

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第170回) 議事録

1. 日時 平成30年1月25日(木) 13:59~17:21

2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)

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

- ・GOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ
- ・JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
- ・JPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、岡田専門委員、小関専門委員、児玉専門委員、鈴木専門委員、手島専門委員、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)

小平事務局次長、池田評価情報分析官、内海課長補佐、森山評価専門官、山口係長、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

- ①GOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ
- ②JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
- ③JPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ(食品添加物)
- ④JPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ(飼料添加物)

6. 議事内容

〇〇〇 それでは、皆さん、おそろいようですので、ただいまから第170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等について」に基づいて非公開で行います。

本日は、所用により〇〇〇は御欠席です。

本日の議題ですが、継続品目であるGOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ及び新規品目であるJPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ、JPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼの安全性についての審議です。

それでは、お手元の資料の確認をいたします。事務局からお願いいたします。

〇〇〇 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。

配付資料ですが、議事次第、座席表、専門委員名簿、食品健康影響評価に関する資料。

机上配布資料としまして、GOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼの申請資料の差し替え、JPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼの参考資料となっております。

なお、これら以外の参考資料につきましては、ファイルに綴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、新規品目のJPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ及びJPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼの申請者でありますノボザイムズジャパン株式会社の方をお呼びしております。申請品目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。

〇〇〇 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いたします。

〇〇〇 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ご報告いたします。本日の議事につきましては、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。

〇〇〇 既に御提出いただいております確認書について、その後、相違等ございませんでしょうか。

(「相違なし」と声あり)

それでは、まず継続審議品目であるGOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼについて審議を行いたいと思います。

本品目は、平成29年9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す。

それでは、事務局のほうから説明をお願いいたします。

〇〇〇 申請者から提出されております指摘事項への回答を説明させていただく前に、本品目の生産菌株の作製目的に関して、補足の説明がございます。

当初の申請資料では、本菌株の作製目的として、「グルコースオキシダーゼの生産性を高めること」と記載されておりましたが、昨年9月の調査会での指摘事項におきまして、本品目の基質特異性について説明を求めましたところ、このブルーのファイルの回答書の冒頭でございますとおり、グルコース以外の広範囲の糖に作用し、かつ、適度な温度安定性を持つグルコースオキシダーゼを野生株の中から探索し、その上で、当該グルコースオキシダーゼの生産性を高めるために遺伝子組換え技術によって生産宿主に導入したとのことでした。これに伴いまして、申請資料の所要の部分に追記修正が行われています。具体的には、この回答書の2ページと3ページになりまして、この根拠といえますか、背景資料として参考文献の追加1、国際特許に関する資料が提出されております。

一方で、この国際特許の中でも「糖質酸化酵素」というような名称で記載がされているのですが、このようにグルコース以外の例えばマルトースやマルトオリゴ糖、ガラクトース等の広範囲の糖に作用する酵素を果たしてグルコースオキシダーゼとして取り扱うことが適当かどうかというところで疑義が生じておりまして、この点について、念のため厚生労働省に確認を求めているところです。

本日ですが、あくまで、この申請品目がグルコースオキシダーゼに該当するものであるということを前提として、指摘事項に対する回答の御審議をいただきたいと思っております。ただ、厚生労働省の整理如何によっては、今後、改めて評価依頼がなされることもあり得るということを御承知おきいただけると幸いです。このような進め方で御異論がなければ、回答書の説明に移らせていただきたいと思いますがいかがでしょうか。

〇〇〇 よろしいでしょうか。

お願いします。

〇〇〇 それでは、回答書をおめくりいただいて4ページ目からになります。

指摘事項1でございます。要旨の中で製造方法の記載がございましたが、この組換えで得られたAcGOについて、「従来のグルコースオキシダーゼと同様に」と記載されておったのですけれども、実際には加熱処理及びpH処理工程等が異なるため、適切な説明に修正することというような指摘に対しまして、こちら、下の黄色でハイライトしている箇所の追記、修正がなされてございます。

続いて、指摘事項2になります。「有効成分の性質及び従来の添加物との比較」におきまして、分子量に関する記載がございました。●●●ものであるというように結論をされているのですけれども、実際には添付資料9の中で、この実験の詳細が記載されておったのですが、要旨のほうで説明が不足をしておりましたので、この追記を求めたところです。

この回答としまして、実際には次のページになるのですけれども、図5のaは当初、申請要旨の中に含まれていたものです。

一方で、次のページになりますけれども、図5のbとして●●●をしたSDS-PAGEの結果が添付資料9から転記をされてございまして、これにより、タンパク質バンドが●●●に収束したことから、糖鎖修飾の相違により2本のバンドが出現したということで結論が得られております。さらに、全自動たんぱく質の一次構造分析装置を用いてN末端アミノ酸配列解析を行った結果、●●●及び糖鎖を除去した●●●のタンパク質がAcGOのN末端アミノ酸配列と一致することを確認したとあります。これらの結果から、電気泳動的に従来のグルコースオキシダーゼは●●●、AcGOは●●●であると結論したと追記がされてございます。

続いて、諸性質比較に関して、当初、従来のグルコースオキシダーゼとAcGOの至適pH、pH安定性、至適温度、温度安定性に関する実験結果が記載されておりましたが、詳細な実験条件の記載がございませんでしたので、要旨のほうに追記を求めたところ、こちらの黄色ハイライトのように一通りの記載がされてございます。

9ページの下段になります。指摘事項3ですけれども、遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点におきまして、●●●によると、AcGOは●●●と理解されるのですが、この点について要旨に説明を追記することと指摘を行いました結果、以下、黄色ハイライトのとおり、●●●旨、記載されてございます。

10ページになります。同じく指摘事項3ですが、従来のグルコースオキシダーゼと組換えで得られたAcGOのアミノ酸配列のアライメントの結果が図7として記載されておりますけれども、こちらにグルコースオキシダーゼ活性を有する領域の情報を追記することということで情報を求めてございます。

その結果ですけれども、11ページ、緑色のハイライトのアミノ酸残基が推定される活性部位であるということで追記されております。この点に関しまして、12ページになりますけれども、従来のグルコースオキシダーゼとアクレモニウム由来のAcGOがアミノ酸の相同性が必ずしも高くないため、●●●が行われております。

13ページ、指摘事項3の続きになりますけれども、これが冒頭に申し上げたAcGOのグルコースオキシダーゼ以外の酵素活性を有するか否か、基質特異性について文献情報や実験結果等をもとに考察を加えることという指摘に対しまして、回答がなされております。当初、先生方にお送りをしていたものから若干追記がございましたので、この部分の差し控え資料として机上配布資料の1の部分をお参照ください。

黄色ハイライトの部分が追記された内容になります。このAcGOですけれども、グルコースのほか、マルトース、マルトトリオース、マルトテトラオース、ラクトース、ガラクトース、セロビオースに作用するということが記載されております。それぞれの用途において、例えば卵白の脱糖をする場合ですけれども、グルコン酸と過酸化水素に分解をされる。グルコン酸はpH調整剤として一般に用いられる食品添加物である。グルコン酸製造に用いる場合も基質はグルコースであって、グルコン酸以外の糖酸が生成する可能性は低い。

製パン用途におきまして、反応生成物としてグルコン酸以外に、マルトースより生成するマルトビオン酸、マルトトリオース、マルトテトラオースより生成するマルトトリオン酸、マルトテトラオン酸について、安全性上問題ない旨が記載されております。

さらに追加として、ラクトースより生成するラクトビオン酸、ガラクトースより生成するガラクトン酸、セロビオースより生成するセロビオン酸についても、それぞれ安全性上問題がない旨の記載がなされております。

続きまして、もとの青色のファイルのほうに戻っていただきまして、14ページになります。指摘事項4になりますが、こちらは記載整備上の修正になりますけれども、「ウリジン要求性が復帰している」という記載が誤解を与えるということで、「ウリジン非要求性となっている」といった記載に修正がなされております。

15ページ、指摘事項5になりますが、この生産宿主のアスペルギルスに関しましては、 α -アミラーゼを産生することが知られておりまして、これがアレルギー性を有するとの知見があります。もともとの申請要旨には、「 α -アミラーゼを用いたパンを摂取することで食物アレルギーを生じた事例はないものと思われる」といった記載がされておったのですが、実際に参考文献等において、パンを摂取することによる食物アレルギーの事例が示されていることから、適切な表現に修正することと指摘をしまして、「食物アレルギーを生じた事例は非常に稀である」、「安全性に問題はないと考える」といった旨の記載に修正がなされております。

16ページ、指摘事項6になりますけれども、これも記載の修正になります。ADFSを用いた相同性検索を行っておりますので、「スライディングウインドウ検索」ではなく「相同性検索」に記載の修正がなされております。

18ページ、指摘事項7になります。「DNAの宿主への導入方法」に関して、記載の不足がございましたので、こちらについて詳細に記載をすることという指摘に対しまして、黄色でハイライトしたように具体的な導入方法の記載がなされてございます。

下、指摘事項8になります。このGOOX-1株のゲノムDNAについて、ゲノムドラフト解析を行い、挿入箇所の同定やコピー数の推定が行われていますが、網羅的な解析ではないため、意図しないDNA断片が宿主ゲノムに挿入されている可能性が否定できないということで、このゲノムと適切に設計したプローブを用いたサザンブロット分析等により、意図しないDNA断片の挿入の有無を明確にすることと指摘をしまして、これに対しまして、この下段からなるのですけれども、*AchGOX*遺伝子及びマーカーとして導入しております*pyrG*遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析が行われ、この結果が19ページ、20ページに記載されてございます。この結果でもって補完することによって、ゲノムドラフト解析で未解析の領域への挿入カセットDNA断片の挿入の可能性は極めて低いと考えられた旨の考察がなされております。

21ページ、「その他」でございまして、1点目は記載整備上の修正でございまして。

その次、要旨の22ページの部分ですけれども、反応副産物として過酸化水素が産生する

ということですが、この点に関して、安全性上の問題がない旨の記載が追記をされてございます。

申請者からの回答書の説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、指摘事項に対する回答書につきまして、先生方から御意見いただきたいと思っております。

まず、この冒頭に説明ありましたとおり、この酵素、実は非常に基質特異性の範囲が広がっております、グルコースオキシダーゼという名前でもよろしいのかどうかという点で、この点につきましては、先ほど事務局から説明がございましたとおり、今、ポールは厚生労働省のほうに行っております、本審議会では、これがグルコースオキシダーゼでよいということを前提に審議すればよいということになってございます。ということは、これが後ほどひっくり返りますと、また改めて厚生労働省のほうから違う酵素の名前になって再審議依頼が来るということになります。仕方がないかなと思うのですが、この手元には、いろいろな基質、それぞれの基質に対してどのぐらいの活性があったかとか、そういったデータはございませんので、この場でそれについて議論することはあまり意味がないと思っておりますので、そこはと思っておりますが、この点については先生方から特に御意見等ございませうでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 1点よろしいでしょうか。禅問答みたいなお話になるかもしれないのですがけれども、今、先生がおっしゃられたのと事務局のほうからもお話であったのですが、ここのタスクというかやるべきことというのは、遺伝子組換えの上で安全かどうかの判断かと思うのです。

グルコースオキシダーゼという添加物、公定書の中に入るか入らないかというところで厚生労働省側のほうでお戻しになれるのであれば、これはどちらかというところ、この専門調査会ではなくて添加物の調査会のマターかなというような整理の仕方のほうが正しいのではないかと。ここでは、あくまでも遺伝子組換えでできたこれらのものについての安全性について審議して、食品添加物として使うという上で問題ありませんという形で親委員会のほうにお戻しすることなのか、その整理を最初にしていただければ私としてはわかりやすいかなと思うのですが、要するに、変な言い方ですが、もう二度とこちらには遺伝子組換えの上での問題点ということでは来てはなくて、ある意味、新しい添加物として、それは添加物の調査会のほうでやっていただくということなのではないでしょうか。そこを教えていただきたいと思っております。

〇〇〇 新規の添加物としての審議であって、遺伝子組換えも使っているようなものの場合というのは、従来ですと両方の調査会でやっていただいております。新規であってもそうでなくても、GMの調査会のほうで見ていただく観点というのはあまり変わらないのかなという気もするのですが、今度、もし新規の形で来たときにどのような形でやる

のか。2つの調査会で別々にお問い合わせなのか、あるいは合同のような形であるのかというのは、多分こちらの事務局の整理の問題かと思うのです。

〇〇〇 おっしゃられるとおりで、もう一つの考え方として、組換えとしては問題ありません、マターとして、次に聞かれるとしたら、これは添加物として聞かれる側。今まで2つ、並行してやっていましたね。その辺のことというのは、今、ここでどう整理されるべきなのか。もう一度、やはりこちらにそういう意味でいくと、はっきり言うと再度評価が来るのかどうかということになると思うのです。すみません。

