

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第237回) 議事録

1. 日時 令和5年6月19日(月) 13:59~16:24

2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)
(Web会議システムを利用)

3. 議事

(1) 遺伝子組換え食品等に係る食品健康影響評価について

- ・ JPAo011株を利用して生産されたホスホリパーゼ
- ・ Ra α 3114株を利用して生産されたプロテアーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、安達専門委員、岡田専門委員、小野道之専門委員、近藤専門委員、
佐々木専門委員、樋口専門委員、藤原専門委員、山川専門委員

(専門参考人)

児玉専門参考人

(食品安全委員会)

川西委員、脇委員

(事務局)

鋤柄事務局長、中事務局次長、前間評価第二課長、井上評価情報分析官、
奥藤課長補佐、神津評価専門職、山口係長、今村技術参与、田地技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ① JPAo011株を利用して生産されたホスホリパーゼ
- ② Ra α 3114株を利用して生産されたプロテアーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 皆さんおそろいのようなので、ただいまから第237回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催したいと思います。

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

まして、非公開で行います。

本日、所用により、〇〇〇は御欠席です。

専門参考人といたしまして、〇〇〇に御出席いただいております。

本日、ウェブ会議システム併用で開催いたします。

本日の議題ですが、新規品目である「JPAo011株を利用して生産されたホスホリパーゼ」と継続品目「Ra α 3114株を利用して生産されたプロテアーゼ」の安全性についての議論です。

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 資料の確認を行います前に、6月1日付で〇〇〇が着任いたしましたので、紹介いたします。

〇〇〇 6月から〇〇〇に着任いたしました、〇〇〇と申します。専門は栄養学です。どうぞよろしくお願いいたします。

〇〇〇 それでは、議事次第に基づきまして、配付資料を確認いたします。

配付資料は、議事次第、専門委員名簿、資料としまして食品健康影響評価に関する資料、そして、机上配付資料といたしまして、机上配付資料1-1、1-2-1、1-2-2、1-3-1、1-3-2、2-1、2-2の7種類がございます。

また、本日は「JPAo011株を利用して生産されたホスホリパーゼ」の申請者であるノボザイムズジャパン株式会社の方、「Ra α 3114株を利用して生産されたプロテアーゼ」の申請者であるピュラトス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 ありがとうございます。

それでは、また事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づきまして、必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について、御報告をお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

事務局におきまして、専門委員の皆様方に御提出いただきました確認書及び現時点での今回の議事に係る追加の当該事項の有無につきまして確認したところ、平成15年10月2日付け委員会決定の2の(1)に規定する調査審議等に参加しないこととなる事由に該当する専門委員はいらっしゃいませんでした。

〇〇〇 ありがとうございます。

確認書はその後に変更等ございますでしょうか。

よろしいですね。ありがとうございます。

それでは、皆様、ウェブ会議を併用した形で開催いたしますので、審議に入る前に、例によってウェブ会議における注意事項の説明を事務局からお願いいたします。

〇〇〇 注意事項をお伝えいたします。

1点目、発言者の音質向上のため、発言しないときはマイクをオフにさせていただくように

お願いいたします。

2点目、発言の際は赤い挙手のカードを提示してください。または、ウェブ会議画面の挙手ボタンを押してください。

また、本日登庁されている委員は挙手でお知らせください。

座長より呼びいたしますので、マイクをオンにして、お名前を発言していただいた上で、御発言をお願いいたします。

座長より指名がない場合は、直接マイクから呼びかけてください。

発言の最後には「以上です」と御発言いただき、マイクをオフにしてください。

3点目、音声接続不良時、通信環境に問題がある場合は、カメラをオフにすることや再入室することにより改善する場合がございます。

マイクが使えない場合はウェブ会議システムのメッセージ機能によりお知らせください。

万が一、全く入室できなくなった場合は、事務局までお電話ください。

4点目、議事中、意思確認をお願いすることがございますが、事前にお送りさせていただきました青い同意カードを挙げていただく、もしくは手で丸をつくるなど、意思表示が伝わるようお願いいたします。

以上がウェブ会議における注意事項となります。どうぞよろしくをお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、早速ですが、新規品目であります「JPAo011株を利用して生産されたホスホリパーゼ」について、審議を行いたいと思います。

では、事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 申請書を説明させていただきます。

グレーのファイル、JPAo011株を利用して生産されたホスホリパーゼのファイルを御用意ください。

また、先ほど〇〇〇から話がありましたが、机上配付資料として、ホスホリパーゼに関しましては5種類用意しております。

1-1が2023年6月16日付の修正要旨になっております。こちらは修正箇所が黄色マーカーとなっております。次に1-2-1、本件ホスホリパーゼに関して、事前確認として申請者から提出いただいた6月6日付の回答書。1-2-2がその関係する参考資料。1-3-1が同様に6月16日付で申請者から提出いただいた回答書。そして、1-3-2がそちらの参考資料となっております。

こちらは途中で適宜説明に沿って御案内いたしますので、よろしくをお願いいたします。

それでは、まずグレーのファイルの2ページ目を御覧ください。

従来の添加物に関する事項でございます。lip182の比較対象となる従来の添加物は既存添加物であるホスホリパーゼ、第1-1-（1）製品名はpla1製品でございます。有効成分であるホスホリパーゼはレシチンを加水分解いたします。

（2）製造方法は、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、小麦、鶏卵などを含むパンまたは菓子パンにおいて物性の向上のために使用されます。

続きまして、3ページ20行目、第1-2、宿主及び導入DNAです。

(1) 宿主は、*A.oryzae* IFO4177株です。

(2) 供与体については、次の4ページ目の表1を御覧ください。

挿入遺伝子は、表1の上の3つでございます。1つ目の*lip182*遺伝子、こちらが本申請添加物の有効成分であるホスホリパーゼA1活性を有する*lip182*をコードしており、2つ目、3つ目に記載されております*pyrG*遺伝子、*LEU2*遺伝子は選択マーカーとして用いられています。

一番上から*lip182*遺伝子の供与体が *Valsaria rubricosa* ATCC24940株、*pyrG*遺伝子と*LEU2*遺伝子の供与体がそれぞれ *Aspergillus oryzae* IFO4177株、*Saccharomyces cerevisiae* CBS1171T株になっております。

続きまして、5ページを御覧ください。

第1-2- (3) 挿入DNAの導入方法です。JPAo011株を作製するために●●●を用いております。

DNA欠失及び挿入の詳細については修正がございまして、先ほどの机上配付資料1-1、6月16日付の要旨の7ページ、図2を御覧ください。

まず①です。●●●を導入することにより、●●●。

次に②●●●に植菌し、生育する菌株を分離。●●●ております。

③その後、●●●になります。

③では、●●●。●●●。

そして、④ベクター●●●。

なお、選択マーカーによる形質転換体の選抜ですが、●●●、ホスホリパーゼ活性が高いものを選抜し、生産菌としております。

続きまして、8ページを御覧ください。

第1-4、宿主の構成成分等です。*A.oryzae*は*Aspergillus flavus*から家畜化された糸状菌であると考えられております。*A. flavus*は有害生理活性物質であるアフラトキシンを生産しますが、*A.oryzae*でのアフラトキシンの産生は確認されておられません。

次に、第1-5、遺伝子組換え添加物に関する記載です。

19行目、(1) 製品名は*lip182*製品、有効成分はホスホリパーゼ。

(2) 製造方法は、9ページの図の3のとおりでございます。除菌ろ過により、生産菌は製品中に混入しないとされております。

6行目から(3) 用途等ですが、既存のホスホリパーゼA1と同様ということで、こちらもパンの品質を向上するために利用されるということになります。

続きまして、10ページを御覧ください。

第1-6、従来の添加物との比較になります。表2に既存のホスホリパーゼ (pla1) との比較が記載されております。既存のホスホリパーゼとして記載されている*A.niger* JPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼは、安全性審査を経て2019年5月に官報掲載済みのもので、日本を含む世界各国2年以上の販売実績がございます。

今回の申請品目は*V.rubricosa* ATCC24940株の*lip182*遺伝子を*A.oryzae* IFO4177株に導入することで、JPAo011株を作成し、生産性を向上させるホスホリパーゼ lip182を大量発現させることを目的として改変されたものとなっております。

次に表3ですけれども、こちらも修正がございまして、机上配付資料1-1、10ページも併せて御覧ください。

(2) 組換え体と宿主との相違点ですが、lip182産生能を獲得している点でございます。修正前の表3にはロイシン非要求性を獲得したように読めましたけれども、実際はこちらの注釈のとおり、遺伝子導入ベクターを大腸菌で調整する際に栄養要求性の選択マーカーとして使用されたということでございます。

続きまして11ページ、第2、宿主に関する事項です。今回用いました宿主をバックグラウンドとする生産菌は、既に酵素製品の製造に広く利用されており、安全性に懸念を生じる報告はないとしております。

少し飛びますけれども、次に16ページを御覧ください。

第4、挿入DNA、遺伝子産物、発現ベクターの構築に関する事項です。

まず、挿入DNAの供与体に関する事項です。30行目から(2) 安全性に関する事項を御覧ください。挿入遺伝子の供与体である*V.rubricosa*、*A.oryzae*及び*S.cerevisiae*は病原体等安全管理規程のバイオセーフティ分類の真菌の項目におきまして、バイオセーフティレベル2及び3には分類されていません。また、*A.oryzae*及び*S.cerevisiae*はヒトまたは動物に疾病を見起こす見込みがないものと考えられるので、病原体等のリスク分類のリスク群1に分類されるとしております。

17ページ、2・(1) 挿入DNAのクローニング、合成方法を御覧ください。3つの挿入遺伝子は全てゲノムDNAを鋳型としてPCRで増幅し、各遺伝子断片を得ております。

