

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第171回) 議事録

1. 日時 平成30年2月28日(水) 10:00～12:11

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

・JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、小関専門委員、児玉専門委員、橘田専門委員、近藤専門委員、
鈴木専門委員、柘植専門委員、手島専門委員、山川専門委員、吉川専門委員

(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、吉岡評価第二課長、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

①JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ

6. 議事内容

○中島座長 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第171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」に基づいて非公開で行います。

本日は、所用により岡田専門委員、樋口専門委員は御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるJPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼの安

全性についての審議です。

それでは、お手元の資料を確認いたします。事務局のほうからお願いいたします。

○内海課長補佐 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、食品健康影響評価に関する資料。

机上配布資料として、申請資料の差し替えとなっております。

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、新規品目の議論を行いますので、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。

○中島座長 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いたします。

○内海課長補佐 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。

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

（「相違なし」と声あり） ありがとうございます。

それでは、新規品目であるJPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼについて審議を行いたいと思います。

事務局から御説明をお願いいたします。

○内海課長補佐 申請資料の説明に入ります前に、審議の進め方について説明いたします。

先ほど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がありましたら整理いただきたいと思います。

その後に説明者に入室いただき、質疑応答を行います。

質疑応答終了後、説明者には退室いただき、審議を再開していただくこととしております。

それでは、申請者から提出されている申請書を説明させていただきます。水色の紙ファイルを御参照いただきまして、まずは1ページの左側にあります「はじめに」という概要の

部分から御説明いたします。

本申請品目ですけれども、プロテアーゼの生産性の向上を目的として、*Fusarium oxysporum* DSM2672株由来のプロテアーゼ遺伝子を宿主である*Fusarium venenatum* A3/5株に導入した生産菌によって産生されるものです。

用途としては、乳由来ホエイタンパク質及びカゼインタンパク質の低アレルゲン化ということでして、このプロテアーゼを用いることで、原料である牛乳中のタンパク質を適度に分解することとされております。

こうした用途には、従来はブタの膵臓由来のプロテアーゼでありますトリプシンが広く使われておりました。このトリプシンはタンパク質中のリジン残基とアルギニン残基のC末端側を優先的に加水分解するプロテアーゼで、この基質特異性は β -ラクトグロブリン等のエピトープの分解に適することに加え、タンパク質の加水分解率が比較的低く、また、切断末端に苦味を呈しやすい疎水性アミノ酸ではなく親水性アミノ酸残基を露出する傾向があるため、他のプロテアーゼと比べて苦味が出にくいという利点もあって汎用されておりますが、ブタ膵臓由来ということで、原料の安定供給の面と、kosherやhalalの認証を受ける上での問題があるということで、このトリプシンと類似した基質特異性を持つ微生物由来のプロテアーゼを探索した結果、*Fusarium oxysporum*が産生するSP387というプロテアーゼを得たとあります。

しかしながら、野性株の*Fusarium oxysporum* DSM2672株は生産性が低いため、この株を用いた酵素の製品化は困難であったということから、このコピー数を増やした生産菌を作製したというのが開発の経緯となっております。

続きまして、1ページ目の「第1-1、従来の添加物の性質及び用途等」です。

先ほど御説明しましたとおり、従来の添加物はトリプシン、有効成分として以下、PTNといたします。

基原はブタの膵臓で、反応特異性としてはタンパク質のペプチド結合をリジンもしくはアルギニン残基のC末端側を選択的に切断するというものです。

製造方法、用途、使用形態等は先ほど説明したとおりです。

続きまして、「第1-1・(4)の摂取量」ですが、この部分に関しましては資料の差し替えがございますので、机上配付資料の1ページの部分を御参照ください。黄色でハイライトしたところが修正箇所となっております。

このPTNは乳製品の低アレルゲン化を目的として使用されるということで、製造の際にPTNが用いられる可能性がある食品としましては、国民健康栄養調査報告の分類上では、牛乳、チーズ、発酵乳・乳酸菌飲料、その他の乳製品、その他の乳類が該当いたします。

これらの食品の全てでPTNが乳由来タンパク質の改良に用いられ、かつ、100%残存すると仮定して、ヒト体重1 kg当たりの最大1日摂取量の試算が行われております。

2ページ目の中ほどですけれども、0.24 mg/日/kg 体重と試算されております。

また、このブルーの紙ファイルの2ページにお戻りいただきます。

続いて「第1-2、宿主及び導入DNA」ですけれども、宿主は*Fusarium venenatum* A3/5株です。これは英国の土壌より単離されたもので、20年以上にわたってヒトによる消化に適したマイコプロテインの生産に使用されているとされています。

続いて挿入DNAの供与体、挿入DNAの性質に関しましては、表1と表2にまとめられています。

表2を御参照いただきまして、まず、本申請品目の有効成分であるプロテアーゼSP387をコードする遺伝子として、*tlpSP387*遺伝子。こちらの供与体は*Fusarium oxysporum* DSM2672株となっております。

続いて、マーカーでありますホスフィノスリシンアセチル基転移酵素をコードする*bar*遺伝子。こちらの供与体は*Streptomyces hygroscopicus* ATCC21705株となっております。

同じくマーカーとして用いられておりますアセトアミダーゼをコードする*amdS*遺伝子、こちらの供与体は*Aspergillus nidulans* Glasgow野性株となっております。

これらの遺伝子の導入方法の記載が以降にございますが、わかりやすいのは4ページの図1、生産菌作製の概要の部分を御参照ください。

まず、この宿主であるA3/5株ですが、*Fusarium*属はカビ毒の一種でありますトリコテセンを産生することが知られておりますので、このトリコテセンの前駆体のトリコジェンの合成経路における最初の酵素をコードする●●●遺伝子を欠失させております。

この欠失した菌株を選択する目的で、相同組換えでもって*amdS*遺伝子で、この●●●遺伝子の置換をしております。

続いて、遺伝子導入ベクターを用いまして、選択マーカーとして*bar*遺伝子を連結した*tlpSP387*遺伝子の発現カセットを導入することで、生産菌を得ております。

「第1-3、宿主の添加物製造への利用経験または食経験に関する事項」ですけれども、先ほど説明したとおり、*F.venenatum*は20年以上にわたってヒトによる摂食に適したマイコプロテインの生産に使用されております。

英国では、高タンパク質の肉代替食品として、食料品店等で販売されているということです。

また、その高いタンパク質の分泌生産能力とカビ毒の生産が検出限界レベル以下であるという事実により、安全なタンパク質発現系と考えられているとされております。

5ページの「第1-4 宿主の構成成分等」についてですけれども、この*F. venenatum*は英国では、カビの培養産物から高タンパク質食品を探索する際に、タンパク質の分泌生産性の高さだけでなく、10年間にわたる各種の動物試験やヒトによる喫食試験での安全性の高さから選択されたという経緯があり、動物試験での毒性、ヒト喫食試験でのアレルギー反応はいずれもないとしております。

この*F.venenatum*を含む*Fusarium*属はマイコトキシン産生能があるということで、この●●●遺伝子を欠失させた結果、マイコトキシンの産生も検出限界未満まで低下させることができたとしております。

「第1-5の遺伝子組換え添加物の性質及び用途等」です。

(1) の製品名はSP387、有効成分はプロテアーゼ、基原は*F. oxysporum* DSM2672株です。

反応特異性は従来の添加物と同様、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解するものとなっております。

「第1-5- (2) の製造方法」です。SP387はJPFV001株から産生されるもので、培養工程、精製工程の中で、2度の除菌濾過により生産菌はSP387から分離除去されるとしております。

図2にこのSP387製剤の製造の概略が示されております。

「第1-5- (3) の用途及び使用形態」ですけれども、従来のトリプシンと同じく乳由来ホエイタンパク質及びカゼインタンパク質の低アレルゲン化の用途で使用されるとしております。

「第1-5- (4) の有効成分の性質及び従来の添加物との比較」ですが、従来の添加物のトリプシンであるPTNは、タンパク質のペプチド結合の中のリジンもしくはアルギニン残基のC末端側のペプチド結合を切断する酵素ということで、この切断特性は非常に厳密であることが知られているとされています。

この特性に関して、合成基質を用いた比較を行ったところ、SP387はPTNの特性をほぼ完全に再現し、アミノ酸配列の相同性は37%であるものの、セリンプロテアーゼの活性中心となるヒスチジン、アスパラギン酸、セリンの三残基は完全に保存されているとされております。

7ページの「第1-6- (1) 、遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点」として、表5に記載がございますが、先ほど御説明したとおり、目的遺伝子の供与体を除いては、従来のPTNと申請品目のSP387は概ね同じような性質を持ったものとなっております。

