

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第211回) 議事録

1. 日時 令和3年5月26日(水) 14:00~16:05
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) 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
 - ・JPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
 - ・*Bacillus subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株を利用して生産された α -グルコシルトランスフェラーゼ
 - (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、樋口専門委員、
山川専門委員、吉川専門委員
(食品安全委員会)
佐藤委員長
(事務局)
鋤柄事務局次長、石岡評価第二課長、蛭田評価情報分析官、
松原課長補佐、山口係長、松井技術参与、松田技術参与
5. 配布資料
資料 食品健康影響評価に関する資料
 - ①JPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
 - ②*Bacillus subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株を利用して生産された α -グルコシルトランスフェラーゼ
6. 議事内容

○中島座長 それでは、ただいまから第211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」に基づきまして非公開で行います。

また、「テレビ会議又はWeb会議システムを利用した食品安全委員会等への出席について」に基づきまして、ウェブ会議システムを利用して行います。

本日は、所用により、飯島専門委員、手島専門委員、吉川専門委員は御欠席です。

本日の議題ですが、いずれも新規品目であります。一つはJPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼ、もう一つは*Bacillus subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株を利用して生産された α -グルコシルトランスフェラーゼの安全性についての審議です。

お手元の資料を確認いたします。事務局のほうからお願いいたします。

○事務局 それでは、議事次第に基づき、配布資料の確認をさせていただきます。

配布資料は、議事次第、専門委員名簿、食品健康影響評価に関する資料、及び机上配布資料は1と2と2つございます。

また、本日は、JPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼの申請者であるノボザイムズジャパン株式会社、*Bacillus subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株を利用して生産された α -グルコシルトランスフェラーゼの申請者である日本食品化工株式会社の方をそれぞれ呼びしております。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。

以上でございます。

○中島座長 それでは、事務局のほうから食品安全委員会における調査審議方法等についてに基づきまして、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。

○事務局 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きまし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。

○中島座長 既に御提出いただいております確認書につきまして、その後、相違等ございませんでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、審議に入る前に、ウェブ会議における注意事項があるそうですので、事務局のほうから御説明をお願いいたします。

○事務局 それでは、説明させていただきます。

本日は、ウェブ会議形式で行いますので、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きようお願いいたします。

2点目、発言の際には赤い挙手カードを御提示ください。または、ウェブ会議画面の挙手ボタンを押してください。座長よりお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、音声接続不良時または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度入室していただくことにより改善する場合もございます。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、事務局までお電話をお願いいたします。

4点目、議事中、意思確認をお願いすることがございます。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。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、早速、新規品目でありますJPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼについて審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうから説明をお願いいたします。

○事務局 それでは、申請書の説明に入ります。

その前に、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、ノボザイムズジャパン株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書の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。その後説明者にはウェブ上で入室していただき、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、申請書の説明をさせていただきたいと思います。

申請書要旨の御準備をお願いいたします。

また、先ほども申し上げました机上配布資料1も併せて準備をお願いいたします。

それでは、始めさせていただきます。

まず1ページ目、「はじめに」というところがございますが、本製品はグルコアミラーゼでございます。*Trametes cingulata*という腐朽菌のグルコアミラーゼ遺伝子を、宿主とする*Aspergillus niger*に導入をしたものでございます。

グルコアミラーゼは、アミロース、アミロペクチンなどのデンプンを末端から加水分解してグルコースを生成させるものでございます。

続きまして、2ページ目をお開きください。第1の1の(3)用途でございます。こちらは次の3ページ目の図1のとおりでございますが、デンプン糖の製造工程の中の糖化の工程で用いられるものでございます。

続きまして、4ページ目、第1の2の1、宿主に関する情報でございます。宿主につきまし

ては、先ほど説明したとおり、*Aspergillus niger* BO-1株となっております。

第1の2の2、導入される遺伝子と供与体についてでございます。こちらはグルコアミラーゼ遺伝子の *amgTC* のほか、選択マーカーとして *A. niger* 由来の *hemA*、*Aspergillus nidulans* 由来の *amdS*、*Saccharomyces cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子、あと、プロモーターとして *A. niger* 由来の *na2* と *nidulans* 由来の *tpi* をくっつけたものとターミネーターは *niger* 由来のものが組み込まれるといったものでございます。

続きまして、6ページ目でございます。第1の2の3、導入方法でございますが、宿主の *niger* BO-1株から●●●遺伝子を欠失させ、*hemA* と *amgTC*、*amdS* のそれぞれ2つの発現カセットを導入するといったようになっております。

10ページ目でございます。第1の6の1、真ん中辺りでございますが、従来の添加物の相違点でございます。こちらは表3のとおりでございます。従来のグルコアミラーゼと比べて至適pH、至適温度が若干広めといったものでございます。遺伝子の違いについては、次のページの表4のとおりとなっております。

次に12ページに参りまして、第2、宿主に関する事項でございます。宿主の *A. niger* BO-1株については、既に評価済み品目でも宿主として用いられており、病原性がない、有害活性物質をつくらないことが確認されているものでございます。

17ページをお願いいたします。第4、挿入DNA、遺伝子発現ベクターについてでございます。供与体のうち *T. cingulata*、*A. nidulans*、*S. cerevisiae* につきましては、第4の1の2、このページの下のほうでございます。 *T. cingulata* については、食経験は知られていないところでございますが、病原性の報告は示されていないものでございます。

A. nidulans につきましては、組換え微生物のマーカー遺伝子としてよく使われてきているもの、*S. cerevisiae* については、発酵用酵母として使われているものでございます。いずれの菌にいたしましても、バイオセーフティレベルは1に分類されているものでございます。

続きまして、19ページ、第4の2の3でございます。挿入遺伝子の機能に関する事項について、*amgTC* については比較対象の従来の *A. niger* 由来のグルコアミラーゼと比較したところ、●●●の相同性が示されているといったものでございます。

続きまして、20ページに参りまして、第4の2の3の3) 真ん中辺り、遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性についてでございます。

まず①人工胃液に関する感受性につきましては、図7のとおりでございます。開始30秒で *amgTC* のバンドが消え、また、消化されたタンパクの断片と思われるバンドも20分で消化されているところが示されております。

続きまして、21ページに参りまして、②人工腸液に関する感受性でございます。こちらについては、消化されないことが確認されております。

③加熱処理についてでございます。22ページの図9でございますが、pH 5、30分で活性を確認したところ、図9のとおり75℃で完全に失活をしているところでございます。

続きまして、その下、4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとその構造相同性に関する知見でございます。アレルゲンとの構造相同性については、*amgTC*と80アミノ酸残基で35%以上の相同性については2つ検出されております。1つ目、*Asp n 14*につきましては、食物アレルゲンとしては登録されていないといったところ。2つ目の*Sch c 1*につきましては、23ページに移りまして②の連続する8アミノ酸配列で一致するアレルゲンとしても検出をされております。しかし、これは気管支肺真菌症の原因菌である *Schizophyllum commune* 由来のグルコアミラーゼであり、当該グルコアミラーゼをアレルゲンとする報告は今まで1件のみ報告されているということで、こちらも食物アレルゲンではないと考えられているところでございます。

29ページ、第4の5、今回導入されたベクターについてでございます。今回、ベクターは *pJPV029*と*pJPV030*の2つ入れております。*pJPV029*につきましては、29ページの図11のとおりで、*amgTC*と*hemA*と*URA3*が入っているところでございます。

構成要素につきましては、次の30ページのとおりとなっております。

この30ページについて、修正がございます。今回机上配布させていただきました資料を御覧ください。修正箇所につきましては、30ページの構成要素の表の下から2つ目の*pUC19*プラスミドについて少し詳細に記載されたというものでございます。

続きまして、*pJPV030*につきましてはでございます。こちらは31ページの図12と、構成要素については32ページの表7のとおりとなっておりますところでございます。こちらの表7につきましても、机上配布資料1の2枚目のとおり同様の修正となります。

続きまして、33ページに参ります。これらのベクターの中に目的外のタンパク質が発現する可能性がないか、ORFの検索をした結果でございます。アレルゲンにつきましては、遺伝子産物のところで申し上げた結果と同じでした。また、毒性タンパク質との相同性につきまして、データベースでヒットしたものは34ページの表8のとおりでございます。こちらに示すとおり7つORFがございました。

