

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第196回) 議事録

1. 日時 令和元年12月20日(金) 14:00～17:38

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

- ・CF307株を利用して生産されたキシラナーゼ
- ・JPBL006株を利用して生産されたキシラナーゼ

(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、小野専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、近藤専門委員、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、川西委員

(事務局)

小平事務局次長、箆島評価第二課長、蛭田評価情報分析官、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

- ①CF307株を利用して生産されたキシラナーゼ
- ②JPBL006株を利用して生産されたキシラナーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第196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。

本日は、所用により、〇〇〇、〇〇〇が御欠席です。

本日の議題ですが、キシラナーゼが2個です。新規品目であるCF307株を利用して生産されたキシラナーゼ、JPBL006株を利用して生産されたキシラナーゼの安全性についての審議です。

お手元の資料を確認したいと思います。事務局からお願いいたします。

〇〇〇 それでは、議事次第に基づき、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専門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、本日は新規品目でありますCF307株を利用して生産されたキシ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JPBL006株を利用して生産されたキシラナ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、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、その後、相違等は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「CF307株を利用して生産されたキシラナーゼ」について、審議を行いたいと思います。

事務局のほうから説明をお願いいたします。

〇〇〇 申請書の説明に入ります前に、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。緑色のファイルを御用意ください。「CF307株を利用して生産されたキシラナーゼ」でございます。

5ページをお願いいたします。第1、従来の添加物、名称はキシラナーゼ、こちらは既存添加物に収載されているものでございます。規格もでございます。

有効成分はキシラナーゼです。

製造方法ですけれども、図1にございますが、生産菌株を培養いたしまして、除菌ろ過で回収した酵素溶液を限外ろ過で濃縮しまして、製剤化したものです。

6ページ、用途及び使用形態でございますが、キシラナーゼはパンの製造に使用することができ、パンのボリュームアップの効果がございます。本申請のキシラナーゼは、D-キシロースの1,4-β-D-キシロイド結合をランダムにエンド型で加水分解する酵素です。

7ページ、パンの製造の際には、ミキシングによって小麦粉の水不溶性タンパク質画分であるグリアジンとグルテニンが相互作用して、グルテンネットワーク構造が形成されまして、パン生地として必要な伸展性、粘弾性、安定性が得られます。

ところが、小麦粉中のアラビノキシランは約75%が水不溶性のアラビノキシランであり、WU-AXはグルテンネットワーク構造の形成及び安定化を阻害いたします。

そこで、キシラナーゼでWU-AXを加水分解いたしまして、水溶性アラビノキシランへと可溶化することで、グルテンネットワークの形成阻害が低減されまして、伸展性にすぐれた生地を得ることができるということでございます。

摂取量でございますが、8ページをお願いいたします。パンの摂取によるBS3.2キシラナーゼの理論上の最大摂取量は0.005 mg TOS / kg 体重 / 日と算出されております。

宿主及び導入DNAですけれども、宿主は*Bacillus subtilis* (*B.subtilis*) BG125株でございます。

(2) 目的タンパク質であるBS3.2キシラナーゼをコードしている*BS3.2-xylanase*遺伝子は、*B.subtilis* 168株の野生型キシラナーゼ遺伝子を改変したものです。

(3) *BS3.2-xylanase*遺伝子は、宿主*B.subtilis* BG125株を形質転換して得た*B.subtilis* AK2258株のゲノムに組み込まれております。こうして得たBS3.2キシラナーゼ生産菌株を「CF307株」と命名しております。

*BS3.2-xylanase*遺伝子には、野生型キシラナーゼ遺伝子がコードしているキシラナーゼの185個のアミノ酸残基のうち、●●●するDNA配列の変異を導入してございます。

一番下のパラグラフですけれども、BS3.2キシラナーゼ生産菌株であるCF307株のゲノム上の欠失した*aprE*遺伝子座へ*BS3.2-xylanase*遺伝子発現カセットを導入した際には、受容株*B.subtilis* AK2258株●●●*B.subtilis* AK2258株のコンピデントセルを形質転換する方法をとったということでございます。

カセットを●●●AK2258株●●●AK2258株に入れて形質転換してCF307をつくったということでございます。

10ページ、*B.subtilis* AK2258株は、宿主*B.subtilis* BG125株からアルカリ性プロテアー

ゼ産生能、中性プロテアーゼ産生能、細胞外プロテアーゼ産生能、細胞内セリンプロテアーゼ産生能、バチロペプチダーゼF産生能、細胞壁結合性プロテアーゼ産生能、孢子形成能及び α -アミラーゼ産生能を遺伝子組換え技術により欠失させております。

11ページ、表1にございますが、*BS3.2-xylanase*遺伝子発現カセットには、*catH*遺伝子が抗生物質耐性マーカーとして導入されております。

12ページ、3番ですが、*B.subtilis*は食品や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ございます。

13ページ、4番ですが、*B.subtilis*はヒト及び動物に非病原性であり、有害生理活性物質を産生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定においてバイオセーフティレベル（BSL）1に相当いたします。

5番、遺伝子組換え添加物ですけれども、製品名は●●●という名前です。有効成分はキシラナーゼでございます。

製造方法ですが、既存のキシラナーゼ製造工程と同様ということでございます。

14ページ、用途及び使用形態ですが、3パラグラフ目にありますけれども、BS3.2キシラナーゼは既存のキシラナーゼと同様に、粉末製剤としてパン材料の調整時に添加されるというものです。

15ページ、(4) ですが、BS3.2キシラナーゼは、従来のキシラナーゼと同様に、アラビノキシランの加水分解反応を触媒いたしますが、小麦などに含まれるTAXI、キシラナーゼ阻害物質の影響を受けにくいものとなっております。

16ページ、6の(1) ですが、従来の添加物として知られている *Aspergillus niger*、*Trichoderma reesei*由来のキシラナーゼと比較しまして、*B.subtilis*のキシラナーゼ活性が穀類に含有されるTAXIに影響されにくいことが報告されております。

18ページ、(2) ですが、CF307株は、宿主である *B.subtilis* BG125株と比較しまして、BS3.2キシラナーゼの産生能を獲得しております。また、孢子形成に関係している *degU^h* 遺伝子に変異を導入しております。

さらに、8つの遺伝子を欠失しております。このほかにも、●●●生じたと考えられるということです。

19ページ、第2の1ですが、宿主は *B.subtilis* BG125株でございます。

20ページ、2番は記載のとおりでございます。

3番、*B.subtilis*はヒト体内の温度条件で生育可能であるものの、ヒト腸管への定着及び腸管内での増殖の可能性は低いとしております。

4番ですが、これまで病原性の外来因子の存在を示唆する報告はございません。

5番ですが、近縁種である *Bacillus cereus*はエンテロトキシン型下痢毒の産生により食中毒を引き起こすことが知られております。また、*Bacillus anthracis*は芽胞が呼吸器や肺に到達すると肺炭疽の症状を引き起こすことが知られております。しかしながら、これらと *B.subtilis*は分類上明確に区別されております。

第3、ベクターに関する事項です。CF307株に *BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセット及び *catH* 遺伝子発現カセットを導入するため、環状DNAとして構築した *BS3-catH-DNA* サークルを、●●●線状DNAとして増幅しまして、ゲノムに導入しております。

21ページ、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセットの由来となったプラスミドが図7にございます。

22ページ、*catH* 遺伝子発現カセットの由来となったプラスミドが図8にございます。

これら使用されたDNA配列に関しまして、ヒトへの有害性を示す報告はこれまでに知られていないということです。

23ページ、第4の1、欠失型遺伝子の供与体ですが、24ページの2パラグラフ目、宿主 *B.subtilis* BG125株に導入した欠失型遺伝子は、全て *B.subtilis* 168株に由来する遺伝子でございます。

catH 遺伝子の供与体ですが、*catH* 遺伝子発現カセットに組み込んだ *catH* プロモーター配列とターミネーター配列は全て *B.subtilis* のベクターである pC194 を由来としております。

25ページ、2の(1) 欠失型遺伝子の操作の概要は、記載しております。

26ページからが、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセットの作製について記載しております。こちらは省略させていただきます。

29ページの(2) です。欠失型遺伝子のDNA配列は、宿主ゲノムへ挿入後の配列解析により決定されております。

30ページ、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセットのDNA配列と制限酵素による切断地図は明らかにされております。

(3) の3パラグラフ目、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセットとともに、CF307株のゲノムに選択マーカーとして組み込まれた *catH* 遺伝子発現カセットにより、*Bacillus* 属に由来する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、*BS3.2* キシラナーゼ生産菌の選択が可能になります。

31ページの真ん中より少し下ですが、CF307株の構築工程について、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセットの導入以外の菌株の改変、すなわちプロテアーゼ群と α -アミラーゼ生産能の欠失及び胞子形成能の不活化は、セルフクローニングに該当すると考えられるとしております。

また、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセットに含まれる *B.amyloliquefaciens* 由来の *apr* ターミネーター配列の導入は、*B.subtilis* 及び *B.amyloliquefaciens* の間で自然に遺伝子交換がなされていると考えられるため、上記基準にあるナチュラルオカレンスに該当すると考えられるとしております。

真ん中ほど、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性についてですが、*B.subtilis* は、第9版食品添加物公定書で多くの酵素の基原生産菌の一つとして挙げられております。長年にわたって納豆の製造に広く用いられていることから、日本では *B.subtilis* 自体についても

食経験がございます。

33ページ、遺伝子産物のアレルギー誘発性についてです。BS3.2キシラナーゼは既に2004年ごろからパンの生産などに用いられていますが、BS3.2キシラナーゼのアレルギー性の懸念につながる事象は報告されておられません。

遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性ですが、BS3.2キシラナーゼの製造用原体を用いまして、人工胃液及び人工腸液の感受性の評価が行われております。人工胃液のBS3.2キシラナーゼのバンドは60分経時まで消失しないことがウェスタンブロッティング分析によって示されております。

人工腸液の結果、BS3.2キシラナーゼのバンドは、360分間のパンクレアチン処理により消失しないことがウェスタンブロッティング分析によって示されております。

36ページ、BS3.2キシラナーゼの加熱処理による免疫反応性の変化を、BS3.2キシラナーゼポリクローナル抗体を用いたELISA法によって評価しております。

表の下が結果ですが、実際のパンの焼成条件を想定したキシラン抽出液中の加熱処理（100℃）では、2.5分間の加熱でBS3.2キシラナーゼの免疫反応性が失われたということです。

40ページ、5の（1）ですが、4パラグラフ目にありますBS3-catH DNAサークルを直鎖化して増幅した配列をCF307株のゲノムに導入しております。

BS3-catH DNAサークル●●●であり、DNA配列を決定しております。

41ページ、（3）BS3.2-xylanase遺伝子導入用ベクターBS3-catH DNAサークル全体が、意図する挿入領域でございます。

42ページ、（4）ですが、ベクターの構築に用いたDNA断片は、精製キットを用いて純化したものでございます。

なお、CF307株のゲノム配列を解析した結果、大腸菌由来の●●●DNA断片がBS3.2-xylanase遺伝子発現カセットとともに導入されたことがわかったということです。

この大腸菌由来のDNA断片の混入は、●●●大腸菌に由来するDNA断片が精製時に排除し切れず混入したためと推察できるということです。

6番、BS3-catH DNAサークルを組み込んだ●●●のゲノムを、宿主*B.subtilis* BG125株の改良株である*B.subtilis* AK2258株のコンピテントセルに組み込み、相同組換えによって生産菌株CF307株を得ております。

43ページから47ページにかけて、導入方法の記載がございます。

48ページ、BS3.2-xylanase遺伝子配列確認ですが、結果は下のほうにございまして、CF307株のゲノムに組み込まれたBS3.2-xylanase遺伝子配列を解析した結果、意図しない突然変異がないことを確認したということです。

コピー数の確認をしておりまして、配列解析のため、CF307株のゲノムの全領域をリードとして増幅しまして、次世代シーケンサーによってDNA配列を解析しております。平均冗長度は●●●であったということです。

49ページ、*BS3.2-xylanase*遺伝子発現カセット及び*catH*遺伝子発現カセット、ここは遺伝子発現カセットが重複しておりまして、修正いたします。ゲノム配列上の1カ所に挿入されているということを確認しております。

その2パラグラフ後ですが、●●●されております。

ここからCF307株のゲノム上の1カ所に、*BS3.2-xylanase*遺伝子発現カセットが●●●コピー存在すると推定しております。

51ページをお願いいたします。図19の●●●されております。●●●と考えているということです。●●●と考えられるとしております。

7の(1)ですが、CF307株のゲノムに挿入されているDNA断片には、*catH*遺伝子が含まれております。

52ページ、(2)ですが、発現カセットの構築に用いた●●●であるCF307株には導入されておられません。

第5の1、真ん中ですが、CF307株の継代安定性の確認をしております。CF307株を●●●代を経ても*BS3.2*キシラナーゼ産生能を有していたということです。

2の(1)ですが、2パラグラフ目、*BS3.2-xylanase*遺伝子が設計どおりに欠失後の*aprE*遺伝子座に挿入されていることをPCRで確認しております。結果は53ページです。

その結果、●●●のDNA断片が増幅されているということで、欠失させた*aprE*遺伝子座に*BS3.2-xylanase*遺伝子が組み込まれていることが確認できたということです。

(2) ORFの検出ですが、生産菌のゲノム上の*BS3.2-xylanase*遺伝子発現カセット、*catH*遺伝子発現カセット及び欠失型遺伝子のDNA配列に関し、近傍DNA配列とともに終止コドンから終止コドンで終結する6つの読み枠においてORFを検出しております。これらのORFについて既知のアレルゲン及び有害タンパク質との相同性を評価した結果、安全性に懸念があるORFは見出されなかったということです。

54ページ、●●●としておりますが、安全性に懸念があるORFは見出されなかったということです。

遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性ですが、*BS3.2-xylanase*遺伝子発現カセット、*catH*遺伝子発現カセット及び欠失型遺伝子とその近傍配列について、6つの読み枠において終止コドン間の読み枠のORFを検索しております。

検出されたORFのうち、欠失によって新たに生じたもの、すなわち欠失前のゲノム配列と一致しなかった●●●のORFを対象としまして、既知のアレルゲンとの相同性を、FASTAを用いましてAllergen Onlineで検索しております。●●●個のORFに関して、検索1、検索2、検索3それぞれの条件で評価しております。

検索1では、ORF全長で35%以上の相同性を示すアレルゲンとして、*Bacillus lentus*由来のsubtilisin savinaseと欠失後の*epr*遺伝子領域のORFとの間に48.8%の相同性が示されております。

