

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第99回会合議事録

1. 日時 平成23年12月16日（金） 10：00～11：59

2. 場所 食品安全委員会大会議室

3. 議事

(1) 食品健康影響評価について意見を求められた遺伝子組換え食品等の安全性評価について

- ・CN01-0118株を利用して生産された5'-イノシン酸二ナトリウム
- ・KCJ-1304株を用いて生産された5'-グアニル酸二ナトリウム
- ・DP-No.1株を利用して生産されたアスパルテーム
- ・BDS株を利用して生産されたL-セリン
- ・RGB株を利用して生産されたL-アルギニン

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、五十君専門委員、宇理須専門委員、鎌田専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、澁谷専門委員、手島専門委員、中島専門委員、飯専門委員

(専門参考人)

小関専門参考人、山崎専門参考人

(食品安全委員会委員)

小泉委員長、熊谷委員、長尾委員、廣瀬委員、畑江委員

(事務局)

栗本事務局長、中島事務局次長、坂本評価課長、前田評価調整官、北村課長補佐、三木係員、種池技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ①CN01-0118株を利用して生産された5'-イノシン酸二ナトリウム
- ②KCJ-1304株を用いて生産された5'-グアニル酸二ナトリウム
- ③DP-No.1株を利用して生産されたアスパルテーム

④BDS株を利用して生産されたL-セリン

⑤RGB株を利用して生産されたL-アルギニン

参考資料 1 安全評価に係る指摘事項

参考資料 2 厚生労働省から入手し得た情報に基づく、現時点における食品安全委員会の見解

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第 99 回遺伝子組換え食品等専門調査会を開催いたします。

本調査会は、議事次第にありますように、「食品安全委員会の公開について」に基づきまして非公開で行います。

本日は所用によりまして、和久井専門委員は御欠席となります。

また、専門参考人といたしまして、東京農工大学大学院の小関先生と、それから国立医薬品食品衛生研究所の山崎先生に御出席をいただいております。ありがとうございます。

本日の議題でありますけれども、新規の審議品目であります BDS 株を利用して生産された L-セリン、RGB 株を利用して生産された L-アルギニン、継続審議品目であります DP-No.1 株を利用して生産されたアスパルテーム、その他、親委員会で一度御審議いただきました CN01-0118 株を利用して生産された 5'-イノシン酸二ナトリウム、KCJ-1304 株を利用して生産された 5'-グアニル酸二ナトリウムの安全性についての審議となります。

それでは、お手元の資料の確認をお願いしたいと思います。事務局からよろしく願います。

○北村課長補佐 それでは、議事次第に基づきまして配布資料の確認をさせていただきます。配布資料は議事次第、専門委員名簿、資料としまして、食品健康影響評価に関する資料、参考資料といたしまして、安全性評価に係る指摘事項、厚生労働省から入手し得た情報に基づく現時点における食品安全委員会の見解、となっております。なお、これら以外の参考資料につきましては、ファイルにとじまして委員の皆様の上の机の上に置かせていただいております。本ファイルにつきましては調査会終了後回収させていただきます、次回また配布いたします。不足等がございましたら事務局まで知らせください。

○澤田座長 それでは、議題 1 の審議に入らせていただきたいと思います。

まず、5'-イノシン酸二ナトリウムと 5'-グアニル酸二ナトリウムの審議を行いたいと思います。

この 2 つの品目は、今月 5 日に厚生労働省から至急の評価の要請がありまして、同日臨時開催の食品安全委員会で審議を行ったものであります。その際に、現時点での食品安全委員会としての見解を示すとともに、不十分なデータについて指摘事項を出しまして、必要なデータが提出され次第、本調査会で審議することとされたものであります。指摘事

項に対する回答書が出てまいりましたので、事務局から御説明をお願いいたします。

○北村課長補佐 今座長の方から御説明いただきましたように、本品につきましては 12 月 5 日に臨時に安全委員会を開催いたしまして審議を行っていただいたものです。参考資料 2 をご覧いただきたいのですが、12 月 5 日、食品安全委員会での見解となっております。こちらを紹介させていただきます。

現時点において入手し得た情報に基づいて判断する限りにおいては、「5´-グアニル酸二ナトリウム」そのものの成分規格に関するデータはないけれども、「5´-イノシン酸二ナトリウム」及び 5´-グアニル酸二ナトリウムと 5´-イノシン酸二ナトリウムの混合物であります「5´-リボヌクレオチド二ナトリウム」に関しましては、食品添加物公定書の成分規格を満たしているということです。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」に規定する「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当することを示すためには、一部追加のデータが必要となる。

「5´-イノシン酸二ナトリウム」及び「5´-リボヌクレオチド二ナトリウム」に関しまして、既存の非有効成分の含有量が増えており、その物質に関する詳細なデータを確認する必要があるが、提出されたデータからは、当該非有効成分は既存添加物として認められる物質と考えられる。という見解を出しまして、このデータを求める指摘を出したところでございます。

今回その指摘に対する回答がまいりましたので、説明をさせていただきます。回答のほうは 5´-イノシン酸二ナトリウム、5´-グアニル酸二ナトリウム共通になってございますので、5´-グアニル酸二ナトリウムにとじられております回答のほうで御説明をしたいと思っております。回答書というタグをめぐっていただきまして、1 ページになります。

まず、指摘事項 1 としましては、セルフに該当するかどうかということを説明する場合の指摘でございます。挿入 DNA の導入に用いたプラスミドに由来する導入目的以外の配列が、組換え体に残存していないことをサザンブロット法等により示すことという指摘になってございまして、こちらは目的以外のプラスミド由来の配列の残存の確認が不十分だったということからこの指摘が出されてございます。

指摘の中にあります●●●というのは、本文の 7 ページにも説明がございしますが、ベクターのプラスミドのことでございます。

回答といたしましては、このプラスミド配列をプローブとして実施したサザンブロットハイブリダイゼーション法により確認をしたということになってございます。

1 ページの図 1 がプライマーの位置と配列になってございまして、2 ページにまいりまして表 1 にプライマーとプローブの予想鎖長が記載されております。2 ページの A の KCJ1304 株というのは、5´-グアニル酸を産生する菌株のこととございまして、そのサザンブロットの結果が 3 ページの図 2 に示されているとおりでございます。レーンの 10 にこの菌

株の染色体 DNA をこの制限酵素で切断した DNA のレーンがございます。このプラスミドから作りしましたプローブ 1~7 と同じ配列を持つ PCR 断片と、プラスミドの制限酵素断片をポジティブコントロールとしているもので、この 1~7 のプローブを混合して流してサザンブロットの写真を得たということになってございます。

B の方が 5´-イノシン酸の産生菌株の確認となってございまして、そのサザンブロットの結果が 4 ページの図になります。先ほどと同様に、レーン 10 がこのものの結果になります。

5 ページにまいりまして、こちら以後は高度精製の説明をする場合でございます。5´-グアニル酸二ナトリウムについて、食品添加物の成分規格、非有効成分、残存タンパク質に関するデータを示し、説明を行うことという指摘になってございまして、当初申請があった際には、この 5´-グアニル酸二ナトリウムそのものについてこれらのデータが提出されてございませんでした。このグアニル酸申請書の本文というところがございまして、その 19 ページに添付されてございます 5´-リボヌクレオチド二ナトリウム、これはイノシン酸、5´-イノシン酸二ナトリウムと 5´-グアニル酸二ナトリウムの混合物となっておりますが、こちらのデータが参考として提出されてございました。そのことからこういった指摘が出たものでございます。

まず、5 ページのところに成分規格、そして非有効成分の検討ということで親水性の不純物の比較がされてございます。

6 ページにまいりまして、結果としましては新規の不純物は検出されず、検出された不純物についても対照品目と同じかそれ以下であったという結果になってございます。

7 ページ、8 ページ、9 ページにこのチャートが添付されてございます。

10 ページからが親水性の不純物の比較ということになってございまして、チャートが 11、12、13 ページに添付されてございますが、申請品目のピーク面積は対照品目と同等かそれ以下であったという結果になってございます。

15 ページが残存タンパク質の測定となっておりますが、測定の方法等が 15 ページに記載されてございます。

16 ページが結果になってございまして、本法の定量下限が 1 ppm というところで、3 ロット試験をした結果、すべて定量限界未満であったという結果になっております。

