

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## 第 1 1 1 回会合議事録

1. 日時 平成25年1月17日（木） 14：00～16：15

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

・ *Bacillus subtilis* DTS1451 (pHYT2G) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

・ ARG-No.3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、和久井専門委員

(食品安全委員会委員)

佐藤委員、山添委員

(事務局)

本郷事務局次長、磯部評価課長、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 食品健康影響評価に関する資料

① *Bacillus subtilis* DTS1451 (pHYT2G) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

② ARG-No.3株を利用して生産されたL-アルギニン

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、ただ今から第 111 回遺伝子組換え食品等専門調査会を開催したいと思います。

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」に基づいて非公開で行います。

本日の議題であります、新規の品目であります *Bacillus subtilis* DTS1451 (pHYT2G) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、それから ARG-No.3 株を利用して生産された L-アルギニン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いたします。事務局からお願いします。

○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、資料といたしまして食品健康影響評価に関する資料となっております。そのほかに、机上配布といたしまして、ARG-No.3 株を利用して生産された L-アルギニンの修正に関する資料をお配りしてございます。これら以外の参考資料につきましては、ファイルに綴じまして委員の皆様の方の机の上に置かせていただいております。本ファイルについては、調査会資料後回収させていただき、次回また配布いたします。

不足等ございましたら事務局までお知らせください。

○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関しまして、御報告をお願いします。

○北村課長補佐 本日の議事に関する専門委員の調査・審議等への参加に関する事項につきまし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いた確認書を確認したところ、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。

以上でございます。

○澤田座長 既に御提出いただいた確認書について、その後、変更等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、*Bacillus subtilis* DTS1451 (pHYT2G) を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼについての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 それでは、お手元に青い紙ファイルの資料をお願いいたします。

表紙をめくっていただきまして、まず「序」というところに、このグルカノトランスフェラーゼに関する概要の説明がございますので、こちらから簡単に御説明いたします。

この添加物は、デンプンからシクロデキストリンを製造するために使用される酵素でございます。シクロデキストリンは、図 1 のほうに化学構造が示されておりますように、

グルコースが 6、7、8 個から成る環状構造のものでございまして、中の空洞のところは疎水性、外側が親水性を示し、この空洞内にいろいろな分子を取り込む包接作用があるということで、食品に利用されてございます。

この申請のものは、グルコース 8 個の  $\gamma$ -シクロデキストリンを製造するために用いられるものでございます。図の下のところでございますけれども、今回のものは一番下の  $\gamma$ -CD を主生成物とするもので、 $\gamma$ -CDTase と呼ばれるものでございます。

次をめくっていただきまして、図 2 に CDTase によるデンプンからのシクロデキストリンの生成についての図が示されてございます。

3 ページにまいりまして、この添加物につきましては、中性 pH 領域での比活性の向上を目的として改良されたものでございます。●●●変異が入っておりまして、Table 1. にありますように、中性での比活性が向上してございます。ちなみに、アルカリ性の比活性も向上しております。

次に、概要書のほうの説明に入らせていただきます。

めくっていただきまして、概要書の 1 ページをお願いいたします。

まず第 1 に、比較対象として用いる添加物、宿主等、あと組換え体との相違の事項になります。

従来の添加物につきましては、(1) にございますように、CD アミラーゼ G という社内識別名のものでございまして、基原は *Bacillus clarkii* 7364 株でございます。有効成分はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼでございまして、こちらは既存添加物として既存添加物名簿に記載されているものでございます。そのほか、CAS 番号等は下記のとおりです。

(2) の製造方法は、図 1 のフロー図にございますものでございます。この菌株につきましては、製剤化工程で生産物より分離・除去されるということでございます。

(3) の用途でございますけれども、先ほどの概要で御説明しましたように、アミロースなどの  $\alpha$ -1,4-グルカンに作用しまして、 $\alpha$ -1,4 結合の切断、同一分子内の非還元末端の 4 位の OH 基の転移を行う分子内転移活性により、環状  $\alpha$ -1,4-グルカンであるシクロデキストリンを生成させる酵素でございます。先ほども同じ図がございましたけれども、2 ページの図 2 に図が示されてございます。このため、主にデンプンに作用させてシクロデキストリンの製造に用いられる酵素でございます。

3 ページにまいりまして、摂取量につきましては、シクロデキストリンをつくるときの加工助剤として用いられますけれども、●●●を経て除去されまして、最終製品の糖化品におきましては、ELISA 分析において 1 ppm 未満（検出限界未満）であることが確認されております。そのため、当該酵素をヒトが摂取する可能性は低いということでございます。

2 番の宿主及び導入 DNA でございますけれども、宿主は、*Bacillus subtilis* Marburg 168 株を起源とする ISW 1214 株から、中性プロテアーゼ遺伝子、アルカリ性プロテアー

ゼ遺伝子及びトリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子を欠失させました DTS 1451 株でございます。図 3 のとおり、この株が構築されてございます。

(2) になりますけれども、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの遺伝子の供与体は、*Bacillus clarkii* 7364 株でございます。

(3) の挿入 DNA の性質等につきましては、4 ページになりますけれども、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子は●●●変異、トリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子については●●●変異が導入されてございます。これをプラスミド pHY300PLK に導入することによって発現プラスミド pHYT2G を構築しまして、プロトプラスト法により宿主に導入され、プラスミド DNA として細胞内に保持されております。

食経験につきましては、*Bacillus subtilis* については自然界に広く分布しておりまして、一部が *Bacillus natto* として納豆の製造に用いられているということ。アミラーゼ、プロテアーゼ等の生産菌として用いられてきた実績がございます。

5 番の組換え添加物の性質及び用途等に関する資料になりますけれども、組換え体の製品名は CD アミラーゼ RV、これは社内識別名になります。有効成分は既存のものと同様になります。CAS 番号等も同様でございます。

(2) の製造方法になりますけれども、5 ページの図 4 に示されているとおりでございます。培養後、●●●によってこの菌株を除去しまして、CD アミラーゼ RV がつくられてございます。

5 ページの (3) でございますけれども、用途、使用形態は、従来の添加物 (CD アミラーゼ G) と同じでございます。

(4) の有効成分の性質等につきましては、野生型のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼと比べまして、中性及びアルカリ性 pH 領域の酵素比活性が改良されているということでございます。

6 番の相違点につきましては、(1) 添加物の相違点につきましては、アミノ酸が●●●置換されているということ、●●●アミノ酸が付加されているということと、中性、アルカリ性領域の比活性が改良されているということが相違点でございます。

6 ページにまいりまして、組換え体と宿主でございますけれども、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ産生能、トリプトファン tRNA 合成酵素産生能、テトラサイクリン耐性を有する点が宿主との相違点でございます。

第 2 の宿主に関する事項は記載のとおりになってございまして、*Bacillus subtilis* DTS 1451 株を宿主としまして、これはバイオセーフティーレベル 1 ということ、寄生性や定着性は知られていないということと、病原性の外来因子の存在を示唆する事実はないということと、近縁株につきましては、毒性物質の産生が知られております *B. cereus* や *B. anthracis* とは明確に区別されているということでございます。

第 3 のベクターに関する事項でございますけれども、発現プラスミドの構築には pHY300PLK プラスミドが使用されてございまして、このプラスミドは、pACYC177 と pAM $\alpha$

1 プラスミドを使用して構築されたものでございます。

塩基配列、塩基数は明らかになっておりまして、制限酵素切断地図も 7 ページの図 5 のとおり明らかとなっております。

(3) の既知の有害物質を含まないことに関する事項につきましては、pHY300PLK プラスミドに含まれております遺伝子については、有害性は知られておりませんで、このプラスミドに有害塩基配列は含まれないと考えられるということでございます。

薬剤耐性については、アンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子を含んでおりまして、*Bacillus subtilis* 中ではアンピシリン耐性遺伝子は発現しないということでございます。

