

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第184回) 議事録

1. 日時 平成31年3月29日(金) 13:58~14:58

2. 場所 食品安全委員会大会議室(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

・JPAo002株を利用して生産されたフィターゼ

(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、橘田専門委員、児玉専門委員、
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)

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

①JPAo002株を利用して生産されたフィターゼ

6. 議事内容

〇〇〇 まだ時間がありますが、全員おそろいのようなので始めたいと思います。

ただいまから第184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、所用により〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇が御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるJPAo002株を利用して生産されたフィターゼの安全

性についての審議です。

では、お手元の資料を確認いたしますので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、食品安全委員会に関する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上机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、本日は新規品目でありますJPAo002株を利用して生産されたフィターゼの申請者である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。

〇〇〇 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。ありがとうございます。

それでは、新規品目であるJPAo002株を利用して生産されたフィターゼについて審議を行いたいと思います。事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、御説明させていただきます。

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、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、申請資料について御説明いたします。お手元にピンク色のファイルの御準備をお願いいたします。

まず2ページをお願いいたします。第1の（1）といたしまして、名称はフィターゼ、基原は*Aspergillus niger*、反応特異性はフィチン酸のリン酸エステル結合を加水分解するものです。

(2) 製造方法ですが、生産菌株の培養液から抽出、除菌及び精製等の工程を経て製造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、飼料にフィターゼを添加することにより家畜の胃においてフィチン酸が分解され、遊離したリンが腸管で吸収され、その結果、家畜の成長が促進されます。

続いて第1-2です。(1) 宿主の由来等でございますが、宿主は*A. oryzae* IFO4177株でございます。清酒麴から分離された野生株でございます。

(2) DNA供与体の由来についてでございますが、IFO4177株の染色体に導入された遺伝子はフィターゼをコードする*CbPhyt#1*遺伝子、そして選択マーカー遺伝子として*amdS*遺伝子、*niaD*遺伝子、*URA3*遺伝子の3つが用いられております。これらの供与体は次の3ページに表1としてまとめられております。*CbPhyt#1*遺伝子は、*Citrobacter braakii* ATCC51113株由来、*amdS*遺伝子は*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株由来、*niaD*遺伝子は*A. niger* IFO4177株由来、*URA3*遺伝子は*Saccharomyces cerevisiae* FL100株由来でございます。また、そのほかにもプロモーターやターミネーター、そしてシグナル配列について、その性質についてもあわせて記載をしております。

4ページをお願いいたします。(3) 挿入DNAの性質についてでございますが、生産菌株は遺伝子導入用ベクターpJPV009及びpJPV010を導入し、さらに欠失導入用ベクターやガンマ線照射により複数の遺伝子を欠失することで作成しております。具体的な手順は、その下の図1に示したとおりでございます。

5ページに行きまして、表2に欠失導入用ベクターにより欠失させた遺伝子及びその性質について記載しております。

その下、DNAの挿入方法でございますが、遺伝子導入用ベクターpJPV009及び010をプロトプラスト法で宿主に導入しております。なお、009は●●●染色体に、010は●●●染色体に挿入されております。

6ページ、(2) DNAの欠失方法についてですが、1) 欠失導入用ベクターによるDNA欠失では、●●●遺伝子を欠失させております。その際に*amyC*遺伝子についてはDNA欠失操作において異種由来*pyrG*遺伝子断片の挿入を伴い、当該断片の一部が生産株においても染色体上に残存するため、安全性に関する解析を行っております。このことについては後ほど御説明いたします。

続いて2) ガンマ線照射によるDNA欠失では、2つの遺伝子クラスターを欠失させております。この結果、シクロピアゾン酸合成遺伝子クラスターとアフラトキシン合成遺伝子クラスターを破壊しております。

続いて第1-3、利用経験や食経験に関する事項ですが、*A. oryzae*は食品用酵素の生産菌として長年安全に使用されてきた実績があり、我が国においても*A. oryzae*が生産するリパーゼやプロテアーゼ等の酵素は既存添加物として食品に使用されております。また、この菌自身は麴菌として味噌や醤油、醸造酒などの発酵食品の製造に広く用いられており、飼

