

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第189回) 議事録

1. 日時 令和元年6月14日(金) 14:00~15:18

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

・JPAo003株を利用して生産されたリパーゼ

・RN-No.3株を利用して生産された5'-リボヌクレオチド二ナトリウム

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、飯島専門委員、岡田専門委員、小関専門委員、橘田専門委員、
児玉専門委員、近藤専門委員、柘植専門委員、手島専門委員、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)

佐藤委員長、川西委員

(事務局)

小平事務局次長、箆島評価第二課長、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

①JPAo003株を利用して生産されたリパーゼ

②RN-No.3株を利用して生産された5'-リボヌクレオチド二ナトリウム

6. 議事内容

〇〇〇 それでは、皆さんおそろいのようなので、ただいまから第189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、全委員出席でございます。

本日の議題ですが、新規品目であるJPAo003株を利用して生産されたリパーゼ、RN-No.3株を利用して生産された5'-リボヌクレオチド二ナトリウムの安全性についての審議です。

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。

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、食品健康影響評価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、本日は新規品目でありますJPAo003株を利用して生産されたリパ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。

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JPAo003株を利用して生産されたリパーゼについて審議を行いたいと思います。

事務局のほうから御説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、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、お手元にピンク色のファイルJPAo003株を利用して生産されたりパーゼの申請資料の御用意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の項目です。第1-1- (1) でございます。名称はリパーゼ、反応特異性はトリアシルグリセロールの1及び3の位置のエステル結合を加水分解するというものでございます。

(2) 製造方法でございますが、製造の概略図は3ページの図1に示したとおりでございます。培養液は数段階の工程を経て製剤化され、生産菌は除菌ろ過により、生産物から分離除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、製パン工程で配合される乳化剤の代替として、直接パン生地に添加されます。製パン原料である小麦粉にはさまざまな脂質が含まれており、これに含まれるトリアシルグリセロールを加水分解し、ジアシルグリセロールやモノアシルグリセロールが生成されます。これらの生成物は乳化作用を示すことから、乳化剤添加と同様の効果を得ることができるというものでございます。

3ページに行きまして、(4) 摂取量でございます。従来の添加物でありますNOVOZYM677が全てのパン類に含まれると仮定して、日本におけるNOVOZYM677のヒト体重1 kg当たり1日最大摂取量を計算した結果、最大摂取量は0.0004 mg TOS/日/kg体重と算出しております。

続いて、第1-2といたしまして、宿主等に関する項目でございます。

(1) 宿主の由来等ですが、*Aspergillus oryzae* IFO4177株でございます。

(2) DNA供与体等の由来でございますが、こちらは5ページの表1に記載しているとおりでございまして、挿入遺伝子としては*lipFO*遺伝子、こちらは*Fusarium oxysporum* DSM2672株に由来します。また、そのほかに選択マーカーとして*amdS*遺伝子を挿入しており、それ以外にもプロモーター、ターミネーターについては、性質とともに、そちらに記載しているとおりでございます。

6ページをお願いいたします。(3) 挿入DNAの性質でございますが、こちらは図2、図3に示したとおりでございまして、まず、欠失導入用ベクターにより、●●●遺伝子を欠失させております。

続いて、遺伝子導入ベクターpJPV012を制限酵素で処理しまして、直鎖状とした*lipFO/amdS*遺伝子導入カセットを挿入しまして、最後にγ線照射により*cpa*遺伝子クラスターと*aff*遺伝子クラスターを欠失させております。

この欠失させた●●●遺伝子の性質が7ページの表2に記載されているとおりでございます。

その下に行きまして、(1) DNAの挿入方法ですが、*lipFO*遺伝子及び*amdS*遺伝子を組み込んだ遺伝子導入用ベクターpJPV012を制限酵素で処理、さらに抗生物質耐性遺伝子を含む断片を除去し、遺伝子発現カセットとします。

続いて、プロトプラスト法により、遺伝子発現カセットをIFO4177株に導入してござい

す。

(2) DNAの欠失方法ですが、まず、1) 欠失導入用ベクターによるDNA欠失では、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより、●●●遺伝子の機能を欠損しており、このうち●●●遺伝子の欠失はセルフクロニングに該当します。残りの*amyC*遺伝子座についてでございますが、こちらは欠失操作における遺伝子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、安全性に関する詳細な解析を行っており、これについては、後ほど第5のほうで説明いたします。

続いて、2) γ 線照射によるDNA欠失でございますが、シクロピアゾン酸産生遺伝子クラスターとアフラトキシン産生遺伝子クラスターを破壊して、これらの操作をもって生産菌JPAo003株としております。

続いて、第1-3、利用経験や食経験に関する事項でございますが、*A. oryzae*は食品用酵素や有機酸の生産菌といたしまして、長年安全に使用されてきた実績があり、また、我が国でも、*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ます。