伝達性があるという報告はなく、有するとは考えられないということです。

宿主依存性につきましては、*Bacillus* 属、*Escherichiac* 属、*Streptococcus* 属内で機能することが知られておりますが、それ以外の菌で機能することは知られていないということから、宿主依存性は高いと考えられるということでございます。

8 ページの第 4 になりますけれども、挿入 DNA に関する事項でございます。目的の遺伝子は *Bacillus clarkii* 7364 株由来でございます。そのほか、トリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子については、*Bacillus subtilis* ISW1214 株、プロモーター、シグナル配列は *Bacillus* sp. JAMB750 株、ターミネーターについては *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株由来ということでございます。

安全性につきましては、いずれもバイオセーフティーレベル 1 に該当するというところでございます。

クローニング等に関する事項になりますけれども、この目的のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子については、野生株の遺伝子から PCR 法によりクローニングしたものでございます。あと、中性領域での比活性を高めるために変異が導入されてございます。

トリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子につきましては、●●●変異が PCR 法により入れられてございます。

(2) で、塩基数、塩基配列と制限酵素による切断地図については明らかとなっております。

挿入遺伝子の機能になりますけれども、トリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子につきましては、宿主の DTS1451 株ではこれが欠失されておりますので、合成酵素産生能欠失を相補するというところでございます。

このシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子については、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを産生します。

9 ページにまいりまして、申請者といたしましては、この酵素は加工助剤が前提で、最終製品への混入は極めて少ないと考えられるということですが、評価基準等によりまして、アミノ酸の変異が伴っているような場合には、必要に応じてアレルギー等の有害

作用について検討するということが記載されておりますので、そのアレルギー誘発性について以下のように考察がされてございます。

摂取量については、実質的に摂取されないということと、ELISA 法による測定で検出限界未満、1 ppm 未満だったということでございます。

アレルギー誘発性に関することは、報告は知られておりません。

4) で、物理化学的処理に関する感受性に関する知見について述べられてございまして、①が人工胃液による酸処理、酵素処理になってございます。野生型と組換え型の人工胃液に対する消化性は同等であったということでございますが、11 ページにその結果が示されてございます。

まず、SDS-PAGE におきましては、30 秒後まで複数のバンドが見られましたけれども、1 分以上の処理によってこれらのバンドが消失してございます。

次の Western blot につきましては、15 秒で●●●のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼのバンドは消失してございまして、その後、複数のバンドが 30 秒後まで認められておりますが、1 分以上ではバンドが消失したということでございます。

②の人工腸液になりますけれども、12 ページに図が示されてございます。こちらにつきましては、SDS、Western blot とともに加熱処理 6 時間後においても変化がなかったということでございます。

10 ページになりまして、③の加熱処理でございます。こちらは、添付資料 7 になりますけれども、このシクロデキストリン含有糖化物の製造工程を鑑みまして、80℃～90℃、●●●の処理を行うということで、この条件を 80℃、●●●で試験を行ってございます。その結果、シクロデキストリン含有糖液の存在下におきましては、12 時間処理後では、●●●では 19%、●●●では 35%、シクロデキストリン含有糖液の非存在下では、12 時間処理後では 11%、14%であったということでございます。

5) の既知アレルゲンとの構造相同性になりますけれども、SDAP のデータベースを用いまして既知アレルゲンとの構造相同性を調べてございます。これは 80 アミノ酸残基を 1 セットとしまして相同性を検索してございます。その結果、こちらに記載がございまして 2 つのものと、35%以上の相同性が認められたということでございますが、この領域については、いずれも野生型のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼにも存在する配列だったということでございます。

連続する 8 アミノ酸残基以上の一致につきましては、既知アレルゲンと一致する連続 8 アミノ酸残基はなかったということでございます。

以上のことから、申請者としましては、35%以上で一致した領域は野生型にも存在する配列であるということから、組換え型のアレルギー誘発性が野生型より高まることは考えにくいということで結論されてございます。また、人工胃液により速やかに消化されるということから、アレルギー誘発性は極めて低いと判断されるとしてございます。

13 ページにまいりまして、挿入遺伝子、抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関する

領域になります。プロモーターにつきましては、*Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナナーゼ遺伝子上流に存在する領域でございます。

ターミネーターは、*Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株の  $\alpha$ -アガラーゼ遺伝子の下流に存在する領域になります。

そのほか、このグルカノトランスフェラーゼを菌体外に分泌させるために、*Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナナーゼのシグナル配列が用いられてございます。

4.のベクターへの組み込み方法につきましては、pHY300PLK プラスミドに、記載がございます制限酵素サイトにそれぞれの遺伝子が組み込まれてございます。

5.の発現ベクターにつきましては、この発現ベクターは pHYT2G でございますけれども、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。

(2) のオープンリーディングフレームに関する事項になりますけれども、90 塩基以上で構成される ORF を検索しております。その結果、こちらに記載がございます目的とする遺伝子のほかに、137 個のオープンリーディングフレームが認められてございます。これらのうち、発現プラスミドと挿入 DNA の接合部を含むオープンリーディングフレームが 19 個、含まないものが 118 個あったということです。接合部を含まないものについては、発現プラスミド、挿入 DNA については、相補配列を含めて転写物に有害性がないということから、当該オープンリーディングフレームが有害性を有する可能性は低いと推察されるということでございます。そのため、接合部を含む 19 個のオープンリーディングフレームについて相同性の検索を行ってございます。

14 ページにまいりまして、この相同性検索を行いましたところ、6 個のオープンリーディングフレームがコードするアミノ酸配列に、タンパク質と相同性を有する配列があったということでございます。しかし、接合部の領域を跨いで相同性を示す配列はないということでございます。

続いて、SDAP のデータベースを用いまして、こちらは既知のアレルギー誘発物質との相同性検索を行っております。80 アミノ酸を 1 セットとして、35%以上の相同性を示す配列はなかったということと、連続する 8 アミノ酸が一致する配列がなかったということでございます。

(3) の意図する挿入領域につきましては、プラスミド pHYT2G でございます。

純化に関する事項は、全て純化されたものであり、目的遺伝子以外の機能、由来が不明な遺伝子の混入はないということでございます。

挿入方法はプロトプラスト法でございまして、テトラサイクリンで選抜してございます。

7 番の抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項になりますけれども、プラスミド pHYT2G には、アンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子が存在してございます。アンピシリン耐性遺伝子については、*Bacillus subtilis* 中では発現しないということです。両遺伝子の有害性についての報告はございません。

(2) にまいりましてけれども、これらの耐性遺伝子の含有量につきましては、ドットハ

イブリダイゼーション法により測定をしましたところ、両遺伝子ともに  $10^0$  ppm オーダーで含まれていたということでございます。この製造工程におきましては、●●●膜ろ過により除菌がされてございますので、この生産菌より漏れ出しました遺伝子が検出されたものと考えられるということでございます。最終製品（シクロデキストリン含有糖化品）については、これらの耐性遺伝子の含有量は、ともに 0.01 ppm 未満（検出限界未満）であったということが確認されてございます。

遺伝子産物につきましては、テトラサイクリンについて ELISA 法で測定しましたところ、0.05 ppm 未満（検出限界未満）であったということでございます。アンピシリンにつきましては、発現しないということから測定は行ってございません。

15 ページでございますけれども、組換え体を用いて CD アミラーゼ RV を製造する際に、培地には抗生物質は使用しないということでございます。

第 5 の組換え体に関する事項になりますけれども、宿主と比べましてプラスミド pHYT2G が入ってございますので、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、トリプトファン tRNA 合成酵素、テトラサイクリン耐性が付与されているということでございます。これらの違いは、組換え体と宿主の非病原性、毒性、有害生理活性物質の非生産性に影響しないと考えられるということでございます。

2 番につきましては、挿入 DNA がプラスミドと同様ですので、先ほどの 13 ページのほうの説明と同様になるかと思えます。

第 6 にまいりますけれども、組換え体以外の製造原料及び製造機材に関する事項になります。

1 番で、発酵培地用原料、製剤化に用いる原料は、いずれも食品用酵素の製造に常用されているものでありまして、製造機材につきましても、従来から食品用酵素剤の製造に使用されているものであります。

