

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会 第108回会合議事録

1. 日時 平成24年9月19日（水） 14：00～16：26
2. 場所 食品安全委員会中会議室
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
 - ・ *Aspergillus oryzae* MT2181 株を利用して生産されたキシラナーゼ
 - ・ コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統（食品・飼料）
 - (2) その他
4. 出席者
 - (専門委員)
澤田座長、五十君専門委員、鎌田専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、手島専門委員、中島専門委員、飯専門委員、和久井専門委員
 - (食品安全委員会委員)
三森委員、山添委員
 - (事務局)
姫田事務局長、本郷事務局次長、坂本評価課長、前田評価調整官、北村課長補佐、小倉係員、松井技術参与
5. 配布資料
 - 資料1 食品健康影響評価に関する資料
 - ① *Aspergillus oryzae* MT2181 株を利用して生産されたキシラナーゼ
 - ② コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統（食品）
 - ③ コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統（飼料）
 - 資料2 専門委員からのコメント
 - 参考資料1 食品健康影響評価に係る指摘事項
 - ① *Aspergillus oryzae* MT2181 株を利用して生産されたキシラナーゼ
 - ② コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統

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 108 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、宇理須専門委員、澁谷専門委員は御欠席です。

本日の議題であります、継続の品目であります *Aspergillus oryzae* MT2181 株を利用して生産されたキシラナーゼ、それから、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統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いたします。事務局からお願いします。

○北村課長補佐 配布資料を確認させていただきます前に、事務局の人事異動がございましたので御報告させていただきます。9 月 11 日付で事務局長が栗本から姫田にかわりましたので御報告いたします。

○姫田事務局長 こんにちは。今、御紹介がありましたように、9 月 11 日付で食品安全委員会事務局長になりました姫田でございます。どうぞよろしくお願ひいたします。

私自身は、今のリスクアナリシスの仕組みができて以来、リスク管理機関、消費安全局でずっとお仕事をさせていただいております、リスクコミュニケーション、それから、食品ではないのですけれども、家畜疾病、それからあと、総務課とか審議官とかをやっております。組換え食品に関しては、むしろ、その前からリスク管理側で相対していたというようなところがございまして、汗をかいていたほうの立場で仕事をさせていただいております。最近担当の審議官でしたので、いわゆる環境適性の話とかをさせていただいたところでございます。

いずれにしても、前事務局長は獣医ですけれども、私も畜産屋でございますので、なかなか生物系の話しかよくわからないところでございますけれども、食品安全委員会は科学性、中立性というのはしっかり私としては守っていきたいと思っておりますが、もう一方で、行政機関でございますので、しっかりといわゆるリスク管理機関と連携しながら進めたいと思っておりますので、ぜひ、よろしくお願ひいたします。本日はどうもありがとうございます。よろしくお願ひします。

○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、座席表、専門委員名簿、資料 1 としまして食品健康影響評価に関する資料、資料 2 といたしまして専門委員からのコメント、参考資料としまして安全性評価に係る指摘事項となっております。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、次回に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お願ひいたします。

○澤田座長 それでは、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づき、必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について、御報告をお願いします。

○北村課長補佐 本日の議事に関します専門委員の調査審議等への参加に関する事項について御報告いたします。本日の議事に関しましては、専門委員の先生方からいただきました確認書を確認しましたところ、平成15年10月2日委員会決定の2の(1)に規定する「調査審議等に参加しないこととなる事由」に該当する専門委員はいらっしゃいませんでした。

以上でございます。

○澤田座長 御提出いただいている確認書につきまして、その後、相違等はございませんでしょうか。

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、*Aspergillus oryzae* MT2181株を利用して生産されたキシラナーゼについての審議を行いたいと思います。この品目は一昨年1月の調査会において審議を行い、指摘事項を出したもので、前回8月の専門調査会におきまして、指摘事項5までの審議を行っております。指摘事項に対する回答について、事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、お手元に黄土色のファイルにとじられております回答書の冊子をお願いいたします。

7ページの指摘事項6の回答から御説明させていただきたいと思います。指摘事項6になりますけれども、これは第1の安全性評価において検討が必要とされる相違点の項目でございますけれども、(2)の組換え体と宿主の相違点につきまして、*TAKA* 遺伝子、*alp* 遺伝子、*NPI* 遺伝子を欠失させた理由及びシクロピアゾン酸及びコウジ酸を産生できなくなった理由を回答の上、追記をすること、また、これらの遺伝子の欠失及び遺伝子産物が産生できなくなることによって、生産菌の代謝系に影響がないことについて回答することという指摘になってございます。

回答でございますけれども、指摘にありますこれらの遺伝子の欠損等は、この宿主の改良の際に行ったということでございます。下の少し小さい字になりますが、こちらが審議資料の修正になっておりますので、こちらに基づいて説明をいたします。下線が引いてある5行目あたりからですけれども、*TAKA*、*alp*、*NPI*の各遺伝子の欠損については、宿主の主な夾雑酵素であります α -アミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、中性メタロプロテアーゼの生産能を欠落させ、目的とする酵素の純度を高めるために行っております。また、これらのプロテアーゼ遺伝子の欠損によりまして、産生されたキシラナーゼの分解を抑えることもできるということでございます。シクロピアゾン酸とコウジ酸の産生能の欠損につきましては、これらの二次代謝物の産生を低減させるためということで、これらはどちらも生物の生命活動に直接関与しない二次代謝産物でありまして、この欠損が代謝系に影響するとは考えにくいという回答になってございます。

なお、この酵素の生産菌である組換え体については、表現型の変化は全く見られず、遺伝子も培養を通じて安定的に存在していることが確認されているという記載になってございます。

続きまして、指摘の 7 になります。こちらは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事項につきまして、*A. fumigatus* は日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られているため、その旨を追記することという指摘になってございます。

8 ページにまいりまして上から 6 行目のところに、こちらに関する事項の追記がされてございまして、最終行になりますけれども、日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られているという旨の追記がされてございます。

続きまして、指摘事項の 8 になります。第 3 のベクターに関する事項に関しまして、IPTG に関して適切な記載がされていないため、適切な記載内容に改めること、また、本項全体の記載について再確認の上、必要に応じて記載内容を改めることという指摘になってございます。

回答でございまして、当初の記載内容ですと β -ガラクシターゼが IPTG を分解するという記載になってございましたけれども、*lac Z* のプロモーターが IPTG によって誘導され、*lac Z* が発現し、生成した β -ガラクシターゼが X-gal を分解することによって呈色物質が遊離されるという記載に修正されてございます。また、外来の DNA 断片が挿入されたことは X-gal の分解が起こらないため、コロニーが白色を呈することによって確認できるという旨の内容に修正されてございます。

続きまして、指摘事項の 9 になります。こちらは第 4 の項目になりますけれども、挿入 DNA の供与体に関する事項の (2) の安全性に関する事項及び (4) の挿入遺伝子の機能に関する事項について、*amdS* 遺伝子の供与体である *A. nidulans* 及び遺伝子産物であるアセトアミダーゼは食経験がないと考えられることから、これらによってヒトの健康に影響を与えないことについて回答の上、追記をすることという指摘になってございます。

Aspergillus nidulans は、国立感染症研究所の「病原体等の BSL 分類等」では、BSL1 に属する真菌と考えられておりまして、米国 NIH の定義でも Risk Group 1 に分類されるということから、食経験はないけれども、安全な菌であるという回答でございまして。また、*amdS* を含む導入用ベクター (pMT2155) 全体から同定されました ORF の中に、既存のアレルゲン、既知のトキシンと相同性のあるものはないため、この遺伝子導入による安全性への懸念はないと考えるということです。また、*amdS* 遺伝子産物であるアセトアミダーゼはアセトアミドを唯一の炭素源または窒素源にした場合に誘導される酵素で、通常の培地では発現しないと考えられます。また、アセトアミダーゼは分泌シグナルの配列を持たないことが示されているため、本酵素は菌体内酵素と判断できるということです。

なお、この *amdS* 遺伝子はマーカーとして長年使われてきた実績がありまして、この遺伝子が導入された遺伝子組換え微生物は、食品用酵素の生産菌としても広く用いられて

おりまして、日本で安全性審査が終了しております *Novozym677* (リパーゼ)、*AMG-E* (グルコアミラーゼ) にもこのマーカーが使われているということです。また、審議資料の修正も 9 ページの下のほうからなされております。10 ページの 4 行目のところからは、(4) の遺伝子の機能に関する事項についての修正がされているところでございます。

ここまででお願いいたします。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、一応、指摘事項 6 から 9 までですか、これに関しまして御意見、コメントをいただきたいと思えます。

まず、順番に指摘事項の 6 の *TAKA*、*alp*、*NP1* 遺伝子を欠失させた理由、それから、シクロピアゾン酸、コウジ酸を産生できなくした理由、これにより代謝系に影響がないことという指摘事項でありましたけれども、これは澁谷先生と飯先生の御指摘ですが、澁谷先生は今日のご欠席ですが。

○北村課長補佐 お配りしております資料 2 をお願いいたします。本日、御欠席の澁谷先生から本指摘事項 6 についてコメントをいただいておりますので御紹介いたします。それぞれの遺伝子を欠損させた理由等が説明されているので、この点についてはこれでよいと思えますというコメントでございます。

○澤田座長 飯先生、よろしいですか。

○飯専門委員 一応、回答はこれでよろしいのですけれども、気になる点がまだあります。まず、シクロピアゾン酸とかコウジ酸というのがマイコトキシンだという記載になっているのですけれども、一方で、審査資料のほうの、例えば 10 ページなののですけれども、一番下の方の 4 のところ、宿主の構成成分等に関する資料のところでは、有害生理活性物質等を生産することは知られていないという書き方となっており、これと整合性がないのではないかという気がします。ここでいう有害生理活性物質というのがカテゴリーにもよるかとは思ったのですが、こういう記載をするのであれば、両者が合うようにするべきではないかというのが一つです。

それから、もう一つ、ここでの代謝系への影響ということについて気になった理由に、この生合成系の遺伝子をどれかつぶすことによって、生合成の中間産物がかえって増えたりすることはないのかなということが頭をよぎったということがあったのですが、この宿主のつくり方のデータが今回は入って入って、それを見ますと、少なくともシクロピアゾン酸の生合成のほうに関しては、かなり大きな遺伝子クラスターを欠落する形になっているようなので、そちらのほうは問題ないかなと思えます。