〇〇〇 そういう新規のものが来たときにどのようなやり方をするかというのは、親委員の先生方とも御相談をしようとしているところでございますので、今の段階ではっきりは申し上げられないのですが、いずれにしても、中身的には恐らくGMの調査会でやっていただいたことというのは、そのまま繰り返すことにはならないのではないかと考えております。

〇〇〇 わかりました。ありがとうございます。すみません。

〇〇〇 よろしいでしょうか。私もこれで新しく返ってきて、本調査会としては審議済みであるとしてもそのまま返すしかないなど実は思っていたのですが、事務局のほうもそれなりに手続が必要ということなので、今日のところはこれで。

ほかによろしいでしょうか。

それでは、指摘事項から1つずつ行きたいと思います。

要旨18ページで、「第1-5- (2) 製造方法」について。従来のGOと同様にと記載されているけれども、加熱処理及びpH処理工程等が異なるために適切に修正することということで、これは実は私が物言いをつけているのですが、わかりやすく書き直していただいていると思いますし、このくらいに書いていただければ誤解もないかなと思うので、私はよろしいかと思うのですが、先生方、ほかにございますでしょうか。よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、指摘事項2です。要旨19～21、「第1-5- (4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較」において、これは2つございまして、1つは分子量に添付資料9に記載している内容を引用して、●●●ものである。こう結論した理由について追記すること。実は、これも私のほうから質問させていただいたのですが、これについては●●●とデータをきっちり出して説明していただいております。私は、これは十分かと思うのですが、先生方、よろしいでしょうか。

今度、諸性質の比較について、これは実験条件について示していただきたい。これは〇〇のほうからです。

〇〇〇 十二分に記載されていますので、これでよろしいかと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほかにも先生方。では、この点も。

それでは、指摘事項3になります。要旨の23～24ページ、「第1-6- (1) 遺伝子組み換え

添加物と従来の添加物の相違点」について、ここは3つほどございまして、まず1つは、添付資料9、●●●によれば、AcGOは●●●と理解されるが、この点について、要旨に説明を追記することと御指摘がありました。これもたしか○○○でしたでしょうか。

○○○ 追記されていますので、これでよろしいかと思えます。

○○○ 私もこれでよろしいかと思うのですが、先生方。ありがとうございます。

では、2番目、図7にグルコースオキシダーゼ活性を有する領域の情報を追記すること。これは○○○なのですが、いかがでしょうか。

○○○ 図7でAcGOと従来のGOのアミノ酸の比較ということで、そこで相同性がそんなに高くないということで、別のほうのグルコアミラーゼでの比較、追加でやって立体モデルから出されているということで、この形でよろしいかと思えます。

○○○ ○○○はどうですか。

○○○ 触媒部位も確認しましたがけれども、この情報でよろしいかと思えます。

○○○ ありがとうございます。

それでは、ほかに先生方、よろしいですね。

3番目、AcGOがグルコースオキシダーゼ以外の酵素活性を有するか否かを含め、その基質特異性について文献情報や実験結果等をもとに考察を加えることとあります。これは回答書の13ページに長々と記載してありまして、実は、これは本日欠席の○○○からの御指摘なのですが、私もこれを見させていただきましたけれども、これはいろいろ実は基質特異性は広いようで、それについて、さらにそこから生成するグルコン酸やマルトビオン酸などについて、またラクトビオン酸やガラクトン酸まで含めて安全性についていろいろ説明しておりますので、ここではこれでよろしいかなと私も思うのですが、先生方、いかがでしょうか。よろしいでしょうか。では、御異議ないようなので、これで。

それでは、指摘事項4でございまして。要旨25ページ、「第1-6- (2) 、組換え体と宿主の相違点」において、「ウリジン要求性が復帰している点」とありますが、これは誤解を与える表現でもありますので、「ウリジン非要求性となっている点」に修正すること。これは私と○○○の指摘で、私はこのようなものでよろしいかなと思うのですが、先生はどうですか。

○○○ 私もこれでよろしいかと思えます。

○○○ ほかに先生方。ありがとうございます。

それでは、指摘事項5に参ります。要旨の30ページになります。「第2-2、病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」についてです。α-アミラーゼを用いたパンを摂取することで食物アレルギーを生じた事例はないものと思われるとありますが、参考文献23及び30について、パンを摂取することによる食物アレルギーの事例が示されていることから、適切な表現に修正すること。これについての回答は、回答書の15ページにあります。

○○○からの御指摘なのですが、本日欠席です。これもたしかめったにないということですが、それなりに説明はされていると思うのですが、この点について、○○○、どうぞ。

〇〇〇 問題ないと思うのですが、正確を期するとすると、回答の「大半の」の2行目のところなのですが、 α -アミラーゼを用いたパンを摂取することで、ここで感作されるということで食物アレルギーを生じた事例というようなことで、「感作される」という言葉を一言入れていただければと思います。吸入での感作は起きてもというようなこと。

〇〇〇 2行目の「摂取することで感作される」。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 もっともな指摘だと思うのですが、この点については、細かいところですので入れていただければ。安全性そのものはよろしいでしょうか。

〇〇〇 そうですね。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほかにはよろしいですね。ありがとうございます。

それでは、指摘事項6に参ります。要旨では49ページ、「第4-2- (3) iv、遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項」において、スライディングウインドウ検索とありますが、これを相同性検索に修正すること。用語の問題でありますが、これもたしか〇〇〇から。

〇〇〇 これで問題ないと思います。

〇〇〇 ほかに先生方、よろしいですね。ありがとうございます。

では、指摘事項7に参ります。要旨57ページになります。「第4-6、DNAの宿主への導入方法に関する事項」において、DNAの宿主への導入方法を詳細に記載すること。これはたしか〇〇〇の御指摘でしたか。

〇〇〇 導入方法と株の選抜方法について記載してほしいということだったのですけれども、この程度でよろしいかと思えます。

〇〇〇 私もこのくらい書いていただければわかるかなと思いますのでいいかと思うのですが、先生方、よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、最後、指摘事項8、要旨では60～61ページ、「第5-2- (1) 制限酵素による切断地図に関する事項」において、GOOX-1株のゲノムDNAについて、ゲノムドラフト解析を行い、挿入箇所の同定及びコピー数の推定を行っているが、網羅的な解析ではないため、意図しないDNA断片が宿主ゲノムに挿入されている可能性が否定できない。よって、GOOX-1株のゲノムと適切に設計したプローブを用いたサザンブロット分析等により、意図しないDNA断片の挿入の有無を明確にすることという御指摘でございます。

これは〇〇〇の御指摘だったのですが、これについて私のほうで確認させていただきましたが、ちゃんとサザン分析をやっていただいております、●●●ということで、少なくとも意図しないDNA断片の挿入については、これで証明ができているかなと考えるのですが、ほかに先生方、いかがでしょうか。よろしいですか。

では、よろしいようなので、以上の点も含めまして全体を通じて何か御意見ございますでしょうか。

それでは、特段の御異議ないようですので、本件につきましては、特に安全上問題がないということでありますので、引き続き評価書案の審議に入りたいと思います。

事務局のほうからお願いいたします。

〇〇〇 それでは、資料の6ページを御参照ください。評価書案の説明に移らせていただきます。

まず「Ⅰ．評価対象添加物の概要」です。名称、用途、申請者、開発者は記載のとおりです。

本添加物は、*Aspergillus oryzae* BB-56 (*pyrG*⁻) 株を宿主として、*Acremonium chrysogenum* NBRC30055株由来のグルコースオキシダーゼ、以下、*AchGOX*遺伝子といいますが、これを導入して作製したGOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼである。本添加物は、β-D-グルコースをD-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化するほか、マルトース、マルトオリゴ糖、ガラクトース等に作用する酵素であり、グルコン酸の製造、乾燥卵白の製造時の脱グルコース及び製パン時の改良剤として使用される。

なお、本生産菌には、選択マーカーとして*Aspergillus oryzae*由来のオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が導入されている。

「Ⅱ．食品健康影響評価」です。

第1の1、従来 of 添加物の性質及び用途等ですが、名称はグルコースオキシダーゼ、基原は*A. niger*です。

「(2) 製造方法」「(3) 用途及び使用形態」は記載のとおりです。

「(4) 摂取量」ですけれども、グルコースオキシダーゼが、全てのグルコン酸、乾燥卵白及びパンの製造工程において使用されると仮定した場合の最大一日摂取量は0.0266 mg TOS/kg 体重/日である。

「2. 宿主及び導入DNA」です。

(1) 宿主は、*A. oryzae* BB-56 (*pyrG*⁻) 株である。これは*A. oryzae* BB-56株に突然変異誘導を行い、ウリジン要求性とした株である。

(2) DNA供与体ですが、*AchGOX*遺伝子の供与体は*Acr. chrysogenum* NBRC30055株、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子の供与体は*A. oryzae* KBN616株である。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法です。*AchGOX*遺伝子は、グルコースオキシダーゼをコードする。*pyrG*遺伝子は、オロチジン-5'リン酸デカルボキシラーゼをコードし、選択マーカーとして用いた。

*AchGOX*遺伝子及び*pyrG*遺伝子を含む遺伝子断片をプロトプラスト法により宿主ゲノムに導入した。

「3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験」、「4. 宿主の構成成分等」については、記載のとおりです。

「5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等」ですが、製品名はAcGO、有効成分はグルコースオキシダーゼです。

「(2) 製造方法」「(3) 用途及び使用形態」は記載のとおりです。

「(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較」ですが、AcGOは従来のグルコースオキシダーゼと同じく β -D-グルコースをD-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化するほか、従来のGOと比べて広範囲の糖に作用する酵素である。従来品と比較してアルカリ領域での安定性が高く、高温領域での熱安定性が低い。

おめくりいただいて「6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点」です。

(1) AcGOと従来のグルコースオキシダーゼとの相違点は、構造遺伝子の基原、アミノ酸配列及び酵素活性の至適条件が異なる点並びにAcGOはグルコースオキシダーゼに比べマルトース、マルトオリゴ糖、ガラクトース等の広範囲の糖に作用する点である。

(2) GOOX-1株と宿主との相違点は、GOOX-1株には*AchGOX*遺伝子及び*pyrG*遺伝子が導入され、AcGOを発現する点及びウリジン非要求性となっている点である。

以上1~6から、本添加物及び本添加物の生産菌と比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、第2以下の各事項について評価を行った。

「第2. 宿主に関する事項」ですが、「1. 分類学上の位置付け」、「2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」については記載のとおりです。

おめくりいただきまして、「3. 寄生性及び定着性」、「4. 病原性の外来因子に汚染されていないこと」、「5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産」についても記載のとおりです。

「第3. ベクターに関する事項」ですが、「1. 名称及び由来に関する事項」は、*AchGOX*遺伝子及び*pyrG*遺伝子を含む挿入DNA断片の作製には、プラスミドpUC19が用いられた。

「2. 性質に関する事項」に関しては、記載のとおりです。

次のページ、第4ですけれども、「1. 挿入DNAの供与体」です。先ほど御説明したとおり、*AchGOX*遺伝子の供与体はNBRC30055株、*pyrG*遺伝子の供与体は*A. oryzae* KBN616株です。

「(2) 安全性に関する事項」は、記載のとおりです。

「2. 挿入DNA又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質」ですが、(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法として、*AchGOX*遺伝子は、*Acr. chrysogenum* NBRC30055株の遺伝子ライブラリーよりグルコースオキシダーゼをコードする遺伝子の断片をプローブとし単離し、塩基配列を決定した。NBRC30055株よりRNAを抽出後、RT-PCRにより*AchGOX*遺伝子を得た。*pyrG*遺伝子は、*A. oryzae* KBN616株のゲノムDNAを鋳型としてPCRにより得た。

(2) ですけれども、*AchGOX*遺伝子及び*pyrG*遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能ですけれども、この下段の記載は先ほど御説明したとおりです。

「①遺伝子産物の有害タンパク質との構造相同性」ですが、AcGO及びオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、データベースを用いて検索を行った結果、両者とも既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかった。

「②遺伝子産物の供与体のアレルギー誘発性」ですが、*AchGOX*遺伝子の供与体であるNBRC30055株について、アレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

*pyrG*遺伝子の供与体であるKBN606株については、*A. oryzae*由来の α -アミラーゼに関する情報として、その経口摂取による感作成立やアレルギー症状を惹起する可能性を示唆する報告があるが、本菌株は醤油製造用の麹菌として完全に用いられており、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられる。

次のページですけれども、「③遺伝子産物のアレルギー誘発性」です。*Acr. chrysogenum*由来のグルコースオキシダーゼ及び*A. oryzae*由来のオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼについて、アレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、いずれもアレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

「④遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性」ですが、AcGO及びオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼと既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは見いだされなかった。

