

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第142回会合議事録

1. 日時 平成27年10月21日（水） 14:30～16:46

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

- ・NZYM-AV株を利用して生産された α -アミラーゼ
- ・PLA-54株を利用して生産されたホスホリパーゼA2

(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、柘植専門委員、手島専門委員、中島専門委員、飯専門委員、
山川専門委員

(食品安全委員会)

佐藤委員長、山添委員

(事務局)

東條事務局次長、鋤柄評価第二課長、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1 食品健康影響評価に関する資料

- ①NZYM-AV株を利用して生産された α -アミラーゼ
- ②PLA-54株を利用して生産されたホスホリパーゼA2

資料2 「食品安全委員会における調査審議方法等について（平成15年10月2日
食品安全委員会決定）」に係る確認書について

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142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、樋口専門委員、和久井専門委員は御欠席です。

本日の議題であります、新規の品目であります「NZYM-AV株を利用して生産された α -アミラーゼ」、「PLA-54株を利用して生産されたホスホリパーゼA2」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、配付資料の確認をさせていただきます。

配付資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿。

資料1といたしまして、食品健康影響評価に関する資料。

資料2といたしまして、「食品安全委員会における調査審議方法等について（平成15年10月2日食品安全委員会決定）」にかかる確認書について、となっております。

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、次回また配付いたします。

不足等ございましたら、事務局までお知らせください。

また、本日は新規審議品目の申請企業でござい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 α -アミ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おります。

○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、配付資料2のとおり、専門委員の先生方からいただきまし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 提出いただきました確認書について、相違等はございませんでしょうか。よろしいですか。

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、「NZYM-AV株を利用して生産された α -アミラーゼ」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 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。本日は申請者のノボザイムズジャパン株式会社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、申請品目の御審議をいただいた後に、申請者に対する質問事項等があれば、整理していただきたいと思っております。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、審議を再開していただくこととしております。よろしくお願いいたします。

○勝田係員 それでは、申請者から提出されている申請書について御説明させていただきます。お手元に、NZYM-AV株を利用して生産された α -アミラーゼの灰色の紙ファイルをよろしくお願いいたします。

初めに、本品目の概要について御説明いたします。申請資料の2ページを御覧いただければと思うのですが、2ページの下に図2がございます。こちらに沿って御説明いたします。

本品目である α -アミラーゼにつきましては、デンプン糖を製造する際に一番上の囲みにある液化の工程で添加されます。図にありますように、液化の工程前後につきましては、pHが4前後の酸性の高温条件で行われるのですが、 α -アミラーゼ自身は酸性に弱いため、従来の液化の工程ではpHの調整が必要となっておりました。今回の申請品目については、 α -アミラーゼ自身に酸性領域の耐熱性を付与することで、pH調整の工程を簡略化し、pH調整剤の添加量を削減することを目的として作成されたと説明がされております。

続きまして、詳細について御説明いたします。戻っていただきまして、1ページをお願いいたします。

まず、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。従来の同一添加物としましては、*Bacillus licheniformis* Ca63株由来のものがありまして、その概要が続く3ページの(4)までに記載されております。

3ページ、第1-2としまして、本申請品目における宿主等の情報です。

(1) 宿主等の由来についてですが、従来添加物と同じ*Bacillus licheniformis* Ca63株になりまして、当該株は自然界から分離された株となっております。

(2) DNA供与体等の由来につきましては、続く4ページの表1に記載がありますが、宿主と同一株あるいは同じ*Bacillus*属に由来しております。なお、表1の転写調節配列のところに、*cryIII A* mRNA安定化配列というものが下から3つ目のセルにあると思うのですが、この供与体が*Bacillus*のDSM5525株となっておりますが、確認しましたところ、正しくは5526株ということでしたので、ここで修正させていただければと思います。申し訳ございません。

続きまして、(3) 挿入DNAの性質等についてでございます。生産菌である*Bacillus licheniformis* NZYM-AV株の作製にあたりまして、DNAの挿入とともにDNAの欠失が生じておりまして、それぞれが有する性質につきましては6~8ページにかけて、表2~4にまとめて記載されてあるとおりとなっております。

なお、DNAの挿入につきましては、本品目ではインテグラーゼを用いておりますが、詳細につきましては後述の39ページ、第4-6の項目で御説明いたします。

11ページ、第1-3及び第1-4については記載のとおりです。

12ページの第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) 有効成分等は α -アミラーゼで、以降はこれをLE2488と記載しております。

(2) 製造方法につきましては、図1に記載のとおりで、生産菌は2度の除菌ろ過により、生産物である酵素から除去されている、とのことです。

(3) 用途等につきましては、pH調整が不要となる点以外は、従来添加物と同一で、最終製品にLE2488は残存していない、とのことです。

(4) 有効成分等の比較につきましては、酸性領域で耐熱性を有する以外は、従来の添加物と同一となっております。

13ページには、第1-6として、従来添加物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、表7に記載のとおりでございますが、従来添加物であるAmylase Lにアミノ酸変異が導入されることで酸性領域において耐熱性を有する点になります。

16ページ、第2の項目といたしまして、宿主に関する事項が記載されております。

1~4につきましては、記載のとおりです。

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作成するものの、当該菌はこれらとは明確に区別されており問題ない、と記載されております。

18ページ、第3「ベクターに関する事項」になります。

1及び2の(1)と(2)は記載のとおりです。(3)既知の有害塩基配列については含まれていないこと、19ページの(4)薬剤耐性につきましては、エリスロマイシン耐性遺伝子がそれぞれ含まれることが記載されております。(5)及び(6)についても記載のとおりです。

20ページ、第4といたしまして、挿入DNA等に関する事項になります。

1-(2)安全性に関してですが、供与体のうち、*Bacillus licheniformis* Ca63株につきましては、バイオセーフティーレベル1に分類されるとともに、長年にわたり申請企業のほうで安全に使われてきた実績があること、Ca63株を除く3つの*Bacillus*株については、長年安全に使われてきた実績があること、また、Lactococcal bacteriophageにつきましては、当該株由来の遺伝子が最終的には脱離していることから、安全性に問題ない旨がそれぞれ記載されております。

第4-2-(1)といたしまして、挿入遺伝子の合成方法に関してですが、*amyLE2488*遺伝子はアミノ酸置換が生じるよう*amyL*遺伝子に対し位置特異的変異導入法を用いることにより、*prsA*遺伝子については宿主であるCa63株の染色体から、それぞれ作製されております。

(2)につきましては、記載のとおりです。

(3) といたしまして、次に挿入遺伝子の機能についてですが、順番が前後いたしますが、初めに26ページをお開きいただきまして、*prsA*遺伝子について御説明いたします。*prsA*遺伝子につきましては、同ページに記載のように、当該遺伝子から産生されるタンパク質について、アレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はない旨が記載されております。

22ページに戻っていただきまして、*amyLE2488*遺伝子についてでございますが、まず、1)、2) にありますように、供与体、遺伝子産物ともアレルギー誘発性に関する知見がない旨、記載をされております。

続く、3) には、遺伝子産物の物理化学的処理に関す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なりますが、こちらは処理後、30秒後以内に消化されることが確認されております。人工腸液につきましては、部分的には分解するものの、360分の処理でも完全に消化しないことを確認しております。

③といたしまして、加熱処理に対する感受性につきましては、デンプン糖の製造に用いる条件で検討をいたしましたところ、基質存在下条件では、ほぼ免疫反応性は低下しない結果が得られております。

4) の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、相同性を示す既知のアレルゲンは検出されなかった旨が説明されております。

26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) については記載のとおりです。(3) その他の配列についてですが、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。*amyL* RBS配列も挿入されておりますが、こちらについても長年安全に使われてきた実績がある旨が記載されております。

4及び5- (1) については、記載のとおりです。

31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になります。*stop to stop*で30アミノ酸以上の条件で●●●の遺伝子座について検索を行った結果、合計で527個のORFが検出されたものの、これらは既知のアレルゲンと比較して問題となる結果はなかったと記載されております。