図3にPTNとSP387のアミノ酸配列の比較が示されています。

8ページの「第1-6- (2) 、組換え体と宿主の相違点」が表6にまとめられております。宿主であるA3/5株は●●●●遺伝子を有しておりますが、生産菌であるJFPV001株はこの●●●●遺伝子を欠失する代わりに、*amdS*遺伝子を1コピー含んでおります。

プロテアーゼの発現カセットを構成する*tlpSP387*遺伝子、選択マーカーの*bar*遺伝子に関しましては、それぞれ●●●●導入されているとなっております。

続きまして「第2 宿主に関する事項」ですが、第2-1の分類学上の位置付け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、まず、A3/5株の病原性ですけれども、多くの*Fusarium*属は植物病原細菌として知られておりますが、この*F. venenatum*が属するとされる*Discolor*節に属する種においては、ヒトや動物への感染はこれまで報告されていないとされております。

この*F. venenatum*はバイオセーフティレベル2及び3の実験室や施設を要する病原体等

に分類されていないことから、ヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みのないものと考えられるので、リスク分類のリスク群1に分類されるとされております。

10ページの中ほどですけれども、アレルギー性については、それを示唆する報告はこれまでにないと言われておりまして、適切な環境で扱われる限り、A3/5株によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるとされております。

11ページの第2-4 ですが、ヒトに対する病原性を示すような外来因子も知られていないとされております。

続いて「第3 ベクターに関する事項」ですが、こちらも資料の差し替えがございまして、机上配付資料の束の11ページを御参照ください。

また水色のファイルの要旨にお戻りいただきまして、12ページになりますけれども、「第3-2 性質に関する事項」はこちらに記載のとおりです。

「第4-1 挿入DNAの供与体」は表7にまとめてございます。先ほど御説明したとおりで
ございます。

14ページの「第4-1-（2）、安全性に関する事項」も記載のとおりでございます。

*bar*遺伝子に関しましては、*S. hygroscopicus* ATCC21705株のゲノムDNAを鋳型として用い、*bar*遺伝子をPCRで増幅し、その遺伝子断片を得ています。

第4-2-（2）ですが、図5に挿入遺伝子の塩基数及び制限酵素切断地図が示されております。

まず、*tlpSP387*遺伝子ですが、SP387をコードする遺伝子でして、このSP387はタンパ

ク質のペプチド結合をエンド型で加水分解するものです。

安全性に関する記載ですが、挿入遺伝子の供与体、それから、遺伝子産物のアレルギー性に関する知見は記載のとおりです。

「3) は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」ですが、まず、人工胃液に対する感受性ですけれども、処理開始後2分以内にこのSP387は検出限界以下のレベルまで分解されることが示されたとあります。

図6にこの消化試験のSDS-PAGE及びウェスタンブロットのデータが示されておりますが、この●●●付近のバンドがSP387に当たります。

続いて人工腸液に関する感受性ですが、Figureは18ページの図7に示されてございます。

結論としましては、SP387は消化開始後6時間が経過した時点でも多くは消化されずに残存することが確認されております。

この図7をご覧くださいまして、SDS-PAGEの左から2つ目のレーンで、先ほどの●●●に加えて、四角で囲まれておりますけれども、●●●と●●●付近にバンドがうっすら確認されております。

なお、ウェスタンブロットでSP387の抗体を当ててみましたところ、この●●●のほうのタンパク質がこの抗体には反応が見られておりません。

この点に関しまして、17ページの下から8行目、SP387製剤単一のレーンにおいて、CBB染色のデータでは●●●付近と●●●付近にそれぞれ単一のバンドが観測されておりますが、先ほど御説明した人工胃液のコントロールレーンでは、この●●●バンドは観察されております。この差の要因として、申請者によりますと、電気泳動に供したサンプル溶液のイオン強度（塩濃度等）に起因するものと推測しております。

●●●付近のタンパク質が抗体により検出されなかったことに関しては、製剤中のSP387の純度に関する考察として、後段の第7-4で詳述されておりますので、後ほど御説明いたします。

18ページの「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」ですが、80アミノ酸残基で35%以上の一致するアレルゲン、それから、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を行った結果、それぞれ18個及び11個のヒットが得られまして、重複を整理しましたところ、19ページの表8にございますとおり、11個のアレルゲンとヒットが認められました。

全体としましては、ダニやゴキブリ等のプロテアーゼとのヒットということで、これらはハウスダストを原因とするアレルギーや喘息の原因物質の解明が進められた結果同定されたものということで、すなわち、吸入により呼吸器系が感作されてアレルギーの発症に至るものと記載されております。

各アレルゲンに対して個別に、以降の20ページからアレルゲンの概要と、SP387と従来のトリプシンとのアミノ酸配列の比較がそれぞれ示されております。

26ページになりますが、Der p 3とのアミノ酸配列の比較を示した図14に誤りがござい

まして、誤ってほかのアレルゲンのシークエンスを引っ張ってきていたということで、これも本日机上配付ということで、1枚差し替えをお配りしております。

結果的にはこの四角表で囲んであります相同性スコアに関しては、もともとこの申請資料で書かれておりました数値と変更はなかったということでした。

なので、この要旨の本文の記載自体に誤りはないのですけれども、図14の記載に誤りがあったということで、差し替えをしております。

このアレルギー性に関する考察の結論としましては、30ページの下段から記載がございます。ページの下から4行目あたりからですけれども、構造相同性において最も重要な要素となるのが、エピトープとなり得る8アミノ酸単位での完全な同一性であるが、この同一性が見られた部分はセリンプロテアーゼの活性中心として高度に保存されている部位であり、これまで既存添加物として長期にわたって安全に使用されているブタ膵臓由来のトリプシンにおいても同一である。したがって、既知のアレルゲン等において当該部位がアレルギー性に寄与する程度は明らかではないものの、従来添加物を含めた構造相同性の比較結果ではSP387のアレルギー性の懸念が低いことを示しているものと考えられる。

その上で、万が一、SP387にアレルギー性の懸念があり、最終製品等に残存した場合の安全性について考察するというので、以下の記載がございます。

まず、1点目として、先ほど御説明したとおり、SP387は人工胃液において極めて良好な消化性を示すこと。

それから、ここから5行ほど下っていただいて「更に」とあるのですが、食物アレルゲンとして十分な臨床知見のあるアレルゲンと、一般的にアレルギー性の知られていない食物由来のタンパク質の人工胃液での消化性を比較した研究では、食物アレルゲンは消化されにくく、人工胃液での消化性が摂食の際のアレルギー性を判断する上で重要なパラメータであると報告されているということで、これらの事実、知見等を勘案した場合に、SP387が最終製品等に残存した場合においても、アレルギー性の懸念が低いと考えられるとの考察がなされております。

続いて*bar*遺伝子の機能ですが、ホスフィノスリシンアセチル基転移酵素をコードするもので、植物及び微生物のグルタミン合成酵素を阻害するホスフィノスリシンを無毒化する酵素になっております。

実際にこの組換えにおいては、ホスフィノスリシンを遊離するピアラホスを選択薬剤とした組換え体の選択に使用されております。

安全性に関しては記載のとおり、長年選択マーカーとしての使用実績があること等から、アレルギー誘発性及び毒性を有するとは考えがたいとされております。

32ページは*amdS*遺伝子ですけれども、アセトアミドを分解するアセトアミダーゼをコードし、アセトアミドの存在下でのみ発現するものです。

したがって、アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中で、この遺伝子が挿入された菌株のみが選択的に生育することができることを利用して、マーカーとして機能

しております。

安全性につきましては、先ほどの*bar*遺伝子と同様に、長年選択マーカーとして使われてきた実績があること等から、アレルギー誘発性、毒性を有するとは考えがたいとされております。

続きまして、第4-3ですけれども、まずは「(1) プロモーターに関する事項」です。

この*tlpSP387*遺伝子及び*bar*遺伝子のプロモーターは、ここに記載しておりますとおり、A3/5株由来のグルコアミラーゼをコードする*glaA*遺伝子のプロモーター領域が用いられております。

それから、*bar*遺伝子のほうのプロモーターは*A. nidulans* Glasgow野性株由来の*amdS*遺伝子のプロモーター領域が用いられております。

「第4-3・(2) ターミネーター」ですが、*tlpSP387*遺伝子のターミネーターは*F. oxysporum* DSM2672株由来の*tlpSP387*遺伝子のターミネーター領域。

それから、*bar*遺伝子のターミネーターは*A. niger* BO-1株由来のAMG遺伝子のターミネーター領域が用いられております。

それから、「第4-4 ベクターへの挿入DNAの組み込み方法に関する事項」ですが、こちらも差し替えがございまして、机上配付資料の束の33ページを御参照ください。黄色でハイライトした部分が追記となっております。

