

xxx 株（菌名）を利用して
生産された xxx（酵素名）

安全性審査資料

申請者

xxx 会社

開発者

xxx 会社

20xx 年 xx 月 xx 日

目次

| | 頁 |
|--|----------|
| 第1 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 |
| 第1-1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料 | 1 |
| 第1-1-（1） 名称、基原及び有効成分 | 1 |
| 第1-1-（2） 製造方法 | 1 |
| 第1-1-（3） 用途及び使用形態 | 1 |
| 第1-1-（4） 摂取量 | 1 |
| 第1-2 宿主及び導入DNA | 1 |
| 第1-2-（1） 宿主の種名（学名）、株名等及び由来 | 1 |
| 第1-2-（2） DNA供与体の種名、株名又は系統名等及び由来 | 1 |
| 第1-2-（3） 挿入DNAの性質及び導入方法 | 2 |
| 第1-3 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 | 2 |
| 第1-4 宿主の構成成分等に関する資料 | 2 |
| 第1-5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料 | 2 |
| 第1-5-（1） 製品名及び有効成分 | 2 |
| 第1-5-（2） 製造方法 | 2 |
| 第1-5-（3） 用途及び使用形態 | 2 |
| 第1-5-（4） 有効成分の性質及び従来の添加物との比較 | 2 |
| 第1-6 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 | 3 |
| 第1-6-（1） 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点 | 3 |
| 第1-6-（2） 組換え体と宿主の相違点 | 3 |
| 第2 宿主に関する事項 | 3 |

| | | |
|-----------|---|----------|
| 第2-1 | 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項 | 3 |
| 第2-2 | 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項 | 3 |
| 第2-3 | 寄生性及び定着性に関する事項 | 3 |
| 第2-4 | 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 | 3 |
| 第2-5 | 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 | 3 |
| 第3 | ベクターに関する事項 | 4 |
| 第3-1 | 名称及び由来に関する事項 | 4 |
| 第3-2 | 性質に関する事項 | 4 |
| 第3-2-（1） | DNAの塩基数及びその塩基配列を示す事項 | 4 |
| 第3-2-（2） | 制限酵素による切断地図に関する事項 | 4 |
| 第3-2-（3） | 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項 | 4 |
| 第3-2-（4） | 薬剤耐性に関する事項 | 4 |
| 第3-2-（5） | 伝達性に関する事項 | 4 |
| 第3-2-（6） | 宿主依存性に関する事項 | 4 |
| 第4 | 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 | 4 |
| 第4-1 | 挿入DNAの供与体に関する事項 | 4 |
| 第4-1-（1） | 名称、由来及び分類に関する事項 | 4 |
| 第4-1-（2） | 安全性に関する事項 | 5 |
| 第4-2 | 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項 | 5 |
| 第4-2-（1） | 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 | 5 |
| 第4-2-（2） | 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 | 5 |
| 第4-2-（3） | 挿入遺伝子の機能に関する事項 | 5 |
| 第4-3 | 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 | 6 |
| 第4-3-（1） | プロモーターに関する事項 | 6 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 第4-3-(2) | ターミネーターに関する事項 | 6 |
| 第4-3-(3) | 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、性質が明らかであること | 6 |
| 第4-4 | ベクターへの挿入DNA組み込み方法に関する事項 | 6 |
| 第4-5 | 構築された発現ベクターに関する事項 | 7 |
| 第4-5-(1) | 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 | 7 |
| 第4-5-(2) | 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれないこと | 7 |
| 第4-5-(3) | 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発現ベクター上で明らかであること | 7 |
| 第4-5-(4) | 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること | 8 |
| 第4-6 | DNAの宿主への導入方法に関する事項 | 8 |
| 第4-7 | 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項 | 8 |
| 第5 | 組換え体に関する事項 | 8 |
| 第5-1 | 宿主との差異に関する事項 | 8 |
| 第5-2 | 遺伝子導入に関する事項 | 8 |
| 第5-2-(1) | 制限酵素による切断地図に関する事項 | 8 |
| 第5-2-(2) | 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 | 9 |
| 第6 | 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項 | 9 |
| 第6-1 | 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 | 9 |
| 第6-2 | 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 | 9 |
| 第7 | 遺伝子組換え食品添加物に関する事項 | 10 |
| 第7-1 | 諸外国における認可、食用等に関する事項 | 10 |