こちらの内容につきましては、病原菌で発現するタンパク質、または病原性因子といったものでございますが、単独で同性が報告されているものではなかったことと、あとは毒性ペプチドと相同性は認められるものの、同じ機能があることを示唆するほどのものではなかったことから、毒性を有するタンパク質は含まれていないと考えられているところでございます。

続きまして、37ページをお願いいたします。第4の6、DNAの宿主への導入方法に関する事項でございます。今回の導入方法につきましては、方法としてはプロトプラスト形質転換法を用いて行われております。まず、*pJPV029*を導入して5-アミノレブリン酸がない培地で選択をし、その後、*pJPV030*を導入して、アセトアミドを唯一の窒素源とする培地を使うことで選択をしているといったところでございます。これによって目的の*amgTC*遺伝子が複数コピーされているといったところになっております。

その下、第4の7、抗生物質マーカー遺伝子についてでございます。*pJPV029*及び*030*に

つきましては、抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていないと報告をされております。この2つのベクターの基となったプラスミドのpUCにつきましては、アンピシリン耐性遺伝子が含まれておりますが、机上配布資料の導入ベクターの構成要素のpUC19由来の配列のところを見ていただければと思いますが、アンピシリンの耐性遺伝子の配列は含まれておらず、●●●となっております。したがって、抗生物質マーカーは含まれていないといったところでございます。

続きまして、38ページ、第5の2の真ん中辺りでございます。こちらは次世代シーケンスでゲノム解析をしているというものについてでございます。今回、プロトプラスト法による導入でございますので、導入箇所を特定するため、ゲノム解析を行ったということでございます。その結果、pJPV029については●●●染色体に入っています。39ページ目に参りまして、pJPV030につきましては●●●染色体に挿入されているといったことが分かりました。また、定量PCR解析によってコピー数は●●●と推定されているところでございます。

続きまして、40ページをお願いいたします。組換え体のところのORFの確認をしております。こちらは挿入した配列の両端の接続領域の、宿主側1,000bpと挿入配列側の500bpでORFの検索をしているものでございます。イメージとしては、この図14と図15のとおりでございます。

検索の結果でございますが、pJPV030で8アミノ酸の連続した配列で一致が見つかりました。しかし、こちらは食物アレルギーとして登録されていないといったものであり、アレルギーエピトープとしても一致するものではなかったといったところでございます。

また、毒性タンパクの検索については、接合部分をまたいで新たに生じるORFは検索してヒットしませんでした。したがって、アレルギー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ているところでございます。

続きまして、44ページ、第7でございます。遺伝子組換え食品添加物に関する事項でございます。第7の1、諸外国における認可と食用等に関する事項でございます。このグルコアミラーゼにつきましては、欧州、米国で約10年前から販売されているものでございます。

46ページをお願いいたします。第7の3、製造に由来する安全性に関する事項でございます。こちらでは添加物の規格基準の範囲内であること、また、オクラトキシンA等がつかわれていないといったところを確認しております。

説明につきましては以上でございます。御審議のほどよろしくをお願いいたします。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして、先生方の御意見をいただきたいと思っております。ノボザイムズ社ですし、これまでに何度も出てきているタイプの申請でございますので、ポイントも限られようかと思っておりますので、申請書全体につきまして、どこでもお気づきになった点がございましたら、御質問、御意見等をいただければと思っております。

小野先生、よろしく申し上げます。

○小野専門委員 ちょっとしたことなのですから、20ページのアレルゲンデータベースの検索なのですが、文献検索が2019年9月となっているので、もうちょっと新しくいいのではないかなというので、その部分の更新をお願いしてもいいのではないかなと思います。

以上です。

○中島座長 アレルゲンデータベースはどのぐらいの頻度で更新されているものなのか。2019年というところ。

○小野専門委員 アレルゲンデータベースといってもPubMedとかも含まれているので、そういうのも含めてということですか。

以上です。

○中島座長 アレルギーにお詳しい先生、どなたかこの辺に関して御意見いただければと思うのですが、橘田先生、いかがですか。

○橘田専門委員 橘田です。

PubMedに関しては、確かにもう少し新しいものがあったとしてもいいのかもしれませんが、アレルゲンデータベースの更新頻度については私、承知しておりませんので、申し訳ありません。

ただ、2019年から、今は2021年ですよ。1年半ぐらいに大幅にアレルゲンが特に増えたということもあるのかどうか、ちょっとその辺も承知していないので分からないのですが、これまではいかがだったのでしょうか。これぐらいのものは使われていたような気もするのですが、明らかな回答ができなくて申し訳ございません。

○中島座長 ありがとうございます。

事務的には最近の例とか、微妙かなという気もするのですが、2017年だったものは、それは古いとした経緯は確かにありますね。

安達先生、御意見をお願いできますか。

○安達専門委員 アレルゲンデータベースの更新頻度なのですが、例えば、22ページにありますネブラスカ大学のFARRPがやっているアレルゲンデータベースの場合ですと、大体1年に1度のペースで更新されていると思います。ここにはアレルゲンプロテインデータベース、バージョン19を使ったと書かれていますが、今一番新しいものではバージョン21になっていると思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。勉強になりました。

これについては、念のため最新のもので検索していただくように言おうかと思っております。

ほかに先生方。

小野先生、よろしく申し上げます。

○小野専門委員 たびたびすみません。意見というよりは質問になってしまうのですけれど

ども、38ページのところに次世代シーケンスの解析があるのですが、それと同時に、コピー数はどのぐらい入ったかというのが分からないということで、わざわざ定量PCRをしてコピー数を決めているということなのですが、次世代シーケンスをして、そのデータを基にプラスミドのコピー数は想定できるのではないかなという気もするのです。その辺、先生方でお詳しい方がいたら教えていただきたいなというところですよ。

以上です。

○中島座長 タンデムに並んでいる、こういうもののコピー数はなかなか難しい問題で、これまでも何度かこんなパターンがあったかと思います。中には次世代シーケンサーで染色体のほかの部分に比べて当該の部分は何倍ぐらいヒットしたかというので推定していた例もありました。なので、彼らもそのデータからと、あと、●●●コピーというのもやっておりますので、それと矛盾しないとか言ってくれてもよかったのではないかなと思うのですが、いろいろな例があって、少なくとも次世代シーケンサーはやってみただけでも、それでコピー数は分からなかったという報告のほうが今までは多かったですね。次世代シーケンサーの結果、このぐらいであるといった例も今まではございました。なので、次世代シーケンサーというのは思ったほど万能ではないなというのがこれまでの私の印象ではあります。

私の覚えている限りではそういう感じなので、今回の彼らが出してきたデータ、次世代シーケンサーでは不明で、結局タンデムで●●●コピーと一応報告していますけれども、私個人としては、それほど違和感はないかなという印象です。

小野先生、よろしいですか。

○小野専門委員 ありがとうございます。大丈夫です。

○中島座長 ほかの先生方。

あまり御意見がないようで、実は私も精査させていただいたのですが、既に諸外国で10年以上前から発売されているものでもありますし、そんなに問題はないかなと思いました。

アレルゲンデータベースについては、一応最新のもので検索はやり直していただくということで、これは含むということで、それ以外をもって安全性に特に懸念、心配だという先生方はいらっしゃいますでしょうか。

では、この件については、安全性については特に懸念はないということで判定してよろしいでしょうか。先生方、御意思をお願いいたします。

(同意する委員あり)

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、皆さん同意いただけましたようですので、安全性については特に懸念はないということで、評価書案に入りたいと思います。早速お願いいたします。

○事務局 それでは、評価書案の審議のほうに入りたいと思います。

資料をお願いいたします。

グルコアミラーゼにつきましては2ページ目からでございます。

読み上げますので、7ページ目をお願いいたします。

「I. 評価対象添加物の概要」でございます。

名称はJPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼ、用途はデンプン製造時の糖化効率の向上でございます。

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1株を宿主として、*Trametes cingulata* TC42432株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製されたJPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼである。本添加物は、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して β -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用されるとしております。

続きまして、「II. 食品健康影響評価」でございます。

第1、安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違につきましては、1の(1)から(4)につきましては、この記載のとおりとしたいと思います。

次のページに参りまして、2、宿主及び導入DNAでございます。

(1) 宿主の種名(学名)、株名等及び由来でございます。宿主は、*A. niger* BO-1株である。*A. niger* BO-1株は、自然界から分離された*A. niger* C40-1株に突然変異誘導を行い、グルコアミラーゼ生産性を向上し、夾雑酵素である α -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能を欠失した株としております。

