

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第136回会合議事録

1. 日時 平成27年3月20日（金） 10:00～11:34

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* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼ

・ NZYM-RO株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、岡田専門委員、小関専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、
近藤専門委員、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)

佐藤委員、山添委員、

(事務局)

東條事務局次長、山本評価第二課長、池田評価情報分析官、北村課長補佐、勝田係員、
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 *Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼ

② NZYM-RO株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ

参考資料 安全性評価に係る指摘事項

・ *Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼ

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136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、宇理須専門委員が御欠席です。

今日の議題でありますけれども、継続の品目であります *Aspergillus oryzae* NZYM-SP 株を利用して生産されたアスパラギナーゼ。新規の品目であります NZYM-RO 株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼ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たいと思います。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「食品健康影響評価に関する資料」。

参考資料として、アスパラギナーゼの安全性評価に係る指摘事項等についてとなっております。

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。本ファイルについては調査会終了後、回収させていただきます、次回にまた配布いたします。

不足等がございましたら、事務局までお知らせください。

また、本日は1月の調査会で「遺伝子組換え食品等専門調査会の申請企業者の参加について」を御了承いただきましたことから、本日の審議品目の申請企業でありますノボザイムズジャパン株式会社をお呼びしております。新規品目であります 6- α -グルカノトランスフェラーゼの審議の際に質疑応答に対応していただくことを予定してございますので、よろしく願いいたします。

○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きまして、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(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ております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。

○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、*Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼについての審議を行いたいと思います。この品目は昨年11月の専門調査会におきまして審議をいたしまして、指摘事項が出されていたものであります。事務局から御説明をお願いします。

○勝田係員 それでは、申請者から提出されている回答書について御説明いたします。お手元に*Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼの赤いプラスチックファイルをよろしくお願ひいたします。

指摘事項は全部で5つ出されております。

まず、回答書の1ページ目をお願いします。指摘事項1は、本品目の宿主である*Aspergillus oryzae* BECh2株の作製フロー図において、本株がアフラトキシン非産生であることも考慮した上で説明を追加する、といった内容です。

回答といたしまして、当該フロー図に欠失及び突然変異の方法を追記し、BECh2株がアフラトキシン非産生性である旨を記載しております。

次に、回答書の2ページ目をお願いします。指摘事項2は、分子量の項目で引用している添付資料で確認された高分子のブロードなバンドについて、適切な対照を置いた上で再度試験を行い、当該バンド及び試験に用いた抗体について説明を追加すること、といった内容です。

回答といたしまして、適切な対照を用いた上で分析を行ったところ、得られた結果からAoASP製剤中のタンパク質は全てNZYM-SP株由来であること、また、高分子のブロードなバンドについてはAoASPの●●●であると考えられる、と考察しております。

回答書の3ページ目をお願いします。指摘事項3は、*Aspergillus oryzae*のアレルギー誘発性について再度考察を行うとともに、宿主ではTAKAアミラーゼ遺伝子の欠失がされていることも考慮し、安全性について考察すること、といった内容です。

回答といたしまして、指摘を受けて再度文献を精査の上、記載を修正した上で安全性に係る考察を修正しております。具体的な修正後の記載については、4・5ページ目を御参照いただければ幸いです。

回答書の5ページ目をお願いします。指摘事項4は、人工胃腸液を用いた消化性試験において、より小さい分画まで検出するよう再分析を行うとともに、その結果を受けて再度考察を行うこと、といった内容です。

回答といたしまして、人工胃液における消化性試験を最小分画2,000 Daまで再度実施しております。その結果、AoASP製剤は●●●及び●●●として存在するものの、いずれも2,000 Da以下と十分小さい分子量まで分解されているため問題ないと記載されております。

最後に6ページ目をお願いします。指摘事項5は、ORF検索について、終止コドンから終止コドンまでの30アミノ酸以上と定義した上で再度検索を行うこと、といった内容です。

回答といたしまして、指摘を受けて当該条件でORF検索を再度行うとともに、あわせて

第4-5-(2)の目的外ORFの検索においても同様の検索を再度行った上、記載を修正しております。詳細につきましては、6ページ後半から11ページまでをご覧くださいと思います。

その他の修正事項については、回答書の12ページ以降を御参照ください。

説明は以上になります。

○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につきまして、項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思います。

まず、指摘事項1で、BECh2株の作製のフロー図におきまして、本株がアフラトキシン非産生であることも考慮した上で説明を追加することということで、これは小関先生と中島先生からコメントをいただいたと思います。

○中島専門委員 この程度の説明をしていただければ何をやったかがわかりますし、アフラトキシンの心配がないということもこれでわかりますので、よろしいかと思います。

○小関専門委員 結局これは野生株に対して、*TAKA*と*alpA*と*NpI*についてベクターを用いた、いわゆる組換えをやっているのですね。これはいわゆるセルフクローニングだということは、きちんと要旨の中に書いておいてもらったほうがいいと思います。BECh2自身は食経験はないですね。そうすると、組換えの経緯としては*TAKA*からスタートして、*TAKA*、*alpA*、*NpI*についてはセルフクローニングであることを確認されたかということと、それによって生じたBECh2については食経験があるかないかについては明記をしておいてもらったほうがいいと思います。

○澤田座長 多分この次のものも似たような話があるのですけれども。このBECh2に関しましては、たしか他の添加物で宿主として使った事例があり、そのときに宿主としていいかどうかを議論した経緯があったと思いますので、そこを確認して。