| | | |
|------|--------------------------------|----|
| 第7-2 | 組換え体の残存に関する事項 | 10 |
| 第7-3 | 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項 | 10 |
| 第7-4 | 精製方法及びその効果に関する事項 | 10 |
| 第7-5 | 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 | 10 |
| 第8 | 安全性試験結果に関する事項 | 10 |
| | 本申請品目の安全性に関する結論 | 11 |
| | 添付資料 | 12 |
| | 参考文献 | 12 |

はじめに

以下の内容の概要を記入

- 添加物の名称
- 添加物の特性
- 添加物の由来
- 添加物の用途、作用機構、効果、使用形態
- 宿主菌株
- 生産菌株

第1 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

第1-1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

従来の添加物についての概要

第1-1-1 名称、基原及び有効成分

名称、基原、系統名、IUB 番号、CAS 番号、反応特異性

第1-1-2 製造方法

以下についての概要

- 製造に用いられる原料、精製・濾過助剤、安定化・製剤化原料
- 生産菌の培養、添加物の精製・製剤化
- 製造の概略図

第1-1-3 用途及び使用形態

- 使用用途・形態に対する概要
- 作用機構・効果

第1-1-4 摂取量

日本における従来の添加物のヒト体重 1kg 当たり 1 日最大摂取量を計算

厚生労働省から発行される「国民健康・栄養調査報告」の食品群別栄養素等摂取量等を参考

第1-2 宿主及び導入DNA

第1-2-1 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

- 株名、分類（綱、目、科、属、種）、入手方法
- 突然変異・遺伝子欠失を導入した場合、変異導入方法や欠失遺伝子についての概要
 - ▶ 外来DNAが挿入されていなければ、変異株であれ、宿主として記入

第1-2-2 DNA供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

挿入遺伝子の供与体について以下の項目について記入

- 種名、株名、系統名

第1-2-(3) 挿入DNAの性質及び導入方法

挿入遺伝子について以下の項目について記入

- 挿入遺伝子とは目的タンパク質を発現する遺伝子及び挿入される薬剤耐性遺伝子のことである。
- 挿入遺伝子より発現するタンパク質の性質
- 挿入遺伝子の宿主への導入についての概要

第1-3 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

宿主の利用経験・実績、食経験

第1-4 宿主の構成成分等に関する資料

- 宿主の有害生理活性物質及び栄養阻害物質に関する知見
- 宿主の安全性に関する知見 (以下のものを参考)
 - 国立感染症研究所の病原体等安全管理規程
 - NIHのGuidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules

第1-5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

第1-5-(1) 製品名及び有効成分

- 製品名、有効成分、基原、系統名、IUB番号、CAS番号、反応特異性

第1-5-(2) 製造方法

申請添加物の製造方法の概略(第1-1-(2))

第1-5-(3) 用途及び使用形態

- 申請添加物の使用用途・使用形態及びその効果
- 申請添加物の残存

第1-5-(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

従来の添加物の性質における比較

- 類似点、相違点

第1-6 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

第1-6-(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点

- アミノ酸配列の類似点、相違点
- 従来の添加物と比較して特性の違い及びそれを示すデータ（温度依存性など）

第1-6-(2) 組換え体と宿主の相違点

組換え体（生産菌）と宿主の形質の相違点

第2 宿主に関する事項

第2-1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主の分類学上の位置（第1-2-(1)同様）、使用実績、食経験

第2-2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

宿主の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する知見（以下の情報を参考）

- 国立感染症研究所の「病原体等安全管理規程」
- NIHの「Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules」