また、つくり方も従来からの変異を与えるような方法になっているので、これ以上、問う必要はないかなということで結構かと思うのですが、ここでもまた、この指摘とは違うところなのでも、菌のつくり方の記載が、審査資料の 58 ページになるのですけれども、そこの一番下の段落、vii というところになります。ここで *BECh1* という株のつくり方が書いてあるのですが、ここでシクロピアゾン酸をつくらなくしているのです

けれども、恐らくここの作製はガンマ線を使っているだろうと思います。少なくとも添付資料のほうではそのようになっています。これらを一致させてほしいなど。同じように 54 ページの菌作製の流れ図のところでも、ここで紫外線による変異というふうになっていますので、そこは確認していただきたいと思います。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

まず、10 ページの有害生理活性物質の表現のあたりは記載の整合性をとってくださいということですが。

○飯専門委員 これは私の感覚からいくと、有害生理活性物質に相当するのではないかなというふうに思うのですが。

○澤田座長 その表現の仕方ですね。それは検討していただいて。それから、もう一つ、指摘していただいたのは、58 ページの紫外線がガンマ線ではないかという。

○飯専門委員 添付資料のほうの説明を見ますと、ガンマ線で作製していると。それで非常に大きなデリーションが起きているという結果になっているのですけれども。

○澤田座長 それを確認して直していただきたいと思います。それでよろしいですね。

それでは、次の指摘事項 7 で、*A. fumigatus* が肺炎の原因菌となっていることでありますけれども、これは私も指摘を出したので、これは直したとおりでよろしいかと思いません。

次の指摘事項の 8 で、IPTG 等に関する記載の修正についてでありますけれども、これも飯先生ですが。

○飯専門委員 これだけ丁寧に書いていただければ結構です。

○澤田座長 それでは、次の指摘事項の 9 で、*Aspergillus nidulans* のアセトアミダーゼですか、そのヒトへの健康影響評価につきまして、これは中島先生からの御指摘かと思いません。

○中島専門委員 アセトアミダーゼに関しては、この委員会で前例があったのかという点だけ気にしていたわけです。また、使用実績がありますし、これが無害なものであるということは基本的には知られていることなので、大体、このように記載していただければいいのかなと思います。

○澤田座長 ありがとうございます。

これは食品安全委員会ができる前だと思うのですけれども。

○中島専門委員 昔から使われています。

○澤田座長 それでは、指摘事項 10 以下の御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、回答書の 10 ページの指摘事項 10 について御説明いたします。欠損ベクターの宿主への導入によって、新たに形成される ORF について、各欠損ベクター中の連結点を特定した方法を回答することという指摘になってございます。

遺伝子の欠失のためには、四つの欠失導入ベクターを用いております。pSO5、

pSMO115、pJaL212、pJaL399 という四つのベクターになります。この指摘の連結点というのは、これらのベクターを構築する際に、遺伝子欠損のために意図的に遺伝子のコーディング配列を制限酵素で切り、連結させた箇所のことだという説明がされてございます。

以下、図 13 から表 9 という記載がありまして、それぞれの欠失用ベクターについて構造と塩基のポジションの表がつくられてございます。例えば図 13 になりますけれども、これは pSO5 由来の欠失用断片の構造になってございまして、こちらの場合ですと、連結点というのが塩基番号の●●●になりまして、表 9 のところを見ていただきますと、Element の *pyrG* 5' 末端近傍配列及びコーディング配列と *pyrG* 3' 末端近傍配列のつながり目のところが連結点だという説明になります。図 14 と表 10 につきましては、これが TAKA 遺伝子の欠失用ベクターのものになりまして、次の図 15 と表 11 が *alp*、13 ページの図 16 と表 12 につきましては、*NPI* 遺伝子の欠失用ベクターのものになっておりまして、それぞれ 10 ページに連結点の塩基番号が記載されておりますけれども、そこが連結点だという説明になっております。

続きまして、13 ページの指摘事項の 11 にまいります。欠損ベクターの宿主への導入によって新たに形成される ORF について、80 個以上のアミノ酸で 35%以上、相同性が認められたアミノ酸及び連続する 8 アミノ酸について、相同性が認められたアミノ酸配列について、それぞれ具体的にどの部分と相同性があつたのか等について回答の上、記載内容を改めることという指摘になってございます。

13 ページのところから回答がございましてけれども、まず、記載ミス等の説明がされてございます。15 ページになりますけれども、表 14 の再構成がされております。また、欠失用のベクターの pJaL212 に同定されました ORF の数は、11 ではなくて 12 だったということで修正がされてございます。これは表 14 のところにも修正の記載が入ってございます。14 ページにまいりますと、既知のアレルゲンの相同性を示す ORF の記載漏れがあつたということで修正がされていることと、あと、連結点についても記載漏れがあつたということです。あと、表 14、先ほどと同じ 15 ページになりますけれども、塩基番号の記載ミスがあつたということと、相同性検索を再度やり直したところ、E-value が 0.024 になるトキシンが新たにヒットして、この E-value が最低値になったので、ここを修正しましたということが前半部分は書かれてございます。

14 ページの真ん中から下のところが審議資料の修正になってございます。15 ページが先ほど申しました表等の修正になっておりまして、16 ページの表 15-1 に 8 連続アミノ酸で 100%一致する既知アレルゲンというところがございまして、それぞれのベクターごとに同定された ORF、それと、相同性が検出された既知アレルゲンが表に記載がされてございます。表 15-2 が 80 アミノ酸で 35%以上一致する既知アレルゲンの表になってございます。

17 ページから、それぞれのアレルゲンと ORF の相同性について説明がされてございます。18-1 につきましては、既知のアレルゲン Asp o 21 と ORF、pSMO115_26、

pSMO115_111 との相同性解析の図になってございまして、塩基配列がそれぞれ比較されてございます。こちらの説明としましては、染色体での *TAKA* 3' コーディング配列と *pyrG* 3' 末端近傍配列及び *pyrG* 5' 末端近傍配列と *TAKA* 3' コーディング配列との連結点をまたいで相同性領域を持つことはないため、当該欠損によって新たな既知アレルゲン相同性の ORF は生じないと考えするという説明がされてございます。18 ページの図 18-2 につきましては、それぞれの ORF とゲノム DNA との対応関係図（概念図）になってございます。

18 ページの ii - ii につきましては、既知のアレルゲン Asp f 13、Asp o 13 及び Asp f1 protease に関します ORF との相同性解析の結果になってございます。こちらにつきましても、連結点をまたいで相同性領域を持っていないため、既知アレルゲンと相同性のある新たな ORF は生じないと考えするという説明になっております。

19 ページの ii - iii が Asp f 5 と ORF JaL399_23 の相同性解析になってございます。こちらにも塩基配列と、あと、20 ページの図 20-2 のところに概念図で説明がされております。また、20 ページの四角の 12 の直前になりますけれども、トキシンの説明もされているところでございます。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

まず、指摘事項 10 でありまして、欠損ベクターの中の連結点を特定した方法についてということで、これは児玉先生の御指摘です。

○児玉専門委員 この説明で理解できましたので、これでよろしいかと思います。

○澤田座長 それでは、指摘事項の 11 番目で、相同性が認められたアミノ酸配列の具体的な説明等につきまして、これは手島先生の御指摘です。

○手島専門委員 この説明でよろしいかと思うのですが、15 ページの文章のほうの下から 4 行目からは、相同性が検出された既知アレルゲン、Asp o 21、Asp f 13、Asp f1 protease、Asp o 13、Asp f 5 はすべて宿主染色体から欠損させた標的遺伝子関連のアレルゲンであり、相同領域の安全性については 48~53 ページで検討した結果、すべて野生株にも存在する配列であり、問題はないと考えるとあるのですが、「存在する配列であり」の後にはコーディング配列との連結点をまたいで相同領域を持つことはないため、新たな既知アレルゲンと相同性のある ORF を生じることはないと考えられるというふうな説明にしていただければと思いました。

○澤田座長 ありがとうございます。それは修正をするということではよろしいですか。

○手島専門委員 はい。

○澤田座長 事務局のほうはよろしいですか。どうもありがとうございました。

それでは、指摘事項の 12 で、組換え体のゲノムに挿入したキシラナーゼ遺伝子のコピー数、位置、変異の有無及び安全性について、また、キシラナーゼ遺伝子以外の挿入配列の安全性についてという指摘事項です。

○北村課長補佐 回答について御説明いたします。回答書の 21 ページになりますけれども、*Aspergillus* 等の糸状菌は形質転換の際にベクターを環状のまま使い、ベクター全体を染色体に挿入することが行われているということです。ベクター上のいずれかの位置を末端とし、染色体の任意の位置に導入されますが、この場合、タンデムに複数のコピーが導入される場合が多いことが知られております。導入ベクター pMT2155 もこの方法で BECh2 に導入されたため、その挿入位置を特定するのは難しく、また、染色体上にタンデムに複数のコピーが導入されているため、挿入部周辺の染色体の読み取りは技術的に不可能だという説明でございます。コピー数についてはサザンブロット等の方法を用いて推定することができるということで、ドットブロットを用いて行ったところ、コピー数は●●●と計算されたという説明がされてございます。

以上です。

○澤田座長 中島先生、いかがでしょうか。

○中島専門委員 確かにプラスミド DNA でコウジ菌に形質転換すると、タンデムにまた染色体に何か所か入ることはありますが、●●●コピーも入るような例があるかどうか。通常は多くても 3 コピーとか 5 コピーとかです。サザンで電気泳動して、そのバンドの濃さできちっと見ているのであれば、信用できると思いますが、これはドットブロットのデータでして、確かにドットブロットのデータから見る限りは●●●コピーと計算はできますが、そのまま信じていいのかどうか、少々、疑問です。

それから、染色体中に入っていますが、どこに入っているか、決めるのは難しいとあります。PCR で決めようと思えば確かに難しいですね。では、決めなくて許すかどうか、この点は先生方に御議論いただきたいと思います。この場合、どういう手を打てるかといいますと、二つほど手段がありまして、一つはコウジ菌ですから染色体は 8 本なので、染色体を電気泳動して、これでサザンをやれば何番の染色体に組み込まれているのかということ进行调查することができます。