○北村課長補佐 概要がこの回答の後ろについております。そちらの8ページに表2がございまして、BECh2株の利用経験については表2の後半に記載がございます。

○小関専門委員 問題にしているのは、米国ではやられているけれども、日本の法律論上は今まで使われていないという、告示前のときにきちんとそここのところも確認しているということを明記しておかないと非常にまずいということになると思います。

○澤田座長 日本で初めてかどうか確認してください。それとセルフナチュラルだから許される旨もどこかに書いておいたほうがいいと思います。ほかはよろしいでしょうか。

それでは、指摘事項2で、これは分子量が大きめのところにブロードなバンドがあるということで、再度試験を行って説明を追加することということで、これは橋田先生と児玉先生からコメントをいただいておりますけれども、いかがでしょうか。

○橋田専門委員 この高分子のものが何であるのかの説明がなかったので説明を求めたのですけれども、これが●●●であるという話のようです。しかし、参考資料を拝見しましたら、確かに●●●のものでは●●●をつくるということが書いてあるのですが、●●●

をつくっているのですでしたら、このSDS-PAGEの条件だったら、サブユニットに分かれるのではないかと思うので、これはどういうものとして理解したらいいのか、この説明だけではわからないので、もう少し詳しく説明していただければと思います。

○澤田座長 児玉先生、いかがですか。

○児玉専門委員 遺伝子を導入する前の株では上清に出て来なくて、遺伝子を入れた後に出てくるということなので、導入した遺伝子に由来するものだとは思いますが、前回の添付資料を拝見すると、グルコシダーゼで糖鎖を切ると●●●のほうはきれいに分子量が下がって一本に見えてくるのですが、●●●のほうはほとんど影響を受けない。●●●と言っているこの部分については処理をしても全く影響を受けていないので、単純に●●●と言われて、はい、そうですかという感じで納得するのは難しいかなと、今、思っているところではあります。もうちょっと説明が欲しいかなと考えています。

○澤田座長 ●●●が濃く染まるのは、●●●になると抗体が反応しやすくなって、より濃く染まることはよくあることなのですが、むしろバンドがかなりブロードというほうが気にならないでしょうか。

○児玉専門委員 もともとブロードに関しては、糖鎖がくっついているからということで説明されているのですが、●●●の部分について糖鎖がついているとすると、データの不都合といいますか、合わないところが出てくるかなと感じます。単純に●●●ですと言っていて、はい、そうです、というのは、なかなか難しいかなという感じは受けます。

○澤田座長 追加で説明をいただくのはよろしいのですが、どの辺を。

○小関専門委員 今、問題にされているのはSDS-PAGEであれば、普通にアグったようなもので外れやすいものだったら、分かれて下に落ちるはずだという話ですね。これがコバレントにくっついたものでないということ。もしも完全にくっついているのであるとすると、アミノ酸配列が乱れている可能性がある。だから、そのところの解釈というか、説明をしてくださいということですね。そういうふうにタンデムにつながるなり、あるいは反対方向につながるなり、そうなったときに、突き詰めて言えば、そこに出てくる要するに結合部位のアミノ酸配列にアレルゲン性がないということの担保が欲しいということではないですか。より厳しい言い方をすれば、これは予期せぬトランスクリプトではないですね、ということを確認しないと、そこから先に進めないということですね。

○澤田座長 これは後で質問してみますか。

○松井技術参与 やはりすごく気になって最終的にどう考えたかと言いますと、6ページのSDS-PAGE、人工胃腸液のところなのですが、ここで高分子の●●●が一応見えていて、それが胃液処理でなくなったということで、どうにか結論が出るかなとは考えました。

○橋田専門委員 これはSDS-PAGEですよ。ウェスタンは。

○松井技術参与 SDS-PAGEでは、一応、バンドが出ていて、ここではウェスタンをやっていないということです。

○橋田専門委員 ウェスタンのデータは拝見したいですね。

○児玉専門委員 この正体を突き止めるのは、実験的に言うと難易度が高いかもしれないので、量的にはかなり少ないと思われるということもありますので、確かに今の6ページの分解されます、というところにおいて、もともと量的に少ないものからスタートしたものが本当にあるのかどうかということも気になりますので、その6ページのSDS-PAGEのところと相当するもののウェスタンを出してもらって、抗体に反応するものは全部きれいになっていきますよということで安全性を担保したということにするのが、現実的なところではないかと思えます。

○澤田座長 それでは、次の人工胃液の問題もありますけれども、その点を念頭にデータを出していただく方向で一応考えたいと思えます。

それでは、指摘事項3でアレルギー誘発性について考察を行うということと、TAKAアミラーゼ遺伝子が欠失されていることも考慮して、安全性について、さらに考察を行うということで、宇理須先生は御欠席ですが、特にコメントはいただいてないですか。

○北村課長補佐 申しわけございません。コメントはいただいておりません。

○澤田座長 手島先生、何かコメントはございますか。

○手島専門委員 たしか宇理須先生の前コメントは、論文で経口摂取によって惹起されるということのコメントを書かれていなかった部分があったということで、その部分を記入してくださいということが一つだったのですけれども、それは5番と7番の論文に関して症状が起きることがあるということが書かれていまして、その部分は書き直されていると思えます。

あとは5ページ目のほうになるのですけれども、これに関しましてはアレルギー性があると指定されているのは α -アミラーゼだけで、この株におきましては α -アミラーゼは欠失しているということで、*Aspergillus oryzae*によるアレルギー誘発の可能性は低いと考えられるという結論に持ってきていますので、この訂正でよろしいかと思えます。

○澤田座長 私もTAKAアミラーゼが欠失していることを書いてくれるようコメントをした覚えがありますけれども、それは書かれているので、よろしいかなと思えます。

それでは、指摘事項4で人工胃液の消化性につきまして、もうちょっと低分子量まで見られるように分析を行って再度考察を行ってくださいということで、これは小関先生のコメントですが、いかがでしょうか。

