

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第267回) 議事録

1. 日時 令和7年8月27日(水) 9:58~12:25

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

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

・ チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ
(COR23134) (食品・飼料)

・ *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホス
ホリラーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

児玉座長、伊藤専門委員、小野道之専門委員、佐々木専門委員、柴田専門委員、
爲廣専門委員、手島専門委員、樋口専門委員

(専門参考人)

中島専門参考人、山川専門参考人

(食品安全委員会)

頭金委員、祖父江委員

(事務局)

中事務局長、前間次長、古田評価第二課長、澁岡評価情報分析官、飯塚課長補佐、
岩瀬評価専門職、山口係長、今村技術参与、坂本技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

① チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (食品)

② チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (飼料)

③ *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホス
ホリラーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 それでは、皆様おそろいということですので、カメラをオンにさせていただいて、ただいまから第267回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催いたします。

本調査会は、議事次第にありますように、「食品安全委員会の公開について」に基づいて、非公開で行います。

本日は、所用により〇〇〇は御欠席です。

また、専門参考人として、〇〇〇、〇〇〇に御出席いただいております。

また、本日はWeb会議システムを併用して行います。

本日の議題は、新規品目である「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ（COR23134）」と「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ」の安全性についての審議です。

それでは、事務局から資料の確認をお願いいたします。

〇〇〇 配付資料を確認いたします。

配付資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿、資料として「食品健康影響評価に関する資料」となります。

資料の不足等はありませんでしょうか。不足等がございましたら、事務局まで御連絡ください。

また、本日は「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ（COR23134）（食品・飼料）」の申請者であるコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社の方、「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ」の申請者である日本食品化工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予定としております。

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

〇〇〇 事務局において専門委員の皆様にご提出いただきました確認書を確認したところ、平成15年10月2日付委員会決定の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 本日はWebで会議に参加される専門委員もいらっしゃいますので、審議に入る前に、Web会議における注意事項について事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 Web会議形式の注意事項をお伝えします。

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してください。

2点目、発言の際は赤い挙手カードを提示いただくか、Web会議画面の挙手ボタンを押してください。座長よりお呼びしますので、マイクをオンにして、お名前を発言いただいた上で御発言をお願いします。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、音声接続不良時や通信環境に問題がある場合は、カメラをオフにしたり再入室することにより改善する場合があります。マイクが使えない場合はWeb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、青い同意カードを挙げていただくか、手で丸をつくるなど意思表示をお願いします。

以上がWeb会議における注意事項となります。よろしくをお願いします。

〇〇〇 それでは、新規品目である「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ（COR23134）」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 お手元に黄緑色の紙ファイルを御準備ください。Webで御出席いただいております先生方は、先週御連絡している資料の差し替えの中に要旨修正版というファイルがございますので、そちらの御展開をお願いいたします。

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ（COR23134）の申請要旨でございます。

申請資料の1ページ目を御覧ください。

1の（1）既存品種はマメ科ダイズ属に属するダイズで、系統名は93Y21です。

（2）のDNA供与体です。本品目には4つの遺伝子を導入しております。まず *cry1B.34.1* 遺伝子と *cry1B.61.1* 遺伝子の供与体が *Bacillus thuringiensis* でございます。 *ipd083Cb* 遺伝子の供与体は *Adiantum trapeziforme* var. *braziliense* というホウライシダ科のシダ植物でございます。 *gm-hra_1* 遺伝子の供与体はダイズでございます。

（3）挿入DNAの性質ですが、 *cry1B.34.1* 遺伝子、 *cry1B.61.1* 遺伝子及び *ipd083Cb* 遺伝子の発現によって産生されるタンパク質は、いずれもチョウ目害虫に対する殺虫活性を発揮するものです。 *gm-hra_1* 遺伝子の発現によって産生されるタンパク質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性を付与します。導入方法はアグロバクテリウム法でございます。

2から3ページの5までは記載のとおりでございます。

3ページの最下段の Paragraph を御覧ください。6 安全性評価において検討が必要とされる相違点は、導入された遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項で、そのほかにつきましては従来のダイズと相違はないことから、COR23134の食品健康影響評価においては、比較対象となる既存品種があると判断してございます。

7ページを御覧ください。

第4 ベクターに関する事項です。

9ページ目から（3）の既知の有害塩基配列を含まないことについてでございます。使用する導入用プラスミドの外側骨格領域の構成要素、その由来及び機能は明らかとなっております。既知の有害なタンパク質を産生する塩基配列は含んでいないとしてございます。

同じ9ページ、表3の下から(4)ベクター中の薬剤耐性遺伝子について、ベクターにスペクトノマイシン耐性遺伝子である *spc* 遺伝子並びにカナマイシン及びネオマイシン耐性遺伝子である *nptIII* 遺伝子が含まれ、本プラスミドを有する微生物を選抜・維持するために用いたとのことでございます。

10ページ目の(5)伝達性については、伝達を可能とする配列は含まれていないという記載になってございます。

11ページ目からが第5 挿入DNAに関する事項です。

1の(1)挿入DNAの供与体については、先ほど御説明した第1の1(2)のとおりでございます。

(2)の安全性についてですが、*B. thuringiensis*はヒトへの病原性は知られておりません。また、*A. trapeziforme* var. *braziliense*は中南米に自生し、東南アジアに移入分布しているシダ植物ですが、ヒトもしくは家畜に対して毒性を有しているとの報告はございません。ダイズは古くから食品として利用されてきた歴史があり、現在も多様な食品として消費されております。

その下、2の(1)挿入遺伝子のクローニング方法等です。いずれの遺伝子も人工的に合成されております。詳細は13ページの表4に記載のとおりでございます。

16ページを御覧ください。

(3)挿入遺伝子の機能のうち、①遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能についてです。Cry1B.34.1タンパク質とCry1B.61.1タンパク質はいずれも *B. thuringiensis* に由来する殺虫タンパク質です。昆虫の中腸上皮細胞膜上の特定の受容体と結合し、細胞膜に細孔を形成して細胞溶解を引き起こし、中腸組織を損傷させることにより殺虫活性を発揮します。

Cryタンパク質については、以下、記載のとおりでございます。

続いて、21ページから *ipd083Cb* 遺伝子についてでございます。この遺伝子は、選択的殺虫タンパク質であるIPD083Cbタンパク質をコードします。IPD083Cbタンパク質を一過的に産生する葉では、ツマジロクサヨトウ及びアメリカタバコガを含むチョウ目害虫により葉の食害がほとんど観察されなかったこと、IPD083Cbタンパク質を接触したツマジロクサヨトウにおいては、IPD083タンパク質が中腸上皮細胞に局在し、その後、中腸上皮細胞が破壊されること、中腸上皮刷子縁膜小胞(BBMV)を用いた結合試験の結果、IPD083Cbタンパク質がツマジロクサヨトウ及びアメリカタバコガのBBMVに結合することを確認したことなどから、IPD083Cbタンパク質はCryタンパク質と同様にチョウ目昆虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に結合し、中腸上皮細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられました。

また、図5の下の記載になりますが、チョウ目昆虫及びコウチュウ目昆虫に本タンパク質を表面に塗布することによって調製した飼料を用いて生物検定を行った結果、チョウ目昆虫のみが感受性を示すことが確認されました。このことから、本タンパク質は特定のチョウ

ウ目昆虫に対して殺虫活性を示すと考えられたとしております。

また、22ページの表7の下の記載でございますが、IPD083Cbタンパク質の供与体である *A. trapeziforme* は食経験に関する情報がほとんどございません。また、現在食品として利用されている植物にIPD083ファミリータンパク質が含まれているとの報告もございません。こちらに記載のとおり、IPD083タンパク質がヒトに対してアレルギー誘発性もしくは毒性を示す可能性は低いと考えられるとしており、COR23134系統を原料としたダイズ加工品を通して、ヒトが有意な活性を保持したIPD083Cbタンパク質を摂取する可能性も低いと考えられるとしております。

IPD083Cbタンパク質に関しまして、事前に〇〇〇からヒト細胞、特にヒト腸管上皮細胞を用いた *in vitro* 試験のデータはないかと確認がございまして、申請者に確認しておりますが、所持していないという回答でございました。

続いて、23ページの中ほどからの記載となりますが、COR23134で産生される各殺虫タンパクのうち、Cry1B.34.1タンパク質及びIPD083Cbタンパク質は代表的なCryタンパク質並びにVip3Aaタンパク質が結合する受容体とは異なる受容体に結合することが示唆されており、既に商業栽培されているダイズで産生されるCryタンパク質に対して耐性を獲得したチョウ目害虫についても、COR23134は抵抗性を有することが期待されるということでございます。

続いて、23ページの下段から *gm-hra_1* 遺伝子に関しては記載のとおりでございますが、最下段に記載がありますとおり、本品目においては、GM-HRAタンパク質は除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を目的としたものではなく、選抜マーカーとしての使用を目的に導入されているということでございます。

24ページ目からの②毒性タンパク質との構造相同性の記載でございます。Cry1B.34.1タンパク質、Cry1B.61.1タンパク質、IPD083Cbタンパク質及びGM-HRAタンパク質が既知の毒性タンパク質と機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうかを調査するために、*E-value* が 10^{-4} を閾値として毒性タンパク質データベースで検索を行った結果、いずれのタンパク質についても既知毒性タンパク質との間に相同性は認められませんでした。

続きまして、(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子についてです。本系統の導入用プラスミドには、こちらに記載のとおり、抗生物質耐性を付与する *spc* 遺伝子及び *nptIII* 遺伝子が外側骨格領域に存在していますが、本系統中に抗生物質耐性遺伝子を含む外側骨格領域が含まれていないということを後述のSouthern by Sequencing分析で確認してございます。

続きまして、27ページを御覧ください。

6のDNAの既存品種への導入方法及び交配についてでございます。導入用プラスミドを用いてアグロバクテリウム法により形質転換後、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性をマーカーとして用いて選抜を行い、DNAが導入された細胞を選抜し、植物体を再生しております。植物体を得た後、自殖によりT₁世代を得ており、安全性評価の対象はT₁世代以降としております。

続きまして、29ページを御覧ください。

第6 組換え体に関する事項でございます。

1の(1)を御覧ください。①として、挿入遺伝子のコピー数及び外側骨格領域の有無の確認をしております。COR23134系統のT₁世代の葉から抽出したDNAを断片化し、そのうち導入用プラスミド由来の配列を含む断片の塩基配列を次世代シーケンサーを用いて調べた結果、導入用プラスミドに由来するT-DNA領域がCOR23134のゲノム中に1コピー挿入されていることが確認されました。また、導入用プラスミドの外側骨格領域由来の配列は含まれておらず、T-DNA領域だけがゲノムに挿入されていることが確認されました。

