

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第183回) 議事録

1. 日時 平成31年3月7日（木） 13:59～17:13

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

- ・ BML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼ

- ・ Rhodobacter sphaeroides 168株を利用して製造された香料バレンセン

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、橘田専門委員、児玉専門委員、近藤専門委員、

樋口専門委員、山川専門委員、吉川専門委員

(食品安全委員会)

香西委員、川西委員

(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、飯塚課長補佐、

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

①BML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼ

②Rhodobacter sphaeroides 168株を利用して製造された香料バレンセン

6. 議事内容

○中島座長 それでは、皆さんおそろいようですので、ただいまから第183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」に基づき非公開で行います。

本日、所用により岡田専門委員、小関専門委員、鈴木専門委員、柘植専門委員、手島専門委員が御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるBML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼ及びRhodobacter sphaeroides 168株を利用して製造された香料バレンセン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。事務局からお願いいたします。

○飯塚課長補佐 それでは、議事次第に基づき、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及び机上配付資料となっております。

なお、これら以外の参考資料については、ファイルにとじまして委員の皆様の机の上に置かせていただいております。

本ファイルについては、調査会終了後、回収させていただき、次回また配付いたします。

不足等がございましたら事務局までお知らせください。

また、本日は新規品目でありますBML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼの申請者である、ダニスコジャパン株式会社、そして、Rhodobacter sphaeroides 168株を利用して製造された香料バレンセンの申請者である、アイソバイオニクス株式会社、株式会社三菱ケミカルリサーチ、協立物産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、事務局のほうから「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報告をお願いいたします。

○飯塚課長補佐 本日の議事に関する専門委員の調査審議等への参加に関する事項について、御報告いたします。

本日の議事に関しましては、専門委員の先生方からいただいた確認書を確認したところ、平成15年10月2日委員会決定の2（1）に規定する「調査審議等に参加しないこととなる事由」に該当する専門委員はいらっしゃいません。

○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、その後、相違等ございませんでしょうか。

○中島座長 それでは、新規品目であるBML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼについて審議を行いたいと思います。では、事務局のほうから御説明をお願いいたします。

○飯塚課長補佐 申請書の説明に入ります前に、審議の進め方について御説明いたします。

冒頭で御紹介いたしましたが、本日は申請者のダニスコ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れば整理していただきたいと思います。その後に説明者に入室していただき、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。

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。

水色のファイルを御用意ください。BML780PULm104株を利用して生産されたプルランナーゼです。

申請書の6ページをお願いいたします。従来の添加物の性質及び用途に関する資料です。名称はプルランナーゼ、基原は細菌の培養物ですが、比較対象としている従来の添加物は、2001年3月に安全性審査済みの *B. licheniformis* BML139株となります。有効成分はプルランナーゼで、こちらは既存添加物名簿に収載されているものでございます。

用途、使用形態ですけれども、プルランナーゼは、アミロペクチン、グリコーゲン、デキストリン、プルランなどの α -1,6-グルコシド結合の加水分解反応を触媒するものです。

用途につきましては、ビール、またシロップ製造用途を想定しているということでございます。

摂取量につきましては、ビールとシロップの消費量が記載されておりますが、記載のとおりでございます。

9ページは、宿主及び導入DNAですけれども、宿主は、*B. licheniformis* BRA7株となっております。

プルランナーゼ遺伝子につきましては、*B. deramificans*の野生株でありますT89.117D株由来となっております。

挿入DNAの性質につきましては、10ページの表1にございます。相同組換えに使用いたします、*catH5'*フランキンギン領域と*catH*遺伝子発現カセットとPULm104遺伝子発現カセットがございます。

図2に示しますDNA断片を含む遺伝子導入用ベクターpICatH-PULm104 Ori1を、宿主BRA7株を改変して作製したBML780株にプロトプラスト法で導入したとしております。

導入した遺伝子導入用ベクターPULm104 Ori1のうち、図2の構成のDNA断片をBML780株の染色体上の標的遺伝子座として欠失させた*catH*座へ相同組換えにより挿入し、PULm104を生産するBML780PULm104株を得たとしております。

12ページをお願いします。また、BML780株は、宿主BRA7株の染色体上の*amyL*遺伝子、*catH*遺伝子、*spo II AC*遺伝子、*aprL*遺伝子、*mpr*遺伝子を欠失して作製した遺伝子改変型の菌株ということでございます。

宿主の添加物製造への利用経験と食経験ですけれども、1972年以降、カルボヒドラーゼあるいはプロテアーゼの生産に安全に用いられているということで、食品用酵素の生産菌として安全性は確立されているということでございます。

14ページの3パラになりますが、BRA7株は、既存の添加物である「Optimaxプルランナーゼ」以外にも α -アミラーゼ、エキソマルトテトラオヒドラーゼの生産菌株の宿主としても用いられているものでございます。

また、*B.licheniformis*は、ヒトに対して非病原性ということで、有害生理活性物質・栄養阻害物質の生産についても報告はないということでございます。

国立感染症研究所及び日本細菌学会による分類において、取り扱い保存に関して最小限の安全措置で十分なバイオセーフティーレベル1の微生物と判断されているということでございます。

遺伝子組換え添加物の性質、用途ですけれども、日本での製品名については、これから選択の予定ということです。

有効成分はプルラナーゼ。

製造方法、用途、使用形態は、既存のプルラナーゼと同様ということでございます。

16ページをお願いします。従来の添加物及び組換え体と宿主の相違点ですけれども、PULm104は、既存のプルラナーゼのアミノ酸配列と比較してN末端側の104アミノ酸を欠失しているということです。既存のプルラナーゼでは、生産菌が分泌するプロテアーゼの働きでN末端側の100アミノ酸前後が切断される。その結果、最終産物には、プロテアーゼによる切断を受けなかった全長型と、切断を受けた短縮型が混在していたということです。

短縮型の活性を分析したところ、全長型と同等の活性を保持しているということがわかったということで、製品の均一性及び生産性を高める目的から、短縮型のみを生産するよう遺伝子の改変を行い、PULm104を開発したということでございます。

組換え体と宿主の違いですけれども、組換え体は、宿主であるBRA7株と比較しまして、PULm104の生産能を獲得していることで、その他の*amyL*遺伝子、*spoIIAC*遺伝子、*aprL*遺伝子、*mpr*遺伝子を欠失しているということが違いでございます。

タンパク質高次構造の安定化と改良によって、BML780PULm104株では、比較対象としておりますBMP139株に対して、プルラナーゼ生産能が理論値で●●●%程度改善しているということでございます。

18ページの2番になります。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。*B.licheniformis*は、広く自然界に認められているということで、土壌に多く見られまして、乾燥食品、香辛料、豆類、コンポスト等にも存在しているということです。また、産業上広く使用されており、病原性を有しているとは考えられないということでございます。

19ページの第3は、ベクターに関する事項です。宿主の改良のために用いる欠失用ベクター5種と、*PULm104*遺伝子導入のために用いるベクター1種の合計6種類がございます。

20ページは、 α -アミラーゼの欠失用ベクターです。

21ページは、その他欠失用ベクターです。

22ページには、*PULm104*遺伝子導入用ベクターが記載されております。こちらの*PULm104*導入用ベクターにつきましては、pICatHに*PULm104*遺伝子発現カセットとマーカー遺伝子として*catH*遺伝子発現カセットを組み込んで作製しております。

それぞれ*E.coli*由来のプラスミドpBR322をバックボーンとしているものでございます。

24ページをお願いします。第4、挿入DNAの供与体に関する事項です。欠失型遺伝子

の供与体につきましては、宿主でありますBRA7株に導入した欠失型遺伝子及び*catH*遺伝子発現カセットに組み込んだ*catH*プロモーターとターミネーターは、全て宿主BRA7株由来となっております。

*PULm104*遺伝子の供与体につきましては、*B.deramificans* T89.117D株由来となっております。

安全性に関する事項ですが、欠失型遺伝子の供与体につきましては、宿主と同じですので割愛させていただきます。

*PULm104*遺伝子の供与体につきましては、OptimaxプルラナーゼのDNA供与体としても用いられているものでございまして、国立感染症研究所及び日本細菌学会における分類においても、バイオセーフティーレベル1の微生物と判断されるということでございます。

30ページをお願いします。挿入遺伝子の機能に関する事項です。BML780PULm104株の染色体に組み込まれた*PULm104*遺伝子発現カセットによって、プルラナーゼが生産されるというものです。また、*PULm104*遺伝子発現カセットとともに、BML780PULm104株の染色体に組み込まれた*catH*遺伝子発現カセットによりまして、宿主でありますBRA7株由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼが生産され、PULm104生産菌の選抜が可能になるということでございます。

32ページの図6には、上段に全長型、下段に短縮型のプルラナーゼのアミノ酸配列が記載されて比較されております。赤い色の枠で囲まれているところが推定される触媒サイトということでして、N末端側104のアミノ酸の欠失は、プルラナーゼの触媒サイトに影響を与えていないということが示されております。

挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性ですが、*B.deramificans*に関しまして、アレルギー誘発性に特段の懸念はないと考えられるとしております。

アレルゲンデータベースで検索したところ、既知のアレルゲンに関するヒットはなかったということでございます。

34ページですが、遺伝子産物の物理化学的処理が行われております。人工胃液及び人工腸液で評価がされております。人工胃液のペプシン処理は、PULm104のバンドが1分以内に消失することがSDS-PAGEによって示されております。

また、人工腸液のパンクレアチン処理は、0.5分以内に消失することがSDS-PAGEによって示されております。

37ページですが、遺伝子産物のアレルギー誘発性です。2016年以降、シロップの生産などに用いられておりますけれども、PULm104のアレルギー性の懸念につながる事象は報告されていないということでございます。

39ページになります。加熱後残存活性が見られておりまして、ビールの殺菌条件として72℃30秒間の加熱の後に、PULm104の活性が残存していないことが示されております。

また、シロップの製造工程では、液化工程後にシロップ原液は、130～140℃まで加熱されるため、ほかの酵素同様にPULm104は失活させられるということでございます。

45ページをお願いします。6番、DNAの宿主への導入方法ですけれども、こちらは図12に、BML780PULm104株の作製の概要が記載されております。ステップ1からステップ5までが欠失過程が記載されております。ステップ5までで作製されたBML780株が示されておまして、そこから*PULm104*遺伝子発現カセットを持つOri1株を作製しております。

48ページになりますが、BML780PULm104株のゲノムの全領域をリードとして増幅しまして、配列解析を行っております。これには次世代シーケンサーが用いられております。*PULm104*遺伝子発現カセット及び*catH*遺伝子発現カセットが1カ所にタンデムに挿入されていることを確認したとしております。

また、コピー数ですけれども、BML780PULm104株には、*PULm104*遺伝子発現カセットが●●●コピー含まれていると推定したということでございます。

49ページです。BML780PULm104株にベクター配列が存在していないことの確認がされております。抽出した染色体DNAを鋳型としまして、ベクターpICatH由来の配列を検出するプライマー2つを用いまして、PCRを行っております。陽性対照では、増幅断片が検出されておりますが、●●●PULm104株のいずれにも、この増幅断片が検出されなかったということでございます。

51ページです。*PULm104*遺伝子及び近傍のORF検索が行われております。DNA断片挿入前の染色体配列と一致しなかった40個のORFを相同性検索の対象としまして、既知のアレルゲンとの相同性を検索しております。