検索2と3では、既知のアレルゲンと一致する配列は見出されなかったということです。

今回唯一検出された *B. lentus*由来の subtilisin savinase は、第9版食品添加物公定書におけるプロテアーゼに相当すると考えられ、同公定書では、*B. lentus* はプロテアーゼの生産菌の一つとして定義されております。

56ページ、有害タンパク質との相同性ですが、検出された ORF に関して、既知の毒性タンパク質との相同性について、データベースにおいて BLASTP アルゴリズムを用いて検索しております。

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られたということです。

検出された ORF は、●●●を失うことがアミノ酸配列から推定されるため、適切な構造を保つことができないと考えられるとしております。

57ページ、その他のヒットしたタンパク質についても、全長に対する短い領域のみの相同性が見られたにすぎず、その相同性は低かったことから、仮に発現しても有害タンパク質として機能する可能性は低いと考えられるということです。

第6の1、BS3.2 キシラナーゼの製造には、酵素製造原料及び製造機器ともに従来の酵素製造に適用したものと同一ものを使用しているということです。

2ですが、製造原料はいずれも食品グレードであるか、食品衛生法及び JECFA の定める規格基準に合致した食品添加物を使用しているということです。

58ページ、第7の1、諸外国における認可状況ですが、デンマークにおきまして、2009年5月に食品への使用が承認されております。

フランスでは、セルフクローニングによって改変した *B. subtilis* の菌株によって産生されるヘミセルラーゼは、BS3.2 キシラナーゼを含めまして、フランスの酵素ポジティブリストに掲載されております。

オーストラリア、ニュージーランドですが、BS3.2 キシラナーゼを含めて、*B. subtilis* 由来のキシラナーゼは植物製造に使用する微生物由来の酵素として掲載されております。

2番、生産菌に由来する組換え DNA 断片が残存していないことの確認を、PCR にて確認しております。その結果が 61 ページにあります。3つの異なるロットを試料としまして、いずれのロットについても生産菌に由来する組換え DNA 断片は検出されなかったという結果でございます。

63ページ、3番ですが、CF307株の構築過程で導入した遺伝子の欠失変異は、セルフクローニングであること、また、一連の欠失型遺伝子についても、ORF サーチを行っていませんが、既知の毒性タンパク質やアレルゲンとの相同性を持つ非有効成分の生産を示唆する結果は得られていないこと、食品用酵素は食品 GMP 及び HACCP の要件を準拠し製造されていることなどから、65ページに行きますけれども、本製品の製造に由来する非有効成分の安全性は十分に担保できると考えられるということです。

4の精製方法ですが、67ページをお願いします。図の下、生産工程で精製された BS3.2

キシラナーゼの純度は●●●であったという結果でございます。

5番は記載のとおりでございます。

第8、以上第2～7までの検討により、BS3.2キシラナーゼの食品添加物としての安全性についての知見は得られていると考えているということでございます。

これ以降の説明は省略いたします。

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います。

少々長いので、ベクターに関する事項まで、申請書の5～23ページまでで、ございますでしょうか。また、本日申請者をお呼びしているということでもありますので、聞きたいことを整理しておいて後で聞くというのが合理的かと存じます。

このキシラナーゼについては、パンの膨らみぐあいの増強効果ということで、従来品でキシラナーゼの入っているパンがあったかどうかとか、キシラナーゼの申請としては、この書き方だと従来品がなくて初めてのようにも見えるのですけれども、それから従来のものに比べてどういう点がいいとかそのような記載が、もう一個のキシラナーゼのほうにはそれが書いてあったように思うのですけれども、これにはあったかなと思うのです。

〇〇〇 6ページの用途及び使用形態がございしますが、ここは従来の添加物の記載の箇所です。キシラナーゼはパンの製造に使用することができということがありますので、これまでもキシラナーゼは使われているものと思われま。

新たな組換えのキシラナーゼにつきましては、小麦などに含まれるTAXIの影響を受けにくいものになっているということです。

〇〇〇 そういうことなのでしょうね。

ここは余り重大な問題ではないですが、どうぞ。

〇〇〇 今、重大な問題ではないというお話でしたけれども、比較して、安全性を比べるというのが一応スタンスになっているので、そもそも添加物の基原を見ると *Bacillus* は入っていないので、そこは多分、添加物のほうで変えるのですね。

〇〇〇 一応、既存添加物として基原は収載されておまして、ここに糸状菌と放線菌ということで、おっしゃるとおり *Bacillus* は入っていないのですが、ここに示しているものは参考という位置づけがありまして、ここに入っていないからといってだめということではないものと理解しております。

〇〇〇 恐らく糸状菌は真核で放線菌が原核でという形になると思うのですけれども、従来の情報はどこまで手に入るかにもよるのですが、ある程度このくらい似ていますとか、もう一個のほうには多少書いてありますけれども、反応温度とか、このくらいに出てこのくらい違いますみたいな基本条項は、安全性とは直接リンクしませんけれども、一応、審査の基本が比較でやっていくということですので、一応載せておいていただいたほうが、スタイルは整うのかなと思います。

〇〇〇 やはり、何となく同じように考えた委員もいるようなので、そこがないので、最初から読んでいて少し違和感だったかなと思います。

それは従来の情報を集めて書き足していただければ済む話だと思いますので、これは来たときにまた聞いてみようと思います。

ほかにございますでしょうか。

それでは、第4、23～52ページの挿入DNA、遺伝子産物、発現ベクターの構築に関するところをございます。

ここでは早速気になったのが、このキシラナーゼはとても丈夫でして、人工胃液で1時間びくともしないし、人工胃液や人工腸液でもびくともしない。*Bacillus*はもともと物すごいプロテアーゼをつくるので、プロテアーゼに耐性がないとそもそも大量生産は難しいのですが、それにしてもこれはなかなか。これについて、〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 33ページの人工胃液と人工腸液のところなのですけれども、ちょうど今回、もう一つのキシラナーゼがあって、もう一つのほうは人工胃液で比較的早く落ちるということがあって、どこに違いがあるのかなと思ったのです。

人工胃液のほうの34ページの図でいくと、参照25に書かれているのですが、60分というところ、●●●ように見えるのです。ですので、人工胃液に全く感受性がないということではないかと思しますので、そのような書き方にしてもらったほうがいいのかと思ったのです。

●●●ように見えるのですけれども、下のウェスタンでやると残っているのです、60分では完全に消えていないのだというような書き方をしているので、そのような書き方で、60分でほぼ消化されるということがタンパク染色では示されるのですけれども、ただ、それが完全ではないという書き方にさせていただいたほうがいいのかと思いました。

〇〇〇 60分でもかすかに見えるから正直に書いたのではないかと思うのですけれども、確かに書き方の問題で、人工胃液では全く分解できないから、直ちにだめというわけではないかと思うのですが、この場合は確かに先生のおっしゃるようなものもいいかもしれない。

〇〇〇、どうお考えですか。

〇〇〇 〇〇〇と同じように、全く感受性がないわけではないですけれども一応まだ残っているというところで、書き方がかなり重要かなと思っております。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、どうお考えですか。よろしいですか。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 ほかに、この件に関しましていかがでしょうか。

〇〇〇、いいですか。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 次ですけれども、この遺伝子の組成で51ページに2つ書いてありまして、まず一

つは、大腸菌に由来する●●●が混在していると。それが混在していて、組み込まれてしまったことがわかったので、それについては安全性等の検討もしておるようなのですけれども、ではこの記述でよろしいか。このくらいの調べ方でよろしいかと。

これが組み込まれておったのであれば、どこから入ってきたのか、そもそも導入に使ったプラスミドにその配列が残っておったのが、それともこの中にあったのか、またその継ぎ目がどうなっていたのかとか、その辺について。

これがもしも例えば組換えの作物とかなんとかで、それを直接口にするようなものであればもっと徹底的に調べないといけないのですが、この場合はこの菌を使ってつくる酵素ですので、どこまで情報をいただければ、安全性としてはいいと判断できるか、その辺のところの御意見をいただきたいと思いますが、いかがでしょうか。

〇〇〇 次世代シーケンスで、大体のホールゲノムを決めて、これらのカセットがマルチコピーが入っている。およそ相対的に、相対的という言葉遣いなのですが、●●●とか書いてあるのです。ここのデータとして、ほかのゲノムの部分と比べてというのですけれども、カバレッジがどのくらいあって、●●●というのが本当に正確なのかというのは、どうにも検証できないのではないかと。

そこまで決めるのはどうなのかなと思うところもあるのですが、タンデムにカセットが入っている途中に、たまに1コピーだけ変なものが入っていると、そういうこともあり得るので、●●●のDNA断片、大腸菌から入っていると言っていますが、それ以外にもいろいろ入っている可能性もあるのではないかと思います。

あと、今日やるもう一件のほうとかは多分●●●入るような形をとっていたりとかするので、テクノロジーとしてそうやることができるにもかかわらず、こういうマルチコピー、●●●ぐらい入っています。でも、本当のところはわかりませんというのをいつまで続けていいのかというのは、僕は疑問に感じるころがあるという意見です。

〇〇〇 コピー数については、実はもう一個の問題として指摘するつもりで、本当に●●●もあるのか。

バクテリアであれば、少しでも生産性を上げるというのが普通なので、1コピー突っ込む技術は当然昔からあるのだけれども、少しでもコピー数を多く多くと、糸状菌とかでも大抵そうするので、彼らがこういう株を選んだというのは、そこはそこで理解できると思うのです。

これが●●●というのは本当かということについては、私も疑問に思ひまして、事務局のほうから尋ねていただきました。

ダニスコのほうから回答が来ておりますので、説明していただけますか。

〇〇〇 回答につきましては、このシーケンス手法につきましては現在実施可能な次世代シーケンサーを用いた配列解析方法として最善な方法の一つと考えているということです。

一方で、この方法ではコピー数の多い繰り返し配列の正確な構成までを完全に明らかにすることは困難であると認識しているということです。

このため、この申請では、それぞれのコンティグのコピー数と矛盾せず、かつ遺伝子発現カセット数の増幅と再配置が最も少ない回数となる繰り返し配列の合理的な構成を推定して、オープンリーディングフレームの解析を行ったということです。

〇〇〇 そういうことのように、●●●でありますのでまあまあかなとは思うのですけれども、その回答を私もいただいたのですが、コンティグのコピー数と矛盾せず、かつカセット数の増幅と再配置が最も少ない回数となると推定しというのは、どうやって推定したのかと。そう言われても、はっきり言って納得いかないなとも思うのですけれども、先生、今の回答で御納得いかれましたか。

〇〇〇 今、使える技術でということだったのですけれども、次世代シーケンス、片側は●●●かなんかの次世代で読んでいるということなのですが、今は結構第三世代シーケンスというものがあって、数百キロとか数十キロというレベルで1つのリードが読めるという技術があるので、これぐらいのマルチコピーだったら、実はもうある程度、シーケンスが決められるのではないかといいところもあるので、そういった技術への取り組みというのも考えてもいいのかなと。

〇〇〇 当人をお呼びしておりますので、それは直接質問していただけますか。私は、それでも難しいのではないかと実は思っているのです。多分、第三世代のそれを使っても、そんなに長いのは、読めはするけれども信頼できないというのが現状だと思うのです。しかもそれで何回も読めているのならばともかく1つだけだったら、それでも私は本当かと疑問だと思います。

でも、それは私がそう思うだけで、聞いてみてください。先生がそれで御納得いかれるかどうかという問題だと考えます。

よろしいですか。

〇〇〇 わかりました。

〇〇〇 〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 これは、最終的な導入遺伝子を入れるときに、導入遺伝子を●●●の増幅でやっています、私はこれをやったことがあるのですけれども、やってみると基本的にめちゃめちゃスメアになるのです。●●●なので、ちょっとでもコンタミするとたちまちそれも増幅されてくるので、●●●ので、本当にこれはあり得るなと思って見ていたのです。

なので、増幅したときに、本当にきれいなプラスミドで増幅をかけないと、ちょっとしたものをコンタミすると、それもすぐ増幅がかかってしまうので、それはスメアになっていきますので、きれいな増幅産物だけを取り出して入れるというのは多分できないような技術なのです。

しかも、●●●ので、延々と長くタンデムにつながったものも理論上でき得るのです。それもあって●●●みたいなものができてきたのかなということも思っています、こういう技術を使ったがためにこうなったということだとは理解しています。

そこについては、余り突っ込んでもしょうがないかなとは思っているところはあります。

〇〇〇 それから付随するのだけれども、この後の問題なのだけれども、●●●培養して、それで安定に生産されたとあるけれども、しかも *Bacillus* のこの株は●●●が入っていないので、組換えマイナスではないので、それをやったらまず間違いなく途中で組換えが起こって、コピー数が増えるのではないかと普通は思うのです。

それでも安定に生産できていて、商売になっているのであればいいのかなと思うのだけれども、ただ、それはそれで確認しているのかどうか、また調べているならばいるで、その辺の記述なりは要求したいと私は思っているのですが、後のほうまで行ってしまいますけれども、いかがですか。

この件に関しまして、〇〇〇いかがですか。

〇〇〇 まさしくおっしゃるとおりで、私もやったことがあって、これはちょっと制御できないですね。ですから、この方法でやった限りは仕方がないだろうなという気がするのと、私も安定性という意味で言ったときに、本当かというところはすごく感じるころはあります。

ただ、生産という意味で言った場合には、彼らはそれで言っているのでもいいのでしょうか、下手をすると生産量が落ちていく。要するに、そういう菌が1個でも培養している中に出てきたら、生存競争をしたら勝っていくので、それでどんどんバルクで見ると落ちていく。それは会社さんにとっては不幸なことなので、こちらの安全性の面では全然関係ないのだけれども、その辺はちょっと頭をひねるところはあります。

だけれども、安全性という意味でいくと、そこの部分はどうかと思うのです。関係ないかなという気はして読んでいました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、この辺はいかがですか。

〇〇〇 別のほうでもいいですか。人工腸液で360分やっても残っているのがありましたね。私は専門ではないからわからないけれども、360分というのはよくないのですか。60分ですか。360ではなかったですか。

〇〇〇 胃液で60分、腸液のほうは360分で残っていますね。たしか害虫抵抗性のCry1とか2とかは腸液では全く溶けないので、それ自体、直ちに問題というわけではないと思います。

〇〇〇 ですので、その辺は大丈夫だと思うのですが、後者のほうは、私はやはりわからないとしか言いようがなく、実は何と言っていいかわからなかったのです。

ただ、それでこれをやっているわけですね。だから安定なのかなと思ったのですけれども。

〇〇〇 大もとの菌株を凍結保存しておいて、後はつくるたびにそこからちょこちょこ小分けしてやっているのだと思うのです。●●●なんてやったものを使っていることは絶対にないと思います。