○小関専門委員 その前のところのお話で、確かに低分子量のところはやられているのでよろしいかとは思いますが、この前の議論にあったように、これのウェスタンはやはりお願いしますということで追加をしていただいたほうがいいと思えます。

○澤田座長 ありがとうございます。ほかに追加でよろしいでしょうか。

それでは、指摘事項5で、ORFの検索で終止コドン、終止コドンで30アミノ酸以上と定義して検索をやり直してほしいということで、これは飯先生からのコメントです。

○飯専門委員 手続的な面が強いですけれども、一応この記載でよろしいかと思えます。

○澤田座長 これは私も似たようなことを言った覚えがありますけれども、記載自身はこ

のままでよろしいかと思えます。ただ、結核菌のタンパクとか何か、安全性の報告がないとだけ書いてあって、言いつばなしでいいのかなという気はちょっとします。これは要旨で記録として残るわけですね。

○北村課長補佐 はい。

○澤田座長 もうちょっと問題がないことを一言言っていただいたほうがいいのかなという気がするのですけれども、書き方ですが、どのくらいの短い断片であるとか、具体的なスコアとかE-valueですか。そこら辺も考慮して、安全性に問題はないという説明を追加していただいたほうがいいのかなと思えます。ほかによろしいでしょうか。

それでは、その他の修正事項が何点かありますけれども、何か御指摘等がございましたら、お願いしたいと思えます。

それでは、本件につきましては追加のデータを求めておりますので、もう一度、指摘事項を取りまとめて確認していただきまして、追加の指摘を厚生労働省を通じて出したいと思えます。

○和久井専門委員 1点よろしいでしょうか。追加の事項の14ページです。13週間反復投与毒性試験の投与用量を問うたのですが、「技術的に投与できる最大量」という言葉が記載されています。

結果から申し上げますと、私は「技術的に投与できる最大量である」は削除すべきであると考えます。また、記載するのであれば、「技術的に濃度調整できた」とすべきと考えます。「技術的に」の言葉は2通りの解釈ができます。1つは、濃縮調整技術が追いつかなかったことから、使用した投与用量に至ったという解釈です。もう1つは、動物愛護と薬物ADME変化の原因となるとの解釈です。具体的には、1匹の実験動物に多量に投与することは動物愛護に抵触する危険があると同時に、過剰投与に起因する被検物質の生体への吸収、分布、排泄、すなわちADMEが正しく評価できない可能性が危惧されることです。そのため、ガイドラインには、強制経口投与では、体重1kg当たり10mgを推奨すると記載されています。しかし、医薬等の動物試験では20mg投与を行うことが、今は一般的になってきているのも事実です。

従いまして、このままの記載では、後者の解釈から、技術的に投与できる最大量は理由は問わずkg体重当たり10mLと規定されていると誤解される可能性がありますので、この部分を削除する、或いは、技術的に濃縮調整できた収量であるということを記載していただきたい。

○澤田座長 このところを削除して、投与量としては十分高いので、問題はないわけですね。削除する方向で行きたいと思えますけれども、よろしいでしょうか。

それでは、本件につきましては、これで次回以降ということになりまして、次の議題に移りたいと思えます。

次は、NZYM-RO株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼで、事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 申請書の説明に入ります前に、冒頭で御紹介いたしましたけれども、本日は申請者のノボザイムズジャパン株式会社の担当者の方をお呼びしております。具体的な対応になりますけれども、申請品目について事務局のほうから説明をいたしまして、御審議をいただいた後に、申請者に対します質問事項等がございましたら、整理をしていただきたいと思います。その後に説明者に入室していただきまして、質疑応答を行います。質疑応答終了後、説明者には退室していただきまして、審議を再開していただくこととしておりますので、よろしくお願いいたします。

○勝田係員 それでは、引き続きまして、申請者から提出されている申請資料について御説明いたします。お手元に、NZYM-RO株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼの水色の紙ファイルをよろしくお願いいたします。

1ページ、第1-1といたしまして、従来添加物の性質等に関する内容です。従来同一添加物としては、*Geobacillus stearothermophilus* TRBE14株を利用して生産されたものがあり、その概要が本ページの（4）までに記載されております。

2ページ、第1-2といたしまして、本申請品目における宿主等の情報になります。

（1）宿主等の由来ですが、*Bacillus subtilis* JA1343株で、これは*Bacillus subtilis*の168株をもとに遺伝子欠失を導入することで作製されております。

（2）DNA供与体等の由来については、*Rhodothermus obamensis* JCM 9785株になります。

（3）挿入DNAの性質等ですが、6- α -グルカノトランスフェラーゼを発現するBEK遺伝子は*Rhodothermus obamensis* JCM 9785株由来の*glgB*遺伝子を最適化したものになりますが、翻訳されるアミノ酸配列については同一のものとなります。当該遺伝子を二重交差相同組換えによって挿入しております。

第1-3及び第1-4については記載のとおりです。

第1-5には、当該GM添加物の性質等が記載されております。

（1）の有効成分等については、6- α -グルカノトランスフェラーゼで、以降はこれをRoBEと呼んでおります。

（2）製造方法等につきましては、図2に記載のとおりで、生産菌は除菌行程により生産物である酵素から除去されるということです。

（3）用途につきましては、分岐デキストリン製造のための加工助剤として使われておりますが、最終製品にRoBEは残存していないということです。

（4）有効成分等については、従来添加物と同一となります。

第1-6には、従来品との比較が記載されております。相違点といたしましては、6ページに記載がありますが、至適温度及び至適pH等が異なっております。なお、従来品として非組換えのTRBE14株由来のものと、本調査会で御議論いただいて、平成24年1月に食品安全委員会のほうに答申いたしました組換えのBR151株由来の2つを引用しております。