17 ページにまいりまして、指摘事項 2-2 になりますけれども、HPLC 法による不純物プロファイルにおいて、AMP 及び CMP と判断した不純物について、溶出条件を検討してより高い分離能での解析を行う等、AMP 及び CMP と同定し得るデータを提出することという指摘になってございます。

こちらの AMP というのは 5´-アデニル酸、CMP は 5´-シチジル酸ということで、いずれも既存添加物でございます。前回提出されたデータによりますと、AMP は 5´-イノシン酸で増加をしておりますが、混合物であります 5´-リボヌクレオチドでも増加をしていたという結果です。CMP と当初判断されておりました不純物については、5´-イ

ノシン酸で増加をしております、混合物の 5´-リボヌクレオチドでは増加はしていない、検出はされたけれども、増加はしていないという結果になってございます。

先ほど説明をしました 5´-グアニル酸二ナトリウム单体につきましては、これらは検出されていないという結果になっております。

まず、AMP と判断した不純物につきましては、HPLC による保持時間、UV スペクトル及び LC-MS による精密質量分析による比較を実施してございます。こちらに用いましたサンプルは単品ではなく、混合物の 5´-リボヌクレオチド二ナトリウムで実施してございます。

結果としましては 18 ページの最後になってございますように、5´-アデニル酸であると考えられたという結果になってございます。

19 ページが CMP と判断した不純物についての同定の結果になってございます。このサンプルは 5´-イノシン酸二ナトリウムを用いております。同様に、HPLC、UV、LC-MS を行った結果、5´-シチジル酸ではないということで、質量スペクトルのデータベースを検索したところ、5´-ウリジル酸とほぼ同一であるということが判明したということから、5´-ウリジル酸との同一性を検討してございます。

21 ページにまいりまして、ウリジル酸であることの確認試験を行いまして、ウリジル酸であると考えられたという結果になってございます。ウリジル酸というのはピリミジン系の核酸関連物質でございまして、しいたけ、マッシュルーム、干し貝柱、酵母エキス、育児用粉乳などのさまざまな食品に含まれているということでございます。また、5´-ウリジル酸のナトリウム塩、5´-ウリジル酸二ナトリウムでございまして、添加物として指定されており、安全性に問題ない成分と考えられるという記載がございまして。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、回答につきまして先生方から御意見をいただきたいと思っております。審議の方法でありますけれども、まず高度精製に該当するかどうかを議論していただきたいと思っております。そこで、指摘事項の 2-1 の 5´-グアニル酸のデータにつきまして御意見、コメントをいただきたいと思っておりますけれども、これはもともと 5´-グアニル酸の方はデータがなくして新たに出してくださいとお願いしたものであります。

ついでながら、精製の方法としましては●●●やっけて、それから書かれてないのだそうですけれども、その後一度晶析をやっているそうです。

○北村課長補佐 製造方法につきましてはそれぞれのファイルの 5 ページにフロー図が記載されてございます。グアニル酸の資料で申しますと、下から 4 つ目の四角に固液分離、●●●というところがございまして、その固液分離のところでは晶析を行っているという説明を受けてございます。

○手島専門委員 こちらの 5´-グアニル酸二ナトリウムについては、前回は単独のデータが出てなかったことと、今回 2 つの液クロの条件下で不純物の検出を行っているとい

うことだと思っております。親水性不純物の中のイノシン酸の方で見られていた AMP に相当する部分の上昇は特に見られていないということは比較的是っきり見えると思えます。

14 ページの方の親水性不純物の保持時間が 4.1 分というところですが、これが AMP と言われている部分なのですが、これはイノシン酸の申請品で従来品に比べ上昇が見られているものですが、グアニル酸の申請品 3 つと対象品 3 つの間では大きな差がないということで、両方で特に差がないということはよろしいかと思えます。

それから、あとはイノシン酸で見られた CMP に相当する部分というのがグアニル酸では若干ピークとしてははっきり見えていないのですが、特に申請品と従来品で変化がないということで、グアニル酸に関しては、イノシン酸で見られたような申請品と従来品での不純物の変動はないというふうに考えてよろしいかと思えます。

○澤田座長 他の先生方からコメントいかがでしょうか。

○山崎専門参考人 幾つかちょっと指摘をさせていただきたいのですが、まず、参考資料 2 の食品安全委員会の見解の中の一番下のパラグラフに書いてあります、当該非有効成分は既存添加物として認められている物質と考えられる、なのですけれども、考えられるであって、データとしては不十分ということで、指摘事項として 2 番が出されています。企業から提出されたデータを見る限り、AMP、CMP と同定し得るデータとしては不十分だと感じます。

その理由としては、まず不純物を確認している対象物質そのものにリボヌクレオチドという混合物の製品を使っていることです。今回申請対象としているグアニル酸あるいはイノシン酸製品そのものではありません。ですから、参考情報にはなりますけれども、最終的な判断をする分析データとしては不適切だろうと思えます。

もう 1 点は、もし AMP、CMP を含めまして、こういうリボヌクレオチド類が不純物として含まれているということを使うのであれば、リボヌクレオチドの一斉分析として最適化された分析条件でリボヌクレオチド類の分析を行い、AMP です、あるいは CMP ですと同定するのが適切だと考えます。

例えば、遺伝子組換え微生物を利用して製造されたアミノ酸類の場合は、アミノ酸類の一斉分析データが出ています。それに相当するものが今回はないのですね。ですから、リボヌクレオチド類の一斉分析データが必要でしょうと考えます。

今回、リボヌクレオチドの混合物である製品を使って不純物の同定を LC-MS などを使って行いましたとされておりますけれども、その LC 条件自身が親水性の不純物を分析する条件を使っておりますので、リボヌクレオチド類の分析として必ずしも最適化された LC 操作条件ではないわけです。やはり最適化された条件で不純物の同定をしたデータが必要だと思えます。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

グアニル酸の話とそれから不純物の話と 2 つ同時に言っていたのですけれども、

まずグアニル酸の追加データだけに関して他にコメントありますでしょうか。

よろしいですか。

そうしましたら次に、分析の条件としてアミノ酸と同じようにリボヌクレオチドも一斉分析しなければいけないかという御指摘なのですけれども、この点に関しては何か御意見ありますでしょうか。

○鎌田専門委員 今、グアニル酸の話されているのですが、実はイノシン酸のほうがすごく気になっていて、ピークがグアニル酸とイノシン酸は少し違うのですね。イノシン酸の方が実はここで彼らが言っている不純物とほぼ同じところにきてしまっているのが現状だと実は単一ピークだと彼らが言っているような感じのところは実は不純物が入った形のピークになってしまっているのがすごく気になっていて。本来だったら別の条件で、それも本来指摘があったとおり、本当は核酸関係のものを分離できる条件にして、見たいものをきちっと見るというふうにしないと、このままだと何か後ろの方のやつでは不純物は無視しているというふうにも逆に見えてしまうので、そこは少し何かの検討が必要かなとは思っています。

○澤田座長 考え方としまして、もとの宿主が本来添加物として既に使われていた経緯があると。その遺伝子を 2 倍増やしたというだけなわけなので、どこまで分析をきちんとやることを要求するかという点ではちょっと微妙なところがあるかと思っているのですけれども。

この点、何か御意見ありますでしょうか。

○山崎専門参考人 その観点で言いますと、この物質が本来 GMP であれば GMP であるということをきちんと示すデータを出してもらえばいいと思うのですけれども。現在の食品添加物公定書の品質規格は、GMP であるという前提に基づいており、性善説に基づいて確認する程度の確認試験でしかないのですね。ですから、不純物がリボヌクレオチド類であった場合には、必ずしもその不純物を主成分と区別して確認できるような成分規格になっておりません。やはり、リボヌクレオチド類の一斉分析をすることによって、これが従来のグアニル酸製品と同等の GMP 含量を持っていて、しかも不純物というか主成分以外のリボヌクレオチド類も従来製品と変わらないレベルですということを分離分析を用いて示していただければ、座長のおっしゃるような方向での資料になるのではないかと思います。

