

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第252回) 議事録

1. 日時 令和6年7月25日(木) 14:00~17:43

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

・コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP915635)
(食品・飼料)

・JPTR004株を利用して生産されたセルラーゼ

(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、小野竜一専門委員、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、藤原専門委員

(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、及川事務局次長、古田評価第二課長、今井評価情報分析官、
奥藤課長補佐、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 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP915635)(食品)

② コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP915635)(飼料)

③ JPTR004株を利用して生産されたセルラーゼ

- 参考資料1-1 遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針
- 参考資料1-2 遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準（平成16年1月29日食品安全委員会決定）の一部改正について新旧対照表
- 参考資料1-3 遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針 目次 新旧比較表
- 参考資料1-4 遺伝子組換え食品（種子植物）の食品健康影響評価に関する技術的文書
- 参考資料2-1 遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物に関する食品健康影響評価指針
- 参考資料2-2 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（平成16年3月25日食品安全委員会決定）の一部改正について新旧対照表
- 参考資料2-3 遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物に関する食品健康影響評価指針 目次 新旧比較表

6. 議事内容

〇〇〇 定刻になりましたので、ただいまから第252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。

食品安全委員会委員におかれましては、7月1日付けで委員の改選が行われたと聞いております。事務局から御紹介をお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

先般、食品安全委員会の委員の改選がございましたので、御報告いたします。

〇〇〇を除いた6名の委員について、6月末で3年間の任期が満了し、7月1日付けで〇〇〇が再任され、新たに〇〇〇が任命されました。委員長には〇〇〇、委員長代理には〇〇〇が選出されています。本専門調査会については、主担当が〇〇〇、副担当が〇〇〇となります。

初めに、〇〇〇から御挨拶をいただきたいと思います。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 ただいま御紹介いただきました〇〇〇と申します。7月1日付けで委員に就任いたしました。食品安全委員会におきましては、これまで添加物専門調査会等を中心に参加しておりまして、遺伝子組換え食品等専門調査会は本日が初めての参加になります。この調査会の主担当ということもありますので、これまでの経験を生かして、先生方の御議論にしっかりついていけるように勉強したいと思いますので、よろしくお願いいたします。先生方におかれましては、活発な御議論をよろしくお願いいたします。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

続きまして、〇〇〇から御挨拶をいただきたいと思います。よろしく申し上げます。

〇〇〇 ただいま紹介いただきました7月1日付けで常勤の委員に就任しました〇〇〇と申します。専門ががんの疫学なので、あまりウェットのことは得意ではないのですけれども、順次キャッチアップしていきたいと思います。副担当であります。よろしく申し上げます。

〇〇〇 ありがとうございます。

また、事務局におきましても7月5日付けで人事異動があり、評価第二課長に〇〇〇が着任いたしましたので、御挨拶させていただきます。

〇〇〇 7月5日付けで農林水産省からこちらの評価第二課長に着任いたしました〇〇〇と申します。どうぞよろしくお願ひいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

本日の議題は、継続品目である「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP915635）（食品・飼料）」、新規品目である「JPTR004株を利用して生産されたセルラーゼ」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、資料といたしまして「食品健康影響評価に関する資料」。そして、今回が新指針に基づいて審議する最初の専門調査会となりますので、参考資料といたしまして「遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針」関係の資料を参考資料1-1から1-3、「遺伝子組換え食品（種子植物）の食品健康影響評価に関する技術的文書」が参考資料1-4、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物に関する食品健康影響評価指針」の関係の資料が参考資料2-1から2-3としております。また、個別品目の審議の際の資料といたしまして、机上配付資料が1から5までございます。

資料の不足等はございませんでしょうか。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、「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP915635）」の申請者でございますコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社の方、「JPTR004株を利用して生産されたセルラーゼ」の申請者でございますノボザイムズジャパン株式会社の方をお呼びしております。申請品目の審議の際に質疑応答に対応していただく予定としております。

以上です。

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 事務局におきまし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 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します。

〇〇〇 Web会議形式の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してください。

2点目、発言の際は赤い挙手カードを提示していただくか、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。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。よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 それでは、継続品目である「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP915635)(食品)」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 事務局から説明いたします。

お手元に「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP915635)の食品としての安全性評価(要旨)」と記載された資料を御準備ください。当該品目は、令和4年4月に開催された第224回の当専門調査会で一度御審議いただき、指摘事項をいただいたものでございます。

まず、申請品目の概要を説明いたします。資料の1ページ目を御覧ください。当該品目は、トウモロコシのデント種PHR03系統を宿主として3つの遺伝子をアグロバクテリウム法により導入しています。まず1つ目が、コウチュウ目害虫抵抗性を付与するIPD079Eaタンパク質を発現する*ipd079Ea*遺伝子で、供与体は*Ophioglossum pendulum*です。

2つ目が除草剤グルホシネート耐性を付与するPATタンパク質を発現する*pat*遺伝子で、供与体は*Streptomyces viridochromogenes*です。

3つ目が形質転換体の選抜マーカーとして機能するPMIタンパク質を発現する*pmi*遺伝子で、供与体は*E.coli* K-12株です。

12ページをお開きください。挿入DNAの供与体に関する事項の(2)安全性に関する事項を御覧ください。*ipd079Ea*遺伝子の供与体である*O. pendulum*はコブランと言われ、ハナヤスリ目に分類されるシダ植物です。申請要旨では、若葉が野菜として食されることが知られているとの説明がありましたが、食経験が豊富なタンパク質ではないということから、後ほど説明いたしますが、これに関する指摘事項が出されております。

18ページを御覧ください。挿入遺伝子の機能に関する事項です。*ipd079Ea*遺伝子がコードするIPD079Eaタンパク質は、選択的殺虫タンパク質で、アミノ酸配列から小孔形成タンパク質として知られているMembrane Attack Complex/Perforinスーパーファミリーに属していることが予測され、結晶構造からも実際にその立体構造のN末端側に小孔形成領域であるMACPFドメインを有していました。MACPFタンパク質は、標的細胞の細胞膜上の受容体に結合した後、環状複合体を形成し小孔を形成します。IPD079Eaタンパク質は、その細胞局在から、ウェスタンコーンルートワームの中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合して作用すると考えられるとしております。

23ページを御覧ください。*pat*遺伝子がコードするPATタンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変えて無毒化するため、組換え体は除草剤グルホシネートに対して耐性を持ちます。

27ページを御覧ください。DP915635は2段階の形質転換工程を経て作出されています。1回目の形質転換は宿主に4つのプラスミドをパーティクルガン法で挿入し、2回目の形質転換は32ページに記載されていますとおり、中間系統の未成熟胚にアグロバクテリウム法により導入用プラスミドを導入し、マンノース添加培地で選抜を行っています。

それでは、お手元に「安全性評価に係る指摘事項等に対する回答書」を御準備ください。前回の審議におきまして、この回答書の3ページから5ページに記載をしております9つの指摘事項と1つの修正事項を出しております。

個別に説明をしていきたいと思っておりますので、6ページ目を御覧ください。指摘事項1でございます。IPD079Eaタンパク質について、ヒトの安全性への影響に関する精緻な審議を行うため、次のことを踏まえてヒトへの影響を考察することを求めた指摘事項でございます。

(1)として供与体であるコブランの食経験に関する事項について情報を整理することとしますが、①の食用部位(若葉)における発現量、②の食用時の調理方法については情報を得ることができなかったという回答です。③の薬用を含めたヒトでの使用実態については、フィリピンでは葉の抽出物がせき止めに使用され、インドネシアでは葉ががんや心臓疾患の治療に用いられる。また、マレーシアでは葉をすり潰したものが頭髪料として用いられるという追記がされております。

続きまして、(2)としてIPD079Eaタンパク質がMACPFドメインを有しており、ヒトに対しPerforinのような作用を有しないか懸念されることから、ヒト培養細胞を用いた*in vitro*試験を行い、当該タンパク質とヒト細胞との作用について考察することという指摘事

項でございます。こちらの回答が6ページの下から2行目から記載されております。ヒト腸管上皮細胞であるT84とCaco-2を用いた*in vitro*試験を行っております。

7ページに記載されていますが、細胞の管腔側を0.1、1、10 µg/mlのIPD079Eaタンパク質溶液にばく露し、48時間後に細胞毒性の有無を確認しています。その結果が表に示されていますが、文章での説明は8ページからになります。

T84につきましては、いずれの濃度のばく露においても乳酸脱水素酵素であるLDHの放出及びテトラゾリウム塩による還元反応であるMTT反応に影響は見られませんでした。Caco-2については、いずれの濃度のばく露においても、LDHの放出に影響は認められませんでした。1.0及び10 µg/mlにばく露した場合のMTT反応において、8ページの表の一番下と下から2番目のところに書かれておりますが、陰性対照と統計学的有意差が認められています。申請者はこの結果について、このMTT反応の平均値は用量反応関係になく、それぞれの平均値と陰性対照の平均値との差は陽性対照の平均値と陰性対照の平均値との差と比較しても軽微だったことから、この統計学的有意差はIPD079Eaタンパク質へのばく露に起因するものではないと考察をしております。

8ページの下から3行目からの記載ですが、当該タンパク質を我が国においてヒトが摂取する可能性についても検討をしております。

9ページからの記載ですが、当該タンパク質の一日平均摂取量は0.18 µg程度と推定され、空腹時のヒトの胃液は最低で20 ml程度とされていることから、ヒトの胃液中の当該タンパク質の最大濃度は0.009 µg/ml程度と算出されています。しかし、1日当たりの胃液の分泌量は約1,000~2,000 ml、腸液の分泌量は約2,400 mlとされていることから、実際には消化管内の当該タンパク質濃度はさらに低くなるものと考えられております。

また、7行目からの記載ですが、当該タンパク質は、本申請要旨中で実施している人工胃液及び人工腸液試験の結果から、消化管内で消化されると考えられていること。さらに、ヒトの腸管における食品の滞留時間は3~5時間程度と報告されていることから、当該タンパク質由来の食品の摂取を通じてヒトの腸管上皮がIEC試験で用いた濃度を超えて未消化の状態に48時間連続してばく露される可能性は低いと考察をしております。

9ページ目の2パラ目以降の記載ですけれども、申請者はマウスを用いた急性経口毒性試験、飼料混入投与による28日間反復経口投与毒性試験、ラットを用いた90日間飼育試験の結果も記載をしておりますが、いずれの*in vivo*試験においても、当該タンパク質の摂取または組換え体の穀粒の摂取による悪影響は認められなかったとしております。

続きまして、14ページを御覧ください。指摘事項2、IPD079Eaタンパク質の作用機作が明確でないことから、標的昆虫への特異性について、近縁の昆虫類だけではなく、ほ乳類やコウチュウ目及びチョウ目以外の昆虫などへの試験や文献等の情報も踏まえて考察をすることという指摘でございます。

回答ですが、前回提出があったコウチュウ目、チョウ目の昆虫に加え、ハチ目、トビムシ目、アミメカゲロウ目昆虫に対する影響を検討した結果、いずれの昆虫についても生存

率に影響は見られなかったとしており、15ページの表6を掲載してございます。

これらの結果と先ほどの指摘事項1の回答にあるほ乳類への影響を検討した結果から、IPD079Eaタンパク質の殺虫活性は、特定のコウチュウ目昆虫に対して特異的なものであると考えるとしております。

16ページを御覧ください。指摘事項3です。申請品目であるDP915635は、2段階の形質転換工程を経て作出されており、1回目の形質転換では、4つのプラスミドをパーティクルガン法により挿入しています。そのことについて3つ指摘事項を出しています。

まず(1)ですが、パーティクルガン法により意図しない断片の挿入がないか、目的のものだけが挿入されているものをどのように選別しているのかについて説明を求める指摘です。

回答は、パーティクルガン法による1回目の形質転換に用いたプラスミド由来の意図しないDNA断片の挿入がないこと及び目的のDNA領域が意図したとおり挿入されていることは、得られた中間系統についてSbS分析を行い確認しているというものでございます。この詳細は、修正要旨の35ページに記載されています。また、最終的に作出されたDP915635において、1回目の形質転換に用いたプラスミドも含め、用いたプラスミド全てについて意図しないDNA断片の挿入がないことをSbS分析により網羅的に確認しているとのことで、こちらの詳細も修正要旨の35ページに記載されています。

続きまして(2)です。申請要旨の1回目の形質転換の説明の中で、修正版の申請要旨では30ページの7行目からの記載になりますけれども、プラスミドであるPHP21139及びPHP21875には*zm-wus2*遺伝子及び*zm-odp2*が含まれており、形質転換における植物体の再生率を向上させるという説明がございまして、指摘事項は、どのような原理で形質転換における植物体の再生率を向上させるのか。そして、意図しない作用を起こさないのかの説明を求めるものでございます。

回答は、まず背景として、単子葉植物であるトウモロコシにおいては、品種によってカルス形成や植物体の再生が容易ではないということが記載されております。これまでにシロイヌナズナ等において形態形成に関わる遺伝子の過剰発現により、胚発生カルスまたは不定胚が形成されたり、植物体の再生が促進されたりするという知見があり、これを基にトウモロコシの未成熟胚を用いた形質転換の際に、トウモロコシの*Bbm*遺伝子である*zm-odp2*遺伝子と*Wus*遺伝子である*zm-wus2*遺伝子を同時に導入して発現させた結果、従来の形質転換が困難であったトウモロコシ品種においても、形質転換後の胚発生が促進され、遺伝子組換え体再生率が向上することが示されたという説明になってございます。

次に、意図しない作用の有無についての回答ですが、17ページに記載をされております。1回目の形質転換に用いたヘルパープラスミドは、ゲノムへの挿入を意図したのではなく、これらのプラスミド由来のDNAゲノムに挿入されていない個体を中間系統として選抜しています。さらに、ゲノムに挿入されなかったプラスミドは、植物体を再生する過程で植物体から失われます。そのため、ヘルパープラスミド由来の*zm-odp2*遺伝子及び*zm-*

*wus2*遺伝子は、未成熟胚へのヘルパープラスミドの導入後に一過的に機能すると考えられます。また、*zm-odp2*遺伝子及び*zm-wus2*遺伝子は、いずれもトウモロコシの内在性遺伝子であり、トウモロコシに新たな機能を付与する可能性は低いと考えられると考察をしています。

これらのことから、*zm-odp2*遺伝子及び*zm-wus2*遺伝子を有するヘルパープラスミドの導入が最終的に作出された組換え体に意図しない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。

実際にDP915636は、付与された形質を除く従来の非組換えトウモロコシと同等であるということを修正版の申請要旨の62ページにある構成成分の分析等で確認をしているということでございます。

続きまして、(3)です。LP配列は*zm-SEQ158*と*zm-SEQ159*に挟まれたところに挿入しますが、この場所を選んだ理由、経緯及びどのような原理で挿入されるのかについて説明を求める指摘です。

回答が17ページの四角の上から記載をされております。この*zm-SEQ158*と*zm-SEQ159*は、その周辺に内在性遺伝子が認められないことから、LP配列の挿入部位として選択したということです。このため、LP配列の挿入により遺伝子破損の生じるおそれがないと考えられるということです。

続きまして、指摘事項4でございます。今回の遺伝子組換え体の作出において、1回目の形質転換で導入した4つのプラスミドのうちの一つに*cas9*遺伝子及びガイドRNA発現カセットが含まれています。Cas9タンパク質はガイドRNAを介して宿主のゲノムDNA中で隣接する内在性の*zm-SEQ158*及び*zm-SEQ159*の間で特異的な二重鎖切断を引き起こすとの説明がありました。前回の審議の際にCas9のガイドRNAの特異性を明確に説明するよう求めたところ、指摘事項4に記載しているとおり、ガイドRNAは宿主ゲノムDNAにおける標的となる箇所に特異的になるように設計されており、最も相同性の高いゲノム配列は標的の切断部位と少なくとも3ヌクレオチド異なるという回答がございました。この回答について具体的な配列の大きさにするとともに、少なくとも3ヌクレオチドの違いについて、シード配列への影響も含めて具体的に説明を求めた指摘事項でございます。

