

組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認

**CRC2836-13885 LVS_ETD MB#2 株を利用
して生産されたフィターゼ**

**令和 6 年 9 月 25 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	4
(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	7
(6)	組換え体に関する事項	8
3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	9
(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	9
(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	9
4	生産物に関する事項	9
(1)	組換え体の混入を否定する事項	10
(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	10
(3)	精製方法及びその効果に関する事項	10
(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	10
(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	10
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	10
IV	審議結果	11
V	参考文献及び参考資料	11

「CRC2836-13885 LVS_ETD MB#2 株を利用し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 「CRC2836-13885 LVS_ETD MB#2 株を利用して生産されたフィターゼ」（以下、「CRC2836 フィターゼ」とする。）について、令和 4 年 1 月 17 日付けで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。

10 II 確認対象飼料添加物の概要

添加物：CRC2836-13885 LVS_ETD MB#2 株を利用して生産されたフィターゼ

製品名：Axtra® PHY GOLD

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：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

15 申請者：ダニスコジャパン株式会社

開発者：DANISCO US, INC.

20 CRC2836 フィターゼは、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、*Trichoderma reesei* RL-P37 株（以下、「RL-P37 株」とする。）を宿主として、化学合成遺伝子である *CRC2836-13885* 遺伝子を宿主改変株の染色体へ導入して作成した CRC2836-13885 LVS_ETD MB#2 株（以下、「13885 LVS_ETD 株」とする。）により生産されたフィターゼである。

25 我が国においてこれまでに安全性が確認された遺伝子組換え微生物により生産されたフィターゼのうち、1 件を対象としてアミノ酸配列の比較や生化学解析により比較を行った結果、CRC2836 フィターゼとの同等性が確認された。

また、宿主である RL-P37 株、*CRC2836-13885* 遺伝子の供与体である糸状菌や大腸菌及び生産菌である 13885 LVS_ETD 株の安全性、製造器材・製造工程の安全性並びに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。

30 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、CRC2836
フィターゼについて、「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」（平成 14 年農林水産省告示第 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

CRC2836 フィターゼは、13885 LVS_ETD 株に導入された糸状菌や大腸菌由来の
遺伝子によって産生される。既存のフィターゼを比較対象として、アミノ酸配列の
比較、生化学的解析（酵素活性、グリコシル化効果）を実施した。その結果、
40 CRC2836 フィターゼが既存のフィターゼと同等と考えるに十分であると確認され
た。

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
45 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

宿主である *T.reesei* は、国立感染症研究所が発行する病原体等のBSL分類にお
けるバイオセーフティレベル2及び3いずれにも収載されていない。

ベクター及び挿入遺伝子については、分子量及び制限酵素による切断地図等が
50 明らかにされており、既知の有害な塩基配列は含まれておらず、組換え体の外界
での安定性が増大するようなものではない。

組換え体の13885 LVS_ETD株は、非病原性であり、工業的利用の場において
宿主RL-P37株と同程度に安全であると考えられる。

55 以上のことから、13885 LVS_ETD株は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

13885 LVS_ETD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、CRC2836
60 フィターゼは、鶏、うずら及び豚用配合飼料に添加することにより、飼料中に含
まれるフィチンリンの利用効率を高めることができる。それに伴い排泄物中のリン
が減少することにより、リンによる環境負荷を低減することができる。

(3) 宿主に関する事項

65 ア 学名、株名等の分類学上の位置付けに関する事項

学名：*Trichoderma reesei* RL-P37株

RL-P37株は、野生株である *T.reesei* QM6a株に由来する突然変異株である。

イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

70 *T.reesei* は、セルラーゼなどの飼料添加物及び食品添加物酵素の生産菌として広く使用されており、安全性について報告されている。一方、*T.reesei* 以外の *Trichoderma* 菌によるマイコトキシンの生産性が報告されているため、RL-P37株のマイコトキシン生産性も調査したが、検出されなかった。

75 これらの知見と試験結果から、RL-P37 株は適切な液体培養条件で安全に使用できる生産菌である。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

80 *Trichoderma* 属は、多種の気候域で土中に観察される。*T.reesei* は木材腐朽菌であり、繊維分解酵素の大量生産に用いられている。米国環境保護庁（EPA）は、*T.reesei* QM6a株の安全性について評価しているが、寄生性についての懸念は示されていない。また、CRC2836フィターゼ生産菌株はセルラーゼ生産能力が欠損しているため、木材を腐朽させる能力を持たず、環境中への定着は有さないと考えられる。

