

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## 第 60 回 会 合 議 事 録

1. 日時 平成 20 年 3 月 17 日 (月) 15:35～18:30

2. 場所 食品安全委員会中会議室

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

・チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統 (食品・飼料)

・パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統 (食品)

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、五十君専門委員、石見専門委員、宇理須専門委員、小関専門委員、鎌田専門委員、橘田専門委員、澁谷専門委員、手島専門委員、丹生谷専門委員、飯専門委員、山川専門委員、山崎専門委員、和久井専門委員、渡邊専門委員

(食品安全委員会委員)

廣瀬委員、本間委員

(事務局)

日野事務局次長、北條評価課長、猿田評価調整官、鶴身課長補佐、舟渡係員

5. 配布資料

資料 1 食品健康影響評価に関する資料

・パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統

資料 2 専門委員からのコメント

・パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統

参考資料 安全性評価に係る指摘事項について

- ・パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統

## 6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、引き続きまして、第 60 回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催いたします。

本調査会は非公開で行います。

本日の議題であります、新規審査品目であります、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統（食品・飼料）及び継続審査品目であります、パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統（食品）についての安全性の審査です。

それでは、お手元の資料の確認をいたしたいと思しますので、事務局からお願いします。

○猿田評価調整官 議事次第に基づきまして、資料の確認をさせていただきます。

配付資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿。

資料 1 「食品健康影響評価に関する資料」。

資料 2 「専門委員からのコメント」。

参考資料「安全性評価に係る指摘事項について」となっております。

なお、これら以外の資料につきましては、紙のファイルにとじまして、机の上に置かせていただいております。本ファイルにつきましては、調査会終了後回収させていただき、また次回に配付させていただきます。不足等がございましたら、事務局までお知らせください。

お手元の資料のほかに、委員の皆様には、本日、御審査いただく予定の品目について、申請者作成の資料等を事前に送付させていただいております。なお、本日、審査を行う品目につきましては「食品安全委員会の公開について」に基づきまして、座長に資料の内容を確認していただき、企業の知的財産を指摘するおそれがある箇所が含まれているということで、非公開で審査をさせていただきます。

また、会議は非公開となりますが、国民への説明責任、透明性の確保の観点から開催予定日等は公開し、会議が非公開であることを明示してございまして、今後、情報提供として議事録を作成し、企業の知的財産を侵害するおそれのある箇所を削除した上で公開させていただきます。

また、審議に用いました各種試験結果の概要、それから評価の結果をまとめた評価書（案）というものを作成しまして、食品安全委員会へ報告して公開させていただきます。

事務局としては、以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、議題1のチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統の審査に入りたいと思います。

本品目は新規でありまして、食品と飼料の両方の依頼が来ておりますので、まず、食品としての安全性の審査を行い、食品としての安全性が確認されましたら、引き続きまして飼料としての安全性の審査を行いたいと思います。

本日は安全性を評価する上で、申請者から提出されております審査資料の確認及び安全性の審査上で追加するべき事項の検討を中心に行いたいと思います。

それでは、事務局の方から御説明をお願いいたします。

○鶴身課長補佐 それでは、グレーのファイルです。ID159と打っております「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統の安全性評価に関する概説書」に基づいて御説明をさせていただきます。

概要書の1ページ、まず第1として、宿主の性質、組換え体との相違に関する事項です。

「1 宿主及び導入DNAに関する事項」として、宿主は、イネ科トウモロコシ、トウモロコシであり、デント種に属すると、DNAの供与体の種名ですが、グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* AB88株の *vip3Aa1* 遺伝子に由来する改変型の *vip3A* 遺伝子、以下、*mvip3A* 遺伝子と記しておりますが、これと大腸菌のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子、以下、*pmi* 遺伝子と記されておりますが、この2つを供与しております。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」ですが、*mvip3A* 遺伝子は、*vip3Aa1* 遺伝子の塩基配列に基づいて、人工合成をした改変遺伝子であって、チョウ目害虫に対して高い殺虫活性を示す mVip3A タンパク質をコードしている。

一方、*pmi* 遺伝子の方は、*pmi* 遺伝子によって産生される PMI タンパク質は、マンノース 6-リン酸のフルクトース 6-リン酸への異性化を触媒する酵素タンパク質であり、選抜マーカーとして用いられている。

T-DNA 領域に、これらの *mvip3A* 遺伝子と *pmi* 遺伝子の発現カセットを組み込んだ発現ベクター pNOV1300 を構築して、アグロバクテリウム法によって導入したとされております。