「⑤遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性」です。

「a. 人工胃液に対する感受性」ですが、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット解析を行った結果、試験開始後0.5分以内に分解されることが確認された。

「b. 人工腸液に対する感受性」も同様の分析の結果、試験開始後60分でも分解されないことが確認された。

「c. 加熱処理に対する感受性」です。本添加物の使用時の加熱条件で処理した後、人工胃液、人工腸液での消化性をSDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を用いて確認をした。その結果、AcGOの加熱後の人工胃液処理では、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析とともに試験開始後0.5分以内に分解されることが確認された。AcGOの加熱後の人工腸液処理では、SDS-PAGEで試験開始後0.5分以内に分解された。ウェスタンブロット分析では試験開始後60分でも薄いバンドが検出されたが、加熱処理されることでAcGOは人工腸液により分解されやすくなることが確認された。

この下線を引いている箇所は、○○○より事前に修正の御指摘をいただいた箇所になります。

以上のことから、総合的に判断し、AcGOはアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

「3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」については記載のとおりです。

「4. ベクターへの挿入DNAの組み込み方法」ですが、プラスミドpUC19に*pyrG*遺伝子等を挿入することにより中間プラスミドを作製し、これにより得られたDNA断片に*AchGOX*遺伝子を連結させることによって遺伝子導入用ベクターpCS*AchGOX*を作製した。

「5. 構築された発現ベクターに関する事項」ですが、(1) 挿入DNA断片の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(2) 挿入DNA断片の全塩基配列について、目的以外のオープンリーディングフレームの有無を調べた結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計81個見出された。

これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、80アミノ酸残基で35%以上及び連続した8アミノ酸配列で完全に一致する既知のアレルゲンは認められなかった。また、**Motif-based method**による検索においても相同性を示す既知のアレルゲンは認められなかった。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、タンパク質データベースを用いて検索を行った結果、相同性を示す既知のタンパク質は認められなかった。

(3) 意図する挿入領域は、プロモーター、*AchGOX*遺伝子、ターミネーター及び*pyrG*遺伝子が連結された直鎖状DNA断片である。

(4) 挿入DNA断片は、電気泳動により単離・純化されている。

「6. DNAの宿主への導入方法」ですが、挿入DNA断片をプロトプラスト法により宿主ゲノムに導入し、ウリジン要求性が消失した株をマーカーとして選抜後、孢子PCRにて挿入DNAを確認し、最も高いグルコースオキシダーゼ生産性を示す株をGOOX-1株とした。ここも下線は○○○から修文の指示をいただいております。

「7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性」ですが、挿入DNA断片に抗生物質耐性遺伝子は含まれていない。

「第5. 組換え体に関する事項」です。

「1. 宿主との差異」ですが、GOOX-1株は、*AchGOX*遺伝子の導入によりAcGOの生産能を有している点に加え、*pyrG*遺伝子の導入によりウリジン非要求性となっている点で宿主と異なる。

「2. 遺伝子導入に関する事項」ですが、(1) 挿入DNA断片の宿主ゲノム上の導入位置及びコピー数を調べるために、GOOX-1株のゲノムドラフト解析、サザンブロット分析及びドットブロット分析を行った結果、染色体1カ所に複数コピー導入されていることを確認された。

(2) オープンリーディングフレームの有無ですが、挿入DNA断片と宿主ゲノムとの接合部位に新たに生じるORFの有無を調べるために、挿入DNAの5'近傍配列を含む領域及び

3'近傍配列を含む領域（それぞれ宿主ゲノム領域の1,000bpを含む）におけるORF検索を行った結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが4個検出された。

これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、80アミノ酸残基で35%以上及び連続した8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは認められなかった。また、Motif-based methodによる検索においても、相同性を示す既知のアレルゲンは認められなかった。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、タンパク質データベースを用いて検索を行った結果、相同性を示す既知のタンパク質は認められなかった。

「第6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材」についてですが、「1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績」、「2. 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性」については記載のとおりでございます。

「第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項」、「1. 諸外国における認可、食用等の状況」ですが、AcGOは海外で販売及び使用されていない。

「2. 組換え体の残存」ですが、AcGOの生産菌の残存の有無を確認するため、培養試験を行った結果、生産菌は確認されなかった。また、AcGO製剤中の導入DNA断片の混入を分析するため、ドットブロット分析を行った結果、DNAは検出されなかった。

「3. 製造に由来する非有効成分の安全性」ですが、AcGOの純度試験分析値はJECFAの食品用酵素の規格値に適合している。また、マイコトシキン類の分析を行った結果、いずれも定量限界又は検出限界未満であった。

「4. 精製方法及びその効果」ですが、AcGO製剤は培養物の固液分離、除菌ろ過等の精製工程を経ることで得られる。これらの工程において、安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。

5、AcGOにおいて含有量の変動により有害性が示唆される常成分は知られていない。

第8、第2から第7までの事項により安全性の知見は得られている。

評価書案の説明は以上になります。

〇〇〇 それでは、評価書案について御意見、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ければと思います。いかがでしょうか。特段ございませんでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 データベースのところにタンパク質データベース、アレルゲンで、a、b、cが書いてあるのですが、そのa、b、cがここには書いていないけれども、どこかに書いてあるのですか。

〇〇〇 aに関しては10ページの最初に出てきます。bとcは12ページ。一番最初に出てくるところで引用として下に記載してございます。。

〇〇〇 わかりました。

〇〇〇 16ページのアレルゲンデータベースの脚注がcですが、これはaの脚注になります。後で修正いたします。その下の402行目のタンパク質データベースも間違っておりますので修正します。

〇〇〇 いかがでしょうか。よろしいでしょうか。

では、よろしいようなので、それでは、いただきました修正については事務局の修正を私のほうで確認させていただいて、本品目の食品添加物としての分類については厚生労働省に御確認いただきまして、グルコースオキシダーゼとして取り扱って差し支えないということであれば、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。ありがとうございました。

本日、あと2件ありますので、どんどん行こうと思います。では、続きまして、新規品目であるJPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼについて、審議を行いたいと思います。

では、事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 申請書の説明に入ります前に、毎度のことでございますけれども、審議の進め方について、いま一度、御説明いたします。

冒頭で御紹介しましたとおり、本日は申請者のノボザイムズジャパン株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書の御審議をいただいた後に申請者に対する質問事項等ございましたら整理をしていただきます。その後、説明者に入室をしていただき、質疑応答を行い、質疑応答終了後、説明者には退室を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。

〇〇〇 それでは、申請者から提出されております申請資料について御説明をいたします。

お手元に「JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」と記載されております灰色の紙のファイルの準備をお願いいたします。

まず1ページ、第1-1としまして、従来の添加物の性質等に関する事項でございます。

従来の添加物といたしましては、(1)としましてグルコアミラーゼがでございます。

反応の特異性としまして、アミロースやアミロペクチン等の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 β -D-グルコースを生成するというものでございます。

(2) 製造方法について、概略図は次のページの図1に示されておりますが、数段階の培養工程を経て製剤化されまして、生産菌は除菌ろ過によって生産物から分離除去されるということでございます。

(3) 用途及び使用形態でございます。こちらも概略図は次のページの図2に示されております。こちらの当該酵素は、デンプンからデンプン糖を製造する際の加工助剤として用いられます。デンプン糖製造工程には大きく分けて3つの工程がございまして、AMGはその2つ目の糖化工程で使用され、生成したデキストリンはグルコースにまで分解されます。最終的には精製工程、加熱濃縮処理を経て製品化されるということです。

3ページ、(4) 摂取量については記載のとおりでございます。

4ページをお願いいたします。第1-2といたしまして、本申請品目の宿主等の記載でございます。

(1) 宿主等の由来でございますが、宿主は*Aspergillus niger* BO-1株でございます、本株は自然界からグルコアミラーゼ生産菌として分離された*Aspergillus niger* C40-1株の突然変異株であり、グルコアミラーゼ生産性が向上したものでございます。

(2) DNA供与体等の由来についてでございますが、*Gloeophyllum trabeum* NN055575株あるいは*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株など、こちらはさまざまな菌に由来をしております。詳細については表1にまとめて記載をしております。

隣のページに移りまして、(3) 挿入DNAの性質及び導入方法でございますが、生産菌であるJPAN001株の作製に当たり、BO-1株染色体の●●●遺伝子座に遺伝子発現カセットを挿入しております。その際に、挿入領域でDNAの置換が起こっており、●●●遺伝子が欠失しております。

さらに、欠失導入用ベクターを用いて●●●遺伝子を欠失させております。

なお、これらのことにつきましては、●●●遺伝子座に挿入した遺伝子発現カセットは5ページ下にあります図4に、挿入DNAの性質は6ページの表2、さらに生産菌の構築過程で脱落するDNAについては7ページの表3に記載されているとおりでございます。

7ページの下に移りまして、DNAの挿入方法についてでございます。

●●●遺伝子座に、表3にあります●●●遺伝子発現カセットを相同組換えによりBO-1株の染色体に挿入し、さらに遺伝子導入用ベクターに組み込まれた●●●遺伝子がコードする●●●インテグラーゼの発現により、●●●インテグラーゼがベクター及び染色体上のFRT-F/FRT-F3配列を認識することで挟まれた領域を組み換え、●●●遺伝子発現カセットを宿主の染色体に導入しております。概要につきましては、9ページの図5に示されております。

9ページ下からのDNAの欠失方法についてでございます。

1) DNA挿入時に起こる欠失は先ほど御説明したとおりでございます。

2) 欠失導入用ベクターを用いたことによるDNAの欠失ですが、こちらは●●●遺伝子発現カセットを使用した相同組換えにより●●●遺伝子を欠損させております。これについては10ページの表5、そして、図6に示しております。

第1-3、第1-4については記載のとおりでございます。

第1-5でございますが、当該GM添加物の性質等を記載しております。

(1) としまして、有効成分等はグルコアミラーゼとなっております、以降、申請書中ではこれをAMG-GTと記載しております。

(2) 製造方法の詳細につきましては2ページ目の図1に記載のとおりでございます、生産菌は二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いうことでございます。

(3) 用途につきましては、従来のAMGとしての用途は、先ほど申し上げたとおりですが、こちらでも糖化工程においてデキストリンをグルコースまで分解するために使用されるということです。

12ページ、(4) 有効成分等の比較についてでございますが、従来の添加物と同様にアミロースやアミロペクチン等の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 β -D-グルコースを生成するという点は同じでございます。また、AMG-GTはAMGに比べまして、イソマルトース合成活性が●●●程度低いということから、従来の添加物よりも高いグルコース濃度に到達することができるため、デンプン糖製造工程の効率化が期待できるとしております。

第1-6でございまして、従来品との比較についてでございます。

(1) ですが、従来の添加物との比較については、相違点というのを表6に示しております。アミノ酸の残基数ですとか性質等の異なる点を記載しております。

グルコアミラーゼに一般的な活性としまして、グルコアミラーゼ活性によりデキストリンがグルコースまで分解された結果、基質溶液中のグルコース濃度がある一定の割合を超過すると、グルコースを基質としてイソマルトースを合成する逆反応を生ずることが知られています。この活性について調べましたところ、AMG-GTの活性はAMGに比べ●●●程度低いことが示され、また、比活性については、AMG-GTはAMGに比べて約●●●高い値を示す結果となりました。

14ページをお願いします。こちらにはアミノ酸配列の比較を示しておりますが、相同性は●●●となっております。

15ページ(2)といたしまして、組換え体と宿主との相違点につきましては、記載のとおりでございます。表7の中におきまして挿入DNAとして`amgGT`遺伝子が●●●挿入されております。

第2、15ページの下に移ります。こちらは宿主に関する事項を記載しております。

第2-1については記載のとおりでございます。

第2-2といたしまして、BO-1株の病原性については、宿主である*Aspergillus niger*は自然界に広く存在しており、ほかの糸状菌と比べて特に病原性で問題となる菌種ではないとされており、非病原性であると考えられております。

また、有害生理活性物質については、*Aspergillus niger*のマイコトキシン産生能について、アフラトキシン類の産生能を有していないことは明らかにされておりますが、オクラトキシンAを産生するという報告がなされております。また、同菌種にはフモニシンの合成遺伝子クラスターも発見されておりますが、BO-1株は分析により、これらのマイコトキシンを産生しないことを確認しております。

アレルギー性については、*Aspergillus niger*由来の酵素として3つの酵素がアレルギーとしての記載、データベースに登録されております。この点につきまして、申請者のほうでは、*Aspergillus niger*由来のタンパク質と報告されたアレルギーは、基本的に特定職種