85 以上のことから、ヒトや動物に対して寄生性や定着性の懸念はないと考えられる。

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 全工程で生産菌株を無菌的に取扱うと共に、品質管理検査によって外来因子に汚染されていないことを確認しているため、ウイルスなどの感染性の外来性因子の混入はないと考えられる。

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 *T.reesei* は、セルラーゼ及びキシラナーゼを分泌する木材腐朽菌であるが、生産菌13885LVS_ETD株は複数のセルラーゼの生産能力を欠損しており、自然環境における生存競争に弱い。

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

T.reesei は有性生殖を行う熱帯系子のう菌 *Hypocrea jecorina* の無性世代であ

100 る。また、米国環境保護庁（EPA）は、*T.reesei* QM6a株の安全性をヒト、動物
や植物等について評価しているが、交雑性に関連した安全性の懸念は示されてい
ない。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

105 *T.reesei* が生産する飼料用酵素は日本や米国、EUで広く用いられている。日
本においては、セルラーゼやムラミダーゼ、フィターゼの生産菌として *T.reesei*
が用いられている。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

110 *T.reesei* は、25～37℃の条件下で増殖可能であることが確認されており、推
奨温度は25℃前後で、より高い温度では増殖しにくいと考えられる。また、
pH4.5～7.5の条件下で長期培養した際には、pH7.5で増殖速度が低下することが
示されており、より高いpHでは増殖しにくいと考えられる。

また、低分子物質による増殖抑制は、2g/L酢酸や0.5g/Lフルフラール、0.05%
バニリンによるものが報告されている。

115 産業界では、蒸気加熱や漂白剤などの化学処理による不活化が知られている。

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 *T.reesei* が属する *Trichoderma* 属の中には、免疫不全のヒトへの日和見感染
が報告されている種もあるが、同様の症例は *T.reesei* では報告されていないこと
から、安全性に懸念をもたらすものではない。

また、*Trichoderma* 属の中には、マイコトキシンを生産する種もあるが、こ
れらの種はすべて *T.reesei* と離れた単系統群に属するため、*T.reesei* との関連性
は低いと考えられる。申請品を含む最終製品についても、マイコトキシンは検出
限界以下であることを確認している。マイコトキシン以外では、*Trichoderma*
125 属の複数の種が抗菌ペプチドを生産することが知られているが、ヒトを含む脊椎
動物への影響は報告されていない。

(4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

130 *CRC2836-13885* 遺伝子発現ユニットを、クローニングベクター
pTTTpyr2_PhyBを用いてPCR増幅によって作成し、生産菌13885LVS_ETD株へ
導入している。*mpg1* 遺伝子と *seb1* 遺伝子の遺伝子破壊ユニットは、クローニ
ングベクター [REDACTED] と [REDACTED] を用いてPCR増幅によって作成した。

イ 性質に関する事項

135 (ア) DNAの分子量を示す事項

クローニングベクターpTTTPyr2_PhyB、[REDACTED] 及び [REDACTED] の塩基数は明らかとなっている。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

140 pTTTPyr2_PhyB、[REDACTED] 及び [REDACTED] の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

145 pTTTPyr2_PhyB、[REDACTED] 及び [REDACTED] は、いずれも市販のベクターを基に作成したベクターpTrex3gへサブクローニングして作成したが、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

ウ 薬剤耐性に関する事項

150 pTTTPyr2_PhyB、[REDACTED] 及び [REDACTED] にはアンピシリン耐性を付与する *AmpR* 遺伝子が組み込まれている。しかし、形質転換では、目的遺伝子を含むDNA領域のみをPCR増幅して用いているため、生産菌13885LVS_ETD株に *AmpR* 遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子は導入されていない。

エ 伝達性に関する事項

155 pTTTPyr2_PhyB、[REDACTED] 及び [REDACTED] は、伝達性はない。

オ 宿主依存性に関する事項

160 pTTTPyr2_PhyB、[REDACTED] 及び [REDACTED] は、大腸菌宿主での複製開始領域が含まれるが、*T.reesei* では機能せず、また、生産菌13885LVS_ETD株には含まれていない。

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

165 ベクターpTrex3及びpTrex3gを経てサブクローニング用ベクターpTrex3gMを作成した。pTTTPyr2_PhyB、[REDACTED] 及び [REDACTED] はこのサブクローニング用ベクターpTrex3gMを用いて作成した。また、*CRC2836-13885* 遺伝子は、pTTTPyr2_PhyB へGateway®技術を用いたLR反応によって組み込んだ。

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 ベクターpTTTpyr2_PhyB から、*CRC2836-13885* 遺伝子発現ユニットをPCRにより増幅し、プロトプラスト化した中間株にPEG法により導入し、生産菌13885LVS_ETD株を得た。