また、(2) のとおり、挿入DNAの塩基配列及び制限酵素部位は明らかになっております。

18ページ目、(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項を御覧ください。

こちらも修正がございまして、机上配付資料1-1の18ページを御覧ください。

まず機能ですけれども、*lip182*遺伝子はリン脂質分解酵素の総称であるホスホリパーゼA1活性を有するlip182をコードいたします。lip182のアミノ酸配列ですが、25行目からと図6のとおり、既存のホスホリパーゼ (pla1) と●●●%以上の相同性を示し、両者のアミノ酸配列から予測される立体構造を重ね合わせた構造全体を示す図7では、構造全体として類似性が見られたことから、lip182はpla1と同等性を有するとしております。

本件については、今度は机上配付資料1-3-1、1-3-2ですね。こちらはノボザイムズジャパ

ンから6月16日付で回答書をいただいております。こちらの確認事項3を御覧ください。

アミノ酸配列の比較について示された立体構造の生成方法について事前に確認しておりますけれども、こちらはコンピュータープログラムによる三次元構造の推定結果という回答をいただきました。そのため、要旨の記載には予測されるといった説明を黄色マーカーのところに追記していただいております。

また、参考資料として、*A.oryzae*のホスホリパーゼA1の文献、関連文献をいただいておりますが、その中でFig4にほかのリパーゼとのアミノ酸配列比較が記載されており、活性中心等の情報が記載されております。

それらの情報を反映させたものが、こちらの回答書3ページ目ですかね。図としてlip182及びpla1のアミノ酸配列比較に反映されております。文献情報からアミノ酸配列を得て値を求めた結果、*A.oryzae*のホスホリパーゼA1とlip182の相同性は●●●%ということになっていただいております。ただし、これらはリパーゼで得られた結果ということで、ホスホリパーゼA1の情報として適当であるか判断がつかないので、あくまで参考情報としてこちらの回答書内で記載を留めているということでした。

引き続き、机上配付資料1-1の20ページとグレーのファイルの同じく20ページからまた御覧ください。

次はlip182遺伝子の安全性についてです。

1) では、挿入遺伝子の供与体 *V.rubricosa* については、アレルギー性で問題となった報告はなく、文献検索でもヒットする文献は得られなかったため、アレルギー誘発性を有するとは考え難いとしております。本データベースの検索日ですけれども、修正要旨のとおり、2023年6月の最新のものに更新していただいております。

2) でも遺伝子産物であるlip182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く、同様にヒットする文献は得られませんでした。こちらについても同様に検索日を最新のものに更新していただいております。

3) の遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見ですけれども、①人工胃液に対する感受性、こちらはlip182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、処理前・処理後の試料液をSDS-PAGE分析をしております。今回はlip182を示すバンドと人工胃液のペプシンを示すバンドが同じ位置で検出されているため、ウェスタンブロットでも分析を行い、その結果、lip182は反応開始後5分以内に完全に消化されることが明らかとなっております。

人工腸液に対する感受性についても同様に6時間消化処理を行い、分析した結果、lip182は1時間以内に完全に消化されることが明らかとなっております。

③加熱処理に対する感受性ですけれども、lip182は約55℃の処理で残存活性が50%になり、70℃の処理でほぼ失活することが明らかとなっております。

最後に、安全性の4つ目ですけれども、遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見では、lip182のアレルギー誘発性の可能性を調べるため、1つ目、80アミノ酸残

基で35%以上一致するアレルゲンの検索。2つ目、連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルギーの検索。こちらの2つを行っております。結果、lip182は既知のアレルギーの一つであるSch c 1と相同性を示しましたが、こちらは食物アレルギーではないと考えられるとしています。また、Sch c 1、lip182は吸入をばく露経路とするアレルギーですが、適切に使用すれば安全に使用できると考えられ、加えて当該ORFとSch c 1との間に連続した8アミノ酸の一致もありませんでした。

これら1)～4)の結果を総合的に検討した結果、lip182がアレルギー誘発性を有するとは考え難いと結論づけております。

なお、本項目の既知のアレルゲンとの相同性検索実施日なのですけれども、2021年となっておりますが、〇〇〇にも伺いまして、申請者は本年5月25日に更新されて、現在最新のバージョンが22となっているアレルゲンオンラインでの再検索について打診いたしました。申し訳ありませんが、時間的に間に合わず、現状のままとなっております。

26ページ、27ページを御覧ください。

第4-5、構築された発現ベクターに関する事項となっております。

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図については、27ページになりますが、遺伝子導入用ベクターpJPV053の塩基数及び構成を図11に、構成要素を表5に示しております。

28ページを御覧ください。

第4-5・(2)最終的に構築された発現ベクターに目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するORFが含まれていないことを確認するため、遺伝子導入ベクターpJPV053について全体のORF検索をそれぞれ行っております。6通りの読み枠で終止コドンから終止コドンで挟まれた30アミノ酸以上の領域をORFと定義し、検索を行った結果、206個のORFがそれぞれ検出されております。

1)の検出されたORFと既知のアレルゲンとの相同性検索については、22ページ同様、2つの方法で行われ、ORFの食物アレルギー感作性についての懸念は低いものと考えられています。

29ページを御覧ください。

次に、2)として検出されたORFと既知の毒性タンパク質との相同性検索をE-value < 1.0 × 10⁻⁵を指標として検索を行ったところ、相同性を示したORFはございませんでした。

31ページ目からが第5-2、導入遺伝子に関する事項になります。

(1)制限酵素による断片地図に関する事項です。pJPV053をIFO4177株に導入する際には、●●●が用いられ、これによって●●●と考えられます。pJPV053が●●●に挿入されたかを調べるため、次世代シーケンサーによるJPA011株の全ゲノム解析が行われ、32ページ、図12のとおり、pJPV053が予想どおりに●●●に挿入されたことが確認されております。

32ページ、ショートリードによるゲノム解析の技術の上限により、挿入断片と宿主ゲノ

ムの境界領域より内側の挿入領域の全配列を決定することができず、挿入コピー数が多いことが示唆されたとしております。遺伝子導入用ベクターにより挿入された遺伝子のコピー数を推定するためにddPCR解析を行った結果、*lip182*遺伝子のコピー数は●●●であると推定されました。

このddPCR解析による遺伝子コピー数の推定については、前回審議の飼料添加物フィターゼと同様の審議ポイントとして、本日御欠席の〇〇〇宛てに事前に御意見を伺っております。〇〇〇からのコメントとしては、今回のddPCRの結果は問題ないということでした。

続きまして、第5-2- (2) ORFの有無についてでございます。遺伝子の導入領域における5'及び3'末端近傍配列と接合部のORF検索を行っております。まず、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として定義して検索を行った結果、*niaD*遺伝子座の遺伝子挿入部位では78個のORFが検出されました。

33ページを御覧ください。

1) で検出されたORFと既知アレルゲンとの相同性検索を実施したところ、*niaD*遺伝子座において宿主ゲノムと挿入配列をまたぐORFと80アミノ酸残基で35%以上が一致するアレルゲンは検出されず、同様にORFと連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンも検出されませんでした。

また、2) で検出されたORFと既知の毒性タンパク質との相同性検索をE-value < 1.0 × 10⁻⁵を指標として実施しました結果、一致したORFはありませんでした。

よって、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、本酵素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たとしております。

続きまして、34ページの第6、製造原料等に関する事項ですが、製造原料は全て食品への使用が認められた品質のもので、これまで安全に使用されてきた実績があるとしてございます。

35ページ、第7の遺伝子組換え食品添加物に関する事項です。

諸外国における認可、食用等に関する事項ですが、*lip182*製品は2019年以降に、欧米で販売が開始され、デンマークでは食品用加工助剤として承認、米国ではGRASに基づき安全性が確認されているとしております。

こちらはまた修正がありまして、机上配付資料1-1、6月16日の修正要旨の35ページを御覧ください。

こちらにありますように、申請者宛てにデンマークと米国以外に現在申請中の国があったりするかを確認したところ、現在EFSAに申請しており、審査中ですということでした。

また、机上配付資料1-2-1、こちらはノボザイムズジャパンからの回答書ですけれども、こちらの確認事項3を見ていただきますと、申請者からは、●●●ということでした。こちらは●●●というようなことでした。

36ページ、また要旨にお戻りください。

第7-2、組換え体の残存に関する事項です。lip182製品にはJPAo011株の染色体DNAが残存しないことが確認されております。

37ページ、3、非有効成分の安全性についてでございます。試験バッチの分析値は、我が国の食品、添加物等の規格基準を満たしており、安全性に問題がある非有効成分や代謝物がlip182製品中に含まれるとは考えにくいとしております。

4、精製方法及びその効果に関する事項ですが、製品中には生産菌であるJPAo011株が残存しないこと、また、製品中のlip182の純度が78～86%であることが記載されております。

最後の39ページの結論を御覧ください。

遺伝子組換え微生物を利用して製造された食品添加物について、当該遺伝子組換え技術によって作成された微生物が有害な物質を産生することは考えられず、当該食品添加物は安全衛生に配慮された設備を使用して製造されたものである。これらのことから、本申請添加物は安全であると考えられるとしております。

説明は以上になります。

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ければと思います。

今回のはやたらに机上配付資料が多うございまして、それは事前にチェックして、ここはどうなっているのかと質問して、それで答えが返ってきているということなので、だから、最初からこういうふうにならなければ出してくれなかったわけではなくて、こちらが指摘したらというところがあるのですよね。

修正版の中で、机上配付資料1-1の7ページは、一番下に染色体上にどういう形が入っているのかを図で示してくれというもので、この形で個々に変えていただけると、●●●、つまり、●●●という形質が双方されているということが確認されている。