料添加物の生産菌としての実績もごございます。

第1-4、宿主の構成成分等についてでございますが、*A. oryzae*がマイコトキシンであるシクロピアゾン酸及び抗菌物質であるコウジ酸を産生することは以前より知られております。また、同じくマイコトキシンであるβ-ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンについては、産生遺伝子を保有するものの多くの観察において、実際には検出可能なレベルで産生されていないことが知られております。

今回の生産菌株であるJPAo002株の作製に使用したIFO4177株のシクロピアゾン酸、コウジ酸、β-ニトロプロピオン酸及びアフラトキシン産生量を二次代謝産物の産生に適した培地を用いて確認したところ、シクロピアゾン酸及びコウジ酸は検出できるレベルで産生され、β-ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンは検出限界未満であることが確認されております。

続いて第1-5、GM添加物の性質について記載されております。

(1) については記載のとおりでございます。

(2) 製造方法の詳細ですが、8ページの図3もあわせて御参照ください。培養液を除菌、ろ過等の工程を経て生産菌を除去した後に製品化されております。

続いて(3)用途等についてですが、こちらは既存のフィターゼと同様でございます。

(4) は記載のとおりです。

続いて第1-6といたしまして、従来品との比較についてでございます。

(1) として従来添加物との比較ですが、販売実績は、本申請品目については海外で5年程度の実績があり、既存のフィターゼについては我が国において20年以上の実績がございます。至適のpHは申請品は4.0で、既存のものが5.0~6.0となっております。

10ページ(2)といたしまして、組換え体と宿主との相違点ですが、生産菌株には*CbPhyt#1*遺伝子が●●●、*amdS*遺伝子が●●●、*niaD*遺伝子が●●●です。そして*URA3*遺伝子が●●●挿入されている点となっております。

続いて第2の項目、宿主に関する事項ですが、第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。*A. oryzae* IFO4177株は清酒麴から分離された野生株であり、その派生株も含めてさまざまな食品用酵素の生産菌の作製に長年用いられてきました。実際にその実績というのは表5に示したとおりでありまして、日本国内のみならず海外でも利用されております。

続いて第2-2、12ページをお願いいたします。まずIFO4177株の病原性についてですが、*A. oryzae*は国立感染症研究所の病原体等安全管理規程によるバイオセーフティーレベル分類では2及び3には分類されておらず、リスク分類では1に分類され、したがって、非病原性であると考えられるとしております。

続いて、有害生理活性物質についてですが、*A. oryzae*がシクロピアゾン酸及びコウジ酸を産生することは以前より知られており、また、β-ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンについては産生遺伝子を保有するものの、多くの観察において実際には検出可能なレベ

ルで産生されていないことが知られております。

実際に申請者はIFO4177株のシクロピアゾン酸、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシン産生量を二次代謝産物産生に適した培地を用いて確認したところ、シクロピアゾン酸及びコウジ酸については検出可能なレベルで産生が確認されましたが、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンについては検出限界未満という結果となりました。

なお、生産菌であるJPAo002株はシクロピアゾン酸合成遺伝子及びアフラトキシン合成遺伝子が欠失されており、本株を酵素製造に用いる際には、これらを含む二次代謝産物が産生されていないことを社内規格として確認しているというところでございます。

第2-3、第2-4については記載のとおりです。

第2-5、*A. oryzae*の近縁種の病原性についてですが、*A. fumigatus*は日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られております。

有害生理活性物質についてですが、こちらに書いてある*A. flavus*あるいはほかのものについても有害生理活性物質であるアフラトキシンを産生しますが、*A. oryzae*はアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログを有するものの、そのほとんどの菌株においてアフラトキシン生合成遺伝子が転写機能を失っております。