32ページにいきまして、今度は毒性タンパク質との比較になります。こちらはその結果が34ページ以降になるのですけれども、34ページ以降にありますように、その相同性については大きく分けて3種類に分類されるという結果が得られておりますが、それぞれ毒性を持つ報告がない、或いは遺伝子導入に起因する新規のORFではないことから問題ない、と説明されております。

39ページ、5- (3) と (4) についても記載のとおりとなっております。

第4-6、DNAの宿主への導入方法についてですが、各遺伝子座に対してマーカー遺伝子を挿入後、目的の遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターを用いることでインテグラーゼが発現し、その働きによって目的の配列が各々の遺伝子座に挿入されると説明が

されております。詳細につきましては、39ページの後半から46ページにかけて説明と図示がされておりますので、そちらを御参照いただければ幸いです。

47ページ、第4-7といたしまして、生産菌に抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことをシーケンスにより確認したという旨が記載されております。

48ページ、第5 組換え体に関する事項になりますが、1の宿主との際に関しましては記載のとおりです。2の遺伝子導入に関してでございますが、目的の遺伝子発現カセットが複数コピー挿入されていること、挿入領域には抗生物質耐性遺伝子が存在しないことについて、シーケンス解析により確認をした旨が記載されております。詳細につきましては、52ページまでを御参照ください。

続いて、54ページ、第6 製造原料等に関する事項になります。LE2488の製造原料等は全て長年安全に使用されてきた実績があると記載されております。

55ページ、第7 組換え添加物に関する事項になります。本品は、まず1にありますように、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。

続く、3～5については記載のとおりで、第8といたしましては、以上、第7までの結果から安全性が確認できたため、追記の事項等の記載はなく、59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、先生方から御意見をいただきたいと思えます。

まず、第1～第3のベクターに関する事項のところまでで、19ページまでで御意見、コメントがございましたら、お願いしたいと思えます。

○児玉専門委員 11ページのところに、欠失導入用ベクターによるDNA欠失というところがあるのですが、通常これは用いたベクターとかを多少紹介して、こういう形で欠失させましたという形で紹介するケースが多いのではないかなと思ったのですが、今回はもう欠失しました、セルフクロニングですということの説明が終わってしまっているんで、ここはもう少し説明をちゃんと入れていただいたほうが、セルフクロニングを相当するということを確認するという意味で必要ではないかなと思えました。

○澤田座長 これはCDのほうにも説明がないですか。

○松井技術参与 添付資料では、用いたベクターとその方法について詳細に図示と説明がされています。

○澤田座長 それでは、もうちょっとそこから持ってきていただけますか。

○松井技術参与 はい。

○児玉専門委員 欠失させましたという一言で終わらせてしまうのはどうかなということです。

もう一つよろしいですか。12ページの有効成分の社内文書4というところが出てくるの

ですけれども、今回の製品はタンパク質の純度が●●●%であるという形で、高純度であるということで紹介されているのですが、残りの●●●%をある特定のバンドが占めているようでして、そのバンドがいわゆる比較対象にもあるバンドなのか、この組換え体のときの製品に入ってくるバンドなのか。そこら辺の記述がないので、そこら辺は教えていただきたいと思います。

○澤田座長 大事な点なので、恐らくもとの宿主にもあるのだとは思いますが、一応確認をしたほうがよろしいかと思います。

ほかはよろしいでしょうか。

それでは、次の第4で、挿入DNA遺伝子産物、発現ベクターの構築のところ、20～47ページまでに関しまして、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。

○児玉専門委員 26ページの「*prsA*遺伝子の機能」というところなのですが、これは標的のアミラーゼの発現とその蓄積等を助けるために使っているようなのですが、メンブレンバウンド・リポプロテインだそうで、いわゆる菌体外酵素ではないので、最終的な製品に入らないということは培養上清に出て来ないとか、そういうことを一言入れていただくと、これの安全性についてはかなり担保されるということがわかると思いますので、一言書いていただいたほうがいいかなと思います。

○澤田座長 データはなくても、説明だけでよろしいですか。

○児玉専門委員 そうですね。文献上、そういうふうに書いてあるようなので。

○澤田座長 ほかはいかがでしょうか。

それでは、48ページから最後のところまでで、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。

○児玉専門委員 何度も何度もすみません。今回のものはアミラーゼの遺伝子をインテグラーゼというもので、一種の相同組換えと言っていいのかどうかははっきりしないのですが、ゲノムに挿入しているのですけれども、もともとゲノムの挿入をして初めてプロモーターとくっつく形になっていまして、もともとそのプロモーターは最初にマーカー遺伝子と呼ばれるものと一緒に1回入れておいて、そのマーカー遺伝子のところがアミラーゼと入れ替わるという形になっていますので、実はそのマーカー遺伝子のほうの説明が、実はもうぱっと削られているというか、この要旨からは、どういうベクターでというところが余り書かれていないように思うのですけれども、その点をそれでいいのかなと。結局そのプロモーターの部分は最終的に残りますので、それを考えると、一旦入れたそのマーカー遺伝子の部分の説明は、記載上は必要なのではないかなと考えたのです。

○北村課長補佐 今のページには書いていないのですが、10ページの①のところには、「マーカー遺伝子発現カセット（プロモーター、mRNA安定化配列及びターミネーター）」ということで、こちらには説明があります。

○児玉専門委員 そこに載ってはいるのですけれども、これを入れるための手順とか、ベクターとか、それに関してはほとんど記載がないのではないかと。これが最終的に全部残

らないということであれば、これでいいかなと思ったのですけれども、プロモーターの部分はしっかり残って機能する形になっているので、それを考えるとあったほうがいいのかなと思いました。

○北村課長補佐 導入方法のところに、その説明を入れたほうがいいのかということですか。

○児玉専門委員 そうですね。少なくとも、簡単ではいいと思うのですけれども、どういうベクターを使って、こういうふうに入れましたという形のものが必要なのではないかなと。

○松井技術参与 添付資料1にはそれがあるので、それをわかるように抜粋した形にして、ここにどのようなベクターを使ったか載せるようにすれば、よろしいかと思います。

○澤田座長 遺伝子導入ベクターのpANとか、そのつくり方がもうちょっと書いてあればいいのですか。それとも、その前の段階ですか。

○児玉専門委員 これが入る前に入れているのですね。●●●とか●●●とか多分、●●●●という形で入れ替わりましたというのを確認するようなストラテジーでやっているようなのですけれども。

○松井技術参与 今の児玉先生の御発言にありましたように、レポーター遺伝子を入れるのに●●●種類のベクターを使っています、それが全てよくわかるように要旨に記載していただきたいという御指摘だと理解しました。

○澤田座長 要は最終的に残らないものでも、途中経過がある程度わかるようにということですか。

○児玉専門委員 最終的に残らないものはいいかなとは思ったのですけれども、プロモーターは最終的に残ってしまうので、そのプロモーターは機能していますので、これはいわゆる導入遺伝子という概念からいくと、導入遺伝子になるかなということ、記載があったほうがよろしいかなと。

○澤田座長 プロモーターというのは、P3と書いてあるものですか。

○児玉専門委員 そうです。

○澤田座長 ほかはいかがでしょうか。

それでは、申請者からの説明をしていただきましょうか。余り大きな質問はないのですけれども。

○手島専門委員 純度のところを聞きたいです。

○澤田座長 純度のところですね。では、1点だけ、●●●%のところを。せっかくいらしていただいたので。

○北村課長補佐 少し休憩ということで、お願いいたします。

(休 憩)

○澤田座長 それでは、会議を続けたいと思います。説明者の方にまず自己紹介をお願い

したいと思えますけれども、よろしく申し上げます。

○説明者 ノボザイムズの福永と申します。よろしく申し上げます。

こちらが同じく、ノボザイムズの清水と村戸でございます。よろしく申し上げます。

○澤田座長 それでは、質疑応答に入りたいと思えます。1点だけ確認させていただきたいということがありまして、あとはマイナーといえますか、記載整備的なことなので後ほど、またお伝えしたいと思えます。