での高頻度暴露によりもたらされるものと考えており、適切な環境下で扱われている限り、BO-1株のアレルギー誘発性の可能性は低いとしております。

19ページに移りまして、第2-3、2-4については記載のとおりです。

第2-5といたしまして近縁種の病原性については、日和見感染、気管支アレルギーの原因になることが知られております。

有害生理活性物質の生産についてですが、宿主菌の近縁種は有害生理活性物質であるオクラトキシンの産生能を有すると記載がされております。また、*Aspergillus niger*にオクラトキシンA、フモニシンの合成遺伝子クラスターが発見されております。

「第3 ベクターに関する事項」ですが、第3-1、第3-2の(1)(2)については記載のとおりです。

(3)といたしまして既知の有害塩基配列は含まれていないこと、(4)薬剤耐性遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子が存在することが記載されております。(5)、(6)については記載のとおりです。

第4、挿入DNA等に関する事項に移ります。

まず1-(1)については記載のとおりです。

22ページに移りまして、1-(2)安全性に関してでございますが、*amgGT*遺伝子の供与体は*Gloeophyllum trabeum*、これは自然界に広く存在していると考えられており、食経験はないものの、この属種が産生する菌体外酵素の中には、産業上、有用なものがあることが報告されております。

*amdS*遺伝子の供与体である*Aspergillus nidulans*は、食経験は特に知られておりません。また、*amdS*遺伝子は選択マーカーとして長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられております。

23ページ、4-2-(1)といたしまして、挿入遺伝子の合成方法ですが、*amgGT*遺伝子、*amdS*遺伝子、*pyrG*遺伝子はそれぞれ供与体からPCRによってクローニングされております。

(2)については記載のとおりです。

24ページをお願いします。(3)挿入遺伝子の機能の説明になります。

まず*amgGT*遺伝子についてでございますが、機能というのは記載のとおりでございます。

安全性でございますが、1)供与体のアレルギー誘発性については、*Gloeophyllum trabeum*は、ほかの糸状菌と比べて特にアレルギー性で問題となる菌種ではないとされておりますが、本菌を扱う際には孢子が飛散しないように十分に気をつける必要があります。

2)AMG-GTを有効成分とする酵素製剤のアレルギー誘発性について、それを示唆する報告はない旨が記載されております。

3)遺伝子産物の物理化学的処理でございます。

①人工胃液処理については、30秒以内に検出限界以下まで分解されることを確認してお

ります。

②、25ページ、人工腸液処理については、処理後6時間でも消化されない旨が記載されております。

26ページに行きまして、4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関してでございます。

AMG-GTと既知のアレルゲンとの相同性検索を①80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索、②連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索の2条件で行った結果、いずれもSch c 1が相同性を示す結果となりました。これは*Schizophyllum commune* H4-8株由来のグルコアミラーゼでございます。これ以降、これをスエヒロタケと呼ばせていただきます。

スエヒロタケは世界中で一般的に観察される真正担子菌で、アレルギー性気管支肺真菌症等の特定のアレルギー疾患病原菌として認知されております。このグルコアミラーゼをアレルゲンとする論文はあるものの、エピトープレベルの解析には至っていないということでございます。

また、スエヒロタケ及びその加工品等を食用としていた事実はなく、食物アレルゲンではないと考えることが妥当であるとしております。

27ページに移りまして、Sch c 1、AMG-GT、AMGのアミノ酸配列の比較を行い、その解析結果を示しております。こちらは28ページにございまして、アライメントスコアは28ページ下の図14の上あたりに記載をしておいております。

この結果から、申請者は、グルコアミラーゼのアミノ酸配列は全体的に構造相同性が高いことを意味しているとしております。連続する8アミノ酸で同一の配列の検索を行ったところ、複数の領域で同一性が見られる結果となりました。しかしながら、Sch c 1のエピトープについてこれまで報告がないことから、既知のアレルゲンとの構造相同性の観点から、AMG-GTのアレルギー性に関連する安全について、これ以上知見を得るのが難しく、29ページ下から書いてあります4つの観点から、リスクは極めて低いと考察しております。

1つ目としましては、人工胃液による易消化性。これは先ほど御説明したとおりです。

2つ目として、生体内腸液における消化の可能性。

3つ目、こちらは30ページの下でございしますが、AMGと比べて摂取量が低いと想定されること。

31ページの上に4つ目として、製造過程の精製工程においてAMG-GTは除去されるというのを挙げております。

続いて、*amdS*遺伝子、*pyrG*遺伝子についてでございますが、これまで長年使われてきた実績があり、アレルギー誘発性や毒性を示唆する報告はないことから、ともに問題はないと考えている旨が記載されております。

32ページ、第4-3に移ります。こちらは遺伝子の発現に関する事項でございます。

(1)のプロモーター、(2)ターミネーター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ございますが、*amgGT*遺伝子の転写を安定化させることを目的として、BO-1株由来の*payA*遺伝子の5'側非翻訳領域である*payA* 5'UTR配列、また、*amgGT*遺伝子の転写産物を安定化させ、遺伝子発現量を向上させる機能を持たせるために Tobacco mosaic virusのcoat protein遺伝子の3'側非翻訳領域のCP 3'UTR配列を用いております。

第4-4、4-5の(1)については記載のとおりでございます。

36ページをお願いします。(2)といたしまして、目的外のORFの有無についてでございますが、●●●遺伝子座に●●●遺伝子発現カセットを挿入したところ、サザンブロット分析の解析により、●●●遺伝子座において*amgGT*遺伝子の1つが消失する結果となり、この原因を自己相同組換えによるループアウトの発生としております。この●●●遺伝子座におけるORFの検索を●●●として●●●において●●●遺伝子発現カセットが挿入された場合の配列を用いて行っております。

ストップ・トゥ・ストップの30アミノ酸以上の条件で検索を行った結果、●●●が検出される結果となりました。

これらについて、次のページに行きまして、既知のアレルゲンとの相同性検索の結果、80アミノ酸残基で35%以上が一致するアレルゲンの検索について集約すると、2つのORFについて既知アレルゲンとの相同性が示されるとしております。

1つ目としましては、●●●ことから、安全性に関する懸念を生じさせるものではないと考察しております。

2つ目の相同性を示したアレルゲンとしては、Sch c 1でございまして、このことに関する考察は先ほど述べたとおりでございます。

また、連続する8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索においては、Sch c 1がございましたが、考察は重複するので割愛いたします。

続いて、毒性タンパク質の相同性検索でございます。こちらを集約すると6つのORFについて毒性タンパク質との相同性が示される結果となりました。申請中では、これらをORF1からORF6と記載しております。

これらに相同性を示しました28のタンパク質では、41ページから51ページまでかけて、一つ一つ記載がされております。結論としましては、遺伝子の導入により新たに生じたORFが発現したとしても、アレルギー誘発性や毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いとしております。

51ページ、第4-5の(3)(4)については記載のとおりでございます。

第4-6、DNAの宿主への導入方法についてでございます。

●●●遺伝子座に対して●●●を挿入しております。この形質転換体は●●●を第一セレクションとし、次に●●●を行っております。

次に、●●●遺伝子発現カセットを持つ導入用ベクターを菌体内に導入し、●●●によるセレクションを行い、次にAMG-GTの活性を指標として、●●●形質転換体を選択して

おります。ここでは、各遺伝子座のコピー数について記載されておりますが、これは後ほど第5のほうで御説明いたします。

また、●●●としております。

続いて、第4-7に移ります。56ページをお願いします。

抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性についてでございますが、導入用ベクターには抗生物質耐性マーカー遺伝子が含まれておりますが、宿主の染色体には導入されていないということをサザンブロット解析により確認しております。

「第5 組換え体に関する事項」ですが、第5-1については記載のとおりです。

第5-2といたしまして、遺伝子導入に関してでございますが、まず(1) 遺伝子導入用ベクターの宿主への導入により、●●●遺伝子発現カセットを●●●遺伝子座に挿入しております。サザンブロット解析の結果では、●●●では設計どおりに入っていることが確認されましたが、●●●では*amgGT*遺伝子が●●●ことを示す結果となりました。このことについて、申請者は遺伝子発現カセット挿入後に自己相同組換えが起こり、1セットがループアウトされた可能性があるとしております。

62ページをお願いいたします。第5-2-(2) としまして、遺伝子導入におけるORFの有無について記載をしております。

挿入領域及び近傍配列の考察については先ほど申し上げたとおりでございます。さらに、DNA欠失を行い、異種遺伝子断片が染色体上に残存する●●●遺伝子座についてORFの検索及びアレルゲンデータベース、毒性タンパク質データベースを用いた相同性検索を行っております。

検索の結果でございますが、検出されたORFと既知のアレルゲン、既知の毒性タンパク質について、相同性を示す結果ではなく、したがいまして、アレルギー誘発性及び毒性を持つことは考えがたい旨が記載されております。

63ページ、第6といたしまして、製造原料等に関する事項が記載されております。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をしております。

65ページに移りまして「第7 遺伝子組換え食品添加物に関する事項」ですが、第7-1、諸外国では承認を受けて使用されていることなどを記載しております。

第7-2、製品中に組換え体由来のDNAが残存していないことを確認しております。

第7-3から第7-5までは記載のとおりでございます。

以上の結論でございますが、70ページにございまして、本品目については安全であると考えられる旨、記載をしております。

説明は以上でございます。

○○○ 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いただきたいと思っております。少々長いので、まず申請書の1～21ページ、ベクターに関する事項まででございますでしょうか。

それでは、これは真ん中が長いのですが、第4、挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベ

クターに関する21～56ページまででございますでしょうか。

〇〇〇 24ページから25ページにかけてなのですけれども、添加物なのですが、アレルギーのところでは完全に排除し切れないような書き方も残ってはいますので、酵素としての熱安定性のデータがないみたいなのですけれども、それはつけてもらったほうがアレルギーのことも考えるとよろしいのではないかなと思うのです。〇〇〇のほうがお詳しいかと思っています。

〇〇〇 いかがですか。

〇〇〇 あとは酵素としての熱に対する失活する従来の酵素との比較というような形もあわせてつけてもらえればと思いました。

〇〇〇 要するに熱安定性に関するデータ。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 人工胃液と人工腸液はあるのにそれはないのですね。

〇〇〇 そうなのです。

〇〇〇 ほかにありますか。

あと、これは●●●発現カセットで導入しておるのですけれども、そいつを●●●入れているわけだから●●●になるわけなのですが、そのうち●●●領域に入れたもの、ここでは●●●になっている。たしか36ページにループアウトによって●●●になっていると説明されていて、糸状菌アスペルギルス属ではよくあることだと思うのですけれども、これが●●●で素直に抜けているという前提にORF検索等を行っておりまして、これでもよろしいかどうかという点についてもできれば御意見いただければと思います。

〇〇〇 その点は聞こうかなと思っていたところではあるのですけれども、ORF検索とか、抜けていないのを前提にしてやっているのではなかったでしたか。抜けたのを前提ではなくて抜けていないのを前提にしてやっているのです。要するに、イベント主義ということからいくとそれは困ってしまうなという感じになってしまうのですけれども、それでいいのかなというのは私も思っていたところですが、ただ、●●●ことも書いてあるのですが、シークエンスデータで添付資料20というのが出てくるのですが、その意味もよくわからなくて、そこを見ると●●●出ているのです。抜けていないのです。これは単純に理想どおりにうまくいったとおりの配列がそのままそこに載っているように読めるのですけれども、でも、引用としてはシークエンスデータになっていて、それはどういうことというのかわからない。そこら辺もお聞きしたいなと思っていたところですが。

〇〇〇 この点について、何か事務局のほうで補足することはございますか。

〇〇〇 今日、申請者をお呼びしておりますので、そのときに聞ける範囲で聞いてみるのはいかがでしょうか。

〇〇〇 私も実はそれがいいかなと思ひまして、せっかく来ていただいているわけですから、やはりここは聞いておきたいなと思ひます。

ほかにございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 30ページの頭なのですからけれども、29ページの終わりからでもいいのですが、試験的には人工腸液では分解されないのですが、ただ、シミュレーションをかけると分解されるようなことを29ページの最後から30ページの頭に書いてありまして、これは同じ申請書の中で、片方で分解されないと行って、片方でシミュレーションではきれいに分解されるから大丈夫だみたいなことを書かれてしまうとつらいなということで、どうしたものですかということですか。

〇〇〇 私もそこはすごいひっかかって、これはもう削除してもらったほうがいい。これをよしというか、入れるとなるとすると、もう実際にやる必要がなくて*in silico*の分解実験でいいのではないかということにもつながりかねないので、これは削除をお願いしたいと思います。

〇〇〇 私もそう思います。この点については、実際、申請者に来ていただくわけですから質問はさせていただくと思いますが、タンパク質は配列的には切れることになっていても3次元構造というものがあって、実際やってみたら切れないということは普通にあるわけですから。でも、せつかく来られるわけですから質問はしてみたいとは思いますが、これは基本削除の方向だと私も思います。

ほかにございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 これは申請者に聞いてしまったほうが早いかもしれませんが、添付資料19にサザンブロットのデータが出てくるのですけれども、●●●遺伝子座に入っているところのサザンブロットのデータで●●●と出てくるのですが、それが私にはよくわからないので、マップのデータと比べてみると、なぜ●●●になるのかがよくわからないので、後で個別に聞いてみたいと思います。

〇〇〇 これは聞いてみて。

ほかにありますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 シークエンスというのが出てくるのですけれども、この場合のシークエンスは次世代ではなくてサンガー法ですね。

〇〇〇 確認しておりませんので、申請者に聞いていただければと思います。

〇〇〇 ●●●とか出てくるからサンガー法だよねという感じ。

〇〇〇 私もそう思ったのです。

〇〇〇 それでは、「第5 組換え体に関する事項」から最後まで、56～69ページまででございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 57ページに、いわゆる外骨格に当たる部分のサザンブロットで社内文書21というところで、そういう懸念のある配列はないですということを書いてあるのですが、厳密に

言うと、やっているのは●●●でして、それは出てこないのですけれども、ただ、これは食品添加物で使い方を考えてみても、さほど我々の口に入るものは届かないものなので、そこまで厳密にやる必要はないのかなという気もするのですが、書き方として、確認していると書かれてしまうと確認し切れていないということになってしまうので、少し書き方を弱めてもらえればいいかなとは思いますが、一応厳密に言うと全部はやっていないということだけ確認しておきたいなと思います。

〇〇〇 そうですね。この点については、可能性の高いこれらの遺伝子について確認しているくらいで、やはりやったことでとめていただかないと、とは私も思いますので、それ以外にもやっているのかどうかについては質問していただければとも思うのですけれども、では、これが安全性に本当に必要かどうかというと、私もこの程度を見てもらえればとも思うのです。

ほかにございますでしょうか。

それでは、せっかく申請者が来ておりますので、質問事項についてまとめておきたいと思います。

まず〇〇〇のアレルギーについては、酵素の安定性のデータについて明らかにしていただきたい。

ORFについて、これは設計どおり●●●入っているものと、●●●になっていると思われるについて、これは抜けていないのが前提で調べているが、これでよろしいか、その辺について。

30ページの人工腸液の実験では分解していないのにシミュレーションでは分解していて、1つの申請書の中で明らかに矛盾を来している点について。これはシミュレーションのほうの削除を要求することになるかと思います。

添付資料19、●●●についてのサザンで、これのシーケンスはどのような方法で、サザン法できっちり確認しておるのかとか、そこをちょっと。

最後に57ページ、制限酵素による切断地図について、これは●●●だけしか調べていないので、書き方の問題ですけれども、確認しているというのは全て確認したわけではなくて、この辺、厳密にさせていただきたいということだったろうと思います。それでよろしいでしょうか。ありがとうございます。

では、申請者。

〇〇〇 それでは、5分ほど休憩を挟みまして。

〇〇〇 申請者の準備が整い次第でもよろしいかと思しますので、お呼びいただければと思います。

〇〇〇 わかりました。

(休 憩)

〇〇〇 では、おそろいのようなので。

それでは、お忙しいところ、ありがとうございます。説明者の方、自己紹介をお願いいたします。会社名とお名前だけで結構です。

〇〇〇 ノボザイムズジャパンの〇〇〇と申します。よろしくお願ひいたします。

〇〇〇 それでは、質疑応答に入ります。

申請書24ページ、25ページ、このタンパク質については、人工胃液と人工腸液についてのデータはついておるのですけれども、これはアレルギーについてもORF検索で可能性は低いけどヒットするものがあるということなので、この酵素の熱安定性のデータも欲しいなと思うのですが、そういうデータはございますでしょうか。

〇〇〇 即答はできないのですけれども、社内で調べてみたいと思います。

〇〇〇 わかりました。

遺伝子は●●●カセットで導入しておいて、染色体上の●●●に導入したのだけれども、そのうち●●●になっている。これでORFを検索しているときにも●●●抜けていないのが前提になっていてORF検索しておりますが、これにつきましてはどうですか。

〇〇〇 これは社内文書19に絵で示してありまして、●●●の図をお示ししているのですけれども、説明が不足していたかもしれないのですが、ORF検索した場合に、●●●だとしても出てくる配列に違いはないというように理解しまして、あとは●●●が入っているという解析のデータがあるわけではないので、●●●あったものとしてやったほうが、余分にやったほうがといたしますか、そのほうが安全ではないかというように判断いたしました、設計どおりのシークエンスで解析を行いました。

〇〇〇 ●●●になっているとして、では、●●●だったとしたら新しく生ずるようなORF、そういう可能性はないと判断しているということではよろしいのですか。

〇〇〇 そうでございます。

〇〇〇 これは素直にそのまま相同性で、相同組換えで抜けているということであればそうなるだろうと思うのですけれども、この菌の場合、相同組換えで抜けると考える根拠はございますでしょうか。

〇〇〇 ●●●ございまして、そこがループアウトする可能性。そうであれば、ほかのところもそういう可能性はあるのですけれども、サザンの結果の長さを見ますと、どうも●●●遺伝子座では●●●をもとにループアウトしたというように理解するのがサザンの結果を判断する上で一番説明しやすいのではないかと判断いたしました。

〇〇〇 相同な配列で組換えて抜けるということであれば、●●●に限らず、●●●で組換えても抜けると思うのですけれども、それは●●●とお考えになる根拠はありますか。

〇〇〇 それは、やはり資料19で、●●●になっております。●●●ですけれども、そこで抜けたとすると、この英語の説明がわかりづらくて、日本語にも一応してみたのですが、そうしたときのバントのサイズが、そこで抜けたとして、抜けた絵を描いたときの制限酵素で切った長さがちょうどぴったり合うという理解で、そういうように推測。●●●ので

断定はできないのですけれども、サザンのデータからはそれが一番考えられるのではないかと考えております。

〇〇〇 この場合、●●●ですから、その中のどこでも組換えて抜ける可能性があります。その場合、どの場合も同じような結果になるのではないかと考えるのですけれども、それが●●●で特に特定される根拠はございますか。

〇〇〇 言葉で説明するのは非常に難しいので、御質問いただいたときに文書で正確に御説明したいと思いますが、それでよろしいでしょうか。絵をお見せして御説明しないと私のほうも口頭では難しいところがございますので、後ほど文書で御説明させていただきたいと思います。

〇〇〇 では、そういうことであるならば。どこで抜けても同じ配列になるか、同じ結果を招くと言っていたら、それはそれでいいのかなと思ったのです。

〇〇〇 ●●●ではいけないという理由がわからないのです。

〇〇〇 それは英語のほうで説明をしているのですけれども、ここで切れたと思われる断片がサザンの結果で出ている。●●●で抜けたとしたときに考えられる塩基の長さがサザンの結果で出ているので、そういうように判断したといいますか、理解した。それでこういう絵を描いたということです。

〇〇〇 では、そういうことであるならば、文書でお答えいただければと思います。ただ、私の思うに、●●●抜けても同じ結果になるだろうと思うので、だから、こういうように質問させていただいているのです。恐らく●●●でも、全く同じサザンの結果で、どう抜けても矛盾はしないと私は思うのですが、でも、文書で御回答いただけるということであるならば、文書で回答いただいて、それを我々のほうで評価させていただきたいと思いますので、では、ここはそういうことでお願いします。

30ページには、人工腸液、プロテアーゼで分解した場合、キモトリプシンやトリプシンで断片化されるというシミュレーションの結果があります。だけれども、この申請書を見させていただきますと、人工胃液の実験と人工腸液の実験を実際にやっております、人工胃液ではすぐばらばらになるが、人工腸液では30分たっても分解されないという結果が出ております。これほど1つの申請書の中で、シミュレーションではばらばらになるけれども、実際実験したら全く分解されないというように矛盾されると困るのですが、この点についてはどうですか。

〇〇〇 これは比較しているものに比べて比較的相同性が既存のものよりも高い相同性が出てしまったので、なるべくデータが多いほうがいかと判断したのですけれども、おっしゃるとおり、確かに矛盾しておりますので、なくてもよかったかと思えます。

〇〇〇 私もそう思います。実験の結果があるわけですから、このシミュレーションはほぼ無意味ですので、また、シミュレーション、配列上は切れることはあっても実際タンパク質は3次元構造等があっても分解されないということは十分ありますので、これは削除していただかないと、と思うのですが、その点はよろしいでしょうか。

〇〇〇 承知いたしました。申しわけございません。

〇〇〇 添付資料19、サザン、●●●、これはお願いします。

〇〇〇 添付資料19の図4なのですけれども、Eのところにサザンのパターンがあつて、●●●というのが載っているのですが、これは上に●●●のローカスのマップのデータがDにあるのです。だけれども、どこを見ても●●●は出てこないのですね。ないのです。Eのところに●●●というのが出てくるのですけれども、これは多分上のDとAを見てもらうと、●●●いて、これが●●●という意味かなと思ったのです。そうすると、本当は●●●●になってということなのだろうなというようには思ったのですけれども、●●●が説明されなくなってしまうので、これはどういうことかなというのを一度お聞きして、会社のほうに聞いてもらわないとわからないかもしれませんけれどもね。

〇〇〇 私もこれを読んで自分で理解したつもりだったのですが、今の御指摘にはお答えできませんので、やはり先ほどのことも含めて、もう一度、御回答させていただきたいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、シークエンスの方法の問題です。どこのシークエンスでしたか。何ページ。

〇〇〇 社内文書20。

〇〇〇 このカセットを確認して、塩基配列でシークエンスを確認しております。シークエンスはサンガー法で1塩基ずつ確認したのではないかと我々も思うのですが、もしくは、これは次世代シーケンサーという手も最近はございまして、できればわかりになればどちらの方法で塩基配列を確認したかお願いしたいのです。

〇〇〇 次世代シーケンサーでやっております。

〇〇〇 本当に次世代ですか。

〇〇〇 それは間違いございません。大丈夫です。

〇〇〇 文章からするとサンガーっぽいのです。

〇〇〇 確認されたほうがいいです。

〇〇〇 今、サンガーはやっていません。もう一度、済みません、これも確認させてくださいませ。申しわけございません。

〇〇〇 次世代であれば、それと冗長度、depthがこれは幾つであったのか、その点もあわせて御確認いただけますでしょうか。サンガーであればそれでいいかなと思ったのですけれども、次世代であれば、確実性のためにdepthをお願いいたします。

〇〇〇 リードという意味ですか。depthというのは。

〇〇〇 日本語では冗長度と申します。つまり、そこで何重に塩基配列を確認しているか。英語ではdepthと申しますが、次世代であれば、その点もお願いいたします。

〇〇〇 はい。承知いたしました。

〇〇〇 最後、これは書き方の問題なのでお願いできますか。

〇〇〇 57ページの中段やや下のところに社内文書21のところの文章で、なお、●●●と

あるのですけれども、これは●●●なのです。●●●なので、●●●だけなので、ほかの分はわからないのです。それが次世代シーケンサーでやっているとなるとわかっていたのかもしれないのですけれども、読んでいる限りは次世代シーケンサーでやっているようには思えなかったもので、サンガー法でやっているとするれば、ないのだろうと思う。

そういうこともあって、そこはわからないところがあるのですけれども、仮にサザンブロットの結果だけから言うと、このデータでは完全にはわからないのです。ですので、書き方を●●●とか、事実を書くぐらいでとどめておいてもらえれば、安全性上は、これはそんなにシビアな問題ではないと思っていますので、確認していると書かれてしまうと確認し切れていないよねということになってしまうので、表現の問題だけ検討していただければと思います。

〇〇〇 承知しました。●●●との確認だと思うのです。ですから、●●●だけの確認だったと思いますので、そういうような書き方に変えさせていただけたらと思うのですが、それでよろしいでしょうか。

〇〇〇 それで結構で、使用した選択マーカは残存していないことを確認したと言っただけであれば我々も安心できたのですけれども、これだと、ありとあらゆるもの全て調べたようにもとれてしまうので、それは困ると申し上げただけです。

我々の要求、確実にわかりましたでしょうか。

〇〇〇 よくわかりました。ありがとうございます。

〇〇〇 先生方、ほかにありますか。せっかく来ていただいておりますので、〇〇〇、アレルゲンについてはどうですか。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 よろしいですか。

どうぞ。

〇〇〇 1つだけ。添付資料19の先ほどの図4のところですが、上に抜けた形でマップがつくられているわけなので、ORF検索とかは、やはりこの図をつくっているのを前提にしてやってもらったほうが、本来の入る形のはずの今その形でやられているのですが、それだと何も解析しなくてもみんなそれでいいではないかという話になってしまうので、抜けていて、こういうように添付資料の図4のように一応マップが描けているだけの情報はあはずなので、それに基づいて、●●●一応この図のように入っているとした場合にORF検索をやってみたという形で作成していただけると、こちらとしてはありがたいなというように思います。

