

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAo013 株を利用して生産された
ホスホリパーゼ

令和8年（2026年）6月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

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. 食品健康影響評価において比較対象として用いる添加物、宿主等の性質並び に遺伝子組換え添加物及び遺伝子組換え体との相違に関する事項	6
1. 従来 of 添加物の性質、用途等に関する事項	6
2. 宿主に関する事項	7
3. 挿入 DNA に関する事項	8
4. 遺伝子組換え添加物の性質、用途等に関する事項	8
5. 食品健康影響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 添加物及び遺伝子組換え体と宿主等の相違点に関する事項	9
第 2. 遺伝子導入に用いる塩基配列（挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの 構築）に関する事項	9
1. ベクターの名称及び由来に関する事項	9
2. ベクターの性質に関する事項	9
3. 挿入 DNA の供与体に関する事項	10
4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝 子産物の性質に関する事項	10
5. 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の発現に関わる領域に 関する事項	11
6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項	11
7. 構築されたコンストラクトに関する事項	12
第 3. 遺伝子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
3. 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の安全性に関する事項	14
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギ－誘発性に関する事項（遺伝子組換え 体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合には、その遺伝子産物（抗生物質代 謝酵素等）についても評価すること。）	14
第 4. 遺伝子組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	16
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	16
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	16
第 5. 遺伝子組換え添加物に関する事項	16

1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	16
2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項	16
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	16
4. 精製方法及びその効果に関する事項	17
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	17
第6. 第1から第5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	17
III. 食品健康影響評価結果	17

<審議の経緯>

- 2025年2月10日 内閣総理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（消食基第102号）、関係書類の接受
- 2025年2月18日 第972回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2025年2月28日 第262回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2026年5月25日 第277回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2026年6月23日 第1029回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- | 2026年1月6日まで | 2026年1月7日から |
|--------------------|-------------------|
| 山本 茂貴（委員長） | 祖父江 友孝（委員長） |
| 浅野 哲（委員長代理 第一順位） | 浅野 哲（委員長代理 第一順位） |
| 祖父江 友孝（委員長代理 第二順位） | 頭金 正博（委員長代理 第二順位） |
| 頭金 正博（委員長代理 第三順位） | 春日 文子（委員長代理 第三順位） |
| 小島 登貴子 | 小島 登貴子 |
| 杉山 久仁子 | 杉山 久仁子 |
| 松永 和紀 | 松永 和紀 |

<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>

- | 2025年9月30日まで | 2025年10月1日まで |
|--------------|--------------|
| 児玉 浩明（座長） | 児玉 浩明（座長） |
| 佐々木 伸大（座長代理） | 佐々木 伸大（座長代理） |
| 伊藤 政博 | 伊藤 政博 |
| 小野 道之 | 小野 竜一 |
| 小野 竜一 | 古園 さおり |
| 柴田 識人 | 柴田 識人 |
| 爲廣 紀正 | 爲廣 紀正 |
| 手島 玲子 | 中島 春紫 |
| 樋口 恭子 | 中村 亮介 |
| 藤原 すみれ | 藤原 すみれ |
| 百瀬 愛佳 | 百瀬 愛佳 |

2026年4月1日から

児玉 浩明 (座長)

佐々木 伸大 (座長代理)

伊藤 政博 爲廣 紀正

小野 竜一 中島 春紫

角田 茂 中村 亮介

古園 さおり 藤原 すみれ

柴田 識人

要 約

「JPAo013 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Fusarium venenatum* A3/5 株に由来するホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo013 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 (pla1FV) である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、チーズ等の歩留まり及び品質の向上を目的として乳製品の製造に用いられる。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物に関する食品健康影響評価指針」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、導入遺伝子の供与体、導入される塩基配列が明らかであること等の導入遺伝子の安全性、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。

以上のことから、「JPAo013 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」については、人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

(申請内容)

名 称：JPAo013 株を利用して生産されたホスホリパーゼ

用 途：チーズ等の乳製品の製造における歩留まり及び品質の向上

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、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Fusarium venenatum* A3/5 株に由来するホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo013 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 (pla1FV) である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、チーズ等の歩留まり及び品質の向上を目的として乳製品の製造に用いられる。

II. 食品健康影響評価

第 1. 食品健康影響評価において比較対象として用いる添加物、宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び遺伝子組換え体との相違に関する事項