2 番でございますけれども、製造原料につきましては、社内規格に基づいた調査を行いまして、食品衛生法を遵守していることを確認してございます。機材についても、酵素製造に長期間安全に用いられてきたものであるということでございます。

第 7 にまいりますけれども、CD アミラーゼ RV につきましては、諸外国において販売、使用された実績はございません。日本のみの使用を想定しているということでございます。

2 番の組換え体の残存に関する事項になります。16 ページにまいりまして、●●●膜ろ過によりまして除菌ろ過処理を実施するというので、組換え体の残存はないと考えられております。実際に残存試験をプレート培養法及び液体培養法により実施しましたところ、CD アミラーゼ RV 中に生産菌は認められなかったということでございます。

3 番になりますけれども、非有効成分につきましては、発酵培地の原料と組換え体の代謝産物が考えられますけれども、発酵培地原料については従来の食品用酵素に用いられてきた原料であるということと、宿主の起源であります ISW1214 株が有害生理活性物質を生産するという報告はないということで、この組換え体が有害生理活性物質を生産するこ

とは考えられないということでございます。

4 番の精製方法に関する事項になりますけれども、組換え体の培養液から●●●除菌等の工程を経て製造されまして、生産菌は存在しません。本製造は、従来の食品用酵素の製造に用いられてきた発酵培地用原料を用いまして、制御された発酵工程で行われておりまして、有害物質が混入するとは考えられないということでございます。

5 番の有害性が示唆される常成分の変動に関する事項でございますけれども、原料、製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものでございまして、有害物質が混入するとは考えられず、有効成分であるグルカノトランスフェラーゼの含有量の変動によりまして、有害性が示唆される常成分の変動があるとは考えられないということでございます。

第 8 ですけれども、第 2 から第 7 までによりまして安全性の知見が得られていると考えられ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賜りたいと思います。

まず、申請書の 1 ページから 8 ページの冒頭で、第 1、第 2、第 3、ベクターに関する事項までで御意見、コメントございましたらお願いしたいと思います。

○五十君専門委員 6 ページの第 2 宿主に関する事項のところですが、以前、*Bacillus subtilis* が出てきたときに、芽胞の形成能を欠損している株を使っていたことから、後の加熱条件とか菌を除く操作の参考になったので、できればこの株も、芽胞形成能があるかどうかの記載はしていただいたほうがいいと思います。

○澤田座長 それは調べて。

○五十君専門委員 多分、ほかには書いてなかったですね。特に芽胞形成能に関する欠損株だとか、そういう記載はなかったと思うので、恐らく芽胞をつくると思うのですけれども、その辺の情報をいただきたい。

○澤田座長 情報だけでよろしいですか。

○五十君専門委員 一応、●●●ろ過して除菌するという工程がありますので、情報として出していただければよろしいと思います。

○澤田座長 わかりました。

ほかは。

○児玉専門委員 3 ページの宿主のところですが、中性プロテアーゼとアルカリプロテアーゼとトリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子を除いた菌株を使っているのですが、どうやってつくっているのか見てみると、いずれも遺伝子導入による遺伝子破壊をやっている様子で、上 2 つは、参考文献を見ると、その後、遺伝子が抜けたのを選抜している様子ですが、最後のトリプトファンはそれをきちっと書いた参考文献がなくて、特許を調べてみて、特許に出てきたものでは抜いたようには書いてないのですね。クロラ

ムフェニコール耐性遺伝子を使って遺伝子破壊して、合成酵素遺伝子を破壊しているというふうにして、それを DTS1451 株にしたというふうに特許では書かれていますので、もしかすると宿主がそのまま、まだ導入遺伝子を保持しているかもしれないので、そこら辺、きちっと調べていただかないと、宿主がそもそも組換え体かもしれないということですので、そこを1つ明らかにしていただきたいと思います。

○澤田座長 クロラムフェニコールの遺伝子がそのまま挿入されている可能性が高いわけですね。

○児玉専門委員 特許上はそう読めるのですけれども。

○澤田座長 そうすると宿主を遡らないといけなくなりますので、書き換えないといけないということになります。

○児玉専門委員 そうなります。

○澤田座長 それから、プロテアーゼは一応デリーションだけという。

○児玉専門委員 遺伝子破壊した後、薬剤耐性遺伝子がなくなったのを選抜しているようなので、抜け落ちたものというふうに……。

○澤田座長 それはセルフというか、一応組換えの操作はしているのですけれども、相同組換えで欠失させているわけですね。

○児玉専門委員 そうですね。

○澤田座長 そうすると、宿主をどこにするかというのはちょっと問題になりまして、その操作で余分なものが入っていないことを確かめる必要があるかという問題が出てくると思うのですけれども。

○児玉専門委員 プロテアーゼのほうは、PCR で抜け落ちたのを確認したとしか書いてないので。

○澤田座長 参考文献の 3 はパブリックな文献なので、そこはまあよろしいということで、問題は tRNA の合成酵素遺伝子の破壊のときに余分なものが入っているかどうか確認していただいて、もし残っているのだったら、宿主を 1214 にする必要はあるということになりますか。

○児玉専門委員 1214、そうですね。

○澤田座長 ISW1214。よろしいですか。

○北村課長補佐 それは、余分なものが入っていないかというのは、どうやって確認をすればよろしいでしょうか。

○児玉専門委員 PCR でもいいですし。

○北村課長補佐 実験をして確認する。

○児玉専門委員 実験するしかないのではないかと思うのですけれども、特許を出しているのは別どこかの法人でしたので、そこから情報をもらって出してもらってでもいいですけれども。

○澤田座長 ほかに、よろしいでしょうか。

○五十君専門委員 今の件は、もしかしたら配列情報を全部持っている可能性もあります。それでもいいとは思うのですけれども。

○澤田座長 ほかにいかがでしょうか。

それでは、続きまして第 4 で、8 ページから 15 ページにかけまして御意見、コメントをよろしくお願ひします。

○宇理須専門委員 10 ページですけれども、この酵素は 35%という基準で引っかかっている点と、人工腸液でも引っかかっているわけですね。そういうことから、ただ、もとの野生型と配列が一緒だからいいだろうと、大丈夫だろうというふうに述べているわけですが、もとのものもアレルギー性を持っている可能性はあるわけですね。そういうことからすると、最後の「当該酵素のアレルギー誘発性は極めて低いと判断される。」というのは、もとのアレルギー性がある可能性があるわけですから、もとと一緒に可能性はあるわけですね。そういう意味では低いとは言えないのではないかとということと、もう一つ、●●●アミノ酸が変化しているわけですね。そういうことからすると、野生型とほぼ同じアレルギー性だろうという推測も、これもちょっと言い過ぎではないかなと。やはりアミノ酸の構造が変わると、一次構造が一緒の部分があるからといっても、その立体構造等が変わってくる可能性があるわけで、それによってアレルギー性も変わる可能性があるのですね。

そういう意味から、●●●アミノ酸が変わっていることからすると、もとの野生型とほぼ一緒だろうという推測も問題があるのではないかとということと、それから、もとと一緒にだというふうに仮にしたとしても、今言ったように、もとがアレルギー性を持っている可能性があるわけですから、低いとは言えないのではないかと。その 2 点、どう対応していいかが自分自身答えを持っていないのですけれども、この文章をそのまま残すのはまずいのではないかと思います。

○澤田座長 一応、アレルギー性自身は基準にのっとったことはやっているの、いいかなと思ふのですけれども、書きぶりとして正確に書くかという問題になるかなと思ひますけれども、その理解でよろしいでしょうか。手島先生。