回答は、DP915635の作出に用いたトウモロコシPHR03系統のゲノムDNA上には標的切断部位と同一の、もしくは1ヌクレオチドまたは2ヌクレオチド異なる配列が存在しないことをあらかじめ確認しており、ガイドRNAが標的切断部位に特異的に結合するよう設計されている。18ページからの記載になりますけれども、標的の切断部位と3ヌクレオチド異なる配列はゲノムDNA中に表8のとおり6種類存在するというところでございます。また、これまでに報告されている文献から、ガイドRNAの配列と3ヌクレオチド以上異なる配列にガイドRNAが結合し切断が生じる可能性は非常に低いと考察をしております。

続きまして、19ページ目を御覧ください。指摘事項5です。本申請品目は、挿入遺伝子のコピー数及び外骨格領域の有無の確認をSouthern by Sequencingで行っております。この方

法は新しい方法であり、令和4年4月時点では前例も少なかったことから、従来法と比較を行い、精度が十分である解析手法であることを説明するよう求めた指摘事項です。

回答として、サザンブロット分析の結果との同等性を論文を引用して説明するとともに、検出感度についても従来のサザンブロット分析では40 bp以上のDNA断片が検出されていましたが、SbS分析では35 bp以上のDNA断片が検出されたことから、両手法の検出感度は同等と考えられるとしています。

「また」以降の記載ですが、DP915635のT₁世代を用いて実施したSbS分析における平均カバレッジ深度は、導入用プラスミド由来の配列が認められた5個体において900から1,168であり、十分な信頼性を確保していると考察をしています。

続きまして、20ページを御覧ください。指摘事項6です。遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性について、加熱処理に対する感受性は、殺虫活性の低下を示すのみでなく、ポリクローナル抗体を用いた方法で分解性を確認し、ヒトへの安全性の影響について考察を求める指摘事項です。

回答として、IPD079Eaタンパク質の加熱処理に対する感受性をELISA法を用いて確認しており、その結果、当該タンパク質の免疫反応性は50℃の加熱処理により非加熱対照の2.1%に、75℃以上の加熱処理で0.1%未満に低下しています。これらのことから、IPD079Eaタンパク質は、加熱処理により殺虫活性及び免疫反応性が低下すると考察をしております。

続きまして、21ページ、指摘事項7を御覧ください。こちらはPATタンパク質とPMIタンパク質に関する物理化学的処理に対する感受性の説明を求める指摘事項です。

まず、PMIタンパク質ですが、*E.coli*で生産されるPMIタンパク質を用いた人工胃液処理の結果ですが、23ページの図12を御覧ください。試験開始30秒後であるレーン5では、PMIタンパク質のバンドは消失しますが、低分子のバンドが現れ、この低分子のバンドは試験開始60分後でも消失しませんでした。そこで、人工胃液で1分間処理した後に、引き続き人工腸液で処理した結果が24ページの図24になります。人工胃液処理後のレーン4では低分子のバンドが認められますが、その後、人工腸液処理を30秒行ったレーン6では低分子の断片も消失しているということが確認できました。

25ページの図14を御覧ください。人工胃液試験のウェスタンブロット分析では、レーン5の試験開始30秒以内にPMIタンパク質のバンドも小断片のバンドも消失をしているということが確認できました。

続きまして、26ページを御覧ください。こちらはPMIタンパク質の人工腸液試験のSDS-PAGEとウェスタンブロットの結果です。図17のSDS-PAGEでは、レーン9の反応開始20分後でPMIタンパク質のバンドが消失したとしており、27ページの図18のウェスタンブロットでは、レーン11の反応開始60分でPMIタンパク質のバンドが消失したとしております。

28ページを御覧ください。PMIタンパク質の加熱処理試験の結果です。75℃以上の加熱処理を加えた場合に酵素活性が検出されなくなっており、PMIタンパク質は加熱処理によ

り酵素活性が低下することが確認されたと考察をしております。

続きまして、PATタンパク質ですが、PATタンパク質は既に承認を受けているDP-004114-3トウモロコシ等に導入されており、人工胃液及び人工腸液で30秒以内に消化されること、90℃、60分間の加熱処理により酵素活性が失われることが確認されたとしております。

こちらについては、OECDの文書においても、PATタンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性が低いとされているという説明も書かれております。

PATタンパク質の説明の補足ですが、修正版の申請要旨の23ページを御覧ください。*pat*遺伝子の説明の中で、上から4行目の後半、なお書き以降の記載ですが、「トウモロコシでの発現を最適化するため*pat*遺伝子の塩基配列を改変しているが、産生されるPATタンパク質のアミノ酸配列に変化はない」と説明をしております、前回の審議の際に提出された添付資料9はお手元にありますでしょうか。タブレットの中の添付資料9になりますけれども、この添付資料9を御覧いただきますと、最後のページに図9といたしましてアミノ酸配列が記載されてございます。このアミノ酸配列の記載の資料からも、アミノ酸配列が変わらない、同一であるということが確認できます。

当該品目で物理化学的処理に対する感受性の試験、人工胃腸液試験であるとか加熱処理試験、こういった試験を省略できる対応につきましては、先日作成いたしました技術的文書に明記をしている事項でございます。

今日お配りしている参考資料1-4に技術的文書がございますが、この技術的文書の15ページに「オ その他」として、物理化学的処理が省略できる場合の考え方の例を示しております、その記載といたしまして、既に食品健康影響評価を終了し、安全性が確認された遺伝子産物とアミノ酸配列が同一であることが確認でき、かつ糖鎖修飾等に変化が生じていないと考えられる場合が物理化学的処理が省略できる場合に当たるという説明をしております。今回このPATタンパク質の記載につきましては、こちらに該当するものと考えてございます。

続きまして、回答書に戻っていただきまして、回答書の29ページ目を御覧ください。指摘事項8でございます。PMIタンパク質については、カエル由来の α -パルブアルブミンとの間に8アミノ酸の一致が認められたとの記載がございました。この一致について、 α -パルブアルブミン感受性患者の血清とのIgE結合能を含め、アレルギー誘発性について考察を求める指摘事項でございます。

申請者は、要旨を修正し、PMIタンパク質とカエル由来の α -パルブアルブミンとの間で一致する連続する8アミノ酸は交差反応性パルブアルブミンで共有される既知のアレルゲンのエピトープの外側にあること、PMIタンパク質がパルブアルブミンのアレルギー誘発性に重要な立体構造を有していないこと、PMIタンパク質のように8アミノ酸の一致を示しながら80アミノ酸以上について35%より大きい相同性を有さない例は、交差反応性を示す既知のアレルゲンの組合せでこれまでに知られていないことから、検出された8アミノ

酸の一致は偽陽性であると考えられるとしております。さらに、PMIタンパク質が食品としてこれまでに安全に使用されていること及びPMIタンパク質の宿主である *E.coli* がヒトに対してアレルギー誘発性を示さないことから、PMIタンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと考察をしております。

続きまして、30ページを御覧ください。指摘事項9でございます。MACPFを有するタンパク質は多種の生物種で様々な機能を有することを考慮して、IPD079Eaタンパク質を導入することによる宿主の代謝系への相互作用を考察するようにという指摘事項でございます。

こちら申請要旨が修正されており、IPD079Eaタンパク質が属するMACPFタンパク質は、様々な生物に広く保存され多様な機能が報告されているが、2019年に米国及びカナダのほ場で行われた栽培試験において、DP915635の生存及び増殖能力が宿主であるトウモロコシと同等であったと説明が追加されております。また、IPD079Eaタンパク質のアミノ酸配列について、既知の酵素タンパク質のモチーフあるいはドメイン等との相同性は認められなかったことから、酵素活性を有する可能性が低く、当該タンパク質の導入により殺虫活性以外の意図しない形質が付与され、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考察をしております。

続いて、31ページの修正事項ですが、こちらは挿入遺伝子の機能に関する事項について、前回の申請要旨では「根特異的な活性を示す」と記載をされていましたが、IPD079Eaタンパク質が根以外でも発現しているということから、「主に根で活性を示す」という修正をしております。

最後に、32ページを御覧ください。こちらは申請者からの修正でございます。まず、安全な摂取に関する事項に、トウモロコシの生産量についての記載を追記しましたという内容と、次にもう一つが、諸外国の申請及び承認状況について、最新の情報に更新しましたという修正になります。

説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

比較的多数の指摘事項がありましたので、1つずつ確認してまいりたいと思います。

まず、指摘事項1ですけれども、(1) 供与体であるコブランの食経験についてです。こちらの指摘事項は、〇〇〇と〇〇〇、〇〇〇と、本日いらっしゃいませんけれども〇〇〇から出されております。

私はこのくらいでよろしいのではないかと思います、〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 そのように思います。これくらいでよいかということですよ。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかがでしょうか。

はい。

では、次に(2)、こちらはヒトに対しての作用について少し詳細に検討してくださいと

ということで、〇〇〇と〇〇〇と〇〇〇、〇〇〇、お二人はいらっしゃいませんが、指摘しております。今回、新規の殺虫タンパク質ということで、レセプターとかその手の情報がありませんので、ヒトに対しての安全性を少し何らかの方法で確認してほしいということで、できればヒト腸管上皮細胞を用いて *in vitro* の試験をしていただけないかということをご指摘事項として出しました。結果はオーソドックスといたしますか、きちんと腸管上皮細胞で細胞の極性を出しながら毒性について検討していただいたということで、影響がないという結果ですので、私はこの内容でよろしいかと思っております。

〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 これで大丈夫だと思います。

〇〇〇 指摘事項1につきまして、ほかの先生方で特にコメント等がありましたらお願いいたします。

よろしいですかね。後からでもいいので、先に進みたいと思います。

次に、指摘事項2ですけれども、こちらはほかの殺虫スペクトラムについて、もう少し広めに議論してくださいということで、〇〇〇と〇〇〇が出したものですけれども、ほかのハチとかアミメカゲロウとかを出されていますので、非常に特異性が高いということが分かって、私はこれでよろしいかと思っております。

次に、指摘事項3ですけれども、DNAの宿主への導入方法について、まず(1)としてパーティクルガンを使っている点について、〇〇〇から御指摘があった点となっております。

〇〇〇 1番の(1)のことでしょうか。

〇〇〇 そうです。パーティクルガン法で中間系統は作出しているのですが、そのパーティクルガンのときに意図しない断片が入っていないのですかという御質問だったと。

〇〇〇 網羅的に確認しているのですが、これでいいと思います。

〇〇〇 中間系統を1個体に絞っておりますので、そこで何か予期しない断片が入っていても、その次の世代でSbS解析をやっておりますので、10個体やっておりますので、確率論的に変な断片が入る確率はほとんどないと思いますので、これでよろしいかと思っております。

(2)ですけれども、4つのプラスミドで再生率を上げているのですが、この仕組みはどういう仕組みですかという御質問で、〇〇〇と〇〇〇です。

〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 実際にはこのヘルパーが残っていないということも確認しておりますので、技術としてはこういったものがあるということで問題ないと思います。

〇〇〇 これも確認されているので、いいと思います。

以上です。

〇〇〇 (3)ですけれども、*zm-SEQ158*と*zm-SEQ 159*に挟まれた領域をLP配列を入れた場所として選んだ理由等について御説明くださいということで、〇〇〇が指摘されていますけれども、よろしいでしょうか。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 ほかの先生方で、この指摘事項3について何かコメントがありましたら。

よろしいですね。

それでは、指摘事項4に参ります。こちらはガイドRNAの特異性について少し説明を足してくださいということで、一応配列等の提示がございました。こちらは誰が指摘したかは書いていないのですが、〇〇〇、この点に関してはいかがでしょうか。

〇〇〇 確認された内容で特に問題ないと思います。

〇〇〇 ミスマッチが1塩基のものと2塩基のものがないので、ほとんどもう確率的にほかの部分の切っていることは。

どうぞ。

〇〇〇 今の指摘事項は〇〇〇からの御指摘でした。申し訳ございません。

〇〇〇 〇〇〇、お願いいたします。

〇〇〇 このミスマッチ数だったら問題ないかと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、指摘事項5ですけれども、これは〇〇〇からで、**Southern-by-Sequencing**の妥当性について少し説明してくださいということで、令和4年の頃はまだ例数が少なかったのですけれども、大分例数が増えまして、今はある程度信頼性がある方法ということで我々も認識しているかと思しますので、この説明でよろしいかと思します。

次に、指摘事項6ですけれども、タンパク質の物理化学的処理に対する感受性のところについて、**ELISA**法もやっていただけませんかという御指摘でした。こちらは〇〇〇から出されたものですが、〇〇〇、一応コメントいただけますでしょうか。

〇〇〇 こちらのほうで**ELISA**で抗体を使ったほうの試験をしているので、これで問題ないと思します。

〇〇〇 〇〇〇も一応コメントいただけますか。

〇〇〇 私のほうも、タンパクの安定性をちゃんと見られているので、これで問題ないかと思します。

〇〇〇 一応補足すると、今の技術的文書では生物的、もしくはこういう物理化学的手法で熱安定性を示すこととなっておりますので、どちらか出されていれば、今の技術的文書ではオーケーということになっておりますので、補足したいと思します。

次に、指摘事項7ですけれども、**PAT**タンパク質と**PMI**タンパク質の物理化学的処理に対する感受性について詳しく記載してくださいということで、こちらは〇〇〇が出されていますけれども、この程度の記述で私はよろしいかと思しますが、ほかの先生方でコメントがありましたら。よろしいですか。

一応、今後、技術的文書で先行して承認されたタンパク質と同じアミノ酸配列の場合には、先ほど事務局からも説明がありましたけれども、省略できるケースがあるということで、今回**PAT**タンパク質が一応それに当たりますという説明でしたので、今後、皆様も御承知おきいただけるといいかと思します。

〇〇〇 1点細かいところで、回答については問題ないと思うのですが、24ページの図のところの説明なのですが、SGFで1分処理してSIFで0.5から30分なのなのですが、表のところのSGFの分が10分になっている、これは1分の間違いかと。

〇〇〇 恐らく1分の間違いかと思しますので、申請要旨を修正させていただきます。

〇〇〇 よろしく申し上げます。

〇〇〇 〇〇〇、ありがとうございました。

それでは、指摘事項8ですけれども、こちらはPMIタンパク質がパルブアルブミンと引っかけかかってしまうのですが、こちらについて少し考察してくださいということで、〇〇〇から出されています。こちらは別な事例でも既に説明されていることがありまして、一応確認済みということではありますけれども、この程度の修正でよろしいかと思えます。

最後、指摘事項9ですけれども、今回導入したMACPFドメインを有するタンパク質の植物に対する影響について検討してくださいということで、これは〇〇〇と〇〇〇です。

〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 酵素タンパク質はないということですので、この記載でよいかと思えます。

〇〇〇 私もこの程度の記載でよろしいかなと。農業形質が基本的に変わらないということですので、この程度の表現でよろしいかなと思えます。

修正事項がほかにあります。全体を通して皆様から何か追加の質問とか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 先ほどありました指摘事項8なのですけれども、30ページ目の1行目の「検出された8アミノ酸の一致は偽陽性であると考えられる」というところは表現があまりよろしくないような感じがいたしますので、偽陽性というところを修正等いただければと思っております。