8ページ、第2の項目として、宿主に関する事項が記載されております。

1～4までは記載のとおりとなります。

5といたしまして、有害生理活性物質の生産についてですが、宿主菌の近縁種は毒性物質を産生するものの、当該菌はこれらと明確に区別されており、問題ないと記載されております。

9ページ、第3のベクターに関する項目になりますが、1及び2-(1)、(2)は記載のとおりとなります。

(3) 既知の有害塩基配列については含まれていないこと、10ページの(4) 薬剤耐性についてはアンピシリン及びクロラムフェニコール耐性遺伝子がそれぞれ含まれていることが記載されております。(5) 及び(6)については記載のとおりです。

12ページ、第4といたしまして、挿入DNA等に関する項目になります。

1-(2) 安全性に関してであります。供与体である *Rhodothermus obamensis* はバイオセーフティーレベル2及び3に分類されていないこと、菌としての生存温度帯が50～85℃であること、近縁種が病原性を持つという報告がないこと、の以上3つを勘案し、安全性に問題はないと申請者が考えている旨が記載されております。

2-(1) として、挿入遺伝子の合成方法ですが、第1-2-(3) で御説明しましたとおり、挿入遺伝子である *BEK* 遺伝子は供与体の株由来である *glgB* 遺伝子を最適化しているものの、タンパク質のアミノ酸配列については同一のものとなります。

(2) については記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能についてですが、1)、2)にあるように供与体、遺伝子産物ともアレルギー誘発性に関する知見はない旨記載されております。3)には、遺伝子産物の物理化学的処理に係る内容が記載されております。

①といたしまして、人工胃液に対する感受性についてですが、こちらは処理後30秒以内に消化されることが確認されております。

②人工腸液につきましては、部分的に分解するものの、360分の処理でも完全に消化されないことを確認しております。

③加熱処理に対する感受性につきましては、デキストリンの製造に用いる条件で検討したところ、3時間以内の処理時間では基質の有無にかかわらず、免疫反応性はほとんど変化が見られなかったものの、6時間以降では基質存在下では非存在下と比較して顕著に免疫反応性が維持される結果が得られております。

4) 既知のアレルゲンとの構造相同性につきましては、検索の結果、*Aspergillus oryzae* 由来のTAKAアミラーゼがヒットしております。しかし、このRoBEはTAKAアミラーゼとの相同性が既存添加物であるBsBEあるいはAqBEと比較して、わずかに高い程度であることから、従来品に比して強いアレルギー誘発性を持つことは考えにくいと考察しております。

17ページには、第4-3といたしまして、遺伝子発現に関する事項が記載されております。

(1)、(2)につきましては、記載のとおりです。(3) その他の配列についてでござ

ざいますが、挿入遺伝子中には別途 *Bacillus thuringiensis* 由来の *cryIII A* mRNA 安定化配列が組み込まれておりますが、本配列には昆虫に対して殺傷効果を示す結晶性タンパク質をコードする領域は入っていないとのことです。

4及び5-（1）につきましては、記載のとおりとなります。

20ページ、（2）といたしまして、目的外オープンリーディングフレームの有無の項目になります。stop to stopの条件で30アミノ酸以上で検索を行った結果、80個のORFが検出されたものの、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質ともに問題となる結果はなかったと記載されております。

22ページ、5-（3）、（4）及び6については記載のとおりとさせていただきます。

24ページ、7になります。抗生物質耐性マーカー遺伝子といたしましては、*cat*遺伝子を用いておりますが、生産菌作製の作用に本遺伝子は欠失させているため、生産菌の当該マーカー遺伝子はないとのことです。

25ページの第5、組換え体に関する事項になりますが、こちらは記載のとおりとなっております。

27ページ、第6といたしまして、製造原料等に関する事項になります。RoBEの製造原料等は全て長年安全に使用された実績があると記載されております。

28ページ、第7、組換え添加物に関する事項になります。1にありますように、本品は既に諸外国で販売実績があること、2にありますように、製品中に組換え体DNAが残存していないことを確認しております。3～5につきましては記載のとおりです

最後に第8といたしまして、以上、第7までの結果から、安全性が確認できたため、追加の事項等の記載はなく、33ページに結論といたしまして、本品目は安全であると記載されております。

説明は以上になります。

○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、項目ごとに先生方からの御意見、コメントをいただきたいと思っております。

第1、第2、第3で、申請書の11ページまででコメント、御意見がありました、お願いしたいと思っております。

○小関専門委員 先ほどと同じですけれども、これも *amyE* とか、その4つの遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた遺伝子欠失と書いてあるのですけれども、これはセルフクロニングであるということを確認していただきたい。それと、できてきたJA1343株は今まで食経験があるかどうか。これについても明らかにしていただきたいということがあります。

以上です。

○澤田座長 宿主の問題は微妙でして、前回はいろいろ実績があるからBECh2を宿主にできたのですけれども、今回のような宿主は従来ですと168株まで戻って、そこから書いて

もらうことが多かったようです。今回どちらがいいかというのは、中間的な宿主であるJA1343株ですか。これが宿主として適切かどうかを一応、実績等で調べ直してもらって、もし実績が余りないようでしたら、168株から書いてもらったほうがいいのかなという気がします。

ほかはよろしいでしょうか。

それでは、第4に移りまして、12~24ページにかけまして、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。