CRC2836-13885 遺伝子発現ユニットの生産菌13885LVS_ETD株上の挿入位置は、次世代シーケンサーを用いた解析により明らかになっている。

175 (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

180 *CRC2836* フィターゼをコードする *CRC2836-13885* 遺伝子は、腸内細菌 *Buttiauxella* (ブティオウクセラ) 種を含む細菌のフィターゼ (機能) における共通アミノ酸配列もとに、たん白質工学によって設計された化学合成遺伝子である。

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

185 2. (4) カに記載のとおり、*CRC2836-13885* 遺伝子発現ユニットは、LR反応によってクローニングベクターに組込まれている。

(イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

190 2. (4) キに記載のとおり、*CRC2836-13885* 遺伝子発現ユニットを導入した形質転換株を選択して生産菌13885LVS_ETD株を得た。また、生産菌13885LVS_ETD株に目的遺伝子以外のDNA配列が含まれていないことを確認した。

ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

195 *CRC2836-13885* 遺伝子の発現には、*T.reesei* の *cbh1* 遺伝子のプロモーター配列を用いた。

(イ) ターミネーターに関する事項

200 *CRC2836-13885* 遺伝子の発現には、*T.reesei* の *cbh1* 遺伝子のターミネーター配列を用いた。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

ORF検索の結果、有害なたん白質が生産されることは考え難いこと、ラットを用いた90日間反復経口投与毒性試験などで、有害性を示す結果がなかったこ

205 とから、挿入DNA配列は安全性の懸念につながるものはないと考えられる。

エ 性質に関する事項

(ア) 挿入DNAの機能に関する事項

210 RL-P37株に導入された挿入DNAの機能及び挿入DNAから産生されるたん白
質の性質、機能は明らかとなっている。また、CRC2836フィターゼの物理化
学処理に対する感受性を評価するため、人工胃液に対する耐性を検討した結果、
360分までに分解されなかった。

(イ) DNAの分子量を示す事項

215 挿入遺伝子の塩基数は明らかとなっている。

(ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

220 RL-P37株に導入されたクローニングベクターの制限酵素による切断地図は
明らかとなっている。

オ 純度に関する事項

225 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。また、
CRC2836フィターゼをコードする *CRC2836-13885* 遺伝子発現ユニットに含まれ
ている遺伝子配列を確認している。

カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

230 生産菌13885LVS_ETD株には、抗生物質耐性遺伝子を導入していない。した
がって、申請品について抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する懸念はな
いと考えられる。

キ 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

235 *CRC2836-13885* 遺伝子発現ユニット、その両端の隣接DNA配列、*mpg1* 遺伝
子及び*seb1* 遺伝子について、Geneious prime®配列情報解析ソフトウェアを用
いてORF検索を行った。確認されたORFのうち、既知の毒性たん白質とアミノ酸
配列の相同性を示したものがあつたものの、ORFから推定されたこれらのたん白
質は有害作用を持たないと判断された。

(6) 組換え体に関する事項

- 240 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
 最終的に得られた生産菌 13885LVS_ETD 株が新たに獲得した形質は、
 CRC2836 フィターゼ生産能であり、安全性に懸念を生じるものではない。
- イ 宿主との差異に関する事項
- 245 生産菌 13885LVS_ETD 株は上述した酵素生産能獲得のほか、セルラーゼ、糖
 たん白質糖鎖遊離酵素、マンノース-1-リン酸グアニリルトランスフェラーゼ及び
 ストレス応答因子結合たん白質生産能が欠失している。
- ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項
- 250 生産菌 13885LVS_ETD 株はセルロースを分解する能力に欠陥があるため、野
 生型の *T.reesei* に比べて生存能力が劣るため、外界における生存性及び増殖性は
 低いと考えられる。
- エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項
- 255 ウで述べたように、生産菌 13885LVS_ETD 株はセルロースを分解する能力を
 著しく損なっているため、天然における生存競争下では著しく不利である。
- オ 不活化法に関する事項
- 260 生産菌 13885LVS_ETD 株は、蒸気加熱、漂白剤などによる化学処理など、
 T.reesei に有効な方法で不活化できる。CRC2836 フィターゼの製造工場では、
 50w/v%-水酸化ナトリウム溶液によるアルカリ処理で不活化を行っている。
- 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 CRC2836 フィターゼを配合する製剤製品に使用する酵素以外の原材料には、
 食品あるいは飼料として指定されているもの、またはそれと同等の品質のものを
 用いている。
- (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
- 270 製造用原体や製剤製品製造は長年使用実績のある飼料添加物製造工場及び製造
 器材を用いている。同工場は FAMI QS、ISO9001:2015、14001:2015 並びに
 22000:2005 及びフィンランド政府から認証を受けている。
- 4 生産物に関する事項