〇〇〇 普通、私でもそうすると思いますので、●●●、それをまた種に使うって次々になどということはやっていないだろうと思います。

〇〇〇、いかがですか。コピー数の問題と、大腸菌の遺伝子の混入の問題でも。

〇〇〇 ●●●が入っていることは技術的にはしようがないとしても、その後でアレルギー性とかを調べているのであれば、これはこれで問題ないのかなとは私は思います。

あと、34ページの人工胃液で長時間切れないというところのほうが気になっていて、こういう場合が今まであったのかどうか、あったときにどうしたのかはよく記憶がないのですけれども、せめて既知のエピトープにはなりませんぐらいの情報があったほうが安心するかなという気がするのです。

〇〇〇 この場合はたしかパンに使うものなので、パンで焼いてとかいう考察もありましたけれども、この辺はいかがですか。

〇〇〇 パンは普段焼いて食べますけれども、焼かなくてもというか、長時間焼かなくても食べますね。その辺は大丈夫なのか何か言ってくれるといいと思います。

〇〇〇 私もこの辺は確かにちょっと不安で、もう少し考察していただきたいなと思うのです。

その辺、〇〇〇あたり直接質問していただけますか。

〇〇〇 加熱で構造変化をすると活性が落ちることが書かれているのですけれども、加熱した後で人工胃液や人工腸液の実験をしていけば、より安心できるのです。そのあたりをやっていけばいいのですけれども。

〇〇〇 それはやっていないでしょうね。

申請者も来ておりますので、少しディスカッションして、納得のいく答えをいただけるかどうかということかなと。

それでは、申請書52～68ページ、組換え体に対する事項で、最後まで、また全体を通してございましたらお願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 ちょっと戻ってしまうというか蒸し返しになってしまうのですけれども、35ページの人工腸液のほうなのですが、ウェスタンと上のSDS-PAGEの染色パターンを見比べると、染色パターンでは●●●ようにも見えるのです。ただ、ウェスタンはかなり飽和の条件に近い形でやっているのだから、濃く見えるのはいいのですけれども、上と下で整合性がとれているのかなとは見えなくもないなと。

どうせ切れないと言っているのだから、そんなに言ってもしようがないのかなというところもあるのですけれども、よく見るとやや不思議なパターンだなとは見えなくもないなという感じがします。

〇〇〇 僕も、抗体がサチュっているのかなと実は思っていたのだけれども、確かに上のSDS-PAGEのバンドが●●●になっているのに、ウェスタンの結果はそれを直には反映していないようにも見えるし、でも●●●とすると、これは完全にサチュっていてこれ以上濃

くならないと考えれば、こういうこともあるかなと。直ちにだめというわけではないようにも思いますけれども、この辺はいかがでしょうか。これはよろしいですか。

大腸菌の●●●のところ、実はこれの●●●との継ジャンクションのところの配列の情報を得られていないようにも思うのですが、この点についてはいかがでしょうか。

要するに、これのところが一応の考察はしてあるのだけれども、その辺がいろいろと詰めが甘いように見えるのです。

先生方、この辺はいかがでしょうか。

〇〇〇 そういう意味で、●●●の配列がわかっているのでしたら、インバースPCRなりテールPCRなりで継ぎ目だけでもすぐには決められると思うので、そこのところは決めてもらうのもいいのではないかと思います。

〇〇〇 やはりそう思いますね。同感です。

〇〇〇 次世代でそういうのは出ていないのかな。

〇〇〇 なので、次世代の生データがあるのであればやり直さなくても、きちんと精査すればそのくらいのデータはあるはずと実は言いたいのです。

データを持っていないということではなくて、申請書のところにその辺のところをきちんと書いてくれているのかなと思います。その点については、申請者に来ていただいているので、直接質問して、その辺をちゃんと見ているのでしょうかから、データを出してよと言えばいいのかなとも思います。

これはそのように対応しようと思います。これでよろしいですか。

ほかに先生方、ございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 非常に細かい話というか、何か納得いかないなと思ったところが1つあって、34ページと35ページでいったときに、下のSDS-PAGEのときにすごく染まっているのです。これは何だろうと。67ページだときれいなのです。この差は何だろうということをするごく思っていて、結局汚いのか、それとも、熱に対するあれと言ったときに、彼らはこれを100℃で加熱処理していますね。SDS-PAGEをかけるときに、メルカプトエタノールとSDSを入れて、サンプルバッファの中で何の処理をしたかという問題で、ここの下のほうに見える。

すなわち、分解してしまったのか、それとも80℃くらいでやっているのかというかなり細かい話なのです。その辺がうんと思ってしまったところは何かという、〇〇〇がおっしゃっていたいわゆるウェスタンだけではエピトープが完全にぼろぼろになったかどうかというのはわからない。場合によってはフロントに流れますね。それでペプチドの格好で残っているということを考えると、ウェスタンよりもELISAのほうがいいでしょうということをおっしゃった御意見を覚えていて、そうだとすると、36ページのところでここはなぜウェスタンを出してこないのだろうと。これはELISAだけなのです。これはパンを焼いたわけではないですから、完全にモデル実験なのです。パンを焼いたから、ぐちゃぐち

やになっているから、いろいろなものが入っているからELISAをやりましたという話ではないはずなのです。

だから、後ろの36ページからの使用形態及び云々かんぬんで、すごいこじつけをディスプレイカッションして、100℃以上に上がりませんと。それは上がる時はパンが中まで真っ黒になっている状態だよねと思って、いわゆる生化学のマニュアルでいくと、タンパクによるのですけれども、温度はメルカプトでSDS-PAGEに乗つける前に、どういう加温処理をするか。タンパクとか人の好みによってやり方は違うのですけれども、その時点でばらばらになっているのではないか。このところを見ていてずっと妙な感じがしたので、そこはどうなのかなと。

すごく細かい話ですけれども、少なくとも34ページのところと精製能のところの写真が全然違うのはなぜだろうというのは教えてほしいなと思いました。

以上です。

〇〇〇 そう言われると気になるので、これは先生、直接聞いていただけますか。

それでは、ほかにございますか。

整理いたしますと、まず、一番最初、従来品との違いについてのお話。

それから、人工胃液、人工腸液のところ、人工胃液のところでは、〇〇〇のほうから質問していただけるといいのですけれども、書き方の問題を御指摘いただければと思います。

謎の大腸菌の●●●について、これのジャンクションのところのデータの問題。これをきっちり出していただきたいというところ。

●●●の定義、一応説明はいただいているのですがよくわからない説明でして、もう少し整理して、納得のいきやすい、わかりやすい記述でお願いしたいというところ。

それから、●●●というところ。

こんなところかと思いますが、後は申請者をお呼びしますので、その場で何かお気づきになりましたことがあれば御指摘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。準備ができますまで、少し休憩いたします。

(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。

簡単に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 ダニスコジャパンの〇〇〇と申します。

〇〇〇 同じくダニスコジャパンの〇〇〇と申します。

〇〇〇 それでは、幾つかお聞きしたいことがございます。

この遺伝子組換えについては、既存のものとの比較対照ということで、比較の上で安全

性の審査を行うというルールになっているのですけれども、従来品でどのようなものがあったとか、それに比べてどういう点が違うのか、どのような点が利点になっているのかといった記載がございませんので、もしかしたら初の事案なのか。初の事案でもこういう書き方をするよねという考えなのですが、この点についてはいかがでございましょうか。

〇〇〇 従来品ということで、今、当社が販売しているのはたしか *Trichoderma* 系の野生型の非組換え体のキシラナーゼを出しておりますので、比較ということであれば、菌株は *subtilis* 菌ではないのですけれども、そういった形の公定書に入っているものをお示しできるのではないかと考えております。

〇〇〇 *Bacillus* と *Trichoderma* では確かに大差なので、余り長々と書いても仕方がないかとも思いますけれども、既存品との比較をお願いいたします。

また、もし *Bacillus* であればなのですが、それはないのですか。

〇〇〇 私が知らないだけかもしれませんが、パンの担当の者と、海外のこういった申請をしている者に問い合わせ、なるべく入れられる情報を集めたいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

それから、この御申請のタンパク質はなかなか頑丈なようで、人工胃液、人工腸液について耐性度が高い。だからとって、直ちにだめというわけではないのですが、続いて、〇〇〇のほうからコメントいただけますか。

〇〇〇 33ページの中で、人工胃液、人工腸液ともに感受性がないという書き方なのですが、34ページの図を見ますと、上のほうの図で、●●●のBS3のタンパク質というのは、●●●いるように見えまして、実際に参考25の中でも、クマシーブリリアントブルー染色では●●●があるということが書かれている。だけれども、ウェスタンブロットで染色するとということで、34ページの下図になるのですけれども、●●●60分ではまだ残っている、完全には消失しないということが書かれていますので、これは人工胃液では、60分ではほぼ消化されることがタンパク染色では示されたけれども、ウェスタンブロットでは完全には消失しないことが確認されたという書き方のほうがよろしいかと思いました。

もう一つ、34ページの中で、図の上のほうなのですが、●●●間に少しバンドが見えるのですが、これについての説明がないのですけれども、どういうものなのかということの説明していただければと思いました。

あとは、38ページの3行目から、BS3.2キシラナーゼは人工胃液及び腸液に感受性を示さなかったものの、下記の理由からアレルギーの原因となる懸念は低いと考えられるというところで、なぜ安全なのかということの説明が少しわかりにくいので、もう少し丁寧な形の説明にしていいただければと思います。

この中には、既にアレルギーのあるタンパクとの相同性がないということも入れておかれることが必要かと思います。

もう一つ、これはまだやっていらっしゃらないかと思うのですけれども、加熱をした後でSGFとかSIF、人工胃液、人工腸液の試験をした経験があるかどうか。そのことをお尋

ねできればと思いました。

〇〇〇 前段のところの御説明で足りなかったところをぜひ足して、またごらんいただけるように修正したいと思います。

加熱後のものに関しては、今回以上のところまでは進めておりません。

〇〇〇 わかりました。

〇〇〇 よろしいですか。

こちらの真意は伝わったのでしょうか。多くは書き方の問題でもありまして、特に人工胃液、人工腸液は全く分解できないとなると多少問題にせざるを得ないのですけれども、人工胃液ならば、完全ではないけれどもおおむね分解しているといった形ということでございます。

35ページの図が出てきましたので、〇〇〇、その質問も一緒にお願ひできますか。

〇〇〇 34ページと35ページは製造原体でやったときに、今、〇〇〇もおっしゃったのですけれども、●●●バンドが出ていますね。

これに対して67ページも製造原体と書いてあるのですけれども、これは何もないのです。もし35ページのもの製品になっていくのだとすると、精製度が●●●とかはともいえないのではないかと思うのですけれども、何かCBBで染まるようなタンパク質なり何なりが●●●出ている。これに対して、67ページは何もないというのはどうしてなのですか。

〇〇〇 工程の中で精製が何段階かあるので、その部分の確認をして、先生がおっしゃってくださった点とあわせて確認します。

〇〇〇 67ページのほうにも製造原体のサンプルを流したと書いてあるのです。だから、同じところから見ているはずで、そうすると、これは全く写真とは合わないという形になってしまいますね。

〇〇〇 ●●●のところを、製造用原体という今、使っている用語をきちんと区別できていなかったかと思しますので、そこを確認して、回答の中に御説明を入れたいと思います。

〇〇〇 もう一点が、36ページの表5の加熱処理のものなのですけれども、加熱処理のものはモデル実験ですね。すなわち、バッファなり何なり溶かした格好で100℃の処理といったときに、2分であつという間にELISA反応性がなくなる、すなわちぼろぼろになるということなので、実はその前の写真のところ、●●●と出ているというのは、よくSDS-PAGEをやるときに、メルカプトエタノールとSDSを入れて、サンプルバッファの中で加温するのです。その影響でこうなっているのです、ひょっとすると34、35の電気泳動の仕方と、図26の出し方が違うのかというのが第1点です。

逆に言うと、モデル実験なのだから、何で加熱のときにSDS-PAGEをしなかったのだろう。胃液、腸液はそうですね。

〇〇〇 これは従前のやり方でやっていて、その部分はなぜというところを考えたことがなかったものですから、処理の仕方は私どものほう、日本サイドでは変えていないのではないかと考えていましたものですから、今、先生が御指摘のところは、もう一度、手技

上のところを確認してみます。

〇〇〇 非常に細かい話なのですが、いわゆるSDS-PAGEのときに流す前の加温処理は多くの場合はやるので、そうすると、その段階でもうぼろぼろになっているかと思ってしまったので、済みませんけれども確認してください。

〇〇〇 ありがとうございます。

私どもは日本サイドで実験をするところがないものですから、少しお時間をいただいて確認しつつ、回答の中に盛り込みたいと思います。

〇〇〇 よろしいですか。

ちょっと簡単に。18ページの組換え体と宿主で、この宿主をいろいろいじっているところ、下から2行目で、●●●ならばわかりやすいのですが、●●●というのは、そのとおりのことであればいいのですが、これはそういうことですか。

〇〇〇 英訳のミスかもしれないので、もう一度原典のほうを見て、アメリカやヨーロッパのほうの者が書いた英訳のリスクアセスメントの書面から起こしていますので、私どものミスの可能性もありますので、もう一度確認いたします。

〇〇〇 本当に●●●であれば、それ自体が問題というわけではないので、御確認いただければそこは結構です。

〇〇〇 了解いたしました。

〇〇〇 それよりも、51ページ、大腸菌由来の塩基配列が●●●入っていたのが判明した。結構慌てただろうとは思いますが、この●●●というのは、この実験に使ったプラスミドに含まれている配列ではないでしょうかということですか。

〇〇〇 全く別の由来の配列だと聞いております。

〇〇〇 ということは、枯草菌を使って形質転換するときに、なぜかそれも一緒に入ってしまったということであろうと考えられるわけですね。

〇〇〇 はい。御指摘のとおりでして、恐らくベクターの構築の過程でどこからか入り込んでしまったものと考えております。

〇〇〇 この●●●の領域は、増幅されている領域で、1コピーではなくて複数コピーある領域ですか。

〇〇〇 そのとおりです。

〇〇〇 このページの絵を見ると、●●●ぐらいあると考えていいのですか。

〇〇〇 そのとおりです。

〇〇〇 そうなると、この●●●と、つまりこの菌に挿入されている領域のジャクシヨンのところが、●●●と枯草菌、本来入っているべき領域と、なぜか入ってしまった大腸菌の領域との継ぎ目がどうなっていて、継ぎ目のところで余計なオープンリーディングフレームが発生しているかどうか。これがアレルゲンとかそうなっているのかどうか。そういう情報が重要になるのですが、少なくともわかりやすくは書いていなかったのですが、その辺はいかがでしょうか。