40個のORFに関しまして「連続する80アミノ酸配列以上で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンの数」また「連続する8アミノ酸配列が既知アレルゲンと一致する配列の数」をそれぞれ評価したところ、いずれについても該当するアレルゲンは見出されなかったということでございます。

有害タンパク質との相同性ですが、既知の毒性タンパク質との相同性について検索しております。E-valueの閾値を10.0に設定して検索した結果、条件に該当するORFは見出されなかったとしております。

こちらで記載内容に飛躍がございまして、本日、机上配付資料として配付しておりますこちらの1枚紙をお願いいたします。資料の一番後ろにつけてございます。有害タンパク質との相同性についてというところで、一番上のパラは一緒ですが、2パラ目からですが、「E-valueの閾値を、BLASTPアルゴリズムの初期設定値である10.0に設定して検索した結果、複数の毒性タンパク質がヒットしたものの、個々に確認した結果、いずれも安全性に懸念はないと考えた。

なお、検出されたORFに対してヒットしたタンパク質のうち、最も低いE-valueは●●●で、このE-valueは生物学的に意味を持つ相同性とは考えられない。

したがって、検出されたORFに対して、有害タンパク質との生物学的に有意な相同性を持つものはないと考えた」。こちらが修正されてきておりますので、御確認をお願いしたいと思います。

申請書にお戻りいただきまして、欠失型遺伝子及び近傍のORF検索も行われております。欠失変異を導入したBRA7株染色体上の4つの遺伝子座とその近傍配列について、検索が行われております。●●●個のORFを相同性検索の対象としております。

検出したORFに関しまして、既知のアレルゲンとの相同性を検索しております。表6のうち「3.欠失後の*bli mpr (mpr)*」との相同性を示したアレルゲンは、*American cockroach*または*German cockroach*のアルギニンキナーゼであったとしておりまして、今回の遺伝子座の欠失によって生じたものではなくて、宿主染色体の内因性の遺伝子配列によるものとしております。

また、表中「4.欠失後の*bli aprL (apr)*」との相同性は、●●●番目の読み枠が示したということで、●●●番目の読み枠に対して●●●個のアレルゲンがヒットしております。最も高い相同性を示したものは*B.licheniformis*自体の内因性のサチライシンであったということで、その他のヒットは、近縁のサチライシン及び類似の配列を持つセリンプロテアーゼに対してであったということでございます。

この読み枠は、終止コドン間の読み枠なので翻訳されないということでして、宿主に導入した欠失変異によるアレルギー誘発性の懸念はないと考えられるとしております。

また、既知の毒性タンパクとの相同性検索もしておりまして、欠失後の*amyL*遺伝子、欠失後の*spo II AC*遺伝子、*mpr*遺伝子座に関して見出された既知の毒性タンパクとの間に、相同性は示されなかったとしております。

しかし、*apr*遺伝子につきましては、●●●番目の読み枠と相同性を示すタンパクが2つ検出されたということで、最初に検出されたタンパク質は、*Candida albicans*が生産するセリンプロテアーゼKEX2でありまして、その次に検出されたタンパク質は、*Nereis japonica*、ゴカイですが、生産するセリンペプチダーゼであったということで、こちらにつきましても終止コドン間の配列であることから、タンパク質は発現されないと考えられるとしております。

56ページをお願いします。諸外国における認可状況ですが、フランス、デンマークにおいて、食品加工助剤ポジティブリストに記載されているということでございます。

組換え体の残存に関する事項ですが、生産菌が検出されないということを確認しておりまして、また、生産菌に由来する組換えDNA断片も検出されなかったということでございます。

製造に由来する非有効性成分の安全性に関する事項ですが、PULm104を有効成分として含む酵素製剤は、JECFAの食品用酵素剤の一般規格に準拠している。またFCCの酵素製剤の一般規格の要求事項も満たしているということでございます。

宿主BRA7株も、食品用酵素の生産菌として多くの使用経験があり、長期にわたる使用経験において安全上の問題は報告されておらず、さらに有害な物質を生産するという事例も見当たらない。

このことから、本生産菌株に由来する非有効性成分には、安全性についての特段の懸念

はないと考えているということでございます。

60ページです。生産工程で生成されたPULm104の純度は、●●●%であったということでございます。

以上、第2から第7までの検討により、PULm104の安全性及び安全性を担保する取り扱いに関する十分な知見が得られていると記載されております。

事務局からの説明は以上でございます。

○中島座長 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います。

まずは、1ページから24ページ、ベクターに関する事項のところまででございませんでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 12ページの2パラグラフ目なのですけれども、N末端側の104アミノ酸がないのですけれども、ないこと自体は「アスパラギン酸及びグルタミン酸には影響を与えていない」と書いてあるのですけれども、アミノ酸には直接には影響を与えないので、これは触媒部位が保存されているとか、この欠失部分には触媒サイトは含まないとか、何か違う表現にしていいただきたいと思います。

○中島座長 私もちっと見た感じで違和感があるなと思ったのですけれども、やはりそうお感じになりますか。

○児玉専門委員 はい。

○中島座長 それでは、書きぶりの問題ですので、この点は申請者に指摘をして今のようにお願いできますか。

○飯塚課長補佐 わかりました。

○中島座長 ほかにございますでしょうか。そんなに長いものではないようなので、24ページから49ページ、挿入DNA、遺伝子産物等についてまで、ございましたらお願いいたします。

11ページに、タンデムに入っていて●●●コピー入っていると言ったのかな。48ページに、実際に次世代シーケンサーではかった数を書いてあるとあるのですが、タンデムに入っているのはそうだと思うのですけれども、このつなぎ目の配列がちゃんとどうなっているのかとか、つなぎ目のところで妙なORFができていないのかとか、資料にはなかったので、この辺を私としては申請者に特に質問しておきたいと思うのですが、いかがでしょうか。

もう一つ、これは*Bacillus*に組換えで入れているわけなので、それはいいのですけれども、これで●●●コピーとかというと、*Bacillus*のゲノムはそんなに安定ではないので、本当にいつまでもこの●●●コピーでいるのか。普通に考えると*Bacillus*だったら割と速やかにまた組換えが起こってコピー数が減ったりとかするのであるけれども、その辺、安定性についてもまた、私としては申請者に一言聞いておきたいなと考えております。多分その辺は確認しているという返事が来ると思うのですけれども、私としてはその一言をいた

だいておきたいと思います。

先生方、ほかにございますでしょうか。

もう一つは49ページです。ゲノムにこのベクターが含まれていないことは、*catH*でPCRで確認しているのですけれども、PCRで確認できるのは、そのプライマーの張りつく位置が傷ついていないということだけしか確認できないので、これで本当にこのベクターのところが全くないと言っていいのかどうか。彼らとしては、次世代シーケンサーで塩基配列を決めているわけなので、そのデータを持っているはずですから、ベクター部分が含まれていないというデータをちゃんと確認して書いてもらうということを要求するのは、そんなに過大ではないように思うのですけれども、先生方はいかがでしょうか。

○中島座長 この点も聞いてみたいと思います。

ほかにございますでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 胃液、腸液の消化性テストのところの35ページ、36ページですけれども、これは添加物なので抗体を用いたウエスタンまでは要求していなくてもいいのではないかとってはいるのですけれども、●●●見えるのです。●●●のものは、胃液のほうではちょっと分解しにくいようですけれども、問題は、●●●のほうは腸液のほうを見ると、従来品にも見えるようにも見えるので、どちらも多分問題はないのだらうなと思うのですけれども、一応これについて何か情報をお持ちですかというのは聞いてみたいなと思います。

○中島座長 では、呼ぼうと思いますので、お聞きいただけますか。

○児玉専門委員 はい。

○中島座長 ほかにございますでしょうか。最後まで、60ページまでも含めて御指摘の点等ございましたらお願いいたします。

○児玉専門委員 一ついいですか。この机上配付された部分なのですけれども、有害タンパク質との相同性についてというところで「最も低いE-valueは●●●で」と書いて「このE-valueは生物学的に意味を持つ相同性とは考えられない」と書いてあるのですけれども、この書き方をするとE-value●●●はオーケーになってしまうので、E-valueの数値で判断するのではなくて、相同性が見られた部分は短いとか、ごく一部分しか構成していないとか、何アミノ酸中何個ぐらいしか合っていないとか、別な表現で。

○飯塚課長補佐 わかりました。確認したところということですね。

○児玉専門委員 はい。この文章だと、●●●はオーケーに見られてしまうのです。E-valueの数値がが先行してしまうので、それは避けたいと思いました。

○飯塚課長補佐 修正いたします。

○中島座長 これは別に書きぶりをやっていただければ。

○児玉専門委員 はい。修正してもらえれば。

○中島座長 では、確認してそこは事務局のほうでお願いできますか。

○飯塚課長補佐 「E-valueは」というのが主語になるのがということですね。

○中島座長　　というか、このE-valueのみをもって判断したという前例を残したくないということですね。

○児玉専門委員　　そうです。

○飯塚課長補佐　　わかりました。

○松井技術参与　　ちなみに●●●程度の相同性なので短い領域です。

○児玉専門委員　　私も資料を開けて見ていたのですけれども、全然低い、全然問題ないので安全上は問題ないのですけれども。

○中島座長　　●●●も一致していれば、一応コンピューターではひっかかってくるのでこうなるのですけれども、短いとか、そういった理由で問題ないという書きぶりにしていただければと思います。

○飯塚課長補佐　　座長、済みません。11ページの、今回*catH*5'フランキング領域で挟まれているのですが、片方が3'でなくてよいかという確認は。

○中島座長　　それは一応聞いてみますけれども、これは1回組換えだったら5'3'でなければだめなののですけれども、これは2回組換えでやっているので、コンストラクトから考えてこれで合理的だろうと思います。私もそこが気になったので資料を精査してみたのです。一応聞いてみますけれども、多分2回の組換えでこれでやっているという返事が来ると思います。でも、聞いてみます。

○飯塚課長補佐　　わかりました。

○中島座長　　どうぞ。

○川西委員　　細かいところで恐縮ですが、59ページのSDS-PAGEでの純度評価についてです。このレーンで●●●なので、問題がないといえれば問題がないのですけれども、私はじっと見て、●●●ような気がします。

これは●●●ですので、別にいいではないかということもあるのですけれども、比較のために同時に分析した種々の製造条件で得られたというところで、このあたりが、これは何か違いがあるサンプルなのかなと思って、何が違っているのか気になります。これは電気泳動上の問題なのか、そのあたりを聞いてみたいと思います。

○中島座長　　それは直接お聞きになりますか。

○川西委員　　はい。

○中島座長　　では、振りますのでそうしていただければと。

○川西委員　　非常に小さなことなのです。ただ、私はもともと薬のほうでこういう製造工程で、繰り返しの一定性を非常に重視する人間なので、こういうデータを見ると少し気になるのです。

