

# 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

平成30年9月18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	6
(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	9
(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	9
(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	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	10
V	参考文献及び参考資料	10

# 「MorphΔE8 BP17 4c 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 「MorphΔE8 BP17 4c 株を利用して生産されたフィターゼ」（以下、「BP-17 フィターゼ」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：MorphΔE8 BP17 4c 株を利用して生産されたフィターゼ

製品名：Aextra® PHY

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

BP-17 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糸状菌 *Trichoderma reesei* RL-P37 株（以下、「RL-P37 株」とする。）を宿主として、*Buttiauxella* P1-29 株由来のフィターゼ遺伝子（以下、「BP-17 フィターゼ遺伝子」とする。）を宿主改変株の染色体へ導入して作成した MorphΔE8 BP17 4c 株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が、これまでに 3 件承認されている。アミノ酸配列の比較や生化学的解析により、これらのフィターゼのうち 1 件と BP-17 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、BP-17 フィターゼ遺伝子の供与体である *Buttiauxella* P1-29 株及び生産菌である MorphΔE8 BP17 4c 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

なお、BP-17 フィターゼは、海外で製造され日本に輸入される予定である。

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、BP-17 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

BP-17 フィターゼは、Morph $\Delta$ E8 BP17 4c 株に導入された *Buttiauxella* P1-29 株由来の BP-17 フィターゼ遺伝子によって産生される。既存のフィターゼであるフ  
アイザイム XP（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年 7 月  
40 24 日農林省令第 35 号）別表第 2 の 6-フィターゼ（その 2 の（3）））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、グリコシル化パターン）  
を実施した。その結果、BP-17 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(Mullaney and Ullah, 2007、Gebert, 2013)。

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

宿主 RL-P37 株は、ATCC (American Type Culture Collection) においてバイ  
オセーフティレベル 1 に分類される野生型 *T. reesei* QM6a 株の突然変異株である。  
また *T. reesei* は、国立感染症研究所の定めるバイオセーフティレベル (BSL) 分  
類の 2 及び 3 のいずれにも記載されていないため (国立感染症研究所, 2010)、  
取扱い及び保存に関して最小限の安全処置で十分な BSL 1 の微生物に分類される。

55

BP-17 フィターゼ遺伝子の供与体である *Buttiauxella* P1-29 株の属する  
*Buttiauxella* 属は、ATCC 及び DSMZ (Deutsche Sammlung von  
Microorganismen und Zellkulturen) においてそれぞれ Biosafety Level 1 又は  
Risk group 1 に分類されており (ATCC, 2016、DSMZ, 2016)、国立感染症研究  
所の分類においても BSL1 とされていることから、最小限の安全手順で取り扱う  
ことが出来ると考えられる。

60

挿入遺伝子及び挿入遺伝子の作成に用いたクローニングベクターは、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、また、生産菌株へ  
導入された遺伝子は伝達性を有さない。

65

よって組換え体の Morph $\Delta$ E8 BP17 4c 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る。

以上のことから、Morph $\Delta$ E8 BP17 4c 株は GILSP 組換え体に該当すると考えら  
れた。

70

##### (2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

Morph $\Delta$ E8 BP17 4c 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、Morph $\Delta$   
E8 BP17 4c 株により生産される BP-17 フィターゼは、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 (Dilger *et*  
75 *al.*, 2004、Brana *et al.*, 2006、Sands and Kay, 2007、Santos *et al.*, 2008、

Jones *et al.*, 2010)。

### (3) 宿主に関する事項

#### 80 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（本文中、「RL-P37株」と記載）

#### 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。）

85 *T. reesei*は飼料添加物及び食品添加物酵素の製造において主にセルラーゼ生産菌として広く使用されている糸状菌であり、その安全性が知られている。

また米国環境保護庁(EPA)は、RL-P37株の由来である*T. reesei* QM6a株の安全性について評価を行っており、標準的な工業レベルの酵素生産において毒性物質を産生することはないと報告している（Federal Register, 2012）。

#### 90 ウ 寄生性及び定着性に関する事項

*Trichoderma*属は広く土壌中に観察されるグループである（参考資料2）。また木材腐朽菌であり、セルラーゼやキシラナーゼの生産菌として産業的に広く用いられている。またEPAは*T. reesei* QM6a株の評価において、寄生性についての懸念はないとしている（Federal Register, 2012）。これらから、RL-P37株はヒト及び家畜に対しては寄生性や定着性は有していないと考えられた。