(2)、(3)につきましては、あとその下の3、宿主の添加物製造への利用経験、4、宿主の構成成分等に関する資料、5、遺伝子組換え添加物の性質及び用途に関する資料については記載のとおりでございます。

次のページに参りまして、(2) 製造方法から(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較についても記載のとおりとしております。

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につきましてはでございます。

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物につきましては、*amgTC*と従来のグルコアミラーゼの相違点は、基原、アミノ酸残基数、至適pH及び温度が異なる点としております。

(2) 組換え体と宿主につきましては、JPAN009株と宿主との相違点は、JPAN009株は*amgTC*遺伝子が複数コピー導入され、グルコアミラーゼの高産生性を獲得している点、*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子を導入している点及びグルコアミラーゼの生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点であるとしております。

続きまして、第2、宿主に関する事項でございます。

1、分類学上の位置づけ及び2、病原性及び有害生理活性物質に関する事項は、記載のとおりとしております。

10ページ目に参りまして、3、寄生性と定着性、4、病原性、5、宿主の近縁株の病原性等につきましても、記載のとおり。

第3、ベクターに関する事項に関しても、記載のとおりとしております。

11ページ目に参りまして、第4、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でございます。1、挿入DNAの供与体に関する事項ということで、(1) 名称、由来及び分類に関する事項につきまして、*amgTC*遺伝子の供与体は*T.cingulata* TC42432株である。*hemA*遺伝子、*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子の供与体は、それぞれ*A.niger* BO-1株、*A. nidulans* Glasgow野生株及び*Saccharomyces cerevisiae* FL100株であるとしております。

(2) 安全性に関する事項につきまして、それぞれ記載のとおりとし、いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるBSL1に相当するとしております。

2、挿入DNA又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項につきまして、(1) から(3) につきましても記載のとおりとしております。

12ページ目に参りまして、① *amgTC*遺伝子につきまして、この *amgTC*遺伝子がコードする *amgTC*は、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 β -D-グルコースを生成する。

挿入遺伝子の供与体アレルギー誘発性に関する知見につきましては、*T. cingulata*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なかった。

b、遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見につきましては、*amgTC*を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はなく、また、*T. cingulata*由来のグルコアミラ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なかったということでございます。

c、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につきましても、記載のとおりということでございます。

d、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につきましても、この記載のとおりとしております。

続きまして、13ページ目に参りまして、②から④、*hemA*遺伝子、*amdS*遺伝子、*URA3*遺伝子につきましても、この記載のとおりとしており、以上のことから総合的に判断し、*amgTC*、5-アミノレブリン酸合成酵素、アセトアミダーゼ及びオロチジン、5'リン酸デカルボキシラーゼが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。

続きまして、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ございます。

(1) プロモーターに関する事項から、次のページに参りまして、(2) ターミネーターに関する事項、(3) その他の遺伝子につきましては、記載のとおりとしております。

続きまして、4、ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項でございますが、こちらも記載のとおりとしております。

また、5、構築された発現ベクターに関する事項につきまして、(1) 塩基数及び塩基配

列と制限酵素による切断地図に関する事項については記載のとおりで明らかとなっているとしております。

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないことにつきましては、遺伝子導入用ベクターpJPV029及びpJPV030において、*amgTC*遺伝子、*hemA*遺伝子、*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子以外のオープンリーディングフレームの有無に関するため、全領域のORF検索を行ったところ、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連続する30アミノ酸のORFが、それぞれ029で168個、030で174個検出された。それらのORFと既知のアレルゲンの相同性を確認するため、データベースを用いて相同性検索を行った結果、第4の2の(3)と同じ結果が得られたということで、毒性タンパクについてもデータベースを用いて検索したところ、7個のORFがタンパク質と相同性を示したが、いずれも毒性を有するとは考えにくいタンパク質であった。

したがって、遺伝子導入用ベクターpJPV029及びpJPV030には、アレルギー誘発性及び毒性をコードするORF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、(3) 宿主に関して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上明らかであること。については、意図する挿入領域は、この2つのベクターの全領域であるとしております。

(4) 挿入しようとする発現ベクターは、目的外の組換えがないように純化されているかにつきましては、遺伝子導入用ベクターの029及び030は、全長塩基配列を解析した結果、その配列は構築したとおりということが確認され、精製されたものが用いられていることから、目的外の遺伝子の混入がないように純化されているとしております。

6、DNAの宿主への導入方法に関する事項でございますが、遺伝子導入用ベクター029を宿主ゲノムへプロトプラスト法を用いて導入後、*hemA*遺伝子による選抜を行った。続いて、ベクター030を同様にゲノムへプロトプラスト法にて導入し、*amdS*遺伝子による選抜を行った後に、グルコアミラーゼ活性を指標として形質転換体を選択したとしております。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項については、記載のとおりでございます。

続きまして、第5、組換え体に関する事項でございます。

1、宿主との差異に関する事項につきましては、記載のとおりとしております。

次のページに参りまして、2、遺伝子導入に関する事項ということで、(1) 制限酵素による切断地図に関する事項は、この記載のとおり。

(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いても記載のとおりとしております。

また、下の第6、組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項でございます。

1、添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること。

2、添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていることにつきましては、記載のとおり。

17ページに参りまして、第7、遺伝子組換え添加物に関する事項についても、記載のとおりとしております。

第8、第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項ということで、第2から第7までの事項により安全性の知見は得られているとしております。

最後に「Ⅲ．食品健康影響評価結果」につきまして、JPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼについては、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」に基づき評価をした結果、安全性は確保されているとしたいと考えております。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、先生方のほうから、評価書案につきまして御意見、コメントを賜りたいと思います。何かございますでしょうか。

細かい字句等の修正につきましては、気がついたことがありましたら、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただければと思いますが、基本はよろしいでしょうか。

よさそうですね。

それでは、これをもって食品安全委員会に報告し、パブリックコメントの手続に移っていきたいと思います。

それでは、もう一つ、新規品目であります *Bacillus subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株を利用して生産された α -グルコシルトランスフェラーゼについて審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうから説明をお願いいたします。

○事務局 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、本日は日本食品化工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、説明者にウェブ上で入室していただき、質疑応答を行います。質疑応答終了後、説明者には退室していただき、審議を再開していただくこととしております。

それでは、申請資料の1ページをお願いいたします。第1の1の(1)といたしまして、名称はDDase-GO、基原は *Gluconobacter oxydans* でございます。

(2) 製造方法ですが、●●●液体培地で培養することにより得られる培養液から、●●●の工程を経て製造されます。当該菌株は、精製工程で分離、除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、DDase-GOの有効成分であるGODDは、主にデンプン加水分解物に作用し、 α -1,6-グルコシル転移反応を触媒する酵素でございます。本特性を利用して、DDase-GOをデンプン加水分解物に作用させることで α -1,6-グルカンの製造が行われます。複数の製造工程を経まして、シラップ状や粉末状の α -1,6-グルカン含有糖化品

となります。

次のページをお願いいたします。(4) 摂取量です。DDase-GOを用いて調製した α -1,6-グルカン含有糖化品中のGODDの残存量は、ELISAによる測定において●●●でございました。当該残存量から一日摂取量を推計したところ、GODDの一日摂取量は●●●ということでございます。

続いて、第1の2です。(1) 宿主は、*Bacillus*属の*subtilis* Marburg 168株を基原とする*B. subtilis* ISW1214株を宿主としております。

(2) 挿入DNAの供与体の由来ですが、 α -グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子、申請書では以下、*tdda*と表記しております。こちらの供与体は、*Tepidibacillus decaturensis*、*trpS*の供与体は、*B. subtilis* ISW1214株、プロモーター配列及びシグナル配列の供与体は*Bacillus* sp. JAMB750株、ターミネーター配列の供与体は*Thalassomonas* sp. JAMB-A334株、*cat*の供与体は*Staphylococcus aureus*でございます。

続いて、(3) 挿入DNAの性質ですが、*tdda*は α -グルコシルトランスフェラーゼ、*trpS*はトリプトファンtRNA合成酵素を生産いたします。プロモーター配列、シグナル配列、ターミネーター配列は記載のとおりでございます。これらのDNAを挿入した α -グルコシルトランスフェラーゼの発現プラスミドpHYT2TDは、プロトプラスト法により*B. subtilis* NTI04 (pDATSK) 株に導入し、pDATSKを脱落させることで、*B. subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株が調製されます。