1. 従来添加物の性質、用途等に関する事項

(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

生 産 菌：*Streptomyces violaceoruber*

有効成分：ホスホリパーゼ A1

EC No.：EC 3.1.1.32

CAS No.：9043-29-2

(2) 製造方法

ホスホリパーゼ A1 は、培養工程、培養液から抽出、除菌、精製等の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 A1 は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素でありチーズ等の乳製品製造に用いられる。その酵素活性により生じたリゾリン脂質、脂肪酸等の乳化作用により水分や脂肪の保持力が上昇し、チーズの収量が増え、熟成促進、物性改良等の効果が期待できる（参照 1）。

なお、チーズの製造工程において添加されたホスホリパーゼ A1 の大部分はホエイに含まれ、低温殺菌によって失活するが、カード中には活性を有したホスホリパーゼ A1 が残存する可能性がある。また、加熱工程がない場合は、活性を有したホスホリパーゼ A1 がチーズに残存する可能性がある。しかしなが

ら、カードには基質が乏しく、かつ、固体中であるため、残存したホスホリパーゼ A1 による酵素反応が起こるとは考えにくい（参考 1）。

（4）摂取量

ホスホリパーゼ A1 製品が全ての「牛乳・乳製品」^aの脂質加工に用いられ、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は 4.1 μg TOS (Total Organic Solids) /kg 体重/日である。

2. 宿主に関する事項

（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。本菌株は、清酒麹から分離された野生株であり（参照 2）、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門において NBRC4177 株として登録、保管されている。

（2）宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する事項

A. oryzae は、食品用酵素の生産菌として、長年にわたり安全に使用されている。また、麹菌として味噌、醤油、醸造酒等の発酵食品の製造に広く用いられている（参照 3、4）。

（3）宿主の構成成分等に関する事項

A. oryzae は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル（以下「BSL」という。）2 及び 3 に分類されていない（参照 5）。また、*A. oryzae* はヒト又は動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられるため、病原体等のリスク群分類のリスク群 1 に分類されると考えられる（参照 4、6）。したがって、IFO4177 株は非病原性であると考えられる。

A. oryzae によるアフラトキシンの産生は確認されていない。*A. oryzae* の中に、シクロピアゾン酸、コウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸を産生する株も報告されている（参照 7）が、JPAo013 株ではシクロピアゾン酸、コウジ酸、及び β -ニトロプロピオン酸がいずれも検出限界未満であることが確認されている。

A. oryzae は、味噌、醤油、醸造酒等の製造に長年にわたり安全に使用されてきた経緯があり、適切な環境で扱われている限り、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。なお、*A. oryzae* 由来の酵素のうち、Asp o 13 及び Asp o 21 がアレルゲンとしてデータベース^bに登録されているが、これらは吸入性アレルゲンとして整理される。

^a 令和 5 年国民健康・栄養調査（厚生労働省、2025 年）第 9 表の 1（食品群別栄養素等摂取量－食品群，栄養素別，摂取量－総数，1 歳以上）「牛乳」、「チーズ」及び「発酵乳・乳酸菌飲料」（食品群番号 71、72 及び 73）。

^b WHO/IUIS Allergen Nomenclature

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

A. oryzae には、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はない。

(5) ヒトの健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項

A. oryzae には、ヒトに対して病原性を示す外来因子の存在を示唆する報告はない。

(6) 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 の近縁種には、日和見感染により肺炎の原因菌となる *A. fumigatus* 並びにアフラトキシンを産生する *A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* が知られているが (参照 8)、*A. oryzae* はアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログを有するものの、そのほとんどのアフラトキシン生合成遺伝子は転写機能を失っている (参照 9、10)。

3. 挿入 DNA に関する事項

(1) 挿入 DNA の供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ホスホリパーゼ (*pla1FV*) をコードするホスホリパーゼ (*pla1FV*) 遺伝子の供与体は、*F. venenatum* A3/5 株である。アセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*URA3*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *Aspergillus nidulans* Glasgow 野生株及び *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株である。

(2) 挿入 DNA の性質及び導入方法

pla1FV 遺伝子は、ホスホリパーゼ (*pla1FV*) をコードする。*amdS* 遺伝子はアセトアミダーゼを、*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、いずれも選択マーカーとして用いた。

pla1FV 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクター pJPV058 全体をプロトプラスト法により標的となる宿主の特定の遺伝子座へ導入した。