〇〇〇 データはおっしゃるとおりありますので、すぐに本社の人間にやらせてみたいと思います。

〇〇〇 それでは、ほかに先生方、よろしいでしょうか。

それでは、どうもありがとうございました。後ほどもう一個、プロテアーゼの件もございますので、またお呼びすることもあるかもしれませんが、お疲れさまでした。

〇〇〇 どうもありがとうございました。

(説明者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻ります。

今のこの説明者からの回答を踏まえた上で、御意見、コメント等ありましたらお願いしたいのです。

今の説明の中で安全上、やはりここはどうしてもまずそうだと思う点、熱安定性のデータはないと、と思いますが、私も熱安定性はお願いするべきだと思います。また、それ以外にも細かいところを幾つか、どうも回答者のほうで少々思い違いしている点があるような気がしてならないのですけれども、先生方のほうから特にございますでしょうか。

では、これは仕方ないですね。では、先生方から提出されました御意見、確認事項、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したいと思います。また申請者のほうから回答が出てくるとしますので、これを踏まえて最終的に判断したいと思います。ありがとうございました。

それでは、もう一件、JPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼです。これは食品添加物と飼料のほうが出ておりますが、まず食品添加物について審議を行いたいと思います。

それでは、事務局のほうから御説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、申請資料の説明をさせていただきます。

緑のファイルを御確認ください。

まず1ページ目、第1-1としまして、従来添加物の性質等に関する内容になっております。

Bacillus licheniformis Ca63株由来のアルカリ性プロテアーゼです。これはセリンプロテアーゼの中でのサチライシンに分類されるとなっております。

「第1-1- (1) 名称、基原及び有効成分」ですが、記載のとおりです。反応特異性として、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解するというようになっております。

(2) 製造方法ですが、概略図は2ページの図1に示されておりますが、培養液を数段階の工程を経て製剤化し、生産菌は除菌ろ過により生産物から分離除去されております。

(3) としまして用途及び使用形態ですが、当該酵素は畜肉や魚類エキスの製造で原料を加熱処理した際に煮汁にはゼラチンが多く含まれ、そのまま濃縮すると粘度が増加し、ペースト状になってしまうため、プロテアーゼを加えることにより、ゼラチンや他のタンパク質が分解され、粘度が低下し、これによってエキスの抽出効率を向上させることができるものとなっております。

2ページ目の摂取量については、記載のとおりです。

3ページ目の「第1-2 宿主及び導入DNA」に関してですが、(1) として、宿主である *B. licheniformis* Si3株は自然界から分離されたものに突然変異誘導を行い、孢子形成能を欠損させた株となっております。

「第1-2- (2) DNA供与体の種名、株名又は系統名等及び由来」ということで、表1に詳

細を記載されております。挿入遺伝子となる *pep10R* 遺伝子は、*Nocardiosis prasina* NRRL 18262株、そのほか *B. licheniformis* などの株を由来としております。

「第1-2- (3) 挿入DNAの性質及び導入方法」ですが、概略としては次のページの図2に書かれておりますが、生産菌であるJPBL001株の作製にあたり、Si3株染色体の●●●遺伝子座に遺伝子発現カセットを挿入しております。その際、挿入領域でのDNA置換が起こっており、1つの遺伝子が欠失しております。さらに、欠失導入用ベクターを用いて3つの遺伝子を欠失させております。なお、これらのことについて、●●●遺伝子座に挿入した遺伝子発現カセットは4ページの図3のところに、挿入されるDNAの性質としては5ページの表2のところに、さらに欠失遺伝子とその性質については表3のところに記載されているとおりでございます。

5ページ目の下のほうなのですが、DNAの挿入方法について記載がされております。●●●遺伝子座に、表2に記載のあるP3プロモーターや *cryIII A* mRNA安定化配列などを挿入後、遺伝子導入用ベクターを導入し、相同組換えにより *pep10R* 遺伝子発現カセットを遺伝子座に挿入しております。

(2) としてDNAの欠失方法が記載されております。

1つは、●●●遺伝子座へ *pep10R* 遺伝子発現カセットを挿入時に●●●遺伝子が欠失しております。もう1つは、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより、ここに記載の3つの遺伝子を欠失させております。これらについては、6ページの表4と次ページの図4のほうに詳細が示されております。

7ページに移りまして、「第1-3 食経験に関する資料」と「第1-4 構成成分に関する資料」については記載のとおりとなっております。

8ページ「第1-5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」についてですが、(1) として当該品の有効成分はアルカリ性プロテアーゼで、以降、申請書中では、これを10Rと記載がされております。

(2) として製造方法については、既存品と同じように2度の除菌ろ過により生産菌は10Rから分離除去されるとの記載がされております。

用途につきましても、既存品と同じとなっております。

「(4) 有効成分の性質及び従来添加物との比較」になりますが、当該品の10Rはセリンプロテアーゼの中のキモシンに分類され、従来添加物であるサチライシンと比べて基質特異性が小さいということになっております。

9ページ目、第1-6になりますが、(1) として「遺伝子組換え添加物と従来添加物の相違点」が表5のほうで詳細が書かれております。この中で10Rの性質としては、N末端側にTyr、Trp、PheまたLeuが存在するペプチド結合を優先的に分解するものとなっております。

また、10ページ目の図5として、両者のアミノ酸配列の比較がされております。両者の相同性は●●●と低いながらも活性部位を構成する3つのアミノ酸残基、アスパラギン酸、

セリン、ヒスチジンの種類は同じであり、活性部位の空間配置は酷似していると記載がされております。ここで机上配布資料2になりますが、実際に両者の立体構造図を比較したものをお配りしております。

10ページの続きになりますが、「第1-6- (2) 組換え体と宿主の相違点」になりますが、この表6に記載のとおりで、JPBL001株には挿入DNA、*pep10R*遺伝子が●●●挿入されております。

11ページ「第2 宿主に関する事項」ですが、第2-1については記載のとおりです。

「第2-2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」ですが、*B. licheniformis*は、自然界に広く分布し、食品用酵素の生産菌として長年使用されてきた実績があります。また、病原性及び有害生理活性物質が生産されることは知られておりません。

なお、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のバイオセーフティーレベル1に相当するとされております。

11ページの第2-3、第2-4は記載のとおりです。

12ページの第2-5として、宿主の近縁株としては、こちらに2種類ほど書かれているのですが、*B. licheniformis*と同様、非病原性かつ非毒素産生性とみなされており、毒性物質を産生することが知られている *Bacillus cereus*等とは明確に区別されているとされております。

13ページの「第3 ベクターに関する事項」ですが、第3-1、第3-2については記載のとおりです。

第3-2- (3) として、既知の有害塩基配列は含まれていないことが記載されております。

14ページになりますが、第3-2- (4) として、ベクターのpE194はエリスロマイシン耐性遺伝子を持つことが記載されております。

続く第3-2- (5) 伝達性と (6) 宿主依存性に関する事項については記載のとおりです。

15ページの「第4 挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項」についてですが、1- (1) については表7に記載のとおりでございます。

(2) 安全性に関する事項としまして、挿入DNAの供与体である *N. prasina*を含む *Nocardiopsis*属は自然界に広く分布し、知られている種も多く、ヒトへの病原性が報告されている種類としては2種類のみとなっております。当該菌種については、病原性及び有害生理活性物質が生産されることは知られておりません。

次に、*B. licheniformis*については、先ほどと同じく申し上げたとおりになります。

16ページになりますが、そのほか、*B. licheniformis*以外の *Bacillus*属がそのほかプロモーターなどの供与体として記載がありますが、長年、食品用酵素の生産菌として用いられた実績があるものであったり、これら株由来のプロモーターなどが遺伝子組換え技術を用いて酵素の生産菌を構築する際に長年使用されているものと記載がされております。

「第4-2- (1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項」ですが、挿入遺伝子である *pep10R*遺伝子は、PCRによって増幅することで得られております。

(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してですが、*pep10R*遺伝子の機能については、10Rをコードするというので、あとは記載のとおりになっております。

また、10Rの安全性についてですが、挿入遺伝子の供与体である*N. prasina*のアレルギー誘発性の可能性を調べるため文献検索を行った結果、アレルギー誘発性に関するヒットは確認されておりません。

「2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見」としても、文献検索を行った結果、ヒットする文献は得られておりません。よって、遺伝子産物がアレルギー誘発性を有するとは考えがたいとの記載がされております。

「3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見」として「① 人工胃液に対する感受性」としては、人工胃液を処理した後、30分以内にほぼ完全に消化されることが示されております。

②人工腸液に対しては、10Rは6時間の処理ではほとんど消化されていないことが示されております。

19ページ、「4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見」になりますが、10Rと既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索と連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索と2つの条件で行った結果、どちらも既知のアレルゲンは検出されておりません。

20ページになりまして、第4-3、遺伝子発現に関する事項が記載されておりますが、プロモーター、ターミネーター、その他の配列については記載のとおりになっております。

21ページの「第4-4 ベクターへの挿入DNA組み込み方法に関する事項」と「第4-5 構築された発現ベクターに関する事項」についても記載のとおりとなっております。

24ページに飛びまして、第4-5- (2) として、発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないことの確認としてここに記載がされておりますが、相同組換えにより宿主に導入される領域は明らかであり、シーケンス解析により確認されているため、pJPV002及びpJPV003の全配列を対象としたORF解析は実施されておりません。宿主ゲノムとの境界部位を含む遺伝子導入座位のORF解析については、第5-2- (2) にて記載がされてありますので、そこで改めて説明をさせていただきます。

第4-5- (3) 、第4-5- (4) については、こちらに記載のあるとおりとなっております。

25ページの「第4-6 DNAの宿主への導入方法に関する事項」についてですが、遺伝子配列を利用した相同組換えによってプロモーターや*cryIII A* mRNA安定化配列を挿入し、さらに必要な遺伝子の相同組換えにより、●●●*pep10R*遺伝子発現カセットを●●●遺伝子座に挿入がされております。詳細な図が次の図12、図13のほうに記載がされております。

29ページ「第4-7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」ですが、染色体を全ゲノム解析することにより、抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことを確認

したと記載がされております。

30ページの「第5 組換え体に関する事項」ですが、第5-1については記載のとおりとなっております。

第5-2- (1) として記載がありますが、挿入遺伝子である *pep10R* 遺伝子が●●●目的の挿入領域にのみ挿入されていることと、抗生物質耐性遺伝子が存在しないことをシーケンス解析により確認がされております。

32ページの「第5-2- (2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項」としまして、挿入された領域である遺伝子座においてORF検索を行ったところ、6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンに挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義して検索を行ったところ、合わせて174個のORFが検出されました。

これらについて、既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、①と②と2つの条件において一致する既知のアレルゲンは検出されておられません。

33ページになりますが、次に既知の毒性タンパク質との相同性検索を行った結果、中段のほうになりますが、まとめると5個に分類されまして、それぞれについて次のページから具体的に考察がなされておりますが、いずれにしても毒性を有することは考えがたい、毒性を有する可能性は低いと考えられるとの考察がされております。

以上の検索及び考察から、遺伝子導入によって新たに生じたORFが発現したとしても、本酵素製剤中にアレルギー誘発性、または毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられております。

37ページ、第6としまして製造原料及び製造器材に関する事項については記載のとおりで、長年、安全に使用された実績が全てあるとの記載がされております。

第7として、第7-1の諸外国における認可状況ですが、諸外国では承認を受けて使用されていることなどが記載されております。

38ページの「第7-2 組換え体の残存に関する事項」ですが、ドットプロット分析により、製品中に組換え体DNAが残存しないことが確認されたとして、その結果が図17のほうに載せられております。

39ページの第7-3から第7-5については記載のとおりですが、社内規格でJECFAなどを参考にして●●●やサルモネラ、大腸菌などについて規格を設けられております。

42ページ、第8としまして、第2から第7までの事項により安全性の知見が得られているとの記載がされております。

よって、結果として、43ページ、本申請品目は安全であると考えられる旨、記載がされております。

説明としては以上になります。

○○○ ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして、先生方から御意見いただきたいと思っております。先ほどと同じようにベクターに関する事項まで、申請書では1～14ページまででまずは御意見ござ

いましたらお願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 9ページ目のところに10RとProtease Lの比較で表5があるのですが、そこに性質というところがあって、これは基質特異性のところの説明があるのですが、N末端側にTyr、Trp、Phe、またはLeuが存在するペプチド結合を優先的に分解とあるのですが、微妙にずれていまして、ずれているというか、これは酵素学的に言うとP1サブサイトというところにTyr、Trp、Phe、Leuがあって、その隣のところのペプチド結合を切るのです。なので、そうすると、切るとN末端側のペプチドとC末端側のペプチドができて、このN末端側のペプチドの一番最後にそれらが並ぶのです。