12ページの下から3行目の社内文書4で、純度が●●●%というところなのですが、これの残りの●●●%が従来の宿主由来のもので、安全上は問題がないのか、それとも何か新たに出てきたタンパクなのか。それだけは確認していただきたいという意見が委員の中から出ていましたので、今わかる範囲でもしお答えいただければ。

○説明者 それでは、説明してもよろしいでしょうか。社内文書4を見ていただきたいのですが、**Result&Conclusion**のところ SDS-PAGEのゲルの写真がありまして、バンドを2本検出しています。No.1とNo.2です。No.1が●●●%、No.2が●●●%。No.2が大ききから、抗体反応からLE2488ということは確認しています。

No.1が何なのかという質問だと思うのですが、これはSDS-PAGEで流すときに還元剤を入れて加熱処理して変性した状態で流すとLE2488のバンドが出てきます。これは加熱処理、還元剤を入れずに流すと、No.1のところにバンドが出てきて、抗体がそこで反応するという事なので、変性できずにいるものが残ってNo.1に出てきているのではないかと考えています。なので、No.1も変性していないLE2488で、純度をはかるときにメインバンド、LE2488の大きさに出ているものを取りあえずLE2488としてはかったということです。

○澤田座長 No.1は還元剤を入れるとNo.2になるのですか。

○説明者 還元剤を入れて加熱処理するとNo.2の位置にバンドが来ます。

○澤田座長 それで●●●%の値は。

○説明者 ●●●%の値はNo.1とNo.2のバンドの濃さを足して、それでどれだけの比であるかというのをNo.1とNo.2を足します。

○澤田座長 そうすると、あとの●●●%はスメア的なもののトータルということですか。

○説明者 スメアではないです。

○澤田座長 まだマイナーなバンドがたくさんあって、この図からはちょっとわかりませんが。

○手島専門委員 この図というのは還元剤を入れて電気泳動をした図ですか。

○説明者 そうです。普通はSDS-PAGEをやるときはタンパク質の立体構造を壊して、大きさだけを見るために還元剤を入れて加熱処理して、完全にディネイチャーした状態です。

○手島専門委員 その状態でも少し残るのですか。

○説明者 そうですね。還元剤は完全にディネイチャーは、この条件ではされていないと

ということです。

○手島専門委員 それは今回はバンド1の位置に出ているのが●●●%ということですか。

○説明者 そうです。このやり方ではかると●●●%でした。

○手島専門委員 本来は同じ性質を持つものなのだけれども、ということですか。

○説明者 そうです。

○澤田座長 どうぞ。

○中島専門委員 先ほどの御説明では、このバンド1もウエスタンで反応するとおっしゃっていたのですか。

○説明者 はい。

○中島専門委員 なるほど。ということは、このLE2488は、このタンパク質は●●●になるとか、そういう性質は知られていますか。

○説明者 そこまで調べていないです。恐らくつくるのではないかと考えています。

SDS-PAGE自体でもSDSが入っていますので、多少変性する条件だと思えるのですが、それでも上のほうに出てくるということは、かなり強い結合をしているのか。例えばSS結合など、還元剤を入れないと切れないような結合をしているのではないかと考えています。詳しいところは調べていません。

○中島専門委員 還元剤とSDSを入れて、それでも切れないというのはそうそうはないものなのだけれども、絶対にないわけではないので、ただ、このバンド1がウエスタンで反応するというのであれば、このLE2488のタンパク質と基本的には同じものであると考えられると、そういうふうと考えてよろしいですか。

○説明者 はい。

○中島専門委員 ありがとうございます。

○小関専門委員 その議論でいったときに、結局、24ページのところがそうですね。これでいったときに、抗体自身は上にかかっていますね。酵素製剤と書いてあるところで、確かに薄く出ています。図10では●●●なのですからけれども、図11では●●●見えるのです。

○説明者 この●●●と●●●がなぜ●●●と●●●なのかというのは説明できないのですけれども、上に出ているバンドが抗体に反応しているということは、これからは言えるのではないかと思います。

○小関専門委員 だけれども、再現性がないということも、これで言ってしまうわけですね。●●●と●●●になってしまっている。

○説明者 恐らく図10と図11で何が違うかといいますと、図10はpHがかなり低いところでまず反応させています。

○小関専門委員 これは酵素製剤と書いてあるのは0分ですね。そのレーンが図10の酵素製剤では1本です。下にも薄く見えます。

○説明者 見えていますね。

○小関専門委員 ●●●のところに。これに対して、図11はLpHera®、これが酵素製剤で

す。ここでは●●●見えます。だから、再現性がないです。

○説明者 それは恐らくバッファの違いかと考えています。

○小関専門委員 バッファの違いというのは、結局ローディングバッファをするときに、要するにSDSでたいてやるときに、そんなにそのバッファで変わるのだったら、タンパクの精製のときに非常に困ってしまう話です。

○説明者 恐らくその前の反応で、その違いが出ているのではないかと思います。

○小関専門委員 その前の反応ということを行っているのは、要するにコントロールが両方で背反していますねということを行っているのでしょうか。

○説明者 説明しますと、そのコントロールに使うバッファが図10ではpH2のバッファを使っています。図11ではpH7付近のバッファを使っていると。違いはそこしかないで、恐らくそのpHが低いと、●●●が出ていますね。低いから少し切れたのかもしれないという可能性もあるので、詳しくは調べていないです。その差を見ると、状況証拠からいくと、そういうことが言えるのではないかと思います。

○小関専門委員 変性させるときに、SDSとメルカプトを直接たたき込んで、それでやっただけ。すなわち、ほかのバッファは一切入れていないで、要するに変性バッファ。そうすれば、そこに1.2とpH7ぐらいというのはあるのですけれども、一般的には1.2ぐらいで、しかも、これは恐らくたいていだと思います。要するに温度を加温していると思います。となったときに、1.2で加温したから下のほうに出てくるということはあるかもしれませんが、通常タンパク質のことをやるのだったら、そのpHでやるのではなくて、一部サンプリングして、すぐにSDSメルカプトバッファに入れてやるはずで、そうすると、そのときにpHは1.2ではなくなっているはずだと思います。

○説明者 SDSのサンプルバッファに入れた時点では、そうです。

○小関専門委員 それでヒートショックをかけているわけだから、そのところで要するに前処理のpH1.2のところでのということなのかどうか。要するにサンプリングしてSDSバッファに入れて変性させたときに、そこをきちんと考えていかないと、本当にそれで間違いないのですね。このところの人工胃液のときには、1.2 SDSメルカプトで80℃くらいで10分やった。下のほうは中性でSDSメルカプトを例えば1%くらい入れてやったと言い切っているのですね。

○説明者 多分、今の説明を聞いていると、多少条件が違うのかなと思うのですけれども、どう説明すればいいかな。

○澤田座長 SDSで煮る前に、pHが持ち込みがあつて違うと言いたいのではないですか。

○説明者 そういうことではないです。

○澤田座長 SDSで煮るときのpH自身が違うのですか。

○説明者 反応させているわけなので、胃と腸の条件なので、pHは胃の条件と腸の条件でそれぞれ違います。コントロールにとるのであれば、胃ではペプシン、腸ではパンクレアチンが入っていないものを、同じpHですよ。同じバッファでその酵素が入っていないも

のをコントロールにとるべきです。

○小関専門委員 そうなっていますよね。要するにSDS-PAGE、CBBで染めたものだとペプシンバンドは製剤のほうに出いていませんからね。

○説明者 そうです。pH1.2で流すと、SDS-PAGEというのはpHの影響を結構受けますので、1回中和させて反応を止めているのです。それを反応サンプルもコントロールサンプルも全て同じ作業をやっています。止めてからサンプルバッファーを入れて、サンプルバッファー、SDS、メルカプトエタノール、それを入れて5分間ボイルして、それを流しています。