これで中身とかプラスミドのコピー数については確認し切れなかったということなのですが、大体麹菌もしくは*Aspergillus*属の菌ですと、通常は挿入プラスミドDNAがプラスミドの形で入れる発現、発現プラスミドと申しますが、これが1コピー相同組換えでぽんと入りますね。こういうふうに入るのは割とまれな現象なのですけれども、この菌類ですと生産量というのは発現カセットの数にかなりきれいに比例しますので、だから、ここでもlip182のホスホリパーゼの遺伝子が多コピー入っているものをかなり根性を出してしゃかりきで選んだのだらうと思います。

こういう場合、特に麹菌では素直に●●●多コピーでタンデムで入ることが知られておまして、途中で変なことが起こるとかそういう例は私も聞いたことはございません。なので、●●●中身は全塩基配列をきっちり確認できているわけではないようですが、現在の技術ではそれはそもそも無理です。なので、これに矛盾するようなデータはないということと、それから、別の方法で恐らく●●●コピーであるということが確認できるので、私はこの点はこれでよろしいかなと。〇〇〇からの質問でもございましたけれども、私も一応麹菌を研究しておりますので、私はこれで問題ないかなと考えています。

申請書の10ページにあるところ、ロイシンの遺伝子は、これはロイシン非要求性ということ元は元の麹菌の宿主がロイシン要求性であったということの意味を意味して、非要求性を獲得したとその後読めるので、本当かと質問したら、これはあっさり削ってきまして、大体麹菌は*A.oryzae*で要求マーカーのついている株を選抜するのは非常に大変でして、ロイシン要求性のものは今のところ私の知る限りでも知られていないです。なので、絶対間違いだろうと思ったらこういうふうを書いてきて、酵母の*LEU2*遺伝子は大腸菌で言えば*leuB*に相当して、これはそのまま読めて通用するというのは分かっておりますし、また、*LEU2*遺伝子は安全性については既に確認もされておりますので、これはこれでよろしいかなと思います。

それから、機密の18ページから19ページのアミノ酸配列から立体構造のところ、恐らく本日はここが一番重要なところになるかと思うのですけれども、アミノ酸の配列としては●●●%そこそこしか似ていない。だけれども、立体構造は似ている。重ね合わせてみたらそっくりだから、ほぼ類似の構造だと主張しています。問い合わせましたところ、図7のところアミノ酸配列から予測されると書いてきました。なので、これは実際に確認されたものではなくて、最近のコンピュータープログラムでやったものです。でも、最近のコンピュータープログラムは、既に報告のあるものについては結構精度高く立体構図が予測されるも聞いておりますので、この辺をどのように評価するかという点が重要かと思えます。消化制限等につきましては、この辺のところは本日重要なところかと思えます。

あともう一つ、アレルギー検索、これは最新のアレルギーデータベースでということなのですが、申請は実際に厚生労働省のほうに来て、そこでしばらくやり取りして、またこちらに回ってきて、実際に業者から申請されてこちらに回ってくるにはかなりの日数がかかりますので、これが必ず最新ではないといけないというのはいささか酷かと私は常々思っています。でも、本日審査したという審査日時というのは記録に残るわけなので、後からでもいいから最新のデータベースを要求するのは正当なことかと私も考えています。ただ、申請時点で最新ではないというのを責めるのはいささか酷かなとは実は常々思っています。

先生方、本申請につきまして御意見をよろしくお願いいたします。

18ページのところ、やはりアミノ酸配列から類似していると。これはかなり類似していると元は書いてあったのですが、その辺の表現を少し緩めていただいたのですが、もともと立体構造が似ているかどうかというのは安全性審査に絶対必要な条件ではございません。ではありますけれども、彼らなりにこのような立体構造予測のデータなどを出してきておりまして、これはこの組換えタンパク質の性質を推定するのに結構大きな情報となりますので、こういうものがあるのならば出していただきたいと我々は最近要求することがあって、そういった状況でございます。

これに関しまして、参考にしかないデータではありますが、アミノ酸配列●●●%そこそこ、コンピューター予測ではそっくりということで、まあまあ類似しているという

言い方ですが、これはよろしいでしょうか。

〇〇〇 アイデンティティーはさほど高くはないですけれども、類似したアミノ酸という形まで入れると、そこそこ高い相同性というか類似性になりますので、確かに〇〇〇のおっしゃるとおり、参考程度にしかならないですけれども、コンピューター予測でもかなり重なっているかなと読み取れるように思いますので、今回のホスホリパーゼに関してはこのくらいの表記で十分カバーされているのではないかなと思っております。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかが。

〇〇〇 これは特に大丈夫だと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、この辺はいかが。

〇〇〇 特段問題はないかと思うのですが、モデリングに関して言うと、これは多分既に結晶構造が解かれているものに対して寄せていっているアルゴリズムではないかなと思うのですけれども、違うのですかね。それが問題になるということではないのですけれども、解釈の仕方として、何かモデルを持ってきて、それにモデリングをしているようなイメージがあるのですけれども、それでいいのか。でも、同一性で●●●%ですから、そんなに問題はないのではないかなとは思いますが。

〇〇〇 ありがとうございます。まあいいかなという御見解ということでよろしいでしょうか。

〇〇〇 そこに関してはそれほど問題はないかなと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

もうお一方ぐらい、ここは重要なポイントだと思いますので、〇〇〇先生、御見解を。

〇〇〇 〇〇〇でございます。

立体構造の予測なので、あくまで参考情報という形にしかならないという位置づけかと思っておりますので、●●●%の相同性で立体構造は比較的よく似ていると予想されるというような解釈をすれば、それで問題ないのではないかと思います。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

どうぞ。

〇〇〇 失礼します。

1点、〇〇〇にもこちらを伺っておりまして、御意見を紹介させていただきますと、NCBI、BlastPにおいて配列の相同性を検索していただきました。ポジティブが、アミノ酸は異なりますが、性質の近いアミノ酸への置換を考慮した場合の数値ということで、そちらも含め

ると、立体構造と併せて妥当と言えるのではないかという御意見をいただいております。
○○○ ありがとうございます。

Blast検査を○○○は自分でやってくださったのね。それで特に矛盾ないデータと竜一先生もお考えのようなので、よろしいかなと思うのですが、この点について、先生方、よろしいでしょうか。

○○○、どうぞ。

○○○ ○○○でございます。

御議論本当にありがとうございます。

それで、私、こうやって提示されているデータで、ここでこういう議論をして、今回の場合、後の審議になると思いますけれども、評価書でこの立体構造の類似性みたいな話は全く入れていないですよ。例えばそういうデータが出されて、この調査会もそれをおおむね受け入れたとか、そういうことまで入れるような話なのか、あくまで参考データかというようなことも。これからそういう同等のある類似性なり、そういう議論のときに、評価書まで入れるレベルなのか、参考までのレベルなのかというのは、今、指針の改訂等をやっている中で、そんなことも何となく頭に入れながら議論していただけるとありがたいなと思います。

それで、今回はまだ評価書まで入れなくてもいいのではないかなというのが私の個人的な、感想なのですけれども、それは御議論いただいて、少し言及したらいいのではないというのは、この調査会のこのデータに対する扱いはおおむねその考え方を認めたというようなことになるのかなと。

○○○ ありがとうございます。

立体構造が、本当にこのデータが欲しいのは基質特異性が問題になるときというのがこれまでであったと思います。今回のホスホリパーゼは、その中でもA1と基質特異性がはっきりしておりますので、だから、私の考え方としては、今回は立体構造に関するデータとかその審議は評価書案に書かなくてもよいかなと思います。

また、こういうものが欲しいときは、今まではたしか基質特異性が問題になったときは何とかならないかと要求していたようにも思うのですけれども、この辺、先生方、御意見をいただくとありがたいのですが、○○○と何回かこの辺は議論したことあるように思うのですけれども、○○○、いかが。

○○○ 私は参考人を含めて14年目ぐらいですけれども、かなり初期の頃は今の指針でそもそも基質は何を使うとか、酵素の特異性というものについて実は触れられてなくて、割とその部分に関しては目隠しで審査していた経緯が結構長くありました。植物の代謝系に作用するような導入遺伝子、植物のほうはそういう観点で見ているのですけれども、添加物のほうはそういう観点があまりなくて、割とプロテアーゼなどだとすごく相同性が低いだけでも同じ反応をしますよみたいなものが出てきて、これは本当に同じですかという形になったときに、基質認識部位がどうなっていますかとかそういう質問をして、そ

を確認してきたという経緯がありました。今回に関して言うと、ホスホリパーゼでこのくらい相同性があれば僕は全然問題ないなと実は思っています。今、ガイドラインの改訂をやっていますので、こういうケースではやはり出してくださいというのを技術的文書のほうに入れるのか、指針のほうに入れるのかは分かりませんが、そういうところもある程度はしっかりした段階で将来的に評価書に入れるとかというところを判断していけばいいかなと。過去に遡ってやっていないじゃないみたいに言われても困るなというところもありますので、今の段階では入れないほうがいいかなとは思っています。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、お願いできますか。

〇〇〇 これは多分技術書に書くのではないかなという気はするのですが、そうではなくてはいけないかという、まだそうではないと思うので、私の感覚はそういう感じです。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほかの先生方、この辺については。

〇〇〇、大体こんな感じでよろしいですか。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 それでは、本申請についての評価について御意見、実は事前にかなりやり取りしていて、そこで結構問題点は洗い尽くされて仕事が終わっているかなという感もあるかなという感じなのですが、先生方、いかがでしょうか。

人工胃液、人工腸液についても、これはなかなか溶けづらいところはあるようですが、それもウェスタンもやっていて、人工胃液だと5分、人工腸液だと1時間、70℃で失活とか出ていたり、それから、アレルギー検索についても、食物アレルギーではなさそうだと考えられるといった結論が引き出されておりますけれども、大体この辺もこういった記述でよろしいでしょうか。

特に23ページの辺り、アレルギー検索でヒットしたものについてこういった考察がありますが、おおむね納得のいく考察というか、このぐらいで仕方がないなという考察でございませうか。先生方、よろしく願いいたします。