先ほど説明した話と同じようなことなのですけれども、もともと遺伝子導入用ベクターしか記載がなかった部分に欠失導入用ベクターpLC31bの作製過程についても追記を求めています。

また水色の紙ファイルの33ページにお戻りいただきまして、「第4-5 構築された発現ベクターに関する事項」ですが、遺伝子導入用ベクターpJPV005の制限酵素地図、構成要素等が34ページの図19、表9に記載されてございます。

「第4-5・(2) 最終的に構築された発現ベクター上でのオープンリーディングフレーム」の確認ですが、このpJPV005プラスミドの、実際に宿主ゲノムに導入される*tlpSP387*遺伝子と*bar*遺伝子の発現カセットの部分を対象にORF検索がなされておりました、その結果183個のORFが検出されております。

これらにつきまして、既知のアレルゲンと毒性タンパク質との相同性検索を行っておりますが、35ページの一番下ですけれども、先ほど構造遺伝子の部分についての既知のアレルゲンとの相同性について御説明しましたが、これとの重複を除いた結果、Can a ?というものと相同性が認められたということで、表10の一番下になります。このCan a ?について38ページ以降で考察されております。

このCan a ?は病原性の真菌であります*Candida albicans*のゲノムDNAライブラリーからクローニングされた推定エノラーゼ遺伝子がコードするタンパク質ということになっております。

相同性検索の結果、80アミノ酸残基で35%以上においてのみヒットが認められておりま

して、相同性スコアに関しましては、SP387と従来のPTNは同等の値を示したということになっております。

39ページになりますが、検出されたORFと構造相同性を示した部位がアレルギー性に寄与する程度は明らかでないものの、従来添加物も含めた構造相同性の比較の結果は検出されたORFのアレルギー性の懸念が低いことを示していると考えられるとありますが、相同性スコアから見ても低い値を示すということから、アレルギー性の懸念は低いのではないかと考察しております。

続いて、既知の毒性タンパクとの相同性ですが、データベースを用いてE-value<0.02を指標に検索を行った結果、先ほどの183個のORFのうち、5個の毒性タンパクと相同性が示されております。

中ほどに記載がございますが、この相同性を示したタンパク質は130種類ございまして、Venom peptide isomerase、beta-lactamase、Venom serine proteaseの3種類に大別されるとなっております。

これらは全てSP387と同じく、serine proteaseに属するものということで、現在知られているタンパク質分解酵素の3分の1近くを占めるとされております。

39ページの下から3行目ですけれども、これらのグループ内の個別のタンパク質は、構造的な特徴と関与する生命現象が共通となるため、作用機序に高い類似性が見られる。また、酵素反応としても、活性中心の求核性セリン残基による基質内アミド結合の加水分解であり共通であるということで、個別のタンパク質ごとではなくグループごとの安全性に関する考察を行ったとされております。

表12、13がこの130種類のタンパク質の一覧になっております。

42ページと43ページが、この3つのグループのタンパク質について、安全性に関する考察が行われておるのですけれども、結論としましては、実際にこの毒性タンパク質が機能を発現する上で関与する複数の構造モチーフがございますが、実際にこの相同性が認められた部分というのは、この構造モチーフを充足するレベルのものではないということで、万が一これらのORFが翻訳されたとしても、その産物がこれらの毒性タンパク質と同様の活性なり毒性を有することは考えにくいという考察がされてございます。

44ページの中ほどになりますが、以上の考察から、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、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ると考察しています。

第4-5- (4) は記載のとおりです。

「第4-6 DNAの宿主への導入方法」ですが、遺伝子導入用ベクターpJPV005の●●●消化産物である*tlSP387/bar*遺伝子発現カセットはプロトプラスト法を用いまして導入されております。

*bar*遺伝子をマーカーとして、ビアラホス存在下での生育を指標に導入クローンの選択が行われております。

45ページの「第4-7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性」についてですが、遺伝子導入用ベクターpJPV005はアンピシリン耐性遺伝子を有していますが、遺伝子導入を行う際に、制限酵素●●●で消化し当該遺伝子を除去しているため、宿主の染色体には導入されていません。

●●●遺伝子を欠損させていますが、その遺伝子欠損に用いたDNA断片からもアンピシリン耐性遺伝子は除去されています。したがって、JPFV001株には抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しておらず、このアンピシリン耐性遺伝子に対するプローブを用いたサザンブロット解析においても確認されております。

「第5 組換え体に関する事項」です。

第5-1、宿主との差異は、JPFV001株とA3/5株は*tlpSP387/bar*遺伝子発現カセット及び*amdS*遺伝子が挿入されている点と●●●遺伝子を欠失している点が相違点となっております。

「第5-2 遺伝子導入に関する事項」ですが、まず、(1)ですけれども、この*tlpSP387/bar*遺伝子発現カセットが宿主染色体のどの位置に導入されたかを調べるために、このJPFV001株のWhole Genome Sequencingを行っております。

その際に、このA3/5株の全ゲノムは、アノテーションされて公表されているものがないため、この解読断片をアセンブルする鋳型のゲノムとして、全ゲノムが公表されております*Fusarium graminearum*のPH-1株というものをを用いております。その結果、●●●に挿入されていることが確認されたとなっております。

さらにPH-1株のアノテーション情報をA3/5株ゲノムに外挿し、導入領域周辺の解析を行っております。46ページになりますが、その結果、●●●に挿入されていることが確認されております。

しかしながら、このA3/5株とPH-1株の直線性は100%ではないということで、このアセンブルを行ったA3/5株のドラフトゲノムを鋳型としてJPFV001株のリードをマッピングし、その上でこのJPFV001株のリードにより、A3/5株をゲノム上でカバーされていない領域があるかどうかを確認しております。

仮にこのような領域があった場合には、JPFV001株ゲノムで欠失が生じたと考えることができるのですが、この解析の結果ですけれども、低いカバレッジを示す●●●遺伝子座を除いては、そのような領域は発見されなかったということで、総合的に判断しまして、*tlpSP387/bar*遺伝子発現カセットの挿入により、安全性上の懸念が生ずるような宿主遺伝子の欠失は起こらなかったと結論付けられたとしております。

48ページですけれども、先ほどのWhole Genome Sequencingでは、導入領域内の全ての塩基を解読することができず、接合末端からそれぞれ約●●●塩基程度にとどまったとなっております。

すなわち、宿主染色体上でのコピー数を明らかにすることができなかったということで、以下に示す定量PCR解析を用いて、ゲノム上の発現カセットのコピー数の推定を行ってお

ります。

詳細は社内文書の15に記載があるのですが、コピー数がゲノム解析により確定されている株を比較対象として使用することが必須となる都合上、実際のコピー数推定対象遺伝子としてプロテアーゼ遺伝子ではなく、もう一方の選択マーカーである *bar* 遺伝子を利用したとなっております。実際には遺伝子導入クローンの選択においても、*bar* 遺伝子の活性を利用しているため、当該遺伝子コピー数が *tlpSP387* 遺伝子のコピー数を代表するとしても差し支えないと判断したとなっております。

この定量PCR解析によるコピー数の推定の結果が49ページに、図23としてデータが示されているのですが、申請者によりますと●●●と推定されたとなっております。

50ページの「第5-2- (2) 宿主におけるオープンリーディングフレームの有無等について」ですが、この *tlpSP387/bar* 遺伝子発現カセットの挿入領域における宿主ゲノムの3' 末端及び5' 末端の近傍配列のORF検索を行った結果ですが、ページの中段ぐらいになりますけれども、5' 側接合部位で2,230 bp、3' 側接合部位で2,500 bpを対象に検索を行っております。

それから、*amdS* 遺伝子を置換導入しております●●●遺伝子座におきましては、5' 側で1,791bp、*amdS* 遺伝子を含む挿入配列は3,168 bp、3' 側の5,728 bpを対象にORF検索を行っております。

その結果ですが、合計104個のORFが検出されておまして、これについて既知のアレルゲン、毒性タンパクとの相同性検索を行った結果が51ページに記載されております。

まず、既知のアレルゲンのほうですが、80アミノ酸残基で35%一致のアレルゲンは該当がなく、連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンとして、一つのタンパク質と相同性が認められております。

こちらがここにございますヘモシアニン、エビアレルギー患者の血清に反応するタンパク質として淡水に生息するエビの一種の筋肉組織から同定されたものですが、これと相同性が認められたということで、この考察がなされております。

51ページの下から3行目ですが、このヘモシアニンとエビアレルギー患者血清の結合の強さの検証において、IgEとの結合にはかなりの高濃度のヘモシアニンが必要とされることが報告されておまして、主要なエピトープが一次構造レベルではなく高次構造レベルで免疫原性を示す可能性と、糖鎖等の修飾分子により覆われている可能性が示唆されております。

