

組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認

LU17257 株を用いて生産されたフィターゼ

平成30年12月26日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課

目次

I	はじめに	2
II	確認対象飼料添加物の概要	2
III	審議内容	3
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
2	組換え体等に関する事項	3
(1)	GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え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であることに関する事項	3
(2)	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	3
(3)	宿主に関する事項	3
(4)	ベクターに関する事項	5
(5)	挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	6
(6)	組換え体に関する事項	7
3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	8
(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	8
(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	8
4	生産物に関する事項	8
(1)	組換え体の混入を否定する事項	8
(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	8
(3)	精製方法及びその効果に関する事項	9
(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	9
(5)	組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	9
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試験の成績に関する事項	9
IV	審議結果	9
V	参考文献及び参考資料	10

「LU17257 株を用いて生産されたフィターゼ」に係る安全性確認

I はじめに

5 「LU17257 株を用いて生産されたフィターゼ」（以下、「ナツフォス E」とする。）について、遺伝子組換え飼料添加物としての安全性確認の申請があったことから、「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 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料添加物の概要

10

添加物：LU17257 株を用いて生産されたフィターゼ

製品名：ナツフォス E

有効成分概要

一般名	化学名 (IUPAC)	EC 番号	CAS 番号	機能
フィターゼ Phytase	<i>myo</i> -inositol- hexakisphosphate 6-phosphohydrolase (6-phytase)	3.1.3.26	9001-89-2	フィチン酸の分解

用途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

15

申請者：BASF ジャパン株式会社

開発者：BASF SE

20

ナツフォス E は、フィチン酸の加水分解を触媒するフィターゼの生産性を高めるため、*Aspergillus niger* ISO-502 株（以下、「ISO-502 株」とする。）を宿主として、腸内細菌科に属する 3 つの菌株由来の合成 6-フィターゼ遺伝子（以下、「HF586 遺伝子」とする。）を導入して作成した *A. niger* LU17257 株（以下、「LU17257 株」とする。）により生産されたフィターゼである。

25

我が国では、遺伝子組換え微生物により生産されたフィターゼとして 3 件承認されており、宿主菌、製造工程等からこのうちの 1 件、ナツフォスとナツフォス E との同等性が確認された。

30

また、宿主である ISO-502 株、HF586 遺伝子の供与体である腸内細菌科に属する 3 菌株、プロモーター及びターミネーターの供与体である *A. niger* GAM-53 株及び *A. niger* NRRL3135 株並びに生産菌である LU17257 株について、安全性、製造器材・製造工程の安全性及び不純物を含めた生産物の安全性について確認したところ、飼料添加物としての安全上の問題となる点は認められなかった。

農業資材審議会飼料分科会遺伝子組換え飼料部会における審議の結果、ナツフォス E 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」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき、遺伝子組換え飼料添加物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

35

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

40 ナツフォス E は、LU17257 株に導入された腸内細菌科に属する 3 菌株由来の HF586 遺伝子によって産生される。既存のフィターゼであるナツフォスを比較対象として、主成分であるフィターゼが同等である点、共通の親株をもつ生産菌である点及び共通の賦形物質を使用している点などからナツフォス E が既存のフィターゼと同等であることが確認された（参考資料 1）。

45 2 組換え体等に関する事項

(1) GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え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であることに関する事項

50 LU17257株の作成に用いられた宿主であるISO-502株は、親株である*A. niger* GAM-53株のセルフクローン株としてオランダ所轄官庁より認定を受けている (van Dijk *et al.*, 2003)。また*A. niger*はGILSPリストに掲載されている。

またISO-502株は後述のように非病原性であり、ウイルス等の病原性に関係のある外来因子により汚染されておらず、長期にわたり飼料及び食品添加物の生産に安全に利用されている。

55 挿入遺伝子及びベクターは、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、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く、遺伝子の伝達性を有さない。

60 以上のことから、組換え体のLU17257株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主と同程度に安全であると考えられ、GILSP組換え体に該当すると考えられた。

(2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

65 LU17257株は、飼料添加物フィターゼの生産効率を向上させる目的で利用され、既存の添加物の生産菌と同様の方法で利用される。なお、LU17257株により生産されるナツフォスEは既存のフィターゼと比較して耐熱性が向上しており、また家禽及び豚の飼料に添加することにより、飼料中に含まれるリンの利用効率を高め、糞便中に排泄されるリン濃度を減少させ、環境への負荷を抑えることができるとされている (Gargova *et al.*, 1997)。