それから、次世代のシーケンサーを持っているのであれば、コウジ菌のゲノムは全部で 3,700 万塩基対で単相ですので、全ゲノム配列の決定を行えば、そんなに大変ではなくて、どこに入っているかというのを決めることはできると思われます。これを要求する必要があるかどうかは、ほかの先生方で御議論いただきたいと思いますが、私はこのくらいは決めていただきたいと考えます。

以上でございます。

○澤田座長 コピー数と挿入位置の問題ですけれども、通例としましては、食品添加物の場合は今までゲノムに入った場合、求めていなかったのですが。しかし、確かに●●●という数字がどこまで正しいのかと言われると問題かなと思いますので、もう少しきちんとやってもらったほうがいいのかという気がしますが、いかがでしょうか。

○鎌田専門委員 一つは●●●という数はものすごく大きな数で、途中でそれこそ変異したものが入っていたら、何だからわからなくなってしまうという側面もあるので、これは

きちっとどこにちゃんとしたものとして入っているかというデータがないと、多分、議論が始まらないだろうというのが一つです。

それから、先ほど同じような議論で、結局、遺伝子を欠損させるときのあれも議論としては単にベクターの配列を見ているだけで、本当にそのとおりになっているかと確認はしていないですね。それで、それだけの議論でいいのかと、現実問題としてはアレルゲンの何か似たようなところがあるというような議論もある中で、確認していないことをもって言い切っているのかというのはかなり疑問があるので、その二つの点があるので、今の次世代シーケンサーだったら、そんなに時間がかからないで今はできる時代なので、昔とはかなり違うと思うので、それは時代の進歩とともにできるようになったという解釈で、私はいいのではないかと思うのですが。

○澤田座長 8本の染色体を全部シーケンスしないといけないということになりますか。

○鎌田専門委員 次世代だったならばランダムに全部読んで、リファレンスゲノムがありますので、それに当てはめるだけです。難しい作業ではないと思います。

○飯専門委員 私も一部、コメントをここでしていたと思うのですが、たしか前のときには、入った場所のジャンクションがわからないということが問題だというのが一つ理由だったかなと思うのです。丸いままほうり込んでいるために、どこで宿主側とつながっているのかがわからないのでは、ジャンクションの部分で新たなペプチドが合成され得ることについて配列が決まらないうと検討しようがないのではないかと。だから、それに対しては結局、答えてもらえていないのかなという気がするのです。

それから、関連して、申請書の64ページのところの図になるのですけれども、結局、このサザンのパターンが理解できないというのがあって、多分、前のときも、正確には思い出せないのですけれども、前のページにモデルの図がかいてあるだけで、これではわからないというようなことがあって、これでは、次の64ページのサザンのパターンを理解できないというのが恐らく背景にあったかと思うので、少なくともこのパターンが何を意味しているのかは説明してほしいなという気がするのです。たくさんあるバンドが全部ばらばらな場所に断片として挿入されているのか、本当に彼らが言っているように1カ所につながって入っていて、残りは実験上の問題なのかすら、対照となる親株も流れていなくてわからないという、判断のしようがないというところです。

○澤田座長 サザンのデータで入っている場所がどのくらいかというのを確認したいということですね。

○飯専門委員 入っている場所は、次世代をやるのだったら、それである程度は、出せるかなとは思いますが、一方で、このサザンのパターンで見えているバンドが本当にみんなキシラナーゼの遺伝子由来のバンドであれば、すごい数に切れた断片がそこらじゅうに入っていることになってしまうので、少なくとももう少し詳細に解析してもらわなければならないのではないかなという気がしています。

○澤田座長 かなり追加のデータが必要なのですけれども、どこまで要求するかというの

を決めていただきたいと思います。児玉先生はいかがですか。

○児玉専門委員 サザンのデータを僕もずっと昔というか、最初のころから不思議なデータだと思って見ていたのですけれども、多分、●●●と●●●で同じパターンでかぶっているパターンが非常に多いので、恐らく丸い形が入っていくときにいろんな向きで入っていて、切り方によって短く出たり、長く出たりするように入っているの、同じバンドになるのかなと想像していたのですけれども、コントロールがないので、一体、どのバンドが新規の挿入遺伝子によるバンドなのかが全然わからないので、少なくともこのサザンは変えてほしいとは思いました。

あと、次世代をここで一旦求め出すと、この手の比較的下等ではないですけれども、染色体の小さい生物に対して、みんな、次世代を求め出してしまうのもいいのかどうかというのは、僕自身、悩むところで、要するに前半の部分で安全性を担保できないので、例えば動物実験をやりましたというのも論理としてはあるのかなというふうに、前半の部分で担保できれば、動物実験は省略してもいいというふうに読めるので、担保できなかったのも動物実験をやりましたという論理も、あるのかなというふうには思ったのですけれども。

○澤田座長 一つはプロダクトの安全性が問題で、ゲノムのレベル以外にそっちで安全性がわかれば、シーケンスまで求めないという方針が昔からあるわけですね。だから、トータルに考えて今あるデータで安全性に懸念がないのだったら、あえてシーケンスまで求めなくてもいいのかなというのが一つあります。

あとは製品の純度が気になるところで、余りきれいではないのですね。もう少しタンパクが精製されていれば、問題にしなくてもいいのかなとは思われますが。それと、本来の宿主のコウジ菌をかなり改変しているの、もとのものが安全だから、ここで使っているものが安全かと言われると、すぐにそう言えないところもあります。その辺りの考え方の問題かなというふうに思いますが。

○鎌田専門委員 確かにシーケンスという議論をし出すと、切りがないのかもしれないけれども、一つは先ほど座長も言ったとおり、これはタンパクの純度がすごく低いですね。調べたら 36.3%か何かということは、変な位置に入って、まさにジャンクションも含めて変なタンパクができていて、除去されていない可能性が非常に高くなるので、そこら辺はこれぐらいのものだったならば、もう少しちゃんとしておく必要があるだろうと。特にアレルギー性になるとマウスの試験でやってわかるかということ、そんなものがもちろん出てくるわけではないので、単に動物実験をやったから済むということでは多分ないだろうというのもあり、その上で、先ほど言ったように本当にばらばらな位置で●●●コピーが入っていたら、これは結構何が起こってもおかしくないという確率の問題になるので、1コピーがすぽんと入っているぐらいだったら何ということはないと思うのですが、そうではないので、シーケンスをするほうが本来ではないかと、こういう事例の場合には。

○澤田座長 一つ、海外で 10 年近く使っているという事情がありまして、日本で評価する場合にさらに求めるかという話があるのですが。

○児玉専門委員 今、鎌田先生がおっしゃったように純度が高くない、培養ろ液中にはこのタンパク質が主に出ているというのはよくわからない免疫二次元電気泳動という非常に古い方法でやっていますので、少なくとも培養ろ液でオリジナルの *oryzae* の培養ろ液と比較して、新たな非常に目立つタンパク質はつくられていないというものをを見せていただければ、ある程度の最低限の安全性はとれるかなという気はするのですが、少なくともその部分のデータで、我々がはっきり判断できるデータはを見せていただけていないので、果たして新規のタンパク質ができていないのやら、いないのやらという議論もできない状況ですので、それはを見せていただいてもいいのではないかなというふうには思っているのですけれども。

○澤田座長 ほかに。どうぞ。

○五十君専門委員 この評価のときにいつも困っているのは、遺伝子組換え食品（微生物）と食品添加物のガイドラインをどう分けていくかという点です。今回の場合は遺伝子組換え体自身を大量に食べるわけではないので、遺伝子組換え体自身に対する評価を全ておこなうかということに関しては、座長からはプロダクトとして見て、ある程度、評価すればいいというところで切り分けていると思います。

その切り分けで考えると、今回については、私は個人的には遺伝子を全部シーケンスする必要はないと思います。この菌がもともと産生する可能性のある有害物質の量について、宿主の培養と、組換え体の生成したものと比べるデータがあれば良いと思います。それ以外に何か新たに出てくるかどうかは、確かにわからないところはあるのですけれども、そちらについてはプロダクトの二次元のタンパク泳動のデータを出してもらうなどの、プロダクトベースの比較で評価ができるのではないかと思います。

ただ、今まで組換え体の評価のときに必ずやってきたのは、挿入遺伝子近傍の配列を明らかにすることで、そのところを今回、なぜ、やらないのかです。先ほどの議論の中では、この場合ですと組換え体自身は含まれず、そこから精製されているプロダクトであるので、プロダクトの比較で評価できるということではないかなと思います。

○澤田座長 今までゲノムに挿入された場合は、食品添加物の場合には要求していないのですね。

○五十君専門委員 だとすると、その延長で今回はそこまで要求しないで、プロダクトベースの何らかのデータを出していただくということが重要ではないかと思います。

○澤田座長 それでは、プロダクトに関して電気泳動、SDS と、ウェスタンができるかどうかはわかりませんが、大きく変わっていないことをいうのもなかなか難しいかなという気がしますけれども。あと、低分子は限外濃縮の操作がありますので、余り入ってきていないようですね、低分子の有害物質に関しては、だから、それは余りやっても意味がないかなと。

○五十君専門委員 タンパクを中心に見るということになりますね。

○澤田座長 タンパクになりますけれども。

○五十君専門委員 今回、タンパク質に関して、宿主と組換え体の単純な比較が提出されていないのは、何か理由が逆にあるのかなというぐらい不思議ですね。

○澤田座長 従来、どこの会社も出していません。宿主の IFO 何番ですか、それが容易に手に入るのだったら、それを培養しないといけないということになります。

○児玉専門委員 培養ぐらいいいのではないのでしょうか。

○澤田座長 今までの議論をお聞きしまして、フルシーケンスをどこまで要求するかはまだペンディングですけれども、プロダクトの純度的な情報は少なくとも出していただくと。それからあと、サザンをやり直すことと。タンデムでなければ少なくとも何か所以上というのはわかるかと思います。もう少しきちんとしたデータを出していただく必要はあるかと思います。ただ、本当にタンデムに何コピーも入っているとシーケンスは難しいですね。全部込みで見なければいけなくなりますので。違う場所に入っていて、その周辺領域が違う場合は簡単にシーケンスできるかもしれません。それがダメなら、ランダムにシーケンスして、後でつなぎ合わせるしかないのかなと。