○小関専門委員 今おっしゃられたのは、中和していますね。

○説明者 中和します。

○小関専門委員 となると、1.2のところをやったからという説明と矛盾してしまうのではないですか。ちょっと整理してもらわないと、こちらも頭の中でぐるぐる回ってしまいます。

○説明者 私が言いたいのは、そのサンプルバッファーを入れる前、pH1.2のほうは中和する前です。反応を止める前に、そのpHの違いでバンドがもしかしたら途中、pHで切れるものが出てきて、それが後々に残ってきたのではないかと。

○小関専門委員 下のほうに出てきているものはね。だけれども、上のものが要するに図10では●●●で、図11では●●●あるのは何ですかというのが最初の疑問点でした。

○説明者 ちゃんと実験をしていないから恐らくとしか言えないのですが、pHの低いほうが、例えば●●●をつくっているのか何かわからないのですが、それを●●●に持ってきやすいのかもしれないです。

○小関専門委員 何で●●●になるのですかということが、みんなでクエスチョンマークが頭に浮かんでいるのですが。

○説明者 ●●●かどうかはわかりません。その上に反応しているものです。

○澤田座長 後日もう一度詳しく説明していただいたほうがいいと思います。恐らくタンパクの凝集の度合いがpHでちょっと違う可能性があるとおっしゃりたいわけですね。

○説明者 そうです。

○小関専門委員 だから、その凝集の違いがどういうサンプリングをして、どういうSDS、メルカプト処理をしたかによって大きく左右されるはずなので、そこを明確にしてくださいと、図10では下に●●●薄く出て、上には●●●。図11では上に●●●ということの説明になると思うのですが、今はそれに対する明確なお答えはいただけないという感じがします。

○説明者 そういうデータを今は持っていないので、正確に答えることは難しいです。

○澤田座長 それはまた後日お願いしたいと思います。ただ、純度が●●●%というのは、バンド2のことですね。

○説明者 バンド2のことを言っています。

○澤田座長 本当はもっと高いかもしれないということを意味しているわけですね。

○説明者 そうです。

○飯専門委員 ちょっといいですか。今のに関連して、SDSで変性させた後の●●●%が●●●サイズだということを言っているだけで、それは本当の純度ではないですね。使うときには変性していないものを使うわけだから、純度としてはもっと高いのかなと思う一方で、電気泳動ではスメアしているものが不純物です。それを考えて数字は書かないといけないのではないかと思います。

○説明者 そうですね。この方法でいきますと、SDS-PAGEで流してバンドを検出してという方法でいきますと、機械がバンドを検出していきますので、ほかにはバンドが見当たらなかったということだと思います。この方法がいいのかどうかというのはわかりません。今このころは毎回この方法でいっていますので、ここで変えるのがいいかどうかというのはわかりません。

○澤田座長 まずバクテリアから菌体の外に分泌するタンパクになっているわけですね。メインのタンパクが恐らくそのものだろうというのは確かだろうと思います。純度が●●●%という表現自身はどうですか。SDS上で●●●の純度は●●●%というのは正しいかと。

○説明者 そうですね。それが正確な表現だと思います。

○澤田座長 この際、ほかに質問がありましたら、お願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

では、どうもありがとうございました。

(説明者退室)

○澤田座長 それでは、審議に戻りたいと思います。ただいまの説明者からの回答も踏まえまして、さらに御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。

○児玉専門委員 今の説明ですと、変性しないと高分子のほうのバンド1がメインだということであれば、●●●なのか●●●なのかはちょっとわかりませんが、バンドが●●●本出ている図11を見ると●●●かもしれないなとも思ったのですが、アミラーゼでそういう●●●をつくるものが、ほかに例があるのかどうかは私もわからないのですけれども、そこを議論して、安全上は問題はないと思いますが、要旨上は少し議論していただいたほうがよくて、それで純度も今の考えからいくと、もっと高いということであるので、より安全上は問題ない方向に増えるかと思っておりますので、少しそこら辺の記載をしていただいたほうがよろしいかなと思います。記載というかディスカッションというか、微妙なところですけども。

○澤田座長 どこまで書くかという問題かもしれないですね。

○児玉専門委員 彼らも実験していないみたいなので、実験を追加で要求するほどではな

いと思うのですけれども、そういう●●●といますか、●●●といますか、そういうものをつくっている可能性については、一言述べていただいたほうがよろしいかなと思います。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

○小関専門委員 1点だけ、この実験をやった人に聞いてほしいことがあるのですけれども、さっき言ったpHが1.2というのであれば、ローディングバッファーを入れたときにBPBを入れているので、そのBPBが真っ黄色になっているはずなのですけれども、色は何色でしたかと聞いてもらえますか。そうすれば、答えになります。

○澤田座長 何点か御意見はいただいたのですけれども、安全上の問題は恐らくないと思いますので、評価書案のほうに移りたいと思いますが、よろしいでしょうか。事務局からお願いします。後日説明はいただくことにして、評価書のほうに入って問題はないかと思っていますので。

○勝田係員 それでは、評価書案について御説明をいたします。評価書案を束ねた冊子の1~18ページが本申請品目の評価書案になりますので、お手元に御準備の方、よろしくお願いいたします。

6ページ、I.として申請品目の概要になりますが、 α -アミラーゼの品質を高めるために宿主由来の α -アミラーゼ産生遺伝子を改変いたしました $amyLE2488$ 遺伝子を宿主である*Bacillus licheniformis* Ca63株に導入いたしまして、NZYM-AV株を作製しております。

II以降には、食品健康影響評価に係る個別の項目を記載しております。

第1の1の(1)、(2)及び(4)については記載のとおりです。

「(3)用途及び使用形態」についてでございますが、デンプンの α -1,4-結合を切断いたしまして、デキストリン等の製造時に加工助剤として利用されるとしております。

7ページ、2の(1)宿主の種名等についてですが、宿主は自然界から分離された菌株である*Bacillus licheniformis*のCa63株になります。

(2)DNA供与体の種名等についてですが、挿入遺伝子である $amyLE2488$ 遺伝子及び $prsA$ 遺伝子については、ともに*Bacillus licheniformis* Ca63株に由来いたします。

(3)挿入DNAの性質等についてですが、 $amyLE2488$ 遺伝子は酸性領域での耐熱性を有するようアミノ酸の一部に置換が導入されており、 $prsA$ 遺伝子は、菌体外分泌を促すタンパク質をコードしております。これらを含めた遺伝子の挿入には、インテグラーゼが用いられております。なお、目的物質である α -アミラーゼの生産性を高めるために幾つかの遺伝子を欠失させておりますが、こちらについては記載のとおりとなっております。

8ページの3、宿主の食経験、4、宿主の構成成分、5、組換え添加物等の性質については記載のとおりです。

6といたしまして、相違点についてでございます。従来添加物との相違点はアミノ酸置換により、酸性領域における耐熱性が向上していること。宿主その相違点は、 $amyLE2488$ 遺伝子により α -アミラーゼであるLE2488産生能を獲得したこと及び、その生産性を高め

るために幾つかの遺伝子を欠失させたことが相違点で、以上から本品目と比較可能な既存添加物があると記載しております。

9ページ、「第2 宿主に関する事項」になります。

1については記載のとおりです。

2、病原性等につきましては、宿主はバイオセーフティーレベル1に相当する旨を記載しております。

3、4については記載のとおりで、5、宿主の有害生理活性物質の生産に関しては、*Bacillus licheniformis*の近縁種である*Bacillus cereus*等は毒性物質を産生することは知られているものの、本宿主はこれらとは明確に区別されていることを記載しています。

「第3 ベクターに関する事項」については記載のとおりです。

10ページ、第4、挿入DNA等に関する事項になります。

1の(1)については記載のとおりです。

(2) 安全性につきまして、*Bacillus licheniformis* Ca63株は長年の使用経験があり、ヒトに対する病原性等は知られていないことを記載しております。