第2-3 寄生性及び定着性に関する事項

宿主の寄生性及び定着性に関する知見

第2-4 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

宿主における病原性外来因子に関する知見

第2-5 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

宿主の近縁種の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する知見

第3 ベクターに関する事項

第3-1 名称及び由来に関する事項

ベクターの名称、由来

第3-2 性質に関する事項

第3-2-（1） DNAの塩基数及びその塩基配列を示す事項

- ベクターの塩基数
- ベクターの塩基配列を記入又は添付

第3-2-（2） 制限酵素による切断地図に関する事項

- ベクターの制限酵素切断地図
 - 主な制限酵素サイト、構成要素を記入

第3-2-（3） 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

- ベクターの構成要素及びその基原

第3-2-（4） 薬剤耐性に関する事項

- ベクターに含まれる薬剤耐性遺伝子を記入

第3-2-（5） 伝達性に関する事項

- ベクターの伝達性に関する知見
 - 英国における「遺伝子組換え体の封じ込め利用に関する規制法の中にあるリスクアセスメント」等を参考。

第3-2-（6） 宿主依存性に関する事項

ベクターの複製開始配列の基原とその特性

第4 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

第4-1 挿入DNAの供与体に関する事項

第4-1-（1） 名称、由来及び分類に関する事項

- 挿入遺伝子の名称、由来（供与株）及びその株の分類学上の位置づけ

- 挿入遺伝子とは目的タンパク質を発現する遺伝子及び挿入される薬剤耐性遺伝子のことである。

第4-1-(2) 安全性に関する事項

- 挿入遺伝子の供与体の安全性に関する事項
 - 国立感染症研究所の病原体等安全管理規程 別冊1「病原体等のBSL分類等」
 - NIHのGuidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules
- 供与体について、ヒトに対する病原性や毒素産生性の知見

第4-2 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

第4-2-(1) 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

挿入遺伝子のクローニング又は合成方法

第4-2-(2) 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

- 挿入遺伝子の塩基数及び制限酵素切断地図
 - 主な制限酵素サイトを記入

第4-2-(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

- 挿入遺伝子より発現されるタンパク質の名称及びその特性
- 挿入遺伝子に変異が導入された場合、「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（平成20年6月28日食品安全委員会決定）に従い、アレルギー誘発性に関して以下のことを検討
 - 1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見
 - 2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見
 - 3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

遺伝子産物と既知のアレルゲンとの相同性検索

① 80 アミノ酸で 35%以上一致するアレルゲンの検索

➤ 用いたデータベース、検索結果、考察

② 連続した 8 アミノ酸配列が一致するアレルゲンの検索

➤ 用いたデータベース、検索結果、考察

第 4 - 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

第 4 - 3 - (1) プロモーターに関する事項

- プロモーターの名称及びその由来（供与体）
- 供与体の安全性（食経験、利用実績）
- プロモーターの塩基配列を記入又は添付

第 4 - 3 - (2) ターミネーターに関する事項

- ターミネーターの名称及びその由来（供与体）
- 供与体の安全性（食経験、利用実績）
- ターミネーターの塩基配列を記入又は添付

第 4 - 3 - (3) 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、性質が明らかであること

プロモーター及びターミネーター以外の発現制御に関わる塩基配列（SD 配列、mRNA 安定化配列など）について記入

- 発現制御に関わる塩基配列の名称及びその由来（供与体）
- 発現制御に関わる塩基配列の供与体の安全性（食経験、利用実績）
- 発現制御に関わる塩基配列を記入又は添付

第 4 - 4 ベクターへの挿入 DNA 組み込み方法に関する事項

ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法

第4-5 構築された発現ベクターに関する事項

第4-5-(1) 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

生産菌にプラスミドとしてベクターを保持させる場合は発現ベクター、生産菌の染色体に挿入 DNA を挿入させるためのベクターを遺伝子導入用ベクターという名前で記入する。

- 発現又は遺伝子導入用ベクターの塩基数
- 発現又は遺伝子導入用ベクターの塩基配列を記入又は添付
- 発現又は遺伝子導入用ベクターの制限酵素切断地図
- 発現又は遺伝子導入用ベクターの構成要素及びその由来