○中島座長　　ありがとうございます。

それでは、今のところ、まず、10ページと11ページ、*catH*が5'5'になっていますけれども、これが5'3'でなくて5'5'でいいのかという点。

つなぎ目のこの配列のところの確認はどうなっているのか。

●●●コピーとなっているけれども、この安定性についてはどうなっているのか。

49ページ、ベクターの配列が含まれていないことは、PCRで確認しているけれども、ゲノムで見ているはずなので、その点の確認。

35ページのところの、SDS-PAGEで余分に見えるバンドについて。

59ページ、SDS-PAGEの純度の検定についてということです。

あとはお呼びしたときに、その場で何かお気づきになったことがあれば、適宜聞いていただければと思います。

では、呼んでいただけますでしょうか。準備が整うまで休憩にいたします。

(休 憩)

○中島座長 お忙しいところお越しいただきまして、ありがとうございます。

それでは、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。

○ダニスコジャパン株式会社（笠井氏） ダニスコジャパンの笠井と申します。

○ダニスコジャパン株式会社（河原氏） 同じくダニスコジャパンの河原と申します。

○中島座長 まず10ページ、11ページのこの絵なのですが、組換えの発現カセット、2回の組換えだからこれでいいのかなとも思うのですが、*catH5'*フランキングで両方とも5'フランキングになっておりますが、これはこれで正しいのでしょうか。

○ダニスコジャパン株式会社（河原氏） これはこちらで正しいです。

○中島座長 1回組換えだと5'5'ではないといけないけれども、これは2回組換えだからこれでいいということによろしいですか。

○ダニスコジャパン株式会社（河原氏） おっしゃるとおりでして、2回の組換えでございます。

○中島座長 ありがとうございます。

17ページに発現カセットが●●●コピー入っている。これは後の次世代シーケンサーでも確認されているのですが、タンデムで繰り返しているところのつなぎ目の、繰り返しと繰り返しの間のつなぎ目のところの配列は、余分な配列や余分なORFが生じることなくきちんとつながっておるものなのでしょうか。

○ダニスコジャパン株式会社（河原氏） 正確に申しますと、次世代シーケンサーの技術的な見解として私どもの理解ですと、発現カセットと発現カセットの間のつなぎ目がどのようなになっているかというのは、技術的に読むのが難しいと理解をしております。ただ、外来の意図しない発現カセット以外の配列が含まれないということは確認をしております。

○中島座長 発現カセットとカセットの間をまたぐリードもあったはずなのですが、それで矛盾するような結果は得られていないという返答と考えてよろしいわけですか。

○ダニスコジャパン株式会社（河原氏） はい、確認をしております。資料29番でして、●●●ですけれども、こちらでつなぎ目というものを想定しておりまして、これらFigure1

～3に相当する配列に関してORFサーチをしておりますので、その点に関しては懸念のあるORFが検出されることはない。検討済みであるということをお願いしたいと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

Bacillus●●●コピーということなので、*Bacillus*の相同組換えで入れているということは、当然また相同組換えも起こり得るわけで、●●●コピーというのはそれなりに安定なものなのでしょうか。

○ダニスコジャパン株式会社（笠井氏） そのように理解しております。日本のデータではないのですけれども、継代の安定性を見ろという国もございまして、そちらのほうではちゃんと安定しているという話を聞いていることから、少なくとも生産性に支障が出るような変動というのはないと理解しております。

○中島座長 できればこの概要書にその点も書き加えていただけるとありがたい。また、先ほどの点についても書き込んでいただけるとありがたい。

49ページ、ベクターが含まれていないこと。これは*catH*に対する、PCRでだけ確認しておるのですが、厳密に申し上げますとPCRで確認できるのはそのプライマーで保持されている配列が、プライマーの張りつく領域がないということだけです。それをもってベクターが全然ないと言い切っていてどうなのかということで、ゲノムを次世代シーケンサーで読んでおるのであれば、ベクターにのみに由来する配列はなかったということが確認できていると思うのですが、この点はいかがでしょうか。

○ダニスコジャパン株式会社（笠井氏） ゲノムのその部分についての情報は特段確認していないのですけれども、この検査法は菌株を非常に長く使っている経験値からも、その点は経験値も踏まえてこのような結果で、特異的なところを見ていれば安定しているので、先生おっしゃるようにここのプライマーの部分以外のところは確かに、このデータだけでは見えていないのですけれども、そこも安定しているだろうと考えております。

○中島座長 私も特に疑っているわけではないのですが、せっかく次世代シーケンサーを全部読まれているのであれば、それでゲノム由来の配列とか、矛盾はなかったと書いていただければ、それで安心できる。そういうことでございますが。

○ダニスコジャパン株式会社（笠井氏） 私ども日本にR&Dがないものですから、担当の者を探して聞いてみようと思います。ありがとうございます。

○中島座長 ありがとうございます。

35ページ、36ページは児玉先生から。

○児玉専門委員 35ページ、36ページのSDS-PAGEのデータもしくは59ページのデータでもいいのですけれども、メインのバンドがあって、●●●この余分なタンパク質、見えているタンパク質について何か情報はお持ちでしょうか。

○ダニスコジャパン株式会社（笠井氏） ここの部分について特に聞いておりませんで、培養物なので何か分解している、目的タンパクが発現した後で多少分解するようなことがあるのかなと今のところ推察しております。

○児玉専門委員 ●●●と見えているので、あと、こういうことは実際にタンパク質をやっているとよくあると言えばよくあることなのですが、一応、R&Dに聞くことがあれば、そういう情報を持っているか持っていないかというのは聞いていただければと思います。

○ダニスコジャパン株式会社（河原氏） 承知いたしました。

○中島座長 川西先生、お願いします。

○川西委員 今の質問とも多少関係するかなと思うのですが、念のための質問です。

59ページの図17の●●●だと。それで●●●はそれぞれ比較のために同時に分析した種々の製造条件で得られたということなのですが、よく見ていると●●●気もします。これは●●●ではないので気にするなと言えれば気にするななのですがけれども、何か具体的にこういうことがあって、こういうふうになっているんだということがわかっていれば知りたいなと思います。ということは、製造条件をきちんと把握できているかということにもつながるので、そのあたりわかっている情報、あるいは単純に電気泳動上のアーチファクトならアーチファクトなのか、そのあたりいかがでしょうか。

○ダニスコジャパン株式会社（笠井氏） 問い合わせてみようと思います。御指摘ありがとうございます。

製造条件のほうなのですが、●●●実際の製造条件はその辺は御心配いただかなくても大丈夫かなと考えております。

○川西委員 一番気になるのは、別のものだったということであったりすると、きちんと製造の一定性が担保されていないということにつながるので、そのあたり確認がとれる情報をお願いしたいと思います。

○ダニスコジャパン株式会社（笠井氏） 恐らく製造条件を振って、こういうものが出てこないものを選んだというのがきちんときれいにメインのバンドが出ているもので、それに対して実際の工場での製造条件を立てていると思いますが、質問してみようと思います。ありがとうございます。

○中島座長 先生方ほかにございますでしょうか。事務局のほうからございますか。

○飯塚課長補佐 特にはありません。

○中島座長 終わります。お疲れさまでした。ありがとうございました。

（説明者退室）

○中島座長 それでは、審議に戻りたいと思います。

大体予想された答えはいただけたかなと思うのですが、先生方いかがでしょうか。ただいまの回答を含めてございますでしょうか。

それでは、本件につきましては、特に安全上の問題はないと思いますので、質問に対して回答が来ましたところで私と質問された先生とで確認いたしまして、それで承認したいと思います。よろしいでしょうか。

○中島座長 ありがとうございます。

では、評価書案について審議したいと思います。よろしくお願いいたします。

○飯塚課長補佐 それでは、お配りした資料の食品健康影響評価に関する資料①をごらんください。

6ページ、評価対象添加物の概要です。名称はBML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼ。用途はビール及びデンプン糖製造時の糖化効率の向上です。

本添加物は、*Bacillus licheniformis* BRA7株を宿主として、*B. deramificans* T89.117D株由来の改変プルラナーゼ遺伝子を導入して作製したBML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼである。本添加物は、アミロペクチン等の α -1-6-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、ビール及びデンプン糖製造時の糖化効率の向上を目的として使用されると記載しております。

食品健康影響評価です。従来の添加物の性質及び用途に関する資料です。

名称はプルラナーゼ、基原は*B. licheniformis* BML139株。

製造法、プルラナーゼは、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により除去される。

用途、使用形態ですが、こちらは記載のとおりです。

摂取量につきましても、記載しているとおりでございます。

宿主及びDNAです。宿主は*B. licheniformis* MRA7株である。

DNA供与体の種名、株名は、プルラナーゼ（*PULm104*）遺伝子の供与体は、*B. deramificans* T89.117D株である。

挿入DNAの性質及び導入方法は、PULm104遺伝子は、既存のプルラナーゼのN末端側104アミノ酸領域を欠失したプルラナーゼ（PULm104）をコードする。PULm104は、欠失がプルラナーゼの触媒サイトに影響を及ぼさず、プルラナーゼ活性を示すことを確認している。

*PULm104*遺伝子発現カセット及びクロラムフェニコールアセスチルトランスフェラーゼ（*catH*）遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクターをプロトプラスト法で導入し、相同組換えにより宿主ゲノムの*catH*遺伝子座に導入した。

なお、生産菌の作製に当たり、 α -アミラーゼ（*amyL*）遺伝子、*catH*遺伝子、*spoIIAC*遺伝子、*aprL*遺伝子及び*mpr*遺伝子をそれぞれの欠失用ベクターをプロトプラスト法で導入し、相同組換えにより欠失させている。

3番、4番につきましては、記載のとおりでございます。

5番、遺伝子組換え添加物の性質。

製品名は、ここでは未定としております。有効成分はプルラナーゼ。

(2) (3) (4) につきましては、記載のとおりでございます。

6番、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の相違点ですが、遺伝子組換え添加物と従来の添加物の項目は、PULm104は従来の全長型プルラナーゼのN末端側104アミノ酸領域を欠失し、かつ、コドンを最適化している点が異なると記載しております。

組換え体と宿主の相違点は、BML780PULm104株には*PULm104*遺伝子が複数コピー導

入され、PULm104生産能を獲得している点、並びに種々の遺伝子生産能を欠失している点ということでございます。

以上、1～6から、本添加物及び本添加物の生産菌の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以下の各項目について評価を行った。

第2、宿主に関する事項。

宿主は、*B.licheniformis* BRA7株である。

2番、*B.licheniformis*の病原性及び有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるBSL1に相当すると記載しております。

3番、4番、5番につきましては、記載のとおりでございます。

ベクターに関する事項ですが、遺伝子導入用ベクターpICatH-PULm104 Ori1の作成にはpICatHが用いられたと記載しております。

性質に関する事項につきましては、記載のとおりでございます。

第4、挿入DNAの供与体に関する事項ですが、こちらにつきましても記載のとおりでございます。

2番、挿入DNAまた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、挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項。*PULm104*遺伝子は、*B.deramificans*T89.117D株由来の全長型プルラナーゼ遺伝子のN末端の104アミノ酸領域に相当する塩基配列を欠失させ、かつ、コドン最適化させる改変を行った遺伝子である。

*PULm104*遺伝子の塩基数、塩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) ですが、*PULm104*遺伝子が発現するPULm104は、アミロペクチン等の α -1-6-グルコシド結合を加水分解する酵素である。

① *B.deramificans*のアレルギー誘発性の可能性を調べるためにデータベースを用いて検索した結果、*B.deramificans*に由来する既知のアレルゲンはなかった。また、文献検索も行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかったと記載しております。

