physical and chemical parameter of D-allulose 3-epimerase. 2018
- 8 社内資料, *Arthrobacter globiformis* M30 株由来のプシコースエピメラーゼの新規性. 2016a
- 9 社内資料, プシコースエピメラーゼの純度について. 2017
- 10 Itoh H, Okaya H, Khan AR, Tajima S, Hayakawa S, and Izumori K: Purification and characterization of D-tagatose 3-epimerase from *Pseudomonas* sp. ST-24. Biosci Biotechnol Biochem 1994; 58(12): 2168-71
- 11 Iida T, Hayashi N, Yamada T, Yoshikawa Y, Miyazato S, Kishimoto Y et al.: Failure of D-psicose absorbed in the small intestine to metabolize into energy and its low large intestinal fermentability in humans. Metabolism 2010; 59: 206-14
- 12 Iida T, Kishimoto Y, Yoshikawa Y, Hayashi N, Okuma K, Tohi M et al.: Acute D-psicose administration decreases the glyceic responses to an oral maltodextrin tolerance test in normal adults. J Nutr Sci Vitaminol 2008; 54: 511-4
- 13 世界知的所有権機関国際事務局, 国際特許 国際公開番号: WO 2013/005800 A1 発明の名称: アルスロバクター グロビホルミスの生産する酵素 出願人: 松谷化学工業株式会社
- 14 日本国特許庁, 特許公報 特許番号: 特許第 5848834 号 発明の名称: アルスロバクターグロビホルミスの生産するケトース3-エピメラーゼ 特許権者: 松谷化学工業株式会社

-
- 15 日本国特許庁, 公開特許公報 特許出願公開番号: 特開 2014-140361 発明の名称: ケトース 3 - エピメラーゼ酵素 出願人: 松谷化学工業株式会社
 - 16 Matsutani Chemical Industry Co. Ltd., GRAS notification for allulose (psicose) (GRAS Notice (GRN) No.498). 2013
 - 17 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2014
 - 18 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2014
 - 19 Matsutani Chemical Industry Co. Ltd., GRAS notification for D-allulose 3-epimerase from *Arthrobacter globiformis* M30 expressed in *Escherichia coli* K-12 W3110 (GRAS Notice (GRN) No.624). 2016
 - 20 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2016
 - 21 Food and Drug Agency, Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000498. 2016
 - 22 厚生労働省, 平成 28 年国民健康・栄養調査報告 第 1 部 栄養素等摂取状況調査の結果, 平成 29 年 12 月
 - 23 公益財団法人, 日本食品科学研究振興財団, 既存添加物名簿収載品目リスト、(最終改正 平成 26 年 1 月 30 日)
 - 24 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 B S L 分類等」平成 22 年 6 月
 - 25 社内資料, プシコースエピメラーゼ酵素活性の測定結果. 2017 (未発表)
 - 26 社内資料, プラスミド pKK223-3 の確認. 2016 (未発表)
 - 27 F. Bolivar, R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. O. Betlach, H. L. Heynekerand and H. W. Boyer: Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2; 1977: 95-113
 - 28 J. Brosius and A. Holy: Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic *lac* operator. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1984; 81: 6929-6933
 - 29 H. A. de Boer, L. J. Comstock and M. Vasser: The *tac* promoter: A functional hybrid derived from the *trp* and *lac* promoters. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 21-25
 - 30 A. Orosz, I. Boros and P. Venetianer: Analysis of complex transcription