②の挿入DNAの完全性として、COR23134のゲノムDNAに挿入されたDNA及びその近傍の塩基配列をSanger法により決定しております。その結果、*ipd083Cb*遺伝子上流の*pv-ubi2*プロモーター内で認められた21塩基の欠損を除き、各遺伝子発現カセットの塩基配列は全て導入用プラスミドのT-DNA領域配列と一致しており、各構成要素に欠損は認められなかったとのことでございます。

30ページの③として挿入DNAの近傍配列の由来を確認したところ、5'側近傍配列中の1,024塩基は20番染色体の配列と100%一致し、3'側近傍配列中の1,425塩基は20番染色体の配列と98%一致したことから、挿入DNAの近傍配列はダイズ20番染色体由来であると考えられたとしております。

④としてDNA挿入により既存品種の塩基配列に変化が生じる可能性を考察しておりますが、変化はないと考えられたとしてございます。

続きまして、(2) ORFの有無についてでございます。COR23134系統の挿入DNA領域と5'及び3'末端近傍配列の接合部位において意図しないORFが生じていないことを確認するため、6つの読み枠においてORF検索を行った結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する8アミノ酸以上のORFが1,695個確認されました。

31ページの記載となりますが、確認された1,695個のORFと既知毒性タンパク質及び既知アレルゲンとの相同性の有無を確認するため、毒性タンパク質データベース及びNCBI非重複タンパク質データベース並びにアレルゲンデータベースを用いて、*E-value*が 1×10^{-4} を閾値として相同性検索を行っております。毒性タンパク質データベースによる検索の結果、連続する80アミノ酸配列において35%を超える相同性及び8アミノ酸の相同性を示す既知の毒性タンパク質は検出されませんでした。また、NCBI非重複タンパク質データベースにおける検索の結果、17個のORFがそれぞれコードするペプチドでアライメントが検出されましたが、相同性を有するタンパク質はいずれも毒性タンパク質ではなかったとされました。

既知アレルゲンとの比較では、GM-HRAタンパク質のコード領域中のORFで、80アミノ酸以上について35%を超えて一致する配列として2つのアレルゲンが検出されましたが、いずれのアライメントも有意な相同性を示すものではなかったとのことでございます。

続きまして、32ページの2 遺伝子産物の発現部位、発現時期、発現量についてござい

ます。COR23134の葉、花、根、地上部、種子について、目的タンパク質の発現量をELISA法で分析を行った結果が33ページの表8のとおりとなっております。

続きまして、36ページ目を御覧ください。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性です。

まず、Cry1B.34.1タンパク質についてでございますが、こちらは既に安全性評価済みであるトウモロコシDP910521系統で産生されるCry1B.34タンパク質のC末端側にCry9Db1タンパク質に由来する配列が付加されているものとのことでございます。分子量、免疫反応性及びグリコシル化のないことにおいて、*E. coli*で産生したCry1B.34タンパク質と本系統で発現するCry1B.34.1タンパク質は同等であったとして、*E. coli*から調製したCry1B.34タンパク質を用いて各種の感受性を確認してございます。

続きまして、Cry1B.61.1タンパク質について、こちらにも*E. coli*から調製したタンパク質を用いて各種の感受性を確認してございます。

最下段の параграф、IPD083Cbタンパク質については、ベンサミアナタバコから調製したタンパク質を用いて各種の感受性を確認してございます。

37ページを御覧ください。

①の人工胃液試験です。Cry1B.34タンパク質については、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行っております。SDS分析の結果については、38ページの図8のとおり、129kDaのバンド及び約15kDaのバンドは試験開始後30秒後であるレーン5では消失しておりますが、約20kDaのバンド及び5kDa以下の複数のバンドが認められました。20kDaのバンドは試験開始5分後であるレーン8では消失した一方で、5kDa以下の複数のバンドは試験開始60分後であるレーン11でも確認されてございます。

そのため、申請者は連続胃腸液処理試験を実施しております。39ページの図9を御覧ください。Cry1B.34タンパク質を人工胃液で10分間処理した後、引き続き人工腸液で処理した結果、人工胃液処理後に認められた5kDa以下の複数のバンドは、いずれも人工腸液処理開始後30秒後であるレーン6で消失しております。

続いて、41ページからがCry1B.61.1タンパク質でございます。人工胃液中における消化性について確認するため、こちらにもSDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行っております。42ページの図11のとおり、SDS-PAGEにおきましては、74kDaのバンドは試験開始後15秒であるレーン5では消失しておりますが、10kDa以下の複数のバンドが確認され、反応開始60分後であるレーン11でもそのバンドは確認されてございます。そのため、申請者はこちらにも連続胃腸液処理試験を実施しております。

43ページの図12を御覧ください。Cry1B.61.1タンパク質を人工胃液で5分間処理した後、引き続き人工腸液で処理した結果、人工胃液処理後に認められた10kDa以下の複数のバンドは、いずれも人工腸液処理開始1分後であるレーン7で消失したとのことでございます。

続いて、45ページからがIPD083Cbタンパク質の人工胃液試験でございます。こちらにも同様にSDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行っております。46ページの図14の

とおり、SDS-PAGEにつきましては約96kDaのバンドは試験開始後15秒後であるレーン5では消失しておりますが、こちらにも5kDa以下の複数のバンドが確認され、試験開始60分後であるレーン11でもそのバンドは確認されてございます。

そのため、申請者はこちらにも連続腸液処理試験を実施しております。47ページの図15を御覧ください。IPD083Cbタンパク質を人工胃液で10分間処理した後、引き続き人工腸液で処理した結果、人工胃液処理後に認められた5kDa以下の複数のバンドはいずれも人工腸液処理開始15秒後であるレーン6で消失したとのことでございます。

続きまして、49ページ目を御覧ください。

こちらから人工腸液試験に関する事項です。Cry1B.34タンパク質について、49ページの図17がSDS-PAGEの結果、50ページの図18がウェスタンブロット分析の結果でございます。

50ページの図18を御覧いただきたいのですが、分子量約129kDaのバンドは試験開始30秒後であるレーン4で消失しますが、約75kDa以下の複数のバンドが試験開始60分後のレーン11でも消失しませんでした。

続きまして、51ページ目を御覧ください。

こちらがCry1B.61.1タンパク質です。51ページの図19がSDS-PAGEの結果、52ページの図20がウェスタンブロット分析の結果でございます。

52ページの図20を御覧いただきたいのですが、約74kDaのバンドは試験開始15秒後であるレーン4で消失しますが、74kDaより小さい複数のバンドは試験開始60分後のレーン10でも消失しませんでした。

続きまして、53ページ目を御覧ください。

IPD083Cbタンパク質でございます。53ページの図21がSDS-PAGEの結果で、54ページの図22がウェスタンブロット分析の結果でございます。

54ページの図22を御覧いただきたいのですが、分子量約96kDaのバンドは試験開始15秒後であるレーン4で消失しますが、約20～60kDaの複数のバンドは試験開始60分後のレーン10でも消失いたしませんでした。

続きまして、55ページ目を御覧ください。

加熱処理に対する感受性についてです。感受性について確認するため、機能活性の生物検定を行っております。生物検定の結果、表9から表11のとおり、それぞれのタンパク質について75℃以上の加熱処理で殺虫活性が失活するということが示されてございます。

続きまして、57ページ目を御覧ください。

GM-HRAタンパク質については、既に食品としての安全性審査の手続を経ている高オレイン酸含有ダイズDP-305423-1に導入されているGM-HRAタンパク質と同一のアミノ酸配列を有するとし、物理化学的試験を省略しております。

続きまして、58ページ目を御覧ください。

(4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性についてですが、4つのタンパク質

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データベースを用いて相同性検索を行った結果、*E-value*が100を閾値とした既知のアレルゲン、連続する80アミノ酸配列について35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列といったものは見いだされませんでした。

59ページの5 導入された遺伝子の安定性についての記載になります。本系統の5世代分の葉組織から抽出したゲノムDNAを用いてサザンブロット解析を行った結果、5世代全てについて想定どおりのDNA断片が検出されたことから、複数世代にわたって安定して遺伝しているとのことをごさいます。

65ページ目を御覧ください。

6 代謝経路への影響をごさいます。Cry1B.34.1タンパク質及びCry1B.61.1タンパク質が酵素活性を持つという報告がないこと、IPD083Cbタンパク質のアミノ酸配列について酵素タンパク質のモチーフまたはドメイン等との相同性は認められていないことから、この3種のタンパク質が既存品種の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられるとしております。

GM-HRAタンパク質は、内在性ALSタンパク質と同様、分岐鎖アミノ酸の合成経路において基質であるピルビン酸及び α -ケト酪酸に特異的に作用するとのことをごさいます。内在性ALSタンパク質及びGM-HRAタンパク質が同時に分岐鎖アミノ酸合成酵素で作用した場合においても、フィードバック制御が働くことにより、特定のアミノ酸の含有量が高まるとは考え難いとのことをごさいます。

また、中段辺りからの記載ですが、殺虫タンパク質であるCry1B.34.1タンパク質Cry1B.61.1タンパク質及びIPD083Cbタンパク質とGM-HRAタンパク質の作用機序は独立していることから、相互に影響することは考えにくいとのことをごさいます。

以上のことから、これらのタンパク質が代謝経路に意図しない影響を及ぼす可能性は低いと考えられたとしてごさいます。

さらに、見え消しで追記いただいておりますが、植物の指針別添に基づき、COR23134は、①の導入された遺伝子によって既存品種の代謝系には影響なく、害虫抵抗性、除草剤耐性、ウイルス抵抗性などの形質が付与されるものに分類されると考えられるとのことをごさいます。

続きまして、66ページの7 宿主との差異を御覧ください。組換え体及び対象の非組換えダイズを2022年に米国の7ほ場及びカナダの1ほ場の計8ほ場で栽培し、成熟期の種子で構成成分について比較をしてごさいます。分析項目は種子中の主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類、栄養阻害物質等です。

分析結果の結論は78ページの(7)に記載がごさいますが、COR23134の種子中の構成成分を分析した結果、いずれも参考品種のダイズの範囲内であったとのことをごさいます。