○澤田座長 具体的にどういう分析を追加すればよろしいですか。

○山崎専門参考人 それはリボヌクレオチド類を分析するために最適化された一斉分析の HPLC のデータでいいかと思えます。

○澤田座長 それは主要なリボヌクレオチド。

○山崎専門参考人 そうです、はい。

○澤田座長 分離できる条件。

○山崎専門参考人 そうですね、はい。

○澤田座長 それはパブリッシュされた容易な方法なのですか。

○山崎専門参考人 リボヌクレオチド類の分析は HPLC のデータブックなどを見ると出ているようなものですので、企業で探することができる範囲内にあると思います。

○澤田座長 それでは、他の先生方、いかがでしょうか。

○澁谷専門委員 不純物でちょっと気になるのは、一番最後 22 ページの HPLC で同定して、質量分析と両方やっていて、これは質量分析だけでは確かにわからない。標準品と比較して、あるいは混合して同じピークになるとか、通常のやり方をしてはいるのですけれども。例えば一番上の 3 つのクロマトグラムを見ると、申請品のピークは非常にブロードでテーリングしているのですね。標準品から比べると非常にブロードなのですよね。縦軸を見ると全質量が 100 倍とか違っているので可能性はあるのですけれども、比較するときに同じぐらいのレベルでやってもらわないと。これはこういうブロードになってしまうと何か陰に隠れているかもしれないですよね。だから、やはり同じ比較できるレベルでやって、しかも混ぜるときも大体同じぐらいの量でやるとピークが 2 倍になるとかそういうことが言えるのですが、上も下も片方が全然アンバランスになってしまっているのです。大きなピークの中にどっち側か隠れてしまうのですよね。だから、やはりもしやるのならその辺をちゃんときちっとやってもらってもっと妥当性のあるデータになると思いますが。

○手島専門委員 確かにリテンションタイムがかなり 2 分とか早い時間のところでその前後で見ているというところが分離としては厳しい条件なのかなという感じはいたします。

○澤田座長 他の先生方、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

そうしますと、リボヌクレオチドの分離のいい条件を一応決めていただいて、それでも一度データを出していただくのがいいと思います。イノシン酸とグアニル酸の両方をやらないといけないので、またピークがちょっと違ってくるものが出る可能性があるのですけれども。その場合はやはり一応 LC-MS 等で、MS のデータをつけていただいたほうがいいかと。

そうしますと、AMP と CMP と判断した不純物に関して追加でコメントがありましたらお願いしたいと思います。

不純物に関しましても新しい LC-MS のデータが出てくればもう一度確認はできるかと思えますけれども。そういうことでよろしいでしょうか。

それでは、指摘事項の 1 と 2 が両方終わったことになったと思います。

それであと、一応セルフに該当するか否かというデータも出てきておりますので、これは回答書の 1~4 ページのあたりでありますけれども、これに関してコメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

○五十君専門委員 サザンをやって確認していただくという方針でデータを出していただいたのですが、このデータを見ると、プローブの健全性のチェックは終わっていると思います。しかし、要するに実験のデザインの問題と思うのですが、流した遺伝子自体がきちっと流れているか、ポジティブデータがないものですから判断できないと思います。

○澤田座長 小関先生。

○小関専門参考人 3 ページ、4 ページの図、これは見た瞬間に先ほどの LC と同じで、量的なところを全く考えないでごまかしているデータのとり方だなと思いました。まずアガロースゲルの濃度が非常に固いゲルで、要するに PCR 産物をメインにして見ようとしているアガロースゲルなので、全ゲノムの電気泳動、9 番、10 番のレーンは全く意味をなさない。この光り方について、あれっと思ってみましたところ、9 番、10 番は全ゲノムの●●●程度、1~8 までが●●●程度を流していることになります。単純に考えて、●●●DNA を流す、全ゲノムが大体●●●だとすると、その中に●●●ぐらいのインサートが入っているとすれば、そこにあるヌクレオチドの重さの量でいったら●●●以下になってしまう。となるとすると、どう考えても検出感度はここの 1~8 で光っているものの 100 分の 1 以下のハイブリダイゼーション条件です。ですから、何も見えないのが当たり前なのです。検出限界の下で実験しているのです、これはもう入っていないよということがまず確認できないです。

ですから、やるのであれば何をするかというと、いわゆる 9 番、10 番のところですね、ここをもっとゲル濃度の低い、ゲノムを流すためのアガロースゲルを使ってサザンブロットを行う。そのときに 2 枚シートにして、1 枚はこのプラスミドのバックボーンの部分ですね、すなわち 1 ページ目の図にある全体の部分をラベルしてハイブリダイゼーションしていただくと。それで出ないということをコンファームするわけですがけれども、これに対してポジティブコントロールは絶対必要になります。その使っているハイブリダイゼーションの条件がきちんと検出可能、感度の中にあるかどうか。すなわち、ここで出された 3 ページ、4 ページのものというのは検出限界以下で 9 番、10 番のレーンを見せようとしているので、それでは全然意味がないと。

ポジティブコントロールとしてやるのであれば、例えば導入遺伝子の部分ですね、本文のところの、例えば 16 ページにあるようなこういう標的遺伝子が 2 つ入ったプラスミドをお持ちなわけですから、これはもともと中に入った遺伝子なので、宿主だったら光り方は 1 光るはずですが、2 個入っていれば 2 倍の強さで光ります。半定量的でもいいのですけれども、サザンの図を見せていただければそのぐらいはわかります。そうすれば電気泳動は非常にうまくいっている、ハイブリダイゼーションはうまくいっているというポジティブコントロールになる。

ここのところで読んでいて、この同じページ、本文のところの 17 ページですがけれども、これはジャンクションのところを PCR でやって、すなわち A1 と A2 のプライマーでやって、タンデムにつながって、2 個入ってますとありますけれども、2 個という保証はないのですよ。2 個以上です。これは、タンデムというのは、テンプレートとして同じですから、彼らは 2 個と言っているのに関してこのデータでは不備です。

ですから、そうすると標的遺伝子、ここで使った例えば CN01-0118 でしたら 5 つの標的遺伝子の DNA フラグメントをプローブにしてサザンをやって、宿主では 1 光って、組

換え体では 2 光るといのが出てくれば、ほぼ間違いなく思ったとおりに 2 コピー入ってますね。ところが、それが宿主 1 に対して 4 光ると、実はこれ 4 コピー入ってるということもわかると思います。ですから、ポジコンの実験としてこの辺全部やればすべてが明快な結論が出てくると思います。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

他に追加でよろしいですか。大体言い尽くしていただいたと思うのですけれども。

要は電気泳動の条件をもうちょっと検討していただくのと、それから内在性の、本来持っている遺伝子のプローブを使ってポジコンを追加していただいて、検出感度の確認をしていただくと。もしセルフでやる場合には最低そこまでは言ってもらわないといけないということで。

できれば、不純物の方で問題がないということを書いていただいた方がより安全の面からはベターかなと思います。

他に追加でコメントよろしいでしょうか。

○飯専門委員 コメントというか修正で、両方ともに共通することなのですから、製造工程のことでもちょっとお話ありましたが、その記載との関係で、一番最初の部分、4 ページに当たるのですが、従来の方法と本質的な違いはないと書いてあるのですけれども、これだけだと読み手として何を根拠に本質的な違いがないと結論を出し、オーケーしていいのかわからないので、もう少しこの結論に達する根拠を一言補足していただきたいと思います。これですと、どこかに違いがあると読める書き方ですので。

それからもう 1 つ、比較対象の製品というのは他社のものを使っていると書かれているのですけれども、一応それがどういう菌由来なのかということも申請書の上では明記していただいたほうがいいかなと思います。

○澤田座長 製造方法に関しては本質的な違いというのが引かかるわけですか、要は。

○飯専門委員 ええ、そう書いてある以上はどこかに違いがあるという文章だと思います。その結論が妥当だという修飾を少し加えていただいたほうがいいのではないかと思います。