○手島専門委員 これは、例えば種子植物の由来の組換え食品などの場合のアレルギー性の評価では、相同性のほうで引っかかってくるということで、そうしますと患者血清を用いる試験を行うみたいな形になるのですけれども、今回の場合は添加物ということで、実際上の最終産物の中にはほとんど残らないということがありますので、幾らかの相同性が 35%を超えているというところがあるのですが、書き方としては、懸念はあるという形の書き方にはなるかと思ふのですが、あとは最終産物の中に残存量が極めて少ないというところで、種子植物などの場合のアレルギー性とは違って、添加物であるということで認めてもいいのかなと思ふのです。

ただ、9 ページ目の 7 行目のところの ELISA による測定では、シクロデキストリンへの残存量は 1 ppm 未満というのが書いてあって、その結果が添付資料 2 についているの



うことに意味があるのではないかというふうに思いますけれども、先生がおっしゃったように、文献報告では当然誰も注目していなければ検討しませんですね。

○澤田座長 エピトープ解析では出てこないのですね。8アミノ酸の。

○宇理須専門委員 そのとおりですね。

○澤田座長 それで許容可能かどうかということかと思うのですけれども。

○飯専門委員 これは Taka-amylase と類似性があるということなのですから、ここで相同性があった Taka-amylase 自身がもう既に食品添加物ではないのかと思うので、そういうことも考慮する必要はあるかと思うのですが。これは先生方の御議論かと思えますけれども、類似性があるということでこれだけ特別扱いするというわけにもいかないかと、つまり Taka-amylase をどう扱ってきたかということも同時に考える必要があるのではないかと感じるのですが。どれだけ重要かどうかわからないところがあるのですが、今のところに関連して、添付資料 8 の 18 ページのところを見ますと、その終わりから 4 行ほど手前のところに、厚労省のほうから出ているハンドブックからの引用らしいのですけれども、特定原材料の中の総タンパク質量が数  $\mu\text{g/ml}$  の濃度レベルか、それに満たない場合はという記述があって、ここを読んだときに、この製剤の中の純度というのがどのぐらいなのかなというのがちょっと気になりまして。酵素活性あるいは酵素量については、ずっと追跡しているし、その量が少ないということはデータのにはある程度わかったのですが、トータルとして製剤中の純度が書かれていると、全体として、いろいろな面で計算や理解がしやすいかなと。もし情報を持っているのだったら教えていただけたらなと感じたところです。

○澤田座長 まず最初の問題、アレルギーの問題で。

○宇理須専門委員 先生おっしゃるように、Taka-amylase のほうは実際に使われているわけですが、もう一つ引っかかっているのですね。Shizophyllum という、これはエノキダケかなんかだと思うのですけれども、実際、アレルギーの分野で結構問題になっていまして、これの職業病の患者さんが結構出ているのですね。そういったようなことがあるので、後者のほうに関しては、そういった意味で注目されているアレルギーではあるのですね。

それからもう一つ、先ほど表示で数  $\mu\text{g/ml}$  だったら安全だという、それを根拠に書いていますけれども、これは余り使ってほしくないのですね。といいますのは、僕も表示のときにちょっと関係したのですけれども、この数値はあくまで行政的といいたまうか、便宜上決めた数値で、世界的には、アレルギーを感作する量とか誘発能、そういうのは量的な値というのは決められないということになっているのですね。ただ、これは日本でかなり勇気を持って出した数値なのですね。そういう意味で、これを根拠にして、その量より少ないから安全ですよというのは、言わないほうがいいのではないかと、使わないほうがいいのではないかとというふうに思います。

○澤田座長 問題を整理したいと思うのですけれども、まずこのデータ、出していただい

たデータから、さらに何かアレルゲン性に関して検討する必要があるかどうか。一応、エピトープの問題、35%でホモロジーがあるからアレルゲンであるという結論は直ぐには出ないということで、もし相手側の2つのアレルゲンのエピトープがよくわかっていて、それと同じだと非常に問題があるかなと思うのですけれども、今回はそこら辺がよくわからないのですけれども、いかがでしょうか。

○手島専門委員 アミラーゼのエピトープ、正確にはまだわかっていないかと思うのですが、1つは、これが35%以上のホモロジーはあるのですけれども、8残基の連続がないということなのですが、実際上のデータの中で、*Aspergillus oryzae* の Taka-amylase と今回の酵素を実際にアミノ酸を並べたデータというのがつけられていない。それと同じように、*Shizophyllum* の glucoamylase と今回の酵素のアミノ酸配列を上下に並べて比較したデータがついていないので、それをつけていただきたいと思います。どの残基が同じなのかというような形で、形はつけていただければと思います。

○澤田座長 それを御覧にならないと結論が出ないということですか。

○宇理須専門委員 ちょっと待ってください。僕は難しいと思っています。どうしてかといいますと、*Shizophyllum* ですか、これのエピトープが報告されていないと、結局はそれをやってもわからないし、先ほどの8つのエピトープ解析も、こういうもののエピトープが報告されていないと引っかかってこないわけですね。そういう意味では、このスタディからアレルゲン性は大丈夫だという結論を見出す十分なエビデンスはないので、少なくともこの文章の書きぶりは変えたほうがよいと思います。

そして、どうやってこの物質の安全性を担保するかということを考えてみると、最終産物に入っていないことが証明されることと、ほかの使用方法がないことが担保されれば、問題ないのではないかと思います。もし、これが実際ヒトの口にも入り得るような使われ方もするというのであれば、もう少しアレルゲン性の検査をすべきです。例えば、*Shizophyllum* というのは *Aspergillus* と同じように、allergic bronchopulmonary aspergillosis というような疾患に関係しているらしいのですけれども、そういう場合には IgE だけではなくて IgG も関係します。この疾患ならば、結構日本に患者さんはおられますので、血清は手に入るのではないかというふうには思います。

○澤田座長 既存の添加物でこの酵素自身が問題になったという報告はないわけですね。かなり使われていて。

○宇理須専門委員 そうですね。僕も調べてみましたけれども、文献上はないみたいですね。

○澤田座長 そこで●●●アミノ酸の変異があつて、それが新たなアレルゲンになるかどうかという、ならないという保証はない。

○宇理須専門委員 2つあると思ひまして、相同性があるということで、ひょっとすると、今まで報告はないのだけれども、アレルゲン性があるという可能性は当然ありますよね。それからもう一つは、アミノ酸が変異することによって、今まではその部分を患者さんが

認識していなかったかもしれないけれども、構造が変わることによって認識するようになるということもあると思います。そういう意味で、少なくとも「野生型より高まることは考えにくい」という文言と、それから「アレルギー誘発性は極めて低いと判断される」という、この2つの文言は、適していないのではないかというふうに思いました。

○澤田座長 文言を変えるのは簡単なのですけれども、追加でデータが必要かどうか。

○宇理須専門委員 手島先生がおっしゃるように、入っていないということが保証されればいいのではないかというふうに僕も思います。

○澤田座長 そうしますと、アレルギー性がないことは完全に否定はまだできない段階なので、量的な問題をクリアしてほしいと。

○宇理須専門委員 それか、血清で検討していただくということですね。

○澤田座長 それがだめだったら、最後は患者血清になりますね。

○宇理須専門委員 そうですね。

○澤田座長 そうしますと、先ほど手島先生がおっしゃった定量性の問題は、もうちょっときちんと見ていただく。

それからもう一つ、先生がおっしゃった純度の問題。

○飯専門委員 ついでということもあるのですけれども、純度がわかると考えやすくなるかと思ひまして。

○澤田座長 これはほぼ培養上清そのものですので、余りきれいでないことは間違いないですね。

○飯専門委員 逆に、最終産物の中のタンパク量すら検出できないぐらいにきれいであるのだったら、純度をかけたときにこのもののレベルはもっと下がるだろうみたいな意味です。今、検出限界以下といっても想像つかないレベルみたいなところもあったので、わかればいいなど、そういう意味なのですから。

○澤田座長 ほかの先生、御意見はよろしいですか。

そうしましたら、まずは残存量をきちんとしていただくと。それがクリアできない場合には次の、もうちょっと追加のデータが必要になるかもしれないということになるかと思ひます。