〇〇〇 事務局、いかがでしょうか。

〇〇〇 〇〇〇、具体的にはどのようなことか教えていただけますでしょうか。

〇〇〇 8アミノ酸が一致したのは一致ということで間違いがないことなので、偽陽性ではなく、アレルゲンがありとすることを偽陽性とするということなのだと思います。なので、ちょっと表現の方法を変えていただければ問題はないかと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。申請要旨の修正を依頼したいと思います。

〇〇〇 それでは、細かい修正かと思えますけれども、その点については〇〇〇と私のほうで、後日修正が参りましたら確認させていただいてということでよろしいでしょうか。

それでは、全体を通して特に追加のコメント、質問等はないということですので、この案件について、特に安全上の問題はないという判定でよろしいでしょうか。皆様の御意思を表現していただけますと助かります。よろしいですかね。

(専門委員同意)

〇〇〇 ありがとうございました。

それでは、今回、申請者が来られていますけれども、追加の質問等はないということで、本件については、特に安全上問題が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 ありがとうございます。

それでは、お手元に右肩に資料と書かれた食品健康影響評価に関する資料を御準備ください。

1枚めくっていただきまして、3ページ目からが本品の評価書案になります。本年6月に「遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針」を改正しましたので、今回の評価書案から新指針の項目に基づいた評価書の構成となっております。今回は初めてですので、項目名を読み上げながら御説明をさせていただきたいと思います。

まず、8ページ目を御覧ください。「Ⅰ．評価対象食品の概要」でございます。

43行目から「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP915635）」は、*Ophioglossum pendulum*に由来する *ipd079Ea* 遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes*に由来する *pat* 遺伝子及び *Escherichia coli* (K-12株) に由来する *pmi* 遺伝子を導入して作出されており、IPD079Eaタンパク質を発現することでコウチュウ目害虫抵抗性が、PATタンパク質を発現することで除草剤グルホシネート耐性が、PMIタンパク質を発現することで形質転換体の選抜マーカーが付与されます。

続きまして、51行目から「Ⅱ．食品健康影響評価」でございます。

第1の「1. 既存品種の分類学上の位置付けに関する事項」です。既存品種は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシのデント種PHR03系統です。

第1の「2. 既存品種の食経験に関する事項」、「3. 既存品種の食品としての利用方法に関する事項」、9ページに行ってくださいまして「4. 既存品種の遺伝的先祖及び育種開発の経緯並びに近縁の植物種に関する事項」、「5. 既存品種由来の食品の構成成分等に関する事項」、「6. 既存品種のアレルギー誘発性等に関する事項」、「7. 既存品種の栽培および流通過程において、健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項」、10ページに行ってくださいまして「8. 既存品種の安全な摂取に関する事項」については、記載のとおりでございます。

121行目から、以上1～8より、DP915635の安全性評価においては、既存のトウモロコシが比較対象であると判断したとしております。

124行目「第2. 遺伝子組換え体の利用目的、利用方法及び既存品種との相違に関する事項」です。

第2の「1. 新たに付加される形質又は改変される形質」は、DP915635では、IPD079Eaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質が生産されることです。

「2. 利用目的」は、DP915635は、ウェスタンコーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に殺虫活性を有することにより抵抗性を示し、除草剤グルホシネートの影響を受けずに

生育することができるということです。

「3. 利用方法」は、従来のトウモロコシと変わりません。

147行目、「4. 安全性において検討が必要とされる相違点」は、DP915635は、*ipd079Ea* 遺伝子、*pat*遺伝子及び*pmi*遺伝子を導入して作出されており、IPD079Eaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質を産生するということでございます。

11ページの5、既存品種以外のもは比較対象とはしておりません。

155行目からです。「第3. 挿入DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築に関する事項」の「1. ベクターの名称及び由来に関する事項」、「2. ベクターの性質に関する事項」は記載のとおりでございます。

180行目から「3. 挿入DNAの供与体に関する事項」です。(1)の名称、由来及び分類に関する事項は記載のとおりです。

185行目からの(2)安全性に関する事項ですが、*O. pendulum*は、シダ植物のハナヤスリ属に分類され、葉は野菜として食べられることが知られているとしております。その後の記載ですが、今回の指摘事項の回答に基づきまして、薬としての使用の履歴というか使用経験を書いてございます。ここについては、薬としての使用経験までここに記載するかどうかを後ほど先生方から御意見をいただきたいと考えてございます。

続きまして、12ページに行ってくださいまして、196行目から「4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物（RNA及びタンパク質）の性質に関する事項」です。

(1) 導入遺伝子の機能に関する事項の①遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能です。まず、aとして*ipd079Ea*遺伝子の記載をしてございます。シダ植物の抽出物を用いた標的害虫に対する殺虫活性を指標としたスクリーニングを行い、相同性検索により*O. pendulum*のトランスクリプトームからIPD079Eaタンパク質を同定した。IPD079Eaタンパク質は、選択的殺虫タンパク質である。IPD079Eaタンパク質は、小孔形成タンパク質として知られているMACPFスーパーファミリーに属していることが予測されました。MACPFスーパーファミリーに属するタンパク質は、様々な生物に広く分布しており、その多様な機能が発生等に関連しています。イネ科植物においては、MACPFドメインを有するタンパク質や発生や環境ストレスに対する応答において機能することが示唆されています。MACPFタンパク質は標的細胞の細胞膜上の受容体に結合し、環状複合体を形成し小孔を形成します。IPD079Eaタンパク質はこれまでに報告されているMACPFタンパク質と同等のサイズの環状複合体を形成することが確認されています。IPD079Eaタンパク質は、WCRの中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合して作用すると考えられました。

またIPD079Eaタンパク質のWCRの中腸上皮刷子縁膜小胞に対する結合活性は、WCRに殺虫活性を示す2種のBtタンパク質によって阻害されなかったことから、IPD079Eaタンパク質とこれらのBtタンパク質はWCRの中腸において異なる受容体と結合することが示唆されました。

IPD079Eaタンパク質の殺虫活性について、コウチュウ目、チョウ目、ハチ目、トビムシ目及びアメガゲロウ目の5目18種の生物種に対して評価した結果、標的昆虫であるWCR及びその近縁種に特異的であると考えられました。

bの*pat*遺伝子、cの*pmi*遺伝子は記載のとおりでございます。今回、ヒトの腸管上皮細胞を用いた試験を行い、ヒトへの影響を考察させておりますので、240行目からdとしてIPD079Eaタンパク質のヒトへの影響の考察を記載してございます。IPD079Eaタンパク質のヒトへの影響を考察するため、ヒト腸管上皮細胞であるT84及びCaco-2を用いて、IPD079Eaタンパク質ばく露による細胞の生存率への影響を分析した。0.1 µg/ml、1.0 µg/ml及び10 µg/mlのIPD079Eaタンパク質溶液に両細胞腫を48時間ばく露した結果、T84については、いずれの濃度のIPD079Eaタンパク質のばく露においても生存率への影響は認められませんでした。

Caco-2については、1.0 µg/ml及び10 µg/mlのIPD079Eaタンパク質へのばく露により、テトラゾリウム塩による還元反応において陰性対照との統計学的有意差が認められました。しかしながら、ばく露時の平均値が典型的な用量反応関係を示さず、加えて、それぞれの平均値と陰性対照の平均値との差は陽性対照の平均値と陰性対照の平均値との差と比較して軽微であったことから、Caco-2の生存率への影響において認められた統計学的有意差は、IPD079Eaタンパク質へのばく露に起因する有意な細胞毒性を示すものではないと考えられたとしております。

IPD079Eaタンパク質の一日平均摂取量は、日本人一人が一日に摂取する「とうもろこし・加工品」の原料を全てトウモロコシDP915635に置き換えて推定摂取量を計算すると、0.18 µg程度となるとしております。また、IPD079Eaタンパク質は胃液及び腸液により速やかに消化されると考えられます。これらのことから、食品の摂取を通じて、ヒトの腸管上皮が未消化のIPD079Eaタンパク質に、0.1 µg/mlを超える濃度で長時間連続して曝される可能性は極めて低いと考えられるという記載にしております。

続きまして、②の発現タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性のところがございます。IPD079Eaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質と既知毒性タンパク質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を用いて、*E-value* < 1 × 10⁻⁴を指標として検索を行った結果、既知の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。

(2) の遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子のうち、抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項でございます。導入用プラスミドPHP83175のベクターバックボーンにはテトラサイクリン耐性遺伝子及びスペチノマイシン耐性遺伝子が含まれていますが、ベクターバックボーンはトウモロコシDP915635中に導入されません。

(3) 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の発現に関わる領域に関する事項については、記載のとおりとなっております。

続きまして、15ページに行っていただきまして、309行目から「5. そのほか導入遺伝子

の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能に関する事項」でございます。中間系統作出のために既存品種の細胞に挿入されたプラスミドPHP70605は*cas9*遺伝子及びガイドRNA発現カセットを含んでいるため、挿入に伴いエンドヌクレアーゼであるCas9タンパク質及びガイドRNAが一過的に生産されます。Cas9タンパク質はガイドRNAを介して既存品種のゲノムDNA中で隣接する内在性の*zm-SEQ158*及び*zm-SEQ 159*の間で特異的な二重鎖切断を引き起こし、植物が元来有するDNA修復機能により相同組換えが誘導され、内在性の*zm-SEQ158*及び*zm-SEQ 159*の間にLP配列が挿入されます。さらに、トウモロコシDP915635作出のためにその中間系統の細胞に挿入されたプラスミドPHP83175は、*Flp*遺伝子発現カセットを含んでいるため、挿入に伴いリコンビナーゼであるFLPタンパク質が一過的に生産されます。FLPタンパク質は挿入DNA領域を中間系統のゲノム中のLP配列に部位特異的組換えにより挿入するための相同組換えを誘起いたします。

これらの遺伝子はいずれもトウモロコシDP915635のゲノムに挿入されていないことを確認してございます。

続きまして、328行目から「6. ベクターへの挿入DNAの組込方法等に関する事項」でございます。

(1) 挿入DNAのクローニング又は合成方法に関する事項は記載のとおりでございます。

(2) ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項は記載のとおりでございます。

16ページに行ってくださいまして、「7. 構築されたコンストラクトに関する事項」でございます。こちらも記載のとおりとなっております。

続きまして、18ページ目、360行目からでございます。「第4. 遺伝子組換え体の作出及び遺伝子組換え栽培系統に関する事項」でございます。

「1. 遺伝子導入に関する事項」、(1) 遺伝子の既存品種への導入方法に関する事項でございます。DP915635の作出は、2回の形質転換を経て行われています。1回目の形質転換は、非組換えトウモロコシPHR03系統に、*cas9*遺伝子及びガイドRNAを含むプラスミドPHP70605、プラスミドPHP73878及びヘルパープラスミドをパーティクルガン法により導入しました。プラスミドPHP70605より一過性にエンドヌクレアーゼであるCas9タンパク質及びガイドRNAが発現し、既存品種ゲノムの内在性*zm-SEQ158*及び*zm-SEQ 159*配列間で特異的に二重鎖を切断いたします。プラスミドPHP73878はリコンビナーゼであるFLPタンパク質の標的配列を含む挿入標的配列（LP配列）及びLP配列の両端に*zm-SEQ158*及び*zm-SEQ 159*配列を有しています。同一配列である既存品種のゲノム中の*zm-SEQ158*及び*zm-SEQ 159*配列との間で相同組換えが生じ、LP配列がゲノムDNAに挿入されます。その結果、1コピーのLP配列がゲノムDNAに挿入された個体を選抜し*zm-SEQ158/159*系統としました。

2回目の形質転換は、*zm-SEQ158/159*系統の細胞にアグロバクテリウム法により導入用プラスミド、PHP83175を導入しています。導入用プラスミドPHP83175のT-DNA領域内の*Flp*遺伝子が発現してFLPタンパク質が産生される結果、T-DNA領域中にFRT1及び

FRT6とLP配列中のFRT1及びFRT6との間で部位特異的組換えが誘導され、T-DNA領域のうち挿入DNA領域のみが*zm-SEQ158/159*系統に導入されました。

(2) の遺伝子組換え栽培系統に関する事項は記載のとおりでございます。

(3) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項でございます。トウモロコシDP915635のゲノムに挿入された挿入DNAのコピー数及びベクターバックボーンの有無を確認するため、Southern-by-Sequencing分析を行った。その結果、平均リード深度が900から1,168の範囲であったことから、信頼性に問題がなかったとしております。

LP配列の5' 末端及び3' 末端とトウモロコシDP915635ゲノムとの接合領域がそれぞれ1か所特定され、また、挿入DNA領域の5' 末端及び3' 末端はそれぞれLP配列と接合しており部位特異的組換えによって挿入DNAの領域がLP配列中の意図した位置に挿入されたことが確認されたとしております。したがって、トウモロコシDP915635ゲノム中に挿入DNA領域が1コピー導入されていることが確認されました。

導入用プラスミドPHP83175のベクターバックボーン及び*zm-SEQ158/159*系統の作出に用いたプラスミドに由来するDNA断片の混入がないことをSbS分析にて確認をしております。

さらに、トウモロコシDP915635に挿入されたDNA全体及びその近傍の塩基配列を解析した結果、*pmi*遺伝子のプロモーター領域での1塩基置換を除き、DNA領域が意図したとおりLP配列中に挿入されたことが確認されました。

また、トウモロコシDP915635の挿入DNAの近傍配列の由来を確認するため、上記の塩基配列解析により、トウモロコシDP915635のLP配列挿入部位の5' 側近傍配列及び3' 側近傍配列の塩基配列を決定し、これらの近傍配列をトウモロコシのゲノムDNA配列データベースとblastnを用いて照合いたしました。その結果、挿入DNAの近傍配列はトウモロコシ1番染色体由来であると考えられました。

さらに、トウモロコシDP915635作出に用いた*zm-SEQ158/159*系統において、LP配列を挿入することにより既存品種の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5' 側近傍配列及び3' 側近傍配列について、データベースを用いてblastn及びblastx検索を行っております。その結果、DNAの挿入によって既存の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられたとしてございます。

20ページの425行目、(4) 遺伝子組換え栽培系統における導入遺伝子の安定性に関する事項については、記載のとおりでございます。

(5) 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でございます。トウモロコシDP915635に導入されたDNAの全体及びその5' 末端近傍配列及び3' 末端近傍配列との接合部位において目的遺伝子をコードするORFを除く意図しないORFが生じていないことを確認するために、6つの読み枠においてORF検索を行っております。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する80アミノ酸以上のORFが378個検出されました。

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、毒性タンパク

質データベースを用いて E -value $< 1 \times 10^{-4}$ を指標とし、blastp 検索を行った結果、既知の毒性タンパク質との相同性は認められませんでした。また、既知のアレルゲンとの相同性については、アレルゲンデータベースを用いて E -value $< 1 \times 10^{-4}$ を指標として、連続する8アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を有する配列及び連続する8アミノ酸以上の配列が一致する配列を検索した結果、既知のアレルゲンと連続する8アミノ酸以上の一致を有するORFが1個検出されました。このORFは *pat* 遺伝子発現カセット中の *os-actin* プロモーター及び *os-actin* イントロンの接続領域の相補鎖に位置し、8個及び12個のグリシンが連続する2か所の配列が既知のアレルゲンであるトウモロコシ由来エンドキチナーゼAのアミノ酸配列と一致しておりました。当該ORFの上流にはプロモーターがなく、開始コドンも含まれていないことから翻訳される可能性は低いと考えられました。

21ページの452行目から「2. 遺伝子産物の遺伝子組換え栽培系統における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項」については記載のとおりでございます。

22ページに行っていただきまして、465行目から「3. 遺伝子産物のタンパク質摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項」につきましては、記載のとおりでございます。