第4-5-(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれないこと

- 発現ベクターの場合
そのベクターの全塩基配列について、6通りの読み枠において ORF 検索を行う。この際、終始コドンから終始コドンで終結する 30 アミノ酸以上の ORF を検出する。

1) 検出された ORF と既知アレルゲンとの相同性についての検討

① 80 アミノ酸で 35%以上一致するアレルゲンを検索

- 用いたデータベース、検索結果、考察

② 連続した 8 アミノ酸配列が一致するアレルゲンの検索

- 用いたデータベース、検索結果、考察

2) 検出された ORF とトキシンとの相同性についての検討

- 用いたデータベース、検索結果、考察

第4-5-(3) 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発現ベクター上で明らかであること

- 意図する挿入領域をシーエンス解析
 - 発現又は遺伝子導入用ベクターをシーエンス解析出来ない場合、サザンブロット法により挿入遺伝子のコピー数及び挿入パターンの解析を行う。

第4-5-(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

- ベクターが精製されているかどうか
発現又は遺伝子導入用ベクターをシーケンス解析

第4-6 DNAの宿主への導入方法に関する事項

- 発現ベクターの場合、宿主への導入方法について記載
遺伝子導入用ベクターの場合、宿主への導入方法及び宿主の染色体への挿入について記載

第4-7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

抗生物質耐性マーカー遺伝子が発現ベクターに含まれている場合、又は生産菌の染色体に挿入された場合は以下のことを記入する。

- 抗生物質耐性マーカー遺伝子の名称
- 抗生物質耐性マーカー遺伝子の由来（供与体）
- 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する知見
- 抗生物質耐性マーカー遺伝子の供与体の安全性に関する知見

第5 組換え体に関する事項

第5-1 宿主との差異に関する事項

組換え体（生産菌）と宿主の形質の相違点

第5-2 遺伝子導入に関する事項

第5-2-(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

- 発現ベクターを導入した場合
 - 発現ベクターの制限酵素切断地図
- 遺伝子導入用ベクターを導入した場合
 - 挿入された染色体領域の制限酵素切断地図

第5-2-(2) 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

- 第4-5-(2)の概要

第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

第6-1 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

添加物の製造の概要との安全性を記入

- 製造原料の内容
- 製造器材の内容

第6-2 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

- 添加物の製造原料及び製造器材の安全性についての知見と考察

第7 遺伝子組換え食品添加物に関する事項

第7-1 諸外国における認可、食用等に関する事項

アメリカ、ヨーロッパ、オーストラリア・ニュージーランドにおける申請添加物の認可状況

第7-2 組換え体の残存に関する事項

第7-3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

- 製造に用いられる発酵原料、精製・濾過助剤、安定化・製剤化原料の品質
- FCC 及び JECFA の基準を満たしているか確認
- 生産菌又はその宿主の食経験

第7-4 精製方法及びその効果に関する事項

- 製造工程の概要

第7-5 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

- 第7-1～4を踏まえて、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ついて考察

第8 安全性試験結果に関する事項

第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合、以下のうち必要な事項を記入する。

- 1) 急性毒性に関する試験
- 2) 亜急性毒性に関する試験
- 3) 慢性毒性に関する試験
- 4) 生殖に及ぼす影響に関する試験
- 5) 変異原性に関する試験
- 6) がん原性に関する試験
- 7) その他必要な試験（腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等）

例えば、

微生物を用いる復帰突然変異試験、哺乳類培養細胞を用いる小核試験、13 週間反復投与毒性試験

- 試験条件・方法・結果・結論を記入
- 13 週間反復投与毒性試験を行った場合、日本における申請添加物のヒト体重 1kg 当たり 1 日最大摂取量を算出し、NOEL を求める。

本申請品目の安全性に関する結論

第 1～8 までを踏まえて、申請品目の安全性について結論を出す。

添付資料

1. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
2. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
3. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
4. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
5. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

-
-
-
-

参考文献

1. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
2. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
3. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
4. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
5. XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

-
-
-
-