〇〇〇 解析は実際にはしておりまして、参照20の24ページをごらんいただきますと、推測ですけれども、実際には挿入配列の構成に従って。

〇〇〇 済みません。先ほど追加で配りましたiPadに1つだけファイルが入っております。そちらが今回の参照20に該当しまして、その24ページということです。

〇〇〇 なるほど。ここでちゃんと見ていて、アレルゲン検索等もちゃんとやっておると。

〇〇〇 記載は適切に修正させていただきたいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。そこがだめだったらこれは全然だめなので、それを聞いて安心しました。まさか次世代をやっているからそこはと思ったのですが、次世代でもタンデムリピートのコピー数というのはなかなか決めづらいもので、●●●で、それについて一応の御回答はいただいたのですが、はっきり言ってよくわからないのです。

●●●と算出した根拠について、もうちょっとわかりやすく御説明いただけますか。というか、●●●は本当にそのとおりに同コピーずつ入っていくものかというところが気になって質問させていただいているのです。

〇〇〇 実際には●●●で増幅されたとおりに入っていなかったというのが私どもの理解です。

要旨の49ページ、図17に、左側に●●●と四角のボックスで書いておりますけれども、●●●で増幅したと思っている導入DNA断片が部分部分で●●●になっていたというのが解析からわかったことです。

その次の50ページが解析の生データですけれども、このように各場所で●●●を示しておりまして、こちらのデータをうまく説明するようなモデルとして、またその次のページの51ページで●●●という、少し変則的な形でゲノムに挿入されているものと推測しております。

〇〇〇 その辺が実際のところ結構複雑な形で入っていて、●●●のところだけのものと、●●●の中身が入っているものと、そうでないものが●●●の結果、●●●で入っているという感じなのだろうと思うのですが、そのような感じの理解でいいのですか。

図17も一生懸命わかりやすく図解してくださっているとは思いますが、それでもよくわからないので、できれば図17を使って、例えば●●●というのは水色、水色で、●●●はそういう意味ですか。ここの領域が●●●ことができたわけで、これは隣の図18で推定しているわけですか。

〇〇〇 はい。18から推測した結果です。こちらが次世代シーケンサーを用いてリードを数えたコピー数の推測です。

〇〇〇 ●●●というのは実際の●●●領域で、図18だとたしか●●●、そのようなものかと。

だけれども、このコピー数は、図19のところだと●●●と書いてあって、そこでわからなくなっているのです。直接数えて●●●あったと数えているのか、それとも、●●●と算出しているのか、どちらなのかと聞いていたら、回答いただいたら最適な方法でどうこ

うとか言われて、それで余計わからなくなっているのですが、実際のところどのような感じなのでしょうか。

〇〇〇 適切に修正したいと思います。

実際には、順序としましては先に図18のデータを得ておまして、ここから推測をして、次に図19を想定すると、先ほどの図18をうまく説明できるだろうと考えたという順番です。

〇〇〇 しょっぱな出てくるのは、当然図18のデータが出てくるので、そのところかと思うのですが、そういう場合は、今度は●●●の継ぎ目のところの配列が明らかになっているかどうか。

それから、ここに由来不明の大腸菌の遺伝子の配列が入っていて、その継ぎ目がどうなっているのかというあたりが問題になるのですが、大腸菌については先ほどiPadでいただいたデータのところで、そこは明らかになっておるということでよろしいわけですか。

〇〇〇 そのとおりです。

〇〇〇 そうであれば、書き方の問題だろうと思いますので、もともと複雑なものをちゃんと説明するのはなかなか大変だろうとは思いますが、よく読めばわかるように説明していただければと思います。

先生方、ほかによろしいでしょうか。

それから、もう一つ。52ページに、今度はこの株を●●●キシラナーゼ産生能があったとあるのですが、●●●でこのコピー数等々がちゃんと保たれておるとか、そういったことは確認されておるのでしょうか。

〇〇〇 恐らく確認をしていないと思います。そういった質問をしていないので今のような答えになるのですけれども、いろいろなパラメーターというのは、例えば、●●●でやっています。そこに●●●しているようです。

それで大体増殖して行って、出てきたものがサチュってきたところでとめていて、それで終わりとしていると思います。その後、その菌が●●●新たに、例えば次世代シーケンサーで見たりというところまでは恐らくしていないのではないかと思います。

〇〇〇 この枯草菌は組換えの●●●が入っていないので、●●●でこれだけ多コピーで入っているものを培養したら、まあ無事で済んでいないだろうと普通に考えるとそう思うのです。だからといって即座に問題になるわけではないのですが、もしある程度調べておられるのならば、こういう●●●培養で、このキシラナーゼの生産性が●●●変わっていくといったゲノムの変化が推測されるようなデータを得られているのかどうか、その辺がもしあったらお願いしたいと思います。

〇〇〇 問い合わせいたします。

〇〇〇 私のほうから聞きたいことは大体いいと思うのですが、ほかにも先生方、せっかく申請者に来ていただいているので。

どうぞ。

〇〇〇 今までの問題に比べると極めてマイナーなのですが、これを読んでいくと

きに、先ほど〇〇〇から御指摘いただいた点と共通することなのですが、例えば人工胃液とか人工腸液のところはBS3.2キシラナーゼと書いてあったり、58ページはBS3.2キシラナーゼ酵素製剤配合例とか、64ページ、65ページは●●●というふうに書いてあって、いろいろな分析の数字が書いてあるのですけれども、それはどこの段階を測定したかという表記を全体に統一して資料を作成していただきたい。今回はともかくとして、少なくとも次回からはその辺をつくっていただかないと、私たちは読むときにそれをあっちに行ったりこっちに行ったり、添付資料をまた読み解きながらやる必要があるので、ぜひともその辺を統一して書いていただきたいと思います。

例えば、「社内規格を設定している」と書いてありますが、一体どこの規格なのかというのは、これだけ読むとよくわからないのです。

よろしくをお願いします。

〇〇〇 申しわけございませんでした。

要旨の5ページにある生産工程の図1のところで、それと参照できるような形で今後改善していきたいと思います。

培養してきたものをろ過をかけて、先ほど御質問にもありましたけれども、何段階かのろ過もありますし、その後、そこから出てきたものを今度新たに製剤化する、賦形剤に入れたり、パンの場合ですと液体のまま使うわけにいきませんので、●●●使っていたりします。お客様に出すので、そこでの規格があったり、まさに先生がおっしゃったとおり、そういった複雑な工程を我々はわかってしまっているつもりになって書いておりましたので、今後反省して、読みやすくするようなところに持っていきたいと思います。

御指摘をありがとうございます。

〇〇〇 今回のものは、私自身は解読はそれなりについたのですけれども、結構頭の整理をしながらということになりますので、特に純度の問題や酵素活性の問題とかを考えていくときの数値を考えていたり、先ほどの電気泳動の図などを読み解くときに、どこの部分でとかいうことは非常に大切だと思いますので、よろしくをお願いします。

〇〇〇 御指摘ありがとうございます。

〇〇〇 ほかに先生方、よろしいでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 情報をいろいろ調べて、出していただけるということであれば、最終的な導入遺伝子を入れたのが、●●●という株が出てくるのですけれども、その●●●の前に●●●というのが出てくるのです。これは、私は全然意味がわからなくて、あと●●●がどういう株かは、どこかに書いてあるのかもしれないのですけれども探し切れなくて、どういう株かよくわからなかったので、情報を出していただけるということであればそこら辺も整理して書いていただけるとありがたいと思います。

〇〇〇 ●●●というものが途中で唐突に出てきてしまって読みにくかったと思うのですけれども、目的として、●●●の菌株に入れていくという●●●をしておりました。

ページにしまして、要旨の47ページになります。最終的に47ページの下から2番目の四角、工程14にありますAK2258というものが最終的なキシラナーゼ遺伝子の受け手となった菌です。

〇〇〇 少し整理をして、そこを書けるように。

〇〇〇 余り安全性とは関係ないのですけれども、●●●、その段階で●●●になったのかという疑問も持ったのですけれども、それはいいとして、それからゲノムDNAをとってきてと書いてあるのです。ですから、その株がどういう株かというのがわからないと、そのゲノムには一体何が入っているのですかということをやちょっと思って、それを探したのですけれども見つけ切れなくて、どこかにあるのかもしれないのですけれども、それはもうちょっとわかりやすく書いていただけるとありがたいです。

〇〇〇 出所を探して、もう少し補足して説明を厚くしようと思います。

あと、恐らく最終的に●●●いくところでもコピー数は増えたのではないかと考えております。

〇〇〇 ●●●をやっているのですね。

〇〇〇 ただ、ここで説明しましたように、もともとあった抗生物質耐性遺伝子のものなので、新たに持ち込んだわけではございません。

〇〇〇 最終的にもとのBG125株、それから最終的にこの形質転換に用いた直接の宿主になった株はわかりやすく書いていただければ。

あとはこの47ページ、その前にあるこの工程のところで、非常に細かく書いていただいたので、おかげでこのややこしい株をどうやってつくったのかよくわかる。そこはよかったのですけれども、本当に必要なのはオーソライズされていて一番もとになった株と、この株について、●●●で形質転換する直前の宿主、その2つが重要ですので、そこをわかりやすく書いていただけるとありがたかったということです。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 ほかは先生方、よろしいでしょうか。

お疲れさまでした。ありがとうございました。

(説明者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻ります。

ただいまのこの回答を踏まえた上で、御意見、コメント等はございますでしょうか。

安全性については特に直接問題になるような指摘はないと思うのですが、どうしたものかなど。

〇〇〇 修正箇所が多いので。

〇〇〇 修正の数が多く、これを修正してもらえば、チェックをしてすぐに通せると思うので。

〇〇〇 はい。すぐ通せると思います。

〇〇〇 しかも彼らは基本的には書き方の問題なので、大変ではないと思うので、今日の

ところは、修正していただいて、それをまた改めて見させていただくということにしたい
と思います。今日の指摘で直接本当に安全性に寄与するものはなかったようにも思うので
すけれども、さすがに書き方の問題はありますので。

先生、どうぞ。

〇〇〇 今回の例で、人工胃液と人工腸液とパンをつくるときの温度との関係、温度での
分解、そのバランスでその点はオーケーだよねということと言うと、今日の人工腸液だ
とほとんど分解しない。温度の加熱は、100℃ぐらいはパンを焼くときにいくから、そこ
でほぼ分解している。ただ、人工胃液は60分ぐらい、40～50分の時間を要すとデータ上は
そうなっていますが、大体そんなもので、このあたりのデータはいいかなということなの
かな、どうなのかなということが、人から問われたときに私もどう説明したらいいものか
と思うのですけれども、いかがでしょうか。

〇〇〇 だから、加熱した後に、加熱して変性すると胃液で分解しやすくなるとか、そう
いうこともとても考えられるので、そういうデータを持っていないかと〇〇〇が食い下が
っておられたのは多分そういうことでしょう。

〇〇〇 回答は持っていないという回答ですよ。

〇〇〇 そう言われてしまったので。普通に考えればこの温度で大体失活もして変性
もして多分胃液で溶けるようにもなっていて、しかもヨーロッパでは、既にデンマー
クとフランスで認可されているという状況なので、直ちにそれで問題ではないかなとは思
っているのです。だから、本当はそのデータが欲しいところではあるのですよね。ただ、
1時間あればほぼ溶けるということ。

〇〇〇 厳密に言うと、この手の糖の加水分解酵素は、基質があるときはぐっと丸くなっ
て熱耐性が上がるので、本当はこんな温度ではすつとなくならないだろうと僕自身は思っ
ているのですけれども、ただ、SDS-PAGEの結果を見ると、胃液で分解しないと彼らは書
きましたけれども、●●●ように見えるので、添加量の問題も考えると、総合的にはいい
のかなと。ただ、そこら辺の配慮、わかるように書いていただくことが重要かなとはちょ
っと思いますけれども。

〇〇〇 わかりました。

〇〇〇 よろしいですか。

では、この件についてはそういうことで、多分いろいろ頑張って修正していただいた申
請書がまた上がってくると思いますので、そこで修正箇所を改めてチェックをさせていた
だこうと思います。

それでは、もう一件のキシラナーゼの新規品目、「JPBL006株を利用して生産されたキ
シラナーゼ」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、説明させていただきます。

続きまして、水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。

まず、第1の項目でございます。名称はキシラナーゼ。反応特異性は、キシラン中の1,4-β-D結合を特異的に切断し、(1→4)-β-D-オリゴキシランを生ずる反応を触媒するものでございます。

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

(3) 用途及び使用形態ですが、キシラナーゼは代表的な製パン用酵素の一つであり、パンの品質を向上するための改良剤として用いられております。一般的に、パン生地原料である小麦粉にはアラビノキシランが数%含まれており、小麦粉中のペントサンは微量ではありますが、吸水性及び水分保持力が高いため、水分を吸収すると粘性物質となり、パンの品質に影響する成分でございます。パンの製造工程では、キシラナーゼをパン生地に添加し、ペントサンを分解することによって、パン生地のやわらかさ及びパンの膨張性などを改善することができ、また、焼成後のパンの色または食感がよくなるとも言われております。

続いて、隣のページ、(4) 摂取量でございます。xyn264が全てのパン類・菓子パン類の製造に用いられ、かつ、100%残存すると仮定して、我が国におけるヒト体重1kg当たり1日最大摂取量の計算を行った結果、1.7 μgTOS/日/kg体重と算出してしております。

続いて、第1-2の項目でございます。

(1) 宿主の由来等でございますが、*B. licheniformis* Ca63株でございます。

(2) 挿入DNAの供与体について、これは次の4ページをお願いいたします。表1に記載されているとおりでございますが、xyn264遺伝子は、*Bacillus* sp KK-1株由来、prsA遺伝子は、*B. licheniformis* Ca63株由来でございます。そのほかに、プロモーター、ターミネーター、転写調節配列等についても、性質とあわせて記載しております。

続いて、5ページに行きまして、(3) 挿入DNAの性質でございます。こちらは、図1に示しておりますが、●●●遺伝子座に対してxyn264遺伝子発現カセットを挿入し、また、●●●遺伝子座に対してprsA遺伝子発現カセットを挿入しております。その際には、●●●遺伝子を欠失してありまして、また、それ以外にも欠失導入用ベクターによりさらに●●●遺伝子を欠失させております。