「2 宿主の食経験に関する事項」ですが、記載のとおりとなっております。

2ページ、3番の宿主の構成成分ですが、主要栄養素、(2)に毒性物質・栄養阻害物質と記されております。

4番の利用方法及びその相違点ですが「(1) 収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法」「(2) 摂取(可食)部位」「(3) 摂取量」「(4) 調理及び加工方法」については、従来品と

相違はないとされております。

5、比較対照に追加して用いる場合の根拠ですが、比較対照としての宿主であるトウモロコシのみを比較対照とした。

6、安全性評価において検討が必要とされる相違点については、mVip3A タンパク質、それから PMI タンパク質を産生していることが相違点であるとされております。

第2、組換え体の利用目的、利用方法になりますが、2段落目になりますが、mVip3A タンパク質は、ヨーロッパアンコーンボーラーやコーンルートワーム以外のチョウ目害虫に対して、高い殺虫活性を示すとされております。

4 ページの上に行きまして、食品としての利用目的や利用方法に関しては、従来のトウモロコシとの相違はない。

「第3 宿主に関する事項」として、1番、分類学上の位置づけですが、イネ科、トウモロコシ、トウモロコシであって、デント種に属する。

2番、遺伝的祖先、育種開発の経緯は記載のとおりとなっております。

3番、有害生理活性物質の生産に関する事項ですが、トウモロコシにおいて、有害と考えられるレベルの物質の産生は知られていない。

4番、アレルギー誘発性に関してですが、非常にトウモロコシは大規模に消費されている。コーデックスにおいても、特別なアレルギーの表示を付けることの要求はしていないと記されています。

5 ページ、トウモロコシのアレルギー誘発性に関しては、複数の報告例がそこに記載されております。

5番、病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項。トウモロコシは、ウイルスや細菌、糸状菌による各種病害が発生する。しかし、日常的に消費をしていて、ヒトの健康が害されることはないとされております。

6番、安全な摂取に関する事項として、トウモロコシは古くから食品として利用された歴史がある。

6 ページの7番、近縁の植物種にまいりまして、近縁種はブタモロコシとトリブサカム属であるが、食用にされることはなく、有害生理活性物質の報告はないとされております。

7 ページ「第4 ベクターに関する事項」の1番の名称、由来ですが、MIR162 トウモロコシの作出に用いた発現ベクターpNOV1300の構築には、右側のページの図1にありますように、ベクターpSB12が用いられている。

「2 性質に関する事項」の(1)、ベクターpSB12の塩基数は6,330bpで、その塩基

配列はすべて明らかにされている。

(2) の制限酵素による切断地図は図 1 のとおりです。

(3)、既知の有害塩基配列を含まないことについては、構成 DNA 及び塩基配列は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まないとされており。

(4)、ベクター中に、薬剤耐性遺伝子が含まれている場合ということですが、ベクター pSB12 は、その T-DNA 領域の外骨格領域に、選抜・維持のための *E. coli*Tn7 由来の *spec* が含まれている。*spec* によってコードされるストレプトマイシンアデニリルトランスフェラーゼによって、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性が付与される。

(5)、伝達性に関する事項ですが、図 1 に示すように pSB12 には伝達性に関する、*E. coli* の pUC19 由来の *ColE1ori* 及びバクテリオファージラムダ由来の *cos* が含まれているとされており。

9 ページ「第 5 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項」ですが「1 挿入 DNA の供与体に関する事項」として「① *mvip3A* 遺伝子」ですが、土壤中に遍在するグラム陽性細菌である *B. t.* の *vip3Aa1* 遺伝子由来で人工合成をした改変遺伝子である。

「② *pmi* 遺伝子」ですが、マンノースリン酸イソメラーゼを産生する *E. coli*K-12 株由来の *manA* 遺伝子で選抜マーカーとして用いられている。

「(2) 安全性に関する事項」で「① *mvipA* 遺伝子」ですが、供与体である *B. t.* に対するヒトの食経験というものはないが、微生物農薬の基材として長期に利用されており、ヒトや動物に対する病原性は報告されていないとされており。

「② *pmi* 遺伝子」ですが、供与体である *E. coli* は、自然界やヒトの消化器官に広く存在し、*E. coli*K-12 株による病害は報告されていない。また、K-12 株に毒性を持つ遺伝子は見出されていない。更に、ヒト及び動物の腸内でコロニーを形成できないということが示されているとされており。

10 ページ、2 番、挿入 DNA 又は遺伝子、遺伝子産物の性質ですが、(1) クローニングもしくは合成に関する事項。

「① *mvip3A* 遺伝子」ですが、*vip3Aa1* 遺伝子は、789 個のアミノ酸からなる約 89kDa の *Vip3Aa1* タンパク質をコードしている。