23ページ、476行目から「4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項」でございます。

(1) 導入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見は明らかであることを記載してございます。記載の内容は、記載のとおりでございます。

(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が明らかであることについても、記載のとおりでございます。

(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事項でございます。

①IPD079Eaタンパク質のa、人工胃液に対する感受性の記載でございます。498行目から、*E.coli* で発現させたIPD079Eaタンパク質の人工胃液中における消化性について確認するため、SDS-PAGE分析を行った結果、IPD079Eaタンパク質の完全長と考えられるバンドは試験開始30秒後には消失したが、10 kDa以下の複数のバンドが試験開始60分後まで検出されました。そこで、IPD079Eaタンパク質を人工胃液で10分間処理した後、連続して人工腸液で処理を行った結果、10 kDa以下の複数のバンドは人工腸液処理開始30秒以内に消失しました。ウェスタンブロット分析では、試験開始30秒後でいずれのバンドも検出されなくなりました。

508行目からb、人工腸液に対する感受性です。*E.coli* で発現させたIPD079Eaタンパク質の人工腸液中における消化性について確認するため、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始60分後まで完全長と考えられるバンドが検出されましたが、経時的に減少することが確認されました。

24ページの515行目からc、加熱処理に対する感受性です。こちらも *E.coli* で発現させたタンパク質の加熱処理に関する感受性について確認するため、各温度帯で約30分間加熱した後、WCRに混餌投与し致死率を測定した。結果、50℃以上の加熱処理により致死率は

IPD079Eaタンパク質を投与しなかった場合の致死率と同程度まで低下することが確認されました。ここからは回答書に沿って記載をしております。また、ELISA分析を行った結果、75℃以上、30分間の加熱処理により免疫反応性は非加熱対照の0.1%未満に低下した。このことから、IPD079Eaタンパク質は、加熱処理により殺虫活性及び免疫反応性が低下することが確認されたとしてございます。

②のPMIタンパク質、25ページに行っていただきまして、555行目からの③のPATタンパク質については、記載のとおりでございます。

25ページの565行目、(4) 遺伝子産物(タンパク質)と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項でございます。IPD079Eaタンパク質、PATタンパク質及びPMI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、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行いました。検索方法については、 $E\text{-value} < 1 \times 10^{-4}$ を指標として連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上相同性を有する配列及び連続する8アミノ酸以上の配列が一致する配列を検索しています。その結果、IPD079Eaタンパク質及びPATタンパク質について、既知のアレルゲンとの相同性は認められませんでした。PMIタンパク質については、カエル由来の α -パルブアルブミンとの間に8アミノ酸の一致が認められました。当該8アミノ酸は交差反応性を有するパルブアルブミンで共有される既知のアレルゲンのエピトープの外側にあること、PMIタンパク質がパルブアルブミンのアレルギー誘発性に重要な立体構造を有していないこと及びPMIタンパク質のように8アミノ酸の一致を示しながら80アミノ酸以上について35%より大きい相同性を有さない例は、交差反応性を示す既知のアレルゲンの組合せとして知られていないことから、この記載ですが、先ほどの〇〇〇の御指摘を踏まえて、申請要旨修正とともに修正をしたいと思います。アレルゲンありとすることが偽陽性であったというような記載に修正をしたいと思います。

585行目から「さらに」に記載でございます。さらに、PMIタンパク質が食品としてこれまで安全に使用されていることなどから、PMIタンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと考えられるとしてございます。

続きまして、26ページ目に行っていただきまして、593行目「5. 遺伝子組換え栽培系統の代謝経路への影響に関する事項」でございます。こちらについては記載のとおりでございます。

607行目から「6. 既存品種との差異に関する事項及び遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項」でございます。こちらについては記載のとおりでございます。

続きまして、27ページに行っていただきまして、649行目から「7. 諸外国における認可、食用等に関する事項」です。欧州においては、欧州食品安全機構に対して食品及び飼料としての安全性審査の申請が2020年12月に行われております。また、そのほかで4か国・地域で安全性審査の申請が行われ、そのうち3か国・地域で承認等がされてございます。

655行目から第5といたしまして、第1から第4までにより安全性の知見が得られているという結論にしてございます。

今回、IPD079Eaタンパク質の遺伝子の供与体であるコブランに食経験がなかったことから、ヒトへの安全性を確認するために申請者には乳類におけるそういったデータを持っていただければ出してくださいということで出してもらっておりますので、この第1から第4までにより安全性の知見が得られているとした上で、出されているマウスとかラットによる試験については参考情報としてこちらに記載をさせていただいております。

長くなりましたが、評価書の説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

評価書が少し長いこともありまして、また、新しい指針の下での初めての評価書になりますので、まず、8ページ目から17ページ目の第3までの項目で皆様から何かコメント、意見がありましたらお願いいたします。

8ページ目の54行目、トウモロコシの学名のところですが、sspというのはsubspeciesですよ。sspというのは微生物でよく使うもので、植物ではほとんど使いませんよ。〇〇〇、そうですね。

〇〇〇 植物は、亜種というのは使いますけれども。

〇〇〇 申請書本体ではsubspeciesでsubspになっている。sspというと普通は微生物のほうで使うかなと思うのですけれども。

〇〇〇 御指摘のとおりで、申請要旨もsubspになっておりますので、すみません、これは誤記でございますので、修正をさせていただきます。

〇〇〇 それから、11ページ目の185行目から安全性に関する事項ですけれども、アレルギー誘発性と毒素産生性を含むと書いてありますが、こちらは野菜として食されることが知られている。その下の文章が、せき止めとか心臓疾患の治療とかという形で書かれていますけれども、毒素産生性は必要ですが、薬効についてここに書く必要はないかなと思うのですけれども、どうでしょうか。食経験ではないので。〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 〇〇〇です。

これは技術的文書のところに今自然毒のことも書いてあって、食品または構成成分が利用されてきた歴史、食文化と書いてあるので、それをこの評価書に書くかということですね。この技術書は申請書の書き方ですよ。そうすると、食経験がないものと、ただ食していただけというのは、私はさっき安全に食していたとこの場合は考えられるのでいいですと言ったのですが、薬としても使うようなもの、例えば心臓の薬でもこれは多分毒性がないと思うのですけれども、大量に食べると逆に毒性に働くようなものの場合、食べるというのが安全に食べているという歴史は、少量ずつ食べているということの参考になるかと思ったので、あってもいいかなと実は思いました。ただ、今のは申請書に書けばいいので、この評価書では、結論なので、結論を書けばいいという考え方だったら、薬用のことは結論としては書かなくていいと思います。

〇〇〇 ほかの先生方、いかがでしょうか。

これは植物なので、〇〇〇とかはいかがでしょう。

〇〇〇 今のままでいいのではないかなというふうに私は思いました。

以上です。

〇〇〇 〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 アレルギー誘発性、毒素産生性を含む事項ということですので、それ以外のところを記載する必要はあまりないのかなと思います。ですから、野菜として、これはサラダとして食されているような書き方ではなかったでしたか。野菜として。食されているというところ、食経験があるというところが記載されていれば、それでいいのかなというふうに思います。ごめんなさい。ちょっと間違ったかもしれない。

〇〇〇 〇〇〇です。

安全に食している経験があるというのが重要なのですよね。だから、単に食されているというよりは、安全に食されていることが確認されていると書いてあればいいと思います。今ここには野菜として食されているとしか書かれていなかったの、ちょっと気になったのですが、事務局、これはどうなのでしょう。

〇〇〇 これはローカルフードなので、どこまで安全にというのはなかなか難しいところがありますけれども、ローカルフードとしては野菜として食べられているということですので、そこまでいいかなと思いますけれども。

〇〇〇 この資料に「ヒトに対する毒性を有しているとの報告はない」と書かれているので、それだと不十分なのではないでしょうか。187行目に「野菜として食されることが知られている」と書かれていて、189行目に「ヒトに対する毒性を有しているとの報告はない」と書かれていて、だったらいいのかなというふうに理解したのですが。

〇〇〇 先ほど〇〇〇から言っていたいている箇所は、修正版の申請要旨の12ページの25行目にも書かれていることを評価書に反映しているところでございます。

〇〇〇 すみません。失礼いたしました。

〇〇〇 微生物のほうだとよくクラス1とかそういうことで書きますけれども、植物で毒性を有しているとの報告はないみたいなことを評価書に書いた事例はあまりないような気がしますね。どうでしょうか。

〇〇〇 〇〇〇です。

今まで確かに評価書のほうには書かれていなかったですね。

〇〇〇 評価書のほうは、あまりそういうことは植物では書いていなかったと思います。

〇〇〇 今これで考えてみますと、ここで変わったところで下手にそう書いてしまうと、みんなこれから書かなくてはならなくなるので、なくていいというふうに今思いました。

以上です。

〇〇〇 薬効を書いてしまうと、薬効成分は何ですかというパブコメが来ても我々は答えられませんので、一応野菜として食されることが知られているだけで、その後の薬効についてはこの記載から外したいと思いますけれども、皆さん、いかがでしょうか。

では、外すということでお願いいたします。

〇〇〇 了解いたしました。

先生、その後の「ヒトに対する毒性を有しているとの報告はない」まで外してもよろしいでしょうか。

〇〇〇 そこまで外してしまいましょう。

〇〇〇 了解いたしました。

〇〇〇 ちょっといいですか。若葉は野菜として食べられているということなのですが、これはどこで食べられているかという情報がありません。その情報はなくてもよろしいのでしょうか？

〇〇〇 地域。

〇〇〇 申請要旨のほうの記載では、ちょっと読ませていただきますと、シダ植物に分類されると。インド、オーストラリア、アフリカの一部の地域及び東南アジアに自生しており、米国ではフロリダ州に移入分布している。若葉は野菜として食されていることが知られているということで、参考資料がついているのですけれども、ちょっとお待ちください。

〇〇〇 そうしたら、ちょっと確認していただいて、もし地域がある程度書かれているようであれば、どこどこにおいてとか少し入れるようにしましょう。

〇〇〇 了解しました。

〇〇〇 その点については、後ほど修正版を〇〇〇と〇〇〇で確認するというご願ひいたします。

どうぞ。

〇〇〇 今の挿入DNA供与体に関する事項に関して、(2)のどういうことを書いてくださいというところがアレルギー誘発性とか毒素産生性を含むということで、それに関してシダ植物ですかね。つまり、アレルギー誘発性とか毒素産生性はないことが報告されとか、知られていないとか、そういう文章を書いてくださいということではないのですか。

以上です。

〇〇〇 そう言われるとそうですね。では、最後の*pendulum*は、毒性を有しているとの報告はないは残しましょう。

〇〇〇 了解しました。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 毒性を有している報告はないというのは、報告がないだけで、毒性がないと誰かが言っているわけではないので、そのところはきちんと残しておいたほうがいいのではないかと思います。

〇〇〇 では、その文章は残すということをお願いいたします。

そのほか17ページまでで何かお気づきの点はありますでしょうか。

〇〇〇 13ページ目のところで、今回、IPD079Eaタンパク質のヒトへの影響の考察ということで項目を1つ作られておりますが、検討を実施した理由が特に明記されていません。そういうことは記載しなくてもよろしかったでしょうか。

〇〇〇 当時の議論は、これは新しい殺虫タンパク質で、食経験がきちんとかなり分かっている程度よかったですけれども、たしか何となくその当時の表現では、割と狭い地域で野菜として食べられていますみたいな、それは煮ているのか焼いているのかもよく分かりませんみたいな感じで、それだとなかなかちょっと弱いよねということで、マウスとかそういう試験をしますかという話にもなったのですけれども、殺虫タンパク質の場合はレセプターにくっつくので、マウスに効かなかったからといってヒトに効くかどうかはよく分からんということで、ヒトでの細胞試験ができれば一番、国民への説明としてはいいよねということをお願いしたという経緯になっています。ただ、その経緯を書くかどうかというのはちょっと。

〇〇〇 詳細に説明する必要はないと思いますが、例えば他のPATとかPMIについては検討していないのにIPD079Eaだけ検討していますので、その経緯を明記した方が良いかと思った次第です。明記しにくい場合もあるとは思いますが、過去の事例とも齟齬のない記載になっているかご確認くださいと存じます。

〇〇〇 事務局からの参考情報としてですが、ヒトの腸管上皮細胞による試験を求めているのは今回が初めてではございません。令和5年2月に評価書を発出しておりますコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP23211）についても、初のタンパク質だったということでヒトの腸管上皮細胞による試験を求めて、ヒトへの影響を確認しております。その際の評価書につきましても本日の評価書案と同じ記載になっておりまして、試験の実施を求めた経緯とかそういったところは、この評価書の中では書かれていないというものでございます。ただ、議事録には、審議の中でなぜこれを求めたかということが残りますので、議事録を見ればその経緯は分かるという状況でございます。

〇〇〇 分かりました。結構です。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 1点よろしいでしょうか。同じ13ページなのですけれども、下のほうの説明のbのところなのですが、令和元年の国民健康・栄養調査報告なので、厚生労働省平成30年ではなくて令和2年12月の報告。

〇〇〇 ありがとうございます。再度確認して正しい年に直したいと思います。

〇〇〇 ほかはよろしいでしょうか。

では、続きまして、18ページから最後までのところに関しまして、何かコメント等がありましたら、よろしく申し上げます。

〇〇〇 よろしいでしょうか。23ページ目の503行目なのですけれども、人工胃液で10分ではなくて、1分間処理して連続して人工腸液でしょうか。これは1分だと思えます。

〇〇〇 IPD079Eaタンパク質の人工胃腸液試験のデータを確認しますので、お待ちください。

修正版の申請要旨の42ページ目を御覧いただけますでしょうか。こちらの32行目の後ろから書かれていますけれども、そこでIPD079Eaタンパク質を人工胃液で10分間処理した

後、引き続き腸液処理となっていて、こちらは10分かなと思ったのですが。

〇〇〇 分かりました。PMIのほうを見ておりました。失礼いたしました。

それから、25ページ目のところをよろしいでしょうか。先ほど25ページ目の578行目から、当該8アミノ酸は、交差反応性を有するパルブアルブミンでというところがございますけれども、これが先ほどちょっと議論の中で申していなかったのですけれども、43番の論文では、2021年のHermanの論文の中では、当該8アミノ酸は魚のパルブアルブミンのエピトープの外側にあるということになっていまして、表現としては、当該8アミノ酸はカエルのパルブアルブミンと交差反応性を有する魚のパルブアルブミンで同定されているエピトープの外側にあるということが正しいかと思しますので、その点。

〇〇〇 ありがとうございます。もう一度確認させてください。当該8アミノ酸は、カエルのパルブアルブミンと交差反応性を有する魚のパルブアルブミンで共有される。

〇〇〇 同定されたエピトープの外側に位置する。

〇〇〇 ありがとうございます。そのように修正させていただきます。

〇〇〇 584行目の偽陽性のところですが、こちらは知られていないで切ってしまうでもいいですかね。

〇〇〇 よろしいかと思えます。

〇〇〇 〇〇〇、承諾していただいたようなので、知られていないで、参照42、43という形で。

〇〇〇 了解いたしました。

〇〇〇 そのほか皆様からのコメントはありますか。

〇〇〇 座長、よろしいでしょうか。先ほどのコブランの食経験のところでは若葉がどこの地域で食べられているかという話だったのですが、引用されている論文を事務局で確認したところ、地域まではこの論文の中にも書かれていなかったということでございます。

〇〇〇 では、知られているということだけで。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 それでは、ほかにコメント等がなければ、細かい字句の修正等については、後ほどでも構いませんので事務局のほうにお寄せください。また、今回、初めての指針に対する評価書ですので、修正箇所が多いので、全部きれいに修正したものを最後にもう一回皆様に流していただいて、確認していただいたほうがいいかなと思いますので、皆さん、御面倒ですが、最終版を事務局からお流ししますので、一度目を通していただいて、新しい指針の下でちゃんと書かれているかどうか見ていただきたいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、事務局で評価書案の修正が整いましたら、先生方に御確認の依頼を送りたいと思います。よろしく願いいたします。