また、*cat*はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼを生産いたします。

二重交叉相同組換えにより、ISW1214株のゲノムDNA上の*spoIIAC*を置換する形で*cat*が導入されております。

続いて、1の3、1の4は記載のとおりでございます。

続いて、1の5です。まず(1) 製品名はDDase-TD、(2) は記載のとおりでございます。

(3) 用途ですが、従来の添加物と同様です。

(4) 有効成分等の比較ですが、DDase-TDの有効成分であるTDDAは、従来の添加物の有効成分であるGODDと同様にデンプン加水分解物に作用し、 α -1,6-グルコシル転移反応を触媒する酵素ですが、GODDに比べまして熱安定性が向上しており、反応生成物である α -1,6-グルカンの組成が異なります。

続いて、1の6、従来の添加物との相違点ですが、(1) DDase-TDは、従来の添加物であるDDase-GOと同様の反応を触媒しますが、熱安定性が向上しており、反応生成物である α -1,6-グルカンの組成が異なります。

続いて、(2) 組換え体と宿主の相違点ですが、組換え体*B. subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株は、TDDA産生能、テトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性を有しており、これはISW1214株との相違点でございます。

ここで机上配布資料2を御覧ください。こちらは事前に申請者に問い合わせたものになりますが、机上配布資料の最初のページになりますけれども、第1-6のところ、従来の

添加物と申請品目の相違について情報を求めました。その結果、アミノ酸数、分子量、至適pH、至適温度などの情報が出されてきております。

結論としましては、DDase-TDは、DDase-GOに比べまして●●●ということでございます。

それでは、申請資料の本文に戻りまして、第2をお願いいたします。

2の1、宿主は記載のとおりです。

2の2、*B. subtilis*は非毒素産生性微生物とみなされておりました、有害生理活性物質の生産に関する報告はありません。また、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レベル1に該当いたします。

2の3から2の5については記載のとおりです。

続いて、第3、ベクターに関する事項です。

TDDAの発現プラスミドpHYT2TDの構築には、pHY300PLKプラスミド由来の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pHYT2Gを使用しております。pHY300PLKプラスミドは、pACYC177プラスミド及びpAMα1プラスミドを使用して構築されたプラスミドでございます。

次のページをお願いいたします。3の2の(1)、(2)は記載のとおりでございます。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項ですが、pHY300PLKプラスミドに含まれる遺伝子は、複製タンパク質、*Rep-a1*遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子でございます。複製タンパク質、*Rep-a1*はプラスミド複製時にDNA鎖の二次構造形成を阻害する。アンピシリン耐性遺伝子はβ-ラクタマーゼをコードし、アンピシリンのβ-ラクタム環を加水分解することでアンピシリン耐性を付与する。テトラサイクリン耐性遺伝子は、テトラサイクリン排出タンパク質をコードし、宿主の細胞内からテトラサイクリンを排出することにより耐性を付与するものでございます。これらの遺伝子により産生されるタンパク質は、いずれも有害タンパク質ではないという報告がございます。

続いて、(4) 薬剤耐性に関する事項ですが、pHY300PLKプラスミドは、アンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子を持ち、*B. subtilis*中では、アンピシリン耐性遺伝子は発現しないとされております。

(5)、(6)は記載のとおりです。

次に、第4の項目でございます。

1の(2) 安全性に関する事項ですが、*T. decaturensis*、*B. subtilis* ISW1214株、*Bacillus* sp.JAMB750株及び*Thalassomonas* sp.JAMB-A33株は、病原性や毒素産生性などヒトに対する有害性は知られておりません。また、これらは国立感染症病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル1に該当します。

また、*T. decaturensis*は食品産業分野での利用経験はなく、その遺伝子を組換え添加物に利用した事例もないということでございます。*S. aureus*は毒素産生能を有しており、バ

イオセーフティレベル2に該当するものの、*cat*が毒素生産に関与する報告はなく、遺伝子産物の病原性も知られておりません。

ここにつきましても、机上配布資料2の1枚目の下になりますが、この*tdda*遺伝子の供与体について、産業分野での利用経験がないということから、再度申請者にほかに情報はないかと聞いてみたところ、記載のような回答がございまして、Google scholar、PubMedで検索する限りでは、安全性を示す情報は見当たらなかったということございまして。

続きまして、4の2の(1)挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項でございまして、シグナル配列及び*tdda*は、●●●遺伝子の合成を行い、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pHYT2Gのシグナル配列及び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と置換することでTDDAの発現プラスミドを作製しております。

*trpS*は、宿主である*B. subtilis* ISW1214株からPCR法により、pHYT2Gにクローニングをされており、●●●*trpS*の●●●変異をPCR法により部位特異的に導入しております。

プロモーター配列及びシグナル配列は、*Bacillus sp.* JAMB750株のマンナナーゼ遺伝子上流に存在する領域を使用しております。

ターミネーター配列は、*Thalassomonas sp.* JAMB-A33株の α -アガラーゼ遺伝子の下流に存在する領域を使用しております。

*cat*は、pC194プラスミド上の配列を使用しております。

(2)は記載のとおりでございます。

続いて、8ページ、4の2の(3)でございます。発現プラスミドpHYT2TD上の*trpS*は、トリプトファンtRNA合成酵素を産出することで組換え体の*B. subtilis* NTI04株のトリプトファンtRNA合成酵素遺伝子欠損を補完します。

発現プラスミドpHYT2TD上の*tdda*が産出するTDDAは、デンプン加水分解物に作用し、 α -1,6-グルコシル転移反応を触媒する酵素でございます。

続いて、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、2)遺伝子産物について、そのアレルギー誘発性に関する知見でございますが、Google scholar、PubMedによる文献検索の結果、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、物理化学的処理に対する感受性試験です。

まず、人工胃液でございますが、SDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した結果、処理15秒以内にバンドが消失したことが確認されました。

続いて、人工腸液です。こちらもSDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した結果、6時間の処理ではバンドが消失しない結果となりました。

続いて、③加熱処理でございます。 α -1,6-グルカン含有糖化品の製造工程では、●●●pH 4、80~90℃、●●●の処理を行うため、加熱処理による抗TDDA抗体との結合能の変化を調べる際の加熱処理条件をpH 4.0、80℃としております。加熱処理前後の当該抗体と

の結合能についてELISAを用いて測定したところ、TDDAの反応生成物である α -1,6-グルカン含有糖化品の有無に関係なく、加熱処理1時間で相対結合能が過熱前の10%以下にまで低下する結果となりました。

次のページをお願いいたします。4) 既知のアレルゲンとの構造相同性ですが、データベースを用いてTDDAと既知のアレルゲンとの構造相同性を調べました。80アミノ酸残基を1セットとして1アミノ酸残基ごとにスライドしながら既知のアレルゲンとの相同性検索を行ったところ、一致度35%以上の領域は認められませんでした。また、連続する8アミノ酸残基の一致の検索を行ったところ、既知のアレルゲンと連続する8アミノ酸残基が一致する領域は認められませんでした。

5) 摂取量については、記載のとおりでございます。

続いて、4の3、4の4、4の5の(1)までは記載のとおりでございます。

続いて、11ページ、4-5の(2)でございます。発現プラスミド上の90塩基以上で構成されるORFの検索を行った結果、挿入DNA領域を含むORFは84個ということでございました。これらがコードするアミノ酸配列について相同性検索、アレルギー誘発性について調査しております。NIHのblastpによる相同性検索を行ったところ、29個のORFがコードする推定アミノ酸配列について相同性を有する配列が認められたものの、その中に毒性タンパク質は含まれておりませんでした。続いて、SDAPのデータベースを用いて既知のアレルゲンとの相同性検索を行ったところ、80アミノ酸残基を1セットとして検索し、一致度が35%を超える配列、さらには連続する8アミノ酸残基が一致する領域も認められませんでした。

以上のことから、pHYT2TDからORF検索による検出されたORFから有害タンパク質が産生されることは考えにくいとしております。

(3)でございます。意図する挿入領域は発現プラスミドの全塩基配列でありまして、宿主においては、プラスミドの状態で保持されます。

(4)については記載のとおりです。

続いて、4の6、宿主への導入方法でございます。発現プラスミドpHYT2TDの*B. subtilis* NTI04 (pDATSK)株への導入は、プロトプラスト法により行い、テトラサイクリン耐性かつカナマイシン感受性となった形質転換体*B. subtilis* NTI04 (pHYT2TD)株を選抜いたしました。