こうしたことから、万が一生産菌内で翻訳されることがあったとしても、基本的には非常に低いレベルであると推測できること及びアミノ酸残基の修飾は生物種により異なることが一般的に知られていることと、上記のヘモシアニンに関する報告を総合的に判断した結果として、このORFのアレルギー感作性についての懸念は低いと考えられると考察しております。

続いて毒性タンパクとの相同性検索の結果、3つのORFでヒットが認められております。この3つのうち2つは宿主のゲノム配列に該当するため、残りの1つについて考察を行っております。

52ページの下段のほうになりますけれども、このγ₁34.5ですが、ヒトヘルペスウイルスの増殖に関与するタンパク質として同定されているものでございます。

結論としましては、53ページになりますけれども、このタンパク質の一部と弱い相同性を示したが、タンパク質の高次構造によりもたらされるような機能を再現可能なレベルではないということで、このORFがタンパク質として翻訳されたとしても、毒性を有することは考えがたいと考察されております。

続いて、●●●遺伝子座についてORF検索を行った結果、2個の毒性タンパク質とORFがヒットしております。

まず、一つがPutative amidaseですけれども、*Escherichia coli* CFT073株のWhole Genome解析で同定された推定アミダーゼということで、しかしながら、これが毒性を持つという報告はないとなっております。

TssMですが、類鼻疽菌に由来するタンパク質で、このTssMは感染細胞内で脱ユビキチン化活性を示すことで何らかの抗炎症作用経路に関与するのみであり、単独での毒性は報告されていないということで、このORFがこのタンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有する可能性は考えがたいと考察されております。

以上の考察から、遺伝子導入によって新たに生じたORFが仮に翻訳されたとしても、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るとされております。

ここの下段になお書きがございまして、後ほど説明申しますが、このJPFV001株が産生するSP387は比較的純度が高いということ。それから、遺伝子導入ベクターによる遺伝子導入が宿主染色体上の遺伝子と遺伝子の間の領域で起きていることが示されているため、この遺伝子導入に起因する意図しない遺伝子破壊は生じていないと考えられる。しかしながら、導入領域全体の配列は解析できておらず、また、SP387及び遺伝子発現カセット等で検出されたORFが、データベースに登録された一定のまとまった種類のタンパク質と、弱いながらも構造相同性を示したということで、最終的には安全性試験によって確認することにしたと説明されております。

54ページの下「第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項」は、記載のとおりです。

55ページの「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、SP387製剤は2016年に販売が開始され、以来、以下のとおりフランスや米国等で加工助剤として使用されているとされています。

56ページの「第7-2 組換え体の残存に関する事項」ですが、組換え体由来のDNAが残存しないことをドットブロット解析により確認しております。

「第7-3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」ですが、57ページに移りまして、SP387製剤は、米国のFCC及びJECFAの規格値を満たすことが確認されております。

それから、「第7-4 精製方法及びその効果に関する事項」です。先ほど人工腸液に対する感受性の部分で説明しましたが、SP387抗体に反応しない●●●のタンパク質について考察されております。

58ページですけれども、CBB染色の結果をもとに、この●●●のタンパク質の割合の推定を試みたところ、●●●のタンパク質を併せて100%とした場合、●●●のタンパク質の含有割合が●●●%となったことから、この製剤中のSP387タンパク質の純度は約●●●%と推定されております。

一方で、このSP387製剤中のタンパク質は、人工胃液で速やかに分解されることが明らかになっていること。それから、宿主である*F. venenatum*が産生するタンパク質は、マイコプロテインとして長い食経験が知られていることから、SP387製剤の純度が安全性に関する懸念を生じるようなものではないと考えられるとしております。

第7-5ですが、これまでの説明を根拠としまして、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ないと考えられるとしております。

続いて第8ですが、先ほど御説明しましたとおり、既知のアレルゲンや毒性タンパクと弱いながらも相同性を示したことから、このSP387の試料溶液、具体的には製剤化工程において除菌濾過を行った後の培養液を濃縮したものを被験体としまして、毒性試験が行われております。

その実施に当たっては、OECD及びEUのガイドラインを遵守したということで、遺伝毒性試験、変異原性試験として細菌を用いた復帰突然変異試験、*in vitro*の染色体異常試験、反復投与毒性としてラットを用いた13週間の反復投与毒性試験が行われております。

この結果ですが、復帰突然変異試験、*in vitro*の染色体異常試験ともに、代謝活性化系の存在下、非存在下にかかわらず、陰性という結果になっております。

13週間反復投与毒性試験の結果ですが、61ページですけれども、結論としましては偶発的なものと考えられる所見が幾つか見られたものの、検体投与に関連する毒性所見は認められないことから、本試験のNOAELとして、最高用量投与群の投与量であります●●● mg TOS/kg 体重/日としたとなっております。

このNOAELと、推定されるSP387の摂取量の比較が以降で行われておりますが、冒頭説明したとおり、1日当たりのSP387の最大推定摂取量が●●● mg TOS/kg 体重/日であるのに対しまして、安全係数として100でNOAELを除いた値が●●● mg TOS/kg 体重/日となりますので、この摂取量は十分にこれを下回っているということで考察がなされております。

以上のようなデータ等々をもちまして、この申請品目は安全であると考えられると申請者は結論しております。

申請要旨の説明は以上になります。

○中島座長 ありがとうございます。

本申請書は差し替え資料などもございましたし、先生方には少々読みづらかったのではないかと思います。

特にA/5の宿主に対して、まずはトリコテセン合成の遺伝子を欠失させる●●●遺伝子の欠失をやって、それから、このプロテアーゼ遺伝子の導入を2段階やっているのですが、最初のトリコテセン遺伝子の欠失のところをちゃんと書いていなかった部分が少々混乱を招いているように思いました。修正もされておりますし、これを含めて御議論いただければと思います。

それでは、申請書の1ページから13ページ、ベクターに関する事項までで御意見はございますでしょうか。

○内海課長補佐 中島先生、事務局から1点よろしいでしょうか。

○中島座長 はい。

○内海課長補佐 本日お見えになっておりませんが、専門参考人として出席いただいている澤田先生からコメントがございまして、申請要旨の13ページの一番上のところです。pUC19プラスミドの説明に関してなのですが、この申請資料では「コリシンE1プラスミド由来の複製起点 *Ori* を有し」となっておりますが、澤田先生から、pUC19の *Ori* はpBR322に由来するものであって、そのもとがこのコリシンE1プラスミドの類縁プラスミドのpMB1だと。つまり、コリシンE1そのものではないということなので、ここの記載は、例えば「コリシンE1様プラスミド」と修正を求めるべきではないかというコメントをいただいております。

○中島座長 ありがとうございます。

ただいまの澤田先生からの御指摘に関しましては、私も厳密に言えばそれが妥当かとは思いますが、基本的にはそれでも、pBR322からpUC19に來ている流れというものがございまして、世間ではコリシンE1プラスミドと言っているところも結構あるかと思うので、厳密には澤田先生のおっしゃるとおりかとも思いますが、必ずしも訂正しなければいけないほどのことかとも思うのですが、いかがでしょうか。

○山添委員 過去において、これまではどうしてきたのですか。

○中島座長 多分過去ので、ここを全部ちゃんと直さないといけないとなると結構厄介なことになるかと思います。

コリシンE1プラスミド由来と言っていて、由来だったら1ベースも違ってはいけないというわけでもないと思いますので、私はこのままでいいと思うのです。

そういうことで、これは御指摘は御指摘で厳密にはそうなのですが、このままでよろしいかと思います。

ほかにございますでしょうか。

それでは、13ページから45ページ、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の中で、御質問等ございますでしょうか。

○内海課長補佐 中島先生、もう一点澤田先生からのコメントがございましたので、説明させていただきます。

申請要旨の20ページから30ページにおいて、このSP387と構造相同性を示したアレルゲン全11種類について、それぞれ個別に安全性に関する概説がされているのですが、全てにおいて最後のところに、「全体としての何々との相同性スコアに関しては、SP387とPTNは同等の値を示した」と記載されております。

澤田先生はこの表記はあまり意味がないので不要ではないかとおっしゃっていて、申請者の意図としては、従来のトリプシン、PTNも同程度の相同性を有するものの、安全に使用されているので問題ないという意図で書いているそうなのですが、多分その前提としては、ある程度の相同性があるからこそ言えるのであって、例えば相同性スコアで50に満たないようなものを比較して、同じぐらいの相同性スコアだから安全だというロジックにはならないのではないかとということで、これは削除を求めたほうがいいのではないかと趣旨でコメントをいただいておりますが、いかがでしょうか。