続いて14ページ、第3、ベクターに関する事項でございます。

遺伝子導入用ベクターはpJPV009及び010でありまして、この構築に用いたpUC19について記載しております。

第3-1、pUC19は遺伝子組換えの実験や応用に広く用いられてきた*E. coli*由来のプラスミドベクターであり、人に対する有害性は知られておりません。

第3-2、性質に関する事項については記載のとおりでございます。

続いて16ページをお願いいたします。第4、挿入DNA等に関する事項です。本項目では*CbPhyt#1*遺伝子、*amdS*遺伝子、*niaD*遺伝子、そして*URA3*遺伝子について御説明いたします。

35行目から1-(2)安全性に関する事項ですが、まず*C. braakii* ATCC51113株ですが、*Citrobacter*属はEnterobacteriaceae科に属し、その中には医学細菌として知られている*C. freundii*が含まれております。*C. braakii*の医学細菌としての報告はありませんが、チーズから分離されたという報告があり、さらに17ページの上のほうに行きまして、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程では、バイオセーフティーレベル2や3に分類されず、リスク群分類では1に分類されております。

続いて*A. nidulans*ですが、食経験は特に知られておりません。*A. nidulans*のアセトアミダーゼをコードする*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。

続いて*S. cerevisiae*が有害生理活性物質を生産することは知られておらず、パン酵母やアルコール発酵用酵母として食品製造に昔から安全に使われてきた長い歴史があり、安全

性には問題がないと考えられます。これらいずれも病原体等安全管理規程ではリスク群1に分類されております。

続いて第4-2- (1) といたしまして、挿入遺伝子の合成方法等ですが、*CbPhyt#1*遺伝子は*C. braakii* ATCC51113株をもとに合成しております。

*amdS*遺伝子、*niaD*遺伝子、*URA3*遺伝子は、それ由来株のゲノムDNAを鋳型として用い、PCRで増幅し遺伝子断片を得ております。

(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が、まず*CbPhyt#1*遺伝子はフィターゼ活性を有するCbPhytをコードします。これは飼料中のフィチン酸を分解して無機のリンを遊離させるというものです。

次に*amdS*遺伝子は、アセトアミドを分解するアセトアミダーゼをコードします。アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中で、*amdS*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ます。これはpJPV009をIFO4177株の染色体に挿入する際に選択マーカー遺伝子として用いられております。

19ページに行きまして、*niaD*遺伝子は、硝酸還元酵素をコードします。硝酸を唯一の窒素源として含む培養液中で*niaD*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ます。pJPV010をIFO4177株の染色体に挿入する際に、選択マーカーとして用いております。

最後に*URA3*遺伝子ですが、オロチジン5'-リン酸デカルボキラーゼをコードします。一般的にウリジン要求性を相補する選択マーカーとして用いられ、pJPV009及び010を大腸菌で増幅する際の選択マーカーとして用いられました。

続いて第4-3、そして第4-4、4-5- (1) については記載のとおりでございます。

少し飛びまして26ページをお願いいたします。4-5- (2) といたしまして、目的以外のORFの有無についてでございますが、2種類の発現ベクター009及び010について目的外のタンパク質を発現するORFが含まれているか否かを調べるために、それぞれの全体についてORF検索を行っております。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と定義しまして検索を行った結果、pJPV009では162個、010では213個のORFが検出されました。検出されたORFの毒性の可能性を調べるために、既知の毒性タンパク質との相同性検索を行っております。

その結果が16行目以降でございますが、E-value<0.02を指標にして検索を行いました。まずその結果、pJPV009においてはデータベースのタンパク質にヒットしたORFが3個、これらのORFと相同性を持つタンパク質は7個。そして010においてはデータベースのタンパク質にヒットしたORFが1個、このORFと相同性を持つタンパク質は5個という結果でございます。

ここから重複を除きまして整理した結果というのが27ページ、上にある表8でございます。ORF1については5つのタンパク質との相同性を示しましたが、これについての考察が

27ページの下から28ページにかけてでございます。結論といたしましては、いずれもORF1がこのタンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考えがたいと考察しております。

さらにORF2、ORF3についても同様に結論でございますが、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ことは考えがたいとしております。