続いて、4の7でございます。(1)は記載のとおりでございます。

次のページをお願いいたします。(2) 遺伝子産物の摂取に関する事項でございますが、DDase-TD中のアンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子及び*cat*遺伝子の含有量をドットプロットハイブリダイゼーション法により測定したところ、アンピシリン耐性遺伝子の含有量は0.5ppm、テトラサイクリン耐性遺伝子の含有量は0.1ppm、*cat*の含有量は0.1ppm未満でございました。DDase-TDは組換え体を含まないことから、組換え体より漏出した遺伝子が検出されたものと考えられるということです。

また、当該結果及び糖化反応時のDDase-TDの添加量から、 α -1,6-グルカン含有糖化品中の当該遺伝子の含有量を添加したDDase-TDが最大限残存するものとして算出すると、アンピシリン耐性遺伝子が0.012ppm、テトラサイクリン耐性遺伝子が0.002ppm、*cat*が0.002ppm未満であると推定しております。

DDase-TD中のTet(L)及びCATの含有量をELISAにて測定したところ、Tet(L)は0.125ppm未満、CATは0.025ppm未満でありまして、一方、アンピシリン耐性遺伝子産物については、*B. subtilis* NTI04 (pHYT2TD) 株では発現しないとされているため、含有量は測定しなかったということでございます。

続いて、第5は記載のとおりでございます。

第6といたしまして、製造原料等に関する事項でございますが、製造原料や器材は一般的に長期間使用されてきたものである旨が記載されております。

続いて、第7の項目でございます。7の1、諸外国における状況ですが、諸外国において販売、使用された実績はございません。

続いて、7の2でございます。DDase-TDの製造では、●●●のフィルター濾過を実施することから、組換え体の残存はないと考えられる。また、DDase-TD中の組換え体の残存確認試験をプレート培養法により確認したところ、DDase-TD中の組換え体は認められなかったということでございます。

第7の3、7の4は記載のとおりでございます。

ここで、机上配布資料2の1枚目の裏を御覧ください。ここでは、第7-3と7-4について事前に申請者に質問を行いました。

まず7-3のほうでございますが、本添加物も食品添加物公定書に記載されている添加物であることから、ヒ素とか鉛といったものの規格基準を満たすことの確認はしていないのかという質問に対しまして、回答としては、当該規格基準への適合確認は未実施であるということ。理由としましては、現在のものはラボスケールで調製したものであり、実際のスケールプラントで製造した場合の担保にはならないと考えていること。

先方の回答の4パラグラフ目「ご指摘の通り」というところですが、スケールのプラントで製造した酵素に対しまして、食品添加物公定書の規格基準への適合確認を実施することが必須であると認識しているという回答でした。

7-4のほうでございますが、こちらは申請書にも記載のとおり、濃縮後のTDDAの純度について、●●●であったということございました。これについても、どのようにこの数字を出したかというところを確認したところ、こちらは机上配布資料2の2枚目の裏に、ベースラインをどのように引いたかというのがございまして、回答が示されております。今回、申請書の記載はこのうち①のものでして、ベースラインが右が下がっているものになります。そのほか②ベースラインを補整しないパターンですとか、③ベースラインが一定となるように画像処理したパターンも併せてきておりますが、それぞれTDDAの純度は記載のとおりということで、先方としては、もしよろしければ、これらの数値に基づいて、

特に③にデータの差し替えをしたいと考えておりますが、いかがでしょうかという回答が来ております。

申請書の第8は記載のとおりでございます。

説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

先生方、いろいろと読みにくいところとか、それから、何でこの辺は書いていないのかなとか、あちこち思われたことと思います。私のほうも事前に見させていただいて、この辺は先に聞いておいたほうがいいよねという点を幾つか問い合わせております。その結果がこの机上配布資料にも出ておまして、普通にある従来品と今回の申請品との差とか、アミノ酸の配列とか、それから基本的な状況について、普通は両方対照表の形で出してもらうものなのですが、ついていないよねということで、まさかそういうデータは持っているだろうと思ったので問い合わせて、そうしたら丁寧な回答が返ってきたかなという感じです。

それから、今回の *Tepidibacillus*、あまり聞いたことがない菌で、これは *Bacillus* の近縁ではなくてグラム陰性菌でして、少々好熱性のグラム陰性菌です。これについてももう少しデータがないのかということを知りたいのですが、特にはなかった。病原性についての記載もなかったと、そういう報告もなかったということです。

これについては、これまでの申請でありまして、だからといって特段問題になるとかそういうわけではなくて、今回の当該の酵素について見ればいいかなと思うところがございます。

それから、食品添加物公定書、これの記載であれば当然、ヒ素とか鉛の含量とかそういうデータもあるのですが、これは例えば諸外国で既にこの製品が売られているような場合とか、そういうときには当然そのデータがついてきて、これが日本ででも通用するデータであるかどうか、そういったところを見させてもらっているのですが、今回は、これはまだパイロットのところ、実際に生み出す別のものではないということなので、まだ実施していないということでした。

ただ、これは実際に売ろうと思ったら食品添加物公定書の規格基準への適合確認、これは厚労省ですよ。規格基準を満たさないと販売できないという、それは当然厚労省の規定になっておりますので、そこは我々の管轄でないといえないかなと。そこをちゃんと通さないと、最終的に厚労省がうんと言わなければそれは売れないわけなので、現時点でまだ実施していないという理由については、彼らの机上配布資料2のところにあるとおりかなと思います。

それをやっていないことが直ちに、我々がこの場で判断するところで問題になるかという、それはまたちょっと管轄が違うし、彼らとしても最終的に販売する前にこの規格基準を通すことが必須だと考えている。どうせそれを通さなければ厚労省がうんと言わないわけですからとも思います。

最後に、SDS-PAGEのバンドの濃さの基準から考えて、もう少し純度が高いように思ったのだけれども、●●●で何でかなと思ったら、これはImage Jでやっていて、こういうのはHPLCのもうちょっと専用のソフトとかがなかったかなと思うので、そういうソフトで解析してくださいとお願いはしたのですけれども、彼らは持っていなかったのか、Image Jで何通りかやって、その答えが返ってきておりますというところですよ。

どこからでもお気づきになった点から御指摘いただければと思います。また、細かいところとかにつきましては、実際にこの申請者と話をして質問等をしたいと思いますので、先生方、よろしくお願ひいたします。

1つございまして、この大腸菌は*Bacillus subtilis* ISW1214株で、これは元の株で、この宿主をつくる時に*spoIIAC*の遺伝子を*cat*の遺伝子で破壊しています。*Bacillus*でもものづくりするときには途中で孢子をつくられると困るので、*spo*遺伝子のどれかを破壊するのは常識といえば常識なのですけれども、この破壊は*cat*遺伝子との置換でやっているのです、そうすると当然、染色体の上にこの*cat*遺伝子が残っていると。普通だとその*cat*遺伝子の挿入に関する事項、それから、*cat*遺伝子の挿入によって周辺のオープンリーディングフレームはどうなっているとか、アレルゲンや毒性タンパク質が産生される可能性があるとかを見ていただくと思うのですが、彼らは恐らくそれを失念しているのではないかという気がするのですが、そのデータはないようです。私は、そのデータはぜひいただかないといけないと思うのですが、いかがでしょうか。

それから、今回の摂取量について、添加物については最大摂取量を最初に推定していただくのですが、計算方法があまりちゃんと書いてなくて、普通はまず用途について、それから国内の使用量、そういった基礎的なことを書いていただいて、計算の根拠を示していただいて、その上で最終的な計算結果を出していただくと。●●●と結構多いかなという気もするのですけれども、事務局のほうからございませうか。

○事務局 この会社はほとんど本文に書いていませんので、実際は添付資料1のほうを見ていただくと、●●●、そういったものに大体何%含まれていて、そこから何gぐらい取るかというところがあるのですが、本文のほうはかなり省略されているかなというところでございます。

○中島座長 たしかそんなことなのですが、普通は日本国内でシロップとか粉末で糖化品を作るのに添加して使われておりますね。これで推定摂取量の根拠、通常は国内で使われているこれが全て当該品に置き換わった場合を想定して、これで最大摂取量を計算していただいている、これはそうになっていましたか。僕はこれを見てよく分からなかった。

○事務局 この計算の仕方はそういう方法ではなくて、実際の酵素の残留量をELISAで測って、その残留量より算出してあります。

○中島座長 だったと思うのですよ。ということは何が言いたいかということ、最大摂取量は、彼らが少々誤解しているのではないかなと思うのは、 α -グルコシルトランスフェラーゼとしての日本人の最大摂取量ではなくて、今回の申請品がマックス普及した場合にどれ