〇〇〇 それでは、そういう最終確認のステップはございますけれども、一応安全性上は問題ないということで、その後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。

以上で食品のほうについての審議は終了です。

それでは、引き続き、飼料としての安全性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「遺伝子組換え飼料 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP915635)) の安全性評価について」という資料、申請要旨のほうを御準備ください。

ページをめくっていただきまして、1ページ目を御覧ください。品目名、本系統の特徴は食品と同じでございます。

2ページ目の③使用方法は、従来のトウモロコシと同じでございます。

2ページ目の「2. 遺伝子組換え飼料としての安全性」でございます。「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」の3により、①から③に当たるかどうかを考慮して判断してございます。下から2つ目のパラグラフの記載になりますが、一般的に、挿入された遺伝子もしくは当該遺伝子によって産生されるタンパク質が肉、乳、卵等の畜産物中に移行するという事は報告されておらず、本系統に付与された形質は害虫抵抗性及び除草剤耐性であることから、①、②、③の可能性も考えにくく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物には、通常、安全性上の新たな問題は生じないと考えられるということで、これらの飼料を摂取した家畜に由来する畜産物を摂取することがヒトの健康に影響を及ぼす可能性はないと考えられるとしてございます。

申請要旨の説明は以上になります。

〇〇〇 よろしいでしょうか。

それでは、皆さん、安全性上の問題はないということで御同意いただけますでしょうか。いただける場合は、ジェスチャーかカードをお願いいたします。

(専門委員同意)

〇〇〇 よろしいですね。ありがとうございました。

それでは、本件については、特に安全上は問題ないということですので、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 ありがとうございます。

評価書案の説明をさせていただきます。評価書案を束ねました資料の33ページを御覧ください。33ページ目からが本飼料の評価書案になります。

めくっていただきまして、36ページ目を御覧ください。「Ⅰ. 評価対象飼料の概要」につきましては、記載のとおりでございます。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」につきまして、1及び2につきましては記載のとおりでございます。1及び2を考慮したところ、トウモロコシDP915635に新たな有害物質が生成されることはないため、肉、乳、卵等の畜産物中に新たな有害物質が移行することは考えられま

せん。また、遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や、家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成される可能性は考えられません。

以上のことから、改めて遺伝子組換え食品の安全性評価を行う必要はなく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物については、ヒトの健康を損なうおそれはないとしたいと考えてございます。

説明は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案についてコメントを賜りたいと思います。先ほどと同じで、字句については後ほどでもよろしいですので、事務局にお伝えください。何かございますでしょうか。

よろしいですかね。それでは、一応よろしいということのようですので、細かい字句等の修正がありましたら、後ほど私のほうで確認して、食品安全委員会のほうに報告したいと思います。

1つ戻るのですけれども、食品のほうの評価書です。すみません、私、さっき言うのを忘れてしまったのですが、第4の「7. 諸外国における認可、食用等に関する事項」の前に指針だと遺伝子組換え栽培系統の分類を明確にすることとあるのですけれども、これは今までにない項目なので、多分今まで事例がないのですけれども、というか、新しく入る項目なのですけれども、それは書かなくていいのですかね。

〇〇〇 座長、ありがとうございます。指針上、座長がおっしゃるとおり、そこには別添に従い、そういう分類を明確にすることとなっておりますので、今回のものはこの別添で言うと①に当たる害虫抵抗性と除草剤耐性ということになると思います。タイトル、表題とかに書かれてはいるのですが、指針に沿うと、やはりここにも書くべきかと思っておりますので、こちらのほうを評価書案に加えようと思っておりますが、よろしいでしょうか。

〇〇〇 今までここを実は事務局で判断していて、この委員会では判断していなかったのですけれども、指針に入っているので、忘れがちですけれども、この部会として承認するという形を取ったほうが多分いいのではないかと思うので。別添はついていましたっけ。

〇〇〇 本日の参考資料1-1をお手元に御準備ください。まず、1-1の15ページ目を御覧ください。下から6行目のところに、先ほど座長がおっしゃられました6の「既存品種との差異に関する事項及び遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項」の(3)として、別添これこれの1に従い、遺伝子組換え栽培系統の分類を明確にすることという規定がございます。

その別添が17ページにございます。17ページの「1 遺伝子組換え植物に関する事項」というところの以下3つに分類されるというものの中で、今回のものは①に当たると思いますので、書くとしたら、今、事務局案ですけれども、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、害虫抵抗性及び除草剤耐性の形質が付与されるものと記載をしたいと思いますが、いかがでしょうか。

〇〇〇 私はそれでよろしいかと思えます。この判定は申請者にとっては非常に重要でして、この後の掛け合わせのところにまた追加の安全性審査が必要になるか、必要にならないかという判断基準になります。別添の②、③に分類されたものの後代交配種が必要になりますので、申請者にとっては①になるか、②になるか、③になるかはその後の品種改良のときに非常に関わってきますということで、我々にとってはさほどでもないですけれども、申請者にとっては非常に重要な項目になっておりますので、今回は一応①と判定することよろしいかと思うのですけれども、異論はございませんでしょうか。

では、皆さんの同意を得られたということで。

〇〇〇 ありがとうございます。事務局で修正をさせていただきまして、また後ほど確認をしたいと思えます。

〇〇〇 それでは、評価書については、今の点も含めて修正がありますので、先ほど言いましたように、新しい指針の下で初の評価書になりますので、最終案を皆さんに御確認いただいて、その後、食品安全委員会のほうに報告したいと思えます。

それでは、こちらでトウモロコシについては終わりということでよろしいでしょうか。事務局、よろしいですね。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 それでは、新規品目である「JPTR004株を利用して生産されたセルラーゼ」について審議を行いたいと思えます。

事務局からの説明をお願いいたします。

〇〇〇、ありがとうございます。

〇〇〇 今回、事前の確認において申請要旨の修正をいただいた箇所が非常に多くございますので、本日、Web参加の先生につきましては、昨日メールで送らせていただいております机上配付資料1と記載されましたJPTR004株を利用して生産されたセルラーゼの安全性審査資料、2024年7月24日という記載のものをお手元に御用意いただければと思えます。登庁にて御参加いただいております先生方につきましては、本日配付しております机上配付資料1の「JPTR004株を利用して生産されたセルラーゼ安全性審査資料」をお手元に御用意いただければと思えます。

なお、こちらの資料のうち黄色のマーカーが引いてある箇所が、事前に送付いただいている申請要旨からの変更箇所となっております。

まず、本文の2ページ目を御覧ください。第1、比較対象として用いる従来の添加物及び組換え体との相違の項目でございます。1-(1) 製品名は●●●製品で、有効成分はセルラーゼでございます。反応特異性はセルロースを加水分解するとしており、その詳細は(3)で説明してございます。

(2) 製造方法は、生産菌株の培養液から抽出、除菌、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、野菜、果物などの植物素材を搾汁する工程で添加され、

その工程から得られるエキスまたはジュース等の収量を向上する目的で用いられているというものでございます。植物素材を搾汁する工程で添加された既存のセルラーゼは、殺菌またはろ過工程により失活または除去されるとのこととでございます。

(4) の摂取量は事前の配付資料の際はデンプン糖製造のウェットミリング工程で用いるとし、摂取量推計を行ってございましたが、今回、「果汁・果汁飲料」及び「野菜ジュース」製造のための搾汁用途で使用するものとし、記載の変更を行っております。「果汁・果汁飲料」及び「野菜ジュース」製造のための搾汁で用いられ、かつ100%残存すると仮定し、「果汁・果汁飲料」及び「野菜ジュース」100%の果物及び野菜で構成されていると仮定した場合、日本人の一日最大摂取量が126.6 μg TOS/日となるとのこととでございます。そちらを日本人の平均体重である55.1 kgで除することにより、体重1 kg当たりの最大摂取量2.29 μg TOS/kg 体重/日を算出しております。

続いて、3ページ目、第1-2、宿主に関する事項でございます。

(1) 宿主である *Trichoderma reesei* QM6a株は腐朽したテントまたは制服等の軍用繊維から見いだされ、自然界より単離された菌株でございます。

(2) DNA供与体の由来でございますが、JPTR004株には発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておりません。生産菌を作成するために *T. reesei* QM6a株の染色体上の●●●遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させており、その際に、*Fusarium venenatum* A3/5株由来のノンコーディング配列が染色体上に残存したというものでございます。

続きまして、(3) 挿入DNAの性質及び導入方法です。生産菌であるJPTR004株を作製するために、欠失導入用ベクターを導入することにより●●●遺伝子を欠失するというものでございます。

まず、欠失導入用ベクターの性質について、4ページの表1を御覧ください。●●●の欠失導入用ベクターは全てpUC19を基に構築されております。●●●遺伝子は●●●をコードします。●●●遺伝子は二●●●をコードし、●●●遺伝子は●●●をコードします。

DNAの欠失方法については19行目からの記載になります。こちらの●●●の遺伝子座について、欠失導入用ベクターを用いた部位特異的な相同組換えにより、*T. reesei* QM6a株の遺伝子の欠失を行っております。欠失導入用ベクターを *T. reesei* QM6a株に導入し、ベクター内のターゲット遺伝子座の上流配列及び下流配列を利用した相同組換えにより、ターゲット遺伝子座にR配列、●●●及びR配列が挿入されております。導入された●●●遺伝子の発現による●●●により形質転換体を選択しております。続いてR配列による相同組換えにより●●●遺伝子及びR配列がループアウトで欠失し、●●●による形質転換体の選択を行っております。このような方法で欠失を行うと、反復配列Rの一部は残存するとのこととでございます。

先生方に事前に送付させていただいている申請要旨においては、欠失の詳細は社内文書4に記載したとしている箇所でございますが、事前に○○○より、欠失導入用ベクターの

導入方法を申請要旨本文に記載するようという御意見がございましたので、申請者へ第4-6のDNAの宿主への導入方法に関する事項のほうへ記載するよう連絡したのですが、第4-6への記載が構成上難しいとのことで、欠失導入用ベクターを用いた欠失については第1-2-(3)、プラスミドの構成と要素を第4-5-(1)、プラスミドの作製方法を第4-4に追記いただいております。

5ページの23行目からそれぞれの遺伝子座におけるDNAの欠失方法について詳細を追記いただいております。こちらは欠失導入用ベクターの名称を変更しており、それに伴い机上配付2で本日お配りしております社内文書4の差し替えも行っております。それぞれの欠失導入用ベクターを*T. reesei* QM6a株に導入し、ターゲット遺伝子を部位特異的に欠失しております。欠失導入用ベクターpJPV066は●●●遺伝子の、欠失導入用ベクターpJPV067は●●●遺伝子の、欠失導入用ベクターpJPV068は●●●遺伝子の5'側領域断片、3'側領域断片、反復配列R断片及びマーカー遺伝子を有し、染色体とベクターの間で相同組換えにより部位特異的にターゲット遺伝子と置き換わるとしてしております。

さらに、反復配列Rによる●●●するとのことでございます。このような方法で欠失を行うと、反復配列Rの一部は残存するとのことでございます。

続きまして、6ページの21行目から第1-3、宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料でございます。申請者は、食品用酵素の生産菌として*T. reesei* QM6a系統株を40年以上使用してきた実績があるとのことでございます。よって、当該菌種は長年にわたる安全な食経験があるといえるとしてございます。

続いて、第1-4、宿主の構成成分に関する資料でございます。*T. reesei*が病原性及び有害生理活性を有することは知られていないとのことでございます。また、真菌は一般的にマイコトキシンを生産し得るが、*T. reesei*は酵素製造における発酵過程ではマイコトキシンを産生しないと報告されてございます。

次に、第1-5、遺伝子組換え添加物の性質及び用途に関する項目です。

(1) 製品名及び有効成分はJPTR004株由来のセルラーゼでございます。反応特異性はセルロースを加水分解するとしております。

7ページに移りまして、(2) 製造方法について図3を御覧ください。培養液は数段階の工程を経て製品化され、生産菌は膜孔径0.2 μmの除菌ろ過により、生産物から分離除去されます。申請者のノボザイムズ社では社内の規格項目として「生産菌が検出されない」ことを定めており、製品中に生産菌の混入がないことを確認しております。

続きまして、(3) 用途及び使用形態、(4) 有効成分の性質は既存のセルラーゼと変わらないとし、食品用加工助剤として用いられるとのことでございます。

8ページを御覧ください。第1-6-(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点は、生産菌が異なることのみであるということを表2で示してございます。既存のセルラーゼの販売実績は日本では20年以上となっており、JPTR004株由来のセルラーゼは海外のみで●●●に発売開始となっております。

(2) 組換え体と宿主との相違点は表3を御覧ください。組換え体であるJPTR004株では、●●●遺伝子を欠失しています。そのため、●●●が報告されております。宿主内在性遺伝子を欠失することでセルラーゼの生産量が高まるという作用機序なのですが、事前に事務局から申請者に確認を行っております。●●●、結果論としてセルラーゼの生産量が増えるとの回答でございました。

9ページを御覧ください。第2-1、宿主の分類学上の位置付けです。*T. reesei* QM6a株は腐朽した軍用繊維から見いだされ、自然界より単離された菌株です。事実上セルラーゼの生産菌として産業利用されている全ての*T. reesei*株の親株とのこととございます。

以下、宿主に関しましては記載のとおりでございます。

少しページを進みまして、12ページからが第3、ベクターに関する事項でございます。JPTR004株由来には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、遺伝子挿入用ベクターも用いられてございません。欠失導入用ベクターpJPV066、pJPV067及びpJPV068を用いた相同組換えにより、*T. reesei* QM6a株の●●●遺伝子をそれぞれ欠失させております。遺伝子欠失導入用ベクターの構築には*E.coli*由来のプラスミドpUC19を用いております。

続きまして、14ページを御覧ください。第4、挿入DNAに関する事項です。ここではJPTR004株由来の染色体に残存した*Fusarium venenatum* A3/5株由来のノンコーディング配列である異種遺伝子断片について述べております。

18行目からが(2) 安全性に関する事項となっております。*F. venenatum* A3/5株は20年以上にわたり、海外で食品用マイコプロテインの生産に使用されており、安全なタンパク質発現系と考えられております。

28行目からの記載になりますが、*F. venenatum*は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2及び3に分類されておらず、ヒトまたは動物に疾病を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。

続きまして、15ページを御覧ください。第4-2- (1) 挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法ですが、JPTR004株由来には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されていないとのこととございます。

(2) 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でございます。染色体に残存した異種遺伝子配列の塩基数、塩基配列及び制限酵素部位は明らかとなっております。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項ですが、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されていないとのこととございます。

事前に事務局のほうからR配列の供与体である*F. venenatum*のアレルギー誘発性に関する知見について申請要旨に追記するよう求めたところ、黄色マーカーの部分が記載され、机上配付資料5として配付しております参考資料23が新たに提出されました。*F.*

venenatum A3/5株に関してアレルギー性で問題となった報告はないとのことをごさいます。 *F. venenatum* A3/5株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、 *F. venenatum* A3/5株由来の食品用マイコプロテインに起因すると疑われる食物アレルギーに関する報告が1報見つかりましたが、当該報告の結論といたしましては、 *F. venenatum* A3/5株が生産する60S acidic ribosomal protein P2タンパク質が起因する事象であることが示唆されており、ノンコーディング配列であるR配列がアレルギー誘発性を持つとは考え難いとのことをごさいます。

続きまして、31行目からの記載は第4-3、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をごさいます。