② PULm104を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

③ 人工胃液に対する感受性。PULm104の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE分析を行った結果、部分分解物は試験開始後5分以内に、完全長鎖は試験開始後1分以内に分解されることが示されている。

人工腸液に対する感受性。PULm104の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE分析を行った結果、試験開始0.5分以内に分解されることが示された。

加熱処理に対する感受性。PULm104は、ビールの加熱殺菌条件である72℃0.5分の加熱により酵素活性が消失することが示されたとされております。

④ PULm104の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アミノ酸配列以上で35%以上の相同性を示す既知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しております。

以上のことから総合的に判断し、PULm104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としております。

3番、プロモーター、ターミネーターに関する事項については、記載のとおりでございます。

4番、ベクターへの挿入DNAの組み込み方法については、記載のとおりです。

5番、構築された発現ベクターに関する事項ですが、(1) 遺伝子導入用ベクターpICatH-PULm104 Ori1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) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、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。第5-2- (2) に記載のとおりである。

(3) 遺伝子発現用ベクターpICatH-PULm104 Ori1上の意図する挿入領域は、*catH*遺伝子発現カセットの*catH*プロモーター配列からPULm104遺伝子発現カセットの*amyL*ターミネーター配列までの領域である。

(4) 遺伝子導入用ベクターpICatH-PULm104 Ori1は、目的外の遺伝子の混入がないように純化されていると記載しております。

6番、7番につきましては、記載のとおりでございます。

第5、組換え体に関する事項。

宿主との差異に関する事項ですが、BML780PULm104株は、PULm104遺伝子発現カセット及び*catH*遺伝子発現カセットが導入され、また、複数遺伝子を欠失している点で宿主と異なる。

遺伝子導入に関する事項。(1) BML780PULm104株に遺伝子導入用ベクターpICatH-PULm104 Ori1の挿入領域外の配列が存在しないこと及び生産菌がPULm104遺伝子発現カセットを有することをPCR法で確認した。

(2) 挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレームの有無を調べるために、*catH*遺伝子座へのPULm104遺伝子発現カセット及び*catH*遺伝子発現カセットの挿入により、新たに生じるORF検索を行った。その結果、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40個検出された。

これらのORFに対しまして、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。連続する80アミノ酸配列以上で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アレルゲンを検索した結果、既知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E-value<10.0を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められなかったと記載しております。

第6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。PULm104製剤は、フランス及びデンマークにおいて食品加工助剤ポジティブリストに収載されている。

2番、PCR法により確認した結果、PULm104製剤からは生産菌に由来するDNA断片は検出されなかったと記載しております。

3番、4番、5番につきましては、記載のとおりでございます。

第8、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記載しております。

評価書案の説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、先生方、評価書案につきまして御質問、御指摘等ございませんでしょうか。

○橘田専門委員 11ページの加熱処理に対する感受性のところで、実際のところ62℃のビールの加熱処理としては通常使われているような記述があるので、ここは書き過ぎなのかなという気がするのですが。

○飯塚課長補佐 加熱処理の感受性のところですか。

○橘田専門委員 記載は確かなのですが、60℃で不活化されないことについての言及が全くなされていないので、そこはどういうふうにしたらいいのかな、このままでいいのかなというのを思うのですが。ろ過するということで担保しているところがあるので、必ずしもここで不活化される必要はないのかもしれないのですが、ただ、実際問題として62℃ではまだ活性も残ったままという記述があるので、このままでいいのかどうか御検討いただければ。

○飯塚課長補佐 事実として記載する必要があるということであれば、記載したいと思います。

○中島座長 確かに62℃では残るけれども、72℃0.5分で消失する。これも記載があるわけですから、両方書いておけばよろしいですか。

○橘田専門委員 はい。少なくとも62℃では残っているということは書いておくべきなのではないか。ただし、きちんとろ過によって除去できることが担保できているわけではないのですが、そういうものしか使わないと書いてあるので、実用上では問題はないかなと思うのですが。

○中島座長 もっともな御指摘だと思いますので、書きぶりについては橘田先生、御確認いただけますか。

ほかにございますか。

○児玉専門委員 先ほどの座長の質問事項のところに関係するのですが、13ページの2の遺伝子導入に関する事項で、目的が挿入領域外の配列が存在しないことはPCR法で確認したとなっているのですが、ここは次世代シーケンサーの結果を見て文章をもう少し変えていただいたらいいかなと。

○中島座長 おっしゃるとおりですね。事務局のほうでも、また、私のほうでも確認いたします。

また、先ほどの質問に対する回答で内容が変わったところがありました。全体に影響を与えるものではないと思いますが、それに合わせてこれ以外のところも必要に応じて変更したいと思います。それでよろしいですか。

ほかにございますでしょうか。それでは、いただいた修正、また、申請者からの回答に基づいてこの修正等については事務局のほうで、それから、私と質問をされた先生のほうで確認し、その上で食品安全委員会に報告し、パブリックコメントの手続を行いたいと思います。ありがとうございます。これでプルラナーゼの審議は終了いたします。

それでは、引き続きまして新規品目である *Rhodobacter sphaeroides* 168株を利用して製造された香料バレンセンについての審議を行いたいと思います。

では、事務局からお願いいたします。

○山口係長 申請書の説明に入ります前に、審議の進め方について御説明いたします。

冒頭で御紹介いたしましたが、本日は申請者のアイソバイオニクス株式会社、株式会社三菱ケミカルリサーチ、そして協立物産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、申請書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います。その後に、説明者に入室していただき、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。

それでは、申請者から提出されております申請書を説明させていただきます。

緑色のファイルを御用意ください。まず2ページをお願いいたします。

第1の項目ですが、本添加物は、柑橘類に含まれる香気成分で、セスキテルペンの一種です。食品添加物として日本の指定添加物リストに含まれるテルペン系炭化水素の中の具体的品目に分類されますが、個別の食品添加物公定規格はございません。

(1) として名称はバレンセン、基原はオレンジでございます。

(2) 製造方法ですが、バレンセンは、一般にはオレンジ圧搾汁の濃縮過程で回収されたオレンジオイルから蒸留により濃縮されます。オレンジオイルは低沸点のテルペン類が90%以上を占めており、これらを蒸留により除去することによってバレンセンを70～80%程度に濃縮することができます。

3ページ、(3) 用途及び使用形態です。食品添加物としてジュースやチューインガムなどの飲食物に用いられるほか、香水や化粧品、家庭用洗剤などにも利用されております。また、グレープフルーツの香料として用いられるヌートカトン、バレンセンの酸化物であり、バレンセンはヌートカトン製造の原料としても用いられております。

続いて(4) 摂取量でございます。EFSAの評価の中では、EU及び米国はそれぞれ53 μ g/人/日、そして26 μ g/人/日としております。

一方、4ページに行きまして、日本においてはバレンセンを含有するオレンジ油から日本人のバレンセン摂取量を試算した結果、1人1日当たりのバレンセン摂取量は266 μ gと推定しております。

続いて第1の2といたしまして、本申請品目における宿主等の項目です。

(1) 宿主等の由来ですが、宿主は*Rhodobacter sphaeroides* 35053株でありまして、グラム陰性の紅色非硫黄細菌であり、非メバロン酸経路のみによってテルペン類生合成の中間生成物であるイソペンテニルピロリン酸を生成します。

5ページ (2) ですが、DNA供与体等の由来についてです。全部で13種類の遺伝子及び1種類のプロモーター配列をベクターに挿入しております。

詳細は表1に示しておりますが、3つの由来からバレンセン合成酵素遺伝子等のコドンをも最適化して用いております。

6ページ (3) 挿入DNAの性質についてですが、バレンセンは、セスキテルペンの一種であり、メバロン酸経路の中間生成物であるファルネシル2リン酸からバレンセン合成酵素によって合成されます。本組換え体の作出においては、メバロン酸経路にかかわる遺伝子群を導入することで、イソペンテニル2リン酸及びジメチルアリル2リン酸の供給量を向上させ、さらにバレンセン合成酵素を導入して、バレンセンの高レベル生産を目指しております。

これらの遺伝子については、7ページの図1もあわせて御参照ください。

続いて、導入方法ですが、*R.sphaeroides*の形質転換は、細菌の接合現象を利用して行っております。詳細については第4-6で御説明いたします。

続いて、8ページの下から第1-3、利用経験や食経験に関する事項ですが、Coenzyme Q10を生産し、サプリメントとして販売されたり、発酵法により5-アミノレブリン酸の大量生産に関する方法の開発により、化粧品及び健康食品の製造、販売事業に生かされております。

続いて、第1-4、宿主の構成成分ですが、*R.sphaeroides*由来の生産物が食品として利用されておりますが、これまでに有害生理活性物質等を生産するという報告はございません。

第1-5、遺伝子組換え添加物の性質等についてです。

(1) 製品名はバレンセン80、有効成分はバレンセンです。

(2) 製造方法の詳細については、11ページの図2もあわせて御参照いただきたいのですが、培養、発酵、精製工程を経て製造されます。蒸留の過程においては高温により潜在的なタンパク質は全て変性して沈殿するとのことでございます。最終的にはバレンセン濃度80%以上の製品が生産されることになります。

12ページ、(3) 用途等ですが、食品添加物としてジュースやチューインガムなどの飲食物に用いられたり、香料、ヌートカトン製造の原料としても用いられます。また、バレンセン濃度80%以上の疎水性のオイル状製品として販売されるということでございます。

(4) 有効成分との比較についてですが、本組換え体由来のバレンセンの有効成分は、従来の添加物のバレンセンと同一のものでございます。

第1-6、従来品との比較についての項目でございます。

(1) 従来添加物との比較について、本組換え体由来添加物のバレンセンは、

R.sphaeroides 168株を用いて発酵生産され、培養液の精製工程を経て得られます。一方、従来の添加物のバレンセンは、天然オレンジ果実由来のオレンジオイルを蒸留して得られる点が異なります。

続いて（2）といたしまして、組換え体と宿主との相違点は*R.sphaeroides* 168株がメバロン酸経路の遺伝子群及びバレンセン合成酵素遺伝子の導入により、バレンセン産生能を獲得している点でございます。

第2の項目でございます。こちらは宿主に関する事項の記載でございます。

2-1では分類学上の位置づけについて記載しております。

第2-2でございますが、*R.sphaeroides*に病原性及び有害生理活性物質等の生産は知られておらず、*R.sphaeroides*を利用して生産したCoenzyme Q10が食品として利用されておりますが、安全上の問題は知られておりません。

14ページ、表3にはその特徴についてまとめられておりますが、表3の一番下では国立感染症研究所の病原体安全管理規定における分類では、Biosafety level 1に分類されるという旨を記載しております。

2-3、2-4については、記載のとおりでございます。

15ページに行きまして2-5ですが、*R.sphaeroides*は宿主である35053株も含めてBiosafety level 1に分類され、その近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する報告はございません。

16ページ、第3、ベクターに関する事項ですが、ベクターは*Bordetella bronchiseptica*由来のプラスミドpBBR1MCS-2でございます。このプラスミドは、グラム陰性菌において自律複製することが知られている広宿主域クローニングベクターでございます。

2、性質に関する事項ですが、（1）（2）は記載のとおりです。

（3）既知の有害塩基配列を含むという報告はございません。

（4）ネオマイシン、カナマイシン等の抗生物質耐性を付与するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を有しております。

