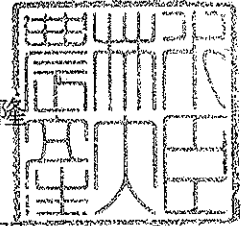


21 消安第 8306 号  
平成 21 年 10 月 22 日

農業資材審議会長  
土 肥 一 史 殿

農林水産大臣 赤松 広隆



組換えDNA技術応用飼料の安全性に関する確認に係る諮問について

下記の飼料について、組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手續（平成14年11月26日農林水産省告示第1780号）第3条第2項の規定に基づき、貴審議会の意見を求める。

記

*E. coli*組換え体利用による飼料添加物塩酸L-リジン

## 組換えDNA技術応用飼料添加物の安全性確認

平成21年10月22日付け21消安第8306号をもって諮問された組換えDNA技術応用飼料添加物の安全性確認について「組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続を定める件」（平成14年11月26日付け農林水産省告示第1780号。以下「確認手続」という。）に基づき確認を行った。その結果は次のとおりである。

### 1 E. coli組換え体利用による飼料添加物塩酸L-リジン

#### (1) 申請品目

飼料添加物名：塩酸L-リジン

用途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

申請者：味の素株式会社

開発者：味の素株式会社

#### (2) 経過

平成21年10月22日	諮問
平成21年11月 5日	第35回組換え体委員会
平成22年 3月23日	第36回組換え体委員会
平成22年 4月27日	第37回組換え体委員会
平成22年 7月 6日	第38回組換え体委員会
平成22年11月 5日	第39回組換え体委員会

#### (3) 結果

確認手続第3条第1項に基づく確認を行って差し支えないと判断される。

参考：飼料に係る食品健康影響評価（畜産物の安全性）

平成22年11月29日 農林水産省より、食品安全委員会に諮問

平成22年12月13日 食品安全委員会において食品としての健康影響評価を実施、継続審議中

1 「*E.coli* 組換え体利用による飼料添加物塩酸 L-リジン」に係る安全性確認(案)

2

3 I はじめに

4 「*E.coli* 組換え体利用による飼料添加物塩酸 L-リジン」について、「組換え DNA 技術応用  
5 飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第  
6 1780 号)に基づき審議を行った。

7

8 II 確認対象飼料添加物の概要

9 添加物：*E.coli* 組換え体利用による飼料添加物塩酸 L-リジン

10 有効成分概要

一般名	分子式(分子量)	化学名(IUPAC)	CAS 番号
塩酸 L-リジン	$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$	(2 <i>S</i> )-2,6-Diaminohexanoic acid	657-27-2
L-Lysine Hydrochloride	(182.65)	monohydrochloride	

11 用途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

12 申請者：味の素株式会社

13 開発者：味の素株式会社

14

15 「*E.coli* 組換え体利用による飼料添加物塩酸 L-リジン」(以下、「本添加物」という。)は、  
16 「組換え体利用飼料添加物の安全性評価指針の制定について」(平成 8 年 5 月 17 日付け 8 畜 A  
17 第 1147 号農林水産事務次官通達)に基づき、平成 13 年に安全性が確認されている塩酸 L-リ  
18 ジン(以下、「既存の添加物」という。)の生産菌の生産効率を高めるため、既存の添加物の  
19 生産菌ではプラスミドに組み込まれていた腸内細菌(*Escherichia coli* K-12 株)及びコリネ  
20 型細菌(*Corynebacterium glutamicum*)由来の L-リジン生合成に関与する遺伝子を、既存  
21 の添加物の生産菌と同じ宿主菌である *E.coli* K-12 株の染色体に組み込むことにより作成され  
22 た LYS-No.1F 株から生産された塩酸 L-リジンである。

23 宿主菌及び組み込んだ遺伝子の安全性は明らかとなっている。なお、本添加物の生産菌に  
24 は、プラスミド及び抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていない。また、生産菌は精製の  
25 過程で除去されているため本添加物には含まれていない。

26 本添加物と既存の添加物の成分等を比較した結果、含有成分が飼料添加物の成分規格を満  
27 たすこと、98.5%以上の純度に精製されており、有害性が示唆される非有効成分は含有してい  
28 ないことが確認された。