○澤田座長 もし違いがあるのだったら具体的に書いていただいた方がいい。

それから、比較対象の製品は企業秘密でわからない場合があるかもしれないのですけれども。

○飯専門委員 由来菌もわからないのですかね。

○澤田座長 ええ。

○飯専門委員 それではわかる範囲で。そこが本当に比較して。

○澤田座長 聞いても多分教えてくれないことがありますので。

他にコメント。

○児玉専門委員 本質的な話の指摘ではないのですけれども、グアニル酸二ナトリウムの

他の申請書の製造工程の4ページですが、4ページのところに今回の申請の対象は5'-グアニル酸の生産性向上を目標として当社が開発した5'-グアニル酸生産菌によって生産されたと書いてあるのですが、製造工程を見ると、この菌自体が作っているのは5'-キサンチル酸で、それを●●●で5'-グアニル酸に変換している工程なので、5'-グアニル酸生産菌と書かれてしまうと何かちょっと違和感があるのですけれども。この5'-キサンチル生産菌を利用して作られた5'-グアニル酸二ナトリウムと書かれるのなら一番すっきりしていると思うのですが、5'-グアニル酸そのものを生産しているわけではないので、ちょっと本質的な話ではないのですけれども、ちょっと引っかけたなという、ちょっと気持ち的には落ち着かない感じの文章かなというふうに思った次第です。

○澤田座長 それは表現を変えていただくのと、生産に利用した菌とか生産用の菌とかそういう表現にした方がいいと思いますね。

他によろしいでしょうか。

それでは、5日の見解のように、安全性の点からは余り大きな問題はないだろうとは思いますが、データの点からまだちょっと不十分な点が幾つかあるということで、いただきました意見、確認事項を指摘事項案としてまとめて、先生方に御確認いただいた上で、厚生労働省を通じて申請者に対して指摘を出したいと思います。

小関先生、山崎先生、本日はお忙しい中、どうも大変ありがとうございました。

(小関専門参考人、山崎専門参考人 退席)

○澤田座長 それでは次に、アスパルテームの審議に移りたいと思います。

この品目は6月の専門調査会におきまして審議をいただきまして、指摘事項を出してあるものです。指摘事項に対する回答書について、事務局から御説明をお願いします。

○三木係員 それでは、御説明を始めさせていただきます。赤いファイルのDP-No.1株を利用して生産されたアスパルテームと書かれたものを御用意くださいますようお願いいたします。

この回答書について、回答書本文の1ページから御説明させていただきます。こちらは以前の調査会で御審議いただいた際に指摘事項をいただいております、それに対する回答となります。指摘事項1としましては、アスパルテームの製造方法に関して、「製造における環境負荷を低減することを目的として開発された」という記載がございまして、こちらに関しては具体的な現行製品の製造法との比較がされておらず不適切であることから、現行製品の製造方法に関する情報を追加し、修正することという指摘をいただいております。

それに対する回答といたしましては、新製法につきましては、L-アスパラギン酸●●●とL-フェニルアラニン●●●を組換え体であるDP-No.1株が発現する酵素により縮合した後、得られた中間物を●●●転移することでアスパルテームを製造するということです。

一方、現行法につきましては、●●●縮合して●●●アスパルテームを製造するということとなっております。

新製法といたしましては、アミノ酸保護のための副原料を使用しないこと、また●●●の溶媒●●●を使用せずに済むということ。さらには、●●●回収する際に要するエネルギーが不要になるということで、環境負荷が大幅に低減できるということの説明となっております。

具体的な化学反応につきましては 2 ページの図に示されておりますけれども、新製法と現行法で、●●●が異なってくるということです。

その下になお書きでありますけれども、●●●されたことが記載されております。

指摘事項 2 としましては、アスパルテームの製造方法に関して導入したプラスミドにアンピシリン耐性遺伝子が含まれていることから、本申請品目の製造におけるアンピシリンの使用の有無について回答することというようになっておりました。

その回答といたしましては、本申請品目の製造においてアンピシリンの使用はありませんということです。併せて、概説書の本文にもその旨を追記したということです。

3 ページに参りまして、指摘事項 3 ですけれども、導入した遺伝子及びそのプロモーターに関する説明が不十分であることから、情報を追加することというふうな指摘をいただいております。

それに対する回答といたしましては、導入した遺伝子にコードされる酵素タンパク質について、データベースを用いまして相同性検索を行ったところ、毒素等の既知の有害タンパク質との相同性は見出されなかったということが確認されたということです。

また、プロモーターにつきましても、●●●長い食品分野の利用実績を有するというものです。本プロモーターは、●●●あり、その配列は以下に示されておおります。

指摘事項 4 にまいりまして、不純物プロファイルの比較結果に関して、①親水性不純物について比較データを提出すること。②不純物プロファイルクロマトグラムについて、本申請品と現行製品でピーク時間が一致しないものがあり、不純物が異なる可能性も考えられることから、さらに検討することという指摘をいただいております。

その回答といたしまして、4 ページ目にまいりまして、①の回答といたしましては、親水性不純物の分析法として、従来より他品目の評価の際に用いられてきた HPLC-1 法を用いて不純物分析を行ったということです。分析条件は以下に示されておおります。

その結果、表 1 のとおりの結果が得られまして、新規不純物は申請品に検出されず、また検出された不純物含量は最高値と比較して現行製品の含量を超えるものはなかったということになっております。

②の回答といたしまして、●●●その申請品中に存在する不純物が現行製品と同一であることを確認するために、Food Chemical Codex に規定されるアスパルテームの類縁物質測定法 (FCC 法) 及び上記の HPLC-1 法を用いまして、申請品と現行製品の同量を混合し調製したサンプルを用いて分析を行ったということです。

次のページにまいりまして。その結果、クロマトグラムにおきまして各不純物ピークの

分裂が観察されなかったということになっております。その結果、表 2 と 3 にそれぞれまとめられております。

以上の結果より、本申請品中の不純物含量は現行製品と同等以下であり、また現行製品にない新規不純物は確認されなかったということから、次のページにまいりまして、安全性は現行製品と同等であると考えられるということです。

その下にまいりまして、混合サンプルの分析において FCC 法で保持時間が 9.3 分付近に、前回の申請時のデータでは確認されなかった新たなピークが確認されたということです。この原因につきましては分析を行うまでに●●●保存し、両サンプル中で増加したためということが記載されております。その含量的なものにつきましては、申請品は現行製品を下回る結果ということで別添資料にその結果がまとめられております。

また、この RT9.3 付近の不純物が製造後の保存に伴い生成するものであることを確認するために、現行製品を常温で●●●保存したサンプルを FCC 法で分析を行ったということです。その結果、RT9.3 分付近のピークに存在することが確認されまして、また、申請品と●●●保存の現行品の混合サンプルを分析したところ、両者のピークは一致することが確認されたということです。その結果に関しましては青いタグのついている添付資料 2 の 9、10 ページにまとめられております。

その下にまいりまして、FCC 法での各種試料の分析にて検出された不純物につきましては、その保存したサンプルにおいて現行製品のみで検出され、申請品目には検出されないものが幾つか含まれましたが、申請品目のみに検出された不純物はなかったということです。また、対応するピークの保持時間もわずかに異なることが確認されましたが、混合サンプルの分析においてそれは 2 つのピークには分離せずに重なったということになっております。

具体的なデータに関しては表 6 以降にまとめられております。表 6 は HPLC-1 法となっているのですが、こちらは FCC 法の間違いでして、修正させていただきます。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思えます。まず、指摘事項の 1 と 2 で、製造方法につきまして、これは児玉先生から御指摘いただいたものです。

○児玉専門委員 この修正案で非常によくわかりましたので、これでよろしいかと思えます。

○澤田座長 あとよろしいでしょうか。

それでは、指摘事項 3 で、遺伝子の導入について、これは中島先生と飯先生から御指摘をいただいたかと思えます。

○中島専門委員 私もこれでよろしいかと思えます。

○澤田座長 飯先生は何か追加で。

○飯専門委員 内容的にはこれでよろしいかと思えます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、指摘事項 4 で、不純物のプロファイルで、これが一番問題点になったかと思えますけれども。これは児玉先生から御指摘いただきましたけれども、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 プロファイルを拝見しましたけれども、同定されていないピークが多いのですが、現行製品を上回るピークは一応ないということですので、安全性の問題はないかとは思いますが。ただ、ちょっとこういうものなのかなと思ったのは、●●●不純物のピークがかなり同じになるというのは、まあそうなのかなと言われればそうなのですが、ちょっとそういうものかなというふうに思った次第ではあります。ちょっと感想ですけれども。失礼しました。