-
- termination region of the *Escherichia coli rrnB* gene. Eur. J. Biochem. 1991; 201: 653-659
- 31 J. Shine and L. Dalgarno: The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1974; 71: 1342-1346
- 32 J. W. Warren, J. R. Walker, J. R. Roth and E. Altman: Construction and characterization of a highly regulable expression vector, pLAC11, and its multipurpose derivatives, pLAC22 and pLAC33. Plasmid 2000; 44: 138-151
- 33 社内資料, 遺伝子発現用ベクターpWKLP の構築. 2016 (未発表)
- 34 社内資料, 発現プラスミド pWKLP の確認. 2016 (未発表)
- 35 社内資料, pWKLP のオープンリーディングフレームの検索. 2016 (未発表)
- 36 社内資料, pWKLP のオープンリーディングフレームのアレルゲン解析. 2016 (未発表)
- 37 社内資料, pWKLP のオープンリーディングフレーム_毒性タンパク検索結果. 2016 (未発表)
- 38 澤井哲夫: β ラクトム系抗生物質。大野雅二、大村智編、抗生物質研究の最先端、東京化学同人、東京、1987 ; 121-129
- 39 社内資料, 定量 PCR 法によるプシコースエピメラーゼ製品中の遺伝子の定量. 2016 (未発表)
- 40 社内資料, プシコースエピメラーゼの消化性試験. 2016b
- 41 社内資料, Bacterial reverse mutation test with Maturase FE. 2015a
- 42 社内資料, In vitro micronucleus test with Maturase FE in cultured human lymphocytes. 2015b
- 43 社内資料, Sub-chronic (13-week) oral toxicity study with Maturase FE in rats. 2015c
- 44 社内資料, *Arthrobacter globiformis* 由来プシコースエピメラーゼのアレルギー誘発性に関するアレルゲン配列データベースを用いた解析. 2017
- 45 食品安全委員会, 特定保健用食品評価書「レア スイート」. 2016年2月
- 46 社内資料, *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼによるプシコース生産の検討. 2018

⁴⁷ 社内資料, *Escherichia coli* K-12 W3110 (pWKLP) 株を用いて生産されたプシコースエピメラーゼの Total Organic Solids の算出. 2018

Escherichia coli K-12 W3110(pWKLP)株を用いて生産されたプシコースエピメラゼに係る食品健康影響評価に関する審議結果（案）についての意見・情報の募集結果について

1. 実施期間 平成 31 年 1 月 16 日～平成 31 年 2 月 14 日
2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送
3. 提出状況 4 通
4. 意見・情報の概要及び食品安全委員会の回答

	意見・情報の概要※	食品安全委員会の回答
1	<p>日本は添加物の許可が甘すぎるのではないのでしょうか。単体では大丈夫でも相互作用もあると思いますし、アメリカや欧州では禁止のマーガリンもいまだに販売されています。遺伝子組み換え野菜でも世界で一番採用されていてネズミでは発がん物質が出来ると解明されてるはずですが。今の医療費が増えるのも食が根本にあるはずです。せめてアメリカ並みの基準でお願いします。</p>	<p>添加物の指定等のリスク管理措置に関する御意見については、リスク管理機関である厚生労働省にお伝えいたします。</p> <p>なお、相互作用については、「添加物に関する食品健康影響評価指針」（平成 22 年 5 月 27 日食品安全委員会決定（平成 27 年 7 月 18 日改定））では、「添加物を複数摂取した場合の有害な影響については、食品安全委員会の平成 18 年度食品安全確保総合調査「食品添加物の複合影響に関する情報収集調査」報告書に基づき、個々の添加物の評価を十分に行うことで、添加物の複合摂取による影響についても実質的な安全性を十分確保することが可能と考えられる。ただし、添加物を複数摂取した場合のリスクに関する知見がある場合は、必要に応じて評価を行う。」とされており。</p>
2	<p>・ 高校生物で、遺伝情報の伝達概念、即ちセントラルドグマを理解していればわかるレベルのことだが、p 11 (2) (3)で「**遺伝子は・・・異性化酵素を発現する。」という記述は間違えている。遺伝子は、mRNA に転写され、タンパク質に翻訳されるのであり、酵素というタンパク質を発現することはない。</p> <p>・ p 8 の 4 の起源の記述が正しいとするならば、p 6 の 3) (1) の基原の記述</p>	<p>・ 御指摘を受け、評価書案を修正しました。</p> <p>・ 御指摘を踏まえ、より適切な表記に評価書案を修正しました。</p>