続いて、6ページをお願いいたします。図2にあるとおりですけれども、今回用いた2つの遺伝子発現カセットの模式図を示しております。

続いて、7ページです。まず、①DNA置換によって起こるDNA欠失ですが、それぞれの挿入領域でDNA置換が起こり、●●●遺伝子座以外の●●●遺伝子が欠失しております。なお、●●●遺伝子座では、●●●遺伝子座と●●●遺伝子座の中間に位置する非コード領域にDNAが挿入されたため、遺伝子の欠失は起こっておりません。続いて、②では、●●●遺伝子の機能を欠失導入用ベクターを用いて欠失させております。これは、表3に記載したとおりでございます。

続いて、8ページをお願いいたします。(1) DNAの挿入方法です。まず、1) ●●●遺伝子座におけるDNA挿入では、●●●遺伝子座にP3プロモーター配列と*cryIIIA* mRNA安定化配列を挿入した後に、遺伝子導入用ベクターpJPV020を構築し、宿主に導入、さらに*cryIIIA* mRNA安定化配列と●●●遺伝子断片配列を介した相同組換えにより、*prsA*遺伝子及び*aprH*ターミネーターを●●●遺伝子座に挿入しております。続いて、2) ●●●遺伝子座におけるDNA挿入ですが、●●●遺伝子座にマーカー遺伝子を挿入後、遺伝子導入用ベクターに組み込まれたインテグラーゼによって挿入遺伝子等を宿主の染色体に導入し、生産菌としております。概要については、隣の9ページの図3にあるとおりでございます。

続いて、11ページをお願いいたします。(2) DNAの欠失方法です。まず、3) ですが、目的遺伝子発現カセットを●●●遺伝子座に挿入する際、発現カセットの挿入より遺伝子座の●●●遺伝子が欠失しております。

続いて、4) では、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより●●●遺伝子を欠失しており、これらは全てセルフクロニングに該当いたします。

続いて、12ページをお願いいたします。第1-3、利用経験、食経験等に関する事項ですが、*B. licheniformis*は自然界に広く分布しており、動物や人間の食べ物の中にも存在しており、同種は長年にわたって食品や食品用酵素の製造に安全に使われてきた経験がございます。

1-4、宿主の構成成分です。*B. licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質等を生産するという報告はございません。また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程のバイオセーフティーレベル (BSL) 2及び3には分類されておらず、病原体等もリスク群分類の1に分類されております。

続いて、1-5、組換え添加物の性質等についてでございます。

(1) は、記載のとおりです。

(2) 製造方法の詳細は、恐らくとじているページが逆になっているかと思うのですが、13ページにあるとおりでございますけれども、培養液はろ過等の複数の工程を経て製品化されますが、生産菌は除菌ろ過により生産物から分離除去されます。

続いて、(3) 用途等ですが、これは既存のものとは変わりはありません。

(4) 有効成分と比較ですけれども、既存のキシラナーゼには、*Bacillus* sp. KK-1株由来のものはございません。また、*xyn264*は既存のキシラナーゼと同様に、食品中のペントサンを分解する酵素でございます。

続いて、14ページ、従来の添加物との相違点ですけれども、まず、(1) です。本品目の販売実績でございますが、海外で6年です。既存のものは、日本を含め、世界各国で30年以上あるということでございます。そのほか、性質として、至適pHや温度、反応特異性については、記載のとおりでございます。

続いて、15ページをお願いいたします。

(2) 組換え体と宿主の相違点ですが、JPBL006株では、*xyn264*遺伝子が●●●、*prsA*

遺伝子が●●●となっております。

続いて、16ページをお願いいたします。

第2の項目です。

2-1ですけれども、これまでノボザイムズ社においては、 α -アミラーゼの生産菌として使用されてきた実績があるということでございます。

2-2から2-4については、記載のとおりです。

続いて、2-5ですけれども、*B. licheniformis*の近縁種は、*Bacillus subtilis*、*Bacillus pumilus*、これらは*B. licheniformis*と同様、非病原性かつ非毒素産生性とみなされており、毒性物質を産生することが知られている*Bacillus cereus*などとは明確に区別されるとしております。

続いて、第3ですけれども、遺伝子導入用ベクターの構築には、*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドpE194が用いられております。

3-2については、記載のとおりです。

続いて、19ページをお願いいたします。

第4の項目、挿入DNA等に関してです。

まず、1-(2)、安全性に関する事項でございます。*Bacillus sp.* KK-1株ですけれども、これは土壌から単離された好熱性細菌であり、熱安定性が高いキシラナーゼを産生します。xyn264のアミノ酸配列は、*B. licheniformis*由来のキシラナーゼと98.5%の相同性を示すことから、*Bacillus sp.* KK-1株は、種としては*B. licheniformis*に属している可能性が示唆されました。

続いて、*B. licheniformis* Ca63株は記載のとおりです。

続いて、*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7株ですけれども、これは自然界に広く分布し、食品中にも存在している微生物でございます。長年にわたりノボザイムズ社の食品用酵素の生産菌として用いられてきた実績がございます。

続いて、*B. thuringiensis subsp. tenebrionis* DSM 5525株です。*B. thuringiensis*は、一般に昆虫に対して殺虫効果を示す結晶性のタンパク質を産生する微生物でございますが、このタンパク質がヒトに有害であるということは知られておりません。また、結晶性タンパク質は人体や環境に安全な微生物殺虫剤として広く使用されております。食品用酵素の生産菌として用いられたことはありませんが、この株由来の*cryIII A*プロモーター、*cryIII A* mRNA安定化配列は食品用または工業用を問わず、遺伝子組換え技術を用いて酵素の生産菌を構築する際に長年ノボザイムズ社で用いられているものでございます。

続いて、*Bacillus clausii* PP159株です。*B. clausii*は、EFSAが提供する安全性適格推定ステータスに認定されており、安全面に懸念がないとされております。食品用酵素の生産菌として用いられたことはないということですが、この株由来の*aprH*ターミネーターは食品用または工業用問わず、遺伝子組換え技術を用いて酵素の生産菌を構築する際に長年用いられているということです。

最後に、Lactococcal bacteriophage TP901-1株です。こちらは、乳酸菌に溶原することが知られており、乳酸菌とともに食経験がございます。

続いて、2-(1) 挿入遺伝子のクローニング、合成方法等です。*xyn264*遺伝子は、*Bacillus* sp. KK-1株が有するキシラナーゼの遺伝子配列をもとに合成されております。発現を高めるために、野生型キシラナーゼのアミノ酸配列と比較して、N末端から●●●番目に●●●が付加されております。なお、*B. clausii*由来の*aprH*遺伝子の分泌シグナル配列が付加されております。

*prsA*遺伝子は、Ca63株の染色体よりPCRによって増幅することで得ております。

(2) は、記載のとおりです。

続いて、21ページをお願いいたします。挿入遺伝子の機能に関する事項の説明です。

*xyn264*遺伝子からコードされる*xyn264*はキシラナーゼに分類される酵素です。キシラン中の1,4- β -D結合を特異的に切断し、結合数に多様性のある(1 \rightarrow 4)- β -D-オリゴキシランを生ずる反応を触媒します。アミノ酸配列は、図7に示してあるとおりでして、*xyn264*のアミノ酸配列は*B. licheniformis*由来のキシラナーゼと●●●の相同性を示します。

続いて、22ページをお願いいたします。1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、供与体である*Bacillus* sp. KK-1株について、アレルギー誘発性を示唆する報告はございません。

続いて、2) 遺伝子産物である*xyn264*を有効成分とする酵素製品について、アレルギー誘発性を示唆する報告はないということでございます。

続いて、物理化学的処理でございます。

まず、人工胃液でございますが、SDS-PAGE、ウェスタンブロット分析で分析した結果、人工胃液処理後30秒以内に完全に消化されることが示されたとしております。

23ページが、人工腸液です。SDS-PAGE、ウェスタンブロットで分析した結果、6時間の処理ではほとんど消化されることが示されたということです。

24ページをお願いします。

加熱処理に対する感受性です。pH6、30分の条件で調べた結果、70℃付近で完全に失活することが示されたとしております。*xyn264*製品の使用が想定されるパンの製造では、焼成工程があるため、その工程で失活すると考えられるとしております。

続いて、4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンの構造相同性ですが、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。その下、①80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索、②連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索という2つの条件で相同性検索を行った結果、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、*prsA*遺伝子です。安全性ですが、PrsAタンパク質のアレルギー誘発性及び毒性について示唆する報告はなく、既知のアレルゲンと相同性検索を行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは検出されなかったということでございます。また、PrsAタンパク質

は培地中から検出されないという報告があり、これはPrsAタンパク質が菌体外に排出されないことを強く示唆しております。したがって、このタンパク質がxyn264製品に含まれる可能性はないということでございます。なお、このタンパク質は既に安全性の審査の手続を経た旨が公表されている α -アミラーゼにも導入されております。

続いて、4-3、4-4、4-5-（1）までは記載のとおりでございます。

少し飛びまして、30ページをお願いいたします。

目的外のORFの有無について、発現ベクター、pJPV020、pJPV021について、宿主に導入される領域はそれぞれ明らかであり、挿入遺伝子座のシーケンス解析により確認されております。そのため、これらの全配列を対象としたORF解析は実施していないということです。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で説明いたします。

（3）、（4）については、記載のとおりです。

続いて、31ページ、第4-6、●●●遺伝子座へのDNAの導入方法です。

まず、●●●遺伝子座におけるDNAの挿入ですけれども、*prsA*遺伝子発現カセットを挿入しております。続いて、●●●遺伝子座へのDNAの挿入です。●●●遺伝子座については、同様の方法ですので、説明は省略させていただきます。

続いて、4-7でございます。抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性でございますが、遺伝子導入用ベクターpJPV020、pJPV021は、エリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主の染色体には導入されておられません。

続いて、34ページ、第5の項目でございます。

5-1は、記載のとおりです。

5-2-（1）でございますけれども、シーケンス解析について記載されております。同じページの35行目に飛びますけれども、各サンプルについて最低50の冗長度を担保するために、200～400万のリードが生成された。平均リード長は100bp以上であったということでございます。

続いて、少し飛びまして、38ページをお願いいたします。5-2-（2）、ORFの有無について記載しております。6通りの読み枠で終止コドンから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いました結果、●●●のORFが検出されました。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、次のページ以降で、既知のアレルゲンや毒性タンパク質との同一性検索を行っております。

まず、39ページが既知アレルゲンとの同一性検索です。①、②の2つの条件で検索を行った結果、アレルゲンは検出されない結果となりました。

続いて、40ページをお願いいたします。毒性タンパク質との同一性検索です。E-value<0.02を指標にして検索を行いました結果、重複を除きますと3つのORFがデータベース上のタンパク質と同一性を示す結果となりました。その結果をまとめたものが表11にあるとおりでして、ORF 1、ORF 2、ORF 3と記載されております。ORF 1では3つ、

ORF 2では5つ、ORF 3では13のタンパク質との相同性を示しております。その下からが考察になっておりまして、いずれのタンパク質についても、少し飛びまして、結論になるのですけれども、43ページになりますけれども、まず、毒性タンパク質との相同性の考察ですけれども、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、結論は下3行です。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、xyn264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が低いと考えられるとしております。

続いて、第6の項目です。こちらは記載のとおりでございます。

続いて、第7ですけれども、まず、7-1、諸外国における認可等の状況ですけれども、xyn264を有効成分とする酵素製品は欧米等で2016年に販売が開始され、従来のキシラナーゼと同様、パンの品質を向上する目的で使用されております。カナダ、フランスではポジティブリストに掲載されております。米国では、GRASのリストに掲載されているということです。

続いて、7-2、組換え体の残存に関する事項でございます。ドットブロット解析を行っておりまして、結論ですけれども、xyn264製品には、JPBL006株由来のDNAが残存していないことが確認されております。

続いて、7-3、非有効成分の安全性についての記載でございます。試験バッチの分析の結果でございますけれども、あわせて表12に我が国の食品添加物等の規格基準を示しております。いずれの項目についても、我が国の規格基準を満たす結果となっております。

続いて、第7-4、48ページをお願いいたします。5行目からになりますけれども、xyn264製品中におけるタンパク質の純度はSDS-PAGE分類に引き続く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、第8については、記載のとおりでございます。

説明は以上です。

○○○ ありがとうございます。

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

今日は、たまたま両方ともパンに入れる *Bacillus* のキシラナーゼでして、だから、事務局も気がついたみたいなのだけれども、先ほどのCF307株だとこの推定摂取量が0.30mg、300 μ gTOS/日で、こっちのものだと93 μ gTOS/日になっていて、えらく違う。どうしてかなと思ったら、こちらは菓子パンが入っていないのね。そこが違う。それでそんなに違うものなのかと、そここのところに感心していたくらいなのですけれども、先生方、とりあえず18ページまで、ベクターに関するところまででございますでしょうか。

どうぞ。

○○○ このキシラナーゼのDNAの供与体が *Bacillus* sp. KK-1株で同定されていないのですけれども、*B. licheniformis*に近いのではないかという話だったので、キシラナーゼで比較してそう言っているのは、根拠としてはやや不適切かと思っておりますので、16S

rRNA配列とか、そのくらいは調べられると思います。どこかに情報があるのかもしれないのですけれども、それに基づいて宿主はこれに近いと言ってもらわないと、微生物学的にはいかなものかという感じがいたします。

〇〇〇 そうですね。実にいろいろな菌がこの*Bacillus*になっていて、一時は分類の捨て場と言われていたくらいで、だから、今はそこから*Geobacillus*とか、*B. stearothermophilus*にいろいろ分かれているという状況もございますので、*B. licheniformis*に近いと言うなら言うで、確かにもう少し根拠が欲しいなどは思いますし、コロニーの形態とかは結構特徴があって、*B. licheniformis*は割とほぼ一目でわかるのです。そんなことがあるので、そういうものがそっくりだったからと言ってもらえれば、私なら納得するかなというところもあるのですけれども、だからといって、sp. KK-1株になっている理由は多分特許法の問題があって、特許は属名が確定すれば成立しますので、あとは種名まで決めることは求められていなくて、KKの何株とか、そういう形で株が特定できていればそれで特許は成立するので、恐らくそういうことなのかなと思います。

多分彼らとしてももうちょっときちんと調べていて、多分これはあるのだと思いますので、彼らと呼ぶかどうかはまだわかりませんが、できればもう少しその辺を、*B. licheniformis*に近いなら近いで、根拠があるならもう少しつけ加えていただくように、コロニーの形態とか、観察上の事項でもよろしいので、そういうふうをお願いしていただければと思います。