9ページ、第1-4宿主の構成成分等でございます。宿主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、そしてアフラトキシン産生量を確認したところ、 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、シクロピアゾン酸及びコウジ酸は検出可能なレベルでの産生が確認されております。

第1-5、組換え添加物の項目でございます。

(1) は記載のとおりです。

(2) 製造方法でございますが、こちらは先ほどの図1に示したとおり、従来の添加物と同様でございます。

(3) 用途でございますが、lipFOは一般的なりパーゼの基質であるトリアシルグリセロール以外にも、小麦粉に含まれるリン脂質やガラクト脂質といった極性脂質のエステル結合を加水分解することができます。

製パン工程で配合される乳化剤の代替として、直接パン生地に添加されます。

続いて、(4) 有効成分等の比較でございます。本申請添加物の有効成分はlipFOであり、トリアシルグリセロールの1及び3の位置のエステル結合を加水分解します。

また、小麦粉に含まれるガラクト脂質及びリン脂質の1の位置のエステル結合を加水分解する性質も有しております。

これに対しまして、従来の添加物の有効成分でありますNOVOZYM677は、トリアシルグリセロールの1及び3の位置のエステル結合を加水分解いたしますが、リン脂質等の極性脂質のエステル結合は加水分解しません。

11ページ、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) 相違点ですが、こちらは表3に示したとおりでございます。lipFOはトリアシルグ

リセロールの1及び3の位置のエステル結合だけでなく、小麦粉に含まれるガラクト脂質等の極性脂質を加水分解するという点で、NOVOZYM677と異なります。

また、アミノ酸残基数や至適温度、至適pHについては、表3に記載されているとおりでございます。pHについては、大きな差は見られなかったとしております。

12ページをお願いいたします。先ほどの2つのアミノ酸配列を比較したことによる●●●と書かれているとおりでございます。

15ページに飛びまして、(2)組換え体と宿主との相違点です。JPAo003株には、*lipFO*遺伝子と*amdS*遺伝子が挿入されている点及び●●●遺伝子が欠失されている点が相違点になります。

16ページをお願いいたします。第2-1でございますが、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、既に酵素製剤の製造に広く利用されており、安全性に懸念を生じるような報告等はこれまでになく、その使用実績としては、隣のページの表5にまとめられているとおりでございます。

18ページ、第2-2でございます。

*A. oryzae*は、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のバイオセーフティレベル1に分類され、非病原性であると考えられております。

有害生理活性物質についてですが、産生量を確認したところ、シクロピアゾン酸及びコウジ酸については極めて低値であるものの、検出可能なレベルでの産生が確認されましたが、β-ニトロプロピオン酸、そして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。

アレルギー性については、19ページに行きまして、適切な環境で扱われている限り、IFO4177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しております。

第2-3、第2-4については記載のとおりでございます。

第2-5、近縁種の病原性についてでございますが、*Aspergillus*属で*Aspergillus section Fumigati*に属する*A. fumigatus*は日和見感染により肺炎の病原菌となることが知られております。

近縁種の有害生理活性物質については、*A. oryzae*と同じ*Aspergillus section Flavi*に属する*A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii*、そして*A. bombycis*は、有害生理活性物質であるアフラトキシンを産生します。

*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われております。

続いて、第3ベクターに関する事項でございますが、遺伝子導入用ベクターの構築には、*E. coli*由来のプラスミド、pUC19が用いられております。

22ページをお願いいたします。第4、挿入DNA等に関する事項でございます。

1- (1) 名称、由来及び分類については、記載のとおりです。

1- (2) 安全性についてですが、*F. oxysporum*は土壌中などに普遍的に生育しており、植物病原菌として知られております。この菌種は、多くの場合は土壌中の腐生菌であり、安全性に問題はないということです。病原性が見られるのはこの菌種の分化型であり、限られた宿主植物種に対して病原性を示します。

続いて、*A. nidulans*の食経験は特に知られておらず、*amdS*遺伝子はアセトアミドが唯一の窒素源といった限られた条件でのみ誘導され、通常の培地で発現することはありません。また、選択マーカー遺伝子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。

F. oxysporum、*A. nidulans*は国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のリスク群1に分類されております。

続きまして、23ページに行きまして、2- (1) 及び (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なりますが、*lipFO*遺伝子はlipFOをコードし、トリアシルグリセロールの1及び3の位置のエステル結合及びリン脂質の1の位置のエステル結合を加水分解します。

1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発に関する知見ですが、*F. oxysporum*はほかの糸状菌と比べて特にアレルギー性で問題となる菌種はないとされており、アレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、ヒットする文献はございませんでした。

2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見ですが、lipFO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という報告はございません。