では、〇〇〇、お願いできますか。

〇〇〇 問題視するべきところか分からないのですが、20ページのほうではPubMedのサーチを最近にやり直していらっしゃって、22ページの19行目のほうではやり直していないということなんでしょうか。

〇〇〇 ありがとうございます。

20ページのほうではPubMedですぐに申請者（担当者）が確認ができたのですが、22ページのネブラスカ大学のほうは海外にある本社に確認する必要があるため、ちょっと時間がかかるという背景があると伺っております。

〇〇〇 それでは、〇〇〇、いかが。

〇〇〇 すみません。先ほど遅れて入室して、先ほどタンパク質の立体構造のところはこのページの話がされているのか分かったのですけれども、今のお話はまだページを見つけていませんで、ファイルがたくさん送られてきたのですけれども、どのファイルの話題でしょうか。

〇〇〇 申請で23ページでアレルゲン検索で幾つか引っかけたものについて考察がなされていて、結論としては食物アレルギーではなさそうだとしたことなのだけれども、このぐらいの書き方で先生は納得されているかなと。

〇〇〇 ありがとうございます。

グレーのファイルの中のページ数でしょうか。

〇〇〇 グレーのファイルの中です。

〇〇〇 このグレーのファイルの23ページ、アレルゲンの検索の、アレルゲンの一致、その上のあれですね。

〇〇〇 一致したものについて説明が書いてあるけれども、こんな説明でおおむね納得いくかなというところです。

〇〇〇 すみません。

妥当なところではないかと思うのですけれども、そんなに大きく問題視するほどではないかなという感覚でございました。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、もうお一方、〇〇〇、お願いできますか。

〇〇〇 〇〇〇でございます。

22ページから23ページにかけての考察の部分はきちんと書いていただいていると思いますので、私はこれでよいのではないかと思います。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

最新ので検索をお願いしているところですよね。それでは、最新の検索の結果は、ここは宿題ということにさせていただいて、その結果が届いたところで、私とそれから関係される先生、例えば〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇あたりに私のほうでお願いしたいと思うのですけれども、チェックしていただいて、特に最新のデータベースで問題ないということならいいかなという形にしたいと思うのですが、その点はよろしいでしょうか。

ほかにございますでしょうか。

ということであれば、本申請については安全性には特に問題はないと判定したいと思いますが、先生方、よろしいでしょうか。御意思の表示をお願いいたします。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 ありがとうございます。

安全性には問題ないということなので、それでは、最新のデータベース検索の結果が届

いたらまたそこはチェックさせていただくということで、それを前提に評価書案の審議に行きたいと思います。よろしく申し上げます。

待機している方は解除してあげてください。

〇〇〇 それでは、評価書案の説明に移らせていただきます。

こちらは「資料」と書いてあります①JPAo011株を利用して生産されたホスホリパーゼ、ページは6ページから御覧ください。

それでは、始めさせていただきます。

まず、I の評価対象添加物の概要のところでございます。

51行目から、本添加物は *Aspergillus oryzae* IFO4177株を宿主として、*Valsaria rubricosa* ATCC24940株由来のホスホリパーゼ遺伝子を導入して作成されたJPo011株を利用して産生されたホスホリパーゼA1 (lip182) となります。

57行目からII. 食品健康影響評価の記載になります。

60行目、比較対象とした従来の添加物は *Aspergillus niger* JPAN002株を利用して生産されるホスホリパーゼ、有効成分はホスホリパーゼA1となっております。

7ページを御覧ください。

80行目、宿主は、清酒麹から分離された野生株 *A.oryzae* IFO4177株であり、87行目から、lip182遺伝子の供与体は *Valsaria rubricosa* ATCC24940株となっております。

95行目のとおり、lip182遺伝子はリン脂質の1位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成するホスホリパーゼA1であるlip182をコードしております。pyrG遺伝子とLEU2遺伝子はいずれも選択マーカーとして用い、lip182/pyrG遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクター全体を宿主に導入いたしました。

103行目、3. 宿主の添加物製造への利用経験または食経験に関してですが、*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ございます。

次に、8ページを御覧ください。

111行目、5. 遺伝子組換え添加物、lip182製品についてです。lip182は、JPAo011株を生産菌として、従来のホスホリパーゼと同様に培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造されます。

用途及び使用形態、有効成分の性質等は、従来のホスホリパーゼA1と同様となっております。

127行目、6. 遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違についてです。lip182と従来のホスホリパーゼA1 (pla1) との相違点は、生産菌、遺伝子供与体並びにアミノ酸配列及び残基数が異なり、JPAo011株と宿主IFO4177株との相違点は、JPAo011株はlip182遺伝子が導入されており、lip182生産能を獲得している点となっております。

こちらは評価書に修正が入っておりますけれども、赤字の部分は消していただく形となっております。

ここまでがⅡの健康食品健康影響評価、第1のものとなっております。

続きまして9ページ、第2. 宿主に関する事項です。宿主は*A.oryzae* IFO4177株で、国立感染症研究所のBSL2及び3の病原体等に分類されておらず、病原体等のリスク群1に分類されており、一般的に非病原性の微生物となっております。

156行目、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はなく、159行目、病原性を有する外来因子の存在を示唆する報告もありません。

171行目、第3. ベクターに関する事項としては、遺伝子導入用ベクターpJPV053の作成には、*Escherichia coli*由来のプラスミドpUC19が用いられ、このプラスミドpUC19の塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図が明らかとなっております。また、既知の有害塩基配列は含まれていないこと、薬剤耐性遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子が含まれていること、伝達を可能とする塩基配列は含まれていないこと、自律増殖能を持つこと、これらが次の10ページ冒頭で明らかとなっております。

10ページ199行目、第4. 挿入DNA等についてです。*lip182*遺伝子の供与体は*V.rubricosa* ATCC24940株、●●●*pyrG*遺伝子の供与体は*A.oryzae* IFO4177株、*LEU2*遺伝子の供与体は*S.cerevisiae* CBS1171T株、プロモーター配列及びターミネーター配列の供与体は宿主*A.oryzae* IFO4177株及び*A.niger* B0-1株となっております。

212行目にありますとおり、これら供与体*V.rubricosa*、*A.oryzae*及び*S.cerevisiae*は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるBSL2及び3に分類されておらず、*A.oryzae*及び*S.cerevisiae*はヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられ、病原体等のリスク群1に分類されております。

217行目、2. 挿入遺伝子または遺伝子、次のページに移りまして、11ページ目、①*lip182*遺伝子の機能については235行目から、挿入遺伝子である*lip182*遺伝子の供与体についてアレルギー誘発性を示唆する報告はなかったこと、239行目から*lip182*遺伝子産物がアレルギー誘発性を有するとは考えにくいといったことを記載しております。

また、249行目からc. 遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性ですが、人工胃液に関する感受性はSDS-PAGEとウェスタンブロット分析の結果、試験開始5分以内に消化されること、人工腸液については同様に分析した結果、試験開始1時間以内に消化されることが示されております。

また、12ページ目です。

(c) 加熱処理に関する感受性については258行目から、pH4.0で各温度帯で30分処理した後の活性を測定した結果、70℃の処理によってほぼ失活し、90℃の処理によって完全に失活することが示されております。

*pyrG*遺伝子の機能については267行目からの記載のとおり、*pyrG*遺伝子の供与体である*A.oryzae*は、適切な環境で扱われている限り、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられ、*A.oryzae*由来の酵素としてAsp o 13及びAsp o 21がアレルゲンとしてデータベースに登録されていますが、これらは吸入性アレルゲンとして整理されるということです。

*LEU2*遺伝子の機能についても、276行目から*LEU2*遺伝子の供与体である*S.cerevisiae*にはアレルギー誘発性を示唆する報告はなかったとのことでした。

よって、以上のことから、*lip182*、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ及びロイシン合成酵素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。

次に、3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項です。

285行目からプロモーターに関する事項、293行目からターミネーターに関する事項を記載しております。

13ページ301行目、(3)についてですが、宿主の*A.oryzae* IFO4177株が有する●●●は、●●●としております。●●●としております。

同じく13ページ307行目、4. ベクターへの挿入DNAの組込方法を御覧ください。プラスミドベクターpUC19に*na2*プロモーター断片、*lip182*遺伝子断片、*amg*ターミネーター断片、●●●*LEU2*遺伝子断片、*pryG*ターミネーター断片、*pryG*遺伝子断片、●●●等を挿入し、遺伝子導入用ベクターpJPV053を作成しております。

313行目、5. 構築された発現ベクターに関する事項です。

(1) 遺伝子導入用ベクターpJPV053の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっており、(2) 最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するORFが含まれていないことについては、第5-2-(2)の記載のとおりです。

(3) 意図する挿入領域は遺伝子導入用ベクターpJPV053全体であり、(4) 遺伝子導入用ベクターpJPV053は、目的外の遺伝子の混入がないように精製キットを用いて純化されております。

333行目、6. DNAの宿主への導入方法について、遺伝子導入用ベクターpJPV053を宿主に導入後、●●●培地にて選択し、JPAo011株を得ています。

次に14ページ337行目、7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項、遺伝子導入用ベクターpJPV053には抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれておりません。

341行目、第5. 組換え体に関する事項です。

1. 宿主との差異に関する事項ですが、JPAo011株は、*lip182*遺伝子発現カセット、*LEU2*遺伝子発現カセット並びに*pyrG*遺伝子発現カセットが多コピー導入されている点で宿主と異なっております。

2. 遺伝子導入に関する事項ですが、(1) 制限構想による切断地図に関する事項としては、JPAo011株において挿入された遺伝子導入ベクターにおける制限酵素認識サイトは確認されており、*lip182*遺伝子、*LEU2*遺伝子並びに*pyrG*遺伝子の発現カセットの導入位置及びコピー数を確認するためにシーケンス解析を行った結果、1か所に複数コピー挿入されていることを確認し、ddPCR法により*lip182*のコピー数は●●●であることが判明しております。