2の(1) クローニングに関する事項ですが、*amyLE2488*遺伝子はアミノ酸置換を目的として*amyL*遺伝子をもとに人工合成した遺伝子。*prsA*遺伝子は、宿主であるCa63株より得た旨を記載しております。

(2) については記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項ですが、1)、2)といたしまして、供与体及び遺伝子産物にアレルギー誘発性を示唆する知見はないことを記載しております。

続いて、3)として、当該遺伝子産物の物理化学的処理についてですが、①人工胃液においては30秒以内に消化されること。②人工腸液においては360分後も消化されないこと。③加熱処理については120分の加熱処理で基質非存在下では免疫反応性が約70%に減少するものの、基質存在下ではほとんど減少していない旨をそれぞれ記載しております。

4) 既知のアレルゲンとの構造相同性については検索の結果、相同性を示す既知のアレルゲンは検出されなかったと記載しております。

続く、3と4については記載のとおりです。

13ページ、5といたしまして、発現ベクターに関する事項ですが、(2) 目的外ORFの有無に関する項目をお願いいたします。遺伝子導入用ベクターにつきまして、stop to stopの30アミノ酸以上の条件で検索を行ったところ、合計で527個のORFが確認されました。これらについてデータベース検索を行いましたところ、相同性を示す既知のアレルゲンはなかったものの、毒性タンパク質については、その相同性について大きく分けて3つに分類される結果が得られておりますが、いずれについても毒性を持つ報告はないため、問題はないと記載しております。

(3) 及び(4) については記載のとおりです。

14ページ、6、DNAの導入方法については、標的遺伝子座に対してマーカー遺伝子を挿

入後、目的の遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターを用いることでインテグラーゼが発現し、その働きにより目的の配列が遺伝子座に挿入されると記載しております。

7、抗生物質耐性マーカーに関しましては、NZYM-AV株には組み込まれていない旨を記載しております。

第5 組換え体に関する事項、15ページの第6 製造原料等に関する事項及び第7の1については記載のとおりです。

第7の2といたしまして、組換え体の残存につきましては、ドットブロット分析の結果、組換え体DNAは検出されないことを記載しております。

3 非有効成分の安全性から、5 常成分の変動については記載のとおりです。

第8としては、以上、第7までの結果から安全性の知見は得られていると記載しております。

最後に「Ⅲ. 食品健康影響評価結果」としては、ヒトの健康を損なうおそれはないと結論づけております。

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、評価書案のほうにつきまして、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。添加物ということで、最初から最後一括でコメント、御意見がありましたら、お願いしたいと思います。

○北村課長補佐 事務局ですけれども、補足いたします。7ページの(2)と10ページの(1)、(2)のところで、先生にお送りした後に削除しているところがございますが、こちらのターミネーター、プロモーターの記載につきましては、12ページの318行目からの(1)、(2)、(3)のところに詳しく記載をするということで、先ほどの最初のほうからは削除して移動しております。

○澤田座長 それでは、御意見、コメントはいかがでしょうか。よろしいですか。

それでは、評価書案のほうにつきましては、大きな御意見はないようでありますので、先ほどいろいろと先生方から御質問が出ました点を照会して回答いただきまして、先生方と私のほうで確認した上で食品安全委員会に御報告して、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、次に「PLA-54株を利用して生産されたホスホリパーゼA2」についての審議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。

○勝田係員 それでは、申請者から提出されている申請書について御説明いたします。お手元に「PLA-54株を利用して生産されたホスホリパーゼA2」のプラスチックのファイルをよろしく願いいたします。

5ページ、第1の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。従来の同一添加物としては動物の膵臓を基原とするホスホリパーゼがあり、その概要が本ページの

(4) までに記載されております。

6ページ、第1の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) 宿主等の由来についてでございますが、宿主は*Aspergillus nidulans* GAM-53株で、こちらは*glaA*遺伝子が7コピーに多重化されたもので、自然突然変異によって得られた株となっております。

(2) DNA供与体等の由来につきましては、プロ*PLA2*遺伝子の供与体はブタの膵臓で、*amdS*遺伝子につきましては*Aspergillus nidulans*に由来しています。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、プロ*PLA2*遺伝子は、プロホスホリパーゼA2を発現し、その後、プロ配列が切断されることにより、成熟型ホスホリパーゼA2となります。*amdS*遺伝子は選択マーカーとして利用されますが、生産菌であるPLA-54株からは除去されております。両遺伝子とも●●●により、宿主に導入されております。

続く、第1の3及び4については記載のとおりです。

9ページ、第1の5では、当該GM添加物の性質等が記載されております。

(1) 有効成分等はホスホリパーゼA2となります。

「(2) 製造方法」、同ページ及び10ページの図4に記載のとおりで、生産菌は除菌工程により生産物である酵素から除去されているとのことです。

(3) 用途等につきましては、小麦粉中のリン脂質の分解など、とのことです。

11ページ、(4)といたしまして、有効成分等についてでございます。ブタの膵臓に由来するプロ*PLA2*遺伝子をクローン化して挿入しており、アミノ酸配列、タンパク質サイズとも従来添加物と同一であることから、その有効成分等も同一であるというような説明がされております。

12ページには、第1の6といたしまして、従来品との比較が記載されておりますが、(1)につきましては、先のとおり、従来品とアミノ酸配列及びタンパク質サイズが同一であるため、相違点はないとのことです。

(2) 組換え体と宿主の相違点につきましては、多重化した*glaA*遺伝子座のプロモーターとコード配列に欠失を持つことが両者の違いとなります。

同じく12ページ、第2の項目といたしまして、宿主に関する事項が記載されております。

1～4については記載のとおりです。

13ページの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、宿主菌及びその近縁種はオクラトキシンAなどを産生することが知られているものの、本生産菌の培養液には、そういった二次代謝産物が含まれていないことを記載しております。

14ページ、第3 ベクターに関する事項になります。

1及び2の(1)と(2)については記載のとおりです。

(3) 既知の有害塩基配列については含まれていないこと。

15ページ、(4) 薬剤耐性については、ベクターはアンピシリン耐性遺伝子を有するものの、当該配列は形質転換に使用されないため、当該耐性遺伝子が生産菌に含まれること

はないとのことです。

続く、(5)及び(6)も記載のとおりとなっております。

16ページ、第4として挿入DNA等の性質に関する項目です。

1の(2)安全性に関しましては、ブタの膵臓に由来するホスホリパーゼは長年安全に使用されており、それと申請品目は同一であること、また、*amdS*遺伝子の供与体である *Aspergillus nidulans*につきましても、バイオセーフティーレベル1に属することから、いずれも安全性には問題ないと考察している旨が記載されております。

17ページ、続く、2といたしまして、挿入DNA等の性質に関してですが、挿入遺伝子のうち、*amdS*遺伝子につきましても、生産菌株から除去されているため、ここではプロ *PLA2* 遺伝子について記載がされております。

(1) クローニングの方法につきましては、豚の膵臓組織からホスホリパーゼA2をコードいたします mRNA を単離いたしまして、そこから生成した二本鎖 cDNA をベクターに挿入し、形質転換した後、目的のプラスミドを PCR 法により増幅することで目的遺伝子を得ております。

(2) につきましても記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能についてですが、ここでは供与体と遺伝子産物のアレルギー誘発性の有無を確認するため、通常であれば、人工胃液あるいは腸液による消化性試験、また熱安定性試験などを実施しておりますが、本品目につきましては第1の5の(4)で御説明いたしましたように、従来添加物であるブタの膵臓由来の品と同一であるとのことから、そのことをもって当該項目の検討を省略しております。

続いて、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) につきましても記載のとおりです。

(3) その他の配列についてですが、次のページに行きまして、挿入DNAの発現制御のために *glaAtr* 遺伝子及び *KEX2* 遺伝子が挿入されております。