4. 遺伝子組換え添加物の性質、用途等に関する事項

(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： *pla1FV* 製品

有効成分：ホスホリパーゼ A1 (*pla1FV*)

EC No.： EC 3.1.1.32

CAS No.： 9043-29-2

(2) 製造方法

pla1FV 製品は、JPAo013 株を生産菌として、培養、ろ過、製品化等の工程

を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

pla1FV 製品は、従来のホスホリパーゼ A1 製品と同様に、チーズ等の乳製品の製造に用いられ、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成させ、チーズ等の歩留まり及び品質の向上を目的として乳製品の製造に用いられる。

(4) 推定摂取量

従来のホスホリパーゼ A1 製品が全て pla1FV 製品に置き換わり、全ての「牛乳・乳製品」^a の脂質加工に用いられ、最終製品中に 100% 残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は、4.1 µg TOS/ kg 体重/日である。

(5) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

ホスホリパーゼ A1 (pla1FV) は、従来のホスホリパーゼ A1 と同様に、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解し、食品中のレシチンを分解する。

5. 食品健康影響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遺伝子組換え体と宿主等の相違点に関する事項

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点

ホスホリパーゼ A1 (pla1FV) と従来のホスホリパーゼ A1 との相違点は、生産菌、アミノ酸残基数、至適温度及び至適 pH である。

(2) 組換え体と宿主の相違点

JPAo013 株と宿主との相違点は、JPAo013 株には *pla1FV* 遺伝子が複数コピー導入され、ホスホリパーゼ A1 (pla1FV) の高産生能を獲得している点、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を導入している点である。

以上 1. から 5. までから、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、以下の各事項について評価を行った。

第 2. 遺伝子導入に用いる塩基配列（挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築）に関する事項

1. ベクターの名称及び由来に関する事項

pJPV058 の作製には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pUC19 が用いられた。

2. ベクターの性質に関する事項

(1) ベクター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) 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。

(3) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項

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。

(4) 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。

(5) 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* のみで機能する。

3. 挿入 DNA の供与体に関する事項

pla1FV 遺伝子の供与体は、*F. venenatum* A3/5 株である。*F. venenatum* A3/5 株は 20 年以上にわたり海外で食品用タンパク質の生産に利用されている（参照 11、12）。これまで、*F. venenatum* A3/5 株に関して、安全性に懸念を生じるような報告等は確認されていない。

amdS 遺伝子の供与体は *A. nidulans* Glasgow 野生株である（参照 13）。*A. nidulans* の食経験は特に知られていないが、食品用酵素の製造等に広く使用されており、選択マーカーとして長年利用されてきた実績がある。また、*A. nidulans* のアセトアミダーゼをコードする *amdS* 遺伝子はアセトアミドが唯一の窒素源といった限られた条件でのみ誘導され、通常の培地で発現することはない。

URA3 遺伝子の供与体は *S. cerevisiae* FL100 株である。*S. cerevisiae* は、パン酵母やアルコール発酵用酵母として長年にわたり食品製造において安全に使用されてきた実績がある。

F. venenatum、*A. nidulans* 及び *S. cerevisiae* は、いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL2 及び 3 に分類されていない（参照 5）。また、*S. cerevisiae* は、ヒト又は動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられるため、病原体等のリスク分類のリスク群 1 に分類されると考えられる（参照 6）。

4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) *pla1FV* 遺伝子

pla1FV 遺伝子は、ホスホリパーゼ活性を有する *pla1FV* をコードする。

pla1FV は、ホスホリパーゼのうちホスホリパーゼ A1 に分類され、リン脂質中の 1 位のエステル結合を加水分解する（参照 14）。

(2) *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子は、アセトアミダーゼをコードする。

アセトアミダーゼは、アセトアミドを加水分解する酵素であり、アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中では、本遺伝子が導入された菌株のみが生育できることから、選択マーカーとして用いられる。

(3) *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する。

オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼは、ウリジン要求性を相補する選択マーカーとして用いられる。

5. 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる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

pla1FV 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* 由来の中性アミラーゼ II をコードする *na2* 遺伝子のプロモーター (*na2* プロモーター) 及び *na2* プロモーター断片に *A. nidulans* のトリオースリン酸異性化酵素合成遺伝子のプロモーター断片を連結させた *na2/tpi* プロモーターである。

amdS 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* 由来の *amdS* 遺伝子の野生型のプロモーターである。