#### 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

RL-P37株は、病原性の外来因子により汚染されていないことが確認されている。

100

#### 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

*T. reesei*は木材腐朽菌であり、セルラーゼ及びキシラナーゼ等を産生することによって木材中のセルロースやヘミセルロースを分解し、栄養源としている。

#### 105 カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

*T. reesei*は有性生殖を行う子う菌*Hypocrea jecorina*の無性世代であることが知られている（Kuhls *et al.*, 1996）。またEPAは、*T. reesei* QM6a株の安全性についての評価において、交雑性についての安全性の懸念はないとしている（Federal Register, 2012）。

110

#### キ 飼料に利用された歴史に関する事項

115 *T. reesei*は、セルラーゼ等の生産菌として広く利用されている。日本においては、飼料添加物として*T. reesei*の生産するセルラーゼについて規格が定められている（農林水産省, 2016）。また*T. reesei*は自然環境中に常在し、家畜は一般的に曝露していると考えられることから、家畜が摂取しても健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

#### ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

120 *T. reesei*は、25～37℃の条件下で増殖が可能であることが確認されており、推奨温度は25℃前後であると考えられるが、37℃以上では増殖が抑制される傾向が見られる (ATCC、Suh *et al.*, 1988)。またpHについて、4.5～7.5の条件下において増殖が確認されているが、pH7.5以上においては増殖速度が低下することが示されている (Sarojini *et al.*, 2012)。

125 低分子物質による増殖抑制として、2 g/L酢酸、0.5 g/Lフルフラール及び0.05% バニリンによるものが報告されている (Hayward *et al.*, 1999、Vohra *et al.*, 1980)。

#### 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

130 *Trichoderma*属についてはヒトへの病原性を持つ種が報告されているが、免疫不全の患者への日和見感染に限られており (Schuster and Schmoll, 2010)、また *T. reesei*についてはこうした報告はなされていない。また一部の *Trichoderma* 属について、マイコトキシンの産生が報告されているが (Keswani *et al.*, 2014、Anitha and Murugesan, 2005)、これらは *T. reesei*から遠い単系統群に属するため、関連性は低いと考えられる。加えて *Trichoderma*属において抗菌ペプチドを産生する種が知られているが (Laurence *et al.*, 2007)、これらのペプチドがヒトを含む脊椎動物に影響を与えたとの報告はなされていない。以上より、類縁株における病原性及び有害生理活性物質の生産に関する安全性上の懸念はないと考えられる。

#### 140 (4) ベクターに関する事項

##### ア 名称及び由来に関する事項

145 菌株の構築過程において、遺伝子不活化ユニットのクローニングベクターとして p $\Delta$  CBHI $_{pyr4}$ 、pP $\Delta$  CBHII、pEGII::P-1及びpP $\Delta$  EGIを *E.coli* 由来のpUC4K、pUC219及びpUC100を基に、さらにpCR-BluntII-TOPOを Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen社製) を用いて作製した。

またBP-17フィターゼ遺伝子発現ユニットのクローニングベクターとして pTrex3g/BP-17を、pSL1180 (Pharmacia Inc製) を基に作製した。

##### イ 性質に関する事項

###### 150 (ア) DNAの分子量を示す事項

クローニングベクターp $\Delta$  CBHI $_{pyr4}$ 、pP $\Delta$  CBHII、pEGII::P-1、pP $\Delta$  EGI、pCR-BluntII-TOPO及びpTrex3g/BP-17の分子量は明らかとなっている。

###### 155 (イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

全ての遺伝子不活化ユニット及びBP-17フィターゼ遺伝子発現ユニット、またその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。

###### (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

160 各クローニングベクターは、安全性が確認され市販されているベクターを用いて作製されている。また組み込まれた遺伝子不活化ユニット及びBP-17フィターゼ遺伝子発現ユニットの塩基配列は明らかとなっており、これらに病原性又は感染性をコードする既知の有害な塩基配列は含まれない。

#### ウ 薬剤耐性に関する事項

165 遺伝子不活化ユニット及びBP-17フィターゼ遺伝子発現ユニットには抗生物質耐性を付与する遺伝子は含まれていない。また各クローニングベクターに含まれる抗生物質耐性遺伝子は制限酵素によって切断除去されており、生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株のゲノムには導入されていない。

#### 170 エ 伝達性に関する事項

各クローニングベクター及び導入遺伝子には伝達性を付与する配列は含まれておらず、水平伝搬の可能性はない。

#### オ 宿主依存性に関する事項

175 各クローニングベクターには大腸菌宿主での複製起点が含まれているが、これらの複製起点は制限酵素処理によって除去されており、生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株のゲノムには含まれない。

#### カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

180 *Buttiauxella* P1-29株由来のフィターゼ遺伝子を基にBP-17フィターゼ遺伝子を作製し、PCRにより増幅、単離した。この遺伝子断片をGateway Cloning System (Invitrogen社製)によりLR反応プロトコルを用いて、pUC118を基に作製した*amdS*遺伝子を含むベクターpTrex3gに導入し、クローニングベクターpTrex3g/BP-17を得た。

185 なお、BP-17フィターゼ遺伝子に変異が生じていないことはDNAシーケンシングにより確認されている(参考資料7、8)。

#### 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

190 BP-17フィターゼ遺伝子発現ユニットはPCR法によって精製された後、電気穿孔法によって宿主の栄養胞子内の染色体へ導入されている。

遺伝子発現ユニットの生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株への挿入位置は、DNAシーケンシングにより明らかとなっている。

#### (5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

##### 195 ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

BP-17フィターゼ遺伝子の供与体は、フィンランド共和国の土壌から採取された、腸内細菌科に属する*Buttiauxella* P1-29株である。

また選択マーカー遺伝子である*amdS*遺伝子の供与体は糸状菌*Aspergillus nidulans*である。*amdS*遺伝子は広く利用されており、その遺伝子情報が公開さ

200 れている (Corrick *et al.*, 1987)。

## 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

205 2.4. (カ) に記載のとおり、BP-17フィターゼ遺伝子発現ユニットは、LR反応プロトコルを用いてクローニングベクターに組み込まれている。

### (イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

210 2.4. (キ) に記載のとおり、電気穿孔法によりBP-17フィターゼ遺伝子発現ユニットが宿主の染色体へ導入される。

## ウ 構造に関する事項

### (ア) プロモーターに関する事項

215 BP-17フィターゼ遺伝子のプロモーターは、*T.reesei*の内在性セロビオヒドロラーゼ1遺伝子のプロモーター配列である。また*amdS*遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans*由来の*amdS*遺伝子プロモーター配列である。

### (イ) ターミネーターに関する事項

220 BP-17フィターゼ遺伝子のターミネーターは、*T.reesei*の内在性セロビオヒドロラーゼ1遺伝子のターミネーター配列である。また*amdS*遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans*由来の*amdS*遺伝子ターミネーター配列である。

### (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

225 各クローニングベクター由来の挿入DNAの配列には、既知の病原性又は感染性をコードする配列を含まない。

## エ 性質に関する事項

### (ア) 挿入DNAの機能に関する事項

230 宿主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。また本たん白質の物理化学的処理に対する感受性について、人工消化液を用いて確認し、人工胃液中では処理開始後30分以内に消化されることがわかっている。

### (イ) DNAの分子量を示す事項

235 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

240 宿主RL-P37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となっている。

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。

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。またBP-17フィターゼ遺伝子についてDNAシーケンシングにより配列を確認し、目的外の配列の混入がないよう純化されている。

245

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、各クローニングベクターに含まれる抗生物質耐性遺伝子は制限酵素により切断除去されている。また導入遺伝子にも抗生物質耐性マーカーは存在しない。

250

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

生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株における挿入遺伝子の近傍配列について次世代シーケンス技術を用いて決定し、BLASTPアルゴリズムによるORFの検索を行った(参考資料8)。その結果、5つのORFについて既知の毒性たん白質との相同性が見られたが、いずれも生産菌において発現する可能性は低く、また万が一発現したとしても毒性を示す可能性は考えにくい。

255

(6) 組換え体に関する事項

260

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。)

生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株が新たに獲得したのは、BP-17フィターゼ遺伝子によるBP-17フィターゼの生産能、菌株構築時の選別に利用された*A. nidulans*由来の*amdS*遺伝子及び*T. reesei*に由来する変異型*als*遺伝子による菌株の選別を可能にする性質であり、これらは病原性等を付与するものではない。

265

イ 宿主との差異に関する事項

生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株は上述した酵素生産能のほか、宿主RL-P37株と比較してセルラーゼ及び糖たん白質糖鎖遊離酵素の産生能を欠失している。

270

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

イで述べたように、生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株は宿主RL-P37株と比較してセルロース等を炭素源として利用する能力を欠失しているため、外界における生存性及び増殖性は低いと考えられる。

275

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

ウで述べた形質転換により、生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株は生存及び増殖能力に関し、制限を受ける。