79ページを御覧ください。

8 諸外国における認可の状況ですが、表19に示した国で申請、承認が行われておりま

す。

9の栽培方法、10の種子の製法及び保管方法は記載のとおりでございます。

最後に80ページの第7ですが、以上のことから、COR23134の食品としての安全性の知見が得られるとしてございます。

申請書の説明は以上となります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請資料の審議に入りたいと思います。

まず、申請書の1ページから10ページ、第1から第4のベクターに関する事項まででコメントがある方はよろしくお願ひいたします。

よろしいでしょうか。後から戻っても構いませんので、それでは、申請書の11ページから28ページ、第5 挿入DNA、遺伝子産物並びに発現ベクターの構築に関する事項までのところでコメントがある方はお願ひいたします。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 23ページの殺虫タンパク質のうち、試験の結果、Cry1B.34とIPD083Cbタンパク質は異なる受容体に結合することが示唆されているというので、これはそれぞれが独立で結合することは書いてあるのですけれども、相互に作用するようなことはないのでしょうか。多分ないと思うのですけれども、ないのだったらこれもないと書いてもらいたいと思うのです。後ろの65ページに独立していることから影響することは考えにくいと書いてあるのですけれども、これでよろしいのでしょうか。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

今回導入した殺虫タンパク質間の相互作用と過去に承認されている殺虫タンパク質の相互作用と分けてきれいに書いてもらったほうがいいのかと思うので、後で申請者をお呼びすると思いますので、少しお願ひをするようにしたいと思います。

〇〇〇人 ありがとうございます。

〇〇〇 そのほかございますでしょうか。よろしいでしょうか。

ここの部分では*ipd083Cb*遺伝子の作用機作について21ページあたりに書いてありますけれども、事前に私のほうから質問しまして、ヒトの腸管上皮細胞での試験結果はありますかということをお聞ひしたのですが、現時点で持っていないという返事でしたけれども、今回のタンパク質は完全に食経験がない植物由来のタンパク質で、タンパク質としての特徴をお聞ひしたのですけれども、知られているような特徴がないという返事でした、本当かと思って私のほうでもBLASTにかけてみたのですけれども、やはり何も出てこなくて、シダ植物のごく一部のところに近いタンパク質はあるのですけれども、ほかのタバコとかダイズとかイネといったところには似たタンパク質はないということで、非常に情報に乏しいタンパク質が殺虫性を示したということになっております。レセプター情報も当然ございませんので、どのようなレセプターに結合するかも現時点では全く分からないという形にな

っています。

なので、この点について、過去にシダ植物の似たタンパク質のほうは辛うじて少し食経験があったというタンパク質を一回審議しておりますけれども、そのときと違って今回は全く食経験がないということになっています。それで、やはりヒト細胞を使った試験、*in vitro*の試験をやっていただいたほうがよろしいのではないかと思いますので、この点について委員の先生方から何かコメントがありましたらよろしくをお願いします。

いかがでしょうか。毒性のほうの話なので、あまり得意なところではないかもしれませんが、〇〇〇、〇〇〇あたり、いかがでしょうか。

〇〇〇 以前から細胞を使った試験というのはお願いしていることがあるのですが、できないと言われたケースもあると思うので、義務ではないと思うのですが、23ページですか。今回はマウスを用いた動物実験、経口毒性試験というのをやられていますので、それで哺乳類への影響を調べたということの代替ができるのかなと思うのですが。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 私のほうからは、過去にどういった試験をされたことがあるのかは分かりませんが、現在の状況においても何か影響が出るというようなことは特段認められてなさそうな結果を提出していただいているので、問題はないかと思うのですが、そういう観点から見えていなかったもので、これぐらいの返答しかできません。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほかの先生方、いかがでしょうか。

私個人としては、全く新規のタンパク質で構造上の情報がほとんど出てこないタンパク質ですので、レセプターがある程度同定されるようなタンパク質であれば、レセプターを介してヒトの相互作用というのは議論できるかと思うのですが、今回はそういう情報もないということなので、ヒト腸管上皮細胞の試験をできればしていただきたいと考えております。前回やっていただいたということもあるので、特に必要ないというコメントがもしありましたらよろしくお願いたします。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 お聞きしたいのですが、今回一応マウスのほうで急性毒性試験はやっているということなのですが、プラスアルファで〇〇〇のほうで以前お願いした実験は具体的にはどういう実験なのでしょう。ヒトの腸管細胞で毒性を見るということでしょうか。

〇〇〇 前回こちらの会社さんに別のシダ植物の殺虫性タンパク質で試験をお願いしたときは、腸管上皮細胞を2種類ぐらい使ったと思いますけれども、その2種類の培養液にこのタンパク質を添加しまして、生存率を見たというような試験になっております。

あと、また別の申請者だったと思いますが、やはり似たようなケースがございまして、

そちらのほうは腸管上皮細胞を使って腸管バリア機能、細胞を使って膜を張ってもらって、その膜を通過する物質の通過量みたいな形で、腸管の上皮細胞の機能が保持されていますみたいな試験ですね。腸管バリア機能というのをやってもらって、そちらのほうの影響を見て評価した。

試験のやり方は決まった方法はありませんので、何らかの形でやってもらっていたという形になってはいますが、そういった試験を出していただいて、場合によっては非常に高濃度だとやはり細胞が傷みますみたいなデータが出てきたことはございます。

〇〇〇 個人的には、そういった前例があるのであればやっていただいたほうが無難なのかなとは思いました。

以上です。

〇〇〇 私個人として一番危惧しているのは、この手の殺虫性タンパク質の場合はレセプターに結合するのがmode of actionというか作用機構になっていて、厳密に考えると、仮にレセプターっぽいタンパク質が哺乳類にあったとして、それがマウスとヒトで完全に同じというわけではきっとないので、そうすると、ヒトへの影響は分からないよねと。意地悪な言い方をすると、そういう議論は成り立つのかなと考えまして、ヒト細胞を使って影響がこれくらい出ますとか、出るのは出るのだけれども、実際の腸管にその濃度でたどり着くことは非常に考えにくいみたいな議論をしていただいたほうが非常に安心なのかなと。

特に今回はタンパク質としての情報がほぼ皆無なので、私としては少しドメイン構造でディスカッションできればよかったなと思ったのですが、全く情報が出てこないもので、そういう試験をしていただいたほうがよろしいのではないかと考えた次第でございます。

そのほかいかがでしょうか。

この点につきましては、もし反対意見がないようでありましたら、申請者をお呼びしてそういう試験が可能かどうかお聞きしてみたいと思います。

続きまして、申請書のほうに戻りまして第6 組換え体に関する事項の29ページから58ページでコメントがありましたらお願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 31ページのORF検索のところコメントさせていただきたいと思うのですが、ここの4行目なのですが、これは既知の毒性タンパク質との比較で毒性タンパク質データベースを用いているとあるのですが、これは社内の毒性データベースでしょうか。ということで、注釈を入れていただいたほうがいいかと思いました。

それから、17行目以降ですが、赤字で連続する8アミノ酸以上で完全に一致する配列が検出されなかったが、ここは入れてもらっているのですが、その後でGM-HRAタンパク質のコード領域中のORFで784で一部一致する配列が見られた。80アミノ酸以上で35%見られたとあるのですが、ここのORF 784というのが添付資料の9では54ペー

ジに示されているのですが、要旨でも30ページにゲノムのDNAの全体図が書かれていますので、この784番というのはどこに位置するのかというのを矢印で示してもらえればよろしいかと思います。これはGM-HRA_1の領域の中に入ることなのではございますけれども、その後で一致するAra h 1 allergen、次のcollagenは間違いと思いますが、Ara h 1 allergenと言われている3種のもの及びLup an 1 allergenが検出されたとあると思います。その下に、しかし、いずれのアライメントも有意な相同性を示すものではなかったとあるのですけれども、この「有意な」というのをもう少し具体的に説明してもらえればと思います。これはE-valueから言っているかと思うのですが、添付資料の9では8ページから9ページにそのことが書かれていますのですけれども、Appendix1に具体的に書かれています。Appendix1には具体的な数字が出されていないので、添付資料の8～9ページに書かれている内容というのをテーブルのような形で示してもらえれば、より分かりやすいかと思いました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、後ほど申請者をお呼びしますので、〇〇〇のほうから改めて御指摘いただけたらと思います。

そのほかございますでしょうか。よろしいですか。

では、第6 組換え体に関する事項の最後まででコメントがありましたらお願いいたします。

よろしいでしょうか。

それでは、まずタンパク質間の相互作用について〇〇〇のほうから、それから、毒性タンパク質のデータベースとかアレルゲンのところの細かい点について〇〇〇のほうから、それから、私のほうから腸管上皮細胞を使った試験について少しお伺いしたいと思いますので、これから申請者をお呼びしたいと思います。

10時48分まで休憩としたいと思います。

(休 憩)

〇〇〇 それでは、説明者の方、自己紹介をお願いします。会社名と名前が結構です。

〇〇〇 コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社の〇〇〇と申します。本日はどうぞよろしくお願いいたします。

〇〇〇 同じくコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社、〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 同じく、〇〇〇です。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 それでは、質疑応答に入りたいと思います。質問のほうは大きく分けて3点ございます。

1点目、まず〇〇〇のほうから。

〇〇〇 〇〇〇です。

お聞きしたいところがあって、殺虫タンパク質、Cry1Bの相互作用がないかというところなのですが、申請書の23ページのところです。ここにCry1B.34タンパク質及び代表的なCry1Abタンパク質並びにCry2Abタンパク質並びにVip3Aaタンパク質などと書いてありまして、異なる受容体に結合すると書いてあるので、独立していますよと書いてあるのですが、これらの相互作用がないかどうかは気になりまして、65ページにそのことがちょっと書いてはあるのです。65ページには、また、殺虫タンパク質Cry1B.34.1タンパク質、Cry1B.61.1タンパク質並びに云々の作用機作は独立していることから、相互に影響することは考えにくいと書いてあるのですが、これは今までのものと相互作用がないというのと、今回の相互作用性がないというのは分かりにくいので、これはきちんと書いておいていただきたいのですが、分かりますか。

〇〇〇 こちらはいただいていた事前コメントに対する回答と重複してしまうのですが、今回COR23134で産生される3つの殺虫タンパク質間での作用機作が独立しているかどうかというのは、明確なデータが現在までに得られておりません。少なくとも先ほどおっしゃられたように、Cry1B.34.1タンパク質とIPD083Cbタンパク質はこれまで利用されている代表的なCryタンパク質とは恐らく受容体が異なるであろうと示唆するようなデータは得られておりますが、殺虫タンパク質間の作用機作が独立しているかどうかというのは現段階で明確に言えません。