(1) プロモーターに関する事項、(2) ターミネーターに関する事項のそれぞれに記載がごさいますが、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、ターミネーターの機能を有する配列も挿入されていないとのことをごさいます。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであることに記載のありますとおり、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は挿入されておりませんが、部位特異的組換え関連因子であるR配列の一部が残存してごさいます。

次に、16ページに移りまして、第4-4、ベクターへの挿入DNA組み込み方法に関する事項をごさいます。JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、遺伝子挿入用ベクターも用いられてごさいません。先ほど第1-2- (3) で御連絡していただきましたとおり、欠失導入用ベクターの導入方法についてのうちプラスミドの作製方法を第4-4に追記いただいております。pUC19プラスミドに●●●の標的遺伝子それぞれの5'側領域断片、R配列断片、3'側領域断片などを挿入し、遺伝子欠失用ベクターpJPV066、pJPV067及びpJPV068を作製したとのことをごさいます。

続いて、第4-5、構築された発現ベクターに関する事項の(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をごさいます。こちら第1-2- (3) で御説明していただきましたとおり、欠失導入用ベクターの導入方法についてのうち、プラスミドの構成と要素を次の17ページから19ページに図と表で記載してごさいます。

21ページに移りまして、9行目から第5-1、宿主との差異に関する事項になります。宿主である *T. reesei* QM6a株とJPTR004株との差異は、欠失導入用ベクターの導入により●●●遺伝子を欠失している点であるとのことをごさいます。

事前に○○○より、残存したR配列について転写、翻訳されることがないのか、ないのであれば申請要旨に記載するよう御意見がありまして、申請者に確認いたしましたところ、ノンコーディング配列であることのみがこちらに記載されました。挿入された異種遺伝子断片であるR配列は、 *F. venenatum* A3/5株由来のノンコーディング配列であり、●●●をループアウトさせるために挿入した繰り返し配列であり、病原性及び有害生理活性物質に関するものではなく、欠失された遺伝子のうち、●●●であるとのことをごさいます。ま

た●●●であり、これらの操作が宿主の病原性及び有害生理活性物質の生産性を高めることはないと考えられたとのことでございます。

22ページに移りまして、第5-2- (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。JPTR004株の●●●遺伝子座の●●●の遺伝子欠失領域の異種遺伝子断片残存領域の境界領域において、オープンリーディングフレームの有無を調べるための検索を行ったところ、●●●遺伝子座では48個、●●●遺伝子座では48個及び●●●遺伝子座では54個のORFが検出されました。さらに、検出されたORFのアレルギー誘発性及び毒性の可能性を調べるために、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性検索をそれぞれ行っております。

38行目からの1) 検出されたORFと既知アレルゲンとの相同性検索ですが、ネブラスカ大学アレルゲンデータベースのversion 21を用いて行っております。相同性検索では2つの手法で行っております。

23ページに移りまして、1つ目の手法として80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索を行ったところ、●●●遺伝子座において検出された1つのORF (●●●) がケナゴナダニが有する既知のアレルゲンと相同性を示しましたが、当該ORFでアレルゲンと相同性を示した箇所は宿主内在性の塩基配列部分であり、遺伝子導入により新たに生じたものではございませんでした。

2つ目の手法として連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索を行いましたところ、●●●遺伝子及び●●●遺伝子座では一致するORFが検出されませんでした。●●●遺伝子座において検出された2つのORF (●●●) がそれぞれセイヨウナシ及びコムギが有する既知のアレルゲンと相同性を示しました。

しかしながら、コムギと相同性を示しました●●●は宿主内在性の塩基配列部分で検出されたORFであり、遺伝子導入により新たに生じたものではございませんでした。加えて、●●●はセイヨウナシが有する既知のアレルゲンであるPyr c 5.0101と連続する8アミノ酸配列が1つ一致しましたが、80アミノ酸残基で35%以上の一致する条件ではPyr c 5.0101と相同性を示しませんでした。さらに、Pyr c 5.0101と一致した8アミノ酸配列を食物アレルギーに関する安全性研究のためのアレルゲンデータベースに登録されているアレルゲンエピトープと比較したところ、一致するアレルゲンエピトープは認められませんでした。したがって、●●●の食物アレルギー誘発性についての懸念は低いものと考えられるとしております。

29行目から2) 検出されたORFと既知の毒性タンパク質との相同性検索についてでございます。既知の毒性タンパク質との相同性検索には、NCBIデータベースを用い、*E*-value < 1.0×10^{-5} を指標にして検索を行ったところ、●●●遺伝子座、●●●遺伝子座、●●●遺伝子座それぞれについて、挿入された異種遺伝子配列のDNAと宿主ゲノムの接合部位をまたいで新たに生じるORFとしてNCBIデータベースのタンパク質にヒットしたORFはございませんでした。

以上の結果から、異種遺伝子配列の挿入によって新たに生じたORFが発現したとしても、JPTR004株由来のセルラーゼ製品中に食物アレルギー誘発性または毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられるとしてございます。

続きまして、25ページ、第6、製造原料に関する事項でございます。製造原料、製造器材は全て長年安全に使用された実績があるもので、原材料等から安全性に問題がある物質が酵素製品に混入することは考え難いとしてございます。

26ページ、第7-1、諸外国における認可等の状況ですが、*T. reesei*由来のセルラーゼ製品は日本を含む世界各国で20年以上にわたって販売されており、食品用加工助剤として用いられてございます。今回の審議品目であるJPTR004株を利用して生産されるセルラーゼに関しましては、欧米等で2022年に販売が開始されており、米国では自己認証済みでございます。

続きまして、27ページ、第7-2、組換え体の残存に関する項目です。JPTR004株由来のセルラーゼ製品中に組換え体由来のDNAの残存がないことをPCR解析により確認した結果、JPTR004株由来のセルラーゼ製品にはJPTR004株由来の染色体DNAが残存しないことが確認されたとのことでございます。

続きまして、28ページを御覧ください。第7-3、非有効成分についての項目です。JPTR004株由来のセルラーゼ製品の製造に用いられる発酵原料、精製・ろ過助剤、安定化、製剤化原料を含む全ての製造原料は、ノボザイムズ社において食品用酵素の製造に長い間安全に使用されてきたものであるとのことでございます。表4に記載のとおり、食品添加物の規格基準を満たすことが確認されており、以上のことから、安全性に問題がある非有効成分または代謝産物がJPTR004株由来のセルラーゼ製品中に含まれるとは考えにくいとしております。

18行目からの記載になりますが、第7-4、精製方法及びその効果に関する事項です。生産菌の培養物は粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経て製品化され、JPTR004株由来のセルラーゼ製品には生産菌は残存せず、その試験値は我が国の食品、添加物等の規格基準を満たしております。製造原料及び製造器材は食品用酵素の製造に長年安全に使用された実績を持ち、製造原料は食品への使用が認められた品質のものでございます。よって、JPTR004株由来のセルラーゼ製品については、安全性に問題のある物質が混入するとは考え難いとしております。

第7-5については記載のとおりでございます。

29ページに移りまして、結論として、これまでの第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してございます。

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、申請書の審議に入りたいと思います。今回、宿主は*T. reesei* QM6a株ということで、非常に汎用される株でして、安全性に関しては論文等もありまして、かなり問題

はないという株になっております。セルラーゼの製造に使われておりまして、今回はセルラーゼのところはいじってなくて、そのほかの部分で欠失を入れて、R配列が残ってしまったためにこちらに上がってきたという形になっております。

それでは、申請書の2ページから13ページまでで何か御意見、御質問等がありましたらお願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 特には問題ないのではないかと思うのですけれども、今般、紅麴のこともあって、あれは今のところでいうと、青かびが本来だったら出さないものを出すようになっていくということなのですよ。だとすると、これに関しても、本来は出さないのだけれども、この組換えを行うことによって出すということもあり得るのではないのかなど。そのところをここで評価すべきなのかという問題もあると思うのですけれども、いかがでしょうか。

〇〇〇 製造工程というか製造管理のほうはまた別でして、ここでは一応、遺伝子組換えに伴うリスク評価を行うという形になっているのですけれども。

〇〇〇 今言っているのは製造管理のところではなくて、この組換えによって起こる可能性というのを。

〇〇〇 そこについて疑義があれば、申請者に聞くなりしたいと思いますので、もしお聞きになるようであれば、多分申請者を呼ぶことになると思いますので、ちょっとお聞きいただくことでもよろしいですか。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 今回、書式の体裁が面倒くさくて、導入遺伝子とはいっても欠失用ベクターしか入れていないので、申請者は最初、導入遺伝子はないという反応でつくってきたのですけれども、それだと形が整わないので、一応欠失用ベクターを書いてくださいという形をお願いしてあります。

ただ、欠失用ベクターの説明のところちょっと私、例えば5ページに図があって、相同組換えで入れ替えてしますという形で載っているのですが、このターゲット遺伝子の矢印が何を含むのかがよく分からないので、要するにプロモーター、ターミネーターまで含めてがばっと落としているのか、構造遺伝子のところだけを落としているのか、ちょっと私は読み取れなかったもので、それについては申請者にお伺いしたいと思います。

そのほかコメントや質問はありますか。

どうぞ。

〇〇〇 遺伝子組換えという部分とは少し離れるかもしれませんが、今回、●●●遺伝子を欠失させるわけですが、なぜこれを欠失させるのか理由がよく分かりませんでした。

〇〇〇 一応こちらは●●●ですよ。

〇〇〇 その●●●ということが目的として書かれているようですが、ただ、工業生産ベースでは、これはそもそもできないとも書かれているので、欠落させる理由がよく分かり

ませんでした。

〇〇〇 では、申請者に聞いてみましょう。お呼びすると思いますので。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 〇〇〇ですけれども、この申請自体というよりは、定義として確認させていただきたいのですけれども、6ページ目の第1-3、宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料というところの26行目で、当該菌種は長年にわたる安全な食経験があると言えるというふうに書いてあるのですが、この場合、食品添加物としての利用ですので、菌種自体は食経験としては言わないのではないかなと思うのです。もちろん食品添加物製造の利用経験としては長年あるので安全であるというのは分かるのですけれども、食経験というのはどこまでを含めて食経験というふうに判断するのかというのが別の会議でもたまたま問題になることがあったので、この場合であっても、この菌種自体は安全な食経験というふうに言っているのかどうか、確認させていただきたいと思います。

〇〇〇 菌種、QM6aは非常に安全な宿主であるという論文もかなりありまして、その点はいいのですが、これは表現の問題で、食経験があるかどうかという表現にしているのかどうかは、事務局としてはどうでしょうか。

〇〇〇 すみません。直接の回答になっていないかもしれないのですけれども、セルラーゼにつきましては、厚生労働省の添加物の規格基準、告示370号で出されているものの中でセルラーゼの生産菌というものが規定されておりまして、その中には*T. reesei*が入っております。株までは書かれていないのですけれども、*reesei*を使ったセルラーゼは食品添加物の規格基準上は認められているというものがございますので、今回の比較対象にするものの食経験という意味でいいのかどうか分からないのですが、この菌株自体は法律上も認められている菌株であるという解釈ができるのかなと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

全くの記載の方法の話だけでは多分ないというわけなのですけれども、この場合、添加物製造への利用経験または食経験に関するというふうになっているので、ここであれば添加物製造への利用経験は十分にあるという記載であればいいのですけれども、例えばこの*Trichoderma*を使って、この菌体自体を食べたら健康になりますよみたいな機能性食品とかをつくるといったときに、今回のことをもって食経験があるということで申請される可能性がないわけではないですね。そのときに今回のことを、菌株として扱っているものを、そのものが食経験があるというように判断してしまっているのかどうか。

だから、記載の問題といえば記載の問題だと思いますし、でも、そこで決めておかないと厄介なことが出てきそうだなという気がしないでもないということで確認させていただきました。このもの自体の安全性に関しては全く疑義があるわけではありません。ただ、食経験というものの定義について一応確認させていただきたいということです。

以上です。

〇〇〇 そうしましたら、申請者をお呼びするので、*reesei*そのものを食べることがあるのかという形かと思うので、ちょっとお聞きいただけますか。

〇〇〇 分かりました。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。

〇〇〇 〇〇〇ですけれども、さっきの〇〇〇と同じところの●●●遺伝子というのを欠失させると組換え頻度が上がるとか、何を期待してやったのかというのを一応お聞きしたほうがいいかなと思っております。

以上です。

〇〇〇 それは●●●というのでやっているというのが一応は書いてありました。

〇〇〇 気になったのは、その頻度のデータとかを持っているのかというのがちょっと気になったのです。

〇〇〇 それもお聞きしましょう。

ほかはございますでしょうか。

では、戻ってもよろしいので、申請書の14ページから17ページですけれども、ベクターの構築に関する事項までで何かございますでしょうか。ないですかね。

それでは、最後の遺伝子組換え食品添加物に関する事項のところまでで何かございますでしょうか。

〇〇〇 1点いいでしょうか。〇〇〇です。

これもこの申請書だけということでもないのですけれども、次世代シーケンスによってゲノム解析をしているという話なのですが、そのデータ自体が添付されていないように思うのですけれども、これはどこまで求めるのでしたっけ。この記載の仕方ぐらいでいいという、マッピングデータとかは必要ないものでしたっけ。結局今回の場合は欠損だけなので、基本的には欠損している、R配列が入っているのですけれども、プラスミドを導入していますので、もちろん意図しない導入もあるかと思うのですけれども、その場合はやはりマッピングデータをある程度見たいなという気がしないでもないのですが、いかがでしょうか。

以上です。

〇〇〇 これは新しい指針の下で行うので、〇〇〇、どうでしょうね。

〇〇〇 過渡期にあたりますが、どうしましょうか。

〇〇〇 一応そこに冗長度が45という形では書いてあるので、過渡期といえば過渡期なのですが、どうしましょうかね。今回は欠失だけなので、一応相同組換えがきちんと、どのくらいいくかというのは、〇〇〇、何か御存じのことはありますか。

〇〇〇 この組換え系は、自殺遺伝子みたいな形で目的の遺伝子を潰しているのです、一般的によく使われている方法ですので、そういう意味では確実に潰れていると思います。

〇〇〇 プラスミドの断片がどこかに入るとかそういうことは。

〇〇〇 多分、セレクションの過程でその辺の確認はされていると思うのですけれども、

それで、マーカーの入れ方として相同組換えが起こった後に●●●ですね。あと、遺伝子のセットでやると、非常に強力に目的の遺伝子しか生き残れないみたいなやり方なので、それは担保されていると思うのですけれども。

○○○ 今のような形ですと、一応その組換えで正しく行われているだろうということで、あと欠失だけだということを併せますと、今回は表現としてはこの程度の表現でもよろしいですかね。技術的文書が整理されたらまた変わってくるかと思えますけれども、今回はそこがまだ整理されていないということで、このぐらいの表現でもいいということにしたいと思います。

○○○ 今のことで、ちょっと素人的なところで申し訳ないのですけれども、R遺伝子を●●●の遺伝子に対して使っているのだと思うのですけれども、その間でのクロスオーバーで変なふうに抜けてしまったりしていることはないというふうにももちろん考えていてよろしいということでしょうか。

○○○ 私が理解しているのは、R配列は較的短い配列なので、頻繁に相同組換えが起こるわけではないということです。

○○○ 長さ的には●●●bpだったかと書いてありますけれども、ゲノム上に●●●と残っていますね。

○○○ そうですね。

○○○ その間では、距離の問題もあるのだと思いますけれども。

○○○ 一般的に、相同組換えを行う際には、500 bp以上の相同配列をターゲットとして使用します。そのため、R配列はそれよりも十分に短く、頻繁に相同組換えが起こるわけではないと理解しています。ただし、全く起こらないわけではありません。自然界では、ゲノム上に繰り返し配列などの相同領域が存在するため、頻度の大小はあるものの、相同組換えによるゲノム再編が起こる可能性はあります。トリコデルマなどの微生物でも同様の現象が確認されています。