70 (3) 宿主に関する事項

ア 学名、株名等の分類学上の位置付けに関する事項

学名：*Aspergillus niger* ISO-502株

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。）

75 ISO-502株は、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ィレベル分類ではレベル1の微生物、すなわち「ヒトあるいは動物に疾病を起

こす見込みのないもの」に規定されている。

80 また、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種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」（平成16年文部科学省・環境省令第1号）では、実験分類のクラス1、すなわち「哺乳動物等に対する病原性がないものであって、文部科学大臣が定めるもの」に該当する。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

85 ISO-502 株が、家畜に対して腸管寄生性及び定着性を持つことは知られていない。野生株の *A. niger* は経口摂取されても1日後には消化管内で検出できないことが鶏で確認されている (Schuster *et al.*, 2002)。

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

90 ISO-502株は、バイオセーフティレベル1の微生物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より汚染されていない。

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

95 *A. niger* は、6～47 °Cの温度範囲で生育が可能であり、生育至適温度は35～37 °Cである。また生育に必要な最低限の水分活性の指標である生育最低水分活性は0.88であり、水素イオン濃度についてはpH 1.4～9.8の範囲で生育できると報告されている (Schuster *et al.*, 2002)。

ISO-502株の親株であるGAM-53株は、天然型*A. niger*に比べ生存能力が低い事が報告されており (GRAS Notification, 2010)、GAM-53株のセルフクローン株であるISO-502株の生存能力も同様であると考えられる。

100

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

ISO-502株は有性生殖を行わず、交雑しない。胞子を介して増殖するが、これは他の微生物に組換え遺伝子を拡散するものではない。

105

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

110 *A. niger* の各菌株は、β-グルカナーゼやセルラーゼなど動物飼料用酵素の生産に多く利用されている。米国飼料検査官協会 (AAFCO) の管理基準では、フィターゼを含む飼料用酵素を生産する生物源として許容可能なリストに*A. niger* 種菌株が挙げられている (AAFCO, 2012) (参考資料2)。またISO-502株はこれまでも食品添加物の生産菌に用いる宿主として利用されており、3品目が食品安全委員会において安全性が確認されている。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

115 *A. niger* の4種の株について物理化学的処理 (熱抵抗性、UV抵抗性、アルコール耐性等) に対する生育性が調査されており、生育温度を調査したところ、60°Cの環境においては10分で生存率は0.01%以下であった (かび抵抗性試験用菌株調査委員会, 2009)。

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

120 *A. niger* は幅広い温度、pH条件下で生育でき、分生子も豊富に産生して大気中に拡散させることから、自然界に広く生育しており、ヒトや家畜は日常的にこの菌に暴露されていると考えられる (Schuster *et al.*, 2002) が、一般的に非病原性の安全な微生物であると考えられている (van Djick *et al.*, 2003)。

125 (4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

挿入遺伝子の宿主への導入に用いられた発現ベクターpGBTOP-HF586及び選抜マーカベクターpGBAAS-1は、相同組換え用基準ベクターpGBTOPを使用して作製されている。

130

イ 性質に関する事項

(ア) DNAの分子量を示す事項

プラスミドpGBTOPの塩基数は9,120bpである(参考資料2)。

135

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミドpGBTOPの制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

140

プラスミドpGBTOPを構成する要素の塩基配列及び性質は明らかであり、pGBTOPが既知の有害塩基配列を含むという報告はない。したがって、発現ベクターpGBTOP-HF586及び選抜マーカベクターpGBAAS-1にも、病原性又は感染性をコードする有害な塩基配列は含まれない。

ウ 薬剤耐性に関する事項

145

プラスミドpGBTOPは、抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与する *bla* 遺伝子を有する。 *bla* 遺伝子は発現ベクター及び選抜マーカベクターを *E. coli* 内で増幅する際の選抜マーカとして用いる。また *bla* 遺伝子は発現プラスミドが形質転換に用いられる前に分離・除去されており、組換え体LU17257株に含まれることは無い。

150

エ 伝達性に関する事項

A. niger においてプラスミドpGBTOPの伝達性は知られていない。またプラスミドpGBTOPは自律複製起点、トランスポゾン、接合因子を含まず、伝達性を有しない。

155

オ 宿主依存性に関する事項

プラスミドpGBTOPの基本骨格は *E. coli* に依存しており、発現ベクター及び選抜マーカベクターは *E. coli* に導入し増殖・精製されている。

160 カ 発現ベクターの作製方法に関する事項
発現ベクターpGBTOP-HF586は遺伝子発現ユニット（*PglaA*プロモーターの一部、シグナル配列SS、HF586フィターゼ）を制限酵素処理及びPCRによりpGBTOPに挿入することで作製した。また選抜マーカベクターpGBAAS-1も同様に、遺伝子発現ユニット（*PgpdA*プロモーター、アセトアミダーゼ遺伝子）を
165 pGBTOPに挿入することで作製した（参考資料2）。