29 なお、本添加物は、既存の添加物と同様に、海外で製造され日本に輸入することを予定し  
30 ている。

31 審議の結果、「*E.coli* 組換え体利用による飼料添加物塩酸 L-リジン」については、  
32 「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26  
33 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき、安全性を確認して問題ないと考えられた。

34

35 III 審議内容

36 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

37 本添加物及び既存の飼料添加物の成分、品質及び使用方法について確認した結果、不純  
38 物を含めた成分組成は同等であり、使用方法も変わらないことから、本添加物及び既存の

39 飼料添加物は同等であると考えられた（参考文献 1,2）。

40 2 組換え体等に関する事項

41 (1) GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え  
42 体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体  
43 であることに関する事項

44 LYS-No.1F 株の宿主菌である *E. coli* K-12 株は、非病原性であり、ウイルス等の病  
45 原性に関係のある外来因子により汚染されておらず、長期にわたり工業的利用が安全  
46 になされているものであり、OECD では GILSP (Good Industrial Large-Scale  
47 Practice : 優良工業製造規範) が適用できる微生物、すなわち「特殊な培養条件下以  
48 外では増殖が制限されること、病原性がないこと等のため最小限の拡散防止措置をと  
49 ることにより使用等を行うことができるもの。」として認定されている。挿入遺伝子及  
50 びベクターは、DNA の分子量及び制限酵素による切断地図等が明らかとなっており、  
51 既知の有害な配列を含んでおらず、組換え体の外界での安定性を増大させるものでな  
52 く、遺伝子の伝達性を有さない。組換え体の LYS-No.1F 株は、非病原性であり、工業  
53 的利用の場において宿主と同程度に安全である。以上のことから、LYS-No.1F 株は  
54 GILSP 組換え体に該当すると考えられる（参考文献 3,4,5,6,7,8,9）。これらの事項に  
55 関する詳細は（3）宿主に関する事項～（6）組換え体に関する事項に記載した。

56

57 (2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

58 LYS-No.1F 株は、飼料添加物塩酸 L-リジンの生産効率を向上させる目的で、既存の  
59 添加物の生産菌と同様の方法で製造に利用される（参考文献 9,10）。なお、当該生産  
60 菌は添加物製造工程において、加熱により死滅し、精製により分離・除去されている。

61

62 (3) 宿主に関する事項

63 ア 学名、株名等の分類学上の位置付けに関する事項

64 宿主菌は Enterobacteriaceae 科 *Escherichia* 属の *E.coli* K-12 株である。

65

66 イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項（非病原性であること。）

67 一般に、家畜は *E.coli* を含む腸内細菌群を保持していることが知られている。ま  
68 た、宿主として用いられた *E.coli* K-12 株は、有害生理活性物質を生産することは  
69 知られておらず、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定によるバイオセーフテ  
70 ィレベル分類では、レベル 1 (BSL1) の微生物、すなわち「ヒトあるいは動物に  
71 疾病を起こす見込みのないもの」と規定され、OECD では GILSP が適用できる宿  
72 主微生物として認定されている（参考文献 11）。

73

74 ウ 寄生性及び定着性に関する事項

75 *E.coli* K-12 株が腸管寄生性及び定着性を持つことは知られていない（参考文献  
76 12）。

77

78 エ ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

79 BSL1 微生物のみを扱う実験室において管理されており、病原性の外来因子には

80 汚染されていない。

81

82 オ 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項  
83 温度、pH、栄養素等の条件が適切に揃うことにより生存及び増殖が可能となる。  
84 これらの条件が揃わなければ増殖は制限される（参考文献 13）。

85

86 カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項  
87 本宿主は、F 因子（*E.coli* の性決定因子）及び伝達性プラスミドを保有しておら  
88 ず、有性生殖での遺伝子供与体とはならない（参考文献 14）。従って、他の微生物  
89 に組換え遺伝子を拡散するものではない。

90

91 キ 飼料に利用された歴史に関する事項  
92 *E.coli* K-12 株は、既存の添加物の生産菌株の宿主菌であり、これまでも飼料添加  
93 物生産に利用されている。