続いて30ページをお願いいたします。(3)意図をする挿入領域でございますが、009及び010のそれぞれの全体でございます。

(4)については記載のとおりです。

続いて第4-6、導入方法でございます。pJPV009及び010をIFO4177株に導入する際には、プロトプラスト形質転換法を用いており、この方法を用いることによって発現ベクターの任意の配列を末端として、染色体上の任意の位置に1から複数コピーがタンデムに導入されると考えられております。

第4-7については記載のとおりです。

続いて第5、組換え体に関する事項ですが、第5-1、宿主との差異に関しましては記載のとおりでございます。

第5-2といたしまして、遺伝子の導入に関する事項ですが、(1) pJPV009及び010が宿主の染色体上のどの位置に導入されたかを調べるために、JPAo002株の全ゲノム解析を行っております。

次世代シーケンサーによるゲノムの解析結果でございますが、結果は37行目にありましており、まずpJPV009については●●●染色体に挿入されたことが明らかとなりました。

続いて32ページにおきまして、010については●●●染色体に挿入されたことが明らかとなりました。

続いて、少し飛んで28行目なのですが、定量PCR解析によるコピー数の推定を行っております。*CbPhyt#1*遺伝子はpJPV009の導入により●●●、010の導入により●●●、合計●●●挿入されているということが確認されております。

少し飛びまして35ページをお願いいたします。5-2-(2) 遺伝子導入におけるORFの有無について記載がされております。pJPV009及び010の挿入に加えまして、●●●遺伝子を欠損したうち*amyC*遺伝子についてはDNA欠失操作において異種遺伝子断片の挿入を伴い、当該断片の一部が生産株において染色体上に残存するため、この箇所については安全性に関する解析を行っております。

21行目に少し飛びまして、6つ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、●●●染色体の遺伝子挿入部位では65個、●●●染色体の遺伝子挿入部位では61個、*amyC*遺伝子座では120個のORFが検出される結果となりました。これらの検出されたORFと既知の毒性タンパク質の同一性検索を行っておりまして、その結果ですが、37行目からになります。

まず●●●染色体の挿入部位ですが、65個のORFのうち宿主ゲノムと挿入配列をまたぎ、

かつ、データベースのタンパク質にヒットしたORFが2個ということでございました。そのうち1つのORFは宿主ゲノム領域内で検出されたものであるため、解析の対象から除外し、残りの1つのORFと相同性を持つデータベースのタンパク質は3個であったということでございます。

36ページ、同様に●●●染色体では1つのORFと相同性を持つデータベースのタンパク質は1個という結果になりました。これらの結果についてはまとめて表9に記載されております。

続きまして14行目からになりますが、ORF1については第4-5-(2)に記載のとおり、ORF1がこのタンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考えがたいとしております。

ORF2については、*Streptomyces*属に由来するものと考えられており、毒性について報告はございません。よってこのORFが毒性を有することは考えがたいとしております。

最後に*amyC*遺伝子座でございますが、検出された120個のORFのうち、宿主ゲノムと挿入配列をまたぎ、データベースのタンパク質にヒットしたORFはなかったということでございます。

第6、製造原料等に関する事項ですが、製造原料等は全て長年安全に使用された実績があるという旨が記載されております。

続いて第7をお願いいたします。遺伝子組換え食品添加物に関する事項ですが、7-1として諸外国における認可等について記載しております。本品目につきましては2012年ごろに販売開始され、以来、EUを中心として飼料添加物として使用されているというものでございます。

続いて第7-2、組換え体の残存に関する事項ですが、ドットプロット解析によりまして、本製品にはJPAo002株の染色体DNAが残存しないことを確認しております。

40ページ、第7-3、非有効成分について記載されておりますが、表10には飼料添加物成分規格収載書の規格基準に定める規格値と、それから、試験バッチの分析値の結果を並べて記載しております、いずれも規格値を満たすものとなっております。