○児玉専門委員 ちょっと戻ってしまうのですが、5ページの従来の添加物との相違点のところがいいのかどうかという問題はあるのですが、この製品のタンパク質としての精製度合いといいますか、純度といいますか、その情報がどこかにありますか。多分ないと思うのですが、それは出していただきたい。前のこちらのアスパラギナーゼのほうは出ていたのですが、こちらを探しても見当たらなかったの、出していただきたいと思います。

○澤田座長 これは製法的にはほとんど同じで、菌体外に出させているわけですね。それほど純度は悪くはないとは思いますが、一応情報は出していただきたいと思います。

ほかはいかがでしょうか。

○小関専門委員 前のものでも問題になったのですが、14ページの感受性のところで、SDS-PAGEは14.4kDaということで、かなり大きいところで見ているのですが、ウェスタンのほうは確かに短いところで見ているので、いいのだろうとは思いますが、これは写真としては違っているものを使っています。特に6.9の下にあるバンドが何kDaなのかを明記してもらっておいたほうがいいと思います。

ウェスタンをやるときに、これはSDS-PAGEで一番下に見ているバンドというのは多分フロントラインだと思いますが、これは完全にどういう実験をするか、実験者のやり方によるのですが、ウェスタンに持っていく前に一番下を切ることがあります。ぺらぺらになるから。そうすると低分子のところは抜ける。要するに14.4の下にSDS-PAGEだと濃く見えている、これは低分子ですよとおっしゃられても実験者がその部分を切り離している可能性があるの、私はよく切り離すのですが、そうしないと泡が入ったりとか、いろいろな問題が起こるので、その辺も含めて、きちんと何を見ているのかということについての御説明をいただきたいと思います。

○澤田座長 まず、これは同じ実験ではないですね。別ですね。

○小関専門委員 同じでないです。

○児玉専門委員 このウェスタンとSDS-PAGEはどうも違う実験で、この申請者の前のものを見たのですが、どうも毎回違うゲルを使っているみたいで、サボってしまうときはウェスタンをやった後にそのゲルを染めてしまうのですが、大概残るので、そうするとパターンが見えてきて同じパターンでとれるのですが、違うように別個に流しているようなのですが、分子量が結構マーカースの関係から見ると違うように見えるのです。実はさ

かのぼって見たら、この申請者の出している申請書は毎回このパターンで、よく見ると結構分子量がいつも違って見えるというのが一旦気になり出すと、すごく気になってしまうのですけれども、これは説明を求めたら回答してくれるのかどうかはわかりませんが、聞いてみたいと思います。

○澤田座長 使っているゲルの種類が違う可能性があるのか。

○児玉専門委員 でも、片方が66よりも大分上に見えているので、70数kDaはありそうに見えるのですけれども、ウェスタンのほうだと56.2のちょっと上なので70kDaはないなみたいな、ちょっと合わないのではないかなと。

○澤田座長 では、説明していただくことにしたいと思います。

○手島専門委員 SDS-PAGEのときは、ゲルのパーセンテージとかも示してもらえると見やすいかと思います。

○澤田座長 先ほど小関先生から指摘がありましたSDS-PAGEの低分子量は、もっと小さいのが必要かどうかというのはいかがでしょうか。ウェスタンでやっているからいいとするのか。

○小関専門委員 私はウェスタンがあれば、要するに分解という意味で言ったときに、そのデータがあれば、いいのではないかと思います。宇理須先生がいらっしゃれば、恐らくウェスタンよりもサンドイッチとか、そちらのほうがいいのではないですかと、より短くなっても抗体反応性が見えるからというような御意見をおっしゃられると思うので、私としてはこちらのウェスタンのほうに重きを置いたほうがいいような気がします。

○澤田座長 わかりました。ほかはいかがでしょうか。

○児玉専門委員 10ページの構成要素のところですが、pC194というのがぼんと書かれていて、これの説明がないようなので、もう少し情報を書きいただきたいと思います。これは19ページのほうにも出てきますので、書いておいてもらったほうがよろしいかと思います。

11ページの宿主依存性のOriのところですが、*Bacillus*で複製できるのかどうかだけ情報的に足していただければ。今回は宿主が*Bacillus*になっていますので、その点を書きいただければと思います。

○澤田座長 これは多分、pBR322由来のOriで、それが枯草菌で働くかどうか。

○小関専門委員 *Bacillus*のOriがあるかないかということの追記ですね。

○中島専門委員 これは直接聞いてみればわかると思いますけれども、染色体に組み込むタイプのもので、大腸菌のOriは通常は*Bacillus*ではまず効きませんから、多分*Bacillus*では発現しないと思います。組み込むタイプのもので、*Bacillus*で効くOriがあると、かえって変なことが起こりますから、まずないと考えていいと思います。

○澤田座長 一応は聞いてみますか。

それでは、25ページから最後まででコメント、御意見がございましたら、お願いしたいと思います。

○飯専門委員 1つよろしいですか。25ページの5-2-(1)に当たる内容ですけれども、例

えばこの図12を見るとサザンブロット解析用プローブとあるのですが、サザンの結果を見つづけることができなかつたのですが、どこかにありましたでしょうか。添付資料も含めて、よくわからなかつた。もう一つのほうもそうですけれども、一応ちゃんと入っているのだということやコピー数的なことも含めて、サザンは今までこのタイプの評価ではついていたかなと思うのですけれども、その辺はエッセンシャルにしていたかどうかはよくわからないところもあつたので、必要であれば、つけてもらうほうがいいのではないかと感じたところですよ。