94

95 ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項  
96 *E.coli* K-12 株は、通常細菌同様、細胞分裂により増殖するが、増殖可能最高温  
97 度は 45 ° C 付近であり、増殖速度が最大となる温度は 40 ° C 付近である。温度  
98 低下と共に増殖速度は低下し、10 ° C 付近で実質的に増殖しなくなる（参考文献  
99 15）。

100

101 ケ 類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  
102 *E.coli* の一部に *diarrheagenic E.coli*（下痢原性大腸菌）など病原性を有す種が知  
103 られているが、LYS-No.1F 株宿主株である *E. coli* K-12 株は、2 の（3）のイに記  
104 載のとおり、病原性はなく、有害物質を産生するという事実も認められていない。

105

#### 106 (4) ベクターに関する事項

107 ア 名称及び由来に関する事項

108 Mini-Mu を用いた遺伝子組込み用には、*E.coli* を宿主とするバクテリオファージ  
109 Mu 由来の mini-Mu を遺伝子組込みベクターとしてプラスミド pMW119（ニッポ  
110 ンジーン社製）に搭載したものを、ヘルパープラスミドとしている（参考文献  
111 4,16）。ヘルパープラスミドに、L-リジン生合成関与遺伝子を搭載した 8 つのプラス  
112 ミドを mini-Mu による発現ベクターとしている（参考文献 4,7）。なお、本飼料添  
113 加物と同様に mini-Mu を用いて作られた食品添加物の L-バリンは、食品安全委員  
114 会において平成 19 年に評価済みである。プラスミド pMW119 は、厚生労働省及び  
115 経済産業省の GILSP リストに記載されるベクター pSC101 に由来し、ヒトや家畜  
116 に対する有害性等は知られていない（参考文献 23,24）。

117 また、相同組換えを用いた遺伝子組込み用には、pMAN977 を相同組み換え用ベ  
118 クターとしている（参考文献 26,27,28）。pMAN977 に L-リジン生合成関与遺伝子  
119 を搭載したプラスミドを相同組換えによる発現ベクターとしている。プラスミド  
120 pMAN977 も pSC101 に由来する（参考文献 23,26,27,28）。

121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153

イ 性質に関する事項

(ア) DNA の分子量を示す事項

mini-Mu ベクターは、バクテリオファージ Mu ゲノムの左端と右端からなり、塩基数はそれぞれ 445bp と 112bp となっている。また、mini-Mu を含むヘルパープラスミドの塩基数は 5.4kb あるいは 6.0kb となっている。相同組換え用ベクター pMAN977 の塩基数は 4.1kb となっている (参考文献 4,7)。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

ヘルパープラスミド、相同組換え用ベクター及び発現ベクターの制限酵素地図は明らかとなっている (参考文献 4,7)。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

ヘルパープラスミド、相同組換え用ベクター及び発現ベクターは既知の有害配列を含まない (参考文献 4,7,16,17,18)。

ウ 薬剤耐性に関する事項

ヘルパープラスミド、相同組換え用ベクター及び発現ベクターは、表に示す抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。これらの抗生物質耐性マーカー遺伝子は、各挿入遺伝子が染色体に導入された菌株を選別するため使用された。選抜後、プラスミドとともに抗生物質耐性マーカー遺伝子を除去しているため、LYS-No.1F 株は、抗生物質耐性マーカー遺伝子を有さない。生産菌 LYS-No.1F がこれらの抗生物質耐性マーカー遺伝子を含まないことは、PCR 法により確認されている (参考文献 9)。

表 使用された抗生物質耐性マーカー遺伝子 (生産菌には含まれない)

遺伝子の種類	由来	塩基数 (bp)	遺伝子産物の機能
アンピシリン耐性遺伝子	トランスポゾン Tn3	858	$\beta$ ラクタマーゼ
カナマイシン耐性遺伝子	トランスポゾン Tn903	817	ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ
クロラムフェニコール耐性遺伝子	トランスポゾン Tn9	660	クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

エ 伝達性に関する事項

ヘルパープラスミドに搭載された mini-Mu ベクターは、自己転移に必要な領域が除去されているため、ヘルパープラスミド、相同組換え用ベクター及び発現ベクターは自己転移能や伝達性を有さない。(参考文献4,16)。