○中島座長 先生方、いかがでしょうか。

私も今の御指摘についてはごもっともで、ここは削除を求めるべきかと思うのです。

削除を求めるということでお願いいたします。

これは人工胃液ではあっさり分解されていますけれども、人工腸液に対してはそれなりに抵抗性があるようですが、この点は問題ないでしょうか。

○手島専門委員 まず、人工胃液で分解されるというのが最初の段階の分解ということで重要な要素ではあるのですが、ここで人工腸液で分解されていなくて、31ページの結論のところですか。4行目以降に、人工胃液において極めて良好な消化性を示すとあり、消化によるSDS-PAGEの検出が難しい程度に断片化したペプチドの状態に腸に移行する可能性もあるが云々とあるのですが、ここで人工腸液で分解しにくいという場合は、たしか胃液とかの産生の弱い人などの場合に腸に移行することがあるのではないかとすることが議論になっていたかと思います。

その後もアレルゲンが変性等で高次構造を失った場合にアレルギー性が低減されることを示したとあるのですが、ここの報告の中では熱の抵抗性とかのデータが出されていけませんので、今回は加熱に対する抵抗性があるのかどうかというデータは出してもらったほうがいいのではないかと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

この点についてはいかがでしょうか。消化液のトリプシンですから、人工腸液で基本的にはむしろ抵抗性があるほうが当たり前で、それが直ちにこれでよくないかということにはならないかと思えます。

また、この実験の場合は、いろいろその辺も心配されているようで、最後のほうで復帰突然変異試験とか、まず、13週間の動物試験とかまでやっておりますので、その辺も勘案しまして、これでやはり耐熱試験を求めるべきでしょうか。

○手島専門委員　そうですね。トリプシンとの比較というか、従来のトリプシンとの比較というのは耐熱性といいますか、熱に対する感受性というのはデータとして出していただければと思います。

○中島座長　申請者が参っておりますので、その辺について質問してみるということでもよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

どうぞ。

○山添委員　今回、一生懸命調べてくださったので出てきているのかもしれないですけども、このハウスダストのものとの相同性のデータが幾つかあって、書かれていますね。それで思いついてしまったのですけれども、これはミルクとかの場合、例えば誤飲して気管に入ったらどうなるかということを、過去にこのようなことを考えたことはないのですけれども、そうした場合には何らかのアレルゲン性を。

つまり、今までは消化管を通して全て入って問題になるという話をしていたのですけれども、誤飲とかそういうことはどの程度考えたらいいいのか、その辺のところを手島先生、どう考えたらいいいですか。

○手島専門委員　アレルゲン性と考えるときは、吸入アレルゲンだから、食物アレルゲンだからということで、比較対象はあまり限定していなくて、吸入アレルゲンに対して相同性があるかということは一つ評価の対象にしていって、それは先生がおっしゃるように誤飲で入ってくる。

あるいは、小麦粉の中にダニが入っていて、それでダニのアレルギーを起こしたというケースもあるということで、吸入アレルゲンだからといって食品に必ず入らないかということではないのと、あとはやはり、そういう吸入アレルゲンで感作されているということはIgEを持っているということですので、何らかの形で交差性のあるアレルゲンを、食品として摂取した場合にアレルギー症状を惹起されることはあり得ると考えます。

○山添委員　先生、いいですか。

○中島座長　どうぞ。

○山添委員　ただ、このところで私が心配しているわけではないのですけれども、実際にはホエイとか牛乳などに加えていって処理をしてしまえば、このプロテアーゼそのものも消化されて、実際には減ってしまっているのではないかと思うのですけれども、処理をされた後にもしそういうデータがあれば何の心配もすることはないので、実際にはこの処理をした後にどれだけペプチド活性が残っているとか、そういうところのデータがもしあれば非常に安心感があるなと思っています。

○中島座長　これも申請者が来ておりますので、その辺のところはどうなのか聞いてみるのがよろしいと思うのですけれども、それでよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

○吉川専門委員　よろしいでしょうか。

○中島座長 吉川専門委員、どうぞ。

○吉川専門委員 私がちょっと一つ理解できなかったことは、人工胃液と人工腸液の中で、このSP387というタンパクの●●●のほうが出てくるといふところの説明がよくわからなかったところがあるのです。

これは何かそういう製剤の違いではなくて、ここではサンプル溶液のイオン強度に起因するとありましたけれども、これは結構後ろのほうで、純度の推定にも考慮されていますけれども、この辺の説明というのはおわかりでしょうか。

ちょっとよく理解できなかったところがあるのです。

○中島座長 例えば57ページの後のほうになりますけれども、●●●と出てきて、そのうち●●●はクローズしなかったからとか、ちょっといろいろ議論されていて、実はこの辺についても、こういう議論で●●●は違いそう、この成分ではないかもしれないから、その半分行って、製剤の純度●●●%としているわけで、そういう論議でいいかと。

これでいささか苦しい論議のようにも思えますけれども、だからといって、それで直ちにこれで安全性を担保できないと考えるかどうかということなのですが、実はこの点は先生方に御議論いただきたいと思ったところです。

手島先生、こういうのはいかがでしょうか。

橘田先生がいらっしゃいますので、お願いします。

○橘田専門委員 社内文書のほうを見ると、●●●と●●●に関してはLC/MS/MSで部分配列ということは言われております。そのデータにまでたどり着くことができなかったのでもわからないのですが、そうであるとしたら、分解されてしまったものかなといふところで納得はできなくはありません。ただ、ポリクロを使っていて、●●●と●●●で、●●●だけ全く反応がないのは疑問に思うところではあります。多分その辺も詳しく会社の方から御説明いただけるかと思うのですけれども、一応データとしてはそういうものがありました。

○中島座長 ありがとうございます。

多分、会社の方たちもそこがよくわからなくて困ったから、これがプロテアーゼ由来ではないということにして、その場合の純度というふうに報告書を書いているのだと思うのですけれども、それでは、この説明でよしとするかどうかということだと思います。

先生方、いかがでしょうか。

○手島専門委員 そうですね。今、橘田先生がおっしゃったように、社内文書の中で調べているというのがあれば、そういうのを申請書の中に入れていただくということで説明を加えていただければと思うのですが。

○山添委員 こういうタンパクの場合には、時間をすごく細かく切って、ゲルに泳動をかけていくと、両方が並行して変化するかどうかで、本当は成分なのか、そうでないのかで切れてきた断片かはわかるのです。

そういうデータはやったのかやっていないのかを聞いていただければ、それである程度、

成分なのか、全然夾雑なのかはわかるのではないかと思います。

○中島座長 この辺も、せっかく担当者が来ているのですから、質問したらいいのではないかと思います。よろしいでしょうか。

○橘田専門委員 もう一つ、ちょっとわからなかったのが、純度のところで、●●●を除外しているのですけれども、これは分解し得るからということで除外しているのか、夾雑物として除外しているのか、そこもこの文書からではよく見えなかったもので、そのあたりも聞いていただければと思います。

○中島座長 私もここは、多分彼らとしても、よくわからなかったから、多分このプロテアーゼの分解産物だろうと思うのだけれども、違うように思えるからという、そのように読み取れましたので、多分質問してもそういうことを答えてくるのではないかと思います。けれども、しかし、聞いてみようかと思います。

ほかにございますでしょうか。

もう一つ、今回トリコテセンの遺伝子を破壊しているわけで、もう一個のプロテアーゼの遺伝子を導入したことについては、ORF検索なりいろいろやっていたということですけれども、トリコテセンのほうについては最初の申請書には、そのプラスミドの説明すらなかったという状況で、これでORFの話とか、その辺がまるっきり抜けています。それでもいいかどうかということです。

この辺も少々気になるところなのですが、御意見をいただければと思います。

○内海課長補佐 事務局から1点補足をさせていただいてよろしいでしょうか。

今、中島座長のほうからお話のあった点なのですけれども、申請書の要旨の35ページになりますが、発現ベクター上でのORFの有無というのを通常ここで記載を求めています。

ただし、今回のものがプラスミドとして宿主細胞中で存在するのではなくて、挿入遺伝子領域のみがゲノムに導入されるということで、このプラスミドから制限酵素でもって切り出される部分のみを対象にORF検索を行っております。