ほか、先生方、ございますでしょうか。

挿入DNA遺伝子産物発現ベクターに関して、この33ページまで、また、戻っていただいても結構なので、いただければと思います。

どうぞ。

〇〇〇 これもささいなことかもしれないのですけれども、3ページの摂取量の数値の計算は非常に大きく見積もっているし、遺伝子組換えのものの場合、この摂取量が非常にクリティカルに後々重要になることも少ないのですけれども、この後、当該申請者からはキシラナーゼが多分近々に似たようなものが2つ来ると思うのですよね。この辺の数字が、去年、当該申請者のキシラナーゼを、私がちょうど食品安全委員会に来たころに1つ審議したと思うのですけれども、その摂取量の数字と結構違っていたりして、今回、お願いという形で、その辺が後で全然違う数値が出てきたりしないように注意してくださいとは言っておこうかなと思います。妥当な数字を出してくださいと。

ただ、これは多目に見積もって、ほぼ100%残るという数字だと思うので、現実には、胃で分解される、腸では分解されないけれども、加熱すると分解するというので、こんな量はまず摂取していないのですけれども、いずれにしても、ノボの数字はノボの数字として統一した数字を出してくださいということです。

〇〇〇 これもお願いでよろしいですよ。一番最後、組換え体に関する事項まで、申請書を全て含めて、お気づきの点とか、ぜひここは問いただしておかなければという点が

ございますでしょうか。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 問題がないところだと思うのですが、46ページのドットプロットの図のクオリティーが悪過ぎてよくわからないので、可能だったらもう少しクリアな図を出していただければありがたいです。もう一点、48ページの精製度合いのところ、●●●と推定されたと。それ以外のものについては、賦形剤、製品化するときには添加されている食品素材、小麦粉由来のタンパク質であろうと記載してあります。しかし、そもそもここで求めているデータは製剤中における純度ではないと思うので、小麦由来のタンパクであろうとは思いますが、このままの記述でいいのかなという感じはあります。

さらに、元のデータを見ると、特に小麦由来のタンパクだということも書いていないので、これは説明のために日本で入れたものだと思いますので、この部分については書き方を御検討いただければと思います。

〇〇〇 私も、ここだけはひっかかったところで、小麦粉とか、そういうもので根拠はあるのかとか、そもそも小麦粉を入れる前の段階で何%だったか、聞いているのはそこだよということなので、申請者を呼ぶならそこは問いただしたいとも思っていました。

ほか、先生方、どうぞ。

〇〇〇 これも安全性に関するものではないのですが、参考文献の番号がほとんどずれているようですので、御確認いただいて、直していただければと思います。

〇〇〇 済みません。私も参考文献のナンバーまではチェックしておらないのですが、それは割とゆゆしいので、後に残る文章なので、きっちりチェックをするようにと言っていたらと思います。

どうぞ。

〇〇〇 22ページなのですが、人工胃液の消化性の試験の図なのですが、このタンパク質は大体●●●ぐらいですか。その物が時間とともに下がるということは示されているのですが、ここで分子量●●●ぐらいのところは少し増えているようにも見えるので、このタンパクがどういうものかというのは説明をしていただいて、先ほどの純度とも絡むのですが、これが本来導入したこのキシラナーゼの由来のものなのか、それ以外のものなのかということを含めて、コメントをいただければと思いました。

それと、細かいところなのですが、左側の図の一番右側に、●●●と書いてあるのですが、ペプシン自身は3万7000ぐらいの分子量なので、●●●表示が間違っているのではないかと思うのです。23ページのパンクレアチンなどと同じような考え方で●●●しているのだと思うのですが、ここは間違いだと思いました。

〇〇〇 これは申請者をお呼びして、直接聞いてみましょう。そう思います。

どうぞ。

〇〇〇 先ほどの御指摘と同じことになるのですが、純度の問題と、多分それは小麦粉が入っているというのが、これはよく見ていると、最後に製剤化のときに安定化剤を

添加している。13ページの製品製造の概略にあります。恐らくこれが小麦粉なのだろうと私は推測しています。なおかつ、多分胃液の分解とか、人工胃液の実験は、安定化剤を加えたもので恐らくやって、その上で、この電気泳動の絵から純度を出した。それで●●●になったのではないかと思うのですが、一方で社内資料の16に、●●●が載っています。これは、13ページの製品製造の概略においては、ステップ5の除菌濾過1から右に試験バッチがありますが、これが多分この社内資料15の●●●のことで、これは恐らくは安全性の試験をやったときのロットの分析値なのかなと思うのですけれども、それを見ると、そのバッチのSDS-PAGEが、社内文書のこの中に、これは非常にきれいで、これから純度を出せよなどちょっと思いました。いずれにしても、これは先ほどの製品の問題と一緒に、どこのバッチを試験したのかというのを書いておいてもらわないと理解が大変、と思うと同時に、申請者は●●●では、純度試験にかかわるものを物すごく詳細にやっています。これは遺伝子組換え酵素ですからもともとやっているだろうと私は想像していますが、ちょっと聞きたいのは、この品質検査は毎回やっているのかどうかということ。表向きの製品規格は、食品添加物公定書のものしか並んでいなくて、活性も表向きは設定してないですね。活性がそんなに重要だとは思いませんけれども、組換え酵素の製造メーカーにとっては品質管理上絶対に必要で、当該申請者は絶対にやっていると思いますけれども、いずれにしてもそれは必須ということではなくてあくまで参考として聞いておきたいなと思っています。

以上です。

〇〇〇 聞いてみましょう。この13ページの図を見ますと、ステップ5からこの濃縮したものを試験バッチにしているのだけれども、安定化剤が小麦粉だとしたら、小麦粉を入れる前だから、小麦粉のわけはなくて、はっきり言って矛盾もしているので、そのところを。

〇〇〇 ただ、資料を見る限り、恐らく胃液のもののデータの電気泳動から純度を出しているみたいですね。

〇〇〇 そうだと思うのです。そうすると、つじつまが合わないのです。

〇〇〇 説明してもらわないと。

〇〇〇 その辺は直していただければ済むことかとは思うのですけれども、先生方、ほかに聞くべきことはございますでしょうか。

純度の問題、人工胃液のあれの●●●について、これは〇〇〇からまた質問してくださいね。その辺のところを幾つか聞いてみたいと思います。

どうぞ。

〇〇〇 先ほどのウェスタンとの関係で、私はこの胃液とか腸液の分解の評価で、ノボザイムズさんのものはいつも同じように出てくるのですけれども、これを見ると、クマシーで染色したバンドの太さと、例えば、ウェスタンのものがいつも同じように、30秒で完全に分解されると書いているのですけれども、ウェスタンの目的は、もちろん特異性とサイ

ズがあって、もう一つは、通常は非常に検出感度が高い。クマシーで染色するよりも恐らく数十倍か100倍かは高くなる。ですから、クマシーで染まったバンドより、同じものをやれば、当然太く出てくるはずなのです。これでよくやるのは、試料を10分の1で薄めたりしてウェスタンをやるとか、むしろこの前の申請のものが正直に出してきたのかなと、そんな印象を受けて、これはそういうふうにはっきり、すぐに分解されますよということを行うためにつくっているような印象があるのですけれども、それは別の問題なので。

〇〇〇 そこを露骨に聞くのはなんなのですが、申請者に来ていただくので、質問して聞いていただいてもいいかなと思いますけれどもね。

それでは、申請者を呼んでいただけますか。

(説明者入室)

〇〇〇 お忙しいところ、起こしいただきまして、ありがとうございました。

自己紹介をお願いします。お名前と会社名だけで結構です。

〇〇〇 ノボザイムズジャパンの〇〇〇と申します。よろしく願いいたします。

〇〇〇 よろしく願いいたします。

摂取量の推定のところで、パン類・菓子パン類と。こういう酵素は、通常の食パンと菓子パンとでは、添加量とか、そういった使い方とかは全然違うものなのではないでしょうか。

〇〇〇 摂取量のところですが、キシラナーゼの添加量に関しては、おっしゃるとおり、パンごとにはばらつきがあるかとは思われます。

〇〇〇 そうすると、摂取量の推定のところでも、どういうパンを対象にするか、そういったところでいろいろ振れもあり得ようと思いますので、そういったところは、先々も矛盾のないようなしっかりしたデータを使って推定していただければと思います。別のこのデータそのものが問題と言っているわけではございません。

お願いします。

〇〇〇 補足です。

多分御社のキシラナーゼは、まだ引き続いてこの調査会に来るのではないかと想像しております。去年も1つ見ていて、去年のものと今回のものは多少とも目的は違うようですが、摂取量の計算をそれなりに統一をとってやっていただきたいなと思いますので、後で我々がそれを見るときに悩まないで済みますので、よろしく願いいたします。

〇〇〇 13ページに、これの精製の工程表がございまして、これによると、ステップ5で除菌ろ過をして、これを濃縮して試験バッチにして純度試験等を行っておる。何ページだったかな。最後に、純度としては●●●であって、残りのタンパク質は安定化用の小麦粉タンパク質であろうと書いてあるのですけれども、ステップ9で入れる安定化剤が小麦粉だとするとここには入ってこないし、この中で微妙に矛盾しているように思います。また、この純度●●●で残りの多くが安定化用の小麦粉由来であるという根拠については特にはどこにもなくて、ただ書いてあるだけ。その辺は何かつじつまが合わないように思うのですが、いかがでございましょうか。

〇〇〇 おっしゃるとおり、試験バッチには添加剤として小麦粉等が入っておりませんので、製品化する際に賦形剤等として小麦粉が添加されております。社内文書の2になるのですけれども、この2が製品のコンポジションということで、成分比率を示しております。

●●●と考えておりました。

〇〇〇 要するに、この書き方の上で矛盾のないように書いていただきたいということで、ぱっと見でこれはおかしくないかと思えるような書き方を避けていただきたいなと思ったわけです。

本来、この純度として何が欲しいかという、このもとの培養液に由来するタンパクの中でこのキシラナーゼがどのくらい占めるかの本当のところが良いわけで、要するに、データがもしあるなら小麦粉を入れる前のデータを示せと申し上げたいのですが、もしそういうデータをお持ちでしたら、そちらを記載していただくと助かります。なければないとは思いますが。

〇〇〇 1点確認したいのですけれども、いわゆる試験バッチ等で純度をはかったもののほうがより好ましいということでしょうか。

〇〇〇 本当のところは、この試験バッチに含まれているものは小麦粉とかそういうものは入っていないわけですから、つまり、もとの培養液、もとのこの菌体に由来しているもの、全てそういうことになりますよね。それで何%と。そうすると、●●●よりはるかに高い純度になると思うのですけれども、これの純度が高いのであれば、安全性はより高いと評価できるわけで、これの純度が低いようだと、この菌由来のほかのいろいろなタンパク質なり何なり、安全性についてももう少し議論をする必要が出てきます。

確かに最終の製品でどのくらい本品のキシラナーゼが入っているかどうかは、最終製品情報としては重要なのですが、我々がこの審査の上で本当に欲している情報は、もとの培養液に由来するものの中で、どの程度これが濃縮されているか、どの程度純度が高くなっていて、それ以外の夾雑タンパク質がどの程度除けているのか、こちらのほうが重要なですよ。もしもそういうデータもお持ちであったら、加えていただくとありがたいと思います。

〇〇〇 確認させていただきます。

〇〇〇 46ページ、47ページで、バッチ試験をやっております。型どおりの試験ではあるのですが、白く抜けて飛んでおまして、もうちょっときれいで見やすいデータをお持ちだったら、もしくは、もうちょっときれいなもとの写真をお持ちだったら、そういうものを用意していただくとありがたいのですが。

〇〇〇 わかりました。確認して、提出させていただきます。

〇〇〇 22ページ、人工胃液のところは、〇〇〇から御質問を願いますか。

〇〇〇 人工胃液、22ページの図で、xyn264の完全長の●●●ですか。それが時間とともに30秒以内に落ちているというのはわかるのですけれども、その●●●のところのバンドが0.5分ぐらいから見えてきているのですが、これが何者かというのはコメントをいただけ

〇〇〇 これは結果にどうのこうのという話ではないのですけれども、人工胃液に対する感受性の試験のクマシーで泳動して染めたものとウェスタンの関係なのですから、通常、ウェスタンプロットは相当感度が高くなりますので、クマシーで古いバンドがはっきり見えるようなものは相当太く出ると。見えないものもウェスタンですと出てきますので、この辺の2つの関係は、また別の試料を流しているということなのですか。先ほど●●●のではないかというのもありましたけれども、そういうものもちょっと関係するのかなと思ひまして。これをそのままウェスタンでもって調べているわけではないわけですか。Aの図とBの図は同じゲルを調べているものではないということですか。

〇〇〇 同じサンプルは用いておるのですけれども、ウェスタンプロットの場合ですと、おっしゃったようにすごく高感度なので、同じ量のサンプルを流してしまうと汚いバンドになってしまうところもありますので、そこら辺は調整して希釈しているところもございます。

〇〇〇 ほかに御質問等はございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 これに添えてある社内文書の16は、●●●で、説明を読む限りでは恐らくヨーロッパに承認申請を出したときのデータかもしれないのですけれども、これを見ると、かなり詳細に純度試験に相当するものをやっておられる。

一つの質問は、この●●●とは何だろうなというのと、●●●は恐らくこの途中でとった試験バッチなのですから、いずれにしても、この辺は社内規格として運用しているのか、あるいは途中でとったものなのか、そのあたり、今回の調査会での対象ということではなくて、参考までに、世界のトップメーカーである御社がどういうふうに行っているのかなということに関して、ちょっと情報提供いただければ幸いです。

〇〇〇 この社内文書16に関しましては、以前もお話ししたかもしれないのですけれども、●●●ということで行っております。ですので、●●●で行っている試験でございます。これ自体は欧州で提出している情報ではございません。

ただ、試験バッチのほうの情報、先ほどもちょっとお話ししたのですけれども、日本の申請の中では、提出するものとしては好ましいのではないかと社内で検討して、このデータを出しているところです。

〇〇〇 そうすると、規格を満たしているよということのデータとしては、要するに、最終のところ、●●●ということの意味合いなのだろうか。

〇〇〇 おっしゃるとおりです。特にこの遺伝子組換えの安全性審査というところだと、発酵して出てきたもの、試験バッチというもののほうが、情報が多分好ましいと弊社は考えておりました、実際に、本当に●●●ありますので、それとこの出しているデータは、もちろん同じようなものは見ているのですけれども、目的等がちょっと違ってきております。