*mvip3A* 遺伝子は、この *vip3Aa1* 遺伝子の塩基配列に基づいて、GC 含量を高め、宿主であるトウモロコシでの発現に最適となる塩基配列に人工合成をした改変遺伝子であるという

ことです。

そこから下が少しややこしいんですが、当初データベースに登録された Vip3Aa1 タンパク質のアミノ酸配列というのは、実際に *B. t.* で発現している Vip3Aa1 タンパク質のアミノ酸配列と異なり、284 番目のアミノ酸がリジンでなくグルタミンとなっていた。そのため、この配列に基づいて、人工合成をした遺伝子は、同じように 284 番目のアミノ酸がリジンではなく、グルタミンをコードするものであった。

このタンパク質を Vip3Aa19 タンパクとして新たに登録した。なお、Vip3Aa19 タンパク質及び Vip3Aa19 タンパク質をコードする遺伝子である *vip3Aa19* 遺伝子をそれぞれ mVip3A タンパク質、*mvip3A* 遺伝子としたということでございます。

なお、作出された MIR162 トウモロコシにおける挿入遺伝子の塩基配列を決定した結果、ベクターと比べて、2 か所の塩基配列の置換が確認されています。それにより、129 番目のメチオニンがイソロイシンに置換されていること。

もう一つの塩基配列の置換では、アミノ酸の置換は生じていなかったとされております。このため、MIR162 トウモロコシにおいて発現しているタンパク質を Vip3Aa20 タンパク質として登録をしたということでございます。

その下の表 1 が、それぞれの対応する表となっております。

12 ページにまいりまして「② *pmi* 遺伝子」ですが、*E. coli*K-12 株からマンノースリン酸イソメラーゼを産生する *manA* 遺伝子であるということですので。

(2) の塩基数及び塩基配列、切断地図ですが、*mvip3A* 遺伝子の塩基数は 2,370bp で、*pmi* 遺伝子の塩基数は 1,176bp である。両者の塩基配列は明らかにされているということです。

(3) の挿入遺伝子の機能に関する事項ですが、①の *mvip3A* 遺伝子ですが、Vip3A タンパク質というのは、*B. t.* において見出された殺虫活性タンパク質である。

よく知られている Cry タンパク質が芽胞形成期に産生される細胞内に存在する結晶のタンパク質であるのに対して、Vip3A タンパク質は *B. t.* の芽胞形成期及び栄養成長期に産生され、更に細胞外に分泌される可溶性のタンパク質であるということで、表 2 に Cry との相違点が記されております。

一番下のところになりますが、Vip3A タンパク質がチョウ目昆虫の幼虫に摂取されて消化されると、特定の大きさのコアタンパク質を生じ、このコアタンパク質が腸管上皮細胞の特異的受容体に結合して、イオンチャンネルが形成され、その結果、消化器官が損傷を受け、殺虫活性を発揮することが示されている。

次のページ、このように Vip3A タンパク質の作用機作は、Cry タンパク質と類似をしていますが、同様にチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry1Ab タンパク質とは結合する受容体が異なることから、殺虫活性スペクトラムも異なるとされております。

その下の表 3 に害虫の殺虫活性の比較が記されております。

「②mVip3A タンパク質の既知の毒性タンパク質との構造相同性」ですが、mVip3A タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性について、E value を用いて評価をしたとされております。

14 ページの 2 段落目になりますが、その結果、E value が  $8 \times 10^{-8}$  以下であったタンパク質は 34 件で、その内訳はすべて *B. t.* 由来の栄養成長期に産生されるタンパク質である。それ以外の毒素、タンパク質は検索されなかったとされております。

「③ *pmi* 遺伝子の機能」ですが、391 個のアミノ酸から成る PMI タンパク質であって、選抜マーカーとして用いられております。

植物細胞は、生育する上で、マンノースを炭素源として利用することはできないが、*pmi* 遺伝子が導入された細胞は、マンノースを生育に利用可能なフルクトース 6-リン酸に変換して成長することができるということで、マンノースを組織培地に添加することによって、選抜が可能となるということでございます。

16 ページにまいりまして、表 4 に MIR162 トウモロコシで産生される PMI と、ほかの生物種由来の PMI タンパク質のアミノ酸配列比較が掲載されております。