○鎌田専門委員 添加物のほうがよくわからないのですが、ここに書いてあるのは、少なくとも相同領域は野生型にもあったと、そのアレルギー性が明確でないからという議論をし出したときに、さて、既存の添加物は使用量が決められている、こういうふうに使いなさいと決められているのかどうかということになってしまおうと思うのですが、そこでも別にごく微量でなくても、ある程度の量が入っていても平気なものとして認められている、添加物はそういうものだとしたら、ここでごくごく微量しかないということをもって、いいとか悪いとかではなくなってしまうという、概念的にそういうことになってしまわないかと気にしているのですが。

○五十君専門委員 先ほど私が言いたかったのはまさにそのところで、今あるものを検

索にかけたときに同じ状況だった。そして、今までの使用実績から特にそういった報告がないというので、よろしいとするか。そして、この変異が入ったという部分が新たにアレルギー性をもつかどうかを評価する必要があるかどうかというところを確認したかったのですけれども。

○澤田座長 厳密にやり出すと難しいですね。本当の意味で否定するのは。

○手島専門委員 私もまだ、以前の評価書とかは完全には読んでいないのですが、*aspergillus* 由来の $\alpha$ -アミラーゼは、今、添加物として認められていましたですかね。その場合はある意味では、そもそもがアレルギー性があるということなのですが、その場合の評価はどのようにしたかというところはあるのですけれども、その際に、添加物だから量的に少ないからということで評価したとすれば、そのような形になるのですが、正確には捉え切れていないです。

○澤田座長 うろ覚えかもしれませんが、組換えのアミラーゼ自身はそんなに変わっていないものを組換えでつくった例だったようで。その場合は既存のものにアレルギー性が若干あっても、使っている経験があるのでよいという結論になったのかなと。今回、それにプラスアルファでアミノ酸が●●●変わっているところだけが引かかる点かなと。

○鎌田専門委員 これは添加物だけではなくて、前に耐熱性の $\alpha$ -アミラーゼとかいろいろなことをやってきて、意図的に変えたところがありますよね。そこで、少なくとも既存との比較、データベース等を使って引っかけられないものについて、さらにアレルギー性を検索する必要があるか、要するに検証する必要があるかというのは、私の記憶では過去には一度もやったことがないと思っていますのですが。だから今あるデータをもって安全性の評価をしていって、それで足りないから、アミノ酸を幾つか変えたから、では血清を使ってやったかという、そういう事例は過去にはなかったと思うのです。それをやると、データがないものについても何か考えなければいけなくなってしまうので、今の評価システムでは現実的にはできないかなというふうに思うのですが。

○澤田座長 難しい問題ですけれども、ほかに。

○澁谷専門委員 結局、もともとアレルギー性がもしかしたらあるとかというようなものときに、考え方としては、それはもう使われているからある意味ではしょうがない。ただ、数残基のアミノ酸を入れたときに、それが強くなったりすればこれは問題だという、考え方としてはそういうことだと思いのです。

ただ、これが評価できるかというところが難しく、やるとすれば、患者血清なんかで定量的に抗原性を見る、定量的に ELISA なんかでやっていけば、最終的にはできると思うのですけれども、問題は、あと全体の状況を見て、そこまでやる必要があるかどうかというところだと思いのです。そこが難しいですね。

○澤田座長 食品添加物の場合は、最終的に残る量が少ないから、食品と比べるとアレルギー性、アレルギー誘発性は低いだろうということで、従来は組換え食品並みの要求はしていなかったのです。だから、その並びで考えて、もし患者血清を使うデータを、そこ

まで要求するかどうかの判断になるかなという気がするのですけれども。

○五十君専門委員 今までの使用実績からいって、●●●アミノ酸を置換したときに、かなり大きく影響を受けるかどうかという意味で、直接食べるものではない添加物の場合、アミノ酸配列検索の段階で、もとのものよりも置換した部分に関係するようところがヒットしてきた場合は、やはりやってもらったほうがいいだろうと思います。もとのものに対して付加的に変異を入れたところが追加に引っかかってこなかったならば、いいのではないかと思うのですが、そういうわけにはいかないですか。

○宇理須専門委員 少なくともそのデータをきちんと示して、どこで 35%の云々というのが大事ですよ。

○五十君専門委員 ミューテーションを入れたところにプラスで出てきているかどうかというのを言っただけならば、今までの使用実績からそういう報告はないということだと思います。

○澤田座長 BLAST 検索の一致した領域のデータはないわけですね。

○五十君専門委員 そうなのです。それを出してもらえればそういう議論ができるのではないかと思います。

○澤田座長 では、それをまず出していただくということになりますか。

あと、1 ppm 以下という問題はどうでしょうか。

○手島専門委員 1 ppm 以下というのは、規定は特にしていなかったですね。なので、今の段階で 1 ppm にこだわらないで、どれくらい含有しているかというのを正確に出していただくということによろしいのかと思うのです。

○澤田座長 使った ELISA というのは、固相につけて、それを抗体で見るだけという ELISA ですね。

○手島専門委員 ちょっと定性的なニュアンスが強いのと思うのですが。

○澤田座長 加工助剤の問題は、最終的に残る量が問題にはなるのですけれども、一旦許可されると、ほかの使い道もありうるので、残存する可能性があるという、そういう前提で考えなければいけないというのが今までの考え方かと思います。前にいろいろ議論がそこら辺ありましたですね。今ここで結論がなかなか出しにくいと思うのですが。

そうしますと、相同性のデータをもう一回出していただいた後に考え直すということになりますか。

○北村課長補佐 ELISA の定量的な話については、その後でよろしいですか。

○手島専門委員 できたら検討してもらえればと思うのですけれども。

○澤田座長 35%のホモロジーの領域の中にアミノ酸置換があるかないか。

○手島専門委員 はい。ということもあると、実際の残存量がどれくらいかというのは並行して出していただければとは思いますが。

○宇理須専門委員 そのほうがいいと思います。1 ppm の根拠が、この方法ですと、ELISA の方法としては余りいい方法ではないと思いますので、手島先生がおっしゃった

ようなサンドイッチ ELISA とかインヒビション ELISA ですね。あるいは HPLC というのはどうなのでしょう。混入の度合いを見るという意味では、純度を見るという意味では。

○手島専門委員 タンパクだけを見るという意味で ELISA を使っていると思うのですけれども。

○宇理須専門委員 あるいは、さっきおっしゃったように、タンパクはほとんど含有していないというなら、それでよいかもしれないですね。

○手島専門委員 そうですね。タンパク含有量だけを見るということであれば、別のやり方ですかね。

○澁谷専門委員 あと、野生型とこの酵素の比較のところ、可能だったら、多分、CGTase は立体構造解析を終わっている酵素のような気がするので、そうすると、●●●アミノ酸変異を入れて、分子構造が大きく変化しなければ、表面構造が変わらなければ、新たなエピトープが出る可能性は減りますよね。だから、その辺の確認ができるなら、さっきのとあわせて、要するにもともと使っていた酵素から抗原性が大きく変化しないという根拠の一つになるかと思うので、もしできたら、できるところなら簡単にできるモデリングなので。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。

それでは、先にいきまして、15 ページから最後までで第 5、第 6、第 7、第 8 にかけて、コメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

よろしいでしょうか。

ほかに全般に御指摘、よろしいですか。

1 つ、わからなかった、情報が不足しているところがありまして、5 ページの図 4 の製造工程で、●●●と書いてありまして、この操作が一体何をやっているのかよくわからなかったもので、ついでに情報を追加していただければと思います。

それからもう 1 点は、ORF の検索で、全体をやらなくて接合部分だけやっているという問題があったのですけれども、これは、それでよろしいかどうかというのを御意見をいただきたいと思います。

○北村課長補佐 今、座長から御説明いただきましたのが申請書の 13 ページになります。13 ページの 5. の (2) のところで ORF を検索してございまして、14 ページの 3 行目のところに「接合部の領域を跨いだ相同性を示す配列は認められなかった」という結論がなされております。