ただ、ここで●●●遺伝子座に置換導入される *amdS* 遺伝子の発現カセットを含む欠失導入用ベクターについては、ORF検索の記載がございません。

他方で、申請要旨の50ページの第5-2- (2) の宿主ゲノム上でのORF検索、ここでは主に導入した発現カセットと宿主ゲノムとの接合部位をターゲットにORF検索をやるのですけれども、こちらでは後者のほうの●●●遺伝子座についてもORF検索がなされておりまして、ただ、このORF検索の範囲が、実際には発現カセット上の領域もカバーされておりまして、具体的にはこの *amdS* 遺伝子の発現カセットのプロモーターだとかターミネーターとかの各構成要素の接合部位も検索範囲としてカバーされているので、実質的には先ほど御紹介した発現ベクター上でのORF検索のところでやられるべき検索は、こちらのほうでカバーしております。ただ、申請要旨の記載上は不備があるという形になっているのかと思います。

○中島座長 今のような説明で、結局組み込んだ後でちゃんと見ていて、そこで問題がな

いので結果オーライということです。

*amdS*の導入で邪魔な遺伝子を消すというのは、糸状菌をいじっているとよくあることで、これ自体はさほど害ではないということなので、これは本来は4-5- (2) のベクターのところに記述しておいていただいて、そう書いておいてもらえれば、このような心配をしなくても済むと思うのです。

この点については、4-5- (2) のところに、しかるべく記述を求めるとしたいと思うのですが、よろしいでしょうか。

ありがとうございます。そういう形にしたいと思います。

先生方、ほかにございますでしょうか。

それでは、組換え体に関する事項のところ。45ページから62ページ。最後のところまで御質問はございますでしょうか。

これは先ほどのところの●●●のバンドのところの話をまた含むわけですが。

○児玉専門委員 ちょっと戻ってしまうのかもしれませんが、43ページとか44ページとか、毒性タンパク質とかの相同性を論じているところがあるのですけれども、43ページの下から7行目あたりに、当該相同性は上に述べたような複数の構造モチーフを充足するレベルのものではないという言葉が出てくるのですけれども、この上に述べたような複数の構造モチーフが文章としてないのです。一体何を指しているのか全くわからない。

上は単純に配列とかそういうのがあって、構造モチーフのことは何も書いていないのです。ですから、定型文章をはめ込んでしまったみたいな感じの文章になっていまして、これはちょっと削除になるのかと思っております。

確認していただいて、修正していただければと思います。

○中島座長 この辺も似たような文章が次々つながっているので、確かにここで構造のことは述べていて、関係ないはずの記載のところだと思いますので、ここは申請者に指摘して、余計なことは削るように申し入れていただければと思います。

私も今の御指摘はもっともだと思いますので、そのように指摘していただければと思います。

ほかにございますでしょうか。

○吉川専門委員 これはあまり重要かどうかわかりませんが、56ページの残存を調べたドットプロットの写真がありますけれども、これは恐らく上の実験と下の実験という、2つの実験を合わせて図にしたと思うのですけれども、せっかくこのように検出限界を調べるようなドットプロットをやっておきながら、下の写真は500 ngということは、相当濃いのを入れているのですけれども、スポットの濃さが比較すると随分弱いように。データを出すのであれば、もう少しこういうのをしてほしいというふうに。

上の一番濃いのは80 ngですから、その下は500 ngを入れておいて、随分薄いようなバンドしか出していない。

これは気づいたところなので。

○中島座長 これはいかがなものでしょうか。

しかし、これは結局のところ、最終的に酵素サンプルからDNAが検出されないというところを見ればよろしいと思うので。

しかし、確かにこれは並べ方が見にくくておかしいですね。

これは多分、上半分のDNA検出限界を示しているデータと、下は別なのではないかと思うので、そこはもう少しちゃんと見て、誤解のないようにデータを出し直してもらうように言うのがいいように思います。

これは多分、図24Aと24Bと分けて示してもらえれば、何も問題がなかったように思うのです。このままですと下半分のところが5 ngと同じに見えるからおかしいという気もしています。

ほかにございますでしょうか。

鈴木専門委員、どうぞ。

○鈴木専門委員 せっかく申請者がいらっしゃるので、ちょっとお聞きしたいことがあるのですけれども、48ページの一番上に書いてある全ゲノム配列を解析して、塩基配列を解読することができなかったということが、コピー数が増えたことによるのか、技術的にどうという理由でできなかったのかということを知りたいです。

○中島座長 それでは、お聞きになってみてください。

○鈴木専門委員 はい。

○中島座長 ほかに。

近藤専門委員、どうぞ。

○近藤専門委員 ちょっと細かいことなのですが、36ページの表10の一番下の「Can a ?」ですけれども、これは*Canis*と区別するために、*Candida*の場合はdを入れることが要るのではなかったかと思うのですけれども、手島先生、どうですか。

○手島専門委員 そうですね。

○近藤専門委員 これは多分、38ページのADFSのデータベースからとってきているので、我々のデータベースですけれども、「申請した?」というのもあるかなと思うので、もし書くならCand a enolaseかなと思うのです。

○手島専門委員 Canが*Candida*のCanですね。*albicans*のaと「?」としているのは通常、まだ国際的な番号が決まっていない場合に「?」にしているので、そういう形で載せてはいるのですが、どういたしましょう。

ADFSのデータベース上は「Can a ?」という形で確かに出ているということになっていますが。

○近藤専門委員 ほかのデータベースを見ると、IUISに登録されていないものはCan a enolaseとか、Can a何とかとか、タンパク名をつくって登録されているので、そこにそろえたほうがいいのかとは思ったのです。

○手島専門委員 そうですね。どういたしましょうか。

ここでは、他のデータベースと合わせるような表記でもよいと思います。

○中島座長 その辺の事情は私はよくわからないのですが、この書き方だとまずいのですか。

○手島専門委員 いえ、IUISでの番号が決まっていないうちに、ADFSの場合は「？」を用いて表現すると定義していますので、この申請書に書かれている表記でも問題はないと思います。「Can a？」の形で引用される場合もあり、そういう表記の仕方もあるということなので。

○中島座長 ほかに合わせるというのは、どの書き方に合わせたらいいのか。

すみません。私も今のやりとりでわからなかったのです。

○手島専門委員 これが36ページの表の下から3行目にかかっているunassigned として()でタンパク質の性質を示すような書き方かと思われるのですが。

○中島座長 すみません。近藤先生、どのように記載されていればよろしいか。

○近藤専門委員 登録されていないものをどのように記載するかというのは私もよくわからないのですが、でも、「？」と書いてあると多分いっぱいあって、Allergomeというデータベースを見ると、いっぱいあるわけです。Cand a何とか、enolase、マンガンSODとあるので、どれを指すのかわからない。

ここでは低分子enolaseと書いてあるので、enolaseと書いたほうがいいのかと思ったのですが。

○中島座長 手島先生、どちらなのですかね。

○手島専門委員 今回の申請者が相同性検索したデータベース的にはADFSであり、その結果が申請書に示されているということを考えますと今回は「？」をつけた形で行かせていただければと思います。

○中島座長 ADFSのこの形で通用するという御意見なのですか。

○近藤専門委員 それでもいいと思っています。ただ、最後に「d」は要るのではないかと思います。

○手島専門委員 「d」というのは何ですか。

○近藤専門委員 *Candida*のdです。Canと書くと*Canis*と区別がつかないので、普通*Candida*はdがつくのだと思います。

○手島専門委員 その点は後ほど確認したいと思いますが。

ほかのデータベースでの*Candida*のアレルゲンはどのような表記ですか。

○近藤専門委員 ほかにアレルゲンの、*Candida*の既知のIUISに登録されたものが、全部Candです。

○手島専門委員 「d」を入れていますか。そうしますと、「d」を入れてもらう形でお願いします。

○中島座長 すみません。素人質問で申し訳ないのですが、その場合*Canis*のほうはCanでよろしいのですか。

○近藤専門委員 そうです。

○中島座長 ありがとうございます。

○内海課長補佐 一応参考資料の38に、このADFSの検索結果が1枚出力されているのですが、これによると「Can a ?」という記載になっております。

○近藤専門委員 多分我々のデータベースの表記が修正されていないのだと思います。

○内海課長補佐 そうということなのですね。

○中島座長 それでは、手島先生、Candにするほうが正しいということなののでしょうか。

○手島専門委員 もう一度調べてみます。

ほかのデータベースとの比較もした上で、現時点ではADFSのCan aなのですから、もしほかのデータベースと比較して、「d」を入れたほうがよろしいということであれば、後でまた報告させていただきたいと思います。

○中島座長 それでは、この件に関しては後ほど手島先生と御相談させていただいて、その上で、やはり必要があるということであれば修正を求めたいと思います。

そうということでもよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、ほかに。

それでは、申請者に質問したいと思います。申請者への質問ですが、まず、このタンパク質について、耐熱性試験なり、そういったこのデータを用いるかどうかということでもよろしいでしょうか。