続いて第7-4でございますが、製品中のCbPhytのタンパク質の純度はSDS-PAGE分離に引き続くCBB染色の結果、●●●と推定されたということでございます。

第7-5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。

○○○ ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして専門委員の先生方から御意見をいただきたいと思っております。

本品目は飼料添加物ですので、人が直接食べることは想定しなくてよろしいということなので、だからアレルギーとかそういうことは気にしないでよろしいということでございます。なので全部の中からでよろしいと思っておりますので、どこからでもお気づきの点がございましたら御質問をお願いできればと思っております。

33ページ、34ページ、染色体の●●●と●●●に挿入されていて、これを見ると●●●なっていて、実際にシーケンサーでもここは読めていないのですが、これについてはここがタンデムで多コピー入っていて、そこがだから読み切れないというシーケンシングの一般的な問題だと思われるので、私はここは今までもこういったケースは特に問題にされてこなかったことがございますので、よろしいかと思うのですが、ここは先生方よろしいでしょうか。ありがとうございます。

これは麴菌なので、アフラトキシン生産性についてかなり神経質に調べられているようですが、これはそもそも坂口先生がとってきたもので、この麴菌であればアフラトキシンの遺伝子については実は徹底的に調べられた経緯がございまして、そもそも*A. oryzae*というのは野生のフラバスといわれるものが非常によく似ているので、どうやら日本人がそこから育種したものであると考えられているのですけれども、わかりやすい違いはアミラーゼの遺伝子が3つに増幅しているところ、それから、アフラトキシン生合成遺伝子が機能していないといったところで、アミラーゼの遺伝子、*amyA*、*B*、*C*と3つありますけれども、3つともアミノ酸配列は全く同じ。塩基配列も1つか2つくらいしか違わないです。でも染色体は全く別のところに3カ所散っているといったところが違います。

アフラトキシン生合成については散々調べられていて、タイプ1、2、3と3つくらいに分けられて、タイプ2とタイプ3は大きな欠失があるので全く問題なしで、タイプ1についてもたしか4カ所以上くらい、かなり致命的な変異が入っていて、全部復帰しない限りこの遺伝子群が転写されて機能することはないことが確認されていまして、全部安全宣言がとったの昔に出されておりました、この株は坂口先生がとってこられた株なので当然その時点でも調査されておりますので、当然のようにアフラトキシンも幾ら調べても出てこなかったと、それはそうだろうなど。実は日本ではほぼ常識だったりもします。

麴菌ですと遺伝子導入したときに相同組換えで染色体上、相同のところに入るのと、非相同組換えで相同でないところに入る、両方起こりまして、大体非相同のほうが8割くらいで、相同は2割かそれ以下くらいです。*ligD*という遺伝子がありまして、その遺伝子を潰しておく、そうするとほぼ相同でみんな入るようになる。非相同組換えを防ぐことができるのですけれども、この株の場合は*ligD*の遺伝子を潰していませんので、両方起こるはず。なので●●●とか潰すのも、これも確率の低い非相同組換えで潰れているのを確認しながらやったわけですから、これはかなり苦労したろうと思います。

かわりに標的の遺伝子を入れたときには、これは非相同で入っているのだから●●●と●●●の染色体に多コピーで入っている。プロトプラストランスフォーメーションは通常なのですけれども、プロトプラスト形質転換するとういうふうに入りにやすいなんてことは特にはなくて、それはうそです。普通は1コピーで入ります。なのですけれども、この場合は、時々タンデムで多コピーで入ることがありまして、そういう株は入れた遺伝子が非常に発現量が大きくなるのですぐにわかります。彼らは商業的な目的だろろうと思うのですが、当然生産性のいい株を必死に選んでおるわけで、だからこの株がと

れてきたのだろうと思ひまして、これは一般的でも何でもなくて、よく頑張ってこんなの探したなというのが麹菌を専門にしておる者からすると、そういう印象ですが、でもとられているものとしてはおおむね妥当で、また、このために行っている操作等も私の目から見れば妥当のように思います。