「④PMI タンパク質の既知毒性タンパク質との構造相同性」ですが、mVip3A タンパク質と同様に、E value を用いて評価をしております。

E value が 0.51 以下の登録タンパク質は 332 件であって、そのうち 271 件は他の既知あるいは推定マンノースリン酸イソメラーゼであって、60 件は仮説タンパク質あるいは非命名タンパク質、残り 1 件は *Aspergillus terreus* 由来の AGME であったということで、AGME は、既知毒素としては知られていない。これらのことから、PMI タンパク質と有意な構造相同性を持つ、既知あるいは推定の毒素は検索されなかったということでございます。

17 ページ「(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項」です。発現ベクター pNOV1300 の T-DNA 領域の外骨格領域に、選抜維持のために、*spec* が組み込まれている。

しかし、作出された MIR162 トウモロコシには、この外骨格領域は存在しないことが確認されているということでございます。

下の方にまいりまして「3 挿入遺伝子薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」ですが「(1) プロモーターに関する事項」として、以下のプロモーターが使用され

ております。

「(2) ターミネーターに関する事項」は、以下のとおりとなっております。

18 ページの(3)、その他の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合の由来、性質ですが、トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9配列で *mvip3A* 遺伝子の発現量を高めるために、こちらにある iPEPC9 が用いられております。

発現ベクター pNOV1300 の T-DNA 領域は、プロモーター、*mvip3A* 遺伝子、iPEPC9、35S ターミネーターから成るカセット、それからプロモーター、*pmi* 遺伝子、NOS ターミネーターから成る *pmi* 遺伝子のカセットで構成されているということです。

4 番、ベクターへの挿入 DNA の組込方法ですが、発現ベクターは pSB12 を基に以下の手順で作成したとされております。

5 番、構築されたベクターに関する事項ですが、構築されたベクターは、図 4 に示されております模式図のとおりであって、表 5 に発現ベクターの T-DNA 領域の構成要素が示されております。それが、19 ページと 20 ページになります。

20 ページの下の(2) 番ですが、オープンリーディングフレームに関してですが、発現ベクター pNOV1300 の塩基配列はすべて明らかにされており、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームは含まれていないとされております。

21 ページ、(3) の導入方法ですが、アグロバクテリウム法が用いられ、意図する挿入領域は、右側境界から左側境界までの T-DNA 領域である。

(4)、目的外の遺伝子の混入がないことについてですが、発現ベクターは、外骨格領域にマーカー遺伝子として *spec* を有しており、細菌におけるベクター選抜及び増殖を通じて純化されているということです。

6 番、宿主への導入方法ですが、アグロバクテリウム法を用い、発現ベクターをトウモロコシの未熟胚に接種し、その後、マンノースを添加した組織培養培地で形質転換体を選抜して再生個体を得た。残存するアグロバクテリウムの除菌のために、抗生物質を添加しております。

得られた再生個体について、挿入遺伝子の存在を確認した後、一般的なトウモロコシの育種プロセスに従って作出をしたということでございます。

なお MIR162 トウモロコシとして商品化を予定しているものは、右側の 22 ページの表の黒いところで囲ってあるところですが、これらの世代以降のものであって、これらの世代について、サザンブロット分析を用いて安定性、同一性を確認しているということになり



ます。

23 ページ、組換え体に関することですが、(1) のコピー数、挿入近傍配列に関してですが、MIR162 における挿入遺伝子解析がサザンブロット分析によって行なわれております。

この結果、*mvip3A* 遺伝子と *pmi* 遺伝子から成る発現ベクターの完全な T-DNA 領域 1 コピーであって、トウモロコシゲノムの 1 か所に存在し、外骨格領域は存在しないということが確認されております。

具体的に「①コピー数」ですが、葉からのゲノム DNA を抽出して、トーマスらの方法によってサザンブロットが行なわれております。

24 ページの一番最後の段落になりますが、3 種類の制限酵素で処理をしたトウモロコシゲノム DNA と発現ベクターの T-DNA 構成要素に対応するプローブを用いてサザンブロットが行なわれておりますけれども、T-DNA 領域が 1 コピーを完全に導入された場合と一致するバンドがそれぞれ検出された。

また、発現ベクターの外骨格領域をプローブとしてサザンブロットをしておりますが、それらについては、検出がされなかったというものでございます。

しばらく飛んでいただきまして、32 ページになります。

「②挿入遺伝子の塩基配列の決定」です。MIR162 における挿入遺伝子は、発現ベクターの T-DNA 領域における右側境界の 27bp、それから左側境界の 57bp をそれぞれ欠損していたが、*mvip3A* 遺伝子発現カセット、それから *pmi* 遺伝子発現カセットについては、完全であることが確認されたと書かれております。