○○○ ありがとうございます。

そのほかはございますでしょうか。

それでは、今回、質問事項としては、○○○、○○○、○○○、○○○と○○○という形で質問事項が上がっていますので、こちらについては申請者に直接お伺いしたいと思いますので、説明者に入室していただくこととしたいと思います。

準備もあるので、ここで5分休憩とさせていただきます。47分からということでお願います。

(休 憩)

○○○ それでは、説明者の方、自己紹介をお願いします。会社名と名前をお願いいたします。

〇〇〇 ノボザイムズジャパンの〇〇〇と申します。よろしく申し上げます。

〇〇〇 ノボザイムズの〇〇〇と申します。よろしく願いいたします。

〇〇〇 それでは、質疑応答に入りたいと思います。

今回それぞれ質問を出された先生方から直接質疑応答したいと思いますので、まず〇〇〇から。

〇〇〇 〇〇〇です。よろしく願いいたします。

今回の資料で欠失遺伝子を●●●挙げていると思うのですが、この遺伝子について、欠失の確認はされていると思うのですが、その表現型についてはどういう検証をされているのでしょうか。表現型は特に見られていないのでしょうか。例えば●●●とか、何かそういうものは見られているのでしょうか。

〇〇〇 最終的にはプロダクティビティーというか、最後に生産性のほうで見ているのですが、我々の標的、今回セルラーゼですけれども、これがメインの酵素として抽出しますが、例えば●●●することによって、●●●セルラーゼのほうの収量が増えるという形で、最終的には収量でスクリーニングをしますので、そういう点でいうと表現型というか、最終的な選抜では確認をしているということです。

〇〇〇 そう考えると、ほかの●●●遺伝子に関してはどういうことを見られているとか、そういうデータはおありになるのでしょうか。

〇〇〇 ●●●に関しては遺伝子組換えをやりやすくするよというものなのですね。実はこれはほかの遺伝子組換えにも使っている宿主菌でして、●●●を欠失することによりまして、相同組換えをやりやすくするために一番最初に●●●を欠失している。●●●に関しては、遺伝子組換え操作をやりやすくするためにやっているというような形です。

〇〇〇 ということは、非相同組換えが起こりにくいというデータとかはお持ちであるということですか。

〇〇〇 それぞれ別のホストで取りやすさを比較しているかという質問だと、それは多分、検証していないのでは。検証しているかしていないかはちょっと分からないですね。

〇〇〇 データ以外のエビデンスベースドで●●●を欠失していますので、そういう点でいえばいろいろなデータがあるのですが、申請用にそういうデータを出しているかというのは、どこまで用意しているかは分からない。

〇〇〇 分からないですね。

〇〇〇 ●●●に関しましては、メカニズム的にも、それを欠失すると遺伝子組換えをやりやすくなるというようなエビデンスはありますので。

〇〇〇 では、そういうことに使われているということですね。分かりました。

〇〇〇 では、〇〇〇、同じところかと思しますので。

〇〇〇 〇〇〇です。よろしく願いいたします。

私からは、今回、御社は●●●遺伝子を欠損させていますが、この●●●遺伝子は●●●

●●●●に関わってくるということで、●●●●遺伝子の欠損によって●●●●ということが期待されると思います。ただ、他方で御社の資料を見ますと、一般的な工業発酵ではパラセルシンの産生は起こらないと書かれています。なぜ今回この●●●●遺伝子を欠損させたのか、その理由を教えてくださいませんか。

○○○ 培養条件で毒素をつくらないというのは確定しているのですが、遺伝子を欠損させることで●●●●というために欠損させております。

○○○ そうすると、●●●●があると何か問題等があるということでしょうか。

○○○ まずいことがあるかどうか。

○○○ ただ、●●●●なので、やはりそういう懸念があるものは欠失しておくほうがよからうということで欠失している。ほかに恐らく、これは*Trichoderma*の宿主なのですが、ほかの*Aspergillus oryzae*とか、*niger*とか、そういうものに関しても、通常では産出が多量に出るというわけではないのですが、遺伝子を丸ごと欠失してその懸念を払拭している、こういう遺伝子操作というのは弊社ではよくやっていることです。

○○○ ちなみに、この遺伝子を欠損させることによって別の二次代謝産物ができるとか、そういうことはないのですよね。あるいは確認されているでしょうか。

○○○ そういうものはないですね。

○○○ ないと思います。

○○○ 基本的に、例えばClassical mutagenesisという伝統的にやるような育種手法でも、いろいろ遺伝子組換えにかかわらずそういう育種手法を用いると遺伝子が欠損するので。ただ、そういう場合に関しましても、全ての代謝産物を確認しているわけではないです。

○○○ 分かりました。ありがとうございます。

○○○ 同じく欠失のところで一番新しい審査資料の5ページにある図2です。こちらに欠失の流れが図に示されているのですが、このターゲット遺伝子と矢印でなっているところなのですが、これは真核生物だと思うので、プロモーターとターミネーターはきっとあると思うのですが、ターゲット遺伝子といった場合は、これはプロモーターからターミネーター全部落としているのか、それとも構造遺伝子だけ落としているのか、どちらですか。

○○○ 全体を落としています。●●●●遺伝子座では、その上流と下流領域を使ってそれぞれ相同組換えで落としているので、丸ごと全部、全体的に落とすという形を取っております。

○○○ プロモーターからターミネーターまで全部落としているという理解で。

○○○ そうです。

○○○ 分かりました。

それでは、食経験で○○○、お願いします。

○○○ ○○○でございます。よろしくお願いします。

申請書の6ページにあります第1-3、添加物製造への利用経験又は食経験に関するという

ところで、この段落の最後で「よって、当該菌種は長年にわたる安全な食経験がある」と記載されているのですけれども、これは菌種自体を食したという経験があるということでしょうか。そういったものに使われているという、それとも添加物製造に利用されてきたということだけなのでしょうか。

〇〇〇 ここでは食品用酵素の生産菌として使っておりますので、菌体そのものを食べているというわけではなく、宿主として使っているということです。

〇〇〇 そうすると、文章を少し変えていただくのがいいのかなと。それで何か安全性に問題があるということでは多分ないと思うのですけれども、ここでは添加物製造への利用経験があるということで、そういう記載でいいのかなと思います。

以上です。

〇〇〇 あと、〇〇〇から。

〇〇〇 〇〇〇ですけれども、食経験のところに利用経験がもちろんあるということなのですけれども、今回は●●●の遺伝子を欠損させることによって、全ての代謝産物を調べているわけではないということだったのですが、このことが引き金になって、何らかしらの毒性物質を出すようになる可能性もあるのではないかなと思うのですが、そのことに関しては何かデータをお持ちでしょうか。

〇〇〇 それに関しましては、*Trichoderma*のセルラーゼに関しましては、既に食品添加物公定書中に基原として載っている種なのです。例えばこれは遺伝子組換えで欠失してやったというところで、それに生じて何か起こるかということなのですけれども、今までそこを見ているということはありません。それは先ほどお話ししたようなClassical mutagenesisとかでも、例えばこれは遺伝子組換えでやっているから安全性検査をやっておりますけれども、例えばClassical mutagenesisで育種した場合、遺伝子というのはかなりいろいろ動いているものの、そこまで今まで安全性に関わるようなことはなかったということでございます。

今回、遺伝子組換えによってかなりピンポイントで欠失しておりますけれども、それによって、これだけ安全に使われてきた宿主ですので、この欠失によって安全性に懸念を生じるようなことが起こるといのはあまり想定していないと考えています。

〇〇〇 ありがとうございます。

もちろんおっしゃることは分かるのですが、昨今の青かびでそんなものを出すはずじゃなかったものが出すといったことも報告としてはあるので、もしかするとそういう可能性もあるのではないのかなというのを考えなければいけないのかなとこちらは思っております。そこに関しては、恐らくなのですが、例えば今回用いている●●●の遺伝子に関しては、そのような可能性はあまり考えられないというようなことを一文入れてもらうとか、そういうこともできますかね。

〇〇〇 使っているものが、いわゆる宿主がまず安全だということで、今までやってきた中で安全性に懸念を生じるものはなかったということを組み合わせて、一般的な結論とい

うのはできるかなと。

〇〇〇 分かりました。では、すみませんが、お願いします。

〇〇〇 そのほかの委員の先生方で何か申請者に聞きたいことがありましたらお願いいたします。

〇〇〇 〇〇〇です。

今の〇〇〇の質問に関連して。26ページに諸外国の認可状況についてデータがあります。今回このJPTR004株に関しては、既に販売されていると書かれていますが、過去●●●で何らかの有害事象が報告されたとか、そういう事例はないのですよね。ないのであれば、それが一つの傍証になると思ひましてお聞きしました。

〇〇〇 過去もヨーロッパのほうでは販売されていますけれども、今のところ安全性に懸念が生じるような事例があったという報告はございません。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 私から最後に1つお聞きしたいのですけれども、QM6aは結構汎用される有名な菌株ですけれども、今後この●●●の遺伝子を落としたものを宿主として新たに遺伝子を入れるみたいなことはお考えになっていますでしょうか。

〇〇〇 可能性がないということではないですね。十分これをいわゆるジェネラルなホストということで、将来的に何か遺伝子を入れるということも想定はされます。具体的にそういうものが今あるかということはありませんけれども、可能性としてはあるかなと思っています。

〇〇〇 分かりました。

そのほかございませんでしょうか。

ないようですので、質問は以上になります。説明者の方、どうもありがとうございました。

(説明者退室)

〇〇〇 それでは、1点、〇〇〇のところの文章を入れるかどうかですけれども。

〇〇〇 確かにもう販売していて問題ないのだったら、そこはいいのかなというところもありますけれども、今回の場合はもうデンマークで売られているということなのですが、今後、もし売られていない場合とかだったらどうするのかとか、そういったことも含めて考えなければいけないのかなと。

〇〇〇 遺伝子操作したことよっての安全性とかを担保するような文章は、今まではあまり入れていなかったですね。

〇〇〇 今までは入れていませんし、これから来るもの、今まで来たものについて全て共通するというか、同じ懸念はあるのかなと思うのですが。

〇〇〇 今回は販売もされているということで、このままの形で、申請者にはああ言いましたけれども、特に変えなくてもいいかなということでお願いします。

それでは、以上の回答を踏まえた上で、欠失だけということもありますので、安全性上

のリスクはないのではないかと思うのですけれども、その点について皆様の御同意を得られるかどうか、賛同いただけますでしょうか。御意思のほうをお願いいたします。

(専門委員同意)

〇〇〇 よろしいですかね。

それでは、本件については、特に安全上問題はないということですので、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 ありがとうございます。

評価書案の説明をいたしますので、右上に資料と記載されました評価書案の束をお手元に御準備ください。「食品健康影響評価に関する資料」でございます。こちらの39ページからが本品目の評価書案になってございます。

44ページ目をお開きください。先ほど〇〇〇から植物の指針改定は初めてなので項目名を読み上げさせていただいていたのですけれども、添加物も初めてですので、項目名を併せて読み上げながら進めさせていただきます。

「Ⅰ. 評価対象添加物の概要」でございます。本添加物は、*Trichoderma reesei* QM6a株を宿主として、その染色体上の●●●の遺伝子の欠失をもたらすベクターを導入することにより作製されたJPTR004株を利用して生産されたセルラーゼでございます。本添加物は、セルロースを加水分解する酵素であり、食品分野において、野菜、果物などの植物素材を搾汁する工程で添加され、その工程から得られるエキスまたはジュース等の収量を向上する目的で用いられます。

続いて、37行目から「Ⅱ. 食品健康影響評価」でございます。

まず、「第1. 食品健康影響評価において比較対象として用いる添加物、宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び遺伝子組換え体との相違に関する事項」の「1. 従来の添加物の性質、用途等に関する事項」について、(1) 名称、基原及び有効成分でございますが、名称はセルラーゼ、基原は*Trichoderma reesei*でございます。

(2) の製造方法は、培養、ろ過等の工程を経て製造され、生産菌は、除菌ろ過により除去されます。

(3) の用途及び使用形態ですが、セルラーゼは、セルロースを加水分解する酵素でございます。食品分野において、野菜、果物などの植物素材を搾汁する工程で添加され、その工程から得られるエキスまたはジュース等の収量を向上する目的で用いられます。

植物素材を搾汁する工程で添加された既存のセルラーゼは、殺菌またはろ過工程により失活または除去されます。

(4) の摂取量ですが、全ての「果汁・果汁飲料」及び「野菜ジュース」の製造に使用されており、「果汁・果汁飲料」及び「野菜ジュース」が100%果物及び野菜で構成され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は2.29 µg TOS/kg 体重/日でございます。

続きまして、45ページの62行目からの記載になりますが、「2. 宿主に関する事項」でございませぬ。

(1) の宿主の種名（学名）、株名等及び由来は、*T. reesei* QM6a株、(2) の宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する事項、(3) 宿主の構成成分等に関する事項、(4) 寄生性及び定着性に関する事項、(5) ヒトの健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項、(6) 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項は記載のとおりでございませぬ。

46ページに移りまして、98行目から「3. 挿入DNAに関する事項」でございませぬ。

(1) 挿入DNAの供与体の種名、株名又は系統名等及び由来ですが、JPTR004株には発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、JPTR004株は*T. reesei* QM6a株の染色体上の●●●の遺伝子を、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させることによって作製されました。その際に、欠失導入用ベクター由来のR配列の一部が染色体上に残存し、R配列の供与体は*Fusarium venenatum* A3/5株であるとしております。

(2) の挿入DNAの性質及び導入方法ですが、*T. reesei* QM6a株には発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておられません。欠失導入用ベクターを用いた部位特異的な相同組換えにより、宿主である*T. reesei* QM6a株の●●●の遺伝子が欠失してございませぬ。これら各遺伝子を標的とする欠失導入用ベクターが*T. reesei* QM6a株に導入されることにより、ベクター内にある各標的遺伝子座の相同組換えにより、標的遺伝子座に特定の遺伝子配列及びR配列断片が挿入され、形質転換体が選択されました。続いてR配列断片による相同組換えにより特定の遺伝子配列及びR配列断片の一部がループアウトにより欠失し、形質転換体が選択され、形質転換体はシーケンス解析により適切な遺伝子座の適切なDNAが欠失していることが確認されました。

119行目から「4. 遺伝子組換え添加物の性質、用途等に関する事項」でございませぬ。

(1) 製品名及び有効成分ですが、製品名はJPTR004株由来のセルラーゼ、有効成分はセルラーゼでございませぬ。

(2) 製造方法は、JPTR004株を生産菌として、培養、ろ過等の工程を経て製造され、生産菌は、除菌ろ過により分離・除去されます。

(3) の用途及び使用形態と(4) の推定摂取量、(5) の有効成分の性質及び従来の添加物との比較は、既存のセルラーゼと同様でございませぬ。

47ページの146行目から「5. 食品健康影響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遺伝子組換え体と宿主等の相違点に関する事項」でございませぬ。

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点は、生産菌が異なることとございませぬ。

(2) 組換え体と宿主との相違点は、宿主の●●●の遺伝子が欠失している点とございませぬ。

以上から、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主

があると判断してございます。

続きまして、159行目から「第2. 遺伝子導入に用いる塩基配列（挿入DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築）に関する事項」でございませぬ。