麹菌についての一般的な解説をさせていただきましたが、この際ですので麹菌が出てきたらそういうものだと思っただけだと、お互い手間が省けるかなということです。

また御質問等ございましたらお願いいたします。

〇〇〇 私は麹菌のことを知らないし、お酒も実は下戸で、そういうことで皆様には常識的なことかもしれませんが、資料的に見たときの確認だけなので、確認する必要もないよというかもしれませんが、12ページで今まさに先生がおっしゃったアフラトキシンを初めとして、幾つかの有害生理活性物質が出てくるというようなこと、その遺伝子を潰すということを確認しているところなのですからけれども、社内文書3というところを見ると、●●●という遺伝子を潰したのに関してチェックしているという文章だと私は読めて、では結局、生産菌との関係はどうなのだろうかということが、社内文書3という英語の文書で私、分かりませんでした。このデータとプレゼンの関係がよくわからなかったというところで、JPAo002株と社内文書3との関係というのはどういうことかということがまず1点。

それから、33行目から33行目で欠失を確認するとともに、産生されていないことを社内規格として確認していると書いてあるのですが、ということはノボザイムズはそれなりに懸念をしているということなのかなと思って、社内規格というのがどの段階で、どういう理由でこれを確認しているのかと思ひました。社内規格と言っているのだから恐らく繰り返し確認しているという意味だと私は通常表現として理解しますが、どういう可能性を考えて社内規格として確認しているのかなということを確認してみたいと思ひました。

〇〇〇 確認されたいということならばと思ひますが、私はその必要は余りないような気がして、ちょっと見てみましたが、もとのIFO株からJPAoをつくるまでの間に結構長いステップがございまして、幾つもの遺伝子を欠失させて●●●遺伝子を欠失させて、それからガンマ線を当てて、これはもともとアフラトキシンはつくらなかつたらと思ひますがけれども、シクロピアゾン酸の生合成遺伝子も潰している。その結果としてどこの段階かよくわからないのですが、結局のところ社内規格として、社内規格というのは特に西洋の会社ですと、二次代謝産物で毒性があるものをつくることがわかっているものについては、かなり徹底的に調べないといけないというルールがありますので、それに基づいて調べたということかなと。結果としてそれが検出限界以下になっているという結果もいただいていますので、私が最初結果としてそこは安全になっていると確認したという返事がここに来ているのでいいかなと思ひのですが、気になるのでしたらお呼びしてもいいかなと思ひますが、私は余り。

〇〇〇 私は、やはりデータは見せてもらうなり、どういう考えでやっているかというこ

とは確認するのは必要なのではないかなと思うほうです。

〇〇〇 私はそれ以前の問題で、麴菌というものを信用しておりまして、坂口先生がとってきた麴菌を宿主にする以上、そんなものは心配しなくてもいいのではないかと、実はそこがあったというのがありますので、これが麴菌でなかったら、例えばnidulansとかが宿主だったらもう少し気にしたかもしれないのですが、oryzaeですからお呼びして質問をすればそれなりの答えをしてくれると思うのですけれども、また持ち帰ってとかそういう返事かもしれないけれども、いずれにしろoryzaeならいいんじゃないというのが、実際に味噌とかに入っていて、日本人は何前年も実際にoryzaeの菌体も食べてきていますので、食経験は山ほどありますので、そこは実は私は余り気にしていないところがございます。

〇〇〇 わかりました。その点は了解しました。

〇〇〇 ほかにございますでしょうか。飼料ということを見るとあれなのですが、どうぞ。

〇〇〇 事務局からよろしいでしょうか。

31ページのNGSの解析のところなのですが、35行目から結論が書いてありますが、今回のシーケンス解析では、接合領域の決定に十分なリード数及び冗長度が得られていたと書かれているのですが、実はここの数字の情報をいただいているので、もし必要であれば確認したほうがいいのかと考えているのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇 私は継ぎ目のところが確認できているからいいのかと実は思っていたのですが、ここは聞けばその場で出てくるか、それとも幾つ以上と言われるか、一番可能性があるのは問い合わせますということだと思っておりますけれども。