20ページの4及び22ページの5の(1)については記載のとおりです。

22ページの5の(2)として、目的外 ORF の有無についてでございますが、stop to stop で30アミノ酸以上の条件で検索を行った結果、新たな ORF が合計で13個検出されたものの、これらは既知のアレルゲンと比較して問題となる結果はなかったと記載されております。

既知の毒性タンパク質との比較でございますが、検索の結果、こちらはヘビ毒の一つとされておりますホスホリパーゼA2と相同な配列が検出されたものの、プロ *PLA2* 遺伝子内部の配列であったと事実関係のみが記載されております。説明として、この内容で十分か後ほど御議論いただきますと幸いです。

23ページの5の(3)及び(4)については記載のとおりです。

23ページの6、DNAの宿主への導入方法についてでございますが、まず、宿主である GAM-53株の *glaA* 遺伝子座にコード配列等を欠失した Δ *glaA* 遺伝子を構築いたしまして、その各々を異なる制限酵素部位で標識することで●●●500株を作製します。次に、*pepA*

遺伝子等を不活性化することで●●●502株を作製いたします。その後、目的遺伝子の発現ユニットを●●●によって導入し、マーカー遺伝子が除去された個体の選抜等を経て、生産菌であるPLA-54株を得ると説明されております。

詳細につきましては、28ページの中段までを御参照ください。

続く、第4の7につきましては、ベクターにはアンピシリン耐性遺伝子が含まれているものの、最終生産菌には含まれていない旨が記載されております。

続きまして、28ページ、第5 組換え体に関する事項になります。こちらは記載のとおりとなっております。

29ページ、第6 製造原料等に関する事項ですが、ホスホリパーゼA2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。

30ページ、第7 組換え添加物に関する事項ですが、本品は1にありますように、既に諸外国で販売実績があること。2にあるように、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。

続く、3～5については記載のとおりで、最後の第8では、以上、第7までの結果から、安全性が確認できたため、追加の事項等はなく、本品目は安全である旨が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、項目ごとに御意見をいただきたいと思います。

まず、申請書の15ページまでで、第1、第2、第3のところ御意見、コメントをいただければと思います。

○児玉専門委員 事務局のほうで、もしわかれば教えてほしいのですが、11ページの(4)の「①両者のアミノ酸配列は同じあること」ということで出てくる、このアミノ酸配列ですけれども、これは製品といいますか、それを実際にアミノ酸シーケンスにかけて出てきた配列なのか。それとも単純に遺伝子配列から変換しましたという配列なのか。

○松井技術参与 ●●●がブタスペシフィックなアミノ酸配列で、それを確認したということですから、その短い領域のアミノ酸配列は読んでいると思いますが、全長について製品のアミノ酸配列を読んだという記載は情報がないです。

○児玉専門委員 そうすると多分、製品中の●●●は実際にシーケンスを読んで、あとは推定ということですか。

○澤田座長 推定でもよろしいですか。

○児玉専門委員 ●●●が読んであれば、まあいいかなと思います。

○澤田座長 ●●●が●●●つあって、●●●が切れるわけですね。そこは一応見ておいたほうかもしれないということはあるかもしれないです。

ほかはいかがでしょうか。

それでは、続きまして、第4の16～28ページまで御意見、コメントがございましたら、

お願いしたいと思います。

○児玉専門委員 18ページのところで、先ほど説明があったように、胃液と腸液の消化性試験を省略しているということなのですから、同じだから省略をしていいかと最初は思ったのですけれども、11ページのところの●●●を見ると、●●●がありますね。多分この●●●は何ですとかと言っても恐らく何も答えは返ってこないのかなと思ひまして、その意味だと胃液、腸液の試験をやっただけであれば、この●●●も全て分解されますとかいうデータが出てくると、安全性上はかなり問題ないかなと思ったのですが、そこまでの試験をやる必要があるかどうかというところがあるかなと思うので、できれば皆さんから御意見をいただければと思います。

○手島専門委員 私も11ページの図では、この純度が何%になるかということなのですから、●●●が見えているので、少なくとも人工胃液の実験はやっていただきたいと思いました。

○澤田座長 この●●●が宿主由来だったらいいのでしょうか。そういう情報があれば、まだいいかなと思うのですけれども。

○小関専門委員 これを読んでいて、私も一瞬そう思ったのですけれども、先生がおっしゃるとおりで、これが宿主由来であったときに、あるかどうか。宿主を入れていないものを一緒に流してもらって、人工胃液でやっても、もともと宿主が持っているタンパク質は胃液に強いものは残ってしまう可能性があるのも、もしも胃液の実験をやるのだとすると、非組換え体とこの組換え体とでやらなければいけないし、情報としては恐らく非組換え体の●●●に対して、非組換え体だとここに●●●が出てくるだけで、あとは同じです、いいのではないかという気はします。要するに*niger*ですから、今まで食べてきているので、宿主としてはタンパク質はあったとしても問題はないというふうには感じていたのです。

○澤田座長 ただ、今から言ってデータが出るかというのは難しいかもしれないですね。これはもう何年も前の製品で、実際にはヨーロッパでかなり長く使われているわけです。

○児玉専門委員 非組換えのものを用意しろというほうが多分しんどいと思います。

○小関専門委員 ですから、要するにディスカッションとして、ここに裏に出てくるものは考えられるものとして、入れたものは製造由来のものしかないし、それは間違いなく既存で食べてきたものであるから安心ですよ。そのほかができるタンパク質は*niger*由来ですね。それは食べていますよねということで、バンドは見えるけれども、それは宿主由来と考えるのが順当で、それは宿主がずっと食経験があるからいいのだというディスカッションを加えてもらえれば、私はそれでいいかなと思っていました。

○澤田座長 データなしでオーケーにできるかという話ですね。これは海外で何年くらい使っているのですか。

○勝田係員 早いところだと、フランスでは2002年にもう許可がされておりますので、かれこれ15年弱くらいは使用されている実績はあるものかと思ひます。

○澤田座長 アレルギーの問題は、報告はされていないですか。

- 勝田係員 そういった報告はないということは聞いてはおります。
- 澤田座長 そういう状況で、そこまで言えるかどうかという話はあるかと思えます。いずれにしても、この不純物の安全性に関しまして、説明はしていただきたいと思えます。
- 児玉専門委員 もう一点よろしいですか。23ページの(3)の5行目「生産菌株に*E.coli* DNAが含まれていないことは、サザンブロット解析により確認されている」というところの文章が16ページの図に由来するのだと思えますけれども、16ページの図でやっているプローブは●●●のプローブはやっていないので、こういうことは言えないのではないかなと思ったのです。
- 松井技術参与 そうしましたら、言い方を変えて、ベクターの名称とかということで対応します。
- 澤田座長 それは説明を直していただくということで、ほかはよろしいでしょうか。
- 山川専門委員 ちょっと前のほうになってしまって申しわけありませんが、9ページ、10ページもそうですけれども、最後に顆粒製品と液体製品で精製が違ってきます。液体のほうはクロマトグラフィーによる精製とありますけれども、さっき不純物についての説明が要りますねと言ったのは、では、何を精製したのですかと。恐らく液体の酵素製品なので、酵素の溶けなかった部分を除いたのだと思うのですけれども、それがどこに由来するかというと、この●●●を●●●でしたか。●●●を加えた後、静置して、それで出てきた分をとっているわけなので、菌体由来なのか、酵素の溶けなかった部分なのか。菌体由来だったら、それはさっき小関先生がおっしゃったように、安全なものだったから大丈夫ですというような説明が要るのかなと思うのです。
- 勝田係員 11ページの図5について1点補足をいたしますと、●●●というものがどういう素性のものかというのを確認しましたところ、●●●だということは聞いております。
- 山川専門委員 そうすると、この●●●のほかに、さらに溶けなかった精製された分は、顆粒製品のほうには入っているということですね。
- 勝田係員 顆粒のほうは液体とは違って精製の工程が少ないという意味においては、そういった可能性はあるものかと思っております。
- 山川専門委員 何か説明していただければいいのかなと思えます。そうしないと不安のもとです。
- 勝田係員 申請者のほうには、後ほど確認をしてみたいと思えます。御指摘いただき、ありがとうございます。
- 澤田座長 このクロマトグラフィーと書いてあるのは、何かよくわかりません。でも、いずれにしても、小麦粉を加えてあるほうは精製ステップが少ないわけですね。
- ほかはよろしいでしょうか。
- 飯専門委員 22ページのオープンリーディングフレームに関するところですが、ブタ由来の配列のところのコードしている部分は、初めから無視してしまっているのかなと。ジャンクションのところだけに限定して調べているようにしか見えないのですけれど