○鎌田専門委員 シーケンスにこだわるわけではないのですが、例えば今のタンパク質を見ろと言ったとしても、結局、培養のステージごとに多分、タンパクのパターンは変わっていくので、そもそも何と比較するのが一番ベストなのかというのは、この場合には多分、なかなか決められない。二次元電気泳動でやるパターンを比較するという、多分、議論になると思うのですが、そのときに比較すべき相手が、結局、これも部分精製してあるわけですね、既に。

だから、もとの親株のタンパクをとって部分精製して、同じステージで比較するというぐらいしかできないのかなという気もするのですが。多分、そこら辺をきっちりしておかないと、パターンとしてタンパクが今回のものに親株にないものが幾つかタンパクが出てきたとなったときに、その議論をせざるを得ないわけですね、今度はね。だから、極端なことを言うと、もし何かで違いが出てきたのだったら、それが何かを徹底的にデータを出してもらわないと、答えが出てこないということになるのではないかと思うのですが。

○澤田座長 あと、動物実験の毒性の問題とヒトでの経験があるという問題がありますが、それをどの程度考えるか。

○児玉専門委員 ただ、これは培養ろ液ですので、細胞をすりつぶしているわけではないので、そんなにめちゃくちゃタンパク質がたくさん出てくるということは、余りないような気はしてはいるのですけれども。ただ、培地中の培地の持ち込み成分は出てくるかもしれませんけれども。

○鎌田専門委員 でも、純度 36%ということで、これだけ夾雑をさせておいて。

○飯専門委員 タンパクを調べたとして、差が出てきたときに、その差については何かとということを同定させることになるのですかね。

○五十君専門委員 既に、ウェスタンというか、抗体を使った評価をやっているのです、純粋にタンパク質の泳動像がとにかく見たいと思います。

○飯専門委員 それは全く同感なのですけれども、その点は全くそのとおりのです。

○五十君専門委員 そうすると、かなり方向性が見えるのではないかと思うのですが。

○飯専門委員 さっき、代謝の関係のところで述べたことで、こちらのほうの議論にもかかわるかと思うことなのですが、例えばプロテアーゼを壊している、逆にふだんだったら壊されているようなものがふえていてもおかしくないのではないかなと、下手するとそういうのがみんなひっかかってくるかなと思ったものですから。ただ、もちろん、タンパク像というのが知りたいのは山々で、それは必要かなとは思いますが。

○児玉専門委員 比較対象としても可能であれば、最後の pMT2155 ですかを入れる直前のホストが最終的に、直前にありますので、最後にこれを入れて終わりですので、直前のホストの培養のパターンと入れた直後の培養のパターンで見るのが一番近い、差は出にくいと言っては変ですけれども、どちらもプロダクトは壊れていますし、そこで、プラスミドを入れたことによって何か新規に変なことが起きないということが見られれば、一番理想ではないかなとは思いますが。

○澤田座長 その場合は中間体もとの宿主の安全性は同じだという仮定のもとにやるわけですね。一応、欠損型なので余り有害なことは起きていないだろうという理論的な前提のもとで、中間体と最終のものを比較して、タンパクがどのくらい違うか、比較して頂くと。

○児玉専門委員 結局、プラスミドが入って、タンデムに何コピーも入ってしまったということに対しての安全性がとれていないということであれば、入れる前と入れた後で変なことが起きていませんよということを見せてもらえるのであれば、一番、我々としては納得しやすいとは思いますが。

○澤田座長 よろしいですか。

○飯専門委員 今のお話で思ったのですけれども、入れる直前の菌株は特許が出ていて、ここではキシラナーゼでこちらに出てきましたけれども、特許には確か別のもも書いてあったのですけれども、前の菌株というのがほかにも実際にこの会社で使われているのであれば、そういうのも安全性の評価の参考になるかなとは思ったのですけれども、どうなのでしょう。

○澤田座長 たしか前の2件がありましたね、厚労省時代の、あの菌株に使われている可能性があるかもしれないですね。

○飯専門委員 日本では出ていないようなものも含めて。

○山添委員 澤田先生、聞いていいですか。タンパクを比較するというお話なのですが、こういうふうに宿主株に入れたときに翻訳後の修飾とかが起きていて、同じもとのアミノ酸配列は似ていても翻訳後修飾で変わっているというような、それで、移動度だけで見ようというのはなかなか難しいという可能性はないのですか。

○澤田座長 このコウジ菌の場合、やってみないと何とも言えないのですが、いかがですか。

○中島専門委員 コウジ菌の場合はそんなに心配はないと思います。しかも、長年使われている菌株なので、もとの京都の蔵からとってこられた菌株を彼らはいろいろいじっていますけれども、この変化を見ている限り、この宿主に使っている株は基本的には安全なものだと認めて、私は安全性は担保できると考えます。

○澤田座長 中間体の株や、食経験があるかどうかはともかくとして、最低限、やっていただきたいことはサザンをやり直してやっていただくことと、それから、上清のタンパクを少なくともこの株と少し前の株で比較していただく。それで、そこら辺をやるよりもシークエンスをしたほうが早いとおっしゃるのだったら、やっていただいても構わない。

○児玉専門委員 今はそうになってしまうかもしれない。

○手島専門委員 例えば導入する前の菌と導入した菌のタンパクの比較をすとなつたときに、二次元電気泳動でやるとすると泳動による位置的なずれとかがあると、本当は 2D-DIGE（蛍光二次元電気泳動）でやってもらおうと、本当に一致しているのかどうかということがわかるのですが、そこまで求めていいのかどうかというのは。

○澤田座長 可能であれば 2D でやってくださいということで。

それでは、指摘事項 13 と 14 で、説明を先にお願ひします。

○北村課長補佐 続きまして、指摘事項の 13 の回答になります。回答書の 23 ページになります。こちらは第 7 の遺伝子組換え食品添加物に関する事項の 2 の組換え体の残存に関する事項に関するものですが、本添加物中に生産菌が残存していないことをドットブロットハイブリダイゼーション法を用いて確認の上、記載内容を改めることという指摘になってございます。

回答ですが、サザンブロットハイブリダイゼーションの結果を追加することによりまして、組換え体の DNA の残存がないことが示されております。検出限界値は 0.04 ng DNA/g ということです。

23 ページの下のほうに審議資料の修正がございまして、この酵素の濃縮液は申請資料 13 ページの SP578 の製造工程で示しましたステップ 5 の後の酵素液を濃縮したものであるということで、バッチは PPJ6867 というものでございまして、これは動物試験等毒性試験に用いているものと同じという説明がされてございます。

24 ページにまいりまして、(2) のところが今回、追加をしましたサザンブロットによりまして組換え体 DNA の確認の事項になります。酵素サンプルは先ほど申しました PPJ6867 の 10%溶液を用いておりまして、こちらは絶対量で 100 mg 相当になるということでございます。25 ページの図 29 がこの解析の結果になってございます。26 ページのほうが各レーンの説明になってございまして、レーン 18 が当該品のレーンになります。

続きまして、指摘の 14 になります。26 ページです。3 番の製剤化に由来する非有効成分の安全性に関する事項について、製剤化に由来する非有効成分のデータもしくは生産菌の作製に使用した宿主及び遺伝子の供与体の食経験及び利用経験等の観点から、非有効成分の安全性について回答の上、記載内容を改めることという指摘になってございます。

回答ですが、審議資料のほうが後半の小さい字のほうで修正がされてございまして、宿主の *A. oryzae* は発酵食品に広く存在する食経験のある菌であり、遺伝子の供与体のこれらの菌も長年、国内で販売実績のある食品用酵素の生産菌であるという説明がされてございます。もう一つの *Aspergillus nidulans* の説明につきましても、先ほど御説明、御審議いただきました指摘 9 の回答と同様の説明がされてございます。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、まず、指摘事項 13 で生産菌が残存していないことの確認、これは小関先生の御指摘でありましたけれども、いらっしゃいませんので、これは五十君先生が一番詳しいですね。

○五十君専門委員 これは約束どおり、ドットハイブリで確認したうえで、出ていないということで大丈夫だと思います。

○澤田座長 それでは、指摘事項の 14 で非有効成分の安全性でありまして、これは澁谷先生と五十君先生、澁谷先生は御欠席ですけれども、コメントをいただいております。

○北村課長補佐 それでは、再度、資料 2 のほうをお願いいたします。指摘事項 14 についてコメントを澁谷先生からいただいております。本製品の比較対照をどう考えるかとも関係する問題だと思いますが、宿主が食経験のある菌であることや、供与体に関しても使用経験がある点は、安全性を考える上で有利な点だと思いますというコメントをいただいております。

○澤田座長 五十君先生、追加でいかがでしょうか。

○五十君専門委員 一応、そこのところについてははっきり整理して記載していただいているので、このくらいでよろしいのではないかと思います。

○澤田座長 このあたりは、これから出てくるデータもちょっと関係していますので、また、もう一回、見直したほうがいい。

○五十君専門委員 多分、これは最終版にはならないと思いますのでそのときに確認できると思います。

○澤田座長 それでは、指摘事項 15、16 ですか、御説明を。

○北村課長補佐 それでは、回答書の 27 ページの指摘事項 15 にまいります。SP578 バッチ PPJ6867 に関する 13 週間ラット経口毒性試験（強制経口投与）について、脾臓重量、赤血球及び白血球数から、高投与群のラットにおいて貧血を起こしていることが考えられるが、毒性影響はないとした根拠について回答の上、記載内容を改めることという指摘になってございます。

こちらにつきましても、もともと添付されております添付資料 29、これは試験の報告書になりますけれども、こちらを引用して説明がされております。まず、脾臓重量につきましては、雌ラットの脾臓の顕微鏡観察において対照群を含むすべての群において、Grade 1 または Grade 2 の所見の髄外造血が観察されているということです。Table 1 に

その数が書かれてございますけれども、特に 3 と 4 に多く見られますが、髄外造血は実験動物によく見られることであり、発症や程度は個体差に影響されるという説明です。また、Table 1 の下になりますけれども、グループ 4 の脾臓重量が有意に高い値を示していますが、この群の髄外造血が対照群と比べ、偶発的に多く見られたため、毒性影響によるものではないと考えますという回答になってございます。