○澤田座長 小さいピークがかなりありますが、量的にはかなり低いので、問題にはならないと思うのですけれども。先ほどのイノシン酸とグアニル酸の場合とは違って、大きな変化はないと。ピークを特定する必要はこの場合はないだろうということによろしいでしょうか。

それでは、あと不純物に関しまして他にコメントありましたらお願いしたいと思います。では、それ以外で全体的に何か追加でコメントよろしいでしょうか。

それでは、指摘がないようでありますので、続きまして評価書案の審議に入りたいと思います。事務局の方から評価書の説明をお願いしたいと思います。

○三木係員 御説明を始めさせていただきます。

右上に資料と書かれている評価書案の 11 ページをお開きください。こちらが本申請品目の評価書案となります。少しページをめくっていただいて、14 ページから御説明させていただきます。

I に評価対象添加物の概要といたしまして、名称、用途及び申請者、開発者をそれぞれ記載しております。その下でございますけれども、本添加物は、*Escherichia coli* K-12 株由来の突然変異株を宿主としまして、原料のアミノ酸（L-フェニルアラニン及び L-アスパラギン酸）の関連化合物を縮合する酵素遺伝子及びプロモーター配列の導入を行った、DP-No.1 株を用いて生産されたアスパルテームである。本アスパルテームは、DP-No.1 株を用いて原料のアミノ酸関連化合物を縮合させた産物を中間原料として製造されるとしております。

アスパルテームは、食品添加物として指定されておまして、成分規格が食品添加物公定書に記載されているとしております。

E. coli K-12 株は、有害な影響を及ぼす毒素の産生性や病原性は知られておらず、OECD では GILSP が適用できる宿主微生物として認定されているとしております。

また、DP-No.1 株は抗生物質耐性マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子を有するが、その有害性は知られていないとさせていただきます。

42 行目にまいりまして、II. 食品健康影響評価にまいります。1. 本添加物は製造工程

において使用微生物及び反応副生物が除去され、晶析による結晶として高度に精製されており、食品添加物公定書の含量規格を満たしているとしております。

47 行目にまいりまして、2 の本添加物の非有効成分については、最終製品において、(1) タンパク質は検出限界未満である。(2) 食品添加物の公定書の成分規格を満たしている。(3) HPLC 法による分析の結果、従来品に存在しない不純物は検出されず、また従来品に存在する不純物の実測値は、従来品の含有量の実測値の最大値を上回っていません。とさせていただきます。

以上、(1)～(3)の結果から、従来品と比較して既存の非有効成分の含有量が安全上問題となる程度にまで増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられるとしております。

58 行目にまいりまして、以上、1 及び 2 の結果から、本添加物については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」の附則「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方」に基づき、安全性が確認されたと判断したとさせていただきます。

したがって、本添加物につきましては「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」による評価は必要ないと判断したとさせていただきます。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして御意見、コメントをいただきたいと思っております。なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただければ幸いです。コメント、御意見ありましたら。

○児玉委員 51 行目の、また従来品に存在する不純物の実測値はとあるのですが、これは本添加物に存在する不純物の実測値は、ではないですかね。

○澤田座長 これはおっしゃるとおりだと思いますけれども。評価対象添加物が上回っていません。

○北村課長補佐 言葉が少し足りないようですが、本申請品に含まれている不純物のうち、従来品に存在する不純物という意味で書いているものです。以前からこの書きぶりにはしているのですが、わかりにくいということであれば修正の文言をお願いできればと思います。

○澤田座長 そうですね、直した方がいいかもしれないですね。これはちょっと検討していただくことにしたいと思います。

他によろしいでしょうか。

○手島専門委員 56 行目なのですが、HPLC 法による分析の結果ということでは、従来からこういう形だと思のですが、今回も特に FCC 法というのを使っているのですが、特にそれは特記しなくてもいいということでございますね。今までこういう形で。

○澤田座長 FCC 法も具体的に言うと HPLC 法なので、まあいいと言えればいいかなと。

○手島専門委員 そうですね、わかりました。すみません。

○澤田座長 それでよろしいかなと思うのですけれども。

○手島専門委員 はい。

○澤田座長 他よろしいでしょうか。

それでは、ただいま御指摘いただきました点だけちょっと微修正になるかと思えますけれども、事務局で修正していただきまして、私の方で確認して、その後食品安全委員会に報告してパブリックコメントの手続に入りたいと思います。

ありがとうございました。

それでは、次の議題であります、L-セリンに移りたいと思います。これ、事務局からまず御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、BDS 株を利用して生産された L-セリンについて御説明いたします。薄い緑のファイルの御準備をお願いいたします。

タグの概要書というところですが。まず食品添加物の概要になります。L-セリンは既存添加物に該当いたしまして、3 ページにございますような化学構造、分子式、分子量、性状を有してございます。確認試験、純度試験により物理化学的性質を確認できるということです。

4 ページにまいりまして、用途としましては飲料などの調味料に利用されているということです。

5 ページが L-セリンの製造方法の概要になります。2-1 としまして、L-セリン生産菌 BDS 株作製の目的ですが、L-セリンの生産蓄積能力が向上した生産菌株 BDS 株を構築することで効率的な L-セリンの製造を行うことを目的としたということです。

2-2 が L-セリン生産菌 BDS 株作製の方法となっております。作製方法の概略ですが、BDS 株は *E. coli* KY8227 株から作製されてございます。WSH 株を基に作製してございまして、この WSH 株を用いて生産されました L-セリンについては、平成 20 年に審議を行っていただきまして、評価結果が出されて、安全性が確認されているというものでございます。

BDS 株はこの WSH 株を基にいたしまして、さらに L-セリンの生産蓄積能力を上げるため、L-セリン取り込みに関する酵素遺伝子を欠損、L-セリンに関する酵素活性の阻害がさらに軽減された L-セリン生合成酵素遺伝子を導入しまして、L-セリン排出に関与するタンパク質遺伝子の発現を向上することにより作製されたということです。

宿主菌は、*E. coli* KY8227 株で、長年にわたって食品用アミノ酸の工業的な生産等に用いられた菌株でございます。その派生株の 1 つであります KY8270 株は、ATCC においてバイオセーフティレベル 1 に分類されているということと、全ゲノム配列解析によりまして、病原性に関与する遺伝子は見出されないことを確認しているということです。

(3) に染色体遺伝子操作について説明がございます。

6 ページにまいりまして、(4) で欠失、挿入遺伝子及びプロモーターについて説明が
ございます。

7 ページの (5) に遺伝子組込みユニットの説明がありまして、この (4) に記載がござ
います遺伝子及びプロモーターは以下 8 個の遺伝子組込みユニットを用いた組込みによ
り、欠失、挿入がされてございます。

8 ページがその説明の続きになっておりまして、図 1 に遺伝子組込みユニット、表 2 に
遺伝子組込みユニットの対象遺伝子の記載がございます。

9 ページの (6) が L-セリン生産菌株の説明になってございまして。先ほど説明をいた
しましたように、WSH 株は既に安全性評価を受けているものでございます。図 2 に L-セ
リンの生産菌の BDS 株構成概念図が記載されてございます。

10 ページにまいりまして、L-セリンの製造方法でございまして。現行の製造方法と同様
であるということで、図 3 にフロー図がございまして。フロー図の●●●のところ
で菌体が完全に除去されるということでございまして。その後、晶析、結晶分離等を行
いまして最終製品が得られています。

11 ページが申請品目と現行製品の実質同等性の確認の事項です。3-1 に食品添加物公
定書の規格の分析結果、3 ロットの結果が示されてございまして、公定書規格におい
て申請品目の品質は現行製品と同等と考えられるということです。比較対照としまし
ては、先ほどの WSH 株を利用して生産された L-セリンを用いてございまして。

12 ページにまいりまして、タンパク質残存試験結果となつてございまして。タンパク質
の残存をドットプロット法により分析してございまして、検出限界はアミノ酸重量換
算で 1 ppm でございまして、すべて検出限界未満という結果になっております。

13 ページにまいりまして、不純物プロファイルの比較結果となつております。この
ものにつきましては 4 つの分析法、アミノ酸不純物、親水性モード、疎水性モード
の HPLC 分析、光学異性体測定で申請品目と現行製品の不純物のプロファイル
を比較してございまして。