一方で、GM-HRAタンパク質は、要旨にも記載しておりますように、基質であるピルビン酸と α -ケト酪酸に特異的に作用しますので、少なくとも殺虫タンパク質とGM-HRAタンパク質での相互作用というのではないと考えられます。

この相互作用についてですけれども、こちらは遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項ですので、殺虫タンパク質がそれぞれ酵素であるということは考えにくいので、殺虫タンパク質によって既存品種の代謝系に影響を及ぼす可能性も低いと考えております。

少しコメントをいただいていたところなのですが、誤解を招くような書き方でしたので、先ほど言ったように殺虫タンパク質とGM-HRAタンパク質の作用機作が独立している旨が明確になるよう、要旨を修正しております。いかがでしょうか。

〇〇〇 そうということですか。そうすると、例えばCry1B.34、今回は2つ入れていると思いますが、今回入れているインセクティサイドは、殺虫スペクトルのところを見ただけなのですが、殺虫スペクトルのところの試験対象の昆虫も微妙にかぶっていたりかぶっていなかったりして、スペクトルが違うのだから同じなのだから私も読みにくいなと思ったのですが、殺虫スペクトルという点ではこの3つのインセクティサイドは同じなのですか、違うのですかというところはどうなのでしょう。

〇〇〇 確かにスペクトルはおっしゃるようになんか少し見にくい部分があるかと思うのですが、今回どの殺虫タンパク質もいずれも特定のチョウ目昆虫に対して特異的に活性を

示すというデータは得られているのですけれども、殺虫活性を示すチョウ目昆虫の中では少しスペクトルに違いが見られます。ですので、それぞれ作用機作は明確には言えないのですけれども、スペクトラムの違いから作用機作というか受容体といったものは独立しているのではないかと考えております。

〇〇〇 明確には言えないということでしたけれども、できれば殺虫スペクトルが違えば基本的には異なる受容体に結合すると推察できると書いてもらえるとある程度納得できるかと思しますので、少し文章的に補足できるのであれば補足をお願いしたいのですが。

〇〇〇 検討させていただきます。ありがとうございます。可能です。

〇〇〇 〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 それで結構です。ありがとうございます。

〇〇〇 次の点は〇〇〇のほうからお願いいたします。

〇〇〇 31ページのORF検索のところ、毒性タンパク、それから、アレルギーとの相同性を調べたところなのですが、添付資料の9に基づいて記述がされているのですけれども、追記いただきたいことがあります。お願いしたいと思っております。

まず、4行目なのですが、既知毒性タンパク質との比較については毒性タンパクデータベースであるのですが、これは社内毒性データベースかと思っておりますので、その部分、もし可能であれば追記をお願いしたいと思っております。

それから、17行目からなのですが、連続する8アミノ酸以上で完全に一致する配列が検出されなかった。その後のGM-HRAタンパク質のコード領域中のORF 784で80アミノ酸で35%を超えて一致する配列としてAra h 1 allergen collagenとあるのですが、これはcollagenはなしでAra h 1 allergen、collagen自身は間違いだと思っておりますので、削除をお願いしたいと思っております。

それから、この784というORFの位置なのですが、要旨では30ページの図7にゲノムDNA中に挿入されたDNAの全体図と書かれていますので、ここのGM-HRAの領域に784があるということが添付資料9で示されていますが、これも矢印で示していただくことは可能でしょうか。

それからもう一つ、21行目ですか。80アミノ酸35%の一致配列も有意な相同性を示すものではなかったと。有意ということが書かれているのですが、これは根拠を示していただきたいと思っております。これはE-valueから来ていると思うのですが、添付資料の9でいくと8ページ目に文章では書かれているのですけれども、表などの形で示してもらえればと思っておりました。Appendix1も外部からは見られないような形になっていますので、この部分だけでも表で示してもらえればと思っておりました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

最初の毒性タンパク質データベースについてなのですが、こちらはおっしゃられたように社内のデータベースを用いてまして、ここで第5の2の(3)②、24ページという

ことで、最初の毒性タンパク質データベースを説明したところを引用しているのですけれども、この書き方では不足ということでしょうか。

〇〇〇 実際にこういうデータで構築されているというのは24ページからも分かるのですけれども、インターナルなデータベースという言い方を添付内でもされていたと思うのですけれども、そのような書き方のほうが正確かと思ったのですが。

〇〇〇 24ページで使用しているデータベースと全く同じものなので、今回こういった形で引用しております。

〇〇〇 24ページの欄外の3のデータベースは社内で構築したデータベースということでございますよね。

〇〇〇 おっしゃるとおり、社内で構築したデータベースです。

〇〇〇 なので、そうされたほうがより正確かと思ったのですが。

〇〇〇 承知しました。インターナルであることをということですね。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 分かりました。申し訳ありません。対応可能です。

あと、**allergen collagen**の誤記についても、こちらは修正いたします。

図7中でのORFの矢印についても、図7で矢印を挿入するか、別途図を作るかはまた検討させていただきますが、分かりやすいような形で検討させていただきます。

最後の有意な相同性についてなのですけれども、こちらはおっしゃるように*E-value*の閾値を今回100に設定していまして、相同性があったものについての*E-value*を見て有意か有意でないかという閾値が100というところで判断はしているのですけれども。

〇〇〇 100以下ですよ。100以下のものを選択したということになりますので、個々の*E-value*というのはここでも添付資料9の8ページ目の下側にありますけれども、*E-value*が0.18から4.7とかあるのですが、個々のアレルゲン、一致したアレルゲンについて*E-value*がそれぞれ出てくるはずなので、その値を示してもらえると、根拠になってくるかどうか。通常、 10^{-3} とか 10^{-4} 以上であれば有意差は低いとなるわけですが、その部分が具体的な数字が出てきていないので、個々のアレルゲンについてそのデータがあるはずなのですが。

〇〇〇 承知しました。具体的などの程度の相同性で有意ではなかったという根拠の数字を追記させていただきます。ありがとうございます。

〇〇〇 よろしくお願ひします。

〇〇〇 あともう一つが、事前にもお伺いしましたけれども、IPD083Cbタンパク質ですけれども、今回のタンパク質はホウライシダで全く食経験がないということ。それから、タンパク質のドメイン構造とかを事前にお聞きしましたけれども、そういった構造がないというか情報が出てこないということで、私のほうでも本当かと思って一応BLASTに投げてみたのですけれども、やはり出てこないということで、構造としての情報が全く出てこないということと、当然レセプターについては分かりませんということだと思ひるので、タ

ンパク質としての安全性を判断するのがかなり難しいかなと思いました。

それで、前回、似たようなシダ植物でヒト腸管上皮細胞を使った試験というのをお願いしましたけれども、できましたらヒト腸管上皮細胞を使って、生存率でもいいですし、バリア機能を見たような試験でも構いませんので、そういったin vitroの試験というのは可能かどうかお伺いしたいのですけれども、いかがでしょうか。

〇〇〇 まず、事前コメントの内容と重複してしまうのですけれども、今回IPD083Cbタンパク質の供与体であるヒシガタホウライシダ、*Adiantum*なのですが、おっしゃるように食経験はないのですけれども、要旨に記載しているように毒性ですとかアレルギー性を示すというような報告はこれまでありません。

加えて、スペクトルのデータから、このタンパク質は特定のチョウ目昆虫にのみ殺虫活性を示すと考えられますし、IPD083Cbタンパク質が人に対してアレルギー誘発性もしくは毒性を示す可能性は低いこと。

さらに、今回の34ページに記載しているのですけれども、COR23134は飼料用ダイズですので、そちらを考慮して、COR23134を原料としたダイズ加工品を通してヒトが有意な活性を保持したIPD083Cbタンパク質を摂取する可能性は低いということを記載しております。

これらをweight of evidenceとして考えますと、弊社としては現在のデータで十分に安全性を評価できる状態にあると考えておりまして、これまでに細胞毒性試験というのは実施しておりません。

また、可能かどうかなのですけれども、おっしゃられたように弊社は過去も当該試験を実施しているのですが、現状、ヒト細胞を用いたこういったin vitro試験が日本のみ要求されているということもあって、プロトコルを含めて国際的に標準化された手順というものが無い状態です。また、日本の国内においても、例えばどういった場合にどのような細胞を使ってどのようなエンドポイントで評価すべきか等の基準がガイドライン等で明確に決まっておりませんので、そういった状況を鑑みますと、今回食経験がないので、Codex 2009に基づいて経口毒性試験の結果も既に提出しているのですが、そちらの結果に加えておっしゃられたin vitro試験を実施するというのが難しい状況なのですけれども、いかがでしょうか。

〇〇〇 分かりました。

食経験があるか、もしくはタンパク質の構造で少しディスカッションができれば、こちらもある程度納得できる場所はあるのですけれども、その2つが両方とも欠けている状態ですので、できればやってほしいのですけれども、非常に難しいということであれば、その場合は参考資料としてマウスのデータを使うかということになりますけれども、この点についてはこの後こちらで審議したいと思いますので、その審議結果については後ほど事務局を通じてお知らせするようにしたいと思います。

先生方、事前に質問等をお寄せいただいた先生方もいらっしゃると思いますけれども、

それも含めて、この際何か聞いておきたいことがありましたら、どうぞお願いいたします。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 〇〇〇です。

ささいなことで、事務的なことかもしれません。宿主のダイズの説明について、表の中で単位が落ちているのか、桁数が間違っているのではないかと思ったのがあったので、もし分かっていたら埋めておいていただきたいのですが、申請書の2ページになります。表2でダイズ種子中の栄養阻害物質等というのがあって、%で表してあって、トリプシンインヒビターはTrypsin Inhibitor Unit、レクチンはmg/gと書いてあるのですが、トリプシン、レクチン、フィチン酸以降、スタキオース、ラフィノース、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテインというのがあって、最後の3つは3,061.20とか桁数が3つぐらいつれていて、多分析がずれているか、パーセントではなくてmg/kgあるいはμg/mgではないかと思うのですが、添付資料1を見ただけで分からないので、おのおの見ますといろいろな数字が出ているのですが、これは埋めておいていただけませんか。