も、もともとホモログスな組み合わせで入ってきている部分はいいのかなと思うのですが、一応これはブタ外来由来の部分なので、その部分を含めたデータでないと、今までと整合性がとれないのではないかと思ったのですけれども、どうなのでしょう。

○松井技術参与 実際の生データは挿入した領域全部について調べていまして、●●●個のORFが検出され、その中でジャンクションをまたがるものが13個だということで、13個以外についての議論はないようです。

○飯専門委員 ORFがたくさんあるという点については、データは確かにあるのですが、それらのORFとホモロジーのあるものはないかと言ったときに、ORFとしてジャンクションをまたいでいる場合しか選んでいないのかなと思えたのです。ブタの配列に対してのホモロジーサーチが見当たらなかったのですけれども、それは今まではやってもらっていたような気もしたもので、どうなのでしょう。

○澤田座長 ジャンクションはやってあるのですか。

○飯専門委員 ジャンクションの結果しかないのかな。

○澤田座長 その哺乳動物のそういう配列は、ORFは特にやらなくてもよろしい場合が多いのではないのでしょうか。

○飯専門委員 それは今までのやり方がどうだったかです。

○澤田座長 多分そういう例が余りないですね。哺乳動物由来のジーンをそのまま使っている例が余りなかったです。

○飯専門委員 このタンパク質のORFは別に問題はないと思っているのですけれども、それとは違うフレームです。今まで一応確認してくださいみたいなことをやってきた部分。その辺はこれでいいのかどうか気がなったのです。

○小関専門委員 動物由来と言ったら、一番最初にキモシシしかないような気がします。あのときに何を見たかで、あれは厚生労働省でガイドラインの時点で見えていますけれども、食品安全委員会になったときに、ここでapprovalしているはずです。ですから、すごく古い話ですけれども、あそこで何をしたら、私は実はそのときは立ち会っていないのでわかりません。

これは多分ここで議論をしてもあれだと思うので、事務局のほうでお調べいただいて、それから座長経由でお話しいただく、あるいは座長に御判断をいただくというのでいかがでしょうか。

○北村課長補佐 過去の事例を確認いたします。

○澤田座長 事例がない可能性があるかもしれません。

追加でほかはよろしいでしょうか。

それでは、最後の31ページまでで御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。●●●個入れる話ですけれども、これは前に1回出たことがある方法と全く同じなのですが、たしか途中まで全く同じ菌を使っていて、そのときも非常に複雑でよくわからないところが多かったような覚えがありますけれども、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 27ページの今、座長がおっしゃられた点に関してですけれども、フラッグ法は確かに二度目にお目にかかった方法ですが、今回は全部に置き換わっているわけではなくて、途中で止まったのか、途中のものを使っているのかはよくわからないのですけれども、結局●●●のところはそのままですよという形のように読みとれるのですけれども、これはこの後、自然にここに置き換わっていくような気もするのですが、その安定性はどういうことになっているのかというのはわからないなど。ずっとこのまま固定されているものなのかどうかというのが。

○澤田座長 これは恐らくセルバンクシステムで、マスターセルバンクみたいなものをつくって、そこからワーキングバンクをつくって、という方法でつくることが多いと思います。かなり違うものができるわけではないとは思いますが、最初につくってから10年後につくったものと、どのくらい安定しているかというのが御質問かと思しますので、そこら辺は説明をしていただきましょうか。自然に多重化してしまうと書いてあるので、どのくらい安定かという説明が必要かと思えます。

ほかに最後までで御質問はいかがでしょうか。

○飯専門委員 30ページの真ん中あたりの「2 組換え体の残存に関する事項」のところですが、添付資料はPCRで調べている結果で、最近スタンダードはドットプロットしてもらっているかなと思うところなのですが、そうでなくても、生産菌が残存していないということに関して担保するような説明か資料があるか、どちらかはつけてもらったほうがいいのかと感じたのです。

○澤田座長 従来はドットプロットでオーケーになっていませんでしたか。

○飯専門委員 これはPCRである特定のプライマーセットで見ているだけだと思うのです。

○澤田座長 それよりも感度がいいわけですね。

○飯専門委員 ドットプロットのほうがもっと幅広いです。

○澤田座長 PCRでも、限られたPCRだとわからないとおっしゃりたい。

○飯専門委員 そうですね。少なくとも添付資料はそういうものしかついていなかったもので、なければ生存菌が残存していないということは常に全てのロットでチェックしていると思しますので、そのことできっちり担保できるのだったら、文章だけではなくて、何かつけておいてもらえるかということかなと思います。

○澤田座長 これは生きた残存菌がないことを言う必要は。

○飯専門委員 普通いないとは。でも、ゼロかどうかと言われるとどうなのか、何匹以下みたいなデータしか出てこないのかもしれないですけれども。

○小関専門委員 これは死菌であろうが生菌であろうが、いないということが前提です。いたら、組換え微生物のガイドラインで、安全性評価で評価していかないといけなくなります。

○手島専門委員 このところで添付資料31のデータを少し入れて、生産菌由来の部分を

見ているのだということ、少しデータを入れるような形で書き方を変えてみたらいかがでしょうか。

○小関専門委員 ここは要するに、彼らは勘違いをしているのです。組換え体の残存ということが、生産菌のことしか考えていない。要するに生存菌のことしか考えていなくて、死菌も入っていてはいけないのだというのがこのガイドラインなのです。もう一度よく読み直してくださいと言って、書き直しをしてもらうということは大事だということです。そのときにPCRで見れば、死菌であってもDNAがあれば出てきてしまいますよねということが言えるということです。

○澤田座長 ここは表現を含めて直す必要があるかと思しますので、後で直していただきたいと思います。

31ページまでで、ほかにコメント、御意見はいかがでしょうか。

それでは、幾つか指摘はありましたけれども、安全性上の問題は特にないかなと思いますので、並行して評価書案の審議も行いたいと思います。

○池田評価情報分析官 確認だけさせていただいてよろしいですか。不純物の安全性について説明を求める部分が最初のほうに、11ページあたりとかにあったと思うのですが、そこも含めて大丈夫でしょうか。

○北村課長補佐 今、座長のほうから、安全性には問題ないので評価書の確認ということだったのですが、最初の不純物については、後から確認すればいいということでよろしいですか。

○澤田座長 その説明をしてもらっても、多分結論は変わらないかなという話かと。

○小関専門委員 ですから、先ほど私が申し上げたのは、最後の議論になってきたときに、今までに動物由来のものはあったのだろうかという話になって、それはキモシンが唯一の例としてありますよねと。そのときにどう見たかということを見て、それで、このときにこれを見て、要するに事務局で確認をしていただいて、座長と先生方に見てもらって、問題がなければ、それで従前にもそうでしたよねということで、親委員会のほうに上げてもいいのではないですかという形でまとめたと思います。

○北村課長補佐 ありがとうございます。

○山川専門委員 さっき私が言ったところですがけれども、31ページの4の精製方法の事項で、クロマトグラフィーにより、さらに何々を除かれると書いてあるので、その除かれるのは何ですかと言われたときに困るから、それは説明できるような言い回しだったら大丈夫だと思います。