「1. ベクターの名称及び由来に関する事項」は、遺伝子導入用ベクターは用いられなかつたとしてございませぬ。遺伝子欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより、*T. reesei* QM6a株の●●●の遺伝子をそれぞれ欠失させておりませぬ。また、これらの欠失導入用ベクターはpUC19を基に構築されてございませぬ。

48ページに移りまして、166行目、「2. ベクターの性質に関する事項」についてでございませぬ。

(1) ベクターの塩基数及びその塩基配列を示す事項、(2) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項、(3) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項、(4) 伝達性に関する事項、(5) 宿主依存性に関する事項は記載のとおりでございませぬ。

「3. 挿入DNAの供与体に関する事項」ですが、導入された遺伝子はございませぬ。JPTR004株の染色体に挿入し残存した異種DNA断片は、*F. venenatum* A3/5株に由来するR配列でございませぬ。*F. venenatum* A3/5株は、20年以上にわたり、海外で食品用マイコプロテインの生産に使用されていまして、安全なタンパク質発現系と考えられており、安全性に懸念を生じる報告等はございませぬ。*F. venenatum*は国立感染症研究所の「病原体等安全管理規程「病原体等のBSL分類等」」においてバイオセーフティレベル2及び3の実験室や施設を要する病原体等に分類されておらず、ヒトまたは動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられていまして、病原体等のリスク分類のリスク群1に分類されませぬ。

196行目からの「4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項」でございませぬが、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列はございませぬ。

200行目からの「5. 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の発現に関する領域に関する事項」の(1) プロモーターに関する事項と(2) ターミネーターに関する事項ですが、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、ターミネーターの機能を有する配列は挿入されてございませぬ。

49ページに移りまして、210行目から(3) そのほかの事項として、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、導入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は挿入されていないが、部位特異的な組換えに関連するR配列が挿入され残存しました。R配列は、*F. venenatum* A3/5株由来のノンコーディング配列であり、特定の遺伝子配列をループアウトさせるために挿入した繰り返し配列であるとしてございませぬ。

続きまして、217行目から記載の「6. ベクターへの挿入DNAの組込方法等に関する事項」の(1) 挿入DNAのクローニング又は合成方法等に関する事項と、(2) 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せぬが、記載内容を先生方に御相談させていただきたいと考えておりませぬ。

今回の審議品目は発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、これまでの評価書では最終的に欠失したベクターについてはこの項目で触れておりませんでした。従前どおり最終的に欠失したベクターについては記載せず、今、黒文字で記載している箇所をみの記載とするか、赤文字で表記しておりますような欠失導入用ベクターの内容についても併せて記載するか、そしてまた、その記載内容をどのようにすべきかも御相談させていただきたく存じます。

なお、(1)の欠失導入用ベクターのクローニング方法については、申請要旨に記載がなかったため、事務局より申請者に事前に確認して追記した事項になります。

続いて、229行目から記載の「7. 構築されたコンストラクトに関する事項」の(1)塩基数及び塩基配列並びに制限酵素により切断地図に関する事項は記載のとおりでございます。

(2)の宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域がコンストラクト上で明らかであることと、(3)導入しようとするコンストラクトは、目的外の遺伝子が混入しないよう純化されていることについても先生方に御相談させていただきたい箇所となります。こちら最終的に欠失したベクターについては触れないという従前の記載方法に倣いまして、(2)と(3)の前半に黒文字で記載しております「JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、遺伝子導入用ベクターも用いられなかった」という箇所をみの記載とするか、後半の赤文字で表記しておりますような欠失導入用ベクターの内容についても併せて記載するか、そしてまた、その記載内容はどのようにすべきかも御相談させていただきたく存じます。

続いて、50ページの252行目から「第3. 遺伝子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」は記載のとおりでございます。

「2. 遺伝子導入に関する事項」の(1)コピー数及び挿入近傍配列に関する事項は、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、遺伝子導入用ベクターも用いられませんでした。JPTR004株では●●●の遺伝子の各遺伝子座で標的の遺伝子配列が欠失していることが確認され、これらの遺伝子座に欠失導入用ベクター由来のR配列が残存していることが確認されてございます。

267行目からの(2)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でございますが、JPTR004株には、発現を目的とした特定の遺伝子配列は挿入されておらず、遺伝子導入用ベクターも用いられておりません。特定の遺伝子配列が挿入されていないことは欠失操作を行った●●●の遺伝子座のシーケンス解析により確認されてございます。宿主ゲノムへの遺伝子欠失導入用ベクター内DNA断片の挿入により生じるORFの有無を調べる目的で、シーケンス解析が行われました。

JPTR004株の●●●の標的遺伝子座におけるR配列異種遺伝子断片及びその境界領域において、6つの読み枠で、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の検索が行われました。その結果、●●●の遺伝子座で合計150個のORFが検出されました。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するため、アレルゲ

ンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、1つのORFは、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として、ケナガコナダニが有する既知のアレルゲンと相同性を示しましたが、当該ORFでアレルゲンと相同性を示した箇所は宿主内在性の塩基配列部分であり、遺伝子導入により新たに生じたものではなかったとさせていただきます。

また、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として、検出された2つのORFについて、それぞれセイヨウナシ及びコムギが有する既知のアレルゲンとの相同性が認められました。しかしながら、このうち1つのORFは宿主内在性の塩基配列部分で検出されたORFであり、遺伝子欠失導入により新たに生じたものではございませんでした。もう一つのORFはセイヨウナシが有する既知のアレルゲン（Pyr c 5.0101）と連続する8アミノ酸配列が1つ一致しましたが、80アミノ酸残基で35%以上の一致する条件ではPyr c 5.0101と相同性を示しませんでした。さらに、Pyr c 5.0101と一致した8アミノ酸配列を、食物アレルギーに関する安全性研究のためのアレルゲンデータベースで登録されているアレルゲンエピトープと比較したところ、一致するアレルゲンエピトープは認められませんでした。これらのことから、このORFの食物アレルギー誘発性についての懸念は低いものと考えられたとさせていただきます。

さらに、上記のORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を調べる目的で、NCBIデータベースを用いて、 $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索が行われました。その結果、●●●の遺伝子座のいずれにおいても、新たに生じるORFの中で、データベース中の既知のタンパク質と相同性を示したORFは認められなかったとさせていただきます。

続いて、302行目、「3. 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の安全性に関する事項」は、JPTR004株に抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことがシーケンス解析により確認されたとさせていただきます。

306行目からは「4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合には、その遺伝子産物（抗生物質代謝酵素等）についても評価すること。）」でさせていただきます。

(1) の導入遺伝子の供与体（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の供与体を含む。）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む。以下同じ。）に関する知見が明らかであることは、*F. venenatum*がアレルギー誘発性を示すという報告はないとさせていただきます。

(2) の遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかであることは、JPTR004株では欠失導入用ベクターの導入により宿主の●●●の遺伝子が欠失しておりますが、それら各遺伝子座において、欠失導入用ベクター由来のR配列が残存してございますが、タンパク質としては発現しないとさせていただきます。

52ページに移りまして、321行目の(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に関する感受性に関する事項と(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテ

ン過敏性腸疾患に関与するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。)との構造相同性に関する事項でございますが、JPTR004株には導入用遺伝子はないため、本事項は該当しないとしております。

以上のことから、R配列の残存により、アレルギーを誘発する可能性は低いと考えられたとしてございます。

続いて、332行目からの「第4. 遺伝子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」は、それぞれ記載のとおりでございます。

343行目から「第5. 遺伝子組換え添加物に関する事項」でございます。

「1. 諸外国における認可、食用等に関する事項」でございますが、フランス及びデンマークにおいて、食品用加工助剤として承認を受けており、米国ではGRASの自己認証済みであるとしてございます。

「2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項」は、JPTR004株由来のセルラーゼ製品中に組換えDNAの残存がないことがPCR分析により確認されたとしてございます。

「3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」、「4. 精製方法及びその効果に関する事項」、「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」は、記載のとおりでございます。

53ページの370行目、「第6. 第1から第5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」につきましては、第1から第5までの事項により安全性の知見は得られているとしてございます。

評価書案の説明は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案について御意見、コメントを賜りたいと思います。細かい字句の修正については、後ほど事務局にお寄せください。

それでは、と言いながら細かいのですけれども、92行目のパラセシンはパラセルシンですかね。

〇〇〇 パラセルシンの誤記でございます。訂正させていただきます。

〇〇〇 それから、116行目から117行目の「形質転換体はシーケンス解析により適切な遺伝子座の適切なDNAが欠失している」というのはちょっと変なので、シーケンス解析により●●●の遺伝子座においてDNAが欠失していることが確認されたぐらいのほうがよろしいのではないかと思うのですが。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 先ほど事務局の説明がありましたけれども、220行目と226行目の「ベクターへの挿入DNAの組込方法等に関する事項」のところで、欠失用ベクターについて記載するかど

うかということです。従来は欠失用のベクター等については結構数がいっぱい出てくるときもありまして、基本的には導入遺伝子のみの記載で来ていたのですが、ここは書きますかということなのですが、どうでしょうか。何か御意見等ありましたらお願いします。

〇〇〇 こちらの欠失ベクターのことにしても、pUC19の内容は載っているのですが、●●●のことは何もこの案の中で出てきていないので、最終産物としては抜けているとしても、情報としては記載しておいたほうがいいのかと私は思うのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇 ●●●。

〇〇〇 ●●●で出ると思うのですが。

〇〇〇 ●●●を入れていました。正確に覚えていないのですが、*hph*だからハイグロマイシンですね。

〇〇〇 机上資料の17ページ目に記載されているベクターマップのところだと●●●と書いているのですが、●●●ですか。

〇〇〇 発現カセットは●●●。

〇〇〇 そうか。中に組み込まれているのは●●●。

〇〇〇 そうですね。●●●も入っていますね。ただ、外骨格に相当するのかもしれないです。

それは薬剤耐性のところになるので、302行目ですか。「3. 遺伝子組換え体の選抜に関する遺伝子の安全性に関する事項」で、そこに●●●と●●●を記載した上で、ただし、導入されていないという感じですかね。

〇〇〇 先生、すみません。申請要旨の薬剤耐性に関する事項のところでも、申請要旨上で●●●については文書では説明がないので、そこもきちんと修正させた上でということでしょうか。

〇〇〇 申請要旨でいくと何ページになりますか。

〇〇〇 例えば13ページ、第3-2- (4) 薬剤耐性に関する事項というのが、これは大もとが第3のベクターに関する事項の中の薬剤耐性に関する事項になるので。

〇〇〇 ここはベクターなのでよね。

〇〇〇 そうですね。なので、ここにも書かせる。

〇〇〇 いや、ベクターなので、そこに入れるのはちょっとおかしくなってしまうと思うので。

そうか。申請者は古いタイプのもので書かれていて、こちらが新しいタイプになっているからずれてしまうのね。

〇〇〇 そうです。ただ、現時点では新しい指針に基づいて評価するので、記載が足りない部分は新しく項目を足してでも書いていただくということは可能かと考えています。

〇〇〇 これはアンピシリンと書いてあるけれども、外骨格にあるのは●●●。

〇〇〇 pUC19ですから、pUCはアンピシリンなので、そこにさらに●●●を入れているのですね。操作上の関係で入ってきてしまっていると思うのですが、かなりpUCをそぎ落としているのかもしれないです。

〇〇〇 そこでアンピシリンを書くのだったら、●●●が書いてあってもいいのかなという気もするし、外骨格を書くのかどうかというのが1つと、あと欠損の場合を書くのかというのを、今後どうやっていくかというのを決めなければいけない。

〇〇〇 そうなのです。取りあえず評価書のほうの302行目は、組換え体の選抜なので、多分●●●を組換え体の選抜に使っていると思うので。使っているのだよね。

〇〇〇 ちょっとそれが読めないのですけれども、だから、やはりこの●●●を何のために入れたのかというのが分からないですね。相同組換えを起こすまで●●●を入れているのですかね。

〇〇〇 相同組換えを起こすためのプラスミドをつくるときに。

〇〇〇 多分その選抜で入れているのだと思います。途中のプラスミドをつくるときに●●●を使ったのだと思います。

〇〇〇 座長、すみません。5ページ目の図2のところなのですが、●●●により選択するために●●●遺伝子の発現によるという記載がございますが、こちらではないでしょうか。

〇〇〇 そうなのだよ。だから。●●●はやはりここに書いたほうがいいのですよね。欠失用ベクターを入れた組換え体の選抜には●●●を使って、最終的な株には残っていませんという形をこの評価書のほうの51ページの302行目のところには書いたほうがいいということ。

ただ、申請者の説明書のほうはこのままでいいのではないですか。

〇〇〇 そちらの修正は修正させていただこうと思います。

ちなみに、先ほどのお話の●●●、どうしましょうか。

〇〇〇 欠失用コンストラクトを書くかどうかですよ。

〇〇〇 前例をあまりつくりたくないということでしたら、導入遺伝子に関する事項のところ●●●の遺伝子も入っているとかというようなことを記載だけしておけばいいのかなと思うのですが。

〇〇〇 何行目になりますか。

〇〇〇 50ページの258行目の(1)のところですよ。

〇〇〇 どうするかな。

〇〇〇 〇〇〇、必要であれば、申請者のほうに●●●を入れている理由等を確認することもできますが。

〇〇〇 それを確認するのは、多分途中のプラスミドをつくる時に使ったのだと思います。僕もよく実験で、アンピシリンだけでやっていると混ざってしまうので、よくコロニーを間違えてしまうのですよ。なので、アンピシリンと●●●を両方使うというのはしょ

っちゅうやるのですけれども、多分その目的で使っているのだと思うので、それは聞くだけ聞いてもらってもいいのですが。

〇〇〇 組換えには多分関与していない。

〇〇〇 組換えには関与していないのですけれども、最終的なプラスミドをつくる途中のプラスミドがあって、pUC19にそれをぽんと入れているのだと思うのです。恐らくそれが入ってきているのだと思うのです。

欠失はすごく作業が多いコンストラクトもあるので、ここで欠失用ベクターを書いてしまうと、この先の評価書に何十個と出てくるケースが想定されるので、ここはなしにしましょうか。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 ちょっと変な感じがしますけれども。

あと、283行目ですけれども、「遺伝子導入により新たに生じたもの」ではなくて、欠失によりにしてください。

〇〇〇 先生、すみません。ちょっと戻るのですけれども、302行目の「3. 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の安全性に関する事項」のところ●●●を使って組換え株には残っていないということは、ここには記載するということがよろしいでしょうか。確認のためなのですけれども。

〇〇〇 そうですね。欠失作業のために●●●を使ったけれども、●●●は残っていないというふうにしてほしいです。

〇〇〇〇〇〇 そのほか委員の先生方から何か気づいた点がありましたらお願いいたします。

〇〇〇 よろしいでしょうか。50ページの脚注なのですけれども、ネブラスカ大学アレルゲンデータベースで、こちらはFARRPでつくっているのですが、これを普通はAllergen Onlineと言っているので、Allergen Onlineのversion 21というほうがいいのかと思うのですけれども。一般的かなと。

〇〇〇 了解しました。そのように修正いたします。

〇〇〇 そのほかございますでしょうか。

それでは、ちょっと修正箇所もありますし、これも初めての指針の下で、しかも、ややこしいので、修正が終わったものを最終版として委員の先生方にもう一回お渡しして、確認した上で食品安全委員会に報告するということがよろしいでしょうか。

〇〇〇 了解いたしました。

〇〇〇 それでは、今回は2件とも最終的な評価書についてまた委員の先生方にお送りしたいと思いますので、確認のほどよろしくお願いいたします。

それでは、その形で、確認が終わりましたら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。

それでは、非常に長く時間がかかりまして申し訳ありませんでした。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、事務局から何かありますでしょうか。

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いたしました。

以上をもちまして、第252回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。長い御議論をどうもありがとうございました。