〇〇〇 ありがとうございます。

すみません。恐らく単位の表記が間違っていると思いますので、そちらは確認後、修正いたします。ありがとうございます。

〇〇〇 よろしくお願いいたします。

以上です。

〇〇〇 ほかにございますでしょうか。よろしいですか。

それでは、こちらのほうの質疑に戻りますので、申請者の方、説明ありがとうございます。御退室をお願いいたします。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻りたいと思います。

修正ポイントは後ほど修正していただくということでしたので、そちらのほうを確認したいと思いますが、一番のポイントであります新規のIPD083Cbタンパク質の試験を実際に要求するかどうかという点について、皆様の御意見をお伺いしたいと思います。いかがでしょうか。現状は日本でしか申請されていないのですよと言われましたけれども、今回これをなしにしてしまうと、今後、新規のタンパク質が出てきたときに同じ論法で全部すり抜けられるかなという気もしなくもないですけれども、いかがでしょうか。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 1つ確認させていただきたいのですけれども、今回食経験も全くないということで、ちょっとどうなのかなというところはあるのですけれども、先ほどあったように、使用用途は基本的にはダイズ油でしかヒトには入らないということが書いてありますけれども、この辺の考慮というのはどの程度したらよいものでしょうか。何かしらで加工食品で普通に食べる可能性があるという場合と、高度精製まで行かないですけれども、このような用途しかないといった場合の考慮というのはどの程度考えたらいいのかなというのは、

お考えがあったらお聞かせいただければと思います。

以上です。

〇〇〇 特定の油のみを評価してほしいというケースもございますけれども、植物の場合は、基本的には極端な話、食べられるのであれば生でも食べてもいいと。要するに、トウモロコシでも甘い品種などに交配してそのまま生で食うと。デントコーンとスイートコーンは垂種扱いで別審議になるので、あまり表現としてはよろしくないのですけれども、基本的にはそういう何らかの制限をかけた形での摂食を意図した形のものとは想定してなくて、全部オーケーですよという形で普通の場合は評価します。

ただ、例外があって、前回のDHAを入れた油の場合にはどうしても評価項目に足りる情報が出せなかったんで、油として申請しましたというのが1件あるだけで、植物の場合は基本的には食べられるのだったらどういう形でもいいので食べてくださいという形のもので評価します。考え方としてはそうなります。

〇〇〇 ということは、今回は用途限定ではなくて普通の食品としての評価をしなければならぬということですね。

〇〇〇 そうなります。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 新規食品ということで、これからいろいろな新規食品がまだ出てくると思うのです。そういうことを考えると、マウスでやったからいいとやってしまうと、〇〇〇も言われたようにヒトとマウスで違うこともあるとといったところに引っかかるようなものがすり抜けてしまうことがあるのではないかとというのが気になります。

それで、先ほどの会社さんの回答では国際的に決まった手順がないからということでしたけれども、ないからといってやらないというのは違うのではないかなと。ほかにデータがないというのだったら、できるところはできるだけやって安全なほうを確認していったほうがいいというような考え方はあると思うのです。そういう意味で、ヒトの細胞を使った実験ができるのだったら、やってもらったほうがいいのではないかなとは思いました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 私は専門から外れているのですけれども、先ほど〇〇〇からお話がありましたが、最適な事例がないというようなところについては、OECDのテストガイドラインで487というものがヒトの細胞を使って、こちらはほかの先生のほうが詳しいと思うのですけれども、遺伝毒性の試験をやられるところなのですが、その中で細胞毒性についても対象となっているようでして、Caco-2を使ったようなものであるとか、ほかの細胞を使って発生試験をやるようなものもあるというような感じですか。なので、実施することは、例えばガイドラインがございますよということをお伝えすれば対応できるのではないかと。

以上です。

〇〇〇 少し音声聞き取りにくかったのですが、いわゆる国際的な何か、OECDの中にそういった細胞毒性を見るような試験項目があるということによろしいのですか。

〇〇〇 遺伝毒性を見る中で細胞毒性も見ているというようなところなのですから、評価項目としてそういったものになっておりますので、そういったものがありますよといったことでできるのではないかと。

〇〇〇 今回のものは、チョウ目昆虫の腸管の上皮細胞にあるレセプターにくっついて、大概是孔を開けて虫が死にますよという作用機作だろうと思われるのですが、この手のレセプターにくっつくというものは厄介でして、レセプターの構造がちょっと変わればくっついたりくっつかなかったりする。それで、チョウ目にはくっつくけれども、ほかの昆虫にはくっつきませんという形になっていきますので、マウスでの試験が必ずしもその手のものだとマウスで大丈夫だったからヒトで大丈夫ですかと言われたときに、ロジック的に厳しいところがやはりあるのではないかなというのが私の考え方です。一般的な別な形の細胞毒性とか毒性を示すようなタンパク質であれば、そういうことはないのだと思うのですが、この手のものは少しその点が厄介だなと常々思っているところでございます。

なので、日本しか求めていないと言われると非常に肩身が狭いのですが、可能であれば、Caco-2細胞でもいいので細胞毒性を見ていただけませんかという形で要求してみたいと思うのですが、それでもどうしてもやれませんかということであれば、またそのときに少し考えることにしましょうかね。

事務局的にはどうでしょうか。

〇〇〇 実際に追加の試験を要求するということにつきましては、今出されているデータでは安全性は確認できないということが大前提にあると思いますので、事業者がやらないからということではないと思いますね。それは必要な試験だということになるのだと思います。

〇〇〇 ということですので、求めることにしたいと思うのですが、反対というか、求めないほうがいいのではないかという意見をお持ちの先生がいらっしゃいましたら、挙手をお願いします。

よろしいですか。

事業者がやってくれるかどうかは分かりませんが、細胞毒性試験もしくは腸管バリア機能を見るような試験を少しやっていただくという形で要求を出してみたいと思います。よろしいでしょうか。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 では、事業者がどういう対応をするか分かりませんが、一応その形で要求したいと思います。

それでは、ただいま出ました意見を指摘事項案として取りまとめて、関係の専門委員の先生には御確認いただいた上で、消費者庁を通じて申請者に指摘するということにしたい

と思います。

では、食品のほうを持ち越しになりましたので、飼料のほうは今回はなしということで、次に進みたいと思います。

ここで〇〇〇、どうもありがとうございました。

(〇〇〇退室)

次の審議項目では〇〇〇がお入りになりますので、しばらくお待ちください。

(〇〇〇入室)

〇〇〇 〇〇〇、お待たせいたしました。ありがとうございます。

それでは、続きまして新規品目である「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ」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します。

〇〇〇 それでは、内容について説明をさせていただきます。

会場にいらっしゃる先生方につきましては、プラスチックファイルで配付しております資料を御確認ください。ウェブ御参加の先生方につきましては、先日送付させていただきました差し替え版のほうの資料のファイルをお開きいただきますようお願いいたします。

それでは、内容の説明を始めさせていただきます。

資料の1ページを御覧ください。

まず、比較対象となる従来の添加物についてでございます。従来の添加物は名前がPS-MPとなっております。有効成分がマルトースホスホリラーゼとなっております。

これの用途及び使用形態につきましては同ページ下のほうにございますけれども、マルトースとリン酸からβ-D-グルコース-1-リン酸とD-グルコースを生成する酵素であるということございまして、この特性を利用いたしまして、マルトースホスホリラーゼとほかのホスホリラーゼ製剤を組み合わせ、マルトースに作用させることによって、二糖やオリゴ糖の製造が行われるということでございます。

次の2ページをお願いいたします。

従来の添加物の摂取量でございます。従来の添加物ですけれども、糖化製品の製造の加工助剤として使用されるということございまして、砂糖・甘味料類の摂取量推計の値を用いまして計算したところ、175mg人/日、体重で割りまして3.2mg/kg体重/日と記載されているところでございます。

そして、宿主についてでございますけれども、同ページにございますが、宿主は*Bacillus subtilis* Marburg 168株を起源といたします*B. subtilis* ISW1214株ということでございます。こちらは、その後、6ページの図3に記載がされておりますとおり、ISW1214株を元株といたしまして、複数の遺伝子を欠失用コンストラクトなどを用いて欠失させまして、最終的に中間株として図3のb)の一番下でございますNTI06 (pDATSK) 株という株が、こちらに記載のとおり、トリプトファンtRNA合成酵素の遺伝子であります*trpS*遺伝子、そして、芽胞形成能に関与いたします*spoIIAC*遺伝子、この両遺伝子を欠失させ、そして、

*trpS*遺伝子をプラスミドの形で補完するpDATSKプラスミドを保持した中間株として作られているところという説明がなされております。

続きまして、7ページをお願いいたします。

供与体の種名、株名及び系統名等でございます。まず、マルトースホスホリラーゼをコードいたします遺伝子（*psmpm*遺伝子）の供与体は*Paenibacillus* sp. SH-55株ということでございます。また、選択マーカーとして機能いたします*trpS*遺伝子の供与体が宿主である*B. subtilis* ISW1214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けれども、*psmpm*はマルトースホスホリラーゼを、そして、*trpS*遺伝子につきましてはトリプトファンtRNA合成酵素をコードするというところでございます。先ほど申し上げました中間株であるNTI06（pDATSK）株のプラスミドpDATSKを脱落させつつ、両遺伝子を持つpHYT2MPMという発現プラスミドをプロトプラスチ法によりこの株に導入することで、今回の生産菌株でありますNTI06（pHYT2MPM）株を作ったということと説明されております。

続きまして、同ページ下のほうでございますが、遺伝子組換え添加物の性質等でございます。

まず製品名でございますが、T2-MPという名前になっておりまして、有効成分は同じくマルトースホスホリラーゼでございます。社内識別名がMPMという名前になってございます。

次の8ページを御覧ください。

用途及び使用形態等につきましては従来の添加物と同様でございますけれども、摂取量につきましてはこちらの記載のとおり推計がされておまして、同様に砂糖・甘味料の摂取量を用いて計算した結果、0.19mg-TOS/kg体重/日ということで計算されているところでございます。

続きまして、同ページ下のほうでございます。遺伝子組換え体と従来の添加物の相違点についてでございますが、これが11ページの表1に一覧としてまとまっております。この中でアミノ酸残基数が●●●と記載されているのですけれども、この新たな今回の申請品目につきましては、ページが戻りまして9ページにも記載がありますけれども、熱安定性の向上を企図いたしまして、●●●の変異が導入されていると説明されております。