〇〇〇 この委員会ではリード数という冗長度になると思いますが、一応確認しましょうということにはなっているので、呼ぶか呼ばないかは別として、事後でいいと思うのですが、確認してここの文書に入れてもらえればそれでいいのではないかと思います。

〇〇〇 私もそう思います。きっとこの場に呼んでもかなりの確率で問い合わせますになると思いますので、そこまで頭に入っていることは余りないと思いますので、それだったら事務局のほうから問い合わせさせていただいて、その答えをいただくというのでも多分変わらないと思います。おっしゃるとおりだと思いますので、問い合わせさせていただきますか。その結果については私と〇〇〇で確認させていただきます。

ほかにございますでしょうか。どうぞ。

〇〇〇 これも先生おっしゃったように、確認しますでおしまいだと思うことなのですが、41ページ、これは飼料添加物ということもあって余り気にする必要はないなというのはよくわかるのですが、プロダクト側に関しては社内資料という形で電気泳動とウエスタンブロットの写真が来ている以外は、余りプロダクト側のことは文字上で純度は●●●と推定されたという、これで終わっていて、社内文書を見てみると、電気泳動を見る限りはCoomassie Brilliant Blueで●●●●に幾つかできている。その説明は●●●●だという

ふうに説明しているのですが、それをそう説明したということに関して根拠と言うのは変ですが、ただそうだろうということだけで済ませている。そこがもう少し説明が欲しいというのが思っているところです。

〇〇〇 私もこれが食品だったらもう少し気にすると思うのですが、飼料ですし、もともとが麴菌の培養液で、麴菌のタンパク質がまざっているのだらうと思いますので、飼料だからいいかなと実は思っているのですが、お気になりますでしょうか。

〇〇〇 これはやはり何もやっていないのですか。普通やらないですか。

〇〇〇 そうだろうと思いますし、飼料ですからそんなコストはかけられないのかなと思ったのです。

〇〇〇 一応説明をして、これで納得してねと。

〇〇〇 ●●●以上の純度ですので、純度としてはまずまずだと思いますので、飼料としてはこのくらいであれば、またこれで移行する可能性のあるような毒物ができている可能性があるかどうかという、そういった点については非常に神経質に徹底的に調べて、私もそこだけは気になったのですけれども、そこはよく調べておいていただいていますので、余り心配はないかなと考えているのですが、お気になりますか。

〇〇〇 何もなければ聞いても。ただ、こういうもので何も聞かないというのもどうかなと思う部分があって、ただ、飼料添加物だからとまた言ってしまいますが、リスクに結びつく可能性は極めて低いなどは思います。

〇〇〇 飼料の委員会でこれは審査済みでして、純度に関してはあのデータぐらいなのですけれども、ウエスタンのデータも出ていまして、ウエスタンだと●●●ようなのですけれども、ただ、彼らに聞いてもブロードなのは糖鎖かもしれないけれども、何も調べていませんと。というのは同時に家畜の成育の状況が出てくるので、そこはプラスに働くので、プラスに働いているから何も悪いことはないですよと言われると、そのとおりということになりますので、飼料としてはこのぐらいの純度でよろしいでしょうということで終わっております。

〇〇〇 飼料ですから、そういった扱いのようですから食品ではないので、その辺は私もよろしいかなと実は思うのです。

〇〇〇 ただ、今、〇〇〇が●●●とおっしゃいましたが、これで●●●けれども。

〇〇〇 ●●●というのは●●●というのはおっしゃるとおりです。

〇〇〇 麴菌は割と低いところに、50kDaのところにはぼんとアミラーゼのバンドが出るのですが、大体20 kDaからそのぐらいのところは何本かいつも必ず出ますので、それはなかなか除けないので、普通にSDS-PAGEをやればいつもそれは出ます。なのでその辺の事情を考えると、そこまで除いていなくて、飼料としては麴菌由来であることはほぼ確実なのでよろしいかなと思うのですが。