次に355行目、ORFの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項、*lip182*遺伝子、*LEU2*遺伝子並びに*pyrG*遺伝子の発現カセットの導入により新たに生じるORFを検索するために、挿入DNA及び5'近傍配列及び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78個検出されました。

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した結果、連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは検出されず、また、連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンも検出されませんでした。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質の相同性の有無を確認するために、E-value 1.0×10^{-5} 未満を指標として検索を行った結果、相同性を示したORFはありませんでした。

15ページ、第6. 組換え体以外の製造原料についてです。*lip182*の製造原料及び製造器材は、食品をその製造において安全に利用されてきた実績があり、有害性はないと考えられております。

383行目、第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項、1. 諸外国における認可、食用等に関する事項ですが、*lip182*は、デンマークにおいて食品用加工助剤として承認等を受けており、米国ではGRASとして認証されています。また、EFSAには申請中となっております。

2. 組換え体の残存に関する事項については、*lip182*に生産菌由来のDNAの残存がないことをPCR分析により確認しており、3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項については、*lip182*の製品化前の酵素サンプルは、我が国の食品、添加物等の規格基準に定める規格値を満たしております。

4. 精製方法及びその効果に関する事項は、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、これらの工程において安全性に問題のある物質が混入することはないと考え、5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項については、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられます。

411行目からの第8ですが、最後の16ページに行きまして、第2から第7までの事項により、安全性の知見が得られるとされております。

評価書案の説明は以上となります。

〇〇〇 ありがとうございます。

評価書案につきまして御意見、御指摘等はございますでしょうか。細かい字句等でしたら、また後ほど事務局にお伝えいただければと思います。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 てにをはレベルのことで恐縮なのですが、13ページ目の302行目、320行目、324行目、329行目のところが、例えば302行目は性質等が明らかであること、それから、325はフレームが含まれていないこと、という記述になっているのだけれども、報告書の

記載方法としてはこれは恐らく不適切で、本委員会の直前に修正するのは結構手続が大変なので、もう一回、一通りチェックしてください。

〇〇〇 ありがとうございます。記載については再度確認いたします。

〇〇〇 ほかにございますでしょうか。

〇〇〇 先ほどの〇〇〇からのご意見件で、これは分かりにくくなっているのですけれども、(2)の原則としてこれこれに含まれていないことというのは、タイトルでして、(2)はそういうことを確認する項目ということなのです。

〇〇〇 これはいずれにしても、評価書というのは我々が公表、この調査会が外部に公表する、この概要書というのは一切非公開で、これだけがホームページに吊されているので、なるべく分かりやすいほうがいいと思います。もう一回分かりやすいという視点で見ていただければなと思います。よろしく。

〇〇〇 ありがとうございます。

これまでは評価基準の項目に沿った形で評価書を書かせていただいていたのでこのようになっております。少し課内で検討させていただきます。

〇〇〇 ほかはよろしいでしょうか。

それでは、今のところはともかく、その辺、修正、また、確認したところで食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続を進めていきたいと思っております。

ありがとうございました。

それでは、継続品目であります「**Ra α 3114株**を利用して生産されたプロテアーゼ」について審議を行いたいと思っております。

枯草菌を宿主にして、好熱菌から *Thermus aquaticus*由来の耐熱性プロテアーゼ、**aqualysin1**というものですが、人工胃液、人工腸液試験のところでは少々つまずきまして、今回3回目となります。

それでは、よろしく願いいたします。

〇〇〇 それでは、本件について御説明をさせていただきます。

本件、先ほど御紹介いただいたとおり、3回目の審議となります。前回は令和3年11月の専門調査会で御審議をいただいております。

まず、簡単に本品目について御紹介をさせていただきます。

お配りしておりますプラスチックのファイルを御用意ください。

プラスチックのファイルは2章立てとなっております。前半部分が前回の指摘事項に対する回答書、そして、分かりにくくなっておりますが、青い仕切り紙が途中にございまして、そこから先が修正版の要旨となっております。

こちらの修正版の要旨のほう、後半の部分、第1ページをお開きください。

本品目は *Thermus acuaticus*由来の耐熱性アルカリプロテアーゼ遺伝子を *Bacillus*

*subtilis*に導入し、発現させた耐熱性のアルカリプロテアーゼでございます。一般的なプロテアーゼと比べてより高い温度帯で活性があり、かつ失活の温度も低いというのが特徴であるということでございます。

本添加物は、製パン・製菓において主に生地の混捏時に生成されるグルテンを分解し、生地の進展性を上げることを目的として添加されるものということでございます。

本品目ですけれども、先ほど座長より御紹介いただいたとおりでございます。初回の申請資料においては、遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見というところで、分析のツールでありますPeptide cutterを用いたコンピューターシミュレーションを行った結果が記載されてございました。当時、調査会といたしまして、本シミュレーションについては経時的な変化を伴った試験ではなく、タンパク質分解性を評価したことにならないということで、人工胃腸液試験を実施するようとの指摘がされてございました。そして、その指摘を踏まえ、令和3年11月の前回の調査会において人工胃腸液試験の結果が提出されたところでございます。

その当時の結果につきましては、このプラスチックの冊子を一番最初からめくっていただいて、3ページ目に紹介がされておりますので、こちらも簡単に紹介させていただきます。

3ページ、図A、図Bとございまして、図Aが人工胃液によるAQ1の消化性試験の結果でございます。こちらは反応停止に炭酸ナトリウムが使われているということでございます。

そして、図Bでございますが、人工腸液によるAQ1の消化性試験の結果となっております。こちらは反応停止に熱処理100℃5分による反応停止をしてございます。

続いて、結果を見てまいりますけれども、まず図Aの人工胃液による結果でございます。こちらはレーン1～3がコントロールとなっております。レーン1がペプシン単体、レーン2がAQ1単体、レーン3がAQ1と反応停止剤として用いられている炭酸ナトリウムの混合物ということでございます。結果を見ますと、レーン3、すなわち本添加物であるAQ1と炭酸ナトリウムのみレーンにおいて、ペプシンが添加されていないにもかかわらずバンドが消えているというような現象が確認されてございました。人工胃液であるペプシンが含まれていないのにバンドが消失するというので、消化性を見ることになっているのかというところが当時議論になってございまして、このことに関する当時の申請者の考察といたしましては、炭酸ナトリウムとAQ1が何らかの相互作用を起こしたのではないかと、炭酸ナトリウムを加えたことによるpHの変化による何らかの影響があったのではないかと、考察が示されたところでございます。

そして、その右側、ウェスタンブロットの結果についても御紹介させていただきます。併せてウェスタンブロットを行っており、こちらもレーン1と2と3がコントロールになってございまして、レーン2が同じくAQ1のコントロール、そして、レーン3がAQ1と炭酸ナトリウムを加えたコントロールとなっているのですが、こちらもペプシンが添加されていないレーン3においても、レーン2と比べてバンドに変化が生じてございます。こちらを見

ますと、レーン3においてレーン2におけるAQ1のコントロールのバンドよりも分子量が増えているところにバンドが来ているということが見られておりまして、加えて、その上の150kDa程度のところにももう一本のバンドが見えているということでございました。このことにつきましても、何らか多量体が作られていたのではないかとの考察がございましたところでございます。

続いて図B、人工腸液でございます。こちらも見ますと、レーン1と2がコントロールにそれぞれなっております、図C、SDS-PAGEを見ておりますと、レーン1がパンクレアチンのコントロール、レーン2がAQ1のコントロールになっているのですが、レーン2の時点でバンドが見えておりませんでした。このことにつきましては、AQ1が多量体を作る可能性があり、ゲルに入っていついていないのではないかとの考察が当時示されていたところでございます。

いずれにいたしましても、調査会としては考察の妥当性については判断することができないという結論になりまして、戻っていただきまして1ページのほうに記載がございました指摘事項を当時示したところでございます。

指摘事項の内容といたしましては、先ほどの結果に対する考察の妥当性が判断できないため、下に記載のある1~3の事項等を考慮し、必要に応じてデータの補完を行い、消化性について適切に考察を行うこと。そして、1番、人工胃液及び人工腸液による消化性が明らかであるタンパク質を用いた試験系の適正さの検討。2番が検出感度や変性法など実験条件の検討を行うこと。3番が実験結果の再現性の検討を行うこと。この3点を指摘したところでございます。

それに対する回答が2ページから記載されてございますので、御覧ください。

2ページですけれども、まず議論になった当時の主なポイントとして改めて申請者がまとめ直しているものがこちらに記載がございました。

後半、人工腸液による消化性試験の議論のポイントとして、今回新たな視点として申請者から出された問題点というのがございまして、図BのSDS-PAGEのCBB染色において、コントロール以外のパンクレアチンのブロードバンドが観察されないことが考察の妥当性へ影響を与えているということも新たに視点として追加されてございました。

そして、まず1つ目の要件に対する回答でございますけれども、4ページをお願いいたします。

人工胃液及び人工腸液による消化性が明らかであるタンパク質として、回答の中ではキシラナーゼを使って実験がされてございます。4ページの後半部分からその結果等がございまして、本実験の結論といたしましては、SDS-PAGE後のCBB染色、ウェスタンブロットの両方の結果より、キシラナーゼは1分以内に人工胃液により分解されるといったことが示唆されたということでございまして、加えて、この結果が既知のキシラナーゼの消化性試験の結果と矛盾がなかったということでございます。すなわち、前回行われた消化性試験の人工胃液試験については、試験系自体は妥当であるというようなことで報告

がされております。

続いて、5ページ後半ですけれども、人工腸液評価性試験の妥当性の検証でございます。こちらと同じくキシラナーゼを用いて実験を行っております。SDS-PAGE及びウェスタンロットの結果は6ページに記載がございますけれども、結果といたしましては、人工腸液によってキシラナーゼは180分では分解されないということが示唆されたという結果になってございます。そして、人工胃液及び人工腸液の試験結果については、既知のキシラナーゼの消化性試験の結果との矛盾が見られなかったということで報告がされてございます。