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

発現ベクターは相同組換えによって宿主に導入されている。また発現ベクターに由来する発現カセットの生産菌LU17257株への挿入位置は、サザンブロット解析により、明らかとなっている（参考資料4）。
170

(5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

挿入遺伝子の供与体は、ISO-502株の親株であるGAM-53株、その類縁株である
175 *A. niger* NRRL3135株、及び腸内細菌科に属する3菌株（*Hafnia sp.*、*Yersinia mollaretti* 及び *Buttiauxella gaviniae*）である。

また、選抜マーカベクターに用いられた *amdS* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* である。

イ 遺伝子の挿入方法に関する事項

(ア) ベクターへの挿入遺伝子の組込方法に関する事項

挿入遺伝子は、制限酵素処理及びPCRにより発現プラスミドに組み込まれている。
180

(イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

発現ベクターpGBTOP-HF586及び選抜マーカベクターpGBAAS-1は、いずれも制限酵素処理により切り出された目的遺伝子断片が相同組換えによって宿主であるISO-502株に導入されている。また、導入された遺伝子の挿入位置及びコピー数は明らかとなっている（参考資料4）。
185
190

ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

発現カセットのプロモーターは、宿主であるISO-502株の親株GAM-53由来のグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーターである。また選抜マーカセットのプロモーターは、*A. nidulans*由来のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーターを使用している。
195

(イ) ターミネーターに関する事項

200 発現カセット及び選抜マーカーカセットのターミネーターは、宿主である ISO-502株の親株GAM-53由来の内在性グルコアミラーゼ遺伝子のターミネーターである。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

205 宿主に導入される挿入DNAの全塩基配列は明らかとなっており、既知の病原性又は感染性をコードする配列を含まない（参考資料3, 5）。

エ 性質に関する事項

(ア) 挿入DNAの機能に関する事項

210 LU17257株に導入された挿入DNAの機能及び挿入DNAから産生されるタンパク質の性質、機能は明らかとなっている（参考資料2, 6）。

(イ) DNAの分子量を示す事項

215 挿入DNAの塩基数は明らかとなっている（参考資料2）。

(ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

宿主ISO-502株に導入された遺伝子の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

220 オ 純度に関する事項

各挿入遺伝子の塩基配列、分子量及び由来は明らかとなっている。各遺伝子発現ユニットはアガロースゲル電気泳動により分離・精製されており、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

225 カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

2の(4)のウに記載のとおり、発現プラスミドに含まれる *bla* 遺伝子は、発現プラスミドが形質転換に用いられる前に、制限酵素により切断除去されている。生産菌LU17257株のゲノムに *bla* 遺伝子が存在しないことは、サザンブロット法によって確認されている（参考資料4）。

230 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に関する事項

235 生産菌LU17257株における挿入遺伝子について、blastp（version 2.2.26）を用いてORFの検索を行った結果、遺伝子導入による未知のORFの形成を含む意図しない変化は発生していないことが確認されている（参考資料5）。

(6) 組換え体に関する事項

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（非病原性であること。）

240 生産菌LU17257株に導入されたのはフィターゼの生合成に関与する遺伝子であ

り、病原性等を付与するものはない。

イ 宿主との差異に関する事項

245 生産菌LU17257株は、*HF586*遺伝子を含む発現カセットが導入されることによりフィターゼ生成能が付与されていること以外に、宿主ISO-502株との差異はない。

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

250 宿主ISO-502株と生産菌LU17257株の生存及び増殖能力に相違はなく、生存及び増殖が可能となるのは温度、pH、栄養素等の条件が揃う場合に限られる。なおLU17257株の属する*A. niger*は孢子形成能を持つが、本フィターゼの生産条件下においては孢子形成を行なわないため、安全上の懸念は生じない。