- 275 (1) 組換え体の混入を否定する事項
CRC2836フィターゼ製品に、生産菌13885LVS_ETD株及び組換え体遺伝子の混入がないことを、生産菌に特異的なプライマーを用いたPCR増幅法で確認した。
- 280 (2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項
CRC2836フィターゼの製剤製品について、JECFA（FAO/WHO合同食品添加物専門会議）の食品加工に用いる酵素の一般規格の中の純度規格に適合していることを確認した。さらに、ヒ素、カドミウム及び水銀についても検出限界程度または検出限界以下であることを確認した。
- 285 (3) 精製方法及びその効果に関する事項
酵素の回収と生産菌株の除菌は機械を用いて、同時に行われる。精製効果を評価するため、製造用原体の純度をSDS-PAGEで評価した結果、純度は85～95%であり、製造工程には十分な精製効果があると考えられる。
- 290 (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資料
CRC2836フィターゼ製品は、GMPによって製造され、一定の品質が保たれている。また、製品の製造工場ではHACCPを導入している。
製造した最終製品は10製造ロットごとにJECFA規格適合試験を実施しているほか、すべてのロットでJECFA微生物規格適合性と生産菌株が含まれていないことを確認している。
- 295 以上の品質管理体制から、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懸念はないと考えられる。
- 300 (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
CRC2836フィターゼは、米国、EU、中南米等で飼料添加物として承認・販売されている。このうちEUにおいては、2022年9月に欧州食品安全機関（EFSA）から家きん及び豚への使用について安全性への懸念は無いと評価され、2023年6月のEU官報において認可されている。また、カナダにおいては、カナダ食品検査庁（CFIA）から家きん及び豚の飼料として評価され、2023年10月に登録されている。
- 305
- 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

310 該当しない。

IV 審議結果

CRC2836-13885 LVS_ETD MB#2 株を利用して生産されたフィターゼについて、
「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
315 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。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 320 1 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課, “組換え DNA 技術応用飼料添加物の安
全性確認 Morph Δ E8 BP17 4c 株を利用して生産されたフィターゼ,” 農林水産省,
2018.
- 2 独立行政法人国立印刷局, “官報 (号外第 2 3 号) 令和元年 5 月 31 日金曜日,”
2019.
- 325 3 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定 別冊 1 「病原体等の
BSL 分類等」,” 2010.
- 4 ATCC, “Trichoderma reesei QM 6a (ATCC 13631) Product Sheet”.
- 5 G. Sheir-Neiss and B. S. Montenecourt, "Characterization of the secreted cellulases
of Trichoderma reesei wild type and mutants during controlled fermentations,"
330 Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 20, pp. 46-53, 1984.
- 6 Martinez, D. et al., "Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading
fungus Trichoderma reesei (syn. Hypocrea jecorina)," Nature Biotechnology, vol.
26, no. 5, pp. 553-560, 2008.
- 7 R. Hjortkjaer, V. Bille-Hansen, K. Hazelden, M. McConville, D. McGregor, J.
335 Cuthbert, R. Greenough, E. Chapman, J. Gardner and R. Ashby, "Safety evaluation
of Celluclast®, an acid cellulase derived from Trichoderma reesei.," Food and
Chemical Toxicology, vol. 24, no. 1, pp. 55-63, 1986.
- 8 EPA, “Federal Register Vol. 77, No. 172,” Environmental Protection Agency (EPA),
USA, 2012.
- 340 9 K. D. Domsch, “Trichoderma Pers. ex Fr. 1821,” 著: Compendium of Soil Fungi
Volume 1, Academic Press, 1980, pp. 794-804.
- 10 D. Eveleigh, "Trichoderma.," in Trichoderma, USA, Biology of Industrial
Microorganisms. Benjamin Cummings, London, 1985, pp. 487-509.
- 11 K. Kuhls, E. Lieckfeldt, G. J. Samuels, W. Kovacs, W. Meyer, O. Petrini, W. Gams,