続きまして、指摘事項・要件2に対する回答でございます。要件2、検出感度や変性法など試験条件の検討ということでございます。

まず、人工胃液試験の検討につきましては、前回、反応停止剤として炭酸ナトリウムを用いていたところでしたが、今回、ペプスタチンを使用したペプシンの反応停止が検討されてございます。

AQ1の消化性試験のペプスタチンによる反応停止を行った結果というのが7ページから8ページに記載がございます。その結果、SDS-PAGE後のCBB染色においては、消化性試験の1.5分でAQ1が分解されている。一方、ウェスタンブロットでは、AQ1のバンドが消化性試験60分で消失するということによって、AQ1は人工胃液に60分で分解されるといった結論が示されるということで報告がされてございます。そして、今回、ペプスタチンを使用した反応停止方法に変えることによって、前回見られていたような問題というのが見られなかったということでございました。

続きまして、AQ1の人工腸液評価性試験の検討でございます。前回、熱処理によってパンクレアチンを失活させ反応を停止するという方法を取っていたのですが、今回、本申請品目であるAQ1は高い温度帯で活性を示すプロテアーゼであるということから、反応停止のための加熱処理の段階でパンクレアチンがAQ1に分解されているのではないかとこの考察が付け加えられておまして、これを回避するために非加熱の方法でのパンクレアチンの反応停止を検討したということでございます。このため、反応停止をするため、パンクレアチンのプロテアーゼ機能の中でも主要な役割を持つトリプシンに強い阻害活性を持つPMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) を利用してパンクレアチンの停止を試みたということでございます。

本実験の結果につきましては、9ページに記載がございます。こちらの結果を見ておますと、SDS-PAGEの結果につきましては、レーン3以降パンクレアチンのバンドと重なっているため、明確なAQ1のバンドの消失が確認できなかったということでございまして、ウェスタンブロットを同時に行っているのですが、こちらを見ますと、レーン8においてもAQ1のバンドが確認されるということで、AQ1は人工腸液で120分処理しても分解されないということが示唆されたと報告されてございます。

また、ウェスタンブロットを見てみますと、AQ1に対し2つのバンドが観測されてございます。37kDa及び150kDaの2個が検出されているということで、併せて報告がされてお

ました。

この2本のバンドに関する考察は10ページに記載されてございまして、こちらは前回の調査会において提出された結果の考察においても同じような考察がされておりましたが、このAQ1の特性として多量体を形成するものであるというような考察がされております。このためであるということで考察が記載されているところでございます。

続きまして、指摘事項のうち要件3、試験結果の再現性の検討でございまして。こちらは先ほどの要件2の手法の再現性の検討がされてございます。

まず、ペプスタチンを用いたAQ1の人工胃液評価性試験の再現性でございまして。こちら、方法といたしまして、12ページに記載がございまして。同様にペプスタチンを利用した新手法にてキシラナーゼを用いて人工胃液の消化性試験の比較を行うということがされてございます。その結果でございまして、結果としては異常な結果は出ておらず、キシラナーゼの消化性試験の結果、すなわち5分以内に人工胃液によって分解されるという結果が示されたということでございまして、既存のキシラナーゼの消化性試験の結果と矛盾しないということで、第三者が再現できる堅牢性があると考えられると考察されてございます。

続いて、13ページでございまして。PMSFを利用した新手法による人工腸液試験の再現性でございまして。今回、コントロール以外のパンクレアチンのバンドが観察されないといった現象が前回の人工腸液試験の結果として出てきたということで考察されていたところなのですけれども、その理由として、AQ1が高い温度帯で活性を示すプロテアーゼであるということ、反応停止のための加熱処理の段階でパンクレアチンが分解されていたのではないかとことが考察で示されており、非加熱処理であるPMSFによる反応停止の手法が要件2において提案されたところでございまして、この現象が起こらないということが先ほどの考察によって示されていることから、この原因とそれに対応した対策が取られているということによって、PMSFを利用した新手法によるAQ1の人工腸液消化性試験は第三者が再現できるものであると考えるということで、追加の検証が行われなかったということでございまして。

また、この人工胃腸液試験による消化性試験の再現性については、外部委託サービスを用いたものも検討されたということでございまして。可能性のある機関数社に問い合わせたところ、消化性試験の受託サービス等は行っていなかったということで、今回の検証は断念したと併せて報告がされてございます。

指摘事項に対する対応の回答については以上でございまして、それに基づいた要旨の該当部分について14ページから16ページに修正が記載されてございます。

あわせて、17ページに記載がございまして。語句の用法の統一等が行われております。内容といたしましては、本文中、AQ1という単語とAqualysin1という単語が混在して使われていたところでございまして。AQ1を本申請の添加物、Aqualysin1をIUB No.:EC3.4.21.111に属するプロテアーゼの酵素名並びに比較対象の酵素ということで名前を統一いたしまして、それぞれ書き分けるという修正が行われております。

続きまして、本回答書等につきまして、事務局等から質問等を事前にさせていただいておりますので、御紹介させていただきます。

まず、先ほど紹介した要件に対する考察において、人工腸液のほうなのですけれども、ウェスタンブロットの結果についてバンドが2個見られていたということの考察として、多量体のためと考察されていましたが、人工胃液のほうでは見られていないということについて考察をお願いしますということで事前に質問をしていたところ、回答といたしましては、昨年、令和3年11月の前回の調査会の際においても複数のバンドが見られているものがあつたということが書いておまして、加えて、ウェスタンブロットで複数のバンドが観察されるか、シングルバンドで観察されるかは実験条件の違いによるものと考えられるということで回答がされておまして、その明確な理由は明らかになっていないということでした。

続きまして、要旨のほうの8ページにおいて、本申請品目の失活の温度が90℃であるという記載があるのですけれども、片や要旨の17ページ、これは加熱性試験の結果のところでございますが、こちらのほうでは100℃15分で酵素活性をほぼ失うとの記載があるということでございまして、こちらはどちらが正しいことなのかということで事前に質問をさせていただきます。

その回答なのですけれども、机上配付資料2-1の2ページを御覧ください。

加熱性試験の100℃以外の結果がこのとおり記載されてございまして、そもそもこの17ページの加熱性試験の結果については、100℃15分というのは実際のパンの焼成条件に合わせた場合での酵素活性に関する記述であるということでございまして、90℃で実験をしても失活するという結果に矛盾はないということでした。

そして、追加の指摘として〇〇〇から質問いただいたところでございますが、これらの試験結果について、一度高温に上げてから処理した後に温度が下がった際に酵素活性が復活しないか否かについて確認がされているかということも追加で質問させていただきましたが、その回答といたしましては、90℃、100℃の酵素活性測定においては、AQ1の酵素活性の至適温度である70℃で活性測定を行っているということでございまして、質問にあった温度が下がった際の酵素活性が復活しないか否かについては加味した形で実験を行っているということで回答がされてございました。

続きまして、机上配付資料の3ページをお願いいたします。

EFSAにおいてこちらと同名の酵素について評価申請がされていることを事務局において確認いたしまして、今回の申請品目とこちらのEFSAの文書の品目についてどういった関係かについて事前に質問したものでございます。本件については元の申請資料には含まれておりませんでしたので、今回質問したのになります。

そして、回答といたしましては、本品目と同じものであるということで回答がございました。このEFSAの文書においては、2点、安全性に問題がないと結論づけるには十分では

ないとのコメントがございまして、これが机上配付資料中にも記載がございまして、

4ページをお願いいたします。

机上配付資料中、「以下2018 EFSA文書に上げられていたポイントの詳細について記載します」以下に、当該文書に記載されているものの抜粋物が記載されております。これを見ますと、90日間の経口毒性試験から決定された無毒性量、NOAELから計算されたばく露マージンと推定された食事摂取量を考慮して、使用予定条件下でこの食品酵素に対する安全性の懸念はないと結論づけるには不十分であると考えたということがこちらに書いてございます。

このことについて回答がその以下に記載がございまして、現状として、申請者としては2022年に製造工程を改良したということで報告がされております。このことによって、さらに製品中の酵素の純度が向上しているということでございまして、このため、TOS当たりの活性が上がっているということでございまして、その結果、摂取量の推定量が減っているということで併せて報告がございました。このため、要旨中の摂取量の部分については修正がされております。

机上配付資料2-2として配付しております要旨の修正版を御覧ください。

めくってすぐに5ページがございましてけれども、このとおり、プロテアーゼの理論最大摂取量については、元は0.163mg TOS/kg体重/日ということで記載があったのですが、今回修正がありまして、0.033mg TOS/kg体重/日と修正されております。

続きまして、2番目の点として、テストされた食品酵素の全てのバッチで組換えDNAが存在していたということで指摘がされているところでございますが、このことについては事前に〇〇〇より追加の御質問をいただいております。直前にお伝えしていたところ、回答書の中に回答を含めて来ておりますので、それも御紹介させていただきます。

御質問の内容といたしましては、この全てのバッチにおいて組換えDNAが存在していたことに留意するという点について、こういった試験を行った結果であるのか、そして、規制当局がどのような視点でこの指摘を行ったのかということでございます。

回答といたしまして、まずこういった試験を行った結果なのかということでございますが、本申請品目であるプロテアーゼの遺伝子の一部DNAをテンプレートとしてPCRを行い、製品中に組換えDNAが入っていないかの検出を行ったというものであるということでございます。

続いて、規制当局がどのような視点、理由で指摘を行ったのかに関してですけれども、回答といたしましては環境に対する安全性の懸念であるということでございました。

このEFSAの文章に関する記述に関しては、机上配付資料2-2の32ページを御覧ください。

こちらの32ページ、8. 安全性試験に関する事項のところ追記がされたところでございます。それぞれEFSAの文書に記載のあったことのサマリーが載せられているものでございます。