(1) がアミノ酸不純物のプロファイルになっております。結果が下の表に示されて
ございましてけれども、申請品目中に含まれるグリシンは現行製品に含まれる程度
と同程度ということです。また、申請品目には新規不純物は検出されてござい
ません。クロマトグラムにつきましては、添付資料 2 にございまして。

14 ページにまいりまして、HPLC-1 法による不純物のプロファイルです。こちらは
親水性の不純物を検出することを目的としております。結果が下の表のとおりにな
つてございまして、この HPLC-1 法におきまして申請品目中に現行製品中に存
在しない新規不純物は検出されておらず、検出された不純物は現行製品中の最大
値以下ということで、検出限界未満または定量限界未満となつております。同
じくクロマトグラムについては添付資料 2 の 52 ページ～58 ページに示されて
ございまして。

15 ページにまいりまして、HPLC 法・2 による不純物プロファイルです。こちらは
疎水

性の不純物の検出を目的としてございます。一番下の表に結果がございましたように、新規の不純物は検出されなかったという結果になっております。同じく、クロマトグラムについては、添付資料 2 の 59～65 ページに示されてございます。

16 ページにまいりまして、光学異性体のプロファイルになっております。光学異性体測定法では、主に L-セリンの光学異性体であります D-セリンの検出を目的としております。結果が下の表に示されておりますけれども、申請品目中には新規不純物は検出されず、申請品目で検出されます D-セリンの分析値は現行製品の分析値の範囲内であったということです。同じく、クロマトグラムについては添付資料 2 の 66～72 ページに示されたとおりです。

17 ページがまとめとなってございまして、この申請品目につきましては遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方の要件を満たすと考えるということでございます。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして項目ごとに先生方から御意見をいただきたいと思っております。まず、申請書の 10 ページまでで、食品添加物としての概要、それから製造方法の概要、ここまですらにしましてコメント、御意見ありましたらお願いしたいと思っております。

これ、途中までの製品は一度ここで出てきて承認されたもので、それにさらにまた改変を加えてございまして、方法論は今までと似たようなもので、相同組換えで欠失とそれから挿入をしているものでありますけれども。

説明の内容はこれで十分ですか。

他に追加のコメントよろしいでしょうか。

それでは、11 ページから最後までで、申請の品目と現行製品の同等性の確認で、ここに関しまして御意見、コメントありましたらお願いしたいと思っております。

○橋田専門委員 全くもって本質ではないのですが、13 ページにありますアミノ酸不純物プロファイルの使用機器についてなのですが。申請品目は確かに●●●というもので分析はしているのですが、現行品の検出はそれとはちょっと型が違うものを使っているの、その旨も書いておいていただいてもよいかと思っております。ただ、表記の仕方が若干異なるものながら、データの全く問題はないと思っておりますので。

○澤田座長 それは添付資料を見るとわかるわけですね。

○橋田専門委員 はい。

○鎌田専門委員 今のことは、例えば添付資料の 44 ページとかを見るとわかるのですが、これはセリンですのでセリン見ると、このデータだとセリンがないという、下の数値を見るとセリンがないというふうになってしまうのですね。ところが、後ろのほうにいて、48 ページぐらいになると、セリンはたくさんあるという。要するに機械を変えて表示が

変わったので、何か一見データだけ見ていると非常におかしな表記になっているというのが気になったのです。

○澤田座長 ●●●と●●●●で表示が違うということですが、本質的には問題ないとして、よろしいでしょうか。

そうしましたら、13 ページの記載で、●●●ともう 1 個追加していただければ。

他にコメントよろしいでしょうか。

○飯専門委員 こちらも全く本質的ではないのですが、前のところの範囲に戻ってしまうのですけれども、添付資料 1 の 24 ページなのですから。このプラスミドの図が書いてありますが、右上のところの●●●というのはちょっとスペルが違っているので。たまたま見つけたのですけれども、先ほどの指摘と似たようなところもあるので、全体をもう一回丁寧に確認していただけたらと思います。

○澤田座長 それはもう一度確認して。

○飯専門委員 確認して、最終版では差し替えていただけたらと思います。

○澤田座長 もし他にありましたら、また御指摘いただけたらと思います。

○鎌田専門委員 今のような話があがると、19 ページの宿主についての説明が、これも細かいことなのですが、3 行目のところに、歴史的に安全であるという奇妙な言葉がありまして。歴史的に安全であるということはありませんので、長年にわたり安全に利用されてきた歴史があると本来は書くべきだと思うので。細かいことですが。

○澤田座長 これはよく使う言い回しに直していただけたら。

他によろしいでしょうか。

それでは、評価書案の説明をお願いしたいと思います。

○北村課長補佐 食品健康影響評価に関する資料の 17 ページからが L-セリンの評価書になります。

2 ページほどめくっていただきまして、20 ページをご覧くださいと思います。まず、評価対象添加物の概要です。名称、用途、申請者、開発者は記載のとおりです。

29 行目ですが、本添加物は L-セリンの生産性を高めるため、*Escherichia coli* KY8227 株を宿主として、L-セリンの生合成に関する遺伝子及びプロモーター配列の導入、並びに L-セリン取込み及び L-セリン分解関与遺伝子の欠失導入を行った BDS 株を用いて発酵生産された L-セリンである。L-セリンは、食品添加物としての使用が認められており、成分規格が食品添加物公定書に記載されている。なお、BDS 株は平成 20 年に食品健康影響評価を終了した WSH 株を基に作製されたものであるとしております。

E. coli KY8227 株に由来する KY8270 株は、有害な影響を及ぼす毒素の産生性や病原性は知られておらず、ATCC においてバイオセーフティレベル 1 に分類されている。また、BDS 株は抗生物質耐性マーカー遺伝子を有さない。

40 行目にまいりまして、健康影響評価でございまして。41 行目で、本添加物は、製造工程において使用微生物及び発酵副生成物が除去され、晶析により結晶として高度に精製さ

れており、食品添加物公定書の含量規格を満たしている。

45 行目の 2 番ですが、本添加物の非有効成分については、最終製品において、タンパク質は検出限界（1 $\mu\text{g/g}$ ）未満である。食品添加物公定書の成分規格を満たしている。アミノ酸分析及び HPLC 法による分析の結果、従来品に存在する非有効成分であるグリシンが定量限界未満であるが検出された。また、それ以外の従来品に存在しない不純物は検出されず、また、従来品に存在する不純物の実測値は、従来品の含有量の実測値の最大値を上回っていない。グリシンは、タンパク質を構成する主要な 20 アミノ酸に含まれ、十分な食経験がある。また、食品添加物公定書に記載された指定添加物であり、使用基準は設定されていない。

以上の結果から、従来品と比較して既存の非有効成分の含有量が安全上問題になる程度にまで増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新しい非有効成分を含有していないと考えられるとしております。

61 行目、3 ですが、以上の結果から、本添加物については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」の附則に基づき、安全性が確認されたと判断した。

したがって、本添加物においては、本則による評価は必要ないと判断した、とさせていただきます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして御意見、コメントをいただきたいと思っております。

なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思っております。

よろしいでしょうか。今回は余り気にならないと思うのですがけれども、先ほどの、何か流れか、その前の文書のあるなしで大分違うということですね。

○北村課長補佐 先ほどのものと合わせて修正をさせていただきます。

○澤田座長 どうぞ。

○五十君専門委員 20 ページの 29～30 行目あたりの記載なのですがけれども、*Escherichia coli* 由来の株を宿主として云々ということが書いてあるのですが、今回の場合は挿入している遺伝子もすべて同一菌種からとってきているという記載を入れておいた方がよいと思っております。このままだと他の菌種からとってきているのかよくわからないので、そういった内容を入れておいた方がよいのではないかと思います。

○澤田座長 全くホストと同じでしたか。株だけは違う。

○五十君専門委員 株は違うのですがけれども、菌種は同じ大腸菌由来の遺伝子。

○澤田座長 株は 1 つだけ、簡単に書けるはずらっと並べないといけないかということなのですが。

○五十君専門委員 ここは余り細かく書く必要はないので、同一菌種である大腸菌由来の遺伝子とか、それに限られているような記載を入れた方がよいと思うのですが。

○澤田座長 そうしましたら、遺伝子及びプロモーター配列の前に、大腸菌由来のという言葉を入れればよろしいですか。他に御意見は。

○澁谷専門委員 ちょっとよろしいでしょうか。これの一番最初のところですけども、スタートが KY8227 株から書き起こしているのですけれども、これはここに戻って書くべきなのか、前回安全性評価が終わった WSH 株がありますよね。だから、今回のに特定した書き方にするのか、これどっちだったのでしょうか。それによって違ってくると思いますので。