31ページの「4 精製方法及びその効果に関する事項」で「さらにクロマトグラフィーによる精製を行う」。その精製で除かれたものは何ですかということですか。

○手島専門委員 顆粒だったら、溶液ではクロマトにかけて除かれるものが入ってきているということの意味しているということですか。そういうことを含めてですか。

○山川専門委員 はい。

○北村課長補佐 クロマトグラフィーでどういったものが除かれるかということですか。
○山川専門委員 はい。多分、酵素の溶けなかった部分、要するに不溶部分を除いているのだと思うのですけれども、それだったら大丈夫ですけれども、それがわかるような書きぶりでないという疑問が残ってしまうので、それを担保できるような書き方だったら大丈夫だと思います。

○北村課長補佐 わかりました。

○児玉専門委員 そうすると、先ほどのキモシンのときに胃液、腸液をやっていたら、これはやるということですか。

○小関専門委員 ですから、仮定で話をするのはやめましょう。まずは一度冷静に、どういふふうをやっていたのかなと見てから、それを座長と事務局のほうできちんと確認していただいてから話をしましょう。そうしないと仮定の話をして変な方向にぐらぐら揺れるだけで、現時点において事態は一向に進展しないと思います。

○澤田座長 基本的に海外での使用実績も長いこともありますので、安全上の問題は恐らくクリアできるものかなと思っていて、回答が来て、記載整備上の対応になる可能性は高いと予想されますので、評価書案もやっておいてもよろしいのかなと思うのですけれども、いかがでしょうか。

○勝田係員 それでは、今、座長からお話のあったように、評価書案の方も併せて御審議いただければと思います。評価書案を束ねた冊子の今回は19～34ページが本申請品目であるホスホリパーゼA2の評価書案になります。

24ページ、I といたしまして、本申請品目の概要になります。生産性を高めるためにブタの膵臓由来のプロPLA2遺伝子を宿主である*Aspergillus niger* GAM-53株に導入いたしまして、PLA-54株を作製し、当該株により生産されたホスホリパーゼA2であるとしております。

II以降には、食品健康影響評価に係る個別の項目を記載しております。

第1の1の(1)、(2)及び(4)については記載のとおりです。

「(3)用途及び使用形態」についてでございますが、リン脂質を加水分解する酵素で、パンの品質改良等に使用されると記載してございます。

25ページ、2の(1)宿主の種名等についてですが、宿主は*Aspergillus niger* NRRL3122株の突然変異株であるGAM-53株になります。

(2) DNA供与体の種名等ですが、プロPLA2遺伝子はブタの膵臓に、*amdS*遺伝子は*Aspergillus nidulans*にそれぞれ由来いたします。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、プロPLA2遺伝子は、プロホスホリパーゼA2を発現し、その後、プロ配列が切断されることにより、成熟型ホスホリパーゼA2となります。*amdS*遺伝子は選択マーカーとして用いられるものの、生産菌からは除去されます。これらの遺伝子は相同組換えにより染色体に組み込まれております。

3、宿主の食経験、4、宿主の構成成分及び5、組換え添加物等の性質については記載の

とおりです。

26ページ、6の相違点になります。従来添加物であるブタ膵臓由来のホスホリパーゼとアミノ酸配列及びタンパク質サイズが同一であるため、従来添加物との違いはないこと。宿主との相違点は*glaA*遺伝子の欠失、プロ*PLA2*遺伝子の多重化等によりホスホリパーゼA2の高生産能を獲得している点とそれぞれ記載しております。

27ページ、第2といたしまして、宿主に関する事項になります。こちらは、まず1については記載のとおりです。

2、病原性等につきましては、宿主はバイオセーフティーレベル1に相当している旨を記載しております。

3、4については記載のとおりです。

5、宿主の有害生理活性物質の生産に関しては、*Aspergillus niger*を含む*Aspergillus*属の類縁菌ではオクラトキシン等を産生するとの報告がありますが、本生産菌ではこういった物質が産生されないことを確認した旨が記載しております。

「第3 ベクターに関する事項」については記載のとおりです。

28ページ、第4といたしまして、挿入DNA等に関する事項になります。

1の(1)については記載のとおりです。

(2) 安全性につきましては、動物の膵臓由来のホスホリパーゼは安全に使用された経験があること。また、*Aspergillus nidulans*はバイオセーフティーレベル1に相当する旨を記載しております。

2の(1) クローニングの方法についてですが、豚の膵臓組織よりプロホスホリパーゼA2をコードするmRNAを単離いたしまして、cDNAとしました後、プラスミドpPG4としてクローニングし、これにより得たと記載しております。

(2) につきましては記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項も記載のとおりとなっておりますが、こちらについては、通常、人工胃液、腸液による消化性試験を実施しておりますが、本品目では要旨の際に御説明いたしましたとおり、従来のホスホリパーゼA2と同一であるため、これらの試験は実施しておらず、それにかかわる記載も省略しております。

続く、3、4についても記載のとおりです。

29ページ、5、発現ベクターに関する事項ですが、30ページの(2) 目的外ORFの有無に関する項目をお願いいたします。遺伝子導入用ベクターについて、stop to stopの30アミノ酸以上の条件で検索を行ったところ、合計13個のORFが検出され、うち1つのORFがヘビ毒に分類されるホスホリパーゼA2と相同性が見られたものの、遺伝子挿入による新たなORFではなく、従来のプロ*PLA2*遺伝子中にも認められる配列であったと記載しております。

続く、(3) 及び(4) については記載のとおりです。

31ページの6、DNAの導入方法につきましては、宿主であるGAM-53株の*glaA*遺伝子座

にコード配列を欠失した $\Delta glaA$ 遺伝子を構築し、その各々を異なる制限酵素部位で標識すること及び、*pepA* 遺伝子等を不活性化することによって中間株を作製し、その後、目的遺伝子の発現ユニットを形質転換法により導入し、マーカー遺伝子が除去された個体が選抜等を経て生産菌である PLA-54 株を得ると記載しております。

7 抗生物質耐性マーカーに関しては、PLA-54 株に含まれていない旨を記載しております。

第5 組換え体に関する事項、第6 製造原料等に関する事項及び32ページの第7の1については記載のとおりです。

2、組換え体の残存につきましては、定量PCRの結果、組換え体DNAは検出されていないことを記載しております。

続く、3、非有効成分の安全性から、5、常成分の変動については記載のとおりです。

第8といたしまして、以上、第7までの結果から、安全性の知見は得られていると記載しております。

最後に「Ⅲ. 食品健康影響評価結果」としては、原案では空欄ではございますが、ヒトの健康を損なうおそれはないと結論づけ、その旨を記載させていただければと思います。

説明は以上になります。

○澤田座長 ありがとうございます。

評価書案について御意見、コメントをいただきたいと思います。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。一括で最初から最後まで御意見、コメントがございましたら、お願いしたいと思います。

○児玉専門委員 24ページの82～86行目のところですが、非常に細かいところですが、ECナンバーとCASナンバーは入れておいたほうが、はっきり同定できるので、よろしいかと思います。

○勝田係員 これまでの例にならって、ECナンバー等も記載いたします。どうもありがとうございます。

○澤田座長 ほかはよろしいですか。

○児玉専門委員 もう一つよろしいですか。これは言ったほうがいいのか悪いのかはよくわからないのですけれども、28ページの238行目ですが、供与体と言った場合にブタ臍臓というのは、ここはブタなのかなと思ったのです。生物名を言うのが普通かなと思うのですけれども、どうですか。

○澤田座長 ブタでしょうね。

○北村課長補佐 ブタに修正いたします。

○澤田座長 ほかはいかがですか。よろしいですか。

それでは、大分これを上に上げる前に解決しなければいけない問題が何点かありまして、それをまずいただいて、問題がない場合には、食品安全委員会のほうに御報告するという形にしたいと思います。どうもありがとうございました。

それでは、議題（1）についてはこれで終わりたいと思いますけれども、議題（2）の「その他」につきまして、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。

それでは、本日の議題についてはこれで終了となります。

以上をもちまして、第142回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会させていただきます。どうもありがとうございました。