本回答書等についての御説明は以上とさせていただきます。

〇〇〇 ありがとうございます。

残っていた問題はここでは1つだけで、人工胃液、人工腸液試験の結果がいろいろとわけの分からない結果だったのをもうちょっと何とかして頂戴よということで、これは何しろものがAqualysin、プロテアーゼなので、プロテアーゼだからこういう試験をやればプロテアーゼ同士の共食いが始まるので、それもあってこういう試験はいろいろなことが起こるのでということもあるのかなと私も思ったのです。彼らの回答ですが、この実験系、人工胃液については、これは酸性でpH2で実験しますので、炭酸水素ナトリウムで反応を停止するというのが常法なのですけれども、これで炭酸水素ナトリウムで中和すると、AqualysinはpHが9.5ですので、それで働き出すのではないかなと私も後から思いつきました。彼らは結局、ペプシンは活性中心がアスパラギン酸のプロテアーゼですから、特異的にペプスタチンが効きますのでペプスタチンで反応を停止するという実験系を組んで、これでキシラナーゼの試験を行った。それで、この新しいシステムで実験を行うと、そうすると、この場合どうなるのだったかな。たしか5分で消失するのだったかな。

〇〇〇 回答書の7ページ以降でございますけれども、SDS-PAGEの結果としては1.5分で消失ですが、ウェスタンブロットでは60分で、人工胃液では消失するということが示されたところでした。

〇〇〇 そうでしたね。申し訳ありません。ウェスタンまでやるとそういう結果が出ております。

それから、人工腸液のほうは温度を高くして失活させるのですけれども、今度はパンクレアチンは活性中心がセリンのプロテアーゼなので、PMSFで反応を停止させて実験を行っています。この場合もバンドは2本出てくるので、キシラナーゼではちゃんとこのシステムが動くということを確認した上でこの実験を行う。これでもバンドが2本出てくるから、やはりこれは多量体を作るのだよねという結論を出しております。

私としては、彼らなりによく頑張ってくれたのではないかとは思っておるのです。

それから、これをやっている間に、今度はEFSAに申請中だったのが、EFSAのほうでは90日試験をやったら安全性が確認できないと。これはマウスで90日でNOAELに比べて138倍だったというのかな。大体NOAELに対して100分の1がADI (Acceptable Daily Intake) で添加物などは定義して、ADIを間違っても超えないように添加物の使用法というのは規定されるのですけれども、これは食品に混ぜる場合は200ということで彼らはマージンを取っているということなのね。この200は確保できなかったというので、彼らとしては、この当時から比べると精製方法を変えているということでしたので、純度が上がる。

今回の申請は精製方法を変えたほうのプロトコルなのだったかな。そこは読み切れなかったのだけれども、どうぞ。

〇〇〇 製造方法概略図につきましても、今回、机上配付資料2-2として配付しております修正後の申請要旨の7ページから8ページにおいて図が訂正されてございまして、加えて、

製造方法の中の凝集、加熱処理という文章が加えられているところがございます。

〇〇〇 こういう方法で精製方法を改善して、最終産物の純度を上げてこの点もクリアしているという説明でございました。

先生方、論点はかなり絞られておられると思うのですがけれども、御質問、御意見をお願いいたします。

〇〇〇、いかがお考え。

〇〇〇 すっきりはしないですがけれども、間違っことは言っていないので、これでいいのかなとも思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

私も頑張って出せるデータを一生懸命出してくれているかなとは思っっていて、安全義務は果たしてくれているかなとは思っっているのです。〇〇〇、この点は。

〇〇〇 人工胃腸液試験については阻害剤を使うことで、少なくともペプシンやパンクレアチンのバンドが消えてしまうというような事態は避けることにしているんで、それは非常に頑張って検討していただいたのだろうなと思っいます。

ウェスタンブロットでバンドが1本になるか、2本になるかというところは本当に条件次第ということなのではないかと思っまして、これがどのような作り方をした抗体なのかもよく分からないのですがけれども、例えばAQ1の水溶液でもウェスタンでやるとバンドが2本になるということなので、そこは本当に条件次第ということ、ここは私はこの結果を認めてもよいのではないかと思っいます。

したがっまして、私の中の結論としまっしては、人工胃腸液試験については今回のデータを受け入れるという形でよいのではないかと思っております。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

では、もうお一方、〇〇〇、いかが。

〇〇〇 前回のときに私もこの辺りを指摘させていただいたのですがけれども、できる限りのことを検討されているということと、多量体が条件によって生成したりしなかつたりということも往々にしてあることだと思っいますし、全体的に見て問題はないのではないかなと考えます。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

この辺が専門の先生方からはまあいいんじゃないというニュアンスの御意見だと思っますが、先生方、この点につきまっしていかがでしょうか。

〇〇〇。

〇〇〇 実はこれは最初は2018年のEFSA Journalに既に載っっていて、そのときに先ほど言っったMoEの問題が一応指摘されてっいて、結局5年経過しているということが実は私も先

週知ったということで、それで、EFSA Journalの要約を見ていたら、MoEの問題は食安委のこの調査会のスタンスからいって、あまりこれをもってどうのこうの新たに追加の指摘をするということもフェアではないかもしれないと思う部分もあって、ただ、先ほどの recombinant DNAが、結局、最終のFood enzymes、試験の全てのバッチで検出されたというのがわざわざアブストラクトの最後に書かれていて、これはそもそもEFSAの concernというのが一体どうなのか。

EFSA Journalの中をよく読むと、実はこれは製造プロセスと関係しているので、黒で墨塗りのところが結構あって、正確に一体どういうデータでどういうふうにとというのが必ずしも読み取れなくて、ただ、concernは環境に関する安全性ということが主要なconcernだったようなのですよね。だから、これは食安委的にはそんなに大きく問題にするほどのことではないなと思いつつも、一応答えが聞けたらどんな議論だったのだろうかということだけ確認したいなと思って聞いて、今、これを見ると、今回製造工程をいじって、MoE的にも200をカバーした。これを見ると、製造工程は、要するに●●●の工程を1個入れたということだけのようですね。これでrecombinant DNAが全てのバッチで検出されたということも検出されなくなったというようなお話です。考えてみると、汚かったのかなというレベルのことのようなのです。いずれにしても、私はこれ以上今の段階でいろいろ食安委の評価基準からいって特段に追加して言うことではないなと。ただ、EFSAが最終結論をどうするのかなど。今ちょうど出しているの、それは後々確認はしておきたいなと思っています。今、この段階で胃液腸液の皆さんの一番主要なconcernのところが大体いいんじゃないという話になったのなら、追加的に食安委でこれがEFSAでつかえているという部分は、強いて我々もそれをもってまた追加的にという必要はないかなと個人的には思っています。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。MoEの問題も言及いただきまして、こちらも議論しないといけないところだったので助かります。

ADI、MoEの問題はむしろ実務官庁である厚生労働省のマターでもありまして、我々の審査基準のほうでは直接は関係しないのでということで、そうなのかなと私も思うところなのですが、それでは、先ほどの人工胃液、人工腸液の新しいシステムの導入とその結果に関するポイント、それから、2番目に今回現れたEFSAのMoEのポイント、この2点に限られると思いますが、御質問、御意見等はございますでしょうか。

〇〇〇。

〇〇〇 いえ、特には。新しいシステムをきちんとコントロールを取ってやられていて、問題ないかなと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、この新しいシステムはどうお考え。

〇〇〇 新しいシステムはこれでいいと思うのですけれども、今、見返していて、ようやく前のデータの意味は何となく分かりました。人工胃液試験のときはpH1~2で非常に低いpHで実験するのですけれども、炭酸ナトリウムで中和というかアルカリに持っていくのですよね。中性を超えてアルカリに持っていくので、実は反応停止のときになるとこの酵素は活性を出すということで、そうすると、ペプシンがやられてしまうという形で読み解くと、この酵素が分解された頃にペプシンが見えてくるので、ペプシンが本酵素を分解した後は反応停止した後、ペプシンのバンドが見えてくるけれども、ペプシンが本酵素を分解しきれていなくてこの酵素が生き残っている間は反応停止後、pHがアルカリになることでペプシンがむしろ逆に分解されて、SDS-PAGEをするとバンドが見えないということなのだなど。しかも、人工腸液のほうは同じ原理で高温に耐熱性があるので、これも反応停止の間にトリプシンをやっつけてしまうのだなど。そうやって見ると、大体つじつまは合っているのなど読み取れるなどと思って今見ていたところですが、でも、彼らは非常に苦勞して努力してやってきたことはよく分かるので、むしろ我々も勉強になったし、よかったなど今思っております。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、お願いできますか。

〇〇〇 仕方がないかなというような感じなのですが、確かによくやってはいるのです。だったら、書き方はこれでいいかなというのがあるのですけれども、仕方がないというのが正直なところですが。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、この点、御意見等はございますでしょうか。

それでは、注意義務等は十分果たしている。結果もアクセプタブルであるということで、安全性については懸念はないと判定したいと思いますが、先生方、よろしいでしょうか。御意思の表示を。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 ちょっとコメントさせていただきたいのは、私自身、今、〇〇〇がおっしゃいましたけれども、MoE等の立場からの評価というのは、実はそれはそれで考えなくてはならない。酵素添加物と考えたときには恐らく考えなくてはならないことなのだけれども、結局、今のシステムは厚労省側がある部分方針というかそういうことと非常にリンクしていて、少なくとも我々が持っている指針上ではそこを今指摘して、我々の食安委の評価基準を満たしていないよと言うことは後出しジャンケンとなるということで、将来的な課題としては意識しておかなくてはならない。EFSAと我々との姿勢の非常に大きな違いなので、意識していないとならない問題だと思っております。