- 345 T. Börner and C. P. Kubicek, "Molecular evidence that the asexual industrial
fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete
Hypocrea jecorina," vol. 93, pp. 7755-7760, 1996.
- 12 農林水産省, “飼料添加物規格 セルラーゼ (その1) ,” 2016.
- 13 Association of American Feed Control Office, “30.1 Enzymes/Source Organisms
350 Acceptable for Use in Animal Feed,” 著: AAFCO Official Publication, 2016, pp.
394 - 398.
- 14 D. H. Suh, “Effects of Temperature on Xylanase Secretion by *Trichoderma*
reesei,” *Biotechnology and Bioengineering*, 第 巻 32, pp. 821-825, 1988.
- 15 S. C. Kolli, “Growth response of *Trichoderma* isolates against varying pH levels,”
355 *International Journal of Environmental Biology*, 第 巻 2, 第 4, pp. 180-182, 2012.
- 16 T. K. HAYWARD, “Enzyme Production, Growth, and Adaptation of *T. reesei*
Strains QM9414, L-27, RL-P37, and Rut C-30 to Conditioned Yellow Poplar
Sawdust Hydrolysate,” *Applied Biochemistry and Biotechnology*, pp. 77-79, 1999.
- 17 R. M. Vohra, “Effect of Lignin and Some of its Components on the Production
360 and Activity of Cellulase(s) by *Trichoderma reesei*,” *Biotechnology and*
Bioengineering, 第 巻 XXII, pp. 1497-1500, 1980.
- 18 A. Schuster, “Biology and biotechnology of *Trichoderma*,” *Appl Microbiol*
Biotechnol, 第 巻 87, pp. 787-799, 2010.
- 19 C. Keswani, S. Mishra, B. Sarma, S. Singh and H. Singh, "Unraveling the efficient
365 applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp.," vol. 98, pp.
533-544, 2014.
- 20 R. Anitha and K. Murugesan, "Production of gliotoxin on natural substrates by
Trichoderma virens," vol. 45, pp. 12-19, 2005.
- 21 P. Laurence, Q. Francoise, R. Nicolas, M. Monique, A. Jean-Claude and Y.
370 François, "Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on
Crassostrea gigas embryos," vol. 83, no. 4, pp. 254-262, 2007.
- 22 農林水産省畜水産安全管理課, セルフクローニング又はナチュラルオカレンスに該
当する技術を用いて得られた微生物を利用して製造された飼料及び飼料添加物の取
扱い, 2014.
- 375 23 J. Smith, F. Bayliss and M. Ward, "Sequence of the cloned *pyr4* gene of
Trichoderma reesei and its use as a homologous selectable marker for
transformation," *Current Genetics*, vol. 19, no. 1, pp. 27-33, 1991.
- 24 M. STRATHMANN, “Transposon-facilitated DNA sequencing,” *Proceedings*
of the National Academy of Sciences (PNAS), 第 巻 88, pp. 1247-1250, 1991.

- 380 25 D. Menezes-Blackburn, “Performance of Seven Commercial Phytases in an in
Vitro Simulation,” Journal of Agriculture and Food Technology, 第 巻 1, pp.
283-309, 2013.
- 26 K. Thomas, “A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin
digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins.,”
385 Regulatory Toxicology and Pharmacology, 第 巻 39, 第 2, pp. 87-98, 2004.
- 27 E.F.S.A.(EFSA), “EFSA statement on the requirements for whole genome
sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain,” 2021.
- 28 Silvanovich, “The use of E-scores to determine the quality of protein alignments,”
Regulatory Toxicology and Pharmacology, 第 巻 54, pp. S26-S31, 2009.
- 390 29 JECFA, “Compendium of food additive specifications,” 2006.

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 1 “Westerdijk Declaration of Safe Deposit,” Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
(Royal Netherlands Academy of Arts, Utrecht, 2019.
- 395 2 Metabolite potential of *Trichoderma reesei* GICC00006”.
- 3 Axtra PHY GOLD Certificate of Analysis Impurity Composition,” 2020.
- 4 グルコアミラーゼ遺伝子発現カセット除去領域の野生型配列回復の確認（BLAST に
よる相同性確認）, 2022
- 5 20210510 Open Reading Frame (ORF) Analysis,” 2021.
- 400 6 Open Reading Frame (ORF) Analysis mpg1 and seb 1 Disruptions,” 2021.
- 7 Jämsänkoski Plant Certificates”.
- 8 Production Strain QC Testing - Certificate of Analysis,” 2020.
- 9 rDNA TEST REPORT,” 2020.
- 10 CoA Antimicrobial Activity Assay,” 2020.
- 405 11 Report Bacteria Reverse Mutation Assay (Ames Assay),” 2019.
- 12 Eclipse B In-Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Assay in Human
Peripheral Blood Lymphocytes (HPBL),” 2019.
- 13 Eclipse B: A 90 Day Repeated Dose Toxicity Study,” 2019.
- 14 Eye Irritation Test,” 2019.
- 410 15 Mouse Dermal Sensitization Test,” 2019.
- 16 Skin Irritation Test Using Reconstructed Human Epithelium (RHE) Tissue”.