○小関専門委員 先生、よろしいでしょうか。多分これはサザンと書いてあるのが間違いで、29ページのドットブロット用のプローブがここだと言っているのではないですか。

○松井技術参与 そのようです。

○小関専門委員 ケース・バイ・ケースだと思うのですけれども、サザンを出してもらわないとまずいケースももちろんあると思いますが、こういうふうクリアにきれいに入っていて、全領域で塩基配列を決めていますので、そういう意味で言ったら問題はないでしょう。ただ、ほかのところに入っていないという保証はないというのは確かです。

○飯専門委員 その辺で、1つ前のページの抗生物質マーカのところも根拠としているのは理屈しかないということが引っかかっている、予想外に断片がどこかに入ってしまうという可能性を否定してくれていれば、それ以上は調べる必要はありませんねということになるのですが、その辺が一切ないということで、5-2-(1)の社内文書12というのも、多分これは10の間違いだらうと思います。

○澤田座長 添加物の場合は、産物として変なものができていなければいいのですけれども、それを担保するために何が要るかということになるかと思ひます。

○飯専門委員 同じような例を過去にどう扱ってきたかということで、ここで絶対に必要かどうかという、ボーダー的な部分もあろうかと感じるころはあります。

○中島専門委員 たしかこの申請者さんだったか、別のときには、それが多コピー入っていて、とか、そういったケースが昔あつたと思ひます。多分それは取り下げられたのではないかという気もします。*Bacillus*の場合も幾つかこういう株をとっていると、すごく生産性のいい株がとれたりして、そういうのは工業的にはとても有利なので、ぜひ使いたいだけども、それを狙うと染色体上に数コピーがタンデムに入っているということが割とあります。そういう数コピーがタンデムに入っていると、これは何コピーあるのかをきちんと調べるのが技術的に難しいので、そこを余りきちんと要求すると、また同じようなことになるかなという気がします。この場合はそこまで要求をしなくてもいいように私は思ひます。

○澤田座長 コピー数の情報はなひですか。

○北村課長補佐 これは配列を読んでいまして、●●●ということが確認されています。

○澤田座長 それはサザンで確認しているはずですね。●●●という以上は。

○中島専門委員 思うに、このドットブロットの濃さから●●●と推定しているだけでは

ないかという気がします。サザンをやっているデータを出してもらえるようにも思うのですが、いらっしゃるのなら、ちょっと聞いてみたいところでもあります、恐らくやっていないだろうと思います。

○飯専門委員 私は逆に、この部分に書こうと思っていたことを載せ忘れたのかなとは思ったのですが。社内文書の番号が違うとかいうこともあったものですから。塩基配列を決めているのは、このローカスの配列ですね。ゲノム全体を決め直したわけではなくて。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

それでは、どのような質問をするかという点になりますけれども、問題として出てきたのは、宿主の問題。タンパク質の純度の問題。消化のときの方法などの問題。pC194の追加説明。最後に問題になりましたコピー数とサザンのプローブの問題。これらが大きな問題になるかなと思うので、この4点を説明していただくことでよろしいでしょうか。

○北村課長補佐 事務局ですけれども、申請資料の16ページのところで、TAKAアミラーゼとの相同性がありましたという件で、80アミノ酸残基で35%以上の検索をしたところ、その領域において、TAKAアミラーゼとこの申請品目との相同性が28.4%で、従来品と比べた場合よりも多少は上がっているという結果になっているのですが、このところはいかがでしょうか。

○澤田座長 これは手島先生、いかがでしょうか。相同性の数字はそれほど大きくは変わらないかなと思うのですが、論理の進め方として、この書き方でいいかどうかも問題になるかと思えます。最終的には、8アミノ酸で一致するところがないということが書いてあるようですので、問題はないのかとは思いますが。

○手島専門委員 従来品と比べての申請品目とTAKAアミラーゼ間の相同性の差は大きくないので、アレルギー誘発性の上昇に関しての懸念はないと考えていいと思うのですが、書き方としては、アレルギー誘発性を持つ可能性は低いという形でよろしいかと思えます。

○澤田座長 この8アミノ酸の一致するものがなかったということは、普通やるときは当然、対象としてTAKAアミラーゼも入っているわけですね。それは既にやってあるということと考えていいのです。そこは確認します。

○飯専門委員 同じページで質問できたらと思っていたところがあって、16ページの一番最後の文です。ここで審査しているのはあくまで酵素製品であって、ここの最後に書かれているのは、それを使った産物の話で、それをここの申請者がコントロールできるのであれば書いてもいいけれども、売った先がやる話のことを書くのはどうなのかなと感じるところです。

○澤田座長 なお書きで情報的に書くのは構わないかなとは思いますが、「また」ではなくて「なお」にすれば。一般的な使い方をすれば。ただ、本当に除去される率とか、その情報がないので、この文章が適切かどうかはまた別の問題と思えます。