28 ページにまいりまして、血液学的検査に関する回答になりますけれども、指摘の赤血球、白血球のほかに平均細胞体積の増加及びリンパ球の減少が雌ラットで観察されたということでございまして、本検査を行った研究機関が蓄積してきた対照群のデータの数値幅、95%の範囲でございまして、と比較をしたものが Table 4 に記載がされてございます。これらのことから、今回の試験で投与群の値が対照群と比べて有意に異なっている、偶発的に起こり得る範囲でありまして、投与群が貧血等を起こしているとは考えにくいと考えられたという回答がされてございます。28 ページが回答になっていまして、29 ページが審議資料の修正になります。

最後の指摘の 16 になりますけれども、審議資料の最後に申請者としての本品目の安全性に関する結論を追記することという指摘になってございまして、30 ページの記載をしました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。

指摘事項 15 で、毒性試験で統計学的に有意なものが幾つか見られるということで、それが安全性に問題がないとした根拠を説明してくださいということでありますけれども、これは和久井先生、いかがでしょうか。

○和久井専門委員 この試験資料を 90 日間の反復経口投与試験として評価する根拠の説明を求めたのですが。回答としては、データ数値が、振れ幅の中に入っているとの記載です。しかし、試験結果では、雌だけに用量相関的な脾腫が記載されています。

実際、髄外造血が出ているのとの記載で、その程度について Grade をつけていますが、その標本等を見せていただきたいと思います。また、通常、髄外造血の増加時には、肝臓または腎臓等にヘモジデリン沈着があると考えます。さらに、網状赤血球の増加も想定される現象ですが、それに関するデータがありません。

2004 年に実施された試験報告書と記載されておりますが OECD のガイドライン 408 に準拠して実施したと明記されています。ガイドラインで 408 では、最終解剖時に骨髓組織も採材して、病理組織学的に検査することに成っております。しかし、本回答では、骨髓での造血細胞数の増加等についての記載も欠落しています。したがって、総合的にみて、この試験報告のみで安全性を担保はできないと考えます。

偶発的な変化に含まれるとの回答ですが、その根拠が明確ではありません。傾向として雌だけに異常値が出ています。Historical data のぶれの範囲が回答書に記載されていますが、この範囲に入っているのであれば、すべてオーケーなのだという考え方では、安全

性実験は成り立たないと考えます。何が起きていて、何が原因なのか説明していただきたいと考えます、本回答では説明不足であると思います。

○澤田座長 ありがとうございます。

偶発的ではないのですね、このデータを見ると明らかに雌で起きています。

○和久井専門委員 ですから、もう少し詳細に説明していただきたいのです。

○澤田座長 あと、傾向として白血球、赤血球が減少している傾向はかなり読み取れますし、何らかの変化が起きていることは確かかなと思います。それで、その説明をしてもらうわけですが、標本はとってあるのか、ないのか。

○和久井専門委員 GLP に準拠している実験ですから、無論、この試験を実施した研究機関には保管管理してあるはずですが。

○澤田座長 それで、もうちょっと説明と写真を見せてくれというお話がありましたけれども。

○北村課長補佐 すみません、事務局なのですが、申請者には写真がないか確認をしたのですが、ないという回答が来ています。

○和久井専門委員 無論、日本にはないと思います。これは 2004 年のデンマークですかで実施していますから、そこには保管してあるはずですが。そこにはきっと Bone marrow の標本もあるはずですから。

○三森委員 データを見せていただきましたが、偶発的な変化とは見なせないですね。それで、写真がないという言いわけではなく、これは GLP 試験ですので必ず標本は全て保管してありますので、撮影していただいて、その証拠写真を出してもらうべきです。どうしてもそれが困難ということであれば、ピアレビューというやり方もあると思います。第三者に再度病理組織学的に見ていただいて、本当にこれは偶発的なレベルの変化なのか、あるいは投与に関連した変化なのかを明確にさせていただかない限り、非常に灰色の状態だと思います。

先ほどからの御議論でも、組換え体から産生されるタンパクがどうなのかが見えないということであって、毒性専門家の立場からみますと、不純物が入っているのではないかと、別のものが何か入っているのではないかとという憶測をどうしてもしてしまいます。したがって、その辺のところの情報をもう少しいただかないと、この毒性試験だけで安全性が担保できると断言することは難しいのではないかと思います。

○澤田座長 ありがとうございます。

追加のデータを出してもらうのはいいと思うのですけれども、どこまで何を出していただければよろしいですか、あと。

○和久井専門委員 三森先生のほうからも御意見があったように、あくまでも Grade 1、2 と決めるのは、それぞれの基準はこの研究機関なりが決められていますから、もう一度、彼らに出しても同じ結果が返ってきてしまうと思います。したがって、できうればピアレビューを行っていただいて、クリアカットにしていただきたいと思います。本知見を偶

発的なものとして良いか否か、この回答では充分とはいえません。

○澤田座長 このデータ自身について、ピアレビューをだれかがやっていませんでしたか、向こうの海外では。

○北村課長補佐 すみません、やっているという情報はないです。

○澤田座長 ピアレビューしていただく……。

○三森委員 長期毒性試験の場合にはピアレビューをすると思いますが、こういう短期間の試験はほとんどしないと思います。13 週の毒性試験の場合は、用量依存的に髄外造血が増加するという事は考えにくいです。このようなデータを見ますと、貧血があると私たちは連想します。ですから、貧血傾向もみられているわけですので、何らかの影響があるのではないかと見なさざるを得ないと思います。否定している根拠が十分ではないということです。

○澤田座長 結論としまして、どこまでに。

○和久井専門委員 ですから、はっきり言って、どこまで要求するかというのが難しいのですよね。

○澤田座長 **Grade** のつけ方だけは知りたいと。

○和久井専門委員 それはそうですね。ですから、組織写真等なりを提出していただければ……。

○澤田座長 それとあと、造血組織も一応、情報をいただいたほうがよろしいですか。

○和久井専門委員 骨髄は規定ではとる臓器に入っています。網状赤血球までは検討していないと言われてしまえば、それまでになってしまうのですけれども、少なくとも諸臓器におけるヘモジデリン沈着について全く記載が無いので判断できません。だから……。

○澤田座長 よろしいですか。あと、気になる点は使ったサンプルの問題がありますね。ステップ 5 ですか。

○北村課長補佐 申請者の説明によりますと、申請資料の 13 ページのステップ 5 の粗ろ過のところのものを濃縮したものだという説明はしているのですけれども、ここもどのくらい濃縮したものですとか、そういった情報もないので、そこは追加で確認をしたいと思います。

○澤田座長 ステップ 5 を使うと菌体を除いていない可能性がある。

○児玉専門委員 あと、ステップ 5 だと多分、低分子もまだ結構入っているので、いろいろ考えられますよね。

○澤田座長 その辺りの影響が出てきている可能性はあると思うのですよね。それを念頭に考えると、参考資料ぐらいになる場合もあるかと。それとあと、問題だと思いましたがのは摂取量の計算がありまして、余りにも過大評価している摂取量の値になっているのですよね。だから、それも含めてもう一回、計算していただいて、それと、このラットへの投与量とのセーフティマージンがちゃんとあるかどうかともチェックしたいと思いますので、それは追加でもう一度、検討していただきたいと思います。

それからあと、よろしいですか。指摘事項 16 に関しましては、また、次に出てきたときに最終的に読んでいただいて直していただければよろしいかと思えます。

大分、指摘をいただきましたが、いただきました意見、確認事項を指摘事項案として取りまとめて先生方に御確認いただきたいと思えます。その際にまだこの件に関してはいろいろ問題がありますので、気づいた点がありましたら、追加で指摘していただければありがたいと思えます。その後、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えます。

○北村課長補佐 申し訳ありません、回答書の 30 ページ以降に修正事項等の記載もごさいます。その他、30 ページ、31 ページは調査会からの修正事項になりまして、それ以降のところは申請者自ら修正してきた部分になりまして、かなりの部分が修正されてきております。

○澤田座長 追加で何か気づいたことはありますでしょうか。ないようでしたら、また、もう一度、見直していただいて、後でコメントをいただければと思えます。

それでは、予想よりも早く終わります、次はコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統で、まず、食品でありますけれども、この審議を行いたいと思えます。これは昨年 7 月の専門調査会において審議を行い、指摘事項を出したものであります。

それでは、指摘事項に対する回答につきまして、事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、水色の紙ファイルで、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 に対する回答書をお願いいたします。

まず、1 ページになりますけれども、指摘事項 1 でございますが、概説書 22 ページの図 6 に関して、トウモロコシ Event5307 系統の●●●の掛け合わせ当代において、導入用プラスミドの外骨格領域が導入されていないことを確認し、概説書に記載することという指摘になってございます。

こちらの回答でございませけれども、外骨格領域が導入されていないことは既に確認がされていたのですけれども、要旨のほうには記載をしていなかったということでございませ。この補遺 24 のほうにレポートがございまして、●●●とその後代の●●●について外骨格領域の確認が行われてございませ。2 ページの図 1 が育成図になりまして、2 番目のところが●●●で、一番下のところが●●●になります。この二つについて外骨格領域の確認がされてございませ。

3 ページにまいりまして、こちらの 3 パラ目の二重線が引いてありますところが概説書の修正になりまして、読み上げますと、5307 トウモロコシに導入用プラスミド pSYN12274 の外骨格領域が導入されていないことを確認するため、ゲノム DNA を導入用プラスミド pSYN12274 の T-DNA 領域を切断する制限酵素で処理し、導入用プラスミド pSYN12274 の外骨格領域をプローブに用いた。その結果、どの個体からもバンドが検出されなかったことから、5307 トウモロコシに導入用プラスミド pSYN12274 の外骨格領域は、存在しないことが確認されたという説明がされてございませ。

以下、表 17、18、19 に要約がございまして、7 ページからの図 35、36、37 に各制限酵素で処理をしたサザンブロット分析の結果が示されてございます。

10 ページにまいりまして指摘の 2 になります。サザンブロット分析に関しまして、トウモロコシ Event5307 系統 (●●●世代) において、こちらは 2 ページの先ほどの育成図の一番下のものになります、遺伝的背景とは異なる内在性遺伝子由来のバンドが検出されており、育成図と齟齬が生じている。その理由を説明し、必要に応じて概説書に記載することという指摘になってございます。その指摘がございましたサザンブロット分析は、12 ページの図 2 に示されているものでございます。