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

255 生産菌LU17257株は生存及び増殖能力に関し、宿主ISO-502株と相違はなく同じ制限を受ける。

オ 不活化法に関する事項

260 生産菌LU17257株は、安息香酸ナトリウムを添加することで不活化が可能であり、フィルターを用いて菌は除去される（参考資料2）。

3 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

(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

265 ナツフォスEの製造には、生産菌LU17257株以外に、1994年に安全性確認が行われたナツフォスの製造原料としての使用実績を有する原料が使用される。また、ポリビニルアルコール（PVA）及びポリジェン（Poligen® WE43）を除くすべての原料についてEFSAによって認可された物質を使用している（Scientific Opinion EFSA, 2015）。PVA及びポリジェンについては、毒性試験による安全性確認が行われている（参考資料7）。

270

(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

ナツフォスEは、ナツフォスの製造で長年の使用実績がある飼料添加物の製造器材を用いている。

275

4 生産物に関する事項

(1) 組換え体の混入を否定する事項

設定した製造方法により製造したナツフォスEに生産菌LU17257株が含まれていないことは、寒天培地へ生産物を接種しての培養試験及びPCR法により確認されている（参考資料8）。

280

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

285 生産菌LU17257株を用いて製造されたナツフォスEの3製剤の計7ロットについて、重金属、ヒ素、抗菌活性、サルモネラ菌、大腸菌、マイコトキシン、ポリ塩化ジベンゾ-p-ダイオキシン類（PCDD）、ポリ塩化ジベンゾフラン類（PCDF）及びダイオキシン様PCBについて調べたところ、飼料添加物の成分規格等収載書に記載されている規格値を下回っており（参考資料2, 9, 10）、また比較対象とするナツフォスと同等であった。したがって、ナツフォスEに含まれる、製造に由来する不純物が家畜の健康に影響を及ぼすことはないと考えられた。

290 (3) 精製方法及びその効果に関する事項

フィルターを用いた細胞分離工程及び限外ろ過による濃縮工程により、非酵素成分が除去される。これらの工程の工程管理及び品質管理によって最終製品中に生産菌LU17257株及び有害な不純物が存在しないことがSDS-PAGEによって確認されている（参考資料8, 9）。

295

(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

300 ナツフォスEの製造用原体3ロットについて、フィルターゼ有効性試験（ISO 30024, 2009）でFTUを決定し、飼料添加物成分規格（酵素力単位、性状、純度試験及び強熱残分）への適合性を確認した結果、すべて規格値の範囲内であったことから、本添加物の常成分の変動の範囲も従来の添加物と同じであると考えられた。

なお、これまでに於いて、有害性が示唆される常成分に関する報告はない。

305 (5) 組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

ナツフォスEは、EU、米国や南米、アジア、オセアニア等の20カ国で飼料添加物として許可されている。

310 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試験の成績に関する事項

315 ナツフォスEについて、ラットを用いた単回投与毒性試験及び長期反復投与毒性試験、ネズミチフス菌株4種及び*E. coli* 1種を用いた変異原性試験、ナツフォスEの対象家畜である子豚及びブロイラーを用いた耐容性試験を実施したところ、いずれの結果もナツフォスEの毒性その他の安全性に関する影響を示唆するものではなかった（参考資料11, 12, 13）。

IV 審議結果

320 LU17257株を利用して生産されたフィルターゼについて、「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」に基づき審議した結果、飼料添加物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

参考文献

1. AAFCO (2012) Association of American Feed Control Officials Incorporated (2012) Chapter six – Feed Terms and Ingredient Definitions: 30.0 Enzymes, p373-380.
2. Gargova S, Roshkova Z and Vancheva G (1997) Screening of fungi for phytase production. *Biotechnology Techniques*, 11:221-224.
3. GRAS Notification for Carboxypeptidase from a Genetically Modified Strain of *Aspergillus niger*.
4. Scientific Opinion on the re-evaluation of oxidized polyethylene wax (E914) as a food additive EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Source added to Food (ANS)2,3 EFSA Journal 2015;13(7):4145
5. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC and van Dijck PWM (2002) On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:426-435.
6. van Dijck PWM, Selten GCM and Hempenius RA (2003) On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38: 27-35.
7. かび抵抗性試験用菌調査委員会 かび抵抗性試験用菌株調査報告書 2009

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. ナツフォスに関する概要及び原体、製品の特長
2. 本飼料添加物に関する概要及び原体、製品の特徴
3. 挿入領域の塩基配列及び制限酵素サイト
4. 挿入領域のサザンブロット解析
5. バイオインフォマティクス解析
6. ナツフォス E の活性の熱及び pH に対する特性
7. 賦形剤の安定性
8. 微生物及び DNA の混入に関する分析
9. 製造に由来する不純物の安全性（顆粒）
10. 製造に由来する不純物の安全性（液体）
11. 毒性試験
12. 変異原性試験
13. 飼養試験