（5）伝達性に関する事項ですが、プラスミド移行に必要なタンパク質をコードしているmobタンパク質遺伝子、複製開始タンパク質遺伝子が含まれております。

なお、本組換え体*R.sphaeroides* 168株は、閉鎖系タンクでの発酵に用いられ、発酵後は加熱処理により蒸留等が実施されることから、菌が系外に漏出する可能性は考えにくいとしております。

（6）でございますが、*E.coli*及び*R.sphaeroides*を初めとして、さまざまなグラム陰性菌で複製することが確認されております。

続いて18ページからが第4、挿入DNA等に関する事項です。表4では導入した遺伝子についてまとめられております。

1の（2）安全性に関してですが、まず*Callitropsis nootkatensis*ですが、こちらは抗菌活性、防虫活性を示し、材の耐腐食性が高いことから船の甲板や寺社の建築材として用いら

れております。また、ヨーロッパの温暖な地域では園芸樹として用いられております。

続いて*Paracoccus zeaxanthinifaciens* ATCC 21588株は、Biosafety level 1に分類される菌であり、毒素産生等の報告はございません。

最後に、*E.coli* DH5 α 株は、非病原性のK12株由来であり、一般に非病原性に分類されております。

続いて第4-2 (1) としまして、挿入遺伝子のクローニング、合成方法に関する事項ですが、3つの断片について記載されております。まずmpmii断片は、*E.coli*及び*P. zeaxanthinifaciens*由来の遺伝子情報をもとに、*R.sphaeroides*用にコドンを最適化して合成しております。

ValC断片は、*E.coli*及び*C. nootkatensis*由来の遺伝子情報をもとにコドンを最適化して合成しております。その際、バレンセン合成酵素遺伝子は、酵素活性及び反応特異性を向上させるため、2つのアミノ酸置換が起こるように改変されております。

最後にmev断片は、*P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588株由来のメバロン酸オペロンを含むプラスミドpBBR-K-mev-op-wtを鋳型として、PCRにより増幅しております。

20ページ、(2) については記載のとおりでございます。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。導入した遺伝子の機能については22ページの表6にまとめられております。合成されたバレンセンでございますが、揮発性の化合物で蒸留を繰り返して精製されることから、本組換え体*R.sphaeroides* 168株を用いて製造されるバレンセンの最終製品中からは、タンパク質やDNAは完全に除去され、実際に最終製品中の窒素含有量を測定した結果からも、タンパク質等の混入の可能性は認められませんでした。

したがって、本組換え体*R.sphaeroides* 168株に導入された遺伝子産物である13種類の酵素は、最終製品を通してヒトに摂取されることはなく、申請者は、これらタンパク質の物理化学的特性等の評価を省略しても科学的に合理性があると考え、導入遺伝子由来のタンパク質に関する人工胃腸液試験やアレルギー誘発性に関する評価は行っていないということでございます。

続いて第4の3ですが、こちらは記載のとおりでございます。

24ページ、第4の4でございますが、In-Fusionクローニング法を用いてプラスミドpBBR1MCS-2にValC、mev及びmpmiiの3つの断片を導入して発現ベクターを構築しております。

27ページ、5 (1) については記載のとおりでございます。

(2) といたしまして、目的外のORFについてでございますが、閉鎖系タンクでの発酵に用いられた後、生産物が蒸留等によって精製され、その過程でタンパク質等は除去されることから、仮に目的以外のタンパク質が発現したとしても、それが最終製品に混入することはないとしております。そのため、目的以外のタンパク質が発現して悪影響を及ぼすことが考えにくいことから、ORFの解析は行っていないということです。

続いて(3)ですが、発現ベクターがプラスミドの状態を導入され、宿主ゲノムへの挿入はないことから、意図する挿入領域は発現ベクター全体になります。

(4)については記載のとおりです。

続いて28ページ、第4-6、DNAの宿主への導入方法についてですが、形質転換は細菌の接合現象を利用して行っております。宿主*R.sphaeroides* 35053株は、遺伝子導入の前にニトロソグアニジンを用いた化学的変異原処理を行い、カルテノイド生合成機能及びバクテリオクロフィル生合成機能が低減した菌株を得て、これを形質転換に用いております。発現ベクターを中間宿主*E.coli* S17-1株へ導入し、抗生物質を含む培地で選抜し、次に、選抜した*E.coli*を宿主と共存させて、接合伝達により発現ベクターを導入し、抗生物質を含む培地で目的のプラスミドを保持するクローンを選抜しております。

29ページ、第4-7といたしまして、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性ですが、発現ベクターはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子を含み、その遺伝子産物であるネオマイシンホスホトランスフェラーゼⅡをコードし、カナマイシン耐性等を示します。しかしながら、最終製品のバレンセンは、蒸留等により精製される過程でタンパク質やDNA等は除去され、したがって、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子及びその遺伝子産物についても、最終製品に残ることは考えにくく、バレンセンの安全性に懸念を与える可能性は低いとしております。

続いて31ページをお願いいたします。第5、組換え体に関する事項です。第5-1及び2(1)については記載のとおりでございます。

第5-2(2)として、遺伝子導入におけるORFの有無についてですが、閉鎖系タンクでの発酵に用いられた後、生産物が蒸留等によって精製される。その過程でタンパク質等は除去されることから、仮に目的以外のタンパク質が発現したとしても、それらが最終製品に混入することはない、実際に最終製品中の窒素含有量を測定した結果からも、タンパク質等の混入の可能性は認められなかったということです。

したがって、目的以外のタンパク質が発現することによる安全性への懸念は考えにくく、アレルギー誘発性に関する考察は実施しなかったということでございます。

続いて32ページ、第6でございますが、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。

第7ですが、まず第7-1、諸外国における認可等ですが、米国ではGRAS物質として認定されております。EUではEC規則の対象外であり、本バレンセンが遺伝子組換え添加物の認可の対象外となるということでございます。

続いて2(1) バレンセン80中の残存DNAについては、PCR産物は確認できず、試料中に導入遺伝子のDNAが残存する可能性は極めて少ないと考えられたとしております。

34ページ(2) 残存タンパク質についてですが、ASTM D4629の標準試験法にのっとり、バレンセン80に含まれる窒素含有量を測定し、この結果から残存タンパク質量を推定しております。その結果ですが、バレンセン80の試料中に窒素は検出されず、検出限界を考慮

すると、タンパク質は多くても0.0625mg/l以下であるとしております。

続いて第7-3、非有効成分についての記載です。ここなのですが、申請書だけでは情報が不十分な点もありまして、iPadのほうも活用したいと思います。最初2で始まるのがバレンセンの資料なのですけれども、下のほうに2の添付資料1というものがございまして。こちらが今回の第7-3に相当する資料なのですけれども、今回、その1の分析のほうではGC-MSによる他社市販品との比較分析を行っております。アイソバイオニクス社のバレンセンのみに含まれる成分として5つの物質が確認されたということです。それが35ページの①～⑤の構造異性体でございまして、このような副産物は酵素が由来する起源生物特異的であり、イソプレノイド合成酵素によく見られ、今回、*C. nootkatensis*由来のバレンセン合成酵素が使われていることから、市販のオレンジ由来のバレンセンには見られない特異的な副産物が認められたものと考えているとしております。

それぞれの安全性については、表8に記載されているとおりです。

実際の生データなのですけれども、GCの結果が33ページと34ページにあります。33ページと34ページで2回測定しておりまして、実際にはこれの平均値をとったというものでございまして。他社製品のほうのデータが36ページのスタンダードA、B、Cという表と、37、38、39のデータが分析結果になります。構造異性体の①～⑤の構造というのが40ページと41ページに書かれているものです。

続いて、その2のほうについて御説明いたします。こちらは2の添付資料3と書かれているものです。こちらは別の検体を用いてGC-MSによるバレンセンの他社市販品との比較分析を実施しております。結果は申請要旨の36ページの表9、表10にあるとおりです。表10にありますとおり、バレンセンについては他社製品と同等以上の含有量であったと記載されております。保持時間10.6分というピークがありまして、これは添付資料3の4ページを見ていただくと、ピークごとの比較がされているのですけれども、10.6のピークが他社製品に見られないピークということでございました。ただ、このピークが全体に占める割合は0.13%と非常に小さかったということでございます。

第7-5、第8については記載のとおりでございます。

説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

本品目は、最終製品にDNAもタンパク質も残らないということなので、部分的には高度精製品とも考えることもできると思いますが、この場合は高度精製品ではなくフル評価ということで申請に上がってきております。

新しい事例ですし、また、こんなことができるようになったんだなと私も思っているのですけれども、申請書につきまして先生方から、いろいろあろうかと思いますが、御意見いただきたいと思っております。

まずはベクターに関する事項まで、1～17ページでございましたらお願いしたいと思っております。

事務局からの指摘なのですから、4ページにバレンセンの摂取量についての数字がございます。EU及び米国の摂取量、MSDI法で推定しているものと、日本人の摂取量もここに記されている266 μg というのは輸入されているオレンジで、これを日本人が等しく公平に消費した場合でして、厚生労働省では添加物の場合は1人で10倍食べる人まで想定されておりまして、10倍、つまり人口の10%が均等に消費したと仮定して、これで安全性審査等が行われております。

これで計算しますと2,660 μg となりまして、この数字はテルペン系の添加物の許容摂取量1,800 μg を超えてしまう可能性があります。これについてどう考えるかということで御意見いただきたいと思うのですが、ございますでしょうか。

私の見解なのですが、これはとにかくにもオレンジの輸入量から計算しているもので、これは実際に日本人がこれを摂取しているわけで、これがだから実際にこういう添加物が輸入されて使われていてこの数字だということだと、それなりに問題もあるかと思うのですが、この数字自体については特にはと思います。

あえて言うなら、これを実際に添加物として使用するのであれば、食品安全委員会の見解は厚生労働省に返して、厚生労働省のほうで実際にこの添加物としてどう流通させるかというのを定めるわけですので、そのときにこの許容摂取量を超えないように、そういうふうにしかるべく措置をとるようにと、食品安全委員会からの意見としてつけておけばいいように私としては思うのですが、そういう扱いで事務局としてはいかがですか。

○池田評価情報分析官　ここで言う許容摂取量というのは厚労省が定めているものではなく、EFSAが量进行评估するときにクラス分けして、クラス1に当たるものについて摂取量が1,800 μg 以下であれば特にそれ以上、資料を求めなくても安全とみなすことができるという許容値なので、これを超えていることが即安全でないということになるわけではないのですけれども、恐らく一定の目安として申請者が書かれているものではないかなと思います。なのでそのような形で厚労省に返すのは少し違うかもしれないと思っています。

○中島座長　そういう事情なのですね。でも彼らとしては日本人としてどのぐらい摂取しているかで、ほかに計算の根拠がないから、だから日本に導入されている量から割り算して出しているわけで、私としてはこれをもってまた人口10%を均等に評価して、それが超え得るから、だからもっと安全性に関する資料を要求するには私は当たらないかなと思うのですけれども、先生方いかがですか。

○児玉専門委員　実際にはこれを全部摂取されることはとても考えられないので、かなりの部分にはおいで飛んで行ってしまうと思いますので、今みたいな考え方で、座長の考え方でよろし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。