続いて、24ページ、3) 物理化学的処理に関してでございます。

① 人工胃液でございますが、lipFO製品を酵素液として人工胃液に加え、3時間消化処理を行い、SDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した結果、27kDa付近に見られるlipFOは反応開始後30秒以内に消化されております。20kDa付近に見られたタンパク質は、lipFO由来もしくは宿主由来なのかは判断できないということでしたが、ウェスタンブロットの結果、このタンパク質は反応開始後60分から120分の間に消化されております。

続いて、人工腸液でございます。6時間の消化処理を行い、SDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した結果、反応開始後6時間以内では完全に消化されないということが明らかになっております。

なお、人工胃液の試験で見られた20kDaのタンパク質は、反応開始後1時間以内に消化が認められております。

続いて、25ページ、加熱処理に対する感受性でございますが、pH6.0、30分の条件で調べた結果、70度以上の処理で急速に安定性を喪失し、80度の処理で完全に失活しております。

26ページをお願いいたします。4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性につ

いてですが、アレルギー誘発性の可能性を調べるために、既知のアレルゲンとの相同性検索を行っております。

①としまして、80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索、②連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索という2つの条件で検索を行った結果ですが、既知のアレルゲンは検出されなかったということです。

続いて、*amdS*遺伝子でございますが、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可能でございます。これは選択マーカー遺伝子として用いられており、安全性については、アセトアミダーゼのアレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はなく、また、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遺伝子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。

続いて第4-3、28ページに行きまして第4-4、第4-5-（1）については記載のとおりでございます。

29ページ、（2）といたしまして、目的外のORFの有無についてでございます。

pJPV012ですが、遺伝子発現カセットのみを宿主ゲノムに挿入するための遺伝子導入用ベクターでございますが、宿主に導入される領域は明らかになっております。そのため、pJPV012の全配列を対象としたORFの解析は実施しておらず、宿主ゲノムと境界部位を含む遺伝子導入座位のORF解析については、後ほど第5のほうで御説明いたします。

続いて（3）、（4）については記載のとおりです。

30ページ、第4-6をお願いいたします。導入方法でございますが、pJPV012をIFO4177株に導入する際には、プロトプラスト法を用いております。pJPV012は、抗生物質耐性マーカー遺伝子である*amp*耐性遺伝子を有するため、制限酵素*Not I*で消化し、*amp*耐性遺伝子を含む断片を除去した後に、この消化断片が遺伝子導入に用いられております。

第4-7、31ページに行きまして第5-1については記載のとおりです。

続いて、2-（1）でございますが、遺伝子発現カセットが宿主染色体上のどの位置に導入されたかを調べるために、JPAo003株の全ゲノム解析を行っており、その結果について記載されております。

31ページが一番下、39行目にありますとおり、平均冗長度は50以上でございますが、合計で2500万のリードが得られたということでございます。

少し下に行きまして、10行目からでございますが、挿入位置は、●●●染色体で遺伝子発現カセットの挿入が既存の遺伝子の発現に影響を与える可能性はないと推測されるとしております。

その下、31行目に飛びまして、定量PCRにより遺伝子コピー数の推定を行っております。結果でございますが、●●●という結果となりまして、これ以降では、ORFの解析にはこの●●●のモデルを構築して解析に使用したとしております。

34ページをお願いいたします。5-2-（2）といたしまして、遺伝子導入におけるORF

の有無について記載されております。

ORFの検索は、●●●染色体の遺伝子挿入部位のbreak point内の挿入領域全長に、break point外側の宿主配列として5'側、3'側それぞれ1,000bpを加えたものに対して検索を行っております。また、*amyC*遺伝子座では、5'宿主側が1,000bp、それから異種遺伝子配列を含む欠失導入ベクター由来の配列が1,919bp、3'側の配列が641bpの配列を用いております。

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、合計で478個のORFが検出される結果となりました。これらのORFのアレルギー誘発性及び毒性の可能性を調べるために、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質の相同性検索を行っております。

まず、既知のアレルゲンとの相同性検索についてです。こちらは34ページの下にある①及び②の2つの条件で検索を行った結果、既知のアレルゲンは検出されませんでした。

続いて、既知の毒性タンパク質との相同性検索でございます。E-value<0.02を指標にして検索を行った結果、●●●染色体においてデータベース上のタンパク質にヒットしたORFは9個あったということでございまして、このうち、宿主ゲノム領域内のみで検出されたORFが3つございまして、これを解析の対象から除外すると6つということでございます。

*amyC*遺伝子座のほうでは、ヒットしたORFはなかったということでございまして、これらをまとめた結果が表7でございます。相同性を示したタンパク質は3つございまして、それぞれについての考察が36ページに記載されております。結論としては、いずれも共通しまして、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して、これらの結果から、26行目になりますが、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、製品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しております。