オ 宿主依存性に関する事項

ヘルパープラスミドに搭載された mini-Mu ベクターは、*E.coli* K-12 株及び

154 *Escherichia* 属細菌等の近縁種を宿主とすることが知られている（参考文献 19）。  
155 ヘルパープラスミドの基となったプラスミド pMW119 及び相同組換えに用いた発  
156 現ベクターの基となったプラスミド pMAN977 は、*E.coli* K-12 株及び *Escherichia*  
157 属細菌等の近縁種を宿主とすることが知られている（参考文献 20,26,27,28）。

158

159 カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

160 ヘルパープラスミドは、プラスミド pMW119 に mini-Mu ベクター配列を挿入後、  
161 ターミネーター断片及びプロモーター断片を挿入することにより作成した（参考文  
162 献 4）。

163 発現ベクターは、クローニングした L-リジンの生合成に関与する遺伝子を目的に  
164 応じて接続することにより遺伝子組込みユニットを形成し、ヘルパープラスミドの  
165 mini-Mu の位置する遺伝子組込み領域に挿入することにより作成した。相同組換え  
166 に用いた発現ベクターも同様に、遺伝子組込みユニットを pMAN977 に挿入するこ  
167 とにより作成した。（参考文献 6,7）。

168

169 キ 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

170 Mini-Mu を用いた発現ベクター及び相同組換え用発現ベクターは塩化ルビジウム  
171 法、エレクトロポレーション法、あるいは P1 フェージによる形質導入法により宿  
172 主へ導入している（参考文献 21）。発現ベクター内における導入の位置は、mini-Mu  
173 末端領域の配列の決定、あるいは相同組換え領域の PCR 法による増幅により明ら  
174 かとなっている（参考文献 29）。

175

176 (5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

177 ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

178 L-リジンの生合成に関与する遺伝子は *E.coli* K-12 株及び *C. glutamicum* に由来  
179 する。*E.coli* K-12 株は、腸内細菌目、腸内細菌科、エシエリヒア属に分類され、*C.*  
180 *glutamicum* は、放線菌目、コリネバクテリウム科、コリネバクテリウム属に分類  
181 される（参考文献 22）。

182

183 イ 遺伝子の挿入方法に関する事項

184 (ア) ベクターへの挿入遺伝子の組込方法に関する事項

185 PCR 法あるいは供与体 DNA 断片のクローニングにより取得した組換え遺伝子  
186 を、制限酵素処理によりベクターへと組込み、発現ベクターとしている（参考文  
187 献 5、6、7）。

188

189 (イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

190 ヘルパープラスミドに搭載された mini-Mu を用いた方法、P1 フェージによる  
191 形質導入法あるいは相同組換え法により、発現ベクター上の各遺伝子組込ユニッ  
192 トを宿主菌の染色体に導入している（参考文献 21）。発現ベクター及びヘルパー  
193 プラスミド上に存在する抗生物質耐性マーカー遺伝子により、組換え遺伝子が導  
194 入された菌株を選抜している。なお、抗生物質耐性マーカー遺伝子は、プラスミ

195 ドとともに除去される。抗生物質耐性マーカー遺伝子が除去されていることは  
196 LYS-No.1F 株を用いた PCR 法により確認されている（参考文献 9）。

197

#### 198 ウ 構造に関する事項

##### 199 (ア) プロモーターに関する事項

200 使用したプロモーターはすべて *E.coli* あるいは *E.coli* プラスミドに由来する  
201 (参考文献 3)。

202

##### 203 (イ) ターミネーターに関する事項

204 原核生物においては、各遺伝子の下流にターミネーターを接続しなくても、遺  
205 伝子を発現させることができる。そのため LYS-No.1F 株においては、遺伝子毎  
206 にターミネーター配列を接続していない。ただし、各遺伝子組込みユニットにお  
207 いて、組込み位置周辺領域への影響を避けるため、*E.coli* フェージ由来のバクテ  
208 リオフェージ fd に由来するターミネーター配列が使用されている（参考文献 3）。