URA3 遺伝子のプロモーターは、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子の野生型のプロモーターである (参照 15)

(2) ターミネーターに関する事項

pla1FV 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amg* 遺伝子のターミネーターである。

amdS 遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans* 由来の *amdS* 遺伝子の野生型のターミネーターである。

URA3 遺伝子のターミネーターは、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子の野生型のターミネーターである (参照 15)。

(3) そのほかの事項

該当する塩基配列はない。

6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項

(1) 挿入 DNA のクローニング又は合成方法に関する事項

pla1FV 遺伝子は、*F. venenatum* A3/5 株のゲノム DNA を鋳型として、シグナル配列を含む *pla1FV* をコードする配列を PCR 法により増幅して得られた。

amdS 遺伝子は、*A. nidulans* Glasgow 野生株のゲノム DNA を鋳型として、

PCR 法により増幅して得られた。

URA3 遺伝子は、*S. cerevisiae* FL100 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により増幅して得られた。

(2) ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミドベクター pUC19 に、*na2* プロモーター断片、*na2/tpi* プロモーター断片、*pla1FV* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*amdS* 遺伝子断片、*URA3* 遺伝子断片等を挿入し、pJPV058 を作製した。

7. 構築されたコンストラクトに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列並びに制限酵素による切断地図に関する事項

pJPV058 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 15)。

(2) 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コンストラクト上で明らかであること

意図する挿入領域は、pJPV058 の全領域である (参照 15)。

(3) 導入しようとするコンストラクトは、目的外の遺伝子が混入しないよう純化されていること

pJPV058 は、*E. coli* を用いて調製・精製されていることから、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

第 3. 遺伝子組換え体に関する事項

1. 宿主との差異に関する事項

JPAo013 株は、pJPV058 の挿入により *pla1FV* 遺伝子発現カセット、*amdS* 遺伝子発現カセット及び *URA3* 遺伝子発現カセットが多コピー導入されている点で宿主と異なる。

2. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

pla1FV 遺伝子のコピー数及び pJPV058 の挿入近傍配列を確認するため、定量 PCR 解析及び JPAo013 株の次世代シーケンサーによる全ゲノム解析 (平均冗長度 50 以上) を行った。その結果、*pla1FV* 遺伝子が特定の遺伝子座に複数コピー挿入されていると推定された (参照 16)。

(2) ORF の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

① *pla1FV* 遺伝子発現コンストラクト

pJPV058 について、*pla1FV* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子以外のオープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) の有無を確認す

るため、pJPV058 全領域について ORF 検索を行った。その結果、6 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 が合計 150 個検出された（参照 17）。

a. 既知のアレルゲンとの構造相同性

検出された ORF について、アレルゲンデータベース^cを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 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、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンも検出されなかった（参照 17）。

b. 既知の毒性タンパク質との構造相同性

検出された ORF について、NCBI データベース^dを用いて E-value<1.0 × 10⁻⁵を指標として相同性検索を行った。その結果、データベース中の既知のタンパク質と相同性を示した ORF は認められなかった（参照 17）。

以上のことから、pJPV058 には、アレルギー誘発性又は毒性を有するタンパク質をコードする ORF が含まれる可能性は低いと考えられた。

② 近傍配列との境界領域

pJPV058 の導入により宿主ゲノムとの接合部位に新たに生じる ORF の有無を調べる目的で、遺伝子導入された標的遺伝子座における挿入 DNA 並びに 5' 近傍配列及び 3' 近傍配列を含む領域について ORF 検索を行った（参照 18、19）。その結果、6 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 が合計 62 個検出された。

a. 既知のアレルゲンとの構造相同性

検出された ORF について、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った。その結果、宿主ゲノムと挿入配列を跨ぐ ORF と 80 アミノ酸配列に対して 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（参照 18、19）。

また、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンも検出されなかった（参照 18、19）。

b. 既知の毒性タンパク質との構造相同性

検出された ORF について、NCBI データベース^dを用いて E-value<1.0 × 10⁻⁵を指標として相同性検索を行った。その結果、データベース中の既知のタンパク質と相同性を示した ORF は認められなかった（参照 18、

^c The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) allergen protein database (version 21) (検索日：2022 年 3 月)

^d NCBI (National Center for Biotechnology Information)データベース (検索日：2022 年 3 月)