続いて、第6といたしまして、製造原料等に関する事項が記載されております。

製造原料等は、全て長年安全に使用された実績がある旨が記載されております。

38ページ、第7の項目です。

まず、第7-1、諸外国における認可等の状況ですが、フランス、カナダではポジティブリストに収載されている旨、記載されております。

第7-2組換え体の残存に関する項目ですが、ドットプロット解析によりlipFO製品にはJPAo003株由来のDNAが残存しないということが記載されております。

第7-3、非有効成分についての項目です。こちらは40ページの表8を御参照ください。項目のうち、上の5つについては食品添加物等の規格基準、我が国のことも書かれておりまして、それと比較しまして、いずれも満たす結果となっております。

続いて、第7-4です。lipFO製品中には重量比で90%程度の小麦粉が賦形剤として添加されており、第4-2-(3)のSDS-PAGE及びウェスタンブロットの分析では、小麦粉由

来のタンパク質が混入していると考えられることから、純度の算出はできなかっ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す。

第8でございます。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しております。

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、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えます。

まず、ベクターに関する事項まで、2ページから21ページまででございますでしょうか。

8ページに、シクロピアゾン酸のクラスターとアフラトキシン酸のクラスターの2つを壊したと言っているのだけれども、9ページにいきなりシクロピアゾン酸は検出限界未満だが検出可能なレベルでの産生が確認されたとありまして、これはいかに。

〇〇〇 申請者に事前に確認したところですが、今日御確認いただければと思います。

〇〇〇 申請者を呼んでおりますので、ここは聞いておきたいと思えます。

先生方、ほかにございませんでしょうか。

余り長いものではないので、後から戻ってもいいとは思いますが、22ページから30ページ、挿入DNA、産物に関するところでございますでしょうか。〇〇〇。

〇〇〇 事務局には事前に問いかけてありますけれども、27 kDaというのは、アミノ酸の数から推定される長さよりは小さいので、まずその点はどうなっていますかと聞いたならば、たしかよくわかりませんという答えでしたね。

あと、一番大きいのは、SDS-PAGEで見えているバンドとウェスタンで見えているバンドが全然合っていないくて、抗体のつくり方を聞いたら、製剤からつくったというように回答が来ていて、それは通常どおりですと。ポリクローナル抗体らしいのですけれども、これを見てしまうと通らなくなってしまうので、ウェスタンはなくてもいいのではないかと事務局には問いかけたのです。一番メインのバンドが全然見えないので、20kDaあたりのバンドのほうが濃く見えていたりするので、どうしようもないなという感じなのです。

〇〇〇 どうしようもないですね。だから、これがなくても安全性が確認できるかどうかとか、むしろそういうレベルになるわけで、危ないということであれば、ここは宿題にするしかないなというレベルの食い違いだと思います。

12ページの図6にアミノ酸の配列の図がございまして、今回のlipFOが上の段です。NOVOZYM677という従来のものが下にあります。これを見ても、●●●。

●●●、それがわからないという返事だったということなのです。

聞きたいのですが、何が重要かという、つまり、今回の審査対象に入っているものが、このアミノ酸配列であると言っているのだけれども、実際はそうではないだろうということなので、それは少々重要な問題だと考えますので、ここはきっちりした返事が聞けない

とと私は考えているのですが、先生方はいかがでしょう。

〇〇〇 この添付資料の7にも、●●●という言い方をしているのですが、そこがなぜそうなるかということのはっきりした回答が得られるといいかと。

〇〇〇 そう思います。私は麹菌専門なのですがけれども、そこから考えると、●●●そうするとちょうど27になるので、これでぴったりだと私は思っていたのですが、そういう説明を彼らから聞かないと意味がないと言いたいわけなのです。

なので、実は説明はついているのですがけれども、それは私どものほうから指摘してさしあげるべきことではないと考えます。

〇〇〇 一応、事前に聞いて、回答としては、●●●とっていました。

〇〇〇 ノボザイムズさんは麹菌で結構実績があるはずなのだけれどもなどは、実は思うのだけれども。ほかに。

それでは、一番最後まで含めて、ございましたらお願いいたします。

通常、こういうのは純度についてのデータも何となく要求しているのですが、今回のものは安定剤に小麦粉を入れてあって、測れないと言っているのです。それでオーケーにするかという点について、先生方、ここは御意見をいただきたいと思うのですが、いかがでしょう。

〇〇〇 3ページ目の製造の過程のステップ5で、ろ過滅菌をして、ここを試験バッチ、PPW24486としているということがあって、この段階で純度などを求められるのではないかと思います。