209

##### 210 (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

211 宿主に挿入される DNA の全塩基配列は明らかとなっている。挿入遺伝子の内、  
212 *E.coli* K-12 株に由来する遺伝子に、有害と考えられる配列は含まれていない。ま  
213 た、*C. glutamicum* は非病原性の GRAS 微生物として長年工業的に使用されて  
214 おり、本微生物より分離された遺伝子は一般に安全であると考えられる。その他  
215 使用されている配列は、*E.coli* K-12 株に感染するバクテリオフェージ、*E.coli* K-12  
216 株のプラスミド、マルチクローニングサイト及びリンカーに由来し、有害塩基配  
217 列を含まないものを利用している（参考文献 3）。

218

#### 219 エ 性質に関する事項

##### 220 (ア) 挿入 DNA の機能に関する事項

221 挿入 DNA の機能及び挿入 DNA から産生されるたん白質はすべて L-リジンの  
222 生合成に関与する酵素たん白質であり、それぞれのたん白質の機能は明らかとな  
223 っている（参考文献 8）。

224

##### 225 (イ) DNA の分子量を示す事項

226 挿入遺伝子の塩基数は明らかとなっている（参考文献 6,8）。

227

##### 228 (ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

229 宿主菌に導入された組換え遺伝子の切断地図及び用いた制限酵素の名称、断片  
230 の数、サイズ及びサザンブロットィング解析パターンは明らかになっている（参  
231 考文献 6,7）。

232

#### 233 オ 純度に関する事項

234 各組換え遺伝子の塩基配列、分子量及び由来は上記のとおり明らかとなっており、  
235 各遺伝子組込ユニットは PCR 法等を用いて純化しており、目的配列以外の配列は

236 含まない（参考文献 5）。

237

238 カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

239 各挿入遺伝子を染色体に導入する際、2の（4）のウに示す抗生物質耐性マーカー  
240 遺伝子を菌株の選別のため使用した。いずれも厚生労働省、あるいは経済産業省  
241 の GILSP リストにおいてマーカーとして記載されているものであり、安全性に問  
242 題はないと考えられる（参考文献 23,24）。LYS-No.1F 株は、各挿入遺伝子の導入  
243 確認後、抗生物質耐性マーカー遺伝子を除去されている。すべての抗生物質耐性マ  
244 ーカー遺伝子が生産菌 LYS-No.1F 株から除去されていることは、PCR 法により確  
245 認されている（参考文献 9）。

246

247 キ オープンリーディングフレーム（ORF）の有無並びにその転写及び発現の可能性  
248 に関する事項

249 各遺伝子組込みユニット内部及び各遺伝子組込みユニットの染色体への導入によ  
250 って新たに生じる境界領域から 30 アミノ酸残基以上の長さを有する ORF（終始コ  
251 ドンから終始コドン）を抽出した。各 ORF についてデータベースを用いて相同性  
252 検索を実施した結果、有害と考えられる配列との間に相同性は認められなかった  
253 （参考文献 17）。

254

255 （6）組換え体に関する事項

256 ア 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項（非病原性であるこ  
257 と。）

258 組換え DNA 操作により組込んだ遺伝子は、いずれも L-リジン生合成に関与する  
259 酵素遺伝子であり、病原性等を付与するものでないことから、LYS-No.1F 株は非病  
260 原性であると考えられる。

261

262 イ 宿主との差異に関する事項

263 宿主との差異は、L-リジンの生合成に関与する遺伝子が組み込まれている点のみ  
264 である。組換え DNA 操作により組込んだ遺伝子には有害と考えられる配列は含ま  
265 ない。そのため、この組換え DNA を宿主に導入することで、宿主に有害物質の産  
266 生性は付与されることはないと考えられる（参考文献 8,17）。

267

268 ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

269 宿主株と組換え体における、生存及び増殖能力に相違はなく、生存及び増殖が可  
270 能となるのは温度、pH、栄養素等の条件が揃う場合に限られる。

271

272 エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

273 通常の細菌同様、細胞分裂により増殖するが、増殖可能最高温度は 45 °C 付近で  
274 あり、増殖速度が最大となる温度は 40 °C 付近である。温度低下と共に増殖速度は  
275 低下し、10 °C 付近で実質的に増殖しなくなる。