11ページに戻っていただきまして、宿主に関する事項ということで、宿主の説明をさせていただきます。宿主は先ほど申し上げたとおり、*B. subtilis* ISW1214株というものでございまして、*B. subtilis*自体は非毒素産生微生物とみなされていること、有害生理活性物質の生産に関する報告がないこと、国立感染症研究所の病原体安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に該当するというところ、そして、*B. subtilis* Marburg 168系統株である*B. subtilis* ISW1214株についてはアレルギー誘発性があるということも報告されていないということが説明されているところでございます。

続きまして、12ページをお願いいたします。

ベクターに関する事項でございます。今回発現プラスミドの構築に用いられたベクターにつきましては、平成26年の1月に評価が終わっております「*Bacillus subtilis* DTS1451 (pHYT2G) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」の発現プラスミドであるpHYT2Gというのを使用したと説明されております。

このpHYT2Gにつきましては、pACYC177プラスミドというものを起源に設計された発現プラスミドということでございまして、当該プラスミドについては*Escherichia coli*由来のpACYC177プラスミド及び*Streptococcus faecalis*由来のpAM α 1プラスミドを利用して作られたということでございます。

次の13ページをお願いいたします。

このベクターにおける薬剤耐性に係る事項でございます。このプラスミドにつきましては、アンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン遺伝子を持っております。一方で、このうち、アンピシリン耐性遺伝子については*B. subtilis*中では発現しないということで記載されております。

続いて(6)でございます。こちらは宿主依存性に関する事項としては記載のとおりでございますけれども、当該プラスミドpHY300PLKにつきましては、*B. subtilis*の中においては単コピーではなく複数コピーで存在するというところでございます。

続きまして、14ページをお願いいたします。

挿入DNA、発現ベクターの構築に関する事項でございます。

まず、挿入DNAの名称等につきましてはこちらに記載のとおりでございまして、それぞれ供与体につきましては、(2)に記載がございまして、病原性ですとか毒素産生性などのヒトに対する有害性は知られていないということでございます。また、同じく国立感染症研究所の病原体安全管理規程のバイオセーフティレベル1に該当すると説明されているところでございます。

続いて、性質に関する事項等につきましてはこちらに記載のとおりでございまして、挿入遺伝子の供与体につきましては、供与体のアレルギー誘発性につきまして15ページに記載がございまして、*psmpm*遺伝子の供与体であります*Paenibacillus* sp. SH-55株につきましては、アレルギー誘発性があるとは知られていないということで文献検索等の結果が記載されているところでございます。

また、遺伝子産物につきましては、マルトースホスホリラーゼ及びトリプトファンtRNA合成酵素につきましては、両方とも文献検索の結果、アレルギー発生を持つとは知られていないということで、報告もないということでございました。

続きまして、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。導入遺伝子が2種類あるうちのトリプトファンtRNA合成酵素につきましては、過去に安全性認可を受けた評価済みの申請品目と同じアミノ酸配列のものであるということで説明されてございまして、このことから物理化学的処理に対する感受性について試験を省略したと記載されております。

続いて、*psmpm*遺伝子から産生するマルトースホスホリラーゼ (T2-MP) につきましては、人工胃腸液等の試験が行われております。その結果がこちらの15ページから記載がございます。

まず、人工胃液に対する感受性につきましては、結果、人工胃液処理開始30秒で人工胃液由来以外のバンドが消失したということで記載されております。

続きまして、16ページをお願いいたします。

今度は人工腸液における処理の結果でございますが、人工腸液処理の結果、最大6時間までの処理を行ったところ、6時間処理後でもバンドは消失しなかったという結果が報告されております。

続きまして、同ページ下のほう、加熱処理試験の結果でございます。80℃、pH4あるいはpH6での加熱試験を行っておりまして、その結果、加熱処理1時間で完全に失活するという結果が報告されております。

続きまして、17ページをお願いいたします。

遺伝子産物と既知アレルゲンとの構造相同性についてでございます。AllergenOnlineのデータベースを用いて、35%以上の相同性を示す80アミノ酸以上の配列、そして、連続する8アミノ酸配列との相同性検索が行われております。いずれの結果としても、相同性を有するアレルゲンはなかったという結果が記載されているところでございます。

続きまして、17ページの下でございますけれども、ベクターへの挿入DNAの組み込み方法に関する事項でございます。こちらは先ほども御説明さしあげましたとおり、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、これが平成26年に評価が終わった品目でございますけれども、そのときの発現プラスミドでありますpHYT2Gを、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを発現する遺伝子の部分を今回●●●した*psmpm*遺伝子に置換するという方法を取りまして、今回の発現プラスミドであるpHYT2MPMを作成したということでございます。

続きまして、18ページをお願いいたします。

発現ベクター中、発現プラスミド中のオープンリーディングフレームに関する事項でございます。これが18ページ下、(2)からでございますが、当該発現プラスミドの6通りの読み枠において、終止コドンから終止コドンで挟まれた30アミノ酸以上で構成されるオープンリーディングフレームについて検索が行われております。その結果、143個のオープンリーディングフレームが認められたということでございまして、そのうち70個はベクターでありますpHY300PLKプラスミド由来ということでございました。そして、挿入DNA領域を含むものにつきましては、残る73個であったということでございます。

これら73個のオープンリーディングフレームにつきまして、それらがコードするアミノ酸配列について相同性検索が行われております。

まず、NCBIデータベースを用いたBLAST検索、これが*E-value*が10未満を指標とする相同性検索が行われておりますけれども、その結果、29個のオープンリーディングフレーム

が相同性を有する配列が認められたということをごさいますけれども、その中に毒性タンパク質は含まれていなかったということをごさいます。

続いて、AllergenOnlineを用いたアレルギー誘発性の調査を行った結果をごさいます、35%以上の相同性を示す80アミノ酸以上の配列、そして、連続する8アミノ酸の配列につきまして、既知アレルゲンと一致するものはなかったということの結果が記載されているところをごさいます。

続きまして、19ページの下の方、7.抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項をごさいます。この発現プラスミドpHYT2MPM上にはアンピシリン耐性遺伝子、そして、テトラサイクリン耐性遺伝子が存在いたします。アンピシリン遺伝子につきましては、先ほども御説明させていただいたとおり、*B. subtilis*中では発現しないとされているということをごさいます。また、テトラサイクリン耐性遺伝子のほうにつきましては、テトラサイクリン排出タンパク質であるTetLをコードするというところをごさいますけれども、(2)に記載がごさいます、製品中のTetLの含有量をELISAにて測定したところ、0.025µg/mL未満であったということをごさいます。

加えて、20ページの上の方に記載がごさいますけれども、このTetLにつきましては精製工程において菌体とともに除去されるということも説明されているところをごさいます。

第5 組換え体に関する事項及び第6、第7につきましては、以降、記載のとおりをごさいます。

申請書の説明につきましては以上をごさいます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請資料の審議に入りたいと思います。

まず、申請書の1ページから13ページ、第1から第3の項目でコメントがありましたらよろしくお願いたします。事前に幾つかコメント等も寄せられておりますので、その回答も踏まえて何かコメントがありましたら、それもよろしくお願いたします。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 図2についてですが、特に(C)の部分が分かりにくいと感じました。赤い点線で最初の株を作り、その後青い点線でさらに組換え体を作成し、最終的に●●●ことを示していると思います。しかし、これは1つの染色体の概略図の中に2つの操作を同時に描いているため理解しにくいので、コメントとしては、この部分は切り分けて2つの図として示していただきたいと思います。

また、11ページの宿主に関する記載についてです。「Marburg 168を起源とする」と書かれていますが、本文をよく読むとオリジナルは1012株を使用しています。1012株はMarburg 168とW23を掛け合わせて作られた株であり、両者のゲノム相同性は94.6%程度で、約5.4%は異なる遺伝子です。そのため「起源がMarburg 168である」との記載はやや不正確に感じました。

さらに、図3(4ページ)に関しても説明がやや不親切に思います。下部に「目的株の出現」

と赤い矢印で示されていますが、実際の目的株は右端に位置していますし、赤い線の先端も拡大すると矢印のように描かれています。ここは解説をより丁寧に修正していただきたいです。

加えて、a) の最初の図では、四角の赤やピンクが何を意味しているのかが説明されていません。凡例を明確にするなど、より丁寧な説明を加えていただければと思います。

以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

そうすると、図の切り分けとか図の説明のところの修正は対面ではいいですね。後で指摘すればいいかな。ハイブリッドのところは対面でお聞きになりますか。

〇〇〇 そうします。

〇〇〇 分かりました。

そのほかございますでしょうか。

それでは、申請書の14ページから20ページ、第4 挿入DNA等の事項のところコメントがありましたらよろしくお願いします。

ここで●●●のところを〇〇〇、〇〇〇にお聞きしたいのですが、残存がないことをPCRで確認しているのですが、このくらいいいのですかねというところをお聞きしたいなと思ひまして、もし教えていただけたらありがたいです。基本、相同組換えなので大丈夫なのだろうなどは想像したのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 PCRでよかろうと思います。このくらい確認していただければと思います。

〇〇〇 問題はないと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。それで安心いたしました。

それから、これは事前にお聞きしたのですが、14ページの中段以降の *trpS* の●●●変異を入れというところをお聞きしたのですが、●●●しか基本的にはメジャーなものはないので、変えてしまっているのですかというつもりで質問したのですが、いま一つはぐらかされた回答になっていまして、これは多分マイナーな●●●にしたのだと思うのですが、〇〇〇とか〇〇〇、もし何かこうしたのではないかとということがあるのでしたら教えていただきたいです。

〇〇〇 枯草菌をはじめとするいくつかの細菌では、●●●として利用されることがよく知られています。その場合でも●●●に関わると考えられています。実際、文献でもしばしば報告されています。

今回の件については、質問文を拝見して改めて意識したのですが、これまで私は特に強く気にとめていなかった部分でした。そのため、なるほどそういうことなのだと理解しております。

〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 例えば大腸菌のホスホリラーゼみたいに元が●●●で、それを●●●に変えるなんていうのは●●●に行われることなので、やるとしたらそんなところかなと。この申請書類でも●●●になっていますので、元が●●●だったのを変えたのではなくて、●●●に変えたのだなどは勝手に思っていたのですけれども、これは質問してみれば済むことかなと思います。時々あることです。