○手島専門委員 はい。

○中島座長 それから、このタンパク質について、プロテアーゼを使用して、最終的に処理した後に、このプロテアーゼの活性が残っていて、そういうアレルゲンなり何なりになり得る可能性があるものなのかどうかということでもよろしいでしょうか。

ありがとうございます。それから、この●●●について、LC/MS/MS等では分解産物ということを示唆しているけれども、なぜかポリクロールでは反応しないということで、最終的にはこの●●●は夾雑物と判断しているようなのだけれども、その辺の根拠についてお尋ねするというのもよろしいでしょうか。

それから、もう一つ。全ゲノムでなぜ。こちらは鈴木先生から直接御質問していただけますか。

このくらいかと思うのですが、あとは当人に来ていただきまして、その場で必要と思われる質問がありましたら、していただければと思います。

それでは、呼んでいただけますか。

○内海課長補佐 それでは、5分ほど休憩を挟みまして、申請者への質疑を始めたいと思います。

(休 憩)

○中島座長 御多用中お越しいただきまして、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。

○説明者（橋田） ノボザイムズジャパンの橋田でございます。

○説明者（村戸） 同じく、ノボザイムズジャパンの村戸と申します。よろしくお願いいたします。

○説明者（高橋） 同じく、高橋と申します。よろしくお願いいたします。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、早速。

この当該のプロテアーゼについて、人工胃液ではあっさり溶けるけれども、人工腸液では抵抗性があるということなのですが、もう一つ一般に求めている情報がございます。

耐熱性について、そういった情報などはお持ちでしょうか。

○説明者（橋田） 現在持ち合わせておりません。

○中島座長 手島先生、何か御意見はございますか。

○手島専門委員 例えば、ブタのトリプシンとSP387の熱感受性の比較です。酵素活性が熱によってどれくらい落ちるか。そういったデータはお持ちでしょうか。

○説明者（橋田） そういった酵素のキャラクター的な情報でしたらあるはずです。

○手島専門委員 そのデータを。

○説明者（橋田） はい。承知しました。

○柘植専門委員 最終製品になるときの処理の仕方みたいなことは、どのようになるのでしょうか。想定まではされていないのかもしれませんが。

○説明者（橋田） 最終製品というのは、乳製品ということですね。

○説明者（村戸） 全ての用途を把握できていないわけでは不是のですけども、いわゆる加工乳製品ですと、加熱処理が入る食品もあると考えられるのですけども、その食品の特性によっては、そういった工程が入らないものというの、現時点で特定はできないのですけども、想定はされると考えております。

○中島座長 最終的に加熱処理されるようなものであれば、プロテアーゼの活性はほとんどなくなっていると考えるてよろしいわけですか。

○説明者（村戸） 基本的にはそのように考えております。

○柘植専門委員 それでは、もし無処理で乾燥なり何なりであったら、残存することもあり得るということでしょうか。

○説明者（村戸） 自己消化等もありますので、そのあたりは社内に持ち帰りまして、知見があるかどうか確認した上で、書面にて確認させていただきたいと思ひます。

○中島座長 ありがとうございます。

それから、これは人工腸液で分解したときに、●●●のバンドが出ておりまして、LC/MS/MSだとうやら分解産物と考えられるのですが、なぜかポリクローナル抗体で反応しない。

多分、この申請書をお書きになるのは結構苦勞されたのではないかと思いますけれども、最終的な結論として、●●●のこのバンドは夾雑物と判断して抜いて、そのようにお考えになった理由というか経緯等を御説明いただけるとありがたいです。

○説明者（橋田） 書きぶりに矛盾があって大変恐縮なのですが、今、思っておりますのは、分解物であろうと、ポリクローナル抗体で反応しないのは確かに矛盾なのですが、恐らく表面はポリクローナルなので、何かの間違いで反応しないこともあるのかと思って、胃では全て分解されておりますので、ちょっとその辺は、前もこういうことはあったのですが、人に説明がしづらいデータではあるのですが、基本的には夾雑物ではなく分解物であろうと、今は考えております。

○中島座長 橋田先生、よろしいですか。

○橋田専門委員 配列情報からこういう結論に達するのでしたら、それは問題ないかと思いますけれども。

○説明者（橋田） まだそういったところまで。可能性としては、そこから取り出してシーケンスする、アミノ酸の配列を見るのは可能なのですが、そこまではまだやっておりませんで、まだ出たデータに基づく考えという時点です。

○中島座長 LC/MS/MSのデータはありませんでしたでしょうか。

○説明者（村戸） 一応、そのデータに基づいて、恐らくは消化産物ではないかと考えるのが、恐らく一番妥当と考えるのですが、最初、ウェスタンデータのほうでひっかかりがありまして、申請書上矛盾がある書きぶりになってしまって大変申し訳なかったのですが、ポリクローナル抗体とはいえ、全ての領域に満遍なく反応する抗体が入っているということは、必ずしも言えないと思いますので、図7のウェスタンで●●●のバンドが反応していないのは状況証拠から考えて、そういった抗体ができなかった領域の消化断片ではないかという形で、現状は考察しておりますという感じです。

○中島座長 ありがとうございます。

この件に関しまして、先生方。

○鈴木専門委員 技術的な質問なのですが、つくられた菌株のゲノム解読を恐らく実行されていて、正確にコンプライト解読ができなかったもので、次の解析手法として、定量PCR、挿入遺伝子のコピー数の確認を行い、結果報告をしていますが、そのゲノム解読ができなかった背景とかを教えてください。

例えば、ゲノムアセンブリーが完成できなかったとか？マルチコピーの影響により、ゲノム配列がうまく繋がらなかったとか、そういうことは本国から報告は受けていらっしゃいますか。

○説明者（村戸） 本件のシーケンスはショートリードのNGSを使ってやっているのですが、今、御指摘になったように、コピー数の推定からは●●●に挿入されているということで、技術的な限界で、実際にどういう理論モデルを立てて、それに対してマップするのかというのは、實際上非常に難しいというか、本当のロングリードで一発で決まる

ものがあれば、ある程度は中身まで正確に読めたとは思いますが、使っている技術の特性上、そこまではできなかったというところで、ボーダーのところから内側に少し入ったところまでの解説、解析にとどまったというのが背景かと思われます。

○鈴木専門委員 ということは、ショートリードだけで決めようとしたということですね。

○説明者（村戸） はい。当時使っていた技術だとそれが限界だったので。

○鈴木専門委員 わかりました。

○中島座長 先生方、ほかに。せっかく申請者が見えておられますので。

あとはよろしいでしょうか。

○橘田専門委員 ドットプロットのことは。

○内海課長補佐 56ページです。

○中島座長 先生のほうから聞いていただけますか。そのほうが、私が挟まるよりよさそうに思います。

○吉川専門委員 56ページの、要は残存しないということを示しているドットプロットのデータですが、これは恐らく2つの別の実験を同じ図に入れていると思うのですが、せっかく検出限界を定量して、要はドットプロットでシグナルの強さですから、上が一番濃いところで80 ngを使っていますね。下の実験では500 ngを使っているのです。500 ngを使っているのに、これだけは弱いシグナルしか出ていないというのは、データとしてはもう少しきちんと整理というか、合わせてほしいと思っています。

○説明者（村戸） 御指摘いただいた点はもっともだと思いますので、今後のデータでももう少しきちんとしたものを準備するように注意いたします。

○児玉専門委員 よろしいですか。

一応、iPadのデータを広げて見ていたら、結局、1 gの製剤に500 ngの染色体というのを混ぜて、そこからDNA抽出をやって、カラムで取って、一発でのせるためにそれをエタ沈して、4 μ Lに濃縮して、それをメンブレンにのせてやっているという操作をしたデータらしいのです。

結局、そうするとDNA抽出のときにもロスが出るし、カラムでもロスが出るし、エタ沈でもロスが出るので、結局500 ng入れていますけれども、もう全然500 ngは残っていないということだなと。

実際的には、この濃度から見るとせいぜい60とか50とか、DNAの回収率からいくと10%ぐらいしか回収できていないのかなというのが、そういう結果だったのかなと読めるようにこちらの資料には載っているので、そう考えると、それはそういうデータかなと読めました。

そうすると、検出限界の考え方がやや微妙だなというところはありますけれども、基本的には残らない、検出されなかったということですので、それでよろしいかなとは思いますが。

○中島座長 橘田専門委員、どうぞ。

○橋田専門委員 今、中身を見ていないのでわからないのですけれども、製剤についても全く同じ操作をしてかけているということですか。そうすると、ポジコンと並べてやっているということで、当然製剤のほうもかなりロスがきている状態でのせているということですか。