○澁谷専門委員 図 4 の製造工程の●●●とか、そのところですね。それは添付 1 の 4 ページに●●●はかなり細かく書かれて、添付 1 の 4 ページの上のほうに。

○北村課長補佐 添付 1 が既存の添加物になりまして、添付 5 のほうが改良型の添加物の製造工程になりまして、添付 5 の 4 ページの下のほうに●●●の説明はあるのですけれども、これを読んで、どこが●●●でというのが事務局でよくわからなかったのですけ

れども。

○澤田座長 では、●●●原理がよくわからないのですけれども、一応ここに書いてあるので、これはよろしいかと思えます。

それからあと、ORF のほうの問題は、両端の組み込んだときの接合部分のところだけ ORF の相同性の検索の対象にしたと。途中は省きましたという、その理由は、余りにも ORF が多過ぎて手に負えないからではないかなと思ったのですけれども。

○山添委員 澤田先生、前のところに戻っていいですか。

○澤田座長 はい。

○山添委員 先ほどのアレルゲン性のところで、どこの部分が既存のものに関係しているアレルゲンとの問題かというので、添付 8 のところが、既存のアレルギー誘発物質とアミノ酸の配列を全領域にわたって何%、何%というのがずっと出ているリストが、添付 8 のところの 7 ページぐらいからずっと、14 ページまでであると思うのです。それで、最後の 18 ページにまとめがあって、17 ページの終わりから「考察」というところがあるのですが、18 ページの 1 行目のところで、「改良型 CGTase において一致度が 35%以上となった 80 個のアミノ酸配列セットは、いずれも野生型 CGTase にも存在していた」というふうに、つまりここで差がないということを記載しています。

それで、先ほどから問題になった Taka-amylase ともう一つの物質についてどういうことかというのは、それ以下のところで考察しているので、そこも見て判定をお願いできればと思います。

○澤田座長 もう一度、考察のページを教えてくださいませんか。

○山添委員 添付 8 の 17 ページの後半から、「4. 考察」というところに全部まとめがあります。

○澤田座長 ここ、よろしいですか。

○手島専門委員 はい。確かに、これは 80 個のアミノ酸を一つ一つずらして行って、80 残基ずらして行って、どこがヒットするかという形でやっているのですが、そのヒットする位置が、ワイルドタイプと今度のミュータントで同じ位置がヒットしたということなのですが、アミノ酸の配列を出していけばあれなのでしょうけれども、実際に上下で配列を合わせていただくと、よりわかりやすい。

○山添委員 手島先生のおっしゃるのはわかるのですけれども、35%以上の配列が、Fig. 2 というのは、15 ページが Taka-amylase の配列が出ているところで、次の●●●というのが 16 ページ以降に出ていると思うのですが、余りにもパーセンテージとして多いので、多分こういう表記の方法をしていると思うので、どのポイントであるかをスペシフィックに同定はされていないと思うのです。だからこういう方法をとって表記していると思うのです。

○鎌田専門委員 要するに完全一致は要らないので、あくまで 80 アミノ酸をざっと見て、オーバーオールで見たときに 35%と言っているのです、こいつとこいつがぴったり一致し

たというのが必ずしも連続していないので、多分表記ができない。

○山添委員　そうです。そういうことです。

○手島専門委員　●●●ですか、Fig. 5 に相当するような図を、上のほうのクエリを Taka-amylase にして、下のほうのアンサーという形、●●●と書いてある、この部分を今回の申請の酵素のアミノ酸で出していただくというような形と、もう一つワイルドタイプですか、3 つを並べていただければ、具体的にどこの……。長さが違うということになりますかね。長さが違うので合わないですかね。何となく図一枚になるとわかりやすいということなのですが、難しいですよ。

○飯専門委員　今の点に関して質問よろしいですか。添付資料 8 の 4 ページ目に図 1 というのがあって、●●●35%以上なのですけれども、基本的にそこにはミューテーションは入っていない領域だということがあったので、それでいいのかなという感じでスルーしていたところがあるのですが、アライメントというのは、こういう部分でもう一回アライメントを見たほうがいいのかという理解でよろしいですか。

○山添委員　手島先生、例えば●●●が一番高いですよ。そういうところの配列でいえば、14 ページの右のカラムの列のところに 46.25%という最高を示しているポイントがあるのです、一致度としては、●●●かそこら辺のところにありますね。●●●という、それが 4 ページのグラフの右のところでぴょんと上がっているところになるわけですね。だから、それは読めばその配列は出てくるわけですね。

○手島専門委員　そうですね。

○山添委員　ただ、それは今、御説明があったように、既存のものとの配列には違いはない場所であるということになっていると思うのです。

○澤田座長　じっくり読まないといけないですけども、●●●と●●●が 35%のところに入っていないければいいと、そういうことですか。

○山添委員　そういうことですね。

○松井技術参与　さっきの 5 ページからの数字を全部追ったんですけども、●●●と●●●をカバーするところでは 35%以下、それ以外のところでは 35%以上です。

○手島専門委員　確かに、4 ページの図の中でも 35%、変異があるところは 35%を超えないところという形ですね。そうすると……。

○澤田座長　4 ページの Fig. 1 からすると、●●●だけが 35%を超えているということで、一応 35%はクリアしたということがわかったようであります。そうしますと、領域をもう一回きちんと出し直す必要はないですか。

○五十君専門委員　ここに書いてあるようなことを書いてくれれば、いいような気がしませんが、すけれども。

○手島専門委員　それを本文の中に。

○五十君専門委員　そう、本文の中に。

○澤田座長　では結論としては、35%の問題はオーケーで、あと定量性は。

- 手島専門委員 定量性は、どれくらい残存するというのは出していただければと思うのですけれども、35%超えないという……。
- 澤田座長 もう一回見直しますか。ELISA のデータのところ。
- 手島専門委員 添付 2 です。
- 澤田座長 添付 2 の 7 ページ。
- 手島専門委員 Table 6 の b) のコントロールサンプルのアブソーバンスの値、統計処理はされていないという部分もあるのですけれども、コントロールサンプルが●●●でのアブソーバンスが●●●程度で、あとが、a) のほうでは、実際のサンプルの中で●●●ということがありますが、値的にはかなり近い値が出てきているということがありまして、できれば固相を抗原にしない形の ELISA のほうが正確な値になるかと思います。
- 澤田座長 このシロップが入っている状態で固相に吸着する方法は、余り正確でないことは間違いない。できればサンドイッチ ELISA のほうがより正確であることは確かです。それで、もしやらせるとすると、よい抗体がないとできない可能性はありますね。
- 手島専門委員 これはポリクローナル抗体でやっていることにはなると思うのですが、その抗体が使えれば、その抗体で挟み込みができれば、できる可能性はあると思うのです。
- 澤田座長 1 種類のポリクローナル抗体のサンドイッチ ELISA ということですね。
- 手島専門委員 はい。
- 澤田座長 あとは、例えば酵素活性をはかることも可能かなと思うのですけれども、感度が余りよくないですか。
- 手島専門委員 ちょっと私は……。
- 澤田座長 ほかの先生、いかがでしょうか。
- 澁谷専門委員 先ほどから、どれだけの量ならいいかというのは、多分、決定的にはならないところがあるので、サンドイッチのほうが確かに正確なので、サンドイッチでもしできるなら出していただいたほうがいいけれども、なければ問題だという話ともちょっと違うような気がします。
- 橘田専門委員 今の澁谷先生の御意見と同じかと思うのですけれども、最初に座長もおっしゃったように、一旦承認してしまえば、通してしまえば、どういう使い方をされるかわからないというところ、どれぐらいの残存量になるかということも明確ではないですし、また、添付資料 2 の 7 ページに、「精製不良等により、改良型 CGTase が最終製品に残存する可能性が考えられる」という記述もあって、その上で急性毒性等もやっているのです、そんなに厳密なものを求めることが必要かどうかということを感じたのですけれども、いかがでしょうか。
- 澤田座長 申請者が言いたいのは、●●●以下であるという結論ですね。それで、この ELISA で誤差を考えて、それが言えればそれでよしとしていいのかなという気が私もするのですけれども、確かに定量性は悪いのですけれども。ちょっと引っかかるのは、シロップで粘稠性のものを固相の ELISA で本当に正確には