だけ日本人がこれを撮取する可能性があるかということでもいいのですよね。それを計算していただくというのがたしか趣旨だったと思うのですが、そこがまるっと違うような気がしていて、私はそこを、これは申請者に質問してみようと思うのですが、添付資料の計算式から見るとその点を誤解しているような気がしてならないなという気がします。

先生方、この点、いかがでしょうか。

橋田先生、今の考え方でいいですか。

○橋田専門委員 橋田です。

従来どおりの出し方をさせていただくほうが、統一性があっていいのかなと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

安達先生もそれで、従来品の組換え体と置き換わった場合の推定量ということでよろしいですね。

○安達専門委員 安達でございます。

今おっしゃったとおりのほうがいいと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

後ほど申請者をお呼びして、誤解のないように伝えたいと思うのですが、今のうちに問題点を全部、申請そのものにそんな大きな問題はないようにも思うのですが、やはり我々が安全性を確認するためには必要なデータはお願いしないといけないなと思いますので、ここで必要なデータを全部きっちり分かりやすく要求したいと思いますので、ぜひお願いいたします。

児玉先生、お願いします。

○児玉専門委員 座長からお話があったように結構不慣れな感じなので、体裁を整えてもらうのが結構大変かなと思うのですが、2ページの図2で組換え体の構築のフローチャートがあるのですが、これは私の勘違いかもしれないのですが、この図の意味するものがよく分からなくて、(a)、(b)の意味するところが、その上の文章を読むと、もう単純に(c)の流れが上の文章に書いてあって、(a)と(b)の流れの部分は書いていないように見えるので、何でこの(a)と(b)がついているのかなというのがよく理解できなかったというのが1つあります。

ISW1214株というのは、市販されている株なので、その株をスタートにして、その株のキャラクタライゼーションを最初に書いていただいて、その株に何か別のプラスミドをまず入れて、そのプラスミドを置き換える形で作ったというのが流れのようなので、実際にやられた作業の内容に合わせてもうちょっと整理していただいて、記載を整備していただきたいなと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

私も非常に見にくかったので、この辺はもう少し書き直していただくように、どういう点を分かるようにというところを私のほうからも説明して書いていただこうと思いますので、そのときにはお願いいたします。

続きをお願いします。

○児玉専門委員 それから、4ページなのですけれども、従来の添加物の比較で事務局のほうで問い合わせさせていただいて、机上配布資料のほうに書いてあるのですけれども、これを見るとようやくアミノ酸数が分かったのですが、●●●で結構大きさが違うということで、あと、シグナル配列とかもついていると思うのですけれども、これはグルコシルトランスフェラーゼですよというのが分かるような、何か相同性を取るなり、ある程度酵素の触媒部位とかも調べれば分かるかと思しますので、そういうのが保存されているとか、その酵素がグルコシルトランスフェラーゼであるというのが分かるように記載をしていただきたいなと思います。

それから、第4の5、構築された発現ベクターのところですが、通常ここに普通は実際に使ったプラスミドのマップが載るのではないかなと思うのですが、ベクターの図はあっても使った発現ベクターのマップの図がないので、その図と、通常はそこに構成要素の表がつくと思うのです。何ベースから何ベースまではこういう因子で、何ベースから何ベースまではこういう酵素がコードされていますみたいな表を普通はつけてくれると思うのですけれども、それがついていないので、すごくその点、僕は最初に一体何のプラスミドを入れたのかさっぱり分からなくて、かなりいろいろな資料を見て理解したような記憶がありますので、そういった図はちゃんと載せていただきたいなと思います。

あと、先ほど座長もおっしゃいましたけれども、クロラムフェニコールはゲノムに入っていますので、一連の作業は欠失用のあれですけれども、申請書から欠失していますので、そこはちゃんと、多分作業しなければいけないのではないかなと思いますので、次回申請される時にお願いしたいなと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

一々もつともだと思しますので、申請者に分かりやすく指摘して、誤解なくしっかり伝えたいと思います。

ほかにございますでしょうか。

岡田先生、よろしくをお願いします。

○岡田専門委員 ありがとうございます。

5ページなのですけれども、第2の3で寄生性及び定着性に関する事項というのがありまして、検索をしているのですけれども、ISW1214株に寄生性や定着性があるとは思わないのですが、検索に用いたキーワードがfixationになっているのですけれども、腸管定着性のことでしたらfixationではなくてcolonizationで検索をするべきではないかと思ひます。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

この点は、後ほど申請者を呼びますので、申請者に教えてあげてください。よろしくをお願いします。

小関先生、よろしくお願いします。

○小関専門委員　すごく簡単なことなのですけれども、遺伝子の含有量の単位がppmで書かれているのはすごく違和感があるので、すみませんけれども、これは対面で指摘するようなことではないと思うのですが、後でここは直すように言ってもらったほうがいいような気がします。

以上です。

○中島座長　ありがとうございます。

そこは思いきり違和感がありましたよね。後ほど忘れずに指摘しておきたいと思います。ほかにございますでしょうか。

それでは、この辺で申請者をお呼びしたいと思います。あと、申請者と話している間にお気づきの点等ございましたら、その場ででも結構ですので、御意見いただければと思います。

では、申請者を呼んでいただけますでしょうか。

(日本食品化工株式会社関係者入室)

○中島座長　本日はお忙しいところ御出席いただきましてありがとうございます。

自己紹介をお願いいたします。お名前と会社名だけで結構です。

○飯塚氏　お世話になります。私、日本食品化工株式会社の飯塚と申します。所属は研究所研究一課になります。よろしくお願いいたします。

○竹地氏　同じく日本食品化工の竹地と申します。よろしくお願いいたします。

○金井氏　同じく日本食品化工の金井と申します。よろしくお願いいたします。

○中島座長　それでは、本申請書を詳しく見させていただきました。幾つか誤解に基づくと思われるところもございますので、幾つか指摘させていただきます。

まず、申請書の2ページ、摂取量のところですが、ここには割と簡単にしか書いていないのですが、 α -1,6-グルカンの日本人の推定摂取量を計算していただいていると思うのですが、この項目のポイントは、日本人がそもそもグルコシルトランスフェラーゼをどれだけ摂取しているかというのではなくて、今回の添加物、今、日本国内ではたしかデンプンの加水分解に、 α -1,6-グルカンの製造に使用されているということだと思しますので、現在日本国内で添加物として使用されている α -グルコシルトランスフェラーゼが全て今回の申請品目に置き換わった場合に日本人がこれをどれだけ摂取するかを推定していただくというのが趣旨でございます。

申請書の添付資料を見させていただいた限りでは、添加物としてのではなくて、日本人がこれを摂取している可能性のあるグルコシルトランスフェラーゼの摂取量を推定しているように思われたのですが、そこはいかがでしょうか。

○金井氏　おっしゃるとおりでして、その意図では記載していなかったため、既存添加物をこの酵素に置き換えた場合に摂取する量ですかね。全量を置き換えた場合の量というのを改めて算出させていただきたいと考えておりますが、いかがでしょうか。

○中島座長　そういうことでお願いいたします。今回の申請品が日本国内でシェア100%となった場合にどれだけ摂取し得るかということで記載いただければと思います。

　　ついでながら、添付資料を見るのではなくて、それぞれについて用途はどれだけで、日本国内でどれだけ生産され、どれだけ使われていてとか、根拠となる数字を概要書のほうに書いておいていただけると助かります。概要書、概要ではありましても、もう少し、これだけ見てほぼ全容が把握できるように書いていただけると助かります。

　　それから、宿主及び導入DNA、2ページですが、まずは元の*B. subtilis* ISW1214株、これは購入されたものですね。

○金井氏　そうです。

○中島座長　これで、そこから後の宿主の作製と、それからプラスミドの作製について、それは食品化工さんのほうでやっておられるということでよろしいですね。

○金井氏　はい。

○中島座長　そういう場合でしたら、まず、入手してきた宿主についてそのキャラクタライゼーションをどういう株で、安全性についてはどのようなものであると、まずそれを記載し、その上で、今度はそちらで加工をされた内容を詳しく書いていただけると、こちらも見やすく助かります。そうすると、どのような点について見たらいいのか。