恐らく、小麦を入れているのはステップ8とかになると思うのですがけれども、ステップ5の段階でのもので、純度はどうなのかということ投げかけることはできると思います。

〇〇〇 実は私もそこを聞いてみたいと思いますし、これは出せるはずだと思うので、このデータを要求するのはそんなに過酷ではないような気がしてならないのです。これそのものは、もう既にフランスやカナダなどでオーケーになっているので、物が危険ということは私は余り思っていないのですが、やはり審査して判断をするのに必要なデータを提出していただかないといけませんので、ここは筋を通したいと思っているのですが、先生方、いかがでしょう。

〇〇〇 純度自体は24ページ、25ページにある消化性テストのSDS-PAGEからデンシトメーター的に出せてしまうのです。

〇〇〇 そう思います。

〇〇〇 ただ、彼らはウェスタンブロットで全然違うパターンが出たので、純度計算はできませんというところもあるらしいのです。だから、ウェスタンを抜くしかないのではないかと考えているのです。

〇〇〇 その辺は当事者を呼んでありますので、少々議論したいと思います。

物そのものはそんなに危険ではない。安全性についてはそんなに問題はないと思うのですが、それなりに筋は通させていただきたいと考えますので、そのように対応し

たいと思うのですが、よろしいでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 私も、これは海外で実際に使われてきたものなので、製品自体に疑いを持つものではないのですけれども、この書類でいいと言ってしまうと手抜きが続くなどと思って、今のポイントもまさにそうで、最終製品が安全かどうかという評価ではあるけれども、コンサーンとなるものが、中間体で見たほうがいいときは、それでデータをとっていただいて、ちゃんと確認したという事は説明していただきたい。

一方で、これはいいのだろうなと思いつつ、前のときもそうだとすることに今になって気づいているのですが、最後の40ページの試験バッチの分析値と規格基準との比較は、こここそ最終製品で得られているものと規格を比較しなければならないのに、試験バッチは恐らく●●●で使ったバッチのデータだと私は社内文書を見て理解したのです。

ここの製造工程でこれだけのものが得られているから、その後、結局、限外ろ過、除菌工程、安定化剤添加、製剤化ですから、これ以上どうこうということはないのだけれども、いま一つ、こういうもののプレゼンがよくないなというのは思うところです。

このぐらいのちゃんとした会社なのだから、恐らくちゃんとしているのだと私は思うのですけれども、プレゼンがちょっと問題ありだなと思います。

〇〇〇 実は私も思い切り同感です。

この後、思いつくことがありましたら質問したいと思うのですが、まず、シクロピアゾン酸のクラスター、*cpa*クラスターをγ線で破壊していると言っているのに検出されているという点について。

SDS-PAGEで、331アミノ酸にもかかわらず27 kDaであるのはなぜか。

SDS-PAGEとウェスタンのバンドのパターンが、はっきり言って似ても似つかないのはいかなものか。

また、これに関連して、この抗体はどのようにして調製したものなのかという点について。抗体の問題は、麴菌の場合、この遺伝子を大腸菌に入れて、それをウサギに打ってつくった場合と、麴菌から抽出してつくった場合と両方あるのですけれども、麴菌から抽出してつくと、当然のことながら、夾雑するバンドの分が麴菌由来になりますので、SDS-PAGEをやったときに当然夾雑のバンドが出ます。だから、可能ならば大腸菌で調整して、それをウサギに打っていただくと、完全に夾雑のバンドの分の抗体が麴菌由来ではなくなりますので、もう少しきれいにできるのですが、そういう点についてもし情報を持っているのであれば聞いておきたいと思うのです。

それから、純度については、最終的には小麦粉を入れていて、それで測れないという点は理解するのだけれども、その小麦粉、安定化剤を入れる前の段階でいかほどの純度であるか。

こういった点について、申請者に尋ねてみたいと思います。

先生方のほうから、その場で何か思いついたこと等がございましたら、御質問いただき

たいと思います。

申請者を呼んでいただけますでしょうか。

〇〇〇 座長、よろしいでしょうか。

8ページのところで、γ線照射で欠失させたというところなのですが、●●●になるので、こちらのほうがよろしいのかと思うのです。

〇〇〇 そうなのですが、そういうふうに向こうから説明があれば、こちらも納得いくのですが、8ページのところで欠失させたとあって、9ページで見つかったよというように、いきなり矛盾した書き方をされていると当然質問せざるを得ないのです。

なので、申請者のほうから今のような答えが来れば、こちらとしても納得いくということです。

〇〇〇 わかりました。

〇〇〇 よろしいでしょうか。

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、少々休憩にいたします。

(休 憩)

〇〇〇 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。

説明者の方、自己紹介をお願いいたします。会社名とお名前だけで結構です。

〇〇〇 ノボザイムズの〇〇〇と申します。よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 〇〇〇でございます。