先生方よろしいでしょうか。ということなので、この点については特にこれ以上追加の資料を求める必要はないということにしたいと思います。

それでは、ほかにございますでしょうか。

○児玉専門委員 1つ、申請者に聞けばいいですが、11ページの製造工程のところなのですが、大体の流れはわかるのですけれども、●●●って私はよく知らないので、少し説明していただきたいなと思います。

○中島座長 実は私もこれは気になっていたのですが、申請者をお呼びすることになると思いますが、これは聞いてみたいと思います。

○児玉専門委員 あと、そのときに教えてくれないかもしれませんが、フィルターのサイズとかもできれば聞きたいなと思います。

○中島座長 これはろ過のときに確実に微生物とかが除けるサイズのフィルターを使っているかということですよ。

○児玉専門委員 そうですね。フィルター抽出というものが出てくるのですけれども、ポアサイズみたいなものがあって決められているものなのか、それとも別な不織布みたいなものをただのフィルターとして使っているのかとか。教えてくれないかもしれませんが。

○中島座長 でも聞いてみてよろしいかと思います。

そもそもだから高度精製であれば、宿主に使っている株の安全性が十分担保されているということで基本的にはオーケーになっていて、今回の*R.sphaeroides* 35053株がどのぐらい安全なのかで、9ページに食品利用の実績があって、カロテノイド、Coenzyme Q10とあるのですが、これくらいで安全な宿主と認めていいかどうかというのも、この製品は全く問題なければいいのですけれども、最終製品には当然いろいろな不純物がありまして、安全な宿主であれば少々不純物でも、少々未同定のものとかあってもいいだろうということなのでも、この場合、恐らく審査のポイントは不純物等々、本当に安全と言えるのか。もともとがオレンジであれば、オレンジの抽出物であれば少々未同定でも何でも食べていいものだから、そこは大丈夫と考えていいと思うのですが、この宿主でつくったものであれば何でもいいのか。

この宿主そのもの、菌体そのものを食べているとか、そういう実績でもあれば別なのですが、この場合はそうではなくて、この宿主でつくったものでカロテノイドとかCoenzyme Q10の食品に使用されている実績はあるということなのですが、これをもってこの菌の安全だと、少なくともこの菌でつくったバレンセンに少々含まれる不純物も安全と考えていいかどうかというところのポイントになるように思うのですが、先生方この辺、私も突っ込んで聞いてみようとは思いますが、先生方、何か御意見ございますでしょうか。

Coenzyme Q10は中国か何かでしたっけ。

○池田評価情報分析官 健康食品的にも使われておりますし、この菌で作られたものが医薬品の原材料として使われているかどうかは別ですけれども、医薬品でCoenzyme Q10を有効成分としているものもあったのではないかと思います。それは日本の話でございます。

○中島座長 アイソバイオニクス社はアメリカの会社ですか。どこでしたっけ。

○山口係長 オランダです。

○中島座長 EUなりでアイソバイオニクス社の株を使って何かほかのものをつくって売っているとか、そういう実績はあるのでしょうか。聞いてみればいいのかなと思うのですが、それは少し聞いてみて、要するに宿主の安全性については私としては根掘り葉掘り聞いてみたいと思いますので、先生方もその場でも思いついたこと等あったら、いろいろと突っ込んでいただければと思うのですが、ぜひここは突っ込んでおいてほしいとか、そういうことでもございますでしょうか。

では、どこからでもよろしいと思いますが、挿入DNA、遺伝子産物、発現ベクターに関する18ページから30ページまでについてお願いいたします。

きょう御欠席の手島先生、柘植先生からも、ここには意見いただいているようですので、事務局から御紹介いただけますか。

○山口係長 柘植先生と手島先生から事前に御意見をいただきましたので、それを事務局から御説明させていただきます。

まず柘植先生からでございますが、バレンセンのアレルゲン性についてでございます。最終バレンセン産物に残存するタンパク質量が0.0625ppm以下であり、食品中のバレンセン使用量が●●●程度とすれば食品中にも持ち込まれ、摂取されるタンパクがアレルギーを惹起し得る数 μ gのレベルに達することは考えられない。バレンセン自体のアレルギーの報告はなく、先行する欧米での食経験からも通常量の摂取であれば危険性は少ない。

以上のことから、人工胃腸液試験やORFの検索はしなくてもよいかと思いますが、上記のような考察をつけ加えてはどうでしょうかという御意見をいただきました。

続いて、手島先生からの御意見でございます。この製品の本体が低分子量のテルペン系炭化水素であり、本体の純度は●●●程度であるが、申請書34ページに記載されているようにバレンセンの構造異性体の含量と合わせると●●●以上になる。さらに残存タンパク質量を調べたときに、それが検出限界以下であったということから、高度精製の考え方を適用してもいいのではないかとということでございます。

実際にタンパク質の残存について確認したところ、窒素含有量測定法を用いてタンパク質は検出限界以下であることが示されているので、残存タンパク質は皆無に等しいと考えて、通常のタンパク質の添加物に課しているアレルギー誘発性に関する試験は、特に行わなくても問題ないと考えます。

以上のような意見をいただいております。

○中島座長 ありがとうございます。

本申請は、普通フル評価であれば導入遺伝子の産物についての人工胃液、人工腸液等の産生の試験、それから、遺伝子導入に当たって生じ得るオープンリーディングフレームと、そこから可能性のあるアレルゲンについての考察と要求しているのですが、ここではそれが無い。それについてお二人の意見はお二人とも蒸留されているものだし、タンパクもDNAも含まれていないものであるもので、これはなくてもよろしいのではないかという、お二人ともそういう意見だったように思います。

私も本件についてはそれほど心配しなくていいのではないかという印象ではあるのですが、この点も含めまして先生方から御意見をいただければと思います。

1つ、それとはちょっと違うのですが、18ページ、ValCの遺伝子、これは改変バレンセンの構成遺伝子なのですが、これはヒバ、イエローシーダーなので、真核生物なので、これはイントロンがあったのではないかと思うのですけれども、特にcDNAであるとかそういう記載はありませんが、私としてはその辺を聞いてみたいと思いますし、また、イントロン等を考慮したオープンリーディングフレームの検索等をやっているのかとか、そこを聞いてみたいとは思っています。

○児玉専門委員 先ほどの高度精製を当てはめられるかどうかということなのですが、以前にこの手のこの委員会で話し合いがあったときに、油は高度精製に入らないよねという話がありましたので、その点との整理をしておいたほうがいいなと思ひまして、これも一種の油なので今回について、通常の食用油については蒸留は普通しません。植物油では製造過程によってももしかしたらタンパク質が入るかもしれないということと、植物体自体を食べることはしないのだけれども、それも考慮してというところもあるかと思うのですが、今回の物品に関しては蒸留を少なくとも●●●やっている形になっていますので、そういうものについてはタンパク質や核酸やその他のものはほとんど入らないというのは、通常考えて十分科学的な根拠はあるだろうということで、油だけれども、その点を考慮してという形でアレルギー試験とか、消化性試験とか、そういうものをやらなくてもいいだろうという形で皆さんの同意が得られれば、それでよろしいのではないかと。ここで議事録としてきちんと残しておかないといけないかなと思ひましたので、発言させていただきました。

○中島座長 ありがとうございます。ごもつともだと思ひます。また、それがあから今回の高度精製で受け付けないで、フル審査ということになっているのではないかと思います。筋が通っていると思ひますし、また、今回の件は確かに●●●蒸留しておりますので、また、DNAとかそういうものが含まれていないということを見ても、データを出していただいておりますので、今回のものについてはその点を議事録に残した上で、オープンリーディングフレーム解析と導入遺伝子産物に関するタンパク質としての解析はなくても認めるという、筋を通すことは必要かと思ひますので、この点についてはもちろん議事録は残りますね。なのでそういうことでよろしいでしょうか。今日御欠席の2人の先生もそれでよろしいという意見のようなので、この点についてはそういうふうに整理したいと思ひます。つまり、油はオーケーというルールではない。今回ののはいいけれども、そういうことで扱いたいと思ひます。

○山川専門委員 油はオーケーでない。タンパクや何かはいいのですが、さっきガスクロや何かのデータで高度に精製されていると言ひましたけれども、カロテノイド類の副産物が有害だということはないというのは大丈夫なのですか。

○中島座長 それとこれとは別問題で、タンパクとしての心配はしなくていいけれども、

今度はテルペンとしての不純物のガスクロの細かいピークについて、それとこれとは別問題で議論したいと思います。私もそこはいっぱい突っ込みたいなと思っているのです。

では、一番最後まで含めまして、どこでも結構ですのでいただきたいと思います。

○児玉専門委員 1点よろしいですか。21ページのところの下から2行目に、導入した14種類の遺伝子の機能をというのがあるのですが、書き方がやや不統一で、14種類というのは13種類の本当のコーディングリージョンの入った遺伝子と、1種類のプロモーターをカウントして14種類になっているので、全体そこがやや混乱ぎみなので、ちゃんと整理して13種類なら13種類の遺伝子で1つのプロモーターという、プロモーターは遺伝子とは普通呼ばないので、そこを整理して統一していただきたいと思います。

○中島座長 そこは私も実は同感でして、読んだときに14とあって一生懸命数えてみて、あれ？と思ったのを覚えておりますので、そこは統一した書きぶりに改めていただくように事務局から指示していただければと思います。

それでは、事務局からも指摘がございましたら。34ページ、その他の毒性、遺伝毒性に関する考察は必要ではないか。それから、4と5、面積のピークが小さいことのみを安全性の根拠としているけれども、これは遺伝毒性等の有無について考察する必要はないかということです。4と5は同定できた5つのピーク、しかもだから天然物には含まれていなくて、今回のものに含まれているということで、幾つかピークがあったうち、同定できた5つが1、2、3、4、5となっていて、それで4と5についてはピークが小さい。だけれども、これは同定できた5つについてであって、まだ同定できない細かいものはどうなのかとか、ガスクロの性能を上げたらもっといくのではないのかとか、その辺のところをもう少し私としても安全性に関するインフォメーションなり、彼らなりの根拠が欲しいなと思うのですが、先生から何かございますか。

○川西委員 私もタンパクとかDNAの混入というのは、よほどとんでもないことをしていないと、まず心配ないと思っています。一方でこの類縁物質を含めた不純物の分析というのは、この製品の分析をしたときの分析条件との違いがあり、それ以外の既存の製品の分析結果の比較については、チャートを見ても、どうもよくわからない部分があります。この製品でのピークははっきりしているので、結論にそんな間違いはないと思うのですが、けれども、疑問点はあります。

まず第1点として既存の製品に入っている、この製品だと多く入っていると思われるピークがある。具体的に言うと、この添付資料の製品の分析の●●●というものですかね。これはこの製品だとパーセントエリアが●●●で、このピークはどうも分析結果を見ると、●●●なのです。ほかのものには入っていないピークで、私自身は実はこれは毒性はそんなにないと思っています。構造的に。だけれども、量的な問題もあるから、このもの、少なくとも●●●に当たるものに関しては申請者の見解は聞きたいと思います。

それから、それ以外にもこの資料の35ページの表8で2番目、3番目のピークのGamma-cadineneとepi-alpha-Selineneというものに関しては、オレンジジュースの分析をすると、

これらの成分が認められると書いてあるけれども、量的な問題もあるだろうと。その辺も予想される毒性との兼ね合いで、これは量的にも大丈夫ですよという考察が必要だと思います。