　　それから、遺伝子組換えですので、遺伝子を組換えたところがどのようになっているかというのを見させていただくというルールになっています。この株は*Bacillus*ですから、*spoIIAC*遺伝子を*cat*遺伝子で置換して破壊していますね。*Bacillus*ですから胞子をつくられては困るのでそれは当然やるものなのですけれども、そうすると、この宿主の染色体DNAの中に*cat*遺伝子そのまま残留しているということでよろしいですね。

○金井氏　そのとおりでございます。

○中島座長　その場合は、*cat*遺伝子が宿主にどのように入っていて、DNAがどのように入っていて、その結果、近辺のオープンリーディングフレーム等がどのように変化して、それぞれについて毒性、アレルゲンのデータベースにぶつけて、挿入遺伝子のために新たな毒性やアレルゲンが発生する可能性がないといったことをここは確認する必要があります。今回挿入したプラスミドについてはそこを精査してあるようなのですが、*cat*遺伝子については欠けているように思うのですが、そこは。

○金井氏　認識しておりまして、おっしゃるとおりでございます。

○中島座長　そのデータはぜひよろしくお願いいたします。

○金井氏　別途調査して、後日データをまとめて提出させていただきます。

○中島座長　直接、今、私がお話ししておりますので、分かりにくい点がありましたら、今みたいにはっきり御質問いただければと思います。そうするとお互い二度手間が省けますので、そのためにわざわざこのように対面でお話しさせていただいておりますので、分かりにくい点等ありましたら、確認していただければと思います。よろしいですか。

○金井氏　ありがとうございます。

○中島座長 それから、このフローの図、*trpS*遺伝子を潰して、これについては増殖できないプラスミドを使ってなので、最終的にはこの遺伝子は除かれていてということだと思います。もう少し専門外の者にも分かるように記載していただけると助かります。それぞれの段階でどの株がどのようにできていたか、そういった点について分かりやすい記載をいただければと思います。

○金井氏 今の宿主の2の1のほうに関して、もう少し丁寧に記載してほしいということでしょうか。

○中島座長 宿主とプラスミドでそれぞれの段階でどういう株ができてというのをもう少し分かりやすく一段階ずつで、それについてそれぞれ本文中にも、この段階でこれを行って、このようなものができたというふうに、概要書にしては少し長くなっても構いませので、分かりやすい記載を心がけていただけると助かります。よろしいでしょうか。

○金井氏 承知いたしました。

○中島座長 それから、4ページでしたでしょうか。従来品のDDase-GOに対して今回の組換えのDDase-TDについてデータをお願いして、詳しいデータを寄せていただきました。ありがとうございます。最初からこれが対照表の形でついているともっとよかったですけれども。

それで、従来品に比べてアミノ酸の数が●●●結構変わっている、それから、至適温度等々も変わっているのですが、それが特に問題というわけではないのですけれども、従来品と比較してというのがポイントなので、今回の申請の酵素が、これも確かに α -グルコシルトランスフェラーゼであるのかという点に関する情報をもう少しいただければと思います。例えば、まずアミノ酸配列を載せていただいて、分かっている限り、ここからここまでがシグナル配列で切断されるとか、セカンドプロセッシングでもあればそのようなところ。それから、本体部分と従来品とのアミノ酸の配列、相同比較などを行って、活性中心等がぴったり一致しているとか、こういう根拠でと、そういったデータを示していただいて、今回の申請品についても α -グルコシルトランスフェラーゼであるということが我々にも確認できるようなデータを示していただけると助かります。よろしいでしょうか。

○金井氏 データをまとめて提出させていただきます。承知いたしました。

○中島座長 それから、図4にベクターのプラスミド、pHY300PLK、市販の割と有名なプラスミドですよ。

○金井氏 おっしゃるとおりでございます。

○中島座長 これは安全性確認もされているし、使われているものだからよろしいと思うのですけれども、重要なのは、このベクターを使って御社のほうで α -グルコシルトランスフェラーゼを組み込んだ組換えプラスミドもつくっているはずなのだけれども、その組換えプラスミドのマップも載せてほしいなど。

○金井氏 要旨のほうと一緒に載せる形で対応させていただきます。

○中島座長 そのときにはついでに、そのマップの、pHY300PLKについても制限酵素の

部位とかが書いてあるけれども、もっと重要なのは、新しい組換え体について、この絵では4.87 kbp、4,870塩基対ということだと思えるのですけれども、塩基対1から幾つまでは何の遺伝子で、例えば1,500から1,720まではマーカーでとか、どこからどこまでが何の遺伝子が入っているのかというのを一覧の表にさせていただいて、作製された組換えプラスミドの隅から隅までが、どの領域はどの遺伝子、何に由来してというのが分かるような一覧表を作成していただけるとありがたく思います。よろしいでしょうか。

○金井氏 承知いたしました。

○中島座長 それから、5ページに用いた検索について、これは岡田先生のほうから説明していただけますか。

○岡田専門委員 申請資料の5ページの真ん中辺りに3、寄生性及び定着性に関する事項とありまして、検索をやっているのですけれども、この定着性というのは多分、腸管定着性のことだと思いますので、この場合は、キーワードとしては、**fixation**ではなくて**colonization**を使うのが普通ではないかと思うのですが。

○金井氏 **colonization**でよろしいでしょうか。

○岡田専門委員 はい。腸管の粘膜で増殖とかをすることは**colonization**と普通言いますので、検索のキーワードを変えていただいたほうがよろしいと思います。よろしくお願います。

○金井氏 承知いたしました。

○中島座長 それから、8ページからと9ページで人工胃液、人工腸液でSDS-PAGEでデータを取っていただいております。非常に見やすくして明確なデータで、できれば当該のDDase-TDの酵素のバンド、矢印なり何なりでこれだよと分かるように示していただくと助かります。よろしいでしょうか。

○金井氏 大丈夫です。承知いたしました。

○中島座長 最後に、純度がどのぐらいなのか。これはパイロットプラントで実際に販売するレベルになるとまた少々違った形になろうかとは思えるのですけれども、今回のSDS-PAGEの図を見せていただくと、これはなかなかきれいで純度も結構高いのではないかなと思ったのですが、出てきた数字は●●●で、その純度決定、HPLCのデータをスキャンしてそれをImage Jで解析していると思うのです。手軽な方法ではあるのだけれども、もうちょっとやりようがないのと。HPLCだったら専用のソフトか何かがあるのではないかと思うし、この全体のSDS-PAGEのパターンを見させていただいたものとの乖離が少し大きいような気がいたしまして、そこを何とか工夫いただけるといいのですが、ここは実際にどうやって解析されているのですか。

○金井氏 実際に私どもが解析した手法としましては、Image J内にあります電気泳動用の解析メソッドで解析しておりまして、こちらから今回の要旨の14ページの図9にあります、右図に示すようなプロファイルプロットを得まして、そこから手動なのですけれどもピークを分けまして、有効成分であるTDDAの割合を求めたという形になっております。

そういった形で求めてはおりますが、御指摘がありましたとおり、もうちょっと検討できないかといったお話があったと思うのですけれども、そちらにつきましてはもうちょっと弊社で検討はさせていただきたいなと思っているのですが、いかがでしょうか。

○中島座長 よろしく申し上げます。

むしろこのHPLCの図、Image Jの解析がなければね。 SDS-PAGEのパターンを見ても、●●●とおっしゃっている、それよりはもうちょっと純度が高いようにも見えます。なので、安全性を審査させていただく上では●●●になっているので、まあいいかなとは思いますが、その辺、解析方法などを少し検討していただけると助かります。

これはパイロットプラントで、実際の販売レベルになるとまた変わってくるだろうということなので、これについてはそんなに突っ込んでも仕方がないかなとは思いますが、一度御検討いただければと思います。

○金井氏 承知しました。

○中島座長 ほかに、今のうちに御指摘いただけるとお互い手間が省けるので、よろしくお願いたします。

児玉先生、よろしく申し上げます。

○児玉専門委員 概要書の3ページの(2)のDNAの供与体のところで *Bacillus sp.* JAMB750株というのが出てくるのですが、一応あまり危険性のない宿主から取ってきたよというのが望ましいので、*Bacillus sp.*で止まられてしまうと、セレウス菌もあるシアンラックス菌もあるので、そういう菌ではないよみたいな記述は多分、ちょっと今ざっと調べたところだとあまりその記述がないみたいですが、好アルカリ性の *Bacillus* のようなので、多分そういう性質からそういった危険性のある *Bacillus* ではないよみたいなことが書けるのではないかと思いますので、*Bacillus sp.* だけで止めてしまわれると安全性上からはそぐわないなと思うので、そういう菌ではないよということが分かるように記載していただきたいなと思います。