また、ベクターと MIR162 の挿入遺伝子の塩基配列を比較したところ、2 か所の塩基置換が認められた。最初の置換によって mVip3A タンパク質の 129 番目のアミノ酸がメチオニンからイソロイシンに置換されていた。2 つ目の塩基置換では、アミノ酸の置換を生じていないということです。

なお、*mvip3A* 遺伝子領域における 2 か所の塩基置換を除いて、挿入遺伝子塩基配列はベクターにおける塩基配列と一致していたということです。

③の近傍配列ですが、挿入遺伝子の 5' 及び 3' 末端の塩基配列を決定しておりますが、このデータベースを用いて相同性検索が行なわれております。

この結果、5' 末端近傍配列において、ディソシエーション 1 というんでしょうか、関連転移エレメントの相同性が認められた。*Ds1* は、非自立型転移エレメントであって、その転移には活性化された Activator エレメントが必要とされる。また、*Ds1* エレメントの転移が生じると、近傍 DNA が最大で 36bp 欠損することが知られている。また、*Ds1* 関連エ

レメントの相同性が認められた塩基配列は5'末端から500bp以上離れているということから、挿入遺伝子によって、この *DsI* エレメントは損なわれていないということが判断されたとされております。

33 ページの上になりますが、一方、3'末端近傍配列において、トウモロコシの *cyclophin* 遺伝子を含むゲノミッククローンとの相同性配列が認められたが、その相同性配列はコード領域の外側配列にすぎなかったとされております。

また、挿入遺伝子と近傍配列の接合部位において、意図しないオープンリーディングフレームが形成されているかどうかについて、ソフトウェアを用いて解析が行なわれております。

この結果、接合部位において、新規の意図しない ORF の形成は認められなかった。これらのことから、MIR162 における挿入遺伝子については、内在性遺伝子が損なわれている可能性、それから近傍配列の接合部位においての新規の意図しない ORF が形成されている可能性、これらについては、いずれも極めて低いと判断されております。

「④系統特異的な検出方法」ですが、挿入遺伝子の右側接合領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行なったところ、特異的な 149bp の PCR 産物が増幅された。したがって、近傍ゲノム配列に由来するプライマー、それから T-DNA に由来するプライマーを用いた PCR で特異的に検出することが可能であるとされております。

35 ページ、(2) オープンリーディングフレームの有無についてですが、前述の挿入遺伝子のサザンブロット分析、それから挿入遺伝子の塩基配列の解析、近傍配列の解析の結果に基づくと、挿入遺伝子と5'と3'末端の接合部位の領域において、新規の意図しないオープンリーディングフレームは存在しないことが示された。

2番、遺伝子産物の発現部位、時期、量ですが、ELISA 法によって mVip3A タンパク質と PMI タンパク質の発現量の分析がされております。

mVip3A タンパク質については表7に、PMI タンパク質については表9のところに示されております。38 ページの表9になります。

40 ページ、遺伝子産物が1日タンパク摂取量の有意な量を占めるかどうかについてですが、2段落目の最後の方になりますが、日本人1日1人当たりのタンパク質の総摂取量に占める割合では、mVip3A タンパク質は0.000032%、PMI タンパク質で0.000002%と極めて微量であるとされております。

4番、遺伝子産物のアレルギー誘発性ですが、(1) 供与体のアレルギー誘発性ですが、*mvip3A* 遺伝子の供与体である *B. t.*、それから *pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli*、これら

細菌にアレルギー誘発性があることは知られていないとされています。

(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ですが、mVip3A タンパク質、それから PMI タンパク質に関して、これまでにアレルギー誘発性の報告はない。また、両タンパクはアレルギー誘発性を持つ可能性は極めて低いであろうということを次の(3)～(4)における評価によって確認したとされております。

(3) がタンパク質の物理化学的処理に対する感受性ですが、使用したタンパク質は、*E. coli* の過剰発現系によって産生・純化された mVip3A タンパク質と PMI タンパク質が用いられております。なお、MIR162 トウモロコシ由来のタンパク質の同等性は、下に記されているように、あらかじめ評価をしたとされております。

下にまいりまして、①の人工胃液ですが、mVip3A タンパク質の人工胃液中での消化性を SDS-PAGE 分析とウェスタンブロットで評価をしております。その結果、反応開始 1 分後で完全長のタンパク質やポリペプチド断片のバンドは検出されなくなるとされております。

44 ページ、PMI タンパク質ですが、人工胃液中での消化性を同じく SDS-PAGE を用いて分析が行なわれております。一番最後の行のところに、速やかに分解されることが示されたと書かれております。

46 ページの②、人工腸液ですが、mVip3A タンパク質の人工腸液中での消化性が同じく SDS-PAGE とウェスタンで評価されております。反応開始 5 分