〇〇〇 毎回毎回御苦労さまでございます。

それでは、申請書の8ページに、この株をつくるときにγ線を照射して、シクロピアゾン酸とアフマトキシンの生合成系遺伝子を破壊しているとあります。宿主の構成成分等についてなのですが、9ページには、シクロピアゾン酸は検出可能なレベルで産生が確認されたとあって、シクロピアゾン酸の遺伝子を潰したら全く確認できなくなるのが普通かなと思うのですが、いかがでございましょうか。

〇〇〇 9ページの第1-4に記載しておりますのは、確かに生産菌JPAo003株を作製するのに用いた宿主のものになりまして、宿主ではシクロピアゾン酸とコウジ酸が確認されているというところですが

●●●ということなのです。

〇〇〇 それで結構だと思います。

つまり、宿主からここに持ってくるまでの間で破壊したということですね。

次は、〇〇〇のほうから聞かれますか。

〇〇〇 いえ、先ほどのまとめたもので。

〇〇〇 今回、少々深刻でして、24ページと25ページ、人工胃液と人工腸液を用いた消化

性試験についてです。

まず、一見してSDS-PAGEのデータとウェスタンブロットのデータが全然違うように見えるのです。間違った写真を持ってきたのかと思うレベルで違うのです。

つまり、図10であればlipFOの27 kDaのところのバンドが最初から出ているはずなのですが、それがウェスタンブロットでは検出されていない。

図11では、lipFOと言っているバンドはこれだけあるので、そこと対応するバンドが見えるはずなのですが、実際には●●●、とにもかくにも全然対応していないように見えるのですけれども、これについてはいかがでございましょうか。

〇〇〇 一応、詳しいところはもう一回確認させていただきたいのですけれども、例えばウェスタンブロットとSDS-PAGEの中で違うというところは、一般的に言うとウェスタンブロットのほうがセンシビリティというか感度としては高いので、SDSでは見えていないものがウェスタンで見えているというところはあるかと思えます。

ただ、一回全体的に確認いたしまして、回答させていただきます。

〇〇〇 その点、よろしく願いいたします。

それから、この場でわかればなのですが、lipFOはSDS-PAGEで27 kDa程度とありますが、これは331アミノ酸ですので、普通に計算すると35kDaくらいになるはずなのですが、食い違いにしてもその差が少々大きいように思うのですけれども、その差についてはいかがお考えでしょうか。

〇〇〇 SDS等で見える差というのは、しばしば観察はされているので、一概にこれがという原因は今のところ特定はしていないのですが、社内で同様の酵素の知見というか、観察された現象としては、●●●ということが社内的に報告されておまして、このlipFOの酵素についても同じように●●●分子量が少なくなっている可能性は考えられます。

〇〇〇 もうちょっとはつきり申し上げますと、12ページにアミノ酸配列の比較の図がございまして、今回のlipFOは前回のNOVOZYM677と比べて●●●というところが特徴かと存じます。

この●●●というのは、麹菌屋さんであれば常識だとは思っています。

ここについて、アミノ酸の配列は、本製品に入っているものはどのようなタンパクが入っているのかという点が重要ですので、この点、恐らく私は先の●●●とは思っていますけれども、そういった点について、少なくともこの酵素はどのようなアミノ酸の配列を持っているものなのかということ、少々確認をとっていただければと思います。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 それからもう一つ、これはあれだとは思っていますが、最終的な純度について、小麦粉を安定化剤として入れている。そのおかげで測れなかった。これは理解できるのですが、最終のステップではなく、その前のステップで結構です。純度についてのデータ、SDS-PAGEのところでも推定したデータでも結構ですので、何パーセント以上とか、そういった簡単なデータでも結構ですので、測れなかったではなく、純度に関する何らかの情報

を出していただければと思います。

〇〇〇 社内でデータを確認しまして、純度が出せるようであれば提出させていただきます。

〇〇〇 よろしく願いいたします。

先生方、ほかに御指摘がございますでしょうか。よろしいでしょうか。

ありがとうございました。お疲れさまでございます。

(説明者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻ります。

今の回答を踏まえた上で、御意見、コメント等があったらお願いしたいのですが、社内に戻ってデータを出し直してくださるということですので、さすがに全体の安全性としては、既に流通しているものでもありますし、もとの材料にしても、宿主にしても、安全性はほぼ確認されているものですので、それ自体についての懸念はほとんどないとは思いますが、この件については、申請者のほうからもうちょっときちんとしたデータを出していただいて、それを確認させていただくことにしたいと思いますが、よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、ただいまの先生方からの御意見、確認事項を指摘事項案として取りまとめまして、御関係の先生方に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。ありがとうございました。