今の段階だったら、EFSAが問題にしている、我々としてはその程度だったらあえて問題にするほどではない、130とか200とかというレベルぐらいだったらいいんじゃないの

と思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、まず判定したいと思いますですが、先生方、御意思の表示をお願いできますでしょうか。よろしいでしょうか。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 ありがとうございます。それでは、本件については、安全性については懸念はないと判定したいと思います。

これは厚労省とのリンクの問題となると、厚生労働省は食品安全行政に長年の経験があるからいいのだけれども、これが消費者庁に移管されたときにどうなるかというのが実はとてもとても心配なところです。これは将来的と言っても結構近い将来なので、先にこちらが姿勢をはっきりしておかないと、移管されたときに大混乱になるような気がしてならないので、これも近いうちに議論しておきたいと思います。

事務局、移管前に話をしておきたいと思いますので、テイクノートしておいていただけますか。

それでは、失礼いたしました。評価書案の審議に行きたいと思います。よろしく。

〇〇〇 それでは、評価書案について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を御用意ください。

こちらの19ページをお開きください。

Ra α 3114株を利用して生産されたプロテアーゼの評価書案でございます。

それでは、御説明をさせていただきます。

25ページをお開きください。

評価対象添加物の概要でございます。本添加物は *Bacillus subtilis* Marburg 168株を宿主として、*Thermus aquaticus* YT1株由来のプロテアーゼ遺伝子を導入して作成したRa α 3114株を利用して生産されたプロテアーゼでございます。本添加物はグルテンを分解する酵素でございます。製パン・製菓等の生地の品質向上を目的として使用されるものというところでございます。

続きまして、従来の添加物の性質及び用途に関する資料でございます。こちら、従来添加物は名称がプロテアーゼ、有効成分もプロテアーゼとなっております。

続きまして、製造方法でございます。プロテアーゼは培養工程、ろ過等の製造工程を経た上で製剤化される。なお、生産菌及び菌体成分についてはろ過等の精製工程を経て除去されるということでございます。

続いて、用途及び使用形態でございますが、プロテアーゼは製パン・製菓において、生地混捏時に生成されるグルテンを分解することで生地の品質向上を目的として使用されるということでございます。

続いて、摂取量でございます。プロテアーゼが菓子パンを除くパン類、そして、菓子パ

ン類、和菓子類、ケーキ・ペストリー類、ビスケット類に使用され、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、先ほど修正がございましたとおり、0.033mg TOS kg体重/日になっております。

続きまして、2. 宿主及び導入DNAについてでございます。宿主は *Bacillus subtilis* Marburg 168株でございます。

続きまして、26ページをお願いいたします。

113行目からでございます。DNA供与体の種名、株名または系統名等及び由来についてでございます。

プロテアーゼ *aqI* 遺伝子の供与体は、*Thermus aquaticus* YT1株ということでございます。

続きまして、挿入DNAの性質及び導入方法でございます。*aqI* 遺伝子は *Thermus aquaticus* YT1株由来のプロテアーゼ Aqualysin1 をコードいたします。*aqI* 遺伝子導入のベクターを Aqualysin1 の生産性及び遺伝子組換え効率を高めるために宿主由来で種々の遺伝子の欠失及び変移導入を行った株である *B.subtilis* ●●● に形質転換法にて導入をし、*aqI* 遺伝子発現カセットを宿主の複数の標的遺伝子座に相同組換えにより挿入したものでございます。その後、株の選択により、抗生物質耐性遺伝子は生産菌に残存していないということでございます。

27ページ155行目をお願いいたします。6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点でございます。

まず(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物についてでございます。AQ1と従来のプロテアーゼとの相違点は、基原、至適温度、IUB No.などが異なる点であるということでございます。AQ1と従来のプロテアーゼはIUB No.の末端が異なる酵素に分類されるということでございますが、両者ともにセリンエンドペプチダーゼ (IUB No.:EC3.4.21) に属し、Subtilisin様セリンプロテアーゼのFamily S8に分類されており、アミノ酸配列や立体構造が類似しているということでございます。

(2) 組換え体と宿主についてでございます。Ra α 3114株と宿主の相違点は、Ra α 3114株には *aqI* 遺伝子が複数コピー導入され、プロテアーゼ生産能を獲得している点並びに生産性及び遺伝子組換え効率の向上のために複数の遺伝子を欠失及び変異導入している点が異なるということでございます。○○○ 続きまして、28ページ206行目をお願いいたします。挿入DNAまたは遺伝子(抗生物質耐性マーカを含む)及びその遺伝子産物の性質に関する事項でございます。

(1) 挿入遺伝子のクローニングまたは合成方法に関する事項でございます。*aqI* 遺伝子は *T.aquaticus* YT1株由来のプロテアーゼ遺伝子をPCRにて得たということでございます。

続きまして、(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項のうち、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ございます。*T.aquaticus* のアレルギー誘発性の可能性を調べるためにデータベースを用いて検索がされてございます。その結果、アレルギー誘発性を

示唆する報告はなかったということでございます。

続いて、②遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見でございます。こちらもAQ1のアレルギー誘発性の可能性を調べるためにデータベースを用いて検索がされております。その結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかったということでございます。

続いて、③遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見でございます。

まず、a. 人工胃液に対する感受性でございます。AQ1の人工胃液中での消化性を調べる目的でウェスタンブロット分析を行っております。その結果、試験開始後60分以内に消化されることが示されたということでございます。

続いて、人工腸液に対する感受性でございます。AQ1の人工腸液中での消化性を調べる目的でウェスタンブロット分析が行われてございます。その結果、試験開始120分においても分解されないということが示されたということでございます。

続いて、加熱性処理に対する感受性でございます。AQ1の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、酵素残存活性測定及びウェスタンブロット分析が行われてございます。その結果、100℃15分で失活すること及び抗体反応性が消失することが示されたということでございます。

そして、④遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見でございます。AQ1と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベースを用いた相同性検索が行われてございます。その結果、連続する80アミノ酸に対して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アレルゲンとして29個が検出されてございます。これらは呼吸器系のアレルゲンとして報告されている25個及び皮膚系のアレルゲンとして報告されている4個でございます。AQ1はSubtilisin様セリンプロテアーゼに分類されることから、Subtilisinについて同様の条件にて既知のアレルゲンと相同性検索も行われておりまして、その結果、AQ1で検出された29個の既知のアレルゲンが全て含まれて検出がされてございます。洗剤用酵素であるSubtilisinは呼吸器感作系の物質でございますが、洗剤用酵素は全て粉じんにならないような顆粒及び非揮発性の液体となっており消費者の安全を脅かすものではないと考えられているとされてございます。AQ1においても顆粒状に製造されていること及び海外での使用でアレルギー反応誘発の報告はないことから、パン製造現場等において通常の防じん措置を取る限り安全性への懸念は低いと考えられたとさせていただきます。

続きまして、30ページ306行目をお願いいたします。抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項でございます。

31ページ307行目をお願いいたします。●●●に含まれる●●●耐性遺伝子、●●●耐性遺伝子が一旦ゲノムに導入されるということでございますが、最終的にこれらの抗生物質耐性を示さない株を生産株として選択しているということでございます。生産株ゲノムに抗生物質耐性遺伝子がないことは、PCRとサザンブロット分析によって確認もされてございます。

続きまして312行目、第5. 組換え体に関する事項でございます。

このうち、(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項でございます。*aq1*遺伝子発現カセット領域におけるオープンリーディングフレームの有無を確認するために検索が行われてございます。その結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結するORFが33個検出されてございます。AQ1以外の32個の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が行われてございます。その結果、連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして2個の呼吸器系アレルゲンが検出されております。通常の防じん措置を取る限り、安全性への懸念は低いと考えられたとしてございます。

また、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、データベースを用いて $E\text{-value} < 10^{-5}$ を指標として検索が行われてございます。その結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められませんでした。

次に、ゲノム上のそれぞれの標的部位に導入された*aq1*遺伝子発現カセットと宿主ゲノムとの接合領域に生じるORFの有無を確認するために、挿入DNAの5'近傍配列及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索が行われてございます。その結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結するORFが22個検出されてございます。

次いで、こちらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を調べる目的で、アレルゲンデータベースを用いた相同性検索が行われてございます。その結果、連続する80アミノ酸配列に対して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ギーが検出されてございますが、宿主ゲノム領域のORFであったということでございます。

また、これらのORFと毒性タンパク質との相同性の有無を確認するためにデータベースを用いて $E\text{-value} < 10^{-5}$ を指標として検索を行っております。その結果、データベース中の既知の毒性タンパク質と相同性を示すORFが認められましたが、これは宿主ゲノム領域のORFだったということでございます。

続きまして363行目、第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項のうち、諸外国における認可、食用等に関する事項でございます。*B.subtilis*を生産菌とするAqualysin1プロテアーゼについては、アメリカにおいて2009年にGRASとして自己認証されております。また、フランスにおいてはアルカリ性セリンプロテアーゼとして本品目が2012年に使用が許可され、メキシコにおいては2016年に使用が許可されているということでございます。また、Aqualysin1を含む酵素製剤については、メキシコ、フランス、アメリカ、オランダでの使用実績があるということございまして、いずれの国においても今まで安全性に懸念が示された報告はないということでございます。

続いて、2. 組換え体の残存に関する事項でございます。酵素原体に生産菌の残存がないことはプレートカウント法によって確認がされてございます。

以降はこちらに記載のとおりとなっております。

評価書について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、ただいまの評価書案につきまして御意見、御指摘等はございますでしょうか。細かい字句等でしたら、お気づきになったとき、また後ほど事務局にお伝えいただければと思います。

よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、最終確認したところで、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続を進めていきたいと思えます。

それでは、議題（1）については終わりたいと思えます。

議題（2）その他の事項ですが、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 ということであれば、本日の議題についてはこれで終了でございます。

それでは、以上をもちまして第237回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

先生方、お疲れさまでした。