かれるのかという、そこだけは懸念はあると思います。

○手島専門委員 サンドイッチ ELISA というか、できれば、可能であればという形で提案させていただければと思います。

それともう一つ、加熱のほうの実験も同じような形の ELISA の系なのですが、そういう意味で、固相のほうへの抗原を固定するというやり方が少し定量性に乏しいのではないかというようなところがありますので、可能であれば検討していただくという形では思います。

○澤田座長 そうしますと、指摘としましては、サンドイッチ ELISA は可能であればやってくださいと。そのとき残存量もありますけれども、加熱処理のデータもということになりますね。

○手島専門委員 残存量のほうで。

○宇理須専門委員 1 ついいですか。最終製品で一定の濃度になるように作れというのは無理だと思います。ただ今回、こういう方法で 1 ppm 未満と、言っているわけですが、その測定方法に問題があるわけですから、その方法で測定したデータを残してしまうのはまずいのではないか。もしもこの方法に問題があるなら、そこをやり直してもらうか、あるいはそれを載せないでほしいというような配慮をしたほうがいいのではないかと思います。

○澤田座長 残存量自身は載せないといけないのです。ガイドラインで求めていますので。

○澁谷専門委員 それは CD のときでしょう。これは酵素だから。残存量は。

○澤田座長 酵素のときに求めていますか。

○澁谷専門委員 多分、残存量を出さなければいけないというのは、こうやってつくったシクロデキストリンの審査のときは残存量が必要だけれども、ここでは酵素自体の評価をしているので、普通使われるときにどの程度残るかというのは、ある意味で参考データですよ。これは酵素自体の評価をしているから、添加物で、これで作ったシクロデキストリンなんかの評価のときは、不純物とかが必須なあれになるけれども、ちょっとそことは違うのではないですか。

○澤田座長 組換え体の残存は見ていますけれども、酵素自身は書いてないです。おっしゃるとおりです。

そうしますと、ELISA のデータ自身は全部除かなくてもいいのですけれども、評価書的には書く必要はない。ただ、普通、評価書には書いてありますね。

○北村課長補佐 今のお話ですけれども、前回御審議いただきました 6- $\alpha$ -グルカノトランスフェラーゼ等においては、摂取量のところで最終製品における含有量も記載はしております。

○手島専門委員 今のあれなのですが、やはり何らかの形で含有量を記録するとすると、添付資料 2 の ELISA の方法なのですが、Table 6. の方法の中で、この方法でいくとすれば、検量線とかを書いて、どの程度までは検出ができるということの検出限界と定量限界

というふうなところを示していただくということで、もし可能であればサンドイッチ ELISA をやっていただくということでいかがでしょうか。

○澤田座長 普通、定量の検出限界を求めるときは、ブランクの SD を求めて、その 3.3 $\sigma$  というのがよく用いる方法なのですけれども、要は 3 ページの摂取量のところの「1 ppm 未満（検出限界未満）」という表現がありますけれども、これが言えることを示してくださいと、そういうことでよろしいですか。

○手島専門委員 はい。

○澤田座長 ほかは、よろしいでしょうか。

○児玉専門委員 座長が先ほどおっしゃったベクターのほかの部分の ORF については、私も実は読んでいて気になったのですけれども、このプラスミドがこれまでに使われているのかどうかということがよくわからないので、使用実績がないのであれば、しんどくてもやらざるを得ないのではないかとは思ったのですけれども、どうでしょうか。

○澤田座長 宿主の問題ですか。

○児玉専門委員 プラスミドのほうですね。先ほど座長がおっしゃったように、プラスミドで接合部位は ORF を見えていますけれどもという。

○澤田座長 ORF の問題ですね。

○児玉専門委員 はい。

○鎌田専門委員 6 ページのところベクターの由来が出ていますが、実は安全性上の判断の根拠のものは何もなく、そこに pACYC177 プラスミド、pAM $\alpha$ 1 プラスミドを使用して構築されたとだけ書いてあって、これが安全な歴史の中にどうあるのかというのは、実は探してもどこにもないのです。

多分、*Bacillus* 系と *E. coli* 系で使ってきたものなのだろうとは思いますが、そこら辺も実は余り明確に書かれていないので、先ほど座長も言っていた、オープンリーディングフレームがありそうなものを無視するのかもしれないということとも関わっていて、オリジンがはっきりしていて、過去に安全な食経験があるということなどをどこかにきちんと明確に書いてくださるならば、そのことはいいのではないかと思うのですが、それが明確に書けないということであるならば、安全性は全て見ていただくのが本来であろうというふうには思います。

それから、ついでにもう一つ言うと、今回、この書き方は非常にまずいのですが、最終的にでき上がる生産物としてのタンパクの安全性はアレルギー性の中で見ているのですが、実はこれ、シグナルペプチドを入れているのですね。●●●を最初からつけているのです。最終産物には切れるからということで無視されているのですが、そこは書いてあるのかかわらず、ここの安全性についてはきちりと書かれていないという、ちょっと変な書き方になっていまして、ここの安全性についても一言何かを書いておいていただくのが本来ではないかというふうには思うのです。タンパクとしてはできるわけですから、そこまではきちっとしておいていただきたいとは思っています。

- 澤田座長 マンナナーゼでしたか、シグナルペプチドの由来は。
- 鎌田専門委員 そうですね。13 ページの (3) のところにあるように、マンナナーゼで ●●●アミノ酸残基というふうに書かれています。
- 澤田座長 これは食べている可能性はあるわけですね。
- 鎌田専門委員 かと思います。
- 澤田座長 *Bacillus* ですからね。そこは明記していただいて。  
それからあと、ORF は真ん中もやったほうがいいということ。
- 鎌田専門委員 プラスミドのオリジンがはっきりしていても食経験があるところからきているのだったら、そこまでは必要ないかわりに、オリジンをちゃんと書いておいてほしいと、そういうことだと思います。
- 五十君専門委員 今のですが、*Bacillus* と大腸菌のシャトルベクターなので、恐らく、もともとは *subtilis* のほうのネイティブなプラスミドに大腸菌の *ori* を含む一部が入っているとされますので、その辺を明らかにしてもらえれば判断ができると思いますので、全部やる必要はなくなってくると思います。
- 澤田座長 ベクターの ORF は省略できるかもしれないのですけれども、インサートのほうは。
- 五十君専門委員 インサートのほうはちょっと微妙です。
- 澤田座長 やったほうがいいと。
- 五十君専門委員 できればやっていただくということになります。
- 澤田座長 ほかに、よろしいでしょうか。  
何点か御指摘がありまして、これはもう一回見直さないといけないかなと思いますので、いただいた意見を指摘事項案として取りまとめまして、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。  
それでは、次の ARG-No.3 株を利用して生産された L-アルギニンについてに移りたいと思います。  
事務局から御説明をお願いします。
- 小倉係員 それでは、お手元に赤い紙ファイルをお願いいたします。  
資料本文のところをめくっていただきまして、1 ページからお願いいたします。  
品目名は、ARG-No.3 株を利用して生産された L-アルギニンでございます。  
1 ページ目に L-アルギニンの食品添加物としての概要がございます。L-アルギニンは、食品添加物公定書に収載された既存添加物に該当いたしまして、成分規格は以下のとおりでございます。  
L-アルギニンの製造方法の概要についてでございますが、L-アルギニン生産菌 ARG-No.3 株は、生産効率を高めることを目的に平成 17 年に安全性審査された No.3002 株を基に改変され、平成 21 年に安全性審査がなされた ARG-No.2 株をさらに改変した菌株でございます。