○児玉専門委員 そうです。

○橋田専門委員 わかりました。

○中島座長 そうなると、この検出限界を見ている上のデータのほうが、むしろこんなものがあるのはということになるのですが。

○児玉専門委員 いえ、上はピュアなDNAをのせています。

○中島座長 ピュアなDNAだから、このように切っていけるけれどもという話ですね。ですから、これと同列に並べること自体にどれだけ意味があるのかということになりますね。

○児玉専門委員 上のほうも混ぜて希釈してつくれば一番よかったのでしょうけれども、それをやっていない。

○中島座長 そういうことですね。

だからといって、ただちに問題かということとまた別の評価になりますので。

先生方、ほかにございますでしょうか。

ありがとうございました。これで終わりでございます。

(説明者退室)

○中島座長 それでは、多少突っ込みどころはあるようですが、審議に戻りたいと思います。

説明者からただいまの回答を踏まえた上で、御意見、コメント等ございましたらお願いしたいと思います。

私の考えるところは、これまでも糸状菌でプロテアーゼなり何なり、物をつくらせようとする、普通は大抵1コピーで入ることが多いのですけれども、こういう場合は必ず、なるたけたくさんとれるものを選ぶから、そうすると、こういう申請に上がってくるものに限って、●●●なんてよくそんなに入るなと思うのですけれども、こういうものがよく入ってくる。

普通はきれいにタンデムコピーで入るものなのですけれども、本当にタンデムになっていて、境目がどうなっているかというところは、実は最後の最後までわからないわけです。しかし、それでも酵素製剤の場合にはもとの菌の安全性が確認されていて、それから最終的な酵素は安全性のデータが納得いくものであれば、これまでは大体その辺は認めてきたという経緯もございますので、私もこれのオープンリーディングフレームがどうこう、しかも破壊のところではという、多少欠けているようにも思いますが、私はその点はさほど大きな問題ではないように思います。

私はそう思うのですが、先生方はこの点はよろしいでしょうか。

それでは、幾つか残っている耐熱性の問題、それから、●●●の問題で、こういった説

明で納得がいくか、それとも、追加のデータを求めるかという、その辺のところを議論して決めたいと思います。

まず、手島先生、どうぞ。

○手島専門委員 熱感受性に関しては、既にブタのトリプシンとSP387の比較をしたデータがあるということで、それを出してもらえればよろしいかと思います。

○柘植専門委員 アレルゲン性ということを考えると、耐熱性だけでいいのかと思うのですけれども、ただ、それ以上のデータということになると大変なことになってしまうということで、今まではどうしておられたかなということは思うのですけれども、いろいろアレルギー的には突っ込みどころがいろいろあるということなので、もう少し何かデータがあるといいのではないかと。耐熱性でそれが代えられるものなのかとは思っています。

○中島座長 いかかでしょうか。この辺については、これまではデータベース等をぶつけて、ヒットしたものについて、ヒットすれば議論して、ディスカッションしていただいて、それが納得いくかどうかということやっていて、それ以上に試験をするかということ、それでは、これで患者さんの血清とクロスチェックを求めるといことになるかどうか、その必要があるかどうかという話になります。

クロスチェックは必要とお考えになりますか。

○柘植専門委員 大変なことになってしまうし、それだけでどこまで抑えられるかということも出てきますので。

先生、どうでしょう。

○手島専門委員 そうですね。私も今回申請された酵素と相同性検索で陽性となった10種類のアレルゲンが気になりましてエピトープ情報を検索してみました。これらのアレルゲンでのエピトープの解析データは報告されておりませんでしたので、本申請品と既存アレルゲンとの間で、一致した連続8アミノ酸の部分がエピトープとなっているという報告もないということで、交差性まで求めなくていいかなとは思っています。

○中島座長 私も、しかもこれは諸外国で、欧州では既に認可されているので、既に出回っていて、食経験も海外等で積まれているということを考えると、そこまで求めなくてもいいように私も思うのですが、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 その意味でも、先ほど最終製品に酵素活性のある形で残るかどうかという情報も出していただいて、そこら辺も判断基準の一つに加えたらいかなというふうに。

○中島座長 そちらはほしいですね。そちらは無理なく、しかも持っているはずのデータですので、これは要求したいかと思います。

あとはこの●●●の話。これは申請者が認めているとおり、申請書にそもそも少々矛盾がございますので、これはもうちょっとどちらかに結論して、何らかの事情で抗体が反応しなかったせいなのかと、もうちょっと矛盾のない申請書にさせていただかないとは思っていますが、先生方、いかがでしょうか。

○橋田専門委員 社内文書によると、それがLC/MS/MSでコンファームされた。それはほ

かのところでもうレポートされているというので、まず、そのレポートを拝見させていただきたいと思います。

ただ、実際問題として、胃液処理のゲルの当該レーンについて見てみると、シングルバンドとしてしか出ていないので、確かにここで説明されているように塩濃度が変わって、コンフォメーションが変わって、オートプロテオリシスが起こればそうかなと思うところもないわけではないのですけれども、ただ、やはりポリクロを使っているところが気になるので、コンファームしたというのだったら、そのデータを見せてくださいということをお願いできればと思います。

○中島座長 もっともだと思うのですが、先生方、いかがでしょうか。

○山川専門委員 同じかどうかは。

私もポリクローナル抗体を用いて、分子数の同じ、これは別の分子ですけれども、3つのタンパク質をクマシーでやると同じように当然出てきますけれども、転写すると1本抜けるという経験がありますので、転写効率が悪いということもあるのかもしれない。

ただ、これは同じ分子だとどこまで言えるのかわかりません。

○中島座長 そうですね。

それから、ゲノムの話についてはよろしいですか。

○鈴木専門委員 はい。いいです。

あと、個人的に言うと、糸状菌・放線菌などの微生物ゲノム配列の解析手法は確立されているのに、何でNGSのショートリードだけでやるのかと非常に思うのです。挿入遺伝子がマルチコピーであれば、なおさら、ロングリードも必要です。

しかし、本審査では、安全性の検証であり、その意味では、今から、追加解析でゲノム解析を行っても、直接安全性評価に影響を与える結果を生み出すこともなく、必要性はないと思いました。

○中島座長 ありがとうございます。

事務局サイドから何か。

○内海課長補佐 ●●●のタンパク質の関係で、申請者は本日のお話では、あくまで分解産物だと考えているということであれば、そのトーンで申請書はちゃんと書いてもらうということで、修正を求めたいと思います。

夾雑物の可能性も考慮して、最後の第7-4の58ページのところで、純度の試算をしているのですけれども、これが仮に分解産物だとすれば、●●●純度100%ということになり、その理屈はやはりおかしいので、酵素の純度のデータを求める必要はないでしょうか。

○中島座長 多分そうすると●●●がどちらなのかという、彼らとして結論をしなければならなくなるということですが、それは求めたいと思うのです。

最終製品の電気泳動のSDS-PAGEのパターンでもいいかなと思うのですが、それは求めたいと思うのですが、先生方はよろしいでしょうか。

○内海課長補佐 もちろん●●●が分解産物だという前提で、酵素製剤中のSP387の純度

がいかほどなのかというデータを求めるという趣旨です。

○中島座長 私はそういうつもりなのです。それを求めたいと思いますが、どうでしょうか。

○児玉専門委員 今回は結構つなぎ目の部分のオープンリーディングフレームとか、いろいろなところでアレルゲンが出てきて、全体としてはかなりやっかいなものになっていますので、やはり純度という概念は、この場合は結構大事かなと私は思っていて、100%という数字はあり得ないのですけれども、100%に近い数字だということであれば、そのタンパク質だけを考えれば、我々としてはいいでしょうという根拠の一つにもなるかと思うので、やはり純度の計算はきちんとやっていただいて出してもらったほうが、これだけいろいろアレルゲンとか毒性タンパク質とかひっかかりますというものだとすると、やはり必要かなとは思っています。

○中島座長 私もそう思います。

これまで酵素については、必ずしもこの純度を求めてこなかった経緯もありますが、今回は少々突っ込みどころが多いので、これが純度として100%に近いものであれば、細かいところは目をつぶっても、それなりに安全性は担保できると考えていいように思います。

なので、純度のデータと、耐熱性、最終製品にプロテアーゼの活性が残っているかどうかのデータを求める。全体として、もうちょっと矛盾のない申請書に直していただくということを求めたいと思います。

それでは、ただいま提出されました意見、確認事項を指摘事項として取りまとめて、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指摘したいと思います。 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。

議題のその他ですが、事務局からございますでしょうか。

○内海課長補佐 特にはございません。

○中島座長 ありがとうございます。

本日の議題についてはこれで終了しました。

以上をもちまして、第171回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

ありがとうございます。