280

オ 不活化法に関する事項

宿主RL-P37株同様、生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株は蒸気加熱、漂白剤による

化学処理等の *T. reesei* に有効な方法により不活化する事が可能である。BP-17フィターゼ製造工場では、50 w/v%水酸化ナトリウム溶液によるアルカリ処理での不活化を行っている。

285

### 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

BP-17フィターゼの製造には、生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株以外に、飼料添加物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。これらはいずれも

290

#### (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

液体培養工程を含め、添加物酵素及びその製剤の製造で長年の使用実績がある飼料添加物製造工場及び製造器材を用いている。BP-17フィターゼの製品化までのいずれの工程も、GMPやHACCPに則した適正な工程管理と品質管理が実施されている。

295

### 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

製造されたBP-17フィターゼ製品に生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株が含まれていないことは、培養試験及びPCR法により確認されている(参考資料10,11)。またBP-17フィターゼの規格検査に、生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株が含まれていないことを確認する項目が設定されている。

300

#### (2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

生産菌Morph Δ E8 BP17 4c株を用いて製造されたBP-17フィターゼの液体製剤3ロットについて、JECFA (FAO/WHO合同食品添加物専門会議) が提案した食品加工に使用する酵素製剤の一般規格 (Compendium of Food Additive Specifications Addendum 9) に適合しているほか、JECFAに記載されている重金属、鉛、生菌数、大腸菌群数、サルモネラ菌、大腸菌、抗菌活性及びマイコトキシンの規格はJECFA規格に適合していた (参考資料5,12,13)。また、BP-17フィターゼの製造用原体3バッチを用いて、飼料添加物の成分規格等収載書に記載の純度試験及び強熱残分試験を行ったところ、規格に適合していた (参考資料6)。

305

310

315

また、ラットを用いた毒性試験、遺伝毒性試験 (復帰突然変異試験、哺乳類細胞染色体異常試験)、皮膚及び眼に関する安全性試験を行ったところ、安全性に懸念がある結果は示されなかった (参考資料14~20)。したがって、BP-17フィターゼに含まれる、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。

320

#### (3) 精製方法及びその効果に関する事項

回転真空ろ過による細胞分離工程、及び限外ろ過等による精製工程により、非

325 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Morph Δ E8 BP17 4c株及び有害な不純物が存在しないことが確認されている（参考資料5,6,10,11）。

#### (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

BP-17フィターゼ製品は、GMPに基づいた品質管理によりフィターゼ活性及びその他の品質管理が行われており、一定の品質が保たれている。

330 また、BP-17フィターゼの製造用原体3ロットについて、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（参考資料5）、またJECFAの食品用酵素についての純度規格を満たしていたことから、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（参考資料5）。

335 なお、これまでのBP-17フィターゼの製造実績において、有害性が示唆される常成分に関する報告はない。

#### (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

340 BP-17フィターゼは、米国、EU、アジア等の27カ国で飼料添加物として承認・販売されている。このうち米国においてはAAFCOのOfficial Publicationに収載され、2013年から販売されている（参考資料4）。またEUにおいては、2015年11月にEFSAから安全性への懸念は無いとの報告があり、2016年6月のEU官報において認可されている。

345

#### 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

該当しない。

#### 350 IV 審議結果

MorphΔE8 BP17 4c 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。

#### 355 V 参考文献及び参考資料

##### 参考文献

1. Anitha R. and Murugesan K., “Production of gliotoxin on natural substrates by *Trichoderma virens*”, vol. 45, pp. 12-19, 2005.
2. ATCC, “ATCC Web Catalogue”, 2016, <https://www.atcc.org/>.
3. ATCC, “*Trichoderma reesei* QM 6a (ATCC 13631) Product Sheet”.
4. Brana D. V., M. Ellis, E. O. Castaneda, J. S. Sands and D. H. Baker, 2006, Effect of a novel phytase on growth performance, bone ash, and mineral