○澤田座長 本来はもとの組換えでないものから書き始めて、ただ今回中間のものがありますので、それも書いた方がよろしいですね。

○澁谷専門委員 だから、今回のイベントのところに注目すればもう少し中身も変わってくると思いますので、どちらがいいのかなど。安全性評価が終わったところからスタートするのもあるようには思ったものですから。

○澤田座長 そうですね、KY8227 株に由来する WSH 株を改変したという情報を入れていただいて、それで以下遺伝子プロモーター、分解関与遺伝子の欠失で、文章的に問題がなければ残して。

○澁谷専門委員 つまり WSH 株から書くとする、分解関係のものは今回いじってないのでよね。だから、一番大元からならそういうことになるし、それから今回の評価した中身に関して言えば分解関連酵素は今回操作していないので、ちょっと余分なことになって。これ植物なんかのときは前のものがあつたらそれから書き起こしましたかね、ちょっと。できれば前のを見ていただいて、整合性とれるような書き方にしていただければいいと思うのですけれども。

○北村課長補佐 以前グルタミン酸で評価したものをさらに改変したというものがあつたのですけれども、宿主としては組換え体でない方をもってきまして、説明として安全性評価が終了したものを基に作製したというのをつけ加えたというケースはございます。

○澤田座長 どうしましょう。

○澁谷専門委員 同じように。

○鎌田専門委員 多分、こんなことないと思うのだけれども、一回目の組換えやったのはいいのだけれども、そこから始めてしまって、二回目の組換えをやったときに、実は前と後のものがすごいインタラクションをしていて、すごく大きな影響を及ぼすということを想定すると、前のがわかっていないと二回目の後の安全性は議論できなくなるので。一回目の組換えが終わった後から書き始めてしまうと多分今の議論ができなくなるので、やはり一番最初の非組換えから一応議論した上で、最終物として、途中でこういうのは承認されたと書いてもいいのだけれども、最終物はこうなりましたというその書き方のほうがいいと思います。

○澤田座長 それでは、非組換えを出発点にすると。中間体は今まで書いてなかったようでしたら、特に書かなくても。

○北村課長補佐 評価書の 33 行目からございますように、情報としては記載はしていたかと思えます。

○澤田座長 原則としては non GM から一括して書くと。中間体はもうあえて書かなくてもいいと。中間体という意味は、承認済みの中間体ですね。

○北村課長補佐 申しわけありません。そうすると、33 行目からの記載は不要という意味ですか。

○澤田座長 どうします。あつて悪いというわけではない。

○鎌田専門委員 多分これからさらに今回つくったやつをまた改変とかという話になっていくとどんどんわからなくなるので、一応途中で承認されたものがどこかに書いてあった方が参考にはなるので、やはり完全に省くよりは入れておいていただいた方がいいと思います。

○澤田座長 では、入れておきましょう。

他よろしいでしょうか。

それでは、マイナーな修正ありましたけれども、事務局の方で直していただきまして、私の方で確認して、食品安全委員会に報告して、パブリックコメント等の手続きに入りたいと思います。

○澤田座長 それでは、次の L-アルギニンに移りたいと思います。それでは、事務局のほうから御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、RGB 株を利用して生産された L-アルギニンについて御説明いたします。薄い黄色のファイルをお願いいたします。

概要書のところからお願いいたします。まず、アルギニンの食品添加物としての概要になりますけれども、L-アルギニンは既存添加物に該当いたしまして、下記の化学構造、分子式、分子量、性状を有します。確認試験、純度試験により物理化学的性質を確認できるとされております。

4 ページ、用途でございますが、栄養補給を目的とした飲料等に利用されてございます。

5 ページにまいりまして、製造方法の概要になります。L-アルギニンはその生産菌株を用いた発酵生産により製造されまして、L-アルギニンの生産能力が向上した生産菌株を作製することで、効率的な L-アルギニンの製造を行うことを目的としてございます。

次が RGB 株作製の方法になりますけれども、(1) が作製方法の概略です。L-アルギニン生産菌 RGB 株は、*Corynebacterium glutamicum* KY9002 株を宿主としまして、複数の L-アルギニン生合成に関与する遺伝子の強化、生合成に関与する遺伝子の抑制を解除、生合成に抑制的に働く遺伝子の欠損、代謝経路の一部を改変して炭素の流れを L-アルギニンの生産に有利な方向に導くこと、及び L-アルギニンの排出に関わる遺伝子を強化することにより構築されてございます。

宿主菌の KY9002 株は、ATCC においてバイオセーフティレベル 1 に分類された菌株でございまして、有害な影響を及ぼす毒素の産生性、病原性は知られてございません。こ

の菌株を親株とします突然変異株は、食品用などのアミノ酸の工業的な生産に用いられておりまして、全ゲノム配列が明らかになっており、毒素産生性や病原性に関与する配列は見出されてございません。

(3) ですが、各遺伝子の欠失、置換、挿入におきましては、この染色体への各種 DNA 断片の組込みのために、相同組換えを利用してございます。

下の (4) 欠失、置換遺伝子、挿入プロモーターの説明が以下にございます。

6 ページの (4) -2 が置換遺伝子、7 ページの (4) -3、挿入プロモーターの説明がございます。

(5) にまいりまして、遺伝子組換えユニットですが、これらの遺伝子及びプロモーターは 11 個の遺伝子組換えユニットを用いた組換えにより欠失、置換、挿入されてございます。組込みユニットの説明が 7 ページ、8 ページ、9 ページにございます。

10 ページが組換えユニットの図になってございます。

11 ページの表 1 が組換えユニットの対象遺伝子の表です。

12 ページに L-アルギニン生産菌株の説明がございまして、図 2 に RGB 株構成の概念図がございます。

13 ページが製造方法になりまして、図 3 のフロー図のとおりになっております。精製工程の●●●のところでは菌体が完全に除かれるということです。こちらにつきましては、精製工程の最後のところで●●●グレードというものがございまして、●●●するとともに、さらにこの一次乾燥のところから矢印が出ておりまして、再結晶精製工程を経て、●●●グレードの製造がございます。この●●●グレードのものについては●●●するということですので、この申請に含めております。

14 ページが詳細な説明になっておりまして、※のところには●●●グレード製品と●●●グレード製品の説明があります。

さらに、食品添加物としましては、いずれのグレードとも食品添加物公定書の含量規格であります 98.0~102%を保証しているということで。実際の分析結果は 99%以上であるという説明がございます。

15 ページにまいりまして、申請品目と現行品目の同等性の確認になります。表 2-1 に公定書の成分規格の分析結果がございまして、それぞれ 3 ロットの結果になっております。対照の現行製品においては組換え技術は用いていないということです。

16 ページにまいりまして、こちらが●●●グレードについての添加物公定書の成分規格の分析結果になっております。

17 ページがタンパク質の残存試験結果になっておりまして、いずれのグレードについても検出限界未満、アミノ酸換算で 1 ppm でございますが、という結果になっております。

18 ページが不純物プロファイルの比較結果になっております。3 つの分析方法、アミノ酸アナライザー、HPLC 法 2 モードで現行製品と申請品目との不純物のプロファイル

の比較を行ってございます。

まず、アミノ酸アナライザーの結果について（1）、19 ページの表 4 に結果がございませぬ。新たな不純物は検出されておりませぬで、検出された不純物についても現行製品と同じかそれ以下という結果になってございませぬ。

20 ページが親水性モードの HPLC 法でございませぬ。結果が表 5-1、表 5-2 に示されてございませぬして、新規の不純物は検出されておらず、申請品目中の既存の不純物の量は現行製品以下であるという結果になってございませぬ。

22 ページが HPLC 法-2 で疎水性モードの結果になっております。表 6-1 と表 6-2 に結果がございませぬして、新規の不純物は検出されず、既存の不純物についても現行製品以下だという結果になっております。