19)。

以上のことから、遺伝子導入によって新たに生じた ORF が発現したとしても、本酵素製品中に食物アレルギー誘発性又は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た。

3. 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の安全性に関する事項

pJPV058 には抗生物質耐性マーカー遺伝子が含まれない。pUC19 由来の機能的なアンピシリン耐性遺伝子の配列が pJPV058 に残存していないことはシーケンス解析により確認している（参照 15）。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合には、その遺伝子産物（抗生物質代謝酵素等）についても評価すること。）

(1) 導入遺伝子の供与体（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の供与体を含む。）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む。以下同じ。）に関する知見が明らかであること

F. venenatum A3/5 株は、20 年以上にわたり海外で食品用タンパク質の生産に使用されており（参照 11、12）、これまでアレルギーで問題となった報告はない。*F. venenatum* A3/5 株のアレルギー誘発性の可能性を確認するため文献検索^eを行った結果、*F. venenatum* A3/5 株由来の食品用マイコプロテインに起因すると疑われる食物アレルギーに関する報告が 1 件見つかったが、これは pla1FV とは別のタンパク質に起因する事象であることが示唆されている（参照 20）。したがって、*F. venenatum* A3/5 株が食物アレルギーを誘発する可能性は低いと考えられた。

A. nidulans の食経験は特に知られていないが、食品用酵素の製造等に広く使用されている。他の糸状菌と比べて特にアレルギー誘発性で問題となる菌種ではないとされている。したがって、挿入遺伝子の供与体がアレルギー誘発性を有するとは考えにくい。

S. cerevisiae は、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかであること。

pla1FV を有効成分とする酵素製品についてアレルギー誘発性を示唆する報告はない。また、*F. venenatum* A3/5 株由来のホスホリパーゼの食物アレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^eを行った。その結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

アセトアミダーゼは、選択マーカーとして長年利用されてきた実績があるが、

^e PubMed （検索日：2022 年 5 月）

アレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はない。

オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼは、選択マーカーとして長年利用されてきた実績があるが、アレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① pla1FV

a. 人工胃液に対する感受性

pla1FV 製品を人工胃液に加え、最大で 3 時間消化処理を行った後、SDS-PAGE (CBB 染色) で分析した結果、pla1FV のバンドは試験開始後 30 分以内に消失したが、反応開始 30 秒以降に低分子断片のバンドが認められた (参照 21)。

低分子断片のバンドについて評価するため、人工胃液で 30 分間処理した後に連続して人工腸液で最大 2 時間処理を行った結果、低分子断片のバンドは人工腸液処理開始後 5 分以内に消失した (参照 22)。

b. 人工腸液に対する感受性

pla1FV 製品を人工腸液に加え、最大で 6 時間消化処理を行った後、SDS-PAGE (CBB 染色) で分析した結果、pla1FV のバンドは試験開始後 6 時間でほぼ消化されることが示された (参照 21)。

c. 加熱処理に対する感受性

pla1FV を pH8.0 で各温度帯で 30 分処理した後、活性を測定した。その結果、pla1FV は約 45°C で活性が 50% 以下になり、50°C 以上の処理でほぼ失活することが示された (参照 23)。

② アセトアミダーゼ

アセトアミダーゼは、我が国において長い使用実績があり、既に食品安全委員会の食品健康影響評価が終了している品目で発現するアセトアミダーゼとアミノ酸配列が同じであることから、物理化学的処理に対する感受性試験は実施しなかった。

③ オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ

オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼは、我が国において長い使用実績があり、既に食品安全委員会の食品健康影響評価が終了している品目で発現するオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼとアミノ酸配列が同じであることから、物理化学的処理に対する感受性試験は実施しなかった。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関する事項

pla1FV のアレルギー誘発性の可能性を調べるために、アレルゲンデータベース^oを用いて既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 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（参照 17）。

また、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンも検出されなかった（参照 17）。

その他の詳細は、第 3-2（2）に記載のとおりである。

以上のことから、pla1FV、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がアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

第 4. 遺伝子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

pla1FV 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利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

pla1FV 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利用されてきた実績を有することから、有害性はないと考えられる。また、本製品の原料は、Food Chemicals Codex 等の規格に適合している。