276

- 277 オ 不活化法に関する事項  
278 製造工程において、培養液を 120 °Cで加熱殺菌することにより不活化している。  
279 製造工程におけるこの不活化操作により本添加物中に組換え体が残存しないことを、  
280 PCR 法により確認している（参考文献 25）。  
281
- 282 3 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項  
283 (1) 飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項  
284 平成 13 年における既存の添加物の評価申請時から変更はなく、既存の添加物の製造  
285 で長年の使用実績がある飼料添加物の製造原料を用い、製造される。  
286
- 287 (2) 飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項  
288 平成 13 年における既存の添加物の評価申請時から変更はなく、既存の添加物の製造  
289 で長年の使用実績がある飼料添加物の製造器材を用い、製造される。  
290
- 291 4 生産物に関する事項  
292 (1) 組換え体の混入を否定する事項  
293 PCR 法により、本添加物中に組換え体が混入していないことを確認した（参考文献  
294 25）。  
295
- 296 (2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項  
297 原料および製造工程は平成 13 年の評価申請時から変更していない。また、導入した  
298 L-リジンの生合成に関与する遺伝子は長年の工業生産実績のある遺伝子であり、ORF  
299 についてデータベースに対する相同性検索を実施した結果においても有害物質を発現  
300 すると考えられる配列との間に相同性は認められなかった（参考文献 17）。また、本  
301 添加物は、比旋光度、アンモニウム塩、重金属、ヒ素、強熱残分を含む飼料添加物成  
302 分規格収載書の規格値をすべて満たしており（参考文献 1）、さらに、液体クロマトグ  
303 ラフィーにより、本添加物と既存の添加物との不純物を比較した結果、申請品目にお  
304 いて著しく増加した不純物や新たに生じた不純物は認められず、新たな意図しない成  
305 分は生じていないと考えられることから（参考文献 2）、有害性が示唆される新たな非  
306 有効成分を含有している可能性は極めて低いと考えられた。  
307
- 308 (3) 精製方法及びその効果に関する事項  
309 精製方法及びその効果は明らかとなっており、製造工程において有害物質が混入す  
310 る可能性は極めて低いと考えられる。精製工程を経た添加物の製品は飼料添加物成分  
311 規格収載書の規格値を満足するものであり、また、長年の製造実績においてこれまで  
312 安全上の問題があったとの報告はない（参考文献 10）。  
313
- 314 (4) 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  
315 これまでの既存の添加物の製造実績において、含有する常成分に有害性が示唆され  
316 た報告はなく、本添加物の製造に用いられる原料及び製造方法は、既存の添加物の製  
317 造に使用されているものと同じである。

318 3 ロットの**本添加物**及び**既存の添加物**の**飼料添加物成分規格値**（含量、比旋光度、  
319 アンモニウム塩、重金属、ヒ素、乾燥減量及び強熱残分）を比較した結果、すべて飼  
320 料添加物成分規格収載書の規格値の範囲内であり、本添加物と既存の添加物で有意な  
321 差異は認められなかったことから、本添加物の常成分の変動の範囲も従来の添加物と  
322 同じであると考えられる（参考文献 1）。

323

324 （5）**組み換え体**によって製造された生産物の**外国**における**認可**及び**使用等**の状況に関する事項

326 **LYS-No.1F** 株により製造された**塩酸 L-リジン**は、高度に精製されているが、その  
327 用途は**食品添加物**でなく、**飼料添加物**である。本生産菌株を用いた**塩酸 L-リジン**の遺  
328 伝子組換え飼料添加物としての**安全性確認**の申請は、日本が最初の例である。

329

330 5 2 から 4 までにより**安全性**に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な  
331 試験の成績に関する事項

332 該当しない。

333

#### 334 IV 審議結果

335 *E.coli* 組換え体利用による飼料添加物**塩酸 L-リジン**について、「組換え DNA 技術応  
336 用飼料及び飼料添加物の**安全性**に関する**確認**の**手続**」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1  
337 項による確認を行って差し支えないと判断された。