〇〇〇 C末が並ぶ。

〇〇〇 そうです。なので、この文章を読むと、N末端のところにTyrがあるように読めるので、正しく書いてほしい。隣のProtease Lも同じで、これを引用している文献を見ても、やはり微妙な表現なのではあるのですが、一応P1サブサイトを書いてあるので、P1サブサイトと書いても専門的過ぎるかというところもあるかもしれませんが、いずれにせよ、正しい表現にしてほしい。

〇〇〇 私もそう思います。書き方の問題ですが、かなり違和感のある書き方で、その点について指摘して書き直していただければと思います。

ほかにございますか。

どうぞ。

〇〇〇 今のところに関連してなのではあるのですが、私、不勉強というか、読み込みが浅いので、とんちんかんなことを言っているのかもしれないのですが、この10Rというものは今まで使われてきたのか。要するに、先ほどの話に直結するかもしれない。似たような話なのではあるのですが、プロテアーゼという添加物として、これは入っているのかどうか。要するに基質特異性の問題の話。実は、この前のものもそこまでは、今日、お話ししていませんでしたが、これはある意味、新規なのか、それとも既存なのかというところでひっかかってしまったのです。この辺は教えていただけませんか。済みません。

〇〇〇 これは諸外国では既に使われているみたいですね。

〇〇〇 プロテアーゼ自体は既存添加物になります。

〇〇〇 ですから、添加物公定書、新しくなりました。その中にちゃんと入るものであって、ここに載せてきているのであれば先ほどの変な問題、最初に今日、再度審査したところのような、要するにグルコアミラーゼではなくなりますよなどということはないのかどうか、あらかじめ質問したかった。というのは、これは〇〇〇が御指摘されていて、私もここはすごく気になったのです。わざわざProtease Lのほうは高い基質特異性と書いてありながら、こちらは何も書いていないというところがすごく違和感を覚えたというところからスタートしているのです。

〇〇〇 添加物としての規格としてはプロテアーゼでよろしいですね。だから、アミラ

ーゼについてはグルコアミラーゼなり何なりで、そこが割と厳しくなっているのだけれども、プロテアーゼについては、その点、えらくアバウト。

〇〇〇 そこは大丈夫ですよねということなのです。済みません。

〇〇〇 たしかそうですね。

〇〇〇 はい。プロテアーゼとして規格になっているので大丈夫です。

〇〇〇 ほかにいかがですか。

〇〇〇 今の点でいくと、隣の「高い基質特異性」という言葉は要らないのではないかと
いう。

〇〇〇 私もそう思います。その点について、修正をお願いしてください。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 それでは、挿入DNA、遺伝子産物、発現ベクターについて、申請書では15~29
ページでございますでしょうか。

〇〇〇 1点よろしいですか。これも温度の実験をされていないですね。多分、これは先
ほどのものに比べると、もっと低温だと固まってしまうようなものを高温で溶かしなが
ら切っていくので、結構熱安定性はあるのだらうと私は思いながら読んでいたのですけ
れども、そこを確認していただきたいのと、反応条件ははっきりよく見えなかったの
です。熱安定であるかどうか、やったデータがあればお示ししていただきたいという
ことです。言ってみれば、胃液、腸液、熱安定性という3点セットだったと思うの
ですけれども、この辺、〇〇〇、どうなのでしょう。済みません。

〇〇〇 必ずしも添加物の場合に、全部まで求めてはいなかったかとは思いますが、
ウエート・オブ・エビデンスで全部なくてもアレルゲン性の懸念がないということ
であればよろしかったかとは思いますが、今回は、それで相同性のあるアレルゲンが先
ほどと違って出ていないというのがありますね。ただ、人工腸液では分解性は悪いとい
うところがあるのですけれども、どうでしょうか。より安全のために求めるということ
はしてもよろしいかと思うのです。あるいは温度依存性みたいなところを既存の酵素
などと比較したデータがあれば出してもらうというようなこともよろしいかと思う
のです。

〇〇〇 これは微妙ですね。相同性検索では、今回、ヒットしていないので、必ずしも
要らないかなという気もするのだけれども、ただ、分解性を見ると今度は胃液で溶ける
のに30分かかるのです。違いましたか。人工腸液では分解されずで、プロテアーゼ
はそもそも分解性について割と手ごわいものが時々いるので、だからといって即座
にどうこうという問題ではないかなとも思うのですけれども、これはたしか30秒で消
失ではなくて30分ですね。

その点も踏まえて、それでは、熱安定性、これも多分要求すると結構安定という
データが出てくるのが予想されて、それでも安全ではないと判定するのかどうかとい
うことになるのかも、先々、そういう議論が予想されるわけですね。

この場合は、私は特にそうでなくても、できればほかに安全性が担保できるような情報

を出してもらえるとありがたいのだけれども、これがないからといって即座に危険ではないようにも思えるので微妙で、せっかくだから申請者にそういうデータ、何かもらえるかどうか、聞いてみるのはいいかなと思いますけれども、その上で議論ということでもよろしいですか。

〇〇〇 あれば出してもらって。

〇〇〇 あれば出してもらうということで、別に私は特になくとも即座に安全性を担保できないということではないように思うのです。

ほかにございますか。

〇〇〇 今のことで、従来品と差がなければいいとしてもいいのですね。比較のもしデータがあればそれを出してもらえばいいのですね。

〇〇〇 そうです。

ほかにありますか。

それでは、最後まで、組換え体までの第8まで、申請書では42ページまででございますでしょうか。

それでは、これ以上は特にないようなので、先ほどの説明者、せっかくですから質問したいと思います。

質問したいことですが、まず基質特異性の説明について、これは後ほど書き直しをお願いしてでもいいですが、とりあえず聞いてはみたいということで、せっかく来ていただくのですからよろしいかと思えます。でも、どうだろうな。

〇〇〇 結構サブサイトといってもわからないとは思いますが。

〇〇〇 そんな気がしますね。

もう一つ、熱安定性の実験、またデータもあるのか。従来品と比較して人工胃液、人工腸液ともう少し安全性について説明できるデータをお持ちかどうか、この2点を聞きたいと思えます。

それでは、よろしく願いいたします。時間もあれですので、用意でき次第ということでもよろしいかと思えます。

〇〇〇 では、今から申請者を呼んでまいります。

(説明者入室)

〇〇〇 ありがとうございます。

型どおり、自己紹介をお願いいたします。

〇〇〇 ノボザイムズジャパンの〇〇〇でございます。よろしく願いいたします。

〇〇〇 それでは、質疑応答に入りたいと思えます。

では、これは〇〇〇に質問していただけますか。9ページだけ。

〇〇〇 9ページをお願いしまして、そこに表があって、性質とあるのですけれども、これはもとの英語の文章をそのまま日本語にするとこうなってしまうようなのですが、正確性に欠けていて、N末端側にTyr、Trp、Phe、Leuが存在すると言うとN末端にあるように

読めるのですが、これはエンドペプチダーゼなので内部で切って、そうすると、N末端側を含む部分とC末端側を含む部分ができるのですが、厳密に言うと、このN末端側を含む部分のC末側にこれが並ぶのです。なので、同じことはProtease Lのところでも言えまして、それもこちら側のC末側のところに非極性のアミノ酸が来るのです。ですから、正しい表現に変えていただきたい。

〇〇〇 承知しました。これは切れた後にもこれが残るということですね。

〇〇〇 後で図もつけて御説明します。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 後ほど指摘でこう直していただきたいと行くと思います。

特に「高い基質特異性」とありますけれども、その表現はどうしても必要ですか。

〇〇〇 なくてよいと思いますので、削除いたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

もう一つ、こちらにも人工胃液、人工腸液の実験はあるのですが、熱安定性についてはこのデータがなくて、これはデータがないのですけれども、そういった情報などはお持ちですか。

〇〇〇 手元にはないのですけれども、例えば熱安定性のデータみたいなものだったら、熱のプロファイルとまた違って何度まで何%残るかみたいなデータは探せばあるかとは思っています。

〇〇〇 いわゆるタンパク質としてのプロテアーゼとしての熱安定性ですね。わかりました。

こちらは最終製品の中に、このタンパク質にこのプロテアーゼが残るというものですので、これについての安全性については、こちらも気を使いたいなところなのですが、例えば人工胃液、人工腸液等、またそれ以外、従来品との比較でもいいのですが、この10Rについての安全性なり説明できるようなデータ、何かお持ちでしょうか。

〇〇〇 従来品と比較して、より安全とか、そういうことでしょうか。

〇〇〇 同等ならよろしいのです。

〇〇〇 アミノ酸配列がかなり異なりまして、ただ、文章、後でデータは足したのですけれども、立体構造的にはかなり似ておりまして、活性部位の順番は違うのですが、配置は立体的には一緒であるということはお示しできますので、後で厚労の方から依頼をいただいたデータを追加することで同等性は言えるかとは思っています。

〇〇〇 従来品と今度の酵素での温度依存性とかを比較したようなものとかございますか。

〇〇〇 それは示すことはできると思います。失礼しました。勘違いいたしました。例えば温度安定性の比較とか、それは探せばあると思います。

〇〇〇 ほかに先生方からございますか。予定している質問は実はこれだけです。ありがとうございました。

〇〇〇 どうもありがとうございました。

(説明者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻りたいと思います。

ただいまのこの回答を踏まえました上で、御意見、コメント等ありましたら、お願いしたいのです。特にはない。

安全性については、おおむね担保できると考えられますので、引き続き評価書案の審議に入りたいと思います。よろしいですか。

では、お願いいたします。

〇〇〇 では、評価書案の説明に移ります。

評価書案の束ねられた冊子の39ページからになります。まず44ページ、「I 添加物の概要」としまして、本添加物は *Bacillus licheniformis* Si3株を宿主とし、*Nocardiopsis prasina* NRRL18262株由来のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子を導入し、作製したJPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼとなっております。

本添加物は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解し、ペプチドやアミノ酸を生成させる酵素で、畜肉、魚類エキスの製造においてエキスの抽出効率の向上を目的として使用されております。

IIとして食品健康影響評価になりますが、(1)は記載のとおりです。

(2)についても記載のとおりで、2回の除菌ろ過により生産菌は分離除去されております。

(3)用途としましても先ほど申し上げましたので省略させていただきます。

(4)摂取量についても記載のとおりになります。

45ページ(1)宿主の種名ですが、宿主は *B. licheniformis* Si3株である。これは自然界から分離された *B. licheniformis* Ca63株に突然変異誘導を行い、孢子形成能を欠損させた株となっております。

(2)としてDNA供与体の種名ですが、アルカリ性プロテアーゼ (*pep10R*) 遺伝子の供与体は、*Nocardiopsis prasina* NRRL18262株となっております。

(3)挿入DNAの性質ですが、*pep10R*遺伝子は、セリンプロテアーゼであるキモトリプシンをコードするもので、挿入した発現カセットを相同組換えにより宿主ゲノムの複数の遺伝子座に導入しております。また、その際、カセットが導入された遺伝子座のうち、1つの遺伝子欠失が確認されております。

なお、10Rの生産を高めるため、*aprL*遺伝子を含む3種類の遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させております。

「3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料」「4. 宿主の構成成分等に関する資料」については記載のとおりです。

「5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」ですが、製品名は10R、有効成分としてはアルカリ性プロテアーゼ(キモトリプシン)となっております。

(2)と46ページの(3)については記載のとおりとなっております。

(4) のところになります。有効成分の性質及び従来の添加物との比較として、10Rはサチライシンに分類される既存のProtease Lと比較し、より広範囲の基質に対する反応性を有するとの記載をしております。

6. 宿主との相違点ですが、(1)として、10Rと従来のProtease Lとの相違点は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なる点、並びにProtease LがN末端、多分ここが修正になるかもしれませんが、今の段階では記載とおりにN末端側に疎水性アミノ酸のペプチド結合を優先的に加水分解するのに対し、10RはN末端側にTyr、Trp等が存在するペプチド結合を優先的に加水分解する点としていますが、申請書が修正になると思いますので、ここはまた修正して後ほど御相談になるところかと思っております。

(2)として組換え体と宿主との相違点ですが、JPBL001株には*pep10R*遺伝子が導入されて、10R生産性を獲得している点、導入に伴い一部遺伝子が欠失している点、また10Rの生産性を高めるため、*aprL*遺伝子を含む3種類の遺伝子が欠失している点と記載をしております。

「第2. 宿主に関する事項」についてですが、1と2、3については、記載のとおりとなっております。

「4. 病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項」、「5. 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」についても記載のとおりとなっております。

「第3. ベクターに関する事項」としまして、1、遺伝子導入用ベクターpJPV002及びpJPV003の作製には、*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドpE194が用いられたと記載しております。