以上です。

○金井氏 承知いたしました。

○飯塚氏 1つ確認をさせていただきたいのですが、要は文献情報のある情報を基にヒトへの病原性、あとは哺乳動物への病原性みたいなものがないと推察されるであろうというように書きぶりでよろしいのでしょうか。

○児玉委員 はい。*Bacillus* で問題になるのは多分セレウス菌と炭疽菌だと思いますので、そういった菌ではないということであればそれで十分だと思います。あと、そういうのは情報としては文献上の情報でそういった菌ではないと思われるというような書き方で構わないと思います。

○飯塚氏 承知いたしました。ありがとうございます。

○中島座長 ほかの先生方。

小関先生、よろしく。

○小関専門委員 ちょっと書き方のところで、あれっと思ったところがあるのですけれども、2ページのところで一日摂取量が●●●と書いてあって、10ページのところで摂取量、ヒトがTDDAを摂取する可能性は低いというのは何か矛盾していませんか。ちょっと教えてください。

○金井氏 こちらにつきまして、2ページ目に関しましては、既存添加物であるDDase-GOの摂取量を示しております、今御指摘のあった10ページ目の摂取量につきましては、今回の申請品目であるDDase-TDに関する摂取量の項目だと認識しているのですけれども、いかがでしょうか。

○小関専門委員 摂取する可能性は低いというのと、摂取する量というのは書き方が違うのではないかなと思ったのですけれども、違いますか。

○金井氏 可能性が低いという記載の部分で。

○小関専門委員 おかしくありませんか。要するに、0.5ppm未満で摂取している。

○金井氏 そういうことをございますね。

○小関専門委員 だから、日本語としておかしくありませんかと思ったのですけれども、違いますか。

○金井氏 恐れ入ります。

○小関専門委員 分かりました。

そうしたときに、摂取するということに関して、12ページのところとか摂取に関する事項ということでppmという単位で書かれているのですけれども、これはあまり遺伝子というか、正確に言うところの遺伝子を含むDNAが、普通は何 μg /製品のkg数とか、製品というのは加工されたときの製品にはこのぐらいであってというようなことで、あるいは酵素製剤の中にどのぐらいということ、何当たりのppmかという形のところがよく分からないときに、普通、ppmはあまり遺伝子の含有量で使わないのですね。

○金井氏 申し訳ございません。12ページ目の今御指摘いただいた箇所ですけれども、糖化品中に含まれる当該遺伝子の含有量につきましては、糖化品の固形分のグラム当たりの $\mu\text{g/g}$ DSといった形で求めておりまして、それをppmに換算して記載させていただいております。違っておりますでしょうか。

○小関専門委員 結局これは、評価基準のところドットハイブリダイゼーションのことを記載した理由というのが実はちょっと勘違いされているなと思ったのです。これは菌が残存していないことを証明する方法の一つとしてドットハイブリダイゼーション等をお使いくださいという言い方で評価基準の中に書かれているのですけれども、今回、御社が出されているこれは、言ってみれば酵素製剤の中にDNAが、要するに精製してもDNAとしては必ずコンタミネーションしてくる、それを調べたということですよ。違いますか。

○金井氏 おっしゃるとおりでございます。

○小関専門委員 食品の安全性、添加物の安全性ということで考えたときに、DNAはヒト

が食べたとしても胃の中、腸の中で消化されてしまって、アレルギー性、毒性を引き起こすことはないというのがコンセンサスだと私は思っているのです。ですから、そのDNAの量を測定する必要は、添加物の安全性の上では必要ないと思うのです。だから、この部分の記載は何かちょっと勘違いされてドットハイブリダイゼーションをここに適用されたのだらうかと私は思っているのです、ここはちょっと書き換えたほうが良いような気がします。

これに対して、その下のところのCATとかTetLのこれはタンパク質ですか。

○金井氏 はい。下に関してはそうです。

○小関専門委員 タンパク質に関しては、酵素製剤の中に入っていて、それを使って製造された食品の中に残っていったときに、アレルギーとしてこの2つのタンパク質はほとんど残存しないと思いますし、アレルギー性もないということはデータベース上で調べられているので大丈夫だと思うのですけれども、アレルギーとしての懸念があるのではないかとということで、タンパク質についてはどのくらい入っていますかということ、きちんとELISAで調べられていて、非常に量が少ない。しかも、先ほどの10ページのところの摂取量でいったときに、そもそもの酵素のタンパク質を食べる量が0.5ppm以下。タンパク質の中に入っているTetLとかCATはさらにその0.125ppmとかそのくらいの量であるから、口の中に入るとしても、ppmのppmだからほぼ無視できるくらいというか、ヒトの健康に影響を与えるような量ではないという書き方をしていただけると分かりやすいと思いました。

ここら辺、理解していただけますか。要するに、安全性の評価を基本に置いたときに申請書として書くのだとしたら、そういう論旨の立て方をしていただいたほうが説得しやすいのではないかとと思うのですが、いかがですか。分かってもらえましたか。

○金井氏 一応確認させていただきますが、まず最初の遺伝子の残存量につきましては、基本的な考え方としまして、組換え菌の残存があるかどうかの一つの指標として使われているという認識でよろしいでしょうか。

○小関専門委員 どちらかというところそういう方法でやられているのですけれども、今回の申請書でいきますと、プレート培養法で、ないということを証明されていますね。

○金井氏 はい。

○小関専門委員 プレート培養法もしくはドットハイブリダイゼーション法によって菌の残存がないことを示してくださいということで、ドットハイブリダイゼーションをどちらかというところ使われている形なのです。

○金井氏 承知しました。その意図でこのドットハイブリダイゼーションの試験を行っていなかったもので、ちょっとその趣旨を。

○小関専門委員 だと思えます。勘違いされているのだなと思えました。

○金井氏 御指摘ありがとうございます。

○小関専門委員 あと、よろしいですか。ですから、ppmという単位は使われなくて、例えば、酵素製剤あるいはパイロットとしてつくった製剤の酵素タンパク質、何mgあるいは

何gの中に何 μ g未満のTetLあるいはCATが入っていましたという単位で書いていただくほうが、どちらかという私たちにとってはなじみがあるというか、多分そのほうが一般的な書き方だと思うのです。単なる割り算の仕方と単位の書き方の違いなのだよねと言われたらそのとおりののですけれども、そういう形で申請書を書いていただければ、人に説明しやすいというか、説得しやすいのだと思います。よろしいですか。

○金井氏 御指摘ありがとうございます。承知いたしました。今後、単位の部分に関しては、分かりやすい、ppmではない記載にさせていただきたいと考えております。

○小関専門委員 お願いします。

以上です。ありがとうございます。

○中島座長 小関先生、ありがとうございます。

ということなので、4ページに製造工程がございますけれども、そこでフィルター濾過等をやっておりますので、このフィルターのところでフィルターの目など、何ミクロンのフィルターを使って、それで除いているとか、その辺をもう少し詳しく書いていただけると、やることはやっているというのがこれは分かりますので。

そう考えますと、小関先生の先ほどの指摘でございました12ページのここ、実はDNAは食べても問題ないので、はっきり言ってここは別に、DNAについてはなくてもいいと言えなくてもよくて、それから、テトラサイクリンの遺伝子はそのタンパク質について、文献等を調べればこれに毒性がないとかそういったことは調べられるはずですので、それと併せて書いていただければ、我々としてもそれでこの安全性は確認できますので、よろしく願いいたします。

○金井氏 承知いたしました。

○中島座長 では、ほかに、先生方、よろしいでしょうか。

では、このくらいにしたいと思います。御出席、ありがとうございます。お疲れさまでした。

(日本食品化工株式会社関係者退室)

○中島座長 それでは、退室が確認されましたようなので、議論を開始したいと思います。

先生方、分かりやすい説明をしていただけてありがとうございます。多分これで経験値を積み、次からは分かりやすい申請書が出てくるかなと、とても期待しております。

特に付け加えること等はございますでしょうか。

ということで、この件については改訂版をということで、指摘事項については、また事務局と関係の先生方で文案を詰めて、申請者のほうに厚生労働省を通じて連絡したいと思います。

本日の議題1はこれで終わりたいと思います。

議題2ですが、事務局、何かございますでしょうか。

○事務局 特にございません。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、本日の議論については、これで終了いたしました。



以上をもちまして、第211回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。