No.3002 株と ARG-No.2 株の作製方法の概略は、5 ページまで記載されております。これらは以前提出されたものと同じでございます。

5 ページをお願いいたします。

こちらの中段から ARG-No.3 株の作製方法でございます。親株は ARG-No.2 株を使用しておりまして、各遺伝子の組み込みにおいては、mini-Mu をベクターとして用いております。遺伝子上流へのプロモーター配列の挿入もしておりますが、こちらは相同組換えを利用しております。また、構築途中においては一時的にヘルパープラスミドを使用しておりますが、ARG-No.3 株ではヘルパープラスミドは除去されております。

(3) の挿入遺伝子にまいります。ARG-No.3 株構築において使用された遺伝子は、●●●●●遺伝子、●●●●●遺伝子、●●●●●遺伝子、●●●●●遺伝子でございます。こちらは、L-アルギニン生産菌において●●●●●を目的として導入されております。

ここで使用された遺伝子につきまして、由来などが記載されていないとの御指摘を飯専門委員よりいただきまして、申請者に確認したところ、机上に「ARG-No.3 株を利用して生産された L-アルギニン」の修正のお願い」という紙をお配りさせていただいておりますが、今回導入された遺伝子は、「*E. coli* H155 株より単離されたトランスポゾン Tn2555 に由来する遺伝子であり、いずれも有害性等は知られていない。また、*E. coli* H155 株についても有害性等の報告はない」とのことでございます。

戻っていただきまして、プロモーターでございますが、*E. coli* K-12 由来の DNA、*E. coli* を宿主とするバクテリオファージ由来の DNA より成るものがございます。これらの配列は、それ自身が有害な影響を及ぼす可能性が低いか、または生理活性を有さない配列であると考えられるとのことでございます。

そのほかの構築方法についてでございますが、申しわけありません。もう一度、机上配布させていただいた資料の (2) プロモーター配列挿入というところから説明させていただきます。表の●●●●●遺伝子の上流にプロモーター配列を挿入しております。

欠失でございますが、(3) 遺伝子欠失導入のところまいります。相同組換え法を用いて、表に記載されている 3 つの遺伝子を欠失しております。

構築方法については以上でございます。

申請資料の 10 ページまいります。アルギニンの製造方法でございます。図 1 にフロー図がございますが、発酵により得られた L-アルギニン発酵液から、●●●●●粗製工程、精製工程を経て高度に精製された L-アルギニンを得られるとのことでございます。

3. 申請品目と現行製品の品質の比較でございます。表として食品添加物公定書収載の規格分析結果が示されてございます。現行製品は No.3002 株を用いて製造された製品でございますが、こちらと申請品の品質は同等であると考えられるとのことでございます。

L-アルギニン製品の不純物プロファイル比較結果でございます。3 つの分析法、アミノ酸自動分析計、HPLC 2 モードで、申請品目と現行製品の不純物プロファイルの比較がされております。

まず、i) アミノ酸自動分析計による比較でございますが、表に示されているとおり、検出限界以上の不純物は申請品目中には観察されなかったということでございます。

ii) 不純物検出 HPLC-1 法による比較でございますが、親水性の不純物を検出することを目的といたしまして分析したところ、13 ページの上の表になりますが、ピーク 1 とピーク 3 については、比較した現行 3 ロットの結果の範囲内でございます。ピーク 2 については、真ん中の表にあるとおり、現行製品 6 ロットを加えて計 9 ロットとの比較を行ったところ、現行製品の最大値を超えるものではなかったということでございます。

なお、現行製品と申請品目の分析をした日付が違うことにより、同じピークに対する保持時間が若干異なっておりますけれども、同一のピークであることを再分析によって確認しております。

以上の結果より、検出限界以上の新規不純物は申請品目中には観察されず、また、検出された既存不純物量は現行製品の最大不純物量を超えるものではなかったと記載されております。

iii) 不純物検出 HPLC-2 法による比較でございますが、疎水性の不純物を検出することを目的としておりまして、表にあるとおり、検出限界以上の不純物は申請品目中に観察されませんでした。

以上の結果より、申請品目中に定量限界以上の新規不純物及び増加不純物は検出されず、現行製品と同等の品質であることが確認されたと記載されております。

最後に残存タンパク質分析結果でございますが、ドットブロット蛍光法により測定したところ、本申請品目中にはタンパク質は検出されないということを確認したとのことでございます。

以上の結果より、申請品目は、「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られるとのことでございます。

説明は以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして、2 つに分けて先生方から御意見をいただきたいと思っております。

まず最初に、申請書の 10 ページまでで、食品添加物としての概要と製造方法の概要、そこまででコメント、御意見ありましたらお願いいたします。

○五十君専門委員 10 ページ、単純なことなのですが、基本的には菌が残っていないことを担保する条件が図の下に書いてあるのですが、●●●だけというわけではなくて、●●●と書いてあるのですが、これは必ず●●●を入れないと効力がわからないので、●●●を入れていただきたいと思っております。

○澤田座長 これは●●●を入れていただきます。

ほかは、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 9 ページの目的のところですが、(1)、(2)とあって、導入と挿入なので、下は(3)まで項目がありますので、非常に細かいですが、目的としては欠失の一文も入れておいてほしいと思います。

○澤田座長 (3)の追加ですか。

○児玉専門委員 そうですね。

○澤田座長 ほかは、いかがでしょうか。

それでは、11 ページから最後までで御意見、コメント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、細かい記載整備以外には、特に安全上の問題の御指摘はないということであり、続きまして評価書案の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。

○小倉係員 お配りしております資料の右上に②と記載されている「遺伝子組換え食品等評価書 ARG-No.3 株を利用して生産された L-アルギニン」をお願いいたします。

20 ページをお願いいたします。

25 行目、I. 評価対象添加物の概要でございますが、名称、用途、申請者、開発者は記載のとおりでございます。

31 行目にまいります。本添加物は、L-アルギニンの生成効率を高めるため、*Escherichia coli* K-12 株由来の突然変異株を宿主といたしまして、L-アルギニンの生合成に関与する遺伝子の導入、糖資化に関与する遺伝子の導入、L-アルギニンの分解に関与する遺伝子の欠失及び生合成に関与する遺伝子の上流にプロモーター配列の導入を行った ARG-No.3 株を用いて発酵生産された L-アルギニンでございます。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おります。なお、ARG-No.3 株は、平成 21 年に安全性評価を終了した ARG-No.2 株を基に作製されたものでございます。

39 行目にまいりまして、ARG-No.3 株の宿主である *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 では優良工業製造規範が適用できる宿主微生物として認定されております。また、本株は抗生物質耐性マーカー遺伝子を有しません。

44 行目、II. 食品健康影響評価にまいります。

本添加物は、製造工程において結晶として高度に精製されておまして、食品添加物公定書規格の含量規格を満たしております。

49 行目、非有効成分ですが、タンパク質は検出限界未満でございます。食品添加物公定書規格の成分規格を満たしております。また、アミノ酸分析及び HPLC 法による分析の結果、従来の L-アルギニンに存在しない不純物は検出されず、また、その後、「従来品に」とございますが、こちら「従来品にも」と訂正をさせていただきます。従来品に

も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かったという結果から、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有意に増加しておらず、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記載させていただいております。

以上より、本添加物については、61 行目、「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記載させていただいております。

最後に、したがって、「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」（本則）による評価は必要ないと判断したとさせていただいております。

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、全体を通じまして御意見、コメントを賜りたいと思います。

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っております。

それでは、全体を通じましてコメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

よろしいでしょうか。

それでは、問題がないようでありますので、先ほど 1 字追加ですか、それをしたものを食品安全委員会に御報告しまして、パブリックコメント等の手続に入りたいと思っております。

それでは、議題（1）につきましてはこれで終わりにいたします。

議題（2）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 特にございませぬ。

○澤田座長 ありがとうございます。

以上をもちまして、第 111 回遺伝子組換え食品等専門調査会を閉会いたします。

今日も熱心な御討論、ありがとうございました。