〇〇〇 すみません。私、今ひとつよく分からないので、〇〇〇のほうから質問していただけますか。

〇〇〇 了解です。

〇〇〇 それから、こちらは後ほどの指摘事項でもいいのですけれども、14ページの一番下のところに塩基配列数の●●●とか出てくるのですけれども、これは添付資料の4と見比べたのですけれども、やはりよく分からなくて、添付資料の4で例えば *psmpm* というのは緑色、色別になっているのですけれども、それで●●●ぐらいあるのです。●●●になってなくて、多分●●●っぽいのですよ。なので、書きぶりをちゃんと添付資料4と合わせてほしいということです。これは指摘しなくてもいいかなとは思いますが。対面での指摘でなくていいと思うのですけれども。

そのほかございますでしょうか。よろしいですか。

それでは、申請書の20ページから22ページですけれども、ここでコメントがある方はお願いいたします。

それから、事務局から審議してほしいということで、従来の添加物の摂取量のところですが、申請書でいくと2ページの(4)のところにあります。この従来品は現在販売されていないので、TOS量の測定が不可能ということで、TOSの換算値を記載していません。実際に分からないということなのですけれども、今回のこの添加物に関しては基本的には加工助剂的に最終的な食品に残存しないということのようですので、そういう条件つきではございますけれども、あと、販売ももうしてなくて実際は分かりませんということです。こちらについては私としては今回はこれでよろしいかなと思いますが、皆様よろしいでしょうか。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 では、今回はそういう条件つきでよろしいということにしたいと思います。

それから、導入されたコンストラクトについて、複数コピーということになっているのですけれども、こちらは元の指針ではハイコピーかローコピーかぐらい記述してくださいみたいな形になっているのですが、回答は複数ということになっているのですけれども、〇〇〇、〇〇〇もしコメントがありましたらよろしくお願いします。

〇〇〇 一般に 枯草菌では、プラスミドのサイズ増大やコピー数増加は安定性低下の要因となり、多コピー型ベクターは多くないとされています。pAMa1のoriについては、文献で50コピー程度とあるので、そのようにするのがよいと考えます以上です。

〇〇〇 〇〇〇、コメントはありますか。

〇〇〇 pHY300系のプラスミドは枯草菌ではよく使われるもので、枯草菌に遺伝子組換えを使うときは染色体に組み込む手とプラスミドで入れる手があって、染色体に組み込むとせいぜい1コピーか2コピーぐらいしかいかないので、プラスミドがよく使われますが、〇〇〇のおっしゃるとおり、このプラスミドはせいぜい10コピーとかそのぐらいと私も記憶しております、10コピーを多コピーと考えるか低コピーと考えるか、そのぐらいの認識でありますので、だから、彼らも複数コピーとしか言いようがなかったのかなと思います。

先生方、いかがでしょうね。かれこれ10コピーというのは多コピーのうちに入りますでしょうか。

〇〇〇 そうしましたら、もし文献があるのでしたら、文献で5コピーから20コピーぐらいという文献を引用してもらって、それで多いとも少ないとも言わないという形でもよろしいかなと思うのですけれども。

〇〇〇 そのくらいでよろしいかと思います。ベースで使った大腸菌のpACYCプラスミドは5コピー以下で比較的コピー数が少ないものなので、これよりは多少多いので、私はpHY300系のプラスミドは基本的には多コピーと実は認識しておったのですけれども、文献を引いていただくように言うのがよろしいかなと考えます。

以上でございます。

〇〇〇 分かりました。

そうしましたら、ほかにコメントはありますか。

よろしく申し上げます。

〇〇〇 1点だけよろしいでしょうか。15ページなのですけれども、21行目になって、人工胃液の試験を行っているところなのですが、物理化学的試験をするときの抗原で、これはT2-MPとあるのですけれども、純度が気になるところで、21ページの図12で純度●●●とあるのですが、ここで用いたT2-MPが分かるように、例えば添付資料3とか少し資料、コメントを入れてもらえればと思いました。

あとは23行目ですけれども、「ポリクローナル抗体を用いた」ですが、今回は正確には抗ペプチド抗体を用いていますので、そのほうが正確だと思いました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

そうしますと、そちらは修正依頼ということでもよろしいですか。本当だとペプチドを抗原とするポリクローナル抗体だと。

〇〇〇 その場合、書き方はどちらですかね。

〇〇〇 抗体としては性能がやや限られてしまうのですけれども、今回は加工助剂的に使われるものでして、あまり最終産物に残らないということですので、この抗体でも問題ないかなと。ということでもよろしいでしょうか。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 そのほかございますでしょうか。

それでは、一応お聞きしたい点がありますので、申請者のほうにお入りいただいて少し審議したいと思います。

大分お昼が近づいていますけれども、11時58分まで休憩とさせていただきます。

(休 憩)

〇〇〇 それでは、申請者を交えて質疑応答に入りたいと思います。

説明者の方、会社名と氏名だけで結構ですので、紹介をお願いいたします。

〇〇〇 日本食品化工株式会社の〇〇〇と申します。本日はよろしくをお願いいたします。

〇〇〇 同じく、〇〇〇と申します。よろしく申し上げます。

〇〇〇 それでは、質疑応答に入りたいと思います。

3点ございまして、1点目ですけれども、申請書の11ページの宿主に関するところがございますが、こちらは〇〇〇、よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 質問させていただきます。

申請書の2ページと11ページに宿主についての記載があります。2ページの方が詳しく書かれており、そこでは「Marburg 168を起源とするISW1214株」と説明されています。しかし、ISW1214株は168株と23株のハイブリッド株から作られた1012株に由来するとされています。そのため、正しくはISW1214株は168株と23株のハイブリッド由来と理解すべきであり、「Marburg 168から来ている」という表現にはやや違和感を覚えます。この点についてご意見を伺いたいと思います。

以上です。

〇〇〇 ハイブリッド株であることは確かではあるという認識ですが、過去の申請なども踏まえて168株を起源とするということで今回は記載させていただきました。

以上になります。

〇〇〇 もしより正しくなるように記載できるようであれば、少し検討していただけたらと思います。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 確認します。

〇〇〇 その次は14ページですけれども、事前に質問させていただきましたが、trpSの●●●のところですが、こちらは〇〇〇のほうからより具体的に質問されると思いますので、〇〇〇、よろしく申し上げます。

〇〇〇 ●●●のところ、これはどちらも何か所かアミノ酸を改変していますけれども、この改変の意図と、それから、●●●のところを変えていると読めているのですが、これは元がどのようなアミノ酸で、●●●というのは通常は●●●なのですが、どういうふう

に変えたのかなど。説明していただけるとありがたいです。

〇〇〇 承知いたしました。

まず、*trpS*の●●●を変えた理由なのですが、*trpS*自体を宿主のゲノム上、もともと生育に必須な遺伝子として存在しているのですが、こちらをまず宿主のゲノム上から欠失させております。そうすると、宿主自体は*trpS*がないことによって生育は本来できないのですが、*trpS*をプラスミドに乗せて、そのプラスミドを宿主上に挿入することでゲノム上から失われた*trpS*を補完するというので、ある意味抗生物質耐性遺伝子を使わなくてもプラスミドが安定的に存在できるというような仕組みを用いているので、この*trpS*を用いているということになります。

*trpS*の●●●を変えている理由は、*trpS*自体の●●●に必須というところで、*trpS*の発現量が増えると相対的に同じベクター上に乗っている今回の目的遺伝子の●●●が増えるということが確認されておりますので、本来●●●であるものを変更しているといった具合になります。

今回の変異では●●●を具体的には●●●という塩基配列に変更しております、●●●だから今すぐ出てこないのですが、アミノ酸としては本当は多分別のアミノ酸になるのですが、●●●としてこの宿主内では機能して*trpS*が結果的に発現されていると理解しております。

〇〇〇 ありがとうございます。

元は●●●だったのね。●●●としても使われるときには●●●と読まれるというのは一般的に知られていることなので、問題ないです。●●●に変えると一般的には●●●ますので、●●●において、それで●●●したという理解でよろしいでしょうか。

〇〇〇 その御理解で問題ありません。

〇〇〇 ありがとうございます。

以上でございます。

〇〇〇 もう一点、資料2のTable 9についてお聞きしたいと思います。ここは芽胞形成能の評価結果で、熱処理前後の生菌数というかコロニー数を測定している表だと思います。気になったのは、熱処理後のデータが「0」となっている点です。これはおそらく実験条件の関係で検出限界未満だったと考えられます。そのため、「0」と表記するのはやや不適切で、科学的には「1未満」などの表現を用いるのが妥当ではないかと思いますが、いかがでしょうか。

〇〇〇 本来であれば実際にプレート上にまいて、CFUを測定したときの条件と照らし合わせて、この実験条件では何CFU未満/mLと記載すべきだと感じますので、これについてはそのように修正いたします。

〇〇〇 よろしく申し上げます。

〇〇〇 最後の質問ですが、今回用いたプラスミドのコピー数ですが、こちらは〇〇〇から申し上げます。

〇〇〇 今回用いたプラスミドが枯草菌の中で何コピーぐらいになるかというデータはお持ちでしょうか。

〇〇〇 具体的な数字のデータは持ち合わせておりません。

〇〇〇 何か参考となる文献値等、お調べになったこととかはございますでしょうか。

〇〇〇 pHY300PLK自体はおよそ50コピーぐらいだと思うのですが、最終的に構築されたプラスミドの状態でのコピー数については把握しておりません。

〇〇〇 その50コピーという根拠は枯草菌の中での根拠となるデータか何かはお持ちですか。

〇〇〇 参考文献がございまして、ここの数字に基づくとそれくらいと言われております。

〇〇〇 もしよろしければ、それも文章中に何コピーぐらいというのと文献値を追加していただくことは可能でしょうか。

〇〇〇 承知しました。修正いたします。

〇〇〇 そのほかの先生方でほかにコメントやお聞きしたい点等がありましたらよろしくお願いたします。

よろしいでしょうか。

そのほかにも、今回対面での質問には出していないけれども、幾つか修正していただきたいところがございますので、そちらについては後ほど事務局を通じてお知らせいたします。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 それでは、質疑についてはこれで終わりとしますので、申請者の方は御退室をお願いいたします。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、審議のほうに戻りたいと思います。

事前に事前コメント等を結構お寄せいただきまして、ありがとうございます。

それも含めて、何か特にまだ分からない点等がありますでしょうか。大丈夫でしょうか。

まだ修正箇所等はございますが、全体を通して食品の安全性上のリスクの懸念はないのではないかと思います。いかがでしょうか。皆様の御意思をお願いいたします。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 よろしいですか。ありがとうございます。