分析については、実は添付資料3で既存のものと、この製品との比較をしているのですが、このデータを見ると前の資料で言っている、ほかの既存の製品には入っていないけれども、この製品に入っていますよというものが、こちらでどれかきちんとわかるプレゼンになっていないので、悪く見ると都合よく解説していると見えないわけでもない。そのあたり、分析をどうしてこういう形でプレゼンしているのかということ、それから、先ほどの安全性の理由を説明しているところで、既存の例えばオレンジジュースには入っていますよと言っても、量的な問題を含めてどうなのかというあたりを少し追加で説明していただく。要するに化学合成の香料のときにやる安全性の議論も、ここに加味して説明していただく。組換えタンパク質製品ではなくて、化学物質としての一つの製法としての安全性という部分で、特に不純物の視点で説明をきちんとしてほしいなと感じています。

○中島座長 私も同感でして、通常的高度精製品についても、従来のもよりもピークが大きくなっているとか、そういう意味では非常に厳しく追及されている。その辺を考えますと、安全だとわかっている宿主でつくっているものでもそのように実際取り扱われているということを考えますと、全くもってごもつともだだと思いますので、私から聞くより先生から追及していただいたほうがよさそうに思いますので、その点まさしくそこが本申請のポイントだと思いますので、時間の許す限り、申請者とやりとりしたいと思います。

ほかに、36ページに保持時間10.6分のピークについての言及もありますが、これも全体に占める割合が小さいからどうってことないと軽く流されているのですが、そこも大変気になるところでして、その辺漏れなく質問をさせていただいて、彼らの見解なり追加情報を求めるなりしていきたいと考えます。

ほかに特にございますでしょうか。どうぞ。

○樋口専門委員 今のガスクロによる非有効成分のチェックなのですが、この添付資料1にガスクロのチャートが出ていますが、理由を述べてバレンセンの周辺のところしかチャートを載せていないのですけれども、それ以外の時間帯のところというのが本当にどうだったかというのは、これは証拠物件なのでチャートの端から端まで載せてほしいなというのが1点。

それから、説明を見ると常温で液状になっている油のようですが、このバレンセンとその類縁体自体は蒸留を繰り返してということで揮発性の成分ではありますが、油の中に揮発性の余り高くないほかの不純物が溶け込んでいるというのが大いに可能性としては考えられるので、ガスクロだけでいいのかというのがちょっと気になるころなのです。このガスクロの分析方法を見ると、基本的に揮発しやすいものしか対象にしていけないので、溶媒に溶かしただけで打って、多分そこで出てこないものはひっかからないという感じになっていますので、もう少し違う方法でも揮発性の低い夾雑物を検出できるような方法で

もやっていただいたほうがいいのではないかという気がします。

化学合成したものであれば、ある程度、考えられる不純物はわかると思うのですけれども、これは生物由来のもので、何が入ってくるかわからない。それで柑橘の皮由来ではないということなので、そこは気になることであります。

○中島座長 その辺もまた先生のほうから直接申請者に聞いていただければと思います。私はむしろ安全な宿主でつくっているものであれば、微量であれば少々わからないピークがあっても大丈夫だとむしろ思うのですけれども、この場合、この宿主の安全性がどこまで信用できるのかという点も含めて議論をしたいと思いますので、その辺のところはもう少し情報を出していかないと我々も納得しづらいなと思いますので、そういったところは聞きたいと思います。

○川西委員 その関連で1つ気になっていることがあります。11ページの製造工程を見ると、●●●これは多分、工程管理規格を設定しているのだろうと思うのだけれども、何を気にしているのだろうというのは疑問です。

○中島座長 その辺も聞いていただくしかないなと思います。その場でお気づきになったことを聞かれてもよろしいかと思いますが、では、確実なところはまず*R.sphaeroides*の食品利用の実態での安全性についての質問をさせていただくこと。

精製の工程でまず●●●の話、フィルターのサイズ、先ほどの規格に従って調整のところをお聞きする。

ValCの遺伝子はcDNAではないのか。また、その辺を承知の上でのORF検索になっているのかといった点。

14遺伝子の件は、書き直していただければよろしいわけですね。

35ページの不純物のピークについて、まず不純物について量が少ないものをただ単に量が少ないというだけでオーケーにしているけれども、それでよろしいのかという点と、既存品にもあるけれども、既存品よりも明らかに多いものについての言及を求める。それ以外にもいろいろ出てきそうな気がするのですが、とりあえずこのくらいということで、またその場でお気づきになったことをお聞きいただければと思います。

それでは、申請者を呼んでいただけますでしょうか。準備ができるまで休憩にいたします。

(休 憩)

○中島座長 本日はお忙しいところお越しいただきましてありがとうございます。

では、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。

○アイソバイオニクス社 (Georg Lentzen氏) アイソバイオニクス社のGeorg Lentzenです。

○アイソバイオニクス社 (Elena Melillo氏) アイソバイオニクス社のElena Melilloです。

○アイソバイオニクス社（Emanuele Rizzi氏） アイソバイオニクス社のEmanuele Rizziです。

○中島座長 それでは、質疑応答に入ります。

バレンセンということで、概要書にも構造式くらい書いていただきたかったなと思います。

まず、この宿主、*R.sphaeroides* 35053株の安全性が非常に重要なポイントになると認識しております。この株の食品利用への実績は、ここにはカロテノイド、Coenzyme Q10とありますが、ほかにございますでしょうか。この菌株そのものを食品として食べているとかそういった実績、もしくはこれはどのくらいの、この株で製造したCoenzyme Q10なりカロテノイドなり、これがどの程度使用されているか、どの程度普及しているかといった情報について、もう少しお願いしたいのですが。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） Coenzyme Q10に関しては、確かに*R.sphaeroides*からつくられておりまして、主な製造国としては中国と韓国です。我々の知る限り、*R.sphaeroides*を使ったCoenzyme Q10の製造量に関しては、年間700トン程度と聞いております。

○中島座長 それは日本も含めた世界各国で消費されているわけでしょうか。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） 私たちが知る限り、食品用途で使われたり、もしくは栄養補強という用途で使われたり、もしくはスキンケアという形でさまざまな国で使われていると認識しております。

○中島座長 そのほかにカロテノイドの報告もあるようですが、これはいかほどのようで、また、どのくらいワイドスプレッドに使われているのでしょうか。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） この*R.sphaeroides*を使ってつくられたカロテノイドの用途に関しては1つだけ、台湾の企業が少量使っているということだけはお聞きしておりますけれども、それ以外に幅広く使われているということはお聞きしておりません。

○中島座長 それでは、ここに特に書いていなかったけれども、この株をつかって製造されたバレンセンそのものについては、世界中でワイドスプレッドに使われておると認識しておりますが、その株でつくられたバレンセンは最新の情報ではいかがなものでしょうか。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） この申請書類の中にも記載いたしましたけれども、毎年5トンとなっています。そしてこの量が年々急速に増えていっている状況で、昨年に関しては10トンとなっています。

○中島座長 確かに2014年以降、毎年5トン以上と記載がございます。この記載だけ見ると、天然でつくられたバレンセンというふうにも読めたのですが、ただいまのお答えでは、この株を*Rhodobacter*を使ってつくられたバレンセンということでよろしいのでしょうか。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） これが2014年だったのかどうかということとはちょっと覚えておりませんが、この5トンと書きましたのは、私ども自身で製造

している量という意味で書いておりまして、5トンというのはそういう意味で、そして、昨年はそれが10トンということです。

○中島座長 それでしたら、そのように概要書にも本申請にある製法でつくられたバレンセンの販売使用実績が5トンなり、レイティストで10トンなりあるというふうに明記していただきましたかと思う。そうしていただけると、我々もう少し安心して審査に当たれたということでございます。

先生方、宿主について御質問でございますでしょうか。

それでは、本申請でつくられたバレンセンの精製のステップ、申請書では11ページにある精製のステップなのですが、児玉先生から。

○児玉専門委員 こちらの11ページにある図についてなのですが、我々はあまりこの蒸留とか詳しくないので、●●●というのがそもそもよくわからないので、●●●というのはどういうものを言うのか教えてほしいのですが。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） この蒸留法というのは、●●●と呼んでおります。

○児玉専門委員 それについてはわかりました。

それから、フィルターでろ過とか、そういうものが出てくるのですけれども、そのフィルターのろ過するときの、通常フィルターというとポアサイズといって穴があるのですが、そのサイズみたいなものは、もし教えられるものであれば教えていただきたい。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） ●●●ぐらいだったと記憶しておりますけれども、こちらは確認が必要です。

確認がとれました。●●●です。

○川西委員 同じく製造工程の中で●●●何を除くためにこれはこういう製造工程にしているのでしょうか。後ほどの不純物の議論とも多少関係してくるので、教えていただきたいのですが。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） ろ過の部分というのは固形物の除去を目的としたものであって、●●●という目的です。

○川西委員 具体的に固形物というのは、何がこの製造工程では想定されるのでしょうか。

○アイソバイオニクス社（Emanuele Rizzi氏） ●●●を想定してのことです。

○川西委員 これはそういうものに関しては、規格を最終製品に設定しているということでしょうか。

○アイソバイオニクス社（Emanuele Rizzi氏） 規格という意味では、最終製品に関する規格が存在し、それから、蒸留を行った後に対する規格というのも存在します。それから、ろ過のステップに関しては、これはフィルターのレベルでコントロールする。つまりフィルターの目視を行って物理的に何らかの粒子があるかというのを見ております。

○川西委員 ありがとうございます。

○中島座長 精製工程についてはよろしいでしょうか。

それでは、日本語版の申請書の18ページに導入遺伝子、また、その由来がございました。この中でイエローシーダー由来の *ValC* 遺伝子については、そのままではなく cDNA ではないかと思うのですが、申請書には明記はなかったのですけれども、これは cDNA でしょうか。導入遺伝子の一覧は8ページにもございますが、とにかくイエローシーダー由来の *ValC* 遺伝子です。

○アイソバイオニクス社 (Georg Lentzen氏) この *ValC* の名前ということに関してですか。

○中島座長 これだけはイエローシーダーなので真核生物ですから、当然イントロンがあると思われるのですが、これを *Rhodobacter* で発現させるためには当然 cDNA に変換していると思われるのですが、ここに記述はないのですが、これは cDNA でしょうか。

○アイソバイオニクス社 (Georg Lentzen氏) 確かにおっしゃるとおり、この遺伝子をアイソレートする際には cDNA から行っています。それはイントロンのストラクチャーであるからというのはおっしゃったとおりです。ただ、この名前にある *ValC* の C というのは、*Callitropsis* と呼ばれる木の名前からとっている C です。

○中島座長 そうだろうと思いましたので、それで結構です。

それでは、最大の問題は、このバレンセンに含まれる不純物についての問題だと考えております。天然物のバレンセンには含まれず、この GM の *Rhodobacter* でつくられたバレンセンに含まれている不純物について5つ同定されております。日本語版では35ページにありますでしょうか。

この5つのうち、4番目と5番目のもの2つについては、ただ単にピークが小さいという理由でこれは安全だと主張しておられるようですが、それだけの理由では少々納得しがたいのですが、これは安全だと主張されるほかに根拠はございますでしょうか。