サザンブロット分析を行った●●●の前の世代であります BC5F₃ は、●●●と 6 回戻し交配を行ったことから、遺伝的背景は●●●とほぼ同等と考えられますということです。これは 2 ページの図 1 をご覧いただきたいと思います。しかし、ZmUbiInt プロモーターをプローブとして用いたサザンブロット分析におきまして、これで検出されました内在性ポリユビキチン遺伝子のバンドは、形質転換の際に宿主として用いました●●●と交配親であります●●●由来でありまして、●●●由来ではないことが示されています。この理由としましては、●●●と●●●の内在性ポリユビキチン遺伝子が同一染色体上に存在しまして、形質転換の際にこの遺伝子が●●●の内在性ポリユビキチン遺伝子と同じ染色体上の近接した位置に挿入されたことによりまして、6 回戻し交配をしても●●●の配列が維持されたと考えられるということでございます。

下から 2 番目のパラグラフになりますけれども、BLASTN 検索を行ったところ、ポリユビキチンの内在性遺伝子はトウモロコシ 5 番染色体のポジションの 82,447,620 から 82,443,780 に位置していたということでございます。この位置でございますけれども、全長 220Mb の 5 番染色体上で約 8Mb と近接して存在しているということと、組換え率が小さいセントロメアに近い領域に位置していたということから、このようなことが起きたという説明がされてございます。11 ページには組換え率の説明がされてございます。

以上のことから、5307 トウモロコシの挿入遺伝子と内在性ポリユビキチン遺伝子は、比較的強く連鎖していると考えられ、その結果、形質転換の際に宿主として用いた●●●の内在性ポリユビキチン遺伝子は、6 回の戻し交配でも●●●の配列に置きかわることなく後代に維持され、●●●においても●●●由来の配列が維持されたものと考えられますという説明になってございます。

12 ページがサザンブロット分析の図になってございます。16 ページまでサザンブロットの図が示されてございます。それぞれの図の注釈に今の説明がつけ加えられてございます。

17 ページにまいりまして、指摘の 3 になります。eCry3.1Ab タンパク質の毒性について、ほ乳類細胞に対し選択毒性がないかをほ乳類細胞 (ヒト細胞が望ましい) を用いる試験等により確認を行い、概説書に記載することという指摘になってございます。

回答でございますけれども、*E. coli* 過剰発現系由来の eCry3.1Ab タンパク質をヒト由

来の Caco-2 細胞に処理をしまして、ニュートラルレッド取り込み量及び乳酸脱水素酵素活性の測定をしまして、そのレポートを提出したということでございます。

この試験につきましては、以前に審議していただきました MIR162 系統の mVip3A タンパク質で行った方法を参考にしたということでございます。試験方法は、18 ページの図のほうにまとめられてございますけれども、このタンパク質の濃度につきましては、培養液に完全に溶解する最高濃度は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であったことから、これを上限として試験が行われてございます。この濃度については引用文献 5 に Shimada らの文献がございますけれども、こちらで行われております CrylAb タンパク質で行いました細胞毒性試験における最大濃度の 25 倍に相当するということでございます。

NR 試験は 24 時間処理の影響を調べるため、LDH 試験は 2 時間処理の影響を調べるために行われてございます。NR 試験の流れ図が 19 ページにありますけれども、生細胞のみが NR を取り込むことに基づいた試験になりまして、吸光度から生存率が算出されています。19 ページにまいりまして、LDH 試験の流れが 20 ページの図 4 に示されております。この試験では、細胞膜に損傷を受けた細胞から流れ出しました LDH 量を蛍光として測定しまして、その値から細胞の損傷率が算出されてございます。試験はいずれも 2 回ずつ実施されておまして、どちらの試験においても Digitonin を陽性対照として用いまして、検出可能な試験系であることを確認してございます。

20 ページが試験結果のまとめになりますけれども、23 ページの図 7、図 8 に結果が示されてございまして、NR 試験が 23 ページの図 7 になりますけれども、タンパク質の処理濃度に依存した細胞の生存率の減少は観察されてございません。同様に、24 ページの図 8 になりますけれども、LDH 試験におきましても、タンパク質の処理濃度に依存をしました細胞の損傷率の増加は観察されてございません。

25 ページが考察になりますけれども、タンパク質の濃度については、eCry3.1Ab タンパク質 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) をヒト由来の Caco-2 細胞に処理して行ったということで、細胞への毒性影響は観察されてございません。したがって、このタンパク質がほ乳類細胞に対して細胞毒性を持つ可能性は、極めて低いと考えられましたということです。それに加えまして、加熱処理試験、人工胃液処理試験によりましても、これらの加工過程におけます加熱の影響、唾液その他の水分による希釈と胃液による消化の影響等を考慮すれば、現実にはヒトが暴露される eCry3.1Ab タンパク質の濃度は、非常に低くなるという説明がされてございまして、このトウモロコシから摂取します eCry3.1Ab タンパク質によって、毒性を受ける可能性は低いと考えられたということでございます。概説書の修正が 25 ページの下のほうの二重線にされております。

26 ページにまいりまして、指摘の 4 になります。こちらはアレルギー発生に関する事項の IgE 結合能に関する部分でございますけれども、 α -パルブアルブミン感受性患者の血清を用いましたイムノブロットの結果に関しまして、BSA サンプルにおいてバンドが検出されているということについて、その原因を説明してくださいという指摘になってご

ざいます。

回答としましては、 α -パルブアルブミン感受性患者の血清を用いましたイムノブロットにおいて、コントロールとして用いましたウシ血清アルブミンのサンプルで 2 本のバンド、66 kDa と 35 kDa ですけれども、これが検出されたということで、三つの可能性が考えられたので、それらについて検討がされてございます。その結果、用いました患者血清中に BSA に対する結合活性を持つ IgE 抗体が含まれていた可能性が最も高いと考えられたということでございまして、①から③について、検討がされてございます。

①が患者の血清中に BSA に対する結合活性を持つ IgE が含まれていた可能性ということで、下のほうにまいりまして、BSA が牛肉や牛乳のアレルギー反応に関連するアレルゲンの一つとして報告されているということと、この患者の血清は牛肉に対しても反応を示したということから、試験を行った方がこの可能性が高いという見解を示しているということでございます。

26 ページの下のほうの②になりますけれども、血清に含まれる抗体が非特異的にタンパク質に結合した可能性についてでございますけれども、陰性対照血清を用いたイムノブロットでは BSA を含めていずれのタンパク質とも反応を示さなかったことから、この試験に用いました血清に含まれる抗体が非特異的にタンパク質に結合した可能性は低いということです。

27 ページの③になりますけれども、交差反応性を示す可能性については、アレルゲン同士が類似した構造的特徴を有していることが交差反応を示すために重要だということで、アミノ酸配列の比較が行われてございます。こちらは 29 ページからの図 9 になります。その結果、 α -パルブアルブミンと BSA のアミノ酸配列の相同性は低かったということから、交差反応性を示す可能性は非常に低いということです。

以上のことから、この患者の血清中に BSA に関する結合活性を持つ IgE 抗体が含まれていたことが原因であるという可能性が最も高いという結論になってございます。

2 本のバンドにつきましては、66 kDa が BSA で、35 kDa のバンドは BSA の分解産物もしくは使用された BSA に含まれていた夾雑物である可能性があるという説明がされてございます。

33 ページからが修正事項になりまして、5 点ほど修正がされているところでございます。

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、指摘事項に対する回答でありますけれども、項目ごとに御意見をいただきたいと思っております。

それでは、まず、指摘事項の 1 番目で、導入用プラスミドの外骨格領域が導入されていないことを確認してくださいということで、これは鎌田先生の御指摘ですが。

○鎌田専門委員 この記載で十分だと思います。

○澤田座長 ありがとうございます。

○橋田専門委員 よろしいですか、すみません。今の指摘事項 1 について内容そのものについては全く異論はないのですが、図 35 からのタイトルが、多分、前のサザンのタイトルからずっと引きずられて、こういう形になっているかと思うのですが、外骨格領域をプローブに用いて行ったサザンに対して、複数世代における挿入遺伝子の安定性というタイトルはそぐわないのではないかと違和感を覚えました。いかがしたらよろしいかということでコメントさせていただきます。

○澤田座長 タイトルが外骨格がないことの証明なのですね。適切に変えたほうが良いということですね。ほかはよろしいでしょうか。

では、指摘事項 2 で、図 14~16 のサザンプロット分析において、内在性遺伝子由来のバンドが検出されていることについて、児玉先生の御指摘ですか。

○児玉専門委員 非常に適切な説明がされていて、きれいな説明だと思います。これでもよろしいかと思えます。

○澤田座長 ありがとうございます。よろしいですか。

それでは、指摘事項の 3 番目で、**eCry3.1Ab** タンパク質の細胞毒性について、これは澁谷先生の御指摘ですが、コメントをいただいておりますでしょうか。

○北村課長補佐 資料 2 をお願いいたします。澁谷先生から指摘事項 3 についてコメントをいただいております。回答について、ヒト由来の **Caco-2** 細胞を用いた毒性試験の結果、毒性を示唆する結果は得られていないことから、この回答でよいと思われまふということとです。**LDH** 活性を指標とした実験はかなり振れが認められますが、有意な毒性があるとは思われまふということとでございます。

○澤田座長 ほかの先生方はいかがでしょうか。確かに図 8 の **LDH** の振れは大きいかなと、もう一つ、別にやった実験はかなりきれいなデータなのですけれども、**LDH** は振れが大きいということで、ニュートラルレッドのほうはきれいに死んでいないということが示されておりますので、よろしいかなと思われまふけれども。それでは、指摘事項の 4 で、**BSA** のバンドが出てくることにつきまして、これは澁谷先生と橋田先生も御指摘ですが、あと、手島先生も後でありましたら。まず、橋田先生、よろしいでしょうか。

○橋田専門委員 本データ取得に際して利用されました患者血清の説明については、ここに書かれているとおりで納得いたしました。

○澤田座長 手島先生の前に澁谷先生からもコメントをいただいておりますが。

○北村課長補佐 澁谷先生のコメントを御紹介いたします。使用した抗血清が **BSA** またはその夾雑物と反応性を持っていた可能性が高いという説明で了解しました。本坑血清と **PMI** タンパク質が反応しないという点から、安全性上の問題はないと思われまふということとでございます。

○澤田座長 では、手島先生、追加で。

○手島専門委員 澁谷先生のコメントで私もよろしいかと思います。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、マイナーな修正事項がその後にありますけれども、もし、お気づきの点があれば、もし、後でまたありましたら、御指摘いただければと思います。