	<p>は間違えている。本品目の基原は <i>Arthrobacter globiformis</i> M30 株となるはずである。</p> <p>・ p 7 (3) の最終段落の記述が正しいとするならば、ホモテトラマー酵素が本品目の有効成分という記述は間違えている。機能の判断は記述内容からはできない。本品目の主成分であるにすぎない。この主成分が新規タンパク質として BlastP で確認されたことになる。</p> <p>また、本品目は図 1 及び p 8 (4) より、液体製品と粉末製品の両方の形態があることになるが、総タンパク質当たりのプシコースエピメラーゼ量は TOS 量での比率なのか。</p> <p>更に、残りの比率に含まれるタンパク質については既知のタンパク質との相同性を調べていないのか。</p>	<p>・指定等要請者によれば、本品目の有効成分はホモテトラマーの酵素であるとされており、評価書 p7 においてそのように記載しております。</p> <p>総タンパク質当たりのプシコースエピメラーゼ量は、微生物が生産したタンパク質の SDS-PAGE でのバンドの強度と検量線から算出していることから、TOS 換算はされておられません。</p> <p>残りのタンパク質としては宿主及び発現ベクターに由来するタンパク質の可能性が考えられます。</p> <p>宿主である <i>E.coli</i> K-12 W3110 株は、添加物製造の利用経験があり、また有害な生理活性物質を産生することは知られていないことから安全性が確認されているものと考え、既知タンパク質との相同性を調べておりません。また、発現ベクターである pWKLP において検出されたオープンリーディングフレームから予想されるタンパク質については、既知のタンパク質との相同性を調べています。</p>
3	<p>・「5.我が国及び諸外国における使用状況」にて、我が国では添加物として認められていないし、フランス、デンマーク、オーストラリア、ニュージーランドでは使用不可な物質であるとされているように、国際的には決して安全と認められているとは考えられない。</p> <p>・「6.国際機関等における評価」にて、我が国では健康評価は実施されておらず、EU や豪州等でも評価はされていない。</p>	<p>食品安全委員会は、国民の健康の保護が最も重要であるという基本的認識の下、規制や指導等のリスク管理を行う関係行政機関から独立して、科学的知見に基づき客観的かつ中立公正に食品に含まれる可能性のある危害要因が人の健康に与える影響について食品健康影響評価を行っています。</p> <p>本品目は「酵素指針」及び「評価基準」に基づき、必要とされる事項について評価した結果、添加物として適切に使用さ</p>

	<p>米国では FDA の届出に対して異議が唱えられていないレベルに過ぎず、きちんと影響評価が行われていない。</p> <p>・このような状況にも関わらず、書類審査のみで「本品目の製造を目的として適切に管理された生産菌株については、本品目の添加物としての摂取において問題となるような安全性の懸念はない。」と結論づけるのは国民の健康を大きなリスクに晒す、極めて危険な判断と考えられます。</p> <p>・そもそも、日本での遺伝子組換え物質の認可数は 300 を超え、諸外国と比して極めて緩い状態です。次に多いのが米国の 197、中国は 64、ロシアは 24 で欧州各国では減らそうとしている状況です。遺伝子組換え食品の歴史はせいぜい数十年で健康への影響は、はっきりしていない、あるいは今までわかっていないだけの状態です。今回の物質を始め、申請があればほとんど認可している状態をみていますと、まるで日本人を人体実験に使っているかのごとくです。完全にリスクがゼロと確認できない限り、遺伝子組換え物質の使用は禁止としてください。</p>	<p>れる場合、安全性に懸念はないと判断しました。</p> <p>遺伝子組換え食品の認可等のリスク管理措置に関する御意見については、リスク管理機関である厚生労働省にお伝えいたします。</p> <p>なお、遺伝子組換え食品等については「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）等に基づき、その時点において到達されている水準の科学的知見に基づいて食品健康影響評価を行っています（食品安全基本法 11 条第 3 項）。</p>
4	<p>遺伝子組み換え技術についての質問</p> <p>1. p 11 (3) について、(2) (1) では宿主は <i>E.coli</i> K-1.2W3110 株であることから、この菌株の使用実績の有無を記述すべき。</p> <p>2. (5) について、(1) ではプシコースエピメラーゼは未指定の添加物であることから、有効成分と従来の添加物との比較はできない。また菌株の性質は (6) (1) に記述すべき。</p> <p>3. (6) (1) について、上記同様に同酵素が未指定添加物であることから、「従</p>	<p>1. 本項目では <i>E.coli</i> K-12 W3110 株を含む K-12 株について記載しています。</p> <p>2. 及び 3. I. 7. (1) に記載したとおり、参考として米国において GRAS 認定されている添加物との比較を記載しています。また、菌株の性質は、「評価基準」に沿って適切に記載しています。</p>