それでは、次の件です。新規品目であるRN-No.3株を利用して生産された5'-リボヌクレオチド二ナトリウムについて審議を行いたいと思います。

それでは、申請書について、御説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、水色のファイルを御用意ください。RN-No.3株を利用して生産された5'-リボヌクレオチド二ナトリウムでございます。

申請書の1ページをお願いいたします。5'-リボヌクレオチド二ナトリウムは、食品添加物公定書に記載された指定添加物に該当いたしまして、5'-グアニル酸二ナトリウム及び5'-イノシン酸二ナトリウムの混合物となっております。

4ページをお願いいたします。用途ですけれども、本品は調味料として単品で使用されるか、またはL-グルタミン酸ナトリウムなどとの混合物の形で使用されるというものです。

5ページをお願いします。作製の目的ですけれども、リン酸化酵素菌である *Escherichia coli* RN-No.3株は5'-リボヌクレオチドの生産能力が向上した生産菌株を構築することを目的に作製されています。5'-リボヌクレオチドは、変異型ヌクレオシドリン酸化酵素により、ヌクレオシドをリン酸化することにより生産されるものです。

6ページをお願いします。*E. coli* K-12株由来の突然変異株である●●●に、変異型●●●遺伝子を導入することによって、CEP06Z株を作製しまして、これを親株としてRN-No.3株を作製しております。

10ページをお願いします。親株はCEP06Z株となっております。

ベクターですが、遺伝子クローニング等に一般に利用されている●●●を使用したというものでございます。

挿入遺伝子ですけれども、RN-No.3に導入されている変異型●●●遺伝子は●●●ヌクレオシドのリン酸化に関与する遺伝子でありまして、有害性等は知られていないというものです。

抗生物質耐性マーカー遺伝子ですが、●●●ベクター上にある●●●耐性遺伝子を使用しているというものです。●●●有害性は知られていないというものでございます。

13ページをお願いします。通常、これまでのものは、生産菌が直接アミノ酸を作製するという事例がほとんどでしたけれども、今回のものは、原料であるイノシン、グアノシン、●●●と5'-リボヌクレオチド生産菌RN-No.3株培養液を混合させまして、リン酸化反応を行っております。

●●●晶析・分離工程にて、微量の発酵副生物や反応副生物を系外に除去し、高純度の5'-リボヌクレオチド二ナトリウムを取得するというものです。

14ページをお願いします。申請品目と現行製品の品質の比較でございます。申請品目につきましては、公定書規格を満たしているものでございまして、現行製品と同等と考えるというものです。

なお、現行製品には、●●●を使っております。

〇〇〇から、事前に御指摘いただきまして、●●●というものを申請書に追記してございます。

15ページをお願いします。不純物のプロファイル比較結果ですけれども、食品添加物公定書に規定された成分規格に加えまして、2つの分析法、●●●で不純物プロファイルの比較を実施しております。

●●●の分析結果が16ページにございます。申請品目には、新規不純物は検出されなかったというものです。保持時間18.0、20.2、20.4のピークを除きまして、検出された既存の不純物量は現行製品の最大不純物量を超えるものではなかったというものです。

保持時間18.0、20.2、20.4のピークにつきましては、過去の申請時の現行製品、●●●のものとの比較を行いまして、申請品目の最大不純物量は現行製品の最大不純物量を超えるものではなかったという結果となっております。

●●●の分析結果につきましては、17ページにございますが、●●●結果と一緒にございます。

19ページをお願いします。残存タンパク質でございますが、非有効成分であるタンパク質は申請品目中には検出されないことを確認したということでございます。

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、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っております。余り長くないものなので全部と思っておりますが、せつかく時間もございまして、私の知るところを

少々申しておきますと、うま味というのは5番目の基本の味でして、甘味、酸味、塩味、苦味に続いて5番目です。だけれども、うま味が認定されたのは、今世紀になってうま味の受容体が発見されてからです。

うま味の成分というのは今のところ3つ認定されていまして、一つがグルタミン酸、あと二つ、ここにあるグアニル酸とイノシン酸です。

ちなみに、グルタミン酸は昆布だしの主成分でして、グアニル酸はシイタケ、イノシン酸はカツオだしで、いずれもいいおだしの出る食材から発見されておるといことがございます。

それから、この中にも相乗効果とありましたけれども、相乗効果についてはよく知られていて、グルタミン酸ナトリウムに対して数パーセント、グアニル酸かイノシン酸を加えますと、閾値が10から20倍になるというものすごい増強効果がございますので、これを期待して、グルタミン酸ナトリウムのいわゆる味の素にグアニル酸とイノシン酸を加える。5%ぐらい入れて製品にするというような記述もございましたが、そういうことだろうと思います。