- digestibility in nursery and grower-finisher pigs. *Journal of Animal Science*. 84:1839-1849.
5. Corrick M. C., Twomey P. A. and Hynes J. M., "The nucleotide sequence of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and the molecular characterization of 5' mutations", *Gene*, Vol. 53 pp.63-71, 1987
  6. Dilger R. N., E. M. Onyango, J.S. Sands and O. Adeola, 2004. Evaluation of microbial phytase in broiler diets. *Poultry Science*. 83:962-970.
  7. DSMZ, "DSMZ Web Catalogue", 2016, <https://www.dsmz.de/home.html> .
  8. Federal Register Vol. 77, No. 172, "Environmental Protection Agency (EPA), USA, 2012.
  9. Gebert M. S., Lee S. K., ORTIZ-MALDONADO M. and Ward M. Patent WO2013/119470, 2013
  10. Hayward T., Hamilton J., Templeton D., Jennings E., Ruth M., Tholudur A., McMillan J., Tucker M. and Mohagheghi A., "Enzyme Production, Growth, and Adaptation of *T. reesei* Strains QM914, L-27, RL-P37, and Rut C-30 to Conditioned Yellow Poplar Sawdust Hydrolysate", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 77, no. 1-3, pp. 293-309, 1999.
  11. Jones CK, M. D.Tokach, S. S. Dritz, B. W. Ratliff, N.L. Horn, R. D. Goodband, J. M. DeRouchey, R. C. Sulabo and J. L. Nelssen. 2010, Efficacy of different commercial phytase enzymes and development of an available phosphorus release curve for *Escherichia coli* -derived phytases in nursery pigs. *Journal of Animal Science*. 88:3631-3644.
  12. Keswani C., Mishra S., Sarma B., Singh S. and Singh H., "Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp.", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 98, pp. 533-544, 2014.
  13. Kuhls K., Lieckfeldt E., Samuels G. J., Kovacs W., Meyer W., Petrini O., Gams W., Börner T. and Kubicek C. P., "Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, pp. 7755-7760, 1996.
  14. Laurence P., Françoise Q., Nicolas R., Monique M., Jean-Claude A. and François Y., "Toxicity assessment of peptaibols and contaminated sediments on *Crassostrea gigas* embryos", vol. 83, no. 4, pp. 254-262, 2007.
  15. Mullaney E. and Ullah A., "Phytase: Attributes, Catalytic Mechanisms and Applications," in *Inositol Phosphates*, USA, CAR International, pp. 97-110, 2007.
  16. Sands J. S. and R. M. Kay. 2007, BP-17 phytase improves growth performance and nutrient utilization in wheat-based diets fed to weaned pigs. *Livestock Science*. 109:264-267.
  17. Santos F. R., M. Hruby, E. E. M. Pierson, J. C. Remus and N. K. Sakomura. 2008, Effect of Phytase Supplementation in Diets on Nutrient Digestibility

- and Performance in Broiler Chicks. *Journal of Applied Poultry Research*. 17:191-201.
18. Sarojini C. K., Nagamani A. and Rahel Ratnakumari Y., “Growth response of *Trichoderma* isolates against varying pH levels”, *International Journal of Environmental Biology*, vol. 2, no. 4, pp. 180-182, 2012.
  19. Schuster A. and Schmoll M., “Biology and biotechnology of *Trichoderma*”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol 87, pp. 787-799, 2010.
  20. Suh D. H., Becker T. C., Sands J. A. and Montenecourt B. S., “Effects of Temperature on Xylanase Secretion by *Trichoderma reesei*”, *Biotechnology and bioengineering*, vol. 32, no. 6, pp. 821-825, 1988.
  21. Vohra R., Shirkot C., Dhawan S. and Gupta K., “Effect of lignin and some of its components on the production and activity of cellulose(s) by *Trichoderma reesei*”, *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 22, no.7, pp. 1497-1500, 1980.
  22. 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.
  23. 農林水産省, “飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和五十一年農林省令第三十五号）”, 2016.

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. ATCC SD-6528 Deposit.
2. BP-17 Phytase ETD Safety Evaluation\_v2 p.4-23
3. Metabolite potential of *Trichoderma reesei* GICC00006
4. US FDA CVM Letter to AAFCO
5. Axtra PHY Certificates of Analysis, SOP for Antimicrobial activity assay and Analytical report
6. Axtra PHY 分析試験成績書
7. BP-17 フィターゼ生産菌株作製工程
8. BP-17 フィターゼ生産菌 ORF 解析
9. Plant Certificates from FAMIQs and Evira
10. Axtra PHY Certificate of analysis and SOP for detection of production microorganisms
11. Axtra PHY 15000L r-DNA by PCR Analysis
12. 製造用原体分析証明書
13. Certificate of Analysis BP-17
14. BP-17 Phytase Formulated – Acute Inhalation Toxicity Study in Rat
15. BP-17 Phytase 13-Week Oral (Gavage) Toxicity Study in Rats
16. BP-17 Phytase AMES Test
17. BP-17 Phytase in-vitro Mammalian Chromosome Aberration Test Performed with Human Lymphocytes
18. BP-17 Phytase Local Lymph Node Assay in The Mouse
19. BP-17 Phytase Acute eye irritation study in the rabbits

20. BP-17 Phytase Acute Dermal Irritation Study in the rabbit

360