それでは、この申請書に関しましては、特に安全上の問題はないということですので、引き続きまして、評価書（案）の審議に入りたいと思います。事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、お配りしております資料 1 の 19 ページをお願いいたします。右上に②と書いてございますのがコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 の評価書（案）になります。

めくっていただきまして 24 ページをお願いいたします。こちらにつきまして、下線の部分は事前に先生方にお送りしていたものからの変更点となっております。

24 ページですが、まず、評価対象食品の概要になります。名称、性質、申請者、開発者については記載のとおりです。28 行目からでございますけれども、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307、以下「トウモロコシ Event5307」としますけれども、は *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* 遺伝子 (*mcry3A* 遺伝子) 及び *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子の塩基配列を基に作製したキメラ遺伝子である *cry3.1Ab* 遺伝子を導入して作出されており、eCry3.1Ab タンパク質を発現することで、コウチュウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。なお、Event5307 には選択マーカーとして、*E. coli* K-12 株のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子が導入されている。

37 行目からが食品健康影響評価になります。

比較対象として用いる宿主等の性質等に関する事項でございますけれども、1 番の (1) 宿主でございますけれども、宿主はトウモロコシのデント種でございます。(2) ですが、DNA 供与体の種名及び由来ですけれども、*ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体は *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* 及び *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* でありまして、*pmi* 遺伝子の供与体は *E. coli* K-12 株でございます。(3) *ecry3.1Ab* 遺伝子は eCry3.1Ab タンパク質を発現し、コウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示す。また、*pmi* 遺伝子はマンノースリン酸イソメラーゼを発現し、形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられた。いずれも導入用プラスミド pSYN12274 を用いてアグロバクテリウム法により宿主に導入した。

58 行目からが宿主の食経験に関する事項になってございます。

25 ページにまいりまして、3 番が宿主由来の食品の構成成分等に関する事項になりまして、(1) が主要栄養素等、(2) が毒性物質・栄養阻害物質の種類等になりまして記載のとおりです。

77 行目から 4 番で、食品としての利用方法及びその相違に関する事項になりまして、

(1) 収穫時期と貯蔵方法、(2) 摂取部位、(3) 摂取量、(4) 調理及び加工方法については、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらないという記載にしております。

94 行目からが比較対象でございますけれども、宿主と従来品種以外のものは比較対象としていないという記載にしております。

6 番が検討が必要とされる相違点になりますけれども、eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質を発現することが宿主との相違点である。

26 ページにまいりまして 103 行目からで、1~6 により、トウモロコシ Event5307 の安全性評価においては、既存トウモロコシとの比較が可能であると判断したという記載にしております。

第 2 になりまして、利用目的と利用方法ですけれども、コウチュウ目害虫の影響を受けずに成長することができるという事です。

第 3 が宿主に関する事項になりまして、宿主はトウモロコシのデント種です。2 の遺伝的先祖並びに育種開発の経緯は記載のとおりです。3 番の有害生理活性物質の生産に関する事項で、ヒトの健康に悪影響を与えるレベルの有害生理活性物質の産生は知られておりません。アレルギー誘発性でございますけれども、トウモロコシは主要なアレルギー誘発性食品とは考えられておりません。トウモロコシの LTP と呼ばれる分子量 9 kDa の膜輸送タンパク質及び 50 kDa のタンパク質がアレルゲンとして作用するのを示唆する報告があるという記載にしております。病原性の外来因子に関しましては、トウモロコシには各種の病害が知られておりますけれども、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られておりません。6 番が安全な摂取に関する事項で、27 ページまで記載のとおりになってございます。143 行目からが近縁の植物種で、ブタモロコシ及びトリプサカム属がありますが、野生種で食用にされることはなく、有害生理活性物質の報告もございません。

第 4、ベクターに関する事項ですけれども、導入用プラスミド pSYN12274 の構築にはプラスミド pNOV2114 が用いられております。性質に関する事項ですけれども、プラスミド pNOV2114 の塩基数、塩基配列は明らかになっております。(2) で切断地図も明らかになっております。(3) で既知の有害塩基配列は含まれてございません。(4) の薬剤耐性遺伝子ですけれども、*E. coli* 由来の *spec* 遺伝子が含まれておりますけれども、この遺伝子は宿主ゲノムには挿入されておられません。伝達性については伝達を可能とする塩基配列は含まれておりません。

第 5 でございますけれども、1 番で挿入 DNA の供与体に関しましては、(1) に記載のとおりになります。28 ページの (2) で安全性でございますけれども、*Bacillus thuringiensis* は、微生物農薬の基材として長期に利用されており、ヒトや動物に関する病原性は報告されていないということ、*E. coli* に関する説明を以下にございまして、ヒトや動物に対して病原性を持たないと考えられております。

191 行目からが遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項になりまして、(1) がクローニングもしくは合成方法に関する事項でございます。ecry3.1Ab 遺伝子は mcry3A

遺伝子及び *cry1Ab* 遺伝子をもとに作製されたキメラ遺伝子である。*mcry3A* 遺伝子は、標的害虫に対する抵抗性を高めるために、**Cry3A** タンパク質のN末端から 155～157 番目のバリン-セリン-セリンに相当する 3 個のアミノ酸配列が、カテプシン G プロテアーゼの認識配列でありますアラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニンの 4 個のアミノ酸となるように、塩基配列が改変されております。この遺伝子は、*mcry3A* 遺伝子のドメイン I 領域、ドメイン II 領域及びドメイン III の一部領域と *cry1Ab* 遺伝子のドメイン III 領域以降を融合することにより作製されてございます。*pmi* 遺伝子は、*E. coli* K-12 株からクローニングされました *manA* 遺伝子でございます。

(2) になりますけれども、挿入 DNA の塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかになっております。

(3) で挿入遺伝子の機能になりますけれども、*ecry3.1Ab* 遺伝子は、標的のコウチュウ目害虫に摂取されると、昆虫の中腸に作用しまして、中腸上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示すことが報告されてございます。既知の毒性タンパク質との構造相同性につきましては、NCBI データベースを用いて **blastp** 検索を行った結果、29 ページになりまして、*Bacillus thuringiensis* 由来の δ -エンドトキシン及びパラスポリンに分類されるタンパク質を除き、相同性のある既知の毒性タンパク質は見出されておられません。パラスポリンは *in vitro* でがん細胞に対して細胞死活性を持つが、ヒトやほ乳類に毒性を持つという報告はございません。また、**eCry3.1Ab** タンパク質の細胞毒性試験を行った結果、ヒト結腸がん由来の **Caco-2** 細胞に対する毒性は認められなかったということで、この下線部につきまして澁谷先生のほうから御指摘がありまして、追記してございます。

pmi 遺伝子でございますけれども、**PMI** タンパク質は、作出過程において形質転換体の選択マーカーとして用いられてございます。トウモロコシを含む多くの植物細胞は、マンノースを炭素源として利用して生育することはできないが、*pmi* 遺伝子の導入によって **PMI** タンパク質を産生し、マンノースを生育に利用可能なフルクトース-6-リン酸に変換することができることから、マンノースを培地に添加することによって、形質転換体の選抜が可能となります。毒性タンパク質との構造相同性につきましては、NCBI データベースを用いて **blastp** 検索を行ったところ、相同性のある既知の毒性タンパク質は見出されておられません。

抗生物質耐性マーカー遺伝子につきましては、*spec* 遺伝子が組み込まれておりますけれども、トウモロコシ **Event5307** には導入されていないことがサザンブロット分析によって確認されてございます。

3 番が挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現にかかわる領域に関する事項になりまして、(1) がプロモーター、(2) がターミネーター、(3) がその他になってございます。

30 ページにまいりまして、組み込み方法でございますけれども、プラスミド **pNOV2114** に *pmi* 遺伝子発現カセットを導入し、次いで *ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセットを導入することによりまして、導入用プラスミドが得られてございます。

構築された発現ベクターに関する事項になりますけれども、導入用プラスミドの塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかとなっております。オープンリーディングフレームについては、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームは含まれておりません。意図する領域でございますけれども、プラスミドの右側領域から左側領域までの T-DNA 領域でございます。純化については、ベクターの選抜及び増殖を通じて純化されております。表 1 に挿入 DNA の由来及び機能を表にしております。

31 ページにまいりまして、6 番の導入方法及び交配に関する事項になりますけれども、二つの発現カセットをアグロバクテリウム法を用いて宿主に導入し、マンノースを添加した培地で選抜して再生個体を得た。得られた個体について PCR 分析を行い、導入遺伝子の存在を確認した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、既存の優良トウモロコシ自殖系統との戻し交配あるいは自殖を行い、トウモロコシ Event5307 を得たという記載にしております。

第 6 が組換え体に関する事項で、1 の (1) コピー数及び挿入近傍配列の事項になります。このトウモロコシのゲノムに挿入されましたカセットのコピー数及び完全性を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、それぞれの遺伝子発現カセットが 1 コピー挿入されていることが確認されております。外骨格領域につきましてはサザンブロット分析を行った結果、外骨格領域は導入されていないことが確認されております。

塩基配列につきましては、塩基配列を決定して導入用プラスミドの T-DNA 領域と比較した結果、5' 末端側の 28 bp 及び 3' 末端側の 8 bp の欠損並びに CMP プロモーター上流の非翻訳領域の 1 カ所に塩基置換が確認された。近傍配列がトウモロコシ由来であることを確認するため、5' 末端近傍配列 (1,000 bp) 及び 3' 末端近傍配列 (1,000 bp) の塩基配列を決定し、宿主ゲノムと比較した結果、33 bp の欠失を除いて塩基配列が一致していたことから、近傍配列はトウモロコシゲノム由来であることが確認されております。

32 ページにまいりまして、内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5' 及び 3' 近傍配列について、公的に利用できるタンパク質データベース (NCBI データベース) を用いまして blastx 検索を行った結果、トウモロコシのタンパク質は見出されなかったことから、既存のトウモロコシ内在性遺伝子は損なわれていないと考えられたという記載にしております。