<p>来の添加物の生産菌」は存在しない。</p> <p>4. p 1 3 (1) (2)~(4)について、宿主の記述なら、<i>E.coli</i> K-1 2 W 3 1 1 0株の記述をすべき。菌株について誘導体という表現は、一般的か。</p> <p>5. p 1 4 eについて、「伝達を可能とする」とは、何をどのように、どこに伝達することなのか。</p> <p>6. (3) (1)について、供与体の安全性であるならば、<i>A.globiformis</i> M 3 0株の安全性を書くべき。</p> <p>7. (3) (2)~(4)について、PCR法で得た産物であるならば、遺伝子ではなくcDNAについて記述すべき。また、遺伝子が酵素を発現することはなく、セントラルドグマを理解すべき。</p> <p>8. p 1 5 (3)について、tacプロモーターは人為的に作製されたものであり、「<i>E.coli</i> 由来」ではない。</p> <p>9. (4)について、tacプロモーター、rrnターミネーターは発現ベクターに挿入しないのか。</p> <p>10. p 1 7 (5)について、図1より製造原料は菌株の培養液と考えられるが、培養液に食品原料及び食品添加物を使用することがあるのか。</p> <p>11. p 9 (3) p 6 (3)について、FDAが回答した年は同じ年ではないのか。</p>	<p>4. <i>E.coli</i> K-12 W3110株も <i>E.coli</i> K-12株誘導体であり、安全性評価では一般的な表現として用いられています。</p> <p>5. ベクターが宿主から他の菌株へ自ら移動することを意味します。</p> <p>6. 本項目では、<i>A.globiformis</i> M30株も含む <i>A.globiformis</i> について記載しています。</p> <p>7. 挿入遺伝子であるプシコースエピメラゼ遺伝子は <i>A.globiformis</i> M30株のゲノムから転写された mRNA の逆転写により得られた cDNA をクローニングしたわけではなく、評価書案の記載は適切なものと考えています。また、「酵素を発現」の表現については、御指摘を受け、評価書案を修正しました。</p> <p>8. 御指摘を受け、評価書案を修正しました。</p> <p>9. 両配列ともに発現ベクターに組み込まれています。</p> <p>10. 指定等要請者によれば、製造原料は培養原料、溶菌剤、ろ過助剤、安定剤等が使用され、これらはすべて食品原料及び食品添加物を用いています。</p> <p>11. 御指摘の「p 9 (3) p 6 (3)」は、I. 5. (3) 及び I. 6. (3) を指すものと考えますが、前者ではプシコー</p>
---	---

		スについて、後者ではプシコースを生産する酵素である本品目について、GRAS 物質としての届出に異議がない旨を FDA が回答したそれぞれの年を記載しています。
--	--	---

※ 頂いた御意見・情報をそのまま掲載しています。