これのつくり方なのですけれども、グアニル酸二ナトリウムで、グアニンと糖がつくところまでは発酵生産でできるのですけれども、最後にリン酸をつけるというのが一発ではいけませんので、今回の申請書では、グアノシンとイノシンを入れておいて、培養液と●●●を入れて、最後のリン酸基をつける反応を培養液で行おうということなんです。今までの通常のこのような添加物をつくるという発酵の工程から考えると、かなりトリッキーなことをやっておるのですが、最後のリン酸がついていないと肝心のうま味調味料として役に立たないからこういう手間を踏んでいるということでございます。

だから、最後の調整のところも、そこからリン酸化反応をさせて、あとは●●●などをやっております。

私の知るところはこれくらいで、私はこの内容については特に疑問な点は見当たらなかったのですが、先生方、いかがでございましょうか。

一つだけ、リン酸化酵素なのですが、●●●と説明されております。

この説明でよろしいかどうか、特に御意見がおありでしたら承りたいと思います。

これについては、●●●と思いますが、その点はよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

不純物についても、既存のものを超えていないということなので、よろしいかと思うのですが、先生方よろしいでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 15ページの不純物のピークなのですけれども、単位は何なのでしょう。14~15ページのあたり、現行品と比べているので。

〇〇〇 パーセントとありますけれども。

〇〇〇 パーセントなのですかね。

〇〇〇 対5'-リボヌクレオチド二ナトリウム%とあるので、多分、主成分に対するパーセントだと思うのですが。

〇〇〇 ●●●ですね。

〇〇〇 恐らく。

〇〇〇 だから、何だかわからないけれども、とにかく出てきた数値がこれだからと。安全性はわかるのでいいので、わかりました。

〇〇〇 ●●●を超えていないとありますので、安全性はよろしいかと思えます。多分、●●●ということはないと思えますので、それでよろしいかと思えます。

よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、評価書案を審議したいと思えます。説明をお願いいたします。

〇〇〇 資料の②をお願いします。ページでは19ページになります。

22ページをお願いいたします。評価対象添加物の概要でございます。

名称はRN-No.3株を利用して生産された5'-リボヌクレオチド二ナトリウム、用途は調味料です。

申請者、開発者は、味の素株式会社です。

本添加物は、*Escherichia coli* K-12株由来の突然変異株を宿主として、既に安全性確認が終了したRN-No.2株の親株に、変異型ヌクレオシドリン酸化酵素遺伝子の導入等を行ったRN-No.3株を利用して生産された5'-リボヌクレオチド二ナトリウムである。5'-リボヌクレオチド二ナトリウムは、5'-イノシン酸二ナトリウム及び5'-グアニル酸二ナトリウムの混合物でございます。RN-No.3株が産生するヌクレオシドリン酸化酵素により、原料であるヌクレオシド（グアノシン及びイノシンの混合物）から5'-リボヌクレオチド二ナトリウムが生成されるものです。5'-リボヌクレオチド二ナトリウムは、食品添加物としての使用が認められておりまして、成分規格が食品添加物公定書に記載されているものでございます。

RN-No.3株の宿主である*E. coli* K-12株は、有害な影響を及ぼす毒素の産生性や病原性は知られておらず、経済協力開発機構（OECD）では優良工業製造規範（GILSP）が適用できる宿主微生物として認定されているものでございます。

また、RN-No.3株は、抗生物質耐性マーカー遺伝子として、アンピシリン耐性遺伝子を有しますが、その有害性は知られていないというものです。

II、食品健康影響評価です。

本添加物は、製造工程において使用微生物及び副生成物が除去され、晶析により結晶として高度に精製されており、食品添加物公定書の含量規格を満たしているものです。

本添加物の非有効製品について、最終製品においてタンパク質は検出限界未満である。食品添加物公定書の成分規格を満たしている。HPLC法による分析の結果、従来品に存在しない不純物は検出されず、また、従来品に存在する不純物は、従来品の含有量の最大値

を上回っていないというものです。

以上、(1)～(3)の結果から、従来品と比較して、既存の非有効成分の含有量が安全上問題となる程度にまで増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられるとしております。

1及び2の結果から、本添加物については、「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」の附則「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方」に基づき、安全性が確認されたと判断したとしております。

したがって、本添加物については、「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」による評価は必要ないと判断しております。

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、ただいまの評価書案につきまして、御意見、コメントを承りたいと思います。

なお、細かい字句等の修正につきましては、後ほど修正箇所を事務局まで伝えていただければと思います。

長いものではございませんで、私はこれでいいかと思うのですが、よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思えます。

議題(1)についてはこれで終わりたいと思います。

議題(2) その他ですが、事務局のほうからございますでしょうか。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、本日の議題についてはこれで終了です。

以上を持ちまして、第189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。