オープンリーディングフレームにつきましては、終止コドンから終止コドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF について分析をした結果、6 個の ORF が検出されました。検出された ORF について、NCBI データベースを用いて blastp 検索を行った結果、既知の毒性タンパク質やアレルゲンと相同性を示すものは見出されてございません。さらに、この ORF について、連続する 80 アミノ酸について 35% 以上の相同性を有する既知のアレルゲンは見出されてございません。抗原決定基につきましては連続する 8 アミノ酸の相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸が既知のアレルゲンと一致する配列は見出されてございません。

2 番で遺伝子産物の発現部位、発現時期、発現量になりますけれども、結果は 33 ページの表 2 になります。

33 ページになりまして、遺伝子産物が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項になりますけれども、日本人が一日に摂取しますトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量 0.5 g をすべてこのトウモロコシに置き換えて計算しましたところ、一日一人当たりのタンパク質摂取量に占める割合は、それぞれ 4.4×10^{-8} 及び 1.5×10^{-8} となりまして、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断されてございます。

アレルギー誘発性に関する事項になりますけれども、(1) 供与体につきましては、これまで細菌にアレルギー誘発性があるとは考えられていないという記載にしております。

(2) の遺伝子産物につきましては、アレルギー誘発性の報告はございません。

(3) でございますけれども、①の人工胃液に対する感受性で、eCry3.1Ab タンパク質につきましては、SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行いました結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内に完全長タンパク質は検出されなくなり、試験開始後 15 秒以降に見られた 4 kDa 及び 5 kDa のポリペプチド断片も、10 分以内に消化されることが確認されました。また、ウェスタンブロット分析においては、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認されたという記載にしております。PMI タンパク質につきましては、34 ページになりますけれども、SDS とウェスタンブロット法により分析を行いまして、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 1 分以内に完全長タンパク質は検出されなくなりまして、また、試験開始 1 分後に見られた 4 kDa のバンドも 5 分後には検出されなくなりました。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認されてございます。

人工腸液につきましては、eCry3.1Ab タンパク質は、SDS-PAGE では試験開始後 1 分以内に完全長タンパク質は検出されなくなりまして、ウェスタンブロット法におきましては、1 分以内に完全長のタンパク質は複数のポリペプチド断片に分解されまして、試験開始 48 時間後においても完全には消化されないことが確認されてございます。PMI タンパク質につきましては、速やかに消化されることが確認されてございます。

③番の加熱処理でございますけれども、ELISA 法により分析を行いまして、eCry3.1Ab タンパク質は、65°C、30 分間の加熱で、PMI タンパク質は、95°C、30 分間の加熱で、免疫反応性が失われることが確認されてございます。

アレルゲンとの構造相同性に関する事項になりますけれども、データベースの相同性検索の結果、80 残基以上のアミノ酸について、35%以上の相同性を有するアミノ酸配列は見い出されてございません。抗原決定基については、連続する 8 アミノ酸の相同性検索を行った結果、PMI タンパク質と既知アレルゲンでありますこちらの由来の α -パルブアルブミンと一致する配列が見出されてございます。eCry3.1Ab タンパク質については、8 連続アミノ酸との一致は見られておりません。

35 ページにまいりまして、(5) の IgE 結合能でございますけれども、IgE 結合能の検

討を行った結果、交差反応は認められなかったという記載にしております。

以上より、これらのタンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認したという記載にしております。

438 行目の 5 番になりますけれども、遺伝子の安定性につきましては、リアルタイム PCR 分析により期待分離比と実測値の比較を行いました結果、挿入遺伝子は、メンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝していることが確認されております。サザンブロット分析の結果につきましては、2 世代について共通のバンドが検出されまして、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認されております。

6 番の代謝経路への影響に関する事項になりますけれども、eCry3.1Ab タンパク質については酵素活性を持たず、宿主の代謝系と独立して機能していることから、宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられます。PMI タンパク質につきましては、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する酵素タンパク質でありまして特異的であり、他の天然基質は知られておりません。

7 番が宿主との差異に関する事項になります。(1) の主要構成成分につきましては、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められてございません。

(2) のミネラル類につきましては、36 ページにまいりまして、対照に用いました非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められてございません。(3) のビタミン類については、統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても、一般の商業トウモロコシ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内で行いました。アミノ酸組成については、有意差は認められてございません。脂肪酸組成については認められないか、認められた場合であっても、一般のトウモロコシ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内で行います。(6) の二次代謝産物と栄養阻害物質については、統計学的有意差は認められてございません。

8 番の諸外国における認可状況につきましては記載のとおりになりまして、FDA においては 2012 年 2 月に承認が得られております。

9 番の栽培方法、10 番の種子の製法・管理については、記載のとおりになります。

37 ページの第 7 になりますけれども、第 5 の 2 の (3) の安全性を確認するため、eCry3.1Ab タンパク質の細胞毒性試験の確認を行った。ヒト結腸がん由来の Caco-2 細胞に *E. coli* で発現させた eCry3.1Ab タンパク質を暴露し、ニュートラルレッド取り込み量及び乳酸脱水酵素活性を測定した。その結果、細胞に対する毒性は認められなかったという記載にしております。

Ⅲの食品健康影響評価結果でございますけれども、トウモロコシ Event5307 系統については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断したという記載にしております。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、ただいま御説明いただきました評価書（案）について、御意見、コメントを承りたいと思います。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。

それでは、評価書（案）の第 1 から第 4、ページで 24 から 27 にかけてコメント、御意見がございましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、次の第 5 で 27 から 31 ページで、この部分につきまして、コメント、御意見をお願いしたいと思います。よろしいですか。

それでは、第 6 から最後で 31 ページから 37 ページまで、コメント、御意見がありましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、特に修正はないようでありますけれども、もし細かい修正等がございましたら、また、事務局までお伝えいただきたいと思います。

それでは、細かい修正がもしあった場合、その修正をして食品安全委員会に報告いたしまして、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

どうもありがとうございました。

それでは、引き続きまして、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ **Event5307** 系統の飼料の安全性について審議を行いたいと思います。事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 では、恐れ入りますけれども、お手元に透明の薄いファイルをお願いいたします。

それでは、1 ページ目からお願いいたします。品目名等は食品と同様になります。特徴につきましては、先ほどと同様になりますけれども、コウチュウ目害虫に対しまして高い殺虫活性を示すということと、マンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子が導入されておまして、これが選択マーカーとして用いられるということで、これ以外は宿主のトウモロコシと相違はないということでございます。

使用方法につきましては、**eCry3.1Ab** タンパク質を産生することによります **Western corn rootworm** 及び **Northern corn rootworm**、**Mexican corn rootworm** に対する防除効果でありまして、飼料としての使用方法、利用方法は従来のトウモロコシと相違はございません。2 ページ目になります。トウモロコシの輸入量等が記載されてございまして、家畜別に 40～54%の割合で飼料に配合されてございまして、我が国で最も利用される飼料原料であるということでございます。

2 番の遺伝子組換え飼料としての安全性になりますけれども、評価基準に基づきまして①から③の説明がされてございます。5307 トウモロコシには、**eCry3.1Ab** タンパク質及び **PMI** タンパク質の産生性が付与されております。**eCry3.1Ab** タンパク質が産生されることによりまして、コウチュウ目害虫に対する防除作用を有することから、害虫抵抗性形質を付与されるというものに分類されまして、**PMI** タンパク質につきましては、ダイズを含む複数のマメ科植物等の植物種での存在が知られておまして、細菌等多くの生物において不可欠な酵素で、原核生物と真核生物に多く存在します。

また、*pmi* 遺伝子の供与体であります大腸菌は、自然界や動物の消化器官に広く存在しまして、家畜は飼料を通じて間接的に摂取されてございます。大腸菌 K-12 株の動物に対する毒性は知られておりませんで、また、一般的に挿入された遺伝子もしくは当該遺伝子によって産生されるタンパク質が肉、乳、卵等の畜産物中に移行するという報告はございません。以上のことから、①のみならず、②、③の可能性も考えにくいということから、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物には、通常、安全性上の新たな問題は生じないと考えるということです。

3 ページ目にまいりまして、以上のことから、5307 トウモロコシを飼料として家畜に給餌をしても、「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」の 3 の①～③の可能性は想定されず。当該飼料に由来する畜産物を摂取することにより、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性はないと考えるということでございます。

その他につきましては、食品と同様に、海外での申請の状況が記載されてございまして、FDA に対して申請が行われまして、2012 年 2 月に安全上の問題はないことが確認されたという記載になってございます。

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短いので、一括して御意見をいただきたいと思えます。大体、従来どおりの説明になっているかと思えますけれども、いかがでしょうか。

それでは、本件につきまして特に安全上の問題はないということでもありますので、引き続きまして、評価書（案）の審議のほうに入りたいと思えます。事務局のほうから評価書（案）の御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、資料 1 の 41 ページをお願いします。こちらがコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307（飼料）の評価書（案）になります。

44 ページをお願いいたします。評価対象飼料の概要になりまして、名称、性質、申請者、開発者については記載のとおりになります。

29 行目から 36 行目の概要につきましては、食品のものと同様の記載にしてございます。

38 行目からの食品健康影響評価でございます。

1 番ですが、トウモロコシ Event5307 は、コウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されたものである。なお、遺伝子組換え作物を飼料として用いた動物の飼養実験において、導入された遺伝子もしくは当該遺伝子によって産生されるタンパク質が畜産物に移行することはこれまで報告されていない。

44 行目、2 番ですけれども、トウモロコシ 5307 は、こちらは食品の評価が終わりまして日付と番号を入れさせていただきます、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき、食品としての安全性評価を終了しており、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断している。このため、eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質の安全性は既に評価されている。

上記 1 及び 2 を考慮したところ、トウモロコシ Event5307 に新たな有害物質は生成されず、有害物質が肉、乳、卵等の畜産物に移行することは考えられない。また、畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や遺伝子組換えに由来する成分が家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成されることは考えられない。

以上のことから、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統については、「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」に基づき評価した結果、改めて「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に準じて安全性評価を行う必要はなく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物について安全上の問題はないと判断したという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、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ければと思います。コメント、御意見はいかがでしょうか。

それでは、特に御意見はないようですので御了解いただいたということで、食品安全委員会のほうに報告いたしたいと思います。

それでは、議題（1）に関しましては、これで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 どうもありがとうございました。

本日の議題についてはこれで終了ということになります。

以上をもちまして、第 108 回遺伝子組換え食品等専門調査会を閉会いたします。

今日も活発な議論をありがとうございました。