〇〇〇 了解です。

〇〇〇 先生方ほかにございますでしょうか。

飼料ということを考えますと、これで安全性に特に懸念はないと思うのですが、せっかく申請者の方も待機しておられるようなのですが、聞くようなことはないと思うのですが、先生方いかがでしょうか。よろしいでしょうか。

ありがとうございました。そうかなと思ったのですが、それでは、評価書案の説明をお願いします。

〇〇〇 それでは、評価書案の御説明をさせていただきます。

食品健康影響評価に関する資料の4ページをお願いいたします。

I. 評価対象飼料添加物の概要でございます。

本飼料添加物は、*A. oryzae* IFO4177株を宿主として*Citrobacter braakii* ATCC51113株由来のフィターゼ遺伝子を導入して作製したJPAo002株を利用して生産されたフィターゼでございます。

比較対象とした従来の飼料添加物は、*A. niger*を利用して生産されたフィターゼでございます。

また、68行目から71行目までプロモーターですとかターミネーター、さらにシグナル配列について記載をしております。選択マーカーとしては*A. nidulans* Glasgow野生株由来の*amdS*遺伝子、そして宿主由来の*niaD*遺伝子、そして*S. cerevisiae*由来の*URA3*遺伝子を導入しております。これらにより構築された遺伝子導入ベクターは、宿主ゲノムの2カ所に複数コピー組み込まれております。

II. 食品健康影響評価でございます。

(1) ですが、宿主であります*A. oryzae*は、食品の製造や食品添加物の製造に使用されている糸状菌でございます。また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティーレベル1に相当いたします。

*CbPhyt#1*遺伝子の供与体である*C. braakii* ATCC51113株は、腸内細菌科に属し、バイオセーフティーレベル1に相当いたします。

(3) 本飼料添加物の製造工程において、生産菌は除去されている。また、2012年にEFSAで飼料添加物としての評価が行われ、使用されており、安全性の問題はこれまで報告されておられません。

続いて2でございます。一般的に挿入された遺伝子もしくは挿入遺伝子によって産生されるタンパク質が肉、乳、卵等の畜産物中に移行することは報告されておらず、本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。

以上のことから、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」に準じて評価する必要はなく、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、安全性上の問題はないと判断した。

評価書案の説明は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案について御意見、コメントを承りたいと思います。よろしくお願いたします。

〇〇〇 1カ所よろしいですか。68行目から69行目なのですけれども、プロモーターは *niger* と *nidulans* の *na2* プロモーター連結型とあるのですが、それだと両方の *na2* のプロモーターをがっちゃんこさせたように読めてしまうので、片方は *na2* ですけれども、片方は *Triosephosphate isomerase* のプロモーターなので、そこをちゃんとわかるように文章を整えていただいたほうが。たまにパブコメで違うだろうという、先日そういうパブコメを見たので、ここはちゃんと書いたほうがいいなと思いましたので、変えていただければと思います。

〇〇〇 もっともだと思しますので、そこをよろしくお願いたします。私のほうでも確認いたしますので。

〇〇〇 事務局のほうで修正しまして、また御相談させていただきます。

〇〇〇 ちょっと確認しないとイケないのだけれども、*na2* プロモーターと *na2/tpi* プロモーターを本当のがっちゃんこしてつくっているようにも見えるので、そこをちょっと確認いたしますので、その上でということ。

〇〇〇 2種類のプロモーターを連結しておりまして、*na2* プロモーターは *A. niger* BO-1 株由来で、*tpi* プロモーターが *nidulans* の Glasgow 野生株なので、〇〇〇がおっしゃるように68行から69行目までは書いてあることは正しいのですが、由来と構成が正しく示せていないということだと思いますので、そのように直したいと思います。

〇〇〇 そうですね。また確認させていただきますので、修正案をお願いたします。

ほかにございますでしょうか。

評価書案はこれでよろしいでしょうか。ありがとうございます。ということで、議題1については終わりたいと思います。ありがとうございました。

議題2、その他ですが、事務局から何かございますでしょうか。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 特にございませんということなので、本日の議題についてこれで終了いたしました。

以上をもちまして、第184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した。