〇〇〇 これは繰り返すものなのですか。製法変更をしたときか何かにやるということでは

すか。

〇〇〇 それは●●●もあるのですけれども。

〇〇〇 社内規格としてですか。

〇〇〇 社内規格として設定しているもので、●●●です。●●●は見ております。

〇〇〇 ありがとうございます。大変参考になりました。

〇〇〇 ほかによろしいでしょうか。

お疲れさまでした。ありがとうございました。

(説明者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻ります。

ただいまの回答を踏まえまして上で、御意見、コメント等はございますでしょうか。

細かい点が幾つかありましたが、特に安全性には直接といった問題ではないと思っておりますので、この件はよろしいのではないかとと思いますが、よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

評価書案の審議に入りたいと思います。

事務局から、お願いいたします。

〇〇〇 それでは、評価書案の説明をさせていただきます。評価書案の17ページからが本品目になります。

まず、こちらの22ページをお願いいたします。

まず、「Ⅰ. 評価対象添加物の概要」でございますけれども、本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63株を宿主としまして、*Bacillus sp.* KK-1株由来のキシラナーゼ遺伝子を導入することで作製したJPBL006株を利用して生産されたキシラナーゼでございます。本添加物は、キシランの1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、パン生地の品質向上を目的として使用されます。

続いて、「Ⅱ. 食品健康影響評価」でございます。

1の(1)でございます。名称はキシラナーゼ、有効成分はキシラナーゼでございます。

(2) 製造方法でございます。培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造されます。生産菌は、除菌ろ過により除去されます。

続いて、(3) 用途及び使用形態です。パンの製造工程において、原料となる小麦粉中のキシランを加水分解し可溶性糖類を生成することで、生地の弾力を向上させることを目的として使用されます。

(4) 摂取量です。全てのパンの製造工程に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、1.7 μgTOS/kg体重/日でございます。

2の(1)、宿主の種名等ですが、*B. licheniformis* Ca63株でございます。

続いて、(2) DNA供与体の種名等です。キシラナーゼ遺伝子の供与体は、*Bacillus sp.* KK-1株、*prsA*遺伝子の供与体は、*B. licheniformis* CA63株でございます。

(3) です。*xyn264*遺伝子は、*xyn264*をコードします。また、*prsA*遺伝子は宿主由来の

菌体外分泌タンパク質の分泌量を高めるPrsAタンパク質をコードします。*xyn264*遺伝子発現カセットはインテグラーゼにより、*prsA*遺伝子発現カセットは相同組換えにより宿主ゲノムのそれぞれの遺伝子座に導入し、挿入遺伝子座のうち一部の遺伝子座において遺伝子欠失が確認されております。なお、生産菌の作製に当たっては、複数種類の遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させています。

3、食経験等がございますけれども、*B. licheniformis*は、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されております。

4、宿主の構成成分等ですけれども、*B. licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害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いてバイオセーフティーレベル1に相当します。

続いて、5、組換え添加物の性質等ですが、記載のとおりでございます。

続いて、24ページに行きまして、6の(1)、添加物の相違点でございますが、基原並びに至適温度及びpHが異なる点でございます。

続いて、組換え体と宿主との相違点ですけれども、JPBL006株には*xyn264*遺伝子が複数コピー導入され、*xyn264*生産性を獲得している点、*prsA*遺伝子を導入している点並びに*xyn264*の生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点でございます。

以上から、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ております。

続いて、第2、宿主に関する事項ですけれども、1は記載のとおりです。

2、病原性について、*B. licheniformis*が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バイオセーフティーレベル(BSL) 1に相当します。

続いて、3から5については、記載のとおりでございます。

続いて、25ページ、第3、ベクターに関する事項ですけれども、遺伝子導入用ベクターpJPV020及びpJPV021の作製には、*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドpE194が用いられております。

2、性質については、記載のとおりです。

続いて、第4でございます。

1の(1)は記載のとおりです。

(2)安全性ですけれども、*Bacillus* sp. KK-1株は、土壌から単離された好熱性細菌でございます。*xyn264*のアミノ酸配列は、*B. licheniformis*由来のキシラナーゼと●●●の相同性を有し、*Bacillus* sp. KK-1株は*B. licheniformis*に属している可能性が示唆されております。続いて、*B. licheniformis*については、記載のとおりです。

続いて、26ページ、クローニングに関する事項でございます。下線部が引いてあるところが、先日お送りしたのものから事務局で修正させていただいた点でございます。*xyn264*遺伝子は、*Bacillus* sp. KK-1株由来のキシラナーゼ遺伝子の配列に基づき合成いたしました。

た。野生型キシラナーゼのアミノ酸配列と比較して、1アミノ酸が付加されております。また、*B. clausii*由来の*aprH*遺伝子の分泌シグナル配列が付加されております。*prsA*遺伝子は、宿主ゲノムからPCRにより得られております。

(2) については、記載のとおりです。

続いて、(3) 挿入遺伝子の機能。

まず、①*xyn264*遺伝子です。これは、キシランの1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素でございます。

続いて、a、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はございませんでした。

b、遺伝子産物のアレルギー誘発性ですけれども、*xyn264*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す報告はございません。また、*Bacillus* sp. KK-1が産生するキシラナーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はございませんでした。

続いて、c、物理化学的処理です。まず、人工胃液ですけれども、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後30秒以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。

続いて、人工腸液でございます。SDS-PAGE、ウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後6時間においても分解されないことが示されております。

(c) 加熱処理ですけれども、文字化けをして済みませんでした。70℃・30分にて酵素活性が消失することが示されております。

続いて、既知のアレルゲンとの構造相同性についてでございます。*xyn264*と既知のアレルゲン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アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されませんでした。

②、*prsA*遺伝子ですけれども、PrsAタンパク質をコードしまして、細胞内で増加するほど菌体外分泌タンパク質の分泌が促進されます。PrsAタンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、*xyn264*と同様の手法で行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは検出されませんでした。

以上のことから総合的に判断し、*xyn264*及びPrsAタンパク質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。

続いて3、ページをめくっていただきまして、4、5の(1)については、記載のとおりでございます。

5の(2)でございますが、こちらは第5に記載しているとおりでございます。

続いて、(3)ですけれども、遺伝子導入用ベクターpJPV020及びpJPV021上の意図する領域は、*prsA*遺伝子発現カセット及び*xyn264*遺伝子発現カセットの領域でございます。

(4) については、記載のとおりです。

続いて、6でございますけれども、DNAの導入方法ですけれども、各標的遺伝子座にマーカ-遺伝子発現カセットを相同組換えにより導入し、遺伝子導入用ベクターpJPV020を導入し、相同組換えにより *prsA* 遺伝子発現カセットを挿入しております。さらに、遺伝子導入用ベクターpJPV021を導入し、インテグラーゼの作用によって *xyn264* 遺伝子発現カセットを挿入、各マーカ-により形質転換体を選抜しております。各標的遺伝子座においては、*cry3A* mRNA安定化配列間でループアウトが生じ、マーカ-遺伝子、*int* 遺伝子及びインテグラーゼ認識配列が宿主ゲノムから脱落しております。

7、抗生物質耐性マーカ-遺伝子ですけれども、遺伝子導入用ベクターpJPV020、pJPV021はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主のゲノムからはループアウトにより脱落しており、この抗生物質耐性マーカ-遺伝子は存在しないことを標的遺伝子座のシーケンス解析により確認されております。

続いて、第5. 組換え体に関する事項です。

1は、記載のとおりでございます。

2の(1) ですけれども、*xyn264* 遺伝子が複数コピー、また、*prsA* 遺伝子が挿入されていることが確認されております。

続いて、(2)、ORFの有無でございますけれども、挿入DNAの5'近傍配列を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行った結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが、合計で222個検出されております。これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されませんでした。さらに、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、E-value<0.02を指標として検索を行った結果、3個のORFがデータベース中のタンパク質と相同性を示しましたが、いずれも毒性を有するとは考えがたいタンパク質であったという旨を記載しております。

第6については、記載のとおりです。

第7、まず、諸外国における認可の状況ですが、フランス、カナダにおいて、食品用加工助剤のポジティブリストに収載されております。また、米国では、GRASとして認証されております。

続いて、第7の2、ドットプロット解析によりまして、*xyn264* 製剤中には組換えDNAが検出されないことが確認されております。

続く3から5及び第8については、記載のとおりでございます。

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、コメント等がございましたら、お願いいたします。

す。

〇〇〇 1カ所、細かいところではあるのですけれども、26ページなのですから、(3)のc、(a)人工胃液に対する感受性で、下から3行目で「ウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後30秒以内にバンド」とあるのですが、少しわかりにくいので、「xyn264の完全長のバンド」ということで説明を入れたほうがよろしいように思いました。

〇〇〇 いいですか。

〇〇〇 そのように修正します。

〇〇〇 完全長のほうがよいと。確かに言われてみればそうだと思いますので。

ほかにございますでしょうか。

細かい字句の修正につきましては、また後からでもよろしいので、修正箇所を事務局までお伝えいただければと思います。

今、お気づきなら、どうぞ。

〇〇〇 1カ所、195行目、これは過去の書きぶりにもよるのですけれども、複製開始配列については、これともともと *Staphylococcus* でとれているので、*Staphylococcus* 属に加えるとかと書いたほうがいいのかなどは思ったのですけれども、過去の書きぶりによるので、そこは確認していただいて。

〇〇〇 過去の評価書等も確認して、整合性をとるように記載させていただきます。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 済みません。誤字脱字の類いなので後でもいいのですけれども、120行目、「キシナラーゼ」になっているので、それを変えていただきたいのと、327行目の「相同組み換え」に「み」が入っていて、これは上段で「み」なしのものも入っているの、そこは抜いていただければと。

〇〇〇 送り仮名の「み」を除いてくださいということです。よろしく願います。

よくお気づきになりましたね。

〇〇〇 済みません。KK-1株が *B. licheniformis* に属すると示唆されたということを記載しているのですが、エビデンスにもよると思うのですが。

〇〇〇 示唆は示唆でよろしいかと私は思いますけれども。

〇〇〇 このままでよろしいでしょうか。

〇〇〇 これはこのままでよろしいでしょう。

〇〇〇 アミノ酸配列が相同性を有しというところも、このままでよろしいですか。

〇〇〇 アミノ酸配列の相同性のほうは確実なデータに基づいているので、そっちはよろしいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 ほかによろしいでしょうか。

それでは、またいただいた修正等につきまして私のほうでも確認させていただきまして、また申請書も修正について私と関係する先生方で確認した上で、食品安全委員会に報告し

て、パブリックコメントの手続に入りたいと思います。

ありがとうございました。

これで終わりではないのだよね。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、事務局から。

〇〇〇 済みません。少しお時間をいただきまして、先月の遺伝子組換え食品等専門調査会で審議を行いましたチョウ目害虫抵抗性サトウキビCTC175-Aにつきまして、評価の範囲について整理を行いました。厚生労働省からの諮問はサトウキビCTC175-Aという作物についてであること、なおかつ、管理機関ではサトウキビCTC175-Aという作物が食品の安全性の確保に関する施策の策定に該当するということから、遺伝子組換え食品等専門調査会での審議はサトウキビCTC175-Aという作物についての安全性評価を実施する必要があります。この考え方については、厚生労働省とも共有してございます。

つきましては、サトウキビCTC175-Aという作物についての評価を実施するという前提で、再度指摘事項の取りまとめをお願いしたいと思っております。

〇〇〇 お手元にこの大きいオレンジ色のファイルがあると思いますけれども、前は、サトウキビのゲノムが非常に複雑で挿入遺伝子が確認しきれていないという点をどう扱うかということで、実際にこのサトウキビを日本では栽培しないであろう、入ってくるものが結構純度の高い砂糖であろうということで、そういうことであればということが前提の一つで審査いたしました。サトウキビとしてまず審査する、このような検討でございましたので、遠慮は要らないので、サトウキビとしての安全性審査の上で、だったら、これを指摘したいということがございましたらと。

私から、早速。では、挿入塩基配列、たしか13のうち3つか4つ、不明なところがあったと思いますが、全ての挿入配列の位置とジャンクションについて確実なデータをいただきたい。これを要求したいと思うのですが、ほかに先生方はございますでしょうか。

多分あれだけやっただめだったのだから、きっとそれだと思ってしまうのですが、遠慮は要らないと思いますので、どうぞ。

〇〇〇 植物としてやるのだったら、この指摘事項どおりにならざるを得ないので、実質的にこの指摘事項は向こうでは無理なので、あれだけショートリードもロングリードもやっていたと思うので、今の科学技術の水準ではあれ以上のデータはとれないということは、●●●なのですよ。

〇〇〇 そう思いますね。

〇〇〇 これをメーカー側がもらったら、●●●ですね、日本には輸出できませんということにならざるを得ないのかなと思うのですけれども、植物としてやるとそうなるのです。

一方で、本国とか、アメリカ等では認可されているという事実もあって、そこら辺をどうバランスをとる必要があるのかないのか、日本は日本だからそれでいいよということであればそれでもいいのですけれども、たしか、この委員会のスタンスは、今の科学水準に照らし合わせて、多少データが足りなくても、安全性が判断できる、リスクの評価ができ

るのであれば、リスク評価をしてくださいというのは、たしか〇〇〇から何度か聞いたことのあるお言葉だったようにも思うのですけれども、そこら辺のバランスはとらなくていいのですかということでもあるのですが、どうなのでしょう。

〇〇〇 済みません。これは〇〇〇から一言お願いできますか。

〇〇〇 100%完璧なものは求められないという話はよくさせていただくのですけれども、個別の案件については、それぞれの専門調査会の御判断もあるのだらうと思うのですね。

そういう意味で、先生方がどう御判断なさるのかというのは、我々としても尊重したいと思うのですけれども、〇〇〇の意見も聞いてもいいですか。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 私は、余りそちらに引っ張りたくはないのですが、例えばということですが、動物を用いた安全性試験というの、多分やらないと思うのですけれども、そのデータがとれないならそういう形でやってくれというの、選択肢としてはあるのかなと。

ただ、それに難があるのは、どの量だけすればいいのかというあたりは、もし向こうから聞かれると、この調査会というか、どこへ行っても答えが出しづらい。

ただ、選択肢の一つとして、今までそういう選択肢はほとんどとっていませんけれども、そういうやり方もあるよと。動物というか、毒性試験をやってくださいという選択も一つはあるかなというのは、頭の片隅にはあります。