○飯専門委員 4ページの最後のところにも同じ意味合いが書かれていまして、ここでは

- 自分たちで使った場合にこうなるのはわかるのですけれども、ということです。
- 澤田座長 4ページの最後に書いてある「第4-2-(3) 5) 参照」というのは。
- 北村課長補佐 申請書の15ページの図9の下の参考というところになります。
- 澤田座長 これは参照先がきちんと書いていない。
- 北村課長補佐 記載が間違えていますので、修正してもらいます。すみません。
- 澤田座長 説明の項目がふえましたけれども、大体このくらいになるかと思います。
- 北村課長補佐 追加でもう一点確認させていただきたいのですけれども、挿入DNAの供与体の件ですが、12ページをお願いします。こちらの供与体につきましては、第4-1-(2)に記載がありますように、恐らく食経験はないものですが、超好熱菌であるといったことですか、バイオセーフティーレベルの説明がされているのですが、この情報で十分でしょうか。
- 澤田座長 どうぞ。
- 中島専門委員 超好熱菌ですし、このくらいの説明で大丈夫と考えていいと思います。昔の遺伝子組換えのガイドラインであったころも一番最初に大腸菌、枯草菌、酵母、この次に加わったのは好熱菌でして、この根拠はヒトにどうこうする可能性が考えられないという理由だったと思いますので、それは今でも通用すると考えますし、この説明で十分だと考えます。
- 澤田座長 ほかによろしいですか。
- 児玉専門委員 今、説明のあったとおりで、一般的に超好熱菌は毒性を持つものとか病原性を持つものは知られていないということになっていると思いますので、この程度でよろしいのではないかと思います。
- 澤田座長 それでは、よろしいですか。
- 北村課長補佐 申請者と呼んでまいりますので、少しお待ちください。
- 山本評価第二課長 すみません、今の質問はそれぞれの委員が分担されますか。どうされますか。
- 澤田座長 私が概要を聞いて、補足で委員の先生方から追加で御質問いただければと思います。

(企業関係者入室)

○澤田座長 それでは、先ほどいろいろと先生方から御意見をいただきまして、何点か追加で説明をいただきたい点がありましたので、お願いしたいと思います。特にこの場で答えられないことは、後日また御報告いただくということで構いません。

まず、説明者の方の自己紹介をお願いしたいと思います。トークのボタンを押して、会話を始めていただきたいと思います。

- 説明者 初めまして、ノボザイムズの福永と申します。よろしくお願いいたします。
- 説明者 ノボザイムズジャパンの橋田でございます。よろしくお願いいたします。
- 説明者 同じく、ノボザイムズの清水と申します。よろしくお願いいたします。

○澤田座長 それでは、早速、質疑のほうに入りたいと思います。

何点かありまして、まず、宿主の問題であります。このJA1343株を宿主にすべきか、または168株を本来宿主にすべきかという問題がありまして、このJA1343株が経験的にいろいろな用途で使われている実績があるとか、そういう場合には宿主に用いてもよろしいのですけれども、単なる中間体的に使っている場合は168株に戻って宿主として、それで説明を加えていただきたいという事情がありますので、JA1343株の情報に関して何か御説明できることがありましたら、お願いしたいと思います。

○説明者 JA1343株の使用経験については、この酵素をつくる以外に実際に使用経験はありません。ただ、もと株の168株は使用経験があるということで、そういう話ですと恐らく168株が宿主になるのではないかと思います。

○澤田座長 それはそれでお願いしたいと思います。

次に、この酵素製剤の中の当該する酵素の純度に関して情報が見つからなかったという御指摘がありまして、この点はいかがでしょうか。

○説明者 この酵素のタンパク質純度に関しまして、実際に量ったことはないのですけれども、SDS-PAGEで見る限り、●●●%以上はあると思います。ほぼ●●●%に近いのではないかと考えています。

○澤田座長 ありがとうございます。

追加で御質問はよろしいですか。

○児玉専門委員 それはいいです。

○澤田座長 3番目としまして、14ページの人工胃液のデータでありますけれども、まず、SDS-PAGEとウェスタンブロットは、実験そのものは違う実験をしているということで、同じものを染めているわけではないですね。

○説明者 実際、SDS-PAGEとウェスタンブロットは同じゲルでやっています。このマーカが違って見えるというのは、SDS-PAGEのほうを見ていただきますと、1レーン目にマーカと書いていまして、2レーン目も実はここはプレステインドマーカが入っています。このSDS-PAGEのディテクションの方法がCBBではなくて、ステインフリーというゲルを使っています。このステインフリーとなりますと、プレステインドマーカが写らない状況になります。CBBでも染めたことはありまして、CBBでも同じ結果になります。

○澤田座長 そうしますと、RoBEの分子量が大分ずれているのではないかとこの指摘がありました。この点は大丈夫でしょうか。

○説明者 これはマーカの特徴といいますか、マーカを購入して、このマーカがどの大きさとレファレンスがあるのですけれども、2つ比べると、そのレファレンスとはずれがあるのかなというのは私自身も感じています。

○澤田座長 この実際のマーカ自身の正確性というか、本来の分子量を反映していない可能性があるという理解でよろしいですか。

○説明者 その可能性も、実際に正確にはかったことがないので、何とも言えないところ

ですけれども、このSDS-PAGEの性格上、分子量だけではなくて、そのアミノ酸の電荷とかにも影響される部分があるので、何とも言えない部分があります。ただ、大体は当たっているのではないかというような感じです。

○澤田座長 いかがでしょうか。

○小関専門委員 問題になったのが、SDS-PAGEだと一番下のところに来るのが14.4ですね。ウエスタンだと6.9ということで、今、電荷の問題とおっしゃいましたが、これは両方ともSDS-PAGEですから、電荷の項は消去されているはずなので、その影響はほとんどないようにするのがSDS-PAGEの原理だと思うので、そこのところはおかしいのではないかと。とにかく14.4のSDS-PAGEの下のところ濃いバンドが出ていますね。これはフロントラインではないかと思うのです。だとすると、このフロントラインは6.9のウエステンの値に比べると圧倒的に大きい。それで、これは違うゲルを使って流したのではないかということが第1点。6.9の下に出てくるバンドが何かということが第2点。