24 ページがまとめになってございませぬして、これらのことから申請品目については「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方」の要件を満たすと考えるということになってございませぬ。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして御意見をいただきたいと思ひます。まず、L-アルギニンの添加物としての概要と製造方法の概要で、3 ページから 14 ページですか、ここまでに關しまして御意見、コメントありましたらお願いしたいと思ひます。

今回はちょっと●●●グレードと●●●グレードの 2 つ同時に取り扱っているのが今までと変わっているところで、●●●グレードのほうが HPLC で、純度的にはちょっと落ちてるような。これは●●●のために操作をしたがゆえにわずかに純度が下がっているということになってございませぬけれども。

製品が違ふものを同時にやっていますけれども、同じ菌からとれるということと同時に承認を出すのは差し支えないかなと思ひますのでございませぬ。何かそこら辺をうまく書き分けた方がいいのかどうか、そこら辺、後でまた御意見いただければと思ひます。

それでは、申請書の後半で、申請品目と現行製品の同等性の確認に關しまして御意見、コメントありましたらお願いしたいと思ひます。

よろしいでしょうか。

○前田評価調整官 すみませぬ、1 点確認よろしいでしょうか。20 ページの親水性モードの表 5-1 でございませぬすが、この申請品目の一番右の 8418 の不純物が 0.62 でございませぬして、現行製品はそれより下回っているのが 2 つ、0.60 と 0.40 がございませぬすが。こういう場合につきまして同等以下という判断ということは、これは正しい判断でございませぬしょうか。

○澤田座長 すみませぬ、もう一度。

○前田評価調整官 20 ページの表 5-1 の●●●グレードの不純物の●●●の合計値が

0.62 となつてございますが、この一番下の行ですね。それで、その現行製品ですと 0.60 と 0.40 というその不純物がそれよりも申請品より下回っているロットが 2 つ、●●●と●●●とございますが。こういう場合、推定はもう申請品目 3 つを全体として現行製品の不純物の平均値と比較するというふうな形で評価されるのが妥当なのかどうかということとをちょっと疑問に思いましたので、質問を。

○澤田座長 一応品目ごとにぶれがあることはしょうがないとして、厳密に言うると統計的に差がないと言っていたら本当はいいのですけれども、見たところこれは問題になるようなものではないと思います。

○澁谷専門委員 現行品も一番右がすごく高いですね。

○澤田座長 現行品が 0.09、0.09、0.52 で、申請品目が 0 か 0.1 かわからないのですけれども、0、0、0.50 ですので、見たところは問題ないと思いますけれども。

○鎌田専門委員 今のはわざわざ※がつけてあって、もともとブランクにもあるピークなので、いわゆる不純物というものでもない。だから、そこまで足すから変に見えるだけであって。もともと上の 3 つは基本的には関係ないピークだということですので。

○澤田座長 星マークもあるし、基本的には問題ないという。

他によろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 マイナーなこと、先ほどと同じで分析がまた 2 つのアミノ酸分析系 2 つ使っていますので、両方書いておいていただいたほうが。

○澤田座長 それは 18 ページでしょうか。●●●のところ。はい。

○鎌田専門委員 もう 1 点よろしいですか。これもすごくマイナーなことなのですが、6 ページの●●●遺伝子、●●●遺伝子の説明があって、実はなぜか彼ら●●●遺伝子の名前を間違えておりました、正式には●●●というのには●●●のはずなのですが、全然違う●●●の名前がそこには書かれていますので、きちっと直していただいたほうがいいかと思います。同じことは下のほうの●●●の遺伝子の名前も実は●●●ではなくて●●●なのです、これ。きちっと書いていただいた方がいいと思います。

○澤田座長 それは直していただきたいと思います。

他に。

○澁谷専門委員 これも細かいことですが、13 ページの製造工程のところですが、製造フローのところの●●●の前に●●●をしているはずで、前のセリンはちゃんと●●●●●が書いてあるのですけれども、同じ会社なので、●●●しないで●●●かけるはずはない。ちょっと気になるのは、こういうふうに書いてしまうと、ろ過のところでも全部●●●●●みたいになっちゃうので、そんなことはまずないはずなので、そこは●●●●●のプロセスが入っていると思いますので、加えておいていただいた方がいいと思います。

○澤田座長 本工程で菌体は完全に除かれるというのは、むしろ●●●でも除かれる。

○澁谷専門委員 だから、●●●の最初、前のセリンではちゃんと●●●●●の前に●●●●●しているの、ほとんど完全に除かれて、万一残ってもここで完全に●●●●●で除かれるとい

うはずなのですね。だから、●●●のところはちゃんと前にも書いてあったので、それを書いてもらわないと何か変なことになってしまうと思います。

○澤田座長 わかりました。何となく違和感がありますね、場所的に。間違いではないと思います。

○澁谷専門委員 なんかここにみんなという感じになってしまうのですよね。

○澤田座長 他によろしいでしょうか。

それでは、幾つか修正がありますけれども、安全上の問題があるというわけではありませんので、評価書案の審議に入りたいと思います。事務局の方から御説明をお願いしたいと思います。

○北村課長補佐 それでは、食品健康影響評価に関する資料の 23 ページ。右上に⑤と書いておられますのが L-アルギニンの評価書案になります。

26 ページをごらんいただきたいと思います。I. 評価対象添加物の概要ですが、名称、用途、申請者、開発者は記載のとおりです。

30 行目から、本添加物は L-アルギニンの生産性を高めるため、*Corynebacterium glutamicum* KY9002 株を宿主として、L-アルギニンの生合成に関与する遺伝子及びプロモーター配列の導入。L-アルギニン生合成の抑制に関与する遺伝子の欠失導入並びに L-アルギニン排出に関与する遺伝子の導入を行った RGB 株を用いて発酵生産された L-アルギニンである。L-アルギニンは、食品添加物としての使用が認められており、成分規格が食品添加物公定書に記載されている。

KY9002 株は、有害な影響を及ぼす毒素の産生性や病原性は知られておらず、ATCC においてバイオセーフティレベル 1 に分類されている。また、RGB 株は抗生物質耐性マーカー遺伝子を有さないとしております。

41 行目から健康影響評価になりますが。42 行目、製造工程において使用微生物及び発酵副生成物が除去され、晶析により結晶として高度に精製されており、食品添加物公定書の含量規格を満たしている。

46 行目からですが、最終製品におきまして、タンパク質は検出限界未満、食品添加物の成分規格を満たしている。アミノ酸分析及び HPLC 法による分析の結果、従来品に存在しない不純物は検出されず、また従来品に存在する不純物の実測値は従来品の含有量の実測値の最大値を上回っていません。

以上の結果から、従来品と比較して既存の非有効成分の含有量が安全上問題となる程度まで増加しておらず、かつ有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられる。

57 行目からは、先ほどのセリンと同様の記載にさせていただきます。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、ただいまの評価書案につきまして御意見、コメントをいただきたいと思いま

す。

なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思います。御意見よろしいでしょうか。

○五十君専門委員 先ほどと同様で、遺伝子の由来が同じ菌種だったら書いておいた方がよろしいのではないかと思います。31 行目あたりに先ほどと同じように、この場合ですと、*Corynebacterium glutamicum* ということになると思います。

○澤田座長 それはまた追加していただくということで。

他に。よろしいでしょうか。

それでは、先ほどちょっと申しましたけれども、これは 2 つの製品を込みで見ているのですけれども、特に製品名を名前つけているわけではなくて、2 つの製品を食品添加物として販売することになるのですけれども。特に分けてやる必要があるかないか、それだけちょっと御判断、御意見いただけたら。

これは、我々が判断しなくても、事務局と厚生労働省がこれでいいということならこのままいくこともあるし、ちょっと考えるということであればまた評価書を二つに分ける必要があるかということですね。後でどちらかに決めたいと思います。

他によろしいでしょうか。

それでは、マイナーな修正ですが、事務局のほうにお願いして、私のほうで確認して、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続きに入りたいと思います。

それでは、議題 1 に関しましては終わりたいと思います。

議題 2 のその他でありますけれども、事務局から何かありますでしょうか。

○北村課長補佐 特にございません。

○澤田座長 ありがとうございます。

以上をもちまして、第 99 回遺伝子組換え食品等専門調査会を閉会いたしたいと思いません。どうもありがとうございました。