それでは、修正箇所等はございますけれども、安全性上の問題はないということになりましたので、引き続き評価書案の審議に入りたいと思います。

事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、評価書案の御説明をさせていただきます。

本日の配付資料の中の食品健康影響評価に関する資料をお開きください。

このうち、③、35ページからがマルトースホスホリラーゼの評価書案になります。御準

備をお願いいたします。

そうしましたら、内容の説明をさせていただきます。

40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 *B. subtilis* ISW1214株を宿主として、*Paenibacillus* sp. SH-55株に由来するマルトースホスホリラーゼ遺伝子を導入することにより作製された *B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼでございます。本添加物は、マルトースとリン酸から β -D-グルコース-1-リン酸とD⁺グルコースを生成する酵素でありまして、糖化品の製造工程で添加され、ほかのホスホリラーゼ製剤を組み合わせることでマルトースに作用させることにより、二糖やオリゴ糖の製造に用いられるということでございます。

続きまして、Ⅱの第1、1につきましてはこちらに記載のとおりでございますが、製造方法につきましては培養、ろ過、製品化等の工程を経て製造されると記載してございます。また、生産菌につきましては精製工程で分離・除去されるとしてございます。

続きまして、用途及び使用形態につきましてもこちらに記載のとおりでございますけれども、当該酵素を用いた食品の製造工程では、通常、酵素タンパク質は不活化除去されるため、最終食品には活性を有する酵素は存在しないと記載してございます。

41ページをお願いいたします。

摂取量でございます。全ての砂糖・甘味料の製造に従来の添加物PS-MPが使用され、最終製品中に100%残存すると仮定をした場合、マルトースホスホリラーゼの一日摂取量は3.2mg/kg体重/日であるとしてございます。

続きまして、宿主に関する事項でございます。宿主は *B. subtilis* ISW1214株でございます。この菌株につきましては、*B. subtilis* Marburg 168株を起源といたしております。*B. subtilis* ISW1214株は *B. subtilis* Marburg 168株と *B. subtilis* 23株のハイブリッド株である *B. subtilis* 1012株のテトラサイクリン感受性株として作製されたものとして記載をしているところでございます。

続きまして、(2) *B. subtilis*につきましても、食品用酵素の生産菌としての安全性を確立されているものと記載してございます。

(3) 宿主の構成成分に関する事項でございますが、*B. subtilis*は非毒素産生性微生物としておりまして、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レベル1に該当するとしてございます。また、アレルギー誘発性があるとの報告はされていないともしてございます。

(4) から (6) まではこちらに記載のとおりでございます。

42ページをお願いいたします。

挿入DNAに関する事項でございます。マルトースホスホリラーゼ (MPM) をコードする *psmpm*遺伝子の供与体は *Paenibacillus* sp. SH-55株でございます。

また、菌株の選択マーカーとして使用された *trpS*遺伝子の供与体が宿主である *B.*

subtilis ISW1214株ということでございます。

NTI06 (pHYT2MPM) 株は *B. subtilis* ISW1214株の染色体上の複数の遺伝子 (*trpS*及び *spoIIAC*遺伝子) を欠失導入用コンストラクトを用いた相同組換えにより欠失させることによって作製されております。その際に欠失導入用コンストラクト由来の配列の残存は生じていないことが確認されております。

(2) は記載のとおりでございます。

続いて4.遺伝子組換え添加物の性質、用途に関する事項につきまして、(1) は記載のとおりでございます、(2)、(3) につきましては同様の記載となっております。

(4) でございますけれども、同様に砂糖・甘味料を通したマルトースホスホリラーゼの一日摂取量を計算しておりまして、0.19mg TOS kg体重/日と記載されております。

(5) はこちらに記載のとおりでございます。

続きまして、5.相違点につきましては、(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点、(2) 組換え体と宿主の相違点につきましてはそれぞれ記載のとおりとなっております。

続きまして、44ページをお願いいたします。

第2.遺伝子導入に用いる塩基配列に関する事項でございます。

ベクターに関してでございますけれども、(1)、(2) につきましてはこちらに記載のとおりでございますが、(3) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項でございますけれども、プラスミドpHY300PLKにはテトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が含まれているとしてございます。なお、*B. subtilis*中ではアンピシリン耐性遺伝子は発現されないとされているとも記載してございます。

続きまして、(5) プラスミドpHY300PLKですけれども、こちらは *B. subtilis*中で複数コピーで存在する旨、こちらに記載してございます。

続きまして、3.挿入DNAの供与体に関する事項につきましては、こちらに記載のとおりでございます。

続きまして45ページ、4.導入遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項でございます。 *psmpm*遺伝子がコードするマルトースホスホリラーゼ (MPM) につきましては、マルトースとリン酸からβ-D-グルコース-1-リン酸とD-グルコースと生成する反応を触媒する酵素であるとしてございます。

また、*trpS*遺伝子がコードするトリプトファンtRNA合成酵素につきましては、組換え体の内在性のトリプトファンtRNA合成酵素の遺伝子欠失を補完するものということでございます。

続いて、5番、6番につきましてはそれぞれ記載のとおりでございますが、ベクターへの挿入DNAの組み込み方法に関しましては、46ページに記載がございまして、本発現プラスミドにつきましては、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ、これが脚注に記載がございまして、平成26年に食品安全委員会において了承された品目で、こ

これらの発現プラスミドのシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子及びシグナル配列を今回の *psmpm* 遺伝子及びシグナル配列と置換することによって発現プラスミドが作製されたとしてございます。

7番でございますけれども、こちらは記載のとおりでございます。

続きまして、第3でございます。

第3のうち、1番、2番は記載のとおりでございますが、(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につきまして、本生産菌株で用いられております発現プラスミド *pHYT2MPM* が宿主のゲノムに挿入されずに保持されるということございまして、この発現プラスミドの全塩基配列について、6つの読み枠においてオープンリーディングフレームの検索を行っております。終止コドンから終止コドンまでで終結する連続する30アミノ酸以上のオープンリーディングフレームは143個を見いだされたとしてございまして、そのうち、挿入DNA領域を含むオープンリーディングフレームは73個、ベクターバックボーンのオープンリーディングフレームが70個と記載してございます。そのうち、挿入DNA領域を含むオープンリーディングフレームについては、タンパク質データベースを用いた毒性タンパク質の相同性検索につきまして *E*-value 10未満を指標として検索を行っておりまして、その結果、29個のオープンリーディングフレームに相同性が認められたとしてございますが、既知の毒性タンパク質との相同性はそれぞれ見られなかったと記載をしてございます。

また、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た相同性検索を行った結果、80アミノ酸配列で35%の相同性を示すオープンリーディングフレームとして連続する8アミノ酸配列が一致を示すオープンリーディングフレームはそれぞれ見いだされなかったとしてございます。ベクターバックボーンにつきましてはこちらに記載のとおりでございます。

続きまして、3.組換え体の選抜に関わる遺伝子の安全性に関する事項につきまして、こちらは記載のとおりではございますけれども、テトラサイクリン耐性遺伝子の産物につきましては、精製工程において菌体とともに除去されると記載しているところでございます。

続いて4番でございます。導入遺伝子の供与体について、アレルギー誘発性についてでございますけれども、*psmpm* 遺伝子の供与体で *Paenibacillus* sp. SH-55株につきましては、アレルギー誘発性を示すとの報告はないとしてございます。

48ページに続きの記載がございまして、*trpS* 遺伝子の供与体である宿主 *B. subtilis* ISW1214株につきましては、同じくアレルギー誘発性を示すという報告はないとしてございます。

続きまして、遺伝子産物につきましてもそれぞれアレルギー誘発性を示すという報告はないと記載してございます。

続いて(3)でございます。マルトースホスホリラーゼについて、物理化学的処理に対する関連性の結果をそれぞれ記載してございます。人工胃液につきましては試験開始30秒後

までに消化されること、人工腸液につきましては試験開始6時間を経過しても消化されなかったこと、加熱処理試験に対する感受性につきましてはpH4.0、6.0で80℃において1時間の加熱により失活したということをご記載してございます。

また、②といたしまして、トリプトファンtRNA合成酵素については、既に食品安全委員会の食品健康影響評価が終了している品目で発現するものと同じアミノ酸配列であるということから、物理化学的処理に対する感受性試験は実施しなかったと記載してございます。

また、(4)につきましては、T2-MPと既知のアレルゲンと同一性を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて同一性検索を行った結果、80アミノ酸配列で35%以上、そして、連続する8アミノ酸配列でそれぞれ一致するアレルゲンは見いだされなかったとさせていただきます。

以降、第4、第5、第6につきましては記載のとおりでございます。

評価書案につきまして御説明は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案について御意見、コメントを賜りたいと思います。

なお、細かい字句等の修正につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいたしたいと思っております。

全体を通してコメントはありますでしょうか。

宿主の64行目からのところですがけれども、こちらは表現的にはこのままでもいいのかね。

〇〇〇 先ほど指摘したところなのですがけれども、事務局には事前にこういう修正案もありますというのは私のほうからお示ししたのですがけれども、日本食品化工株式会社のほうからどういう修正が返ってくるかを見て、その表現を使うのがいいかなと思っております。

以上です。

〇〇〇 承知いたしました。修正の上、また皆様に御確認をいただきたいと思っております。

〇〇〇 それから、199行目のところの例のコピー数ですがけれども、こちらはどうしましょうか。そちらも回答待ちにしましょうか。

〇〇〇 先ほどの回答では文献があるということなので、それを確認して、文献値を数値的に入れるのが妥当なのかと思っております。

以上です。

〇〇〇 承知いたしました。こちら回答を待つ修正の上、また御確認いただきたいと思っております。

〇〇〇 そのほか、評価書案につきましてコメント等がありましたらよろしく願います。

よろしいですか。

それでは、今回評価書の審議に入りましたけれども、回答を待つ少し表現を変えると

ころがありますので、そちらについては該当の先生に確認をしていただいた上で、修正が終わった後で、最終的にはもう一度委員の先生方に回しましょうか。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 その上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に入りたいと思います。

以上でマルトースホスホリラーゼの審議については終了としたいと思います。

それでは、議題（1）については終わりたいと思います。

議題（2）の「その他」ですけれども、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 ありがとうございました。

それでは、本日の議題についてはこれで終了しました。12時を超えまして、皆様の御協力、大変ありがとうございました。

お昼を過ぎまして大変恐縮でしたけれども、以上をもちまして第267回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

適宜御退室ください。ありがとうございました。