「2. 性質に関する事項」については、ここに記載のとおりとなっております。

第4、挿入DNAの供与体に関する事項としましては、(1) *pep10R*遺伝子の供与体は、*N. prasina* NRRL18262株となっております。

48ページになりますが、「(2) 安全性に関する事項」として、*N. prasina*は、病原性及び有害生理活性を有する物質を生産するという報告はなく、バイオセーフティーレベル1に相当すると記載をしております。

「2. 挿入DNA又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項」ですが、(1) 挿入遺伝子のクローニングについては、ゲノムからPCRにより得られた。

(2)については記載のとおりとなっております。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」としては、*pep10R*、ここも表現が変わってくるかと思っておりますので、また後ほど修正をして御相談する形になると思います。

①としまして、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関しては、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

②遺伝子産物についてのアレルギー誘発性に関する知見については、文献検索を行った結果、誘発性を示唆する報告はなかった。

③としまして「a. 人工胃液に対する感受性」としては、試験開始後30分以内に分解さ

れることが示されております。「b. 人工腸液に対する感受性」としましては、試験開始後6時間においても分解されないことが示されております。

49ページのほうですが、「④遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見」について、相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかったと記載をしております。

「3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」ですが、プロモーター、ターミネーター、その他の遺伝子に関しては、ここに記載のあるとおりとなっております。

「4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」としては、宿主ゲノム上の異なる挿入遺伝子座への相同組換えにより、必要な一部配列とともに*pep10R*遺伝子などを挿入することにより、遺伝子導入用ベクターpJPV002及びpJPV003を作製した。

50ページ「5. 構築された発現ベクターに関する事項」としましては、(1)～(4)は記載のとおりとなっております。

「6. DNAの宿主への導入方法に関する事項」としましては、宿主ゲノムの標的遺伝子座に相同組換えによりP3プロモーターを導入し、さらに相同組換えによりpJPV002またはpJPV003の目的とする領域を挿入した。挿入領域の塩基配列は全ゲノム解析により確認されております。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関してですが、生産菌の全ゲノム解析により、抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことが確認されております。

「第5. 組換え体に関する事項」ですが、「1. 宿主との差異に関する事項」としましては、JPBL001株は、*pep10R*遺伝子発現カセットが導入され、複数遺伝子を欠失している点で宿主と異なります。

「2. 遺伝子導入に関する事項」ですが、(1)制限酵素による切断地図に関する事項としましては、シーケンス解析により明らかになっております。

51ページ、(2)オープンリーディングフレームの有無についてですが、生産菌の遺伝子座においてORF検索を行った結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計で174個検出された。

これらについて、既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するためにアレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸残基で35%以上及び連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質の相同性について検索を行った結果、5個のORFに対して、それぞれ複数種類のタンパク質が検索されたが、全て毒性を有するとの報告はなかったと記載しております。

第6、製造原料及び製造器材に関する事項については記載のとおりです。

第7の1、諸外国における認可についても記載のとおりとなっております。

次のページになりますが、「2. 組換え体の残存に関する事項」としまして、ドットプロット分析により、10R製剤中には組換え体のDNAが残存しないことが確認されております。

3～5については記載のとおりとなっております。

第8として、第2から第7までの事項により安全性の知見は得られているという記載をしております。

評価書案の説明については以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、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ければと思います。

よろしいでしょうか。それでは、申請書並びにこの評価書の修正事項につきましては、事務局と私と関係する先生で確認いたしまして、その上で食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

ありがとうございましたと言いたいところなのですが、あと少しだけお時間を頂戴して、飼料添加物について審議したいと思います。

事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 オレンジの資料を準備ください。

では、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をいたします。

同じJPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼの飼料添加物になります。

1ページを開いていただきまして、「1) 名称、基原及び有効成分」については、製品名は食品添加物とは名前が変わっておりましてプロアクトとなっております。

中身は同じで、本飼料添加物は、*Bacillus licheniformis* Si3株を宿主とし、*Nocardiosis prasina* NRRL18262株由来のアルカリ性プロテアーゼを発現する遺伝子 (*pep10R*) を導入して作製したJPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼとなっております。

非遺伝子組換え体の *Bacillus licheniformis* を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼについては、飼料添加物の成分規格収載書に収載されております。

既存添加物との比較をしているものが表1のほうに記載されております。ここで右の2つが既存品で、左の1つが今回のGMの飼料添加物となっております。この表でいうところの至適pHや酵素活性が一部右のものとは違いますが、この当該申請品が網羅されるように別途食品安全委員会の肥料・飼料等専門調査会のほうにおいて、基準の改正のための審議がされる予定となっております。

2ページ目をお願いします。繰り返しになりますが、*pep10R* 遺伝子発現カセットは相同組換えにより宿主のゲノム●●●に組み込まれたものとなっております、目的とした領域に適切に組み込まれていることを全ゲノム解析により確認されております。

また、生産菌であるJPBL001株には、抗生物質耐性遺伝子は導入されておりません。

2) としまして製造方法ですが、液体培養した後にろ過を行い、限外ろ過、除菌ろ過などを行い、安定化剤を添加して製剤化しているもので、除菌ろ過により、JPBL001株は最終的な飼料添加物から分離除去されることとなっております。

使用用途としましては、飼料中のタンパク質成分の利用促進を目的として用いられており、飼料に混合し、鶏に摂取させることにより、その消化管におけるタンパク質の消化が促進され、タンパクの利用効率が上昇し、結果として鶏の成長が促進されることとなっております。

「4) 使用方法及び添加量」については記載のとおりです。

5、外国における認可についてですが、諸外国において飼料用酵素として使用されております。

3ページ、2についてですが、真ん中のところになりますが、本飼料添加物は、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令に定められている規格を満たしているとの記載がありますが、先ほど申し上げましたように、別途、肥料・飼料等専門調査会で審議される予定となっております。

そのため、その基準改正等の審議に必要な反復投与毒性試験や復帰突然変異試験、染色体異常試験などが参考で添付されておりますが、総合的に判断し、本飼料添加物中の原体の含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動は考え難いと記載がされております。

よって、4ページになりますが、組換え体利用飼料添加物である当該飼料添加物中に組換え体由来の新たな有害物質が生成され、これが畜産物中に移行する可能性は考えにくい。

また、本申請飼料添加物は、アルカリ性プロテアーゼであり、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畜産物中に移行するという報告はされていないとされております。よって、当該飼料添加物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られるとされております。

以上のことから、最後のパラグラフですが、当該飼料添加物に由来する畜産物を摂取することによるヒトの健康に及ぼす可能性はないと考えられるとの記載がされております。

説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして御意見いただきたいと思っております。よろしく願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 これは飼料添加物としては規格を設定するというところで、3ページにあるそのために必要な毒性試験等の云々かんぬんの記述があるのですけれども、それは飼料添加物のほうの話で、こちらでは、ここの遺伝子組換えのこの部会の資料のところにはこれではなくてもいいのかなというように思ったのです。

〇〇〇 実は、私も同じことを思っておりまして、我々がここで見るべきこととは違うように思いますので、添加物だと思うのです。

先生、どうぞ。

〇〇〇 組換えであることを特徴として、乳、卵、肉に移る可能性があったら、ここで言わなければいけないですね。これはないのですけれどもね。だから、ないというのだけでも、この記述は要るのではないですか。

〇〇〇 飼料の規格がどういようように変わるのか、簡単に説明いただけると。事情がわかりづらいところ、私もよくわかっていないのですけれども、その説明をいただけるとありがたいのです。

〇〇〇 一応、食安委の肥料・飼料等専門調査会のほうの申請資料とかを見させていただいているのですけれどもアルカリ性プロテアーゼで今、既に（その1）（その2）とあるのですが、それにもう一個、加わる形かなと思います。（その1）と（その2）の違いとしましては、それぞれ製造方法の基準とかが違いまして、（その1）、（その2）でそれぞれpHとか重金属などの成分規格が今、設定されています。

新たに今回の飼料添加物が網羅できるように、至適pHが（その1）では7~9というのが今回は9~11であるというところと、酵素活性が100,000たん白消化力単位/g以上というのが200,000たん白消化力単位/g以上になっているところ。あとは本品の水溶液のpHが既存品は5.5~8.5というところがあるのですが、今回の商品については4.0~7.0になっています。主に変わっているところとしては、その3カ所くらいかとは思いますが。

〇〇〇 ありがとうございます。そういうことなのですね。であれば、基本、評価書はこれでいいようにも思うのですが、よろしいですか。

〇〇〇 〇〇〇がおっしゃったとおりで、①、②、③のところでは私たちは立っているのですが、そこところは〇〇〇もおっしゃるとおり、要らないのではないかと私も思います。

〇〇〇 では、そこだけちゃんと議論して、というのも、この辺の方針はまた後々にも影響すると思いますので、ここでこれが残すことにすると、先々もずっとこれはあるべきということになりますし、また、これは今まで特になかった、これはなくていいということであれば以後ずっとなくていいというルールにも、これはルールを決めることにもなるかと思っておりますので、これは議論しておきたいと思っております。

〇〇〇、いかがお考えですか。

〇〇〇 先ほど言ったように、この性質が変わったことによって代謝系を作用し、新たな有害物質を産生する可能性があるかどうかということはここで考えなければいけないと思うのです。

〇〇〇 それはない。

〇〇〇 これは結論としてなかったからいいのですけれども、でも、それをやるためにこのところはあるかというのは、我々、調べなくてははいけませんね。

〇〇〇 一応、従来だと①、②、③の必要項目に対して、モード・オブ・アクション的に

論述して、そういうことはありませんということであれば、そのほかの評価はオミットしてもいいということですので、その①、②、③の評価基準に照らし合わせるとすると、4ページ目にそういうことはないというのがモード・オブ・アクション的には書かれているので、今までの評価書的に言うと、これで終わりでもいいはずなのです。この委員会としては、それでいいはずだと思います。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 多分、ここの委員会でも審査の過程ではあったほうが先生はよいとおっしゃっていて、最終的には資料から抜けてもいいということですね。ですから、それは2つが両方のところで結果がどちらかに載っていれば、それで中身の説明になる。だけれども、最初の段階として資料はあるけれども、最終的には抜けてもいいのではないかといいことで考えていただければいいかと思います。

〇〇〇 私も先生のおっしゃるとおりであって、それで考えていかないと、言ってみれば並行審査ができない形になってしまうと思いますので、あくまでもここのタスクは①、②、③というように仕切ったほうがいいと思います。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 事務局から御提案なのですけれども、この3ページの中段以降の大きなパラグラフは参考情報ということで、むしろ一番最後になお書きぐらいで書いていただくというような形でいかがでしょうか。

〇〇〇 賛成です。

〇〇〇 妥当な御提案だと思います。よろしいでしょうか。では、そういうようお願いいたします。

ほかにございますでしょうか。

では、評価書案、お願いします。

〇〇〇 続きまして、評価書案の説明をさせていただきます。

評価書案の束になっている資料の55ページからになります。

58ページを御確認ください。「Ⅰ．評価対象添加物の概要」として、名称、用途、申請者、開発者は記載のとおりです。

本飼料添加物は *Bacillus licheniformis* Si3株を宿主とし、*Nocardiosis prasina* NRRL18262株由来のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子を導入し作製したJPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼである。飼料添加物としての使用が認められており、成分規格が飼料添加物成分規格収載書に収載されている。本添加物は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解し、ペプチドやアミノ酸を生成させる酵素であり、鶏の飼料中のタンパク質成分の利用促進を目的として使用されると記載しております。

「Ⅱ．食品健康影響評価」として、1. 本飼料添加物は、欧州、米国、豪州等で使用されている。

2. JPBL001株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼは、食品安全委員会にお

いて「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」に基づき、食品添加物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がないと判断している。

3. 本アルカリ性プロテアーゼは、飼料添加物として鶏の飼料に添加して使用される酵素である。本飼料添加物では、新たな有害物質が生成されることはないため、肉、乳、卵等の畜産物中に新たな有害物質が移行することは考えられない。また、遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や、家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成される可能性は考えられない。

以上の結果から、本飼料添加物については「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「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」に準じて安全性評価を行う必要はなく、当該飼料添加物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。

なお書きとしまして、本アルカリ性プロテアーゼは「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」に基づく飼料添加物の基準及び規格等の改正が必要であることから、農林水産省から別途、同改正に係る食品健康影響評価の要請もなされており、これらの結果も踏まえる必要があると記載をしております。

御説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして、コメントございますでしょうか。

評価書案はこれでよろしいですね。ありがとうございます。

それでは、修正等につきまして、確認の後、食品安全委員会に報告したいと思います。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。

議題「（2）その他」ですが、事務局のほうからございますでしょうか。

〇〇〇 特にございませぬ。

〇〇〇 ありがとうございます。

以上をもちまして、第170回「遺伝子組換え食品等専門調査会」、閉会いたします。

先生方、遅くまでありがとうございました。