338

339 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 塩酸 L-リジン製造用原体 (その 2) 飼料添加物成分規格値分析結果 (社外秘)
- 2 塩酸 L-リジン製品中に含まれる不純物評価 (社外秘)
- 3 LYS-No.1F 株の概要 (社外秘)
- 4 mini-Mu ベクター搭載ヘルパープラスミドの制限酵素地図 (社外秘)
- 5 挿入遺伝子のクローニングの方法 (社外秘)
- 6 各遺伝子組込みユニットの制限酵素地図 (社外秘)
- 7 発現ベクターの構築方法 (社外秘)
- 8 各挿入遺伝子の機能 (社外秘)
- 9 抗生物質耐性遺伝子が存在しないことの確認 (社外秘)
- 10 精製の方法及び効果 (社外秘)
- 11 OECD. 1992. SAFETY CONSIDERATIONS FOR BIOTECHNOLOGY  
(<http://www.oecd.org/dataoecd/8/3/2375496.pdf>)
- 12 Gorbach, S.L., 1978, Recombinant DNA: an infectious disease perspective. *J. Infect. Dis.* 137: 615-623
- 13 US EPA 1997, *Escherichia coli K-12 Derivatives Final Risk Assessment.*  
([http://www.epa.gov/biotech\\_rule/pubs/fra/fra004.htm](http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm))
- 14 Curtiss, R. 3rd., 1978, Biological containment and cloning vector transmissibility. *J. Infect. Dis.* 137: 668-675
- 15 Ingraham, J.L. and F.C. Neidhardt. Marr, 1996. *Escherichia coli and Salmonella.* ASM Press, Washington, D.C.
- 16 Castilho, B.A., P. Olfson and M.J. Casadaban. 1984, Plasmid insertion mutagenesis and lac gene fusion with mini-mu bacteriophage transposons. *J. Bacteriol.* 158:488-495.
- 17 L-リジン生産菌 LYS-No.1F 株において生じる ORF (オープンリーディングフレーム) の相同性検索結果について (社外秘)
- 18 NCBI (2007) National Center for Biotechnology Information (NCBI)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/67968376>
- 19 Symonds, N., A. Toussaint, P. Van Putte and M.M. Howe. 1987. *Phage Mu.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- 20 Hasunuma K., M. Sekiguchi. 1979. Effect of dna mutations on the replication of plasmid pSC101 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 137:1095-1099.
- 21 mini-Mu ベクターによる遺伝子組込みユニットの組込み方法 (社外秘)
- 22 Garrity, G.M. 2005, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Springer
- 23 厚生労働省 遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令別表第一号に基づき厚生労働大臣が定める G I L S P 遺伝子組換え微生物 (平成十六年 厚生労働省告示第 27 号)  
([http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/domestic\\_regulations/GILSP\\_list\\_mhlw.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/domestic_regulations/GILSP_list_mhlw.pdf))

- 24 経済産業省 遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令別表第一号の規定に基づき経済産業大臣が定めるG I L S P 遺伝子組換え微生物  
( [http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/domestic\\_regulations/GILSP\\_list\\_meti\\_ver\\_5.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/domestic_regulations/GILSP_list_meti_ver_5.pdf))
- 25 塩酸 L-リジン製品中にリジン生産菌が存在しないことの確認 (社外秘)
- 26 特許協力条約に基づいて公開された国際出願 国際公開番号 : WO99/03988 国際公開 : 1999年 1 月 28 日
- 27 Matsuyama S. and S. Mizushima. 1985. Construction and Characterization of a Deletion Mutant Lacking micF, a Proposed Regulatory Gene for OmpF Synthesis in Escherichia coli. J. Bacteriol. 162: 1196-1202.
- 28 Armstrong K.A., R. Acosta, E. Ledner, Y. Mahida, M. Pancotto, M. McCormick, H. Ohtsubo and E. Ohtsubo. 1984. A 37 × 103 Molecular Weight Plasmid-encoded Protein is Required for Replication and Copy Number Control in the Plasmid pSC101 and its Temperature-sensitive Derivative pHS1. J. Mol. Biol. 175: 331-347.
- 29 発現ベクターの宿主への挿入位置の確認実験結果 (社外秘)