○アイソバイオニクス社 (Georg Lentzen氏) 1つ、この *Callitropsis* の合成酵素自体に毒性が出ていないということ、それから、構造的にバレンセンの異性体、アイソマーと大変類似しているということで、ここでピークが大変小さいということ、そして、香料として相当に希釈された形で使われていること、こういったことを鑑みてリスクは小さいと申し上げております。

○アイソバイオニクス社 (Elena Melillo氏) もう一つ、4番目なのですがけれども、*Cubeb-11-ene* と書いているこちらに関しては、通常マッシュルームに含まれている成分でありまして、普通にヨーロッパ、恐らく日本でもそうなのかと思えますけれども、消費されているマッシュルームに含まれている。そういったことも根拠としております。

○中島座長 そのような根拠があれば、こちらも安心できるので、できる限りそういう情報を収集して、安全性のデータを集めていただきたいと思います。

次に、日本語版で36ページにあるリテンションタイム10.6のピークが全体に占める割合が非常に小さかった。だから安全と言っているのですが、これについても同じように安全性に関するインフォメーションを収集していただきたいと思います。何か今お持ちのインフォメーシ

ョンはございますでしょうか。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） 今日ではこれ以上の情報というのは持ち合わせておりませんので、また確認をさせていただきます。

○中島座長 ありがとうございます。

○川西委員 先ほどの35ページの4番目、5番目の物質も含めてなのですが、通常、香料のJECFAでの評価で構造クラスというものがあり、クラス1、クラス2、クラス3というものが分類されて、毒性予測といたしますか、それは通常行っているわけですが、そのときに構造アラートとってこういう構造を持っていると危ないよという分類をして評価することになっていると思います。ですので理由を説明するときに、そういうことも加味して、これは構造的に問題はないよということもつけ加えて説明していただくと、私たちも国際的な香料の評価でそういうふうには評価されているというのはわかりやすいと思いますので、先ほどの質問に対する答えをするときには、そのあたりも少し加味して答えをつくっていただけるとよいと思います。

○アイソバイオニクス社（Emanuele Rizzi氏） そのような分類というものがあるということですので、そちらに関して含めておりませんので情報収集いたしまして、また含めていきたいと思っています。

○川西委員 あと、実はこの資料ではなくて添付資料のほうの不純物の分析を見ていると、分析結果としてはわかりにくい部分も実はあるのですが、それはおいておきます。御社の製品に関して新たに検出されたものとしての報告というのが5つの成分であるのですが、それ以外のもので既存のコンベンショナルな製品には量的には非常に少ないけれども、この製品には結構多く入っているという物質があります。私がアイデンティファイしたのは、●●●が例ですが、既存の製品に含まれるより量が多いものに関しても、何らか量が多くても安全ですよという考察は必要だと思います。それもお願いしたいと思います。

同様に、35ページの3番目の7-epi-alpha-Selineneですが、説明としてオレンジジュースの分析をするとこれらの成分が認められるということを経由に挙げていますが、これもやはりどのくらい入っているかという量の問題もありますので、そのあたりも答えの中でプラスアルファで、申請者としてはそれでも安全だと考えるということは、きちんと説明していただきたいと思います。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） FEMAの承認申請の過程で毒性の評価を行うように言われておりまして、毒性評価をしておりまして、そのデータをここに含めておりませんが、ございますので、そちらはまた提出させていただきます。

○アイソバイオニクス社（Emanuele Rizzi氏） そして、安全性と毒性の評価という意味で、2次産物としてその含有量が0.1%を超えているものに関しては対象にしております。

○中島座長 樋口先生、どうぞ。

○樋口専門委員 不純物を調べるのに、添付資料でGC-MSの生のデータを出していただいているのですが、バレンセンとその類縁体が出てくるあたりの時間帯のチャートが

あって、それ以外のところは極めて小さなピークしかなかったということでカットされているのですが、これはやはり事実そうであるということを示すための証拠のデータですので、ぜひクロマトチャートは最初から最後まで出していただいて、バレンセンの周辺以外のところは極めて小さなピークしかないということを実際に示していただきたいというのがまず1つです。

○アイソバイオニクス社（Elena Melillo氏） 添付資料3、ページ番号がついていないのですけれども。

○樋口専門委員 そうすると、添付資料1のスタンダードA、B、Cとあったものは、スタンダードと言ってもたくさんピークがありますけれども、こちらのスタンダードのA、B、Cというのは何でしょうか。添付資料3のAnnex4にチャートがあるのですが。

○株式会社三菱ケミカルリサーチ（早川氏） 私のほうから答えさせていただいてよろしいでしょうか。

三菱ケミカルリサーチの早川と申します。

つくるのをお手伝いさせていただいていまして、1つの比べたもので全てのことが言えるとよかったのですが、ここに評価するために求められていることを言うのに、いろいろなところからデータを引っ張ってきまして、それでここにありますように幾つかのデータが出ております。もしこのものについて全ての最初から最後まで必要ということであれば、そのデータについてはまた探してつけさせていただこうと思います。

○樋口専門委員 そうですね。本体の緑のファイルの34ページに、参照として添付資料1のAnnex4に示すようにと書いていますので、それを見に行ったときにほかのところのカットされているなということになってしまうので、本文で参照する生データについてはやはりフルで出していただいたほうが、こちらとしては安心できるということです。

○アイソバイオニクス社（Elena Melillo氏） 文の記載のところで書いているのですけれども、どうして拡大したこの部分しか出していないかというのと、●●●というのは出していないという、そういった理由がございます。

○樋口専門委員 わかりました。

○アイソバイオニクス社（Elena Melillo氏） フルにチャートをごらんになられたい場合は、GCを行っておりますので、添付文書3にフルのものが入っておりますので、そちらをごらんいただければと存じます。

○樋口専門委員 そうすると、添付1と3と同じものの拡大の仕方が違うものがあるということですか。

○アイソバイオニクス社（Elena Melillo氏） サンプルの希釈のされ方が違うものです。そういった理由があって●●●という理由からです。

○樋口専門委員 なるほど、わかりました。

もう一点なのですが、菌株の安全性はこのようなつくり方をして、既に大量に製造して販売されているということで、大丈夫かなとは思っているのですが、ガスクロで分

析されてくるものは、バレンセンと同様に揮発性の高いものは検出されると思うのですが、油の中に溶け込んでいる揮発性の低い不純物の可能性については、何か検討されましたでしょうか。

○アイソバイオニクス社 (Elena Melillo氏) このプロセスにおいて蒸留のプロセスがありますけれども、揮発性の高いもののみ蒸留のプロセスでエクストラクトされるということです。ですからGCで見ているものというのは油の中に入っているもの全てであると思っています。でなければこれは蒸留していないということになりますので。

○樋口専門委員 わかりました。

○中島座長 どうぞ。

○児玉専門委員 日本語のほうの35ページのところに、今回の不純物は副産物は酵素が由来する基原生物特異的であり、イソプレノイド合成酵素によく見られるとあるのですけれども、とするとこれはもとのシーダーにこの物質はあり得るのかというのが1つと、もう一つは蒸留とか繰り返しているの、構造異性体はバレンセンがケミカルにチェンジしていったものである可能性はないのか。要するに酵素がつくっているのか、蒸留過程、製造過程でできてしまったものか、そこは区別しておられるかどうか。要するに酵素としては特異性が低いようにも見える。低いというわけでもないのしょうけれども、そういう可能性もあるのかということをお聞きしたい。

○アイソバイオニクス社 (Georg Lentzen氏) 合成酵素からできるものというのは1つとは限らずに、2つ以上だったり複数だったりするわけですが、バレンセンの合成酵素からできるものの1つというのがバレンセンです。これはプロセスから来ているものではないということです。

普通こういった産物というのは熱に対して安定しているというものですので、このプロセスの中で除去されています。

○アイソバイオニクス社 (Elena Melillo氏) それから、蒸留をしていないサンプルに関しても分析を行ったのですけれども、それで同じピークが出たということです。

○児玉専門委員 わかりました。

○アイソバイオニクス社 (Elena Melillo氏) 確かにおっしゃるように製造工程の中での変化によって出てくるものに関して、それがGCに出るということもありますけれども、●●●●というのも行っておりまして、同じようなピークが出ています。しかし、大変に少量であるということです。

○中島座長 よろしいですか。

先生方ほかにございますでしょうか。

○児玉専門委員 事前には質問したのですけれども、ネオマイシンがGC-MSで検出できなかったという表現があるのですが、ネオマイシンは余り揮発性はないし、GC-MSにかけにくいのではないかと思います。誘導体にしていれば別だと思うのですけれども、その点はどうなのでしょう。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） ネオマイシンがGCで検出されないというのは、それは確かにおっしゃるとおりで、揮発性がないからです。しかし、GCを行って実際のところもちろんネオマイシンは検出されず、分解産物も検出されなかったという状況です。

このネオマイシンに関してですけれども、我々のポイントとしてはこの製品の窒素分析を行っていて、ネオマイシンには6つの窒素原子があるはずなのに、その窒素が検出されなかったということで申し上げます。

○児玉専門委員 こちらの説明書を、どちらかという窒素分析のほうにウェートを置いて文章を変えていただければそれでいいと思います。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） 承知しました。

○中島座長 先生方ほかにございますでしょうか。

それでは、重要なポイントは宿主、*Rhodobacter*の安全性、それから、食品利用上の実績についてできる限りインフォメーションを集めること。

プロダクトのバレンセンの不純物について、それぞれ量的な問題を加味してインフォメーションを集めることと、それから、これをもって安全と考える根拠について丁寧な考察をお願いしたいと思います。

○アイソバイオニクス社（Georg Lentzen氏） 承知しました。

○中島座長 先生方よろしいでしょうか。

これで終わります。ありがとうございました。

（発表者退室）

○中島座長 それでは、審議を再開いたします。

今の質疑を通して大体先が見えたと思いますし、実際にこれでつくられたバレンセンが既に年間5トンなり10トンなり実績があるということですので、指摘させていただいたことについて彼らの回答を待って、もう一度見させていただこうかと思いますけれども、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が、実際のところは直接伝わっておりますので、大体問題なく回答は出てくるものと考えます。そういったところでよろしいでしょうか。

○川西委員 1点よろしいですか。先ほど回答の中でFEMA GRASの申請で毒性試験を求められているということをおっしゃっていた。それは私が理解している限りだと、組換えの遺伝子食品ではそういうデータは今まで求めた例はあまりない。もちろん指針上はそこで安全が確認できないときは求めることになっているけれども、極めてまれで、これは向こうにお任せするということですかね。それはもう入れて回答してくるということですよ。どこまで入れるのか確認しようと、どんな毒性試験をやっているのと聞こうと思ったのですけれども、暴走してしまうとまずいので、申請者には聞かなかったのですが、事務局のほうでそれは出してもらうということ。

○中島座長 まだ審議中ですので、こういう意見があったということで事務局でまとめる

ときに、今の意見も入れて指摘として言っていただければいいかと思います。それでよろしいですね。

ほかにございますでしょうか。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、その他ですけれども、事務局からございますでしょうか。

○飯塚課長補佐 特にございません。

○中島座長 ありがとうございます。

時間を超過して申しわけございませんでした。

本日の議題についてはこれで終了しました。

では、以上をもちまして第183回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。お疲れさまでした。