そここのところ疑問点が幾つか出てきて、SDS-PAGEだったらフロントラインがここに出てきますね。そここのところは技術的に言ったときに、ゲルがべろべろになるので、そこを切り離してウエスタンに持っていったのではないかと、違うゲルでやっているとか、いろいろなところで疑念がすごく発生したところ。今、言われたあれですと、マーカー自身が信用できないというのだったら、このデータ自身も信用できないということ言ってしまうのと同じになってしまいます。

○説明者 そこまで解析したことがなかったので詳しくは答えられないのですけれども、以前の調査会で実際に我々も小さいところが気になるということが言われまして、もう少し固いゲルで3,500Da以下が見えるということが以前のほかの案件で言われまして、それも試しましたが、それでもバンドは見えません。

○小関専門委員 非常に簡単な話です。14.4が一番下で、フロントラインがその直下に出ているのに対して、ウエスタンでは6.9。この点をどう説明されますかということです。まず、第1点。

○説明者 非常に難しい質問でして、この場では正確に答えられないと思いますので、もしかしたらマーカーの問題かもしれませんし、今のところだとわかりませんので、確認します。

○小関専門委員 それでは、確認の際において、今、私は3点申し上げたと思います。すなわち、6.9と14.4ということであると。14.4の直下に見えるこのバンドがフロントラインではないかと。SDS-PAGEのですね。6.9の下に見えるマーカーのバンドが何を意味しているのか。何kDaに値するのか。それから、ウエスタンをするときに下の部分を切り裂いてやっているのかどうか。切り裂いてフロントラインを外すことをすると、低分子側のものを人為的に除去した形になっています。その3点について調べ直してください。

○説明者 わかりました。最後のフロントライン、下の部分を除去しているのではないかという点だけこの場で答えさせていただきたいのですが、除去はしていません。そのまま

ゲルをPDF膜につけて実験をしています。

○小関専門委員 わかりました。

○澤田座長 人工胃液の問題で、ほかに委員の先生でよろしいでしょうか。

それでは、次の点に移りたいと思います。例えば25ページに、ゲノムに入った遺伝子の図が書いてありますけれども、例えばサザンブロット解析用プローブというのは、実際には何に使ったプローブか。それとも余分に書いてあるだけの情報なのか。

○説明者 25ページのサザンブロット解析用プローブというのは、第7-2でドットブロットをやっているのですけれども、ドットブロットに使ったプローブです。これは記載が間違っていて、ドットブロット解析用プローブのことです。

○澤田座長 わかりました。それから、ほかの場合も問題になったことがあると思いますけれども、コピー数が●●●と伺っていますけれども、それはサザンで確認されたのかどうか。

○説明者 これは全ゲノム解析をやっていて、それで●●●であるということは確認しています。

○澤田座長 ホールゲノムで全部シーケンスをされたということですね。

○説明者 そうです。

○澤田座長 よろしいですか。

○飯専門委員 そうであれば、全ゲノムをシーケンスしたのであれば、結果は確実だと思うので、それをどこかにしっかりと明記していただければ、抗生物質マーカーが入っていないこととか、予想外の断片の挿入の可能性などは全部払拭できますので、そういうことを明記してもらうほうがいいかなと思います。

○説明者 わかりました。

○澤田座長 もう2点ほどありまして、4ページの最後のところに、このタンパク質がデキストリンをつくるときに除かれる旨を書いてありまして、第4-2・(3)の5)参照と書いてありますが、その引用先のデータというか説明がどこにあるのかがよくわからないというのがあるのですけれども。

○説明者 これは15ページの下から、4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性のところがありまして、その上に(参考)という、図9のすぐ下です。すみません、ここにありません。先ほどの4ページは記載ミスです。

○澤田座長 それで理解できました。そうしますと、16ページの一番下に、可能性は非常に低いという旨を書いているのですが、これは一般的に使用した条件ではそうかもしれないので、「また」ではなくて「なお」書きくらいにしておいていただければと思います。

○説明者 はい。

○澤田座長 最後に、毎回同じような問題が出てくるかと思いますが、TAKAアミラーゼとの相同性の問題で、8アミノ酸が相同する既知のアレルゲンは検出されなかったとありますけれども、これは当然、対照としてTAKAアミラーゼも含まれているというこ

とでよろしいのでしょうか。

○説明者 もちろんです。

○澤田座長 ありがとうございます。

ほかに追加で委員の先生方から、この際、御質問がありましたら、お願いしたいと思えますけれども、よろしいでしょうか。

それでは、御回答をありがとうございます。以上で説明者との質疑応答を終わりたいと思います。

(企業関係者退室)

○澤田座長 それでは、審議を再開したいと思います。ただいま、いろいろと回答をいただきました点を踏まえまして、さらに追加で御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思いますけれども、いかがでしょうか。回答をいただく必要がある点が多かったので、確認事項、指摘事項にまとめまして、先生方にもう一度確認をいただいた上で、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、議題1につきましては、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。私から報告があります。昨年12月の専門調査会で審議いたしました低リグニンアルファルファKK179系統、及び除草剤アシルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ1910系統、1月の専門調査会で審議していただきましたNZYM-SO株を利用して生産された α -アミラーゼ、2月の専門調査会で審議いただきましたDP-No.1株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミルバリングリシン、GLU-No.7株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウムの計5品目については、申請書等の修正の指摘を出したところでもありますけれども、これらの品目の取り扱いにつきましては、御担当の先生に御協力いただくということで座長預かりとなっております。

指摘に基づき修正されたことが確認されましたので、評価書(案)を食品安全委員会に御報告いたしました。現在、5つの品目ともにパブリックコメントの募集中と伺っております。

私からの報告は以上であります。ほかに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136回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。きょうも熱心な御議論をありがとうございました。