第 5. 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

pla1FV 製品は、2010 年頃から欧米で販売が開始され、10 年以上の食経験がある。また、米国において、米食品医薬品局 (FDA) GRAS (Substances Generally Recognized as Safe) として認証されており（参照 24）、カナダ及びフランスにおいて、それぞれ食品酵素（食品添加物）及び食品用加工助剤のポジティブリストに記載されている（参照 25、26）。

2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項

pla1FV 製品中に生産菌由来の DNA の残存がないことを PCR 分析により確認した（参照 27）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

pla1FV の製品化前の酵素サンプルは、食品衛生法に基づく成分規格（非有効成分）を満たしている（参考 28、29）。

また、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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

pla1FV 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。適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

pla1FV 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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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6. 第1から第5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1から第5までの事項により安全性の知見は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPAo013 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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に関する食品健康影響評価指針」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、導入遺伝子の供与体、導入される塩基配列が明らかであること等の導入遺伝子の安全性、導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。

以上のことから、「JPAo013 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. Application Information (社内文書)
2. 坂口 謹一郎, 山田 浩一. 麹菌の形態と其の分類に就て (其の 1) 日本農芸化学会誌. 1944 年 20 卷 1 号 p.65-73.
3. Wood BJB. Oriental Food Uses of *Aspergillus*. In: Smith JE, Pateman JA (editors). The British Mycological Symposium. London: Academic Press; 1977. pp. 481-498.
4. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;36(5):569-572.
5. 国立感染症研究所. 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」 .
https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_230602-1.pdf [accessed June 14 2024].
6. 国立感染症研究所 病原体等安全管理規程 (国立感染症研究所)
https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_20240401.pdf [accessed June 14 2024].
7. Frisvad JC, Moller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2018;102(22):9481-9515.
8. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology* 2003;41(1):29-36.
9. Tominaga M, Lee YH, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O et al. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(1):484-490.
10. Kusumoto K, Nogata Y, Ohta H. Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet* 2000;37(2):104-111.
11. Trinci APJ. Myco-protein: A twenty-year overnight success story. *Mycological Research* 1992;96(1):1-13.
12. O'Donnell K, Cigelnik E, Casper HH. Molecular Phylogenetic, Morphological, and Mycotoxin Data Support Reidentification of the Quorn Mycoprotein Fungus as *Fusarium venenatum*. *Fungal Genetics and Biology* 1998;23(1):57-67.
13. Hynes MJ, Corrick CM, King JA. Isolation of genomic clones containing the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and their use in the analysis of structural and regulatory mutations. *Mol Cell Biol* 1983;3(8):1430-1439.

14. Ramrakhiani L, Chand S. Recent Progress on Phospholipases: Different Sources, Assay Methods, Industrial Potential and Pathogenicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Article 2011;164(7):991-1022.
15. 遺伝子導入用ベクターpJPV058のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
16. JPAo013株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
17. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV058 on the genome of JPAo013 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
18. Sequence homology of ORFs in the 5' flanking region of the insertion on the genome of JPAo013 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
19. Sequence homology of ORFs in the 3' flanking region of the insertion on the genome of JPAo013 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
20. Hoff M, Trueb RM, Ballmer-Weber BK, Vieths S, Wuethrich B. Immediate-type hypersensitivity reaction to ingestion of mycoprotein (Quorn) in a patient allergic to molds caused by acidic ribosomal protein P2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Article 2003;111(5):1106-1110.
21. Digestibility of pla1FV protein in a product formulation (社内文書)
22. Purity and Digestibility of pla1FV protein in a test batch PPW23436 by Sequential SGF-SIF (社内文書)
23. Analytical method for temperature and pH activity profile and temperature stability of Phospholipase A1 (社内文書)
24. FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS) Notice Inventory. https://www.hfpappexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=142&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=142. January 14, 2025.
25. List of Permitted Food Enzymes (Lists of Permitted Food Additives). <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/5-enzymes.html> [accessed May 16, 2018].
26. フランスの食品用加工助剤ポジティブリスト (2020年) <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000271061>. [accessed Dec. 18 2020].
27. Absence of recombinant DNA in the product from strain JPAo013 (社内文書)
28. 第10版食品添加物公定書 (消費者庁、2024年) https://www.caa.go.jp/policies/policy/standards_evaluation/food_additives/official_documents_002. [accessed September 02 2024].

29. Characterization of Representative Batches and Toxbatch from JPAo013
(社内文書)