〇〇〇 これを本気で議論すると、あり方の問題になるので結構大変だと思うのですけれども、どうぞ。

〇〇〇 前もお話ししたかもしれませんが、これはいわゆるキャノーラが対極にいるのですね。油ということでいったとき。あれは油では審査しないで、全草で見ることがあったのは何かというと、可食部の問題だったのですね。すなわち、キャノーラですと葉っぱも日本人は食べるということで、カナダの人たちは非常に驚いたと。だから、当初、昔は何で油なのに葉っぱごとやるのだとすごく言われたのですよ。春に日本に来て一緒に日本料理を食べに行こうと言って、それで初めてわかってくれた。お浸しですよ。ですから、食生活、食経験の違いの上で、しかももう一点大事なことは何かというと、キャノーラるときには、セットで来たのですよね。セットとは何かというと、環境影響評価と食品安全、すなわち、日本で植える種子で来るという前提があった。したがって、そこまで、日本でお浸しにして食べるケースがあるだろうということで、そういうことがあったというのが事実だと思います。

顧みて、サトウキビのときにどうなるかということ、これは環境影響評価を日本でやるのかどうか、ここは私にはわかりません。やらないだとしたら、その入ってくるものは生きていない状態のもので入ってくる。そうしたときに、可食部はどこかかというと、これは先ほど先生が動物実験とおっしゃいましたけれども、これは茎を食わせると多分ラットは口の中が血だらけになると思うので、要するに、可食部がないということが第1だと思うのです。すなわち、そこはキャノーラと違うということが大きなポイントになるのだらうと。

しかも、その毒性試験は食品の場合はできないのですよね。そればかり食わせて、昔、やった人がいるのですけれども、遺伝子組換えトウモロコシをラットに食わせておかしくなったという、ある意味、マッドサイエンティストではないのか、それは栄養失調でしょうという話があったので、非常に困難。まずこれはあのままでは食わせられないということがある。

それと、食品に関しては動物試験自身がそもそも困難ということで行くと、そこに立ち返って考えていただくと、例えば、大豆でしたら、大豆油で日本に持ってきますと言ったのですけれども、私はその組換えの大豆を使って、確かに豆腐はつくれました。くみ豆腐みたいにはなってしまったのですけれども、油用だということではなかったということがあって、あれも環境影響評価を受けて日本でも植えるということがあったのです。

ですから、そういう意味でいったときに、これははっきり言って日本市場の中でどう食品として来るかというところを今まではそうやって見てやってきたという現実があるとすると、このサトウキビは環境影響評価を受けなければ、丸のままは入ってこない。砕いて入ってくるかもしれないけれども、砕いたものを食べたら、多分口の中は血だらけになるから、ほかは食べることができないということで考えると、一つは、評価としては、例えば、砂糖で評価をしましたと。しかも、粗糖ではなくて精製糖でやりましたと。粗糖については評価できません、植物体全体も評価できませんという形で答えることは可能なのでしょうかということ、むしろ〇〇〇にお聞きしたいのですけれども。

〇〇〇 私は、ここで前回に出ていなかったので中身のほうがよくわからないのですけれども、全体的な印象としては、リスクアセスメントポリシーがはっきりしていないというところにあるように思うのですよね。今、〇〇〇がおっしゃったように、絶対に食べないようなものの植物を評価してくださいという形で評価依頼を受けざるを得ないみたいな、我々食品安全委員会は受け身なので、そういうことはあるのですけれども、それについて、何と言ったらいいのでしょうか。我々は受けてどう返すのかみたいな話になると、いろいろ考えなければいけないところはあるのだろうと思います。全然だめだよと言って返してしまう手もあるのだろうし、今、先生がおっしゃったような返し方もあるのだろうし、何か制限をつけて返すみたいな、そのつけ方も随分いろいろあるのだろうと思うのですけれども、その辺はケース・バイ・ケースで考えていかなければいけないと思います。

我々も考えますし、サイエンティフィックなレベルで考えてどうなのかということは先生方に考えていただきたいと思って、余り答えにならないようなことなのでも、ただ、実際に専門調査会で議論されて、それが私どももそうだなと思うことであれば、それは食品安全委員会として責任を持ちますから、私が責任を持ちますから、それはそうせざるを得ないわけで、それはそう思いますので、極めてサイエンティフィックなレベルで議論していただければいいのだろうと思います。

リスクアセスメントポリシーがしっかりしていないという部分については、これからいろいろ事務局とも相談しながら、何とか、今後の問題もありますので、やっていかなけれ

ばいけない問題だろうと思います。

余りお答えにならないことではようがないのですけれども、もう一点、今のところの話と違って、さっき〇〇〇が御指摘された国際的なハーモナイゼーションなのですから、これも同じことで、サイエンスでだめだということになれば、それはそれではようがないのだと思います。それは、多分厚生労働省なり、外務省になるのかな。今は通産省がないから経産省になるのか。結局、貿易の問題とか何かで闘うことになるのでしょうか。輸入できないというのはWTOの話になるのだと思うのですけれども、食品安全委員会はサイエンスでやるのだと決めてありますので、その部分については、できればそれも国際的なハーモナイゼーションがあればいいのは、そういうものを見ながら我々はやってきたというのは事実だと思いますし、そのほうが望ましいと思いますけれども、外国でオーケーとされているから必ずしなければいけないということはないのだろうと思っています。

〇〇〇 可食部のところを考慮して、本体をかじることはないということなので、挿入遺伝子の全ての位置関係をはっきりするところまでは要求しないという考え方もあるかとは思いますが。

だけれども、今回はサトウキビの作物としての安全性で見ると。こちらは示唆したのだよね。砂糖としてということであれば、このルールのとおりでなくても、そこはこの安全性は安全性として評価できると示唆したけれども、そうではなくて作物全体として見るというお返事と解釈してよろしいのですか。

〇〇〇 先ほども御説明しましたとおり、諮問は作物で受けているということと、厚生労働省、要は、管理機関では、作物について食品の安全性の確保に関する施策の策定をするということですので、作物で評価をする必要があると考えております。

〇〇〇 そうすると、作物といっても、あれは直接ガリガリかじるわけではないので、粗糖もしくは食べるとしても砂糖を絞ってということになるかと思いますが。その上で、事実上の厳しいこの要求をするかどうかということになります。

〇〇〇、何か御意見は。

〇〇〇 昔ですけれども、今も東南アジアへ行けば、サトウキビは若い木をそのまま売っていますよね。こうやってガリガリ食べるために。本当にかたくなったものは〇〇〇がおっしゃるように血だらけになりますけれども、やわらかいものをむきながら、特に戦時中は、私たちの親の世代はそれを食べていますよね。

〇〇〇 私も沖縄に遊びに行ったときにそれを買ってきてチューチュー吸っておいしかったですので、サトウキビは本当に直接口にしないかということ、必ずしもそうとは言えないところはあろうかと思うのですね。

〇〇〇 だから、何が目的なのかわからないのですけれども、将来、そういう食品が入ってくるのか。あるいは、沖縄県や、東京都の小笠原とか、あっちのほうでしか栽培はしていないのですけれども、あるいは温室の中でつくりたいのかもしれないかもしれませんが、サトウキビで何かをつくらせるのかわかりませんが、食品として評価してもらいたい事情がある

のではないかという気がするのですけれども。

〇〇〇 でも、そういう情報は入ってきていないよね。

〇〇〇 実際に申請者が粗糖もしくは精製糖と、アグアルデンテというお酒に入ってくる可能性があると言っておりましたけれども、その評価をしてくれという諮問ではないと承知しております。

〇〇〇 そういうことですよね。

どうぞ。

〇〇〇 すみません。この指摘事項用紙の裏側、●●●をあえて入れてあるのですけれども、これが、先ほど先生方がおっしゃった、全て却下ではないことの一助にはなり得ませんでしょうか。

〇〇〇 通常の作物としていくのであればその遺伝子がどこにどういう形に入っているか完璧な情報を要求していて、組換えのパパイヤが10年かかった理由もそこにある。10年間、こちらから許可できない。アメリカではばんばん流通していたにもかかわらず、いろいろ貿易とか文句をつけられたにもかかわらず、こちらがオーケーできなかった理由はそこにあります。

今回のものも、砂糖でとか、それでということであれば、ショ糖は高度精製品のリストには入っていないので、直に適用するわけにはいかないのですけれども、それでも安全性としては十分担保できていると考える余地は十分にあったのですが、作物としてと言われてしまうと、逃げ道はほとんどないように思うのです。

実際、可食部の問題はあるのだけれども、口につけてチューチュー吸うということで、日本に植えるかどうか、そういう情報もないということは、日本に植えることを前提に考えないといけないということですから、そうすると、現在の技術では多分こちらで要求するデータをそろえるのは不可能だと思うのですけれども、それを承知で全ての挿入遺伝子の位置関係を明らかにせよと、このデータを要求せざるを得ないと私は思うのですけれども、先生方、いかがでしょうか。

〇〇〇、どうですか。

〇〇〇 遺伝子組換えサトウキビは結構いろいろな国で作付されつつあって、その国でIPハンドリングがされない砂糖が日本にやってくる可能性は生じてきつつあるのではないかという事実が、片方にあるわけです。

その一方で、植物体と。結局、今のガイドラインでは逃げ道がないのですよ。逃げ道が全くなくて、この形で審査せざるを得なくて、この形で申請せざるを得ないですよね。ほかに逃げ道がないから。高度精製品は微生物にしかないのです、植物には適用されていないので、逃げ道はないのです。だから、この形でやるしかなくて、今のガイドライン上でやれば、この形で返すしかない。それは厚生労働省のおっしゃるとおりなので、いわゆる建前論でいえば、今の考え方でいえば、これ以上のことを議論する余地もないのですよね。

そういう状況で、片方でそういう世界各国でサトウキビが遺伝子組換えをされていると

というのは、ブラジルも当然つくっているし、インドネシアも作付がされているので、そういう状況がわかっている状況下で、多分サトウキビはゲノムがこれだけぐちゃぐちゃだとすると、いろいろな国で作付をされているGMのサトウキビは恐らく似たような状況になる可能性が非常に高い。そうすると、申請が全部日本では却下されますみたいな状況が生まれるかもしれない。

〇〇〇 ほぼ見えていますね。

〇〇〇 ほぼ見えている。そうすると、今回はこれでいくとしても、日本はその点を考えて少し議論を始めて、そういうものに対してどういうふう実際にリスク評価をしますかという議論を始めないといけない時期に来ているような気が、植物の本体が来なくて、ある程度精製されたものが来る場合に植物体全体としてのフル評価を今までどおりに行っていていいのですかという段階に来ているかなど。

だから、我々はその点に対して議論を始めて、どう対応しましょうかというのを決めなければいけない時期が来ているような気が、意見としてはあります。

〇〇〇 私も全く同感でして、だから、前回のときには、事実上、日本に入ってくるものはほぼ精製品として、それで安全性が担保できるならという線で議論をしたいということだったのですけれども、それが厚労省にどこまでどういうふう伝わったのか。選択肢としては2つで、一つは、だったら、そう来るならこっちもそういくよとストレートに投げ返して、後で大きな宿題を残すか、それとも、しばらくこちらでペンディングにしておいて、それで議論をしていくか。恐らく、サトウキビの問題はどこかで早目に解決しておかないと、次から次へと来ると思う。ここではとりあえずはねておいてもいいのかもしれないけれども、それで済むとは私もとても思えないので、できれば、前例のないケースなので、議論したいと言ってしばらくとめたいのだけれども、それはできるのですか。どうしても返せというのだったら●●●と、それをにおわせてもいいから。

〇〇〇 EUというか、英国はどうするか。英国は、自分の植民地、英国連邦から入ってくるわけですね。そうすると、そこは当然組換えが入っているのです。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 取り扱いは、ちょっと相談させてください。

〇〇〇 そうしていただければと思います。

どうぞ。

〇〇〇 前回のときも〇〇〇が漏らしましたがけれども、遺伝子組換えの植物の高度精製品という扱いであれば、今まで微生物でやっていた指針をもう少し考慮するポイントをふやして、ふやす必要があるかどうかはいろいろあるかと思いますがけれども、それはそんなに時間はかからないような気がします。厚労省と相談するときの話なのですけれどもね。そんなことを言われたって困るよという状態ですね。

〇〇〇 もう一点だけ、よろしいですか。

サトウキビからの砂糖が日本では食べられなくなるといったときにどうなるかという

と、それでは、サトウダイコンからとろうということになる。ビートは遺伝子組換えのものができています。それでは、何であれは組換えとしてホールの作物でやったかという、あれは食べられる。しかも、ビートがありますよね。あれは、テーブルビート、つまり、きれいなスイスチャードありますよね。あれも種が同じですから、交配します。ですから、それで食品として出て来る可能性がある。そのときには可食部が変わるから、だめだということを押さえるために、あの国内交配品種の3原則が立っているということなのです。ですから、同じ砂糖といってもサトウキビとサトウダイコンは違うということは理解していただいて議論を進めない、とんでもないこんがらがりをするので、そこは御理解いただきたいと思います。

サトウキビの場合は、丸のままでは食べないし、ほかのものともかけ合わせて食卓に持っていけないことが特殊事情だということを理解しないと、ぐちゃぐちゃになってしまうと思います。

〇〇〇 微生物の高度精製という下敷きは既にあるわけですから、議論そのものは、筋道としてはある程度見えていると思いますので、ちょうどこういう事例が出てきたので、これで議論するしかないかなと思います。

これで拒否すると、多分日本が一切サトウキビの砂糖を輸入できないというとんでもないことになります。いいの、そうなるからねと厚労省にくぎを刺してください。

〇〇〇 だから、サトウダイコンに関してもいろいろな意見があるので。

〇〇〇 先生方、この件に関して、今、言っておきたいことはございますか。時間を結構過ぎていますが、重要なことなので、どうぞ。

〇〇〇 〇〇〇がおっしゃるように、これからいろいろなものが出てくると思います。タンパク質も出てきます。いいチャンスなので、これでそういう新しい考え方を先にちゃんとつくっておかないと大変なことになるので、作り始めるチャンスだと思います。

それから、今までこのリスク評価をがちがちにやってきましたけれども、もうちょっと世界の趨勢に合わせて日本人もちゃんと考えるチャンスでもあるので、新たな仕組みを考えたほうがいいと思います。

〇〇〇 私も全く同感です。そういうことで、大きい宿題が出てしまいましたね。

今日のところは、これでよろしいですか。

それでは、本日の議題については、これで終了しました。遅くなって申しわけありませんでした。

第196回「遺伝子組換え食品等専門調査会」をこれで閉会いたします。

少々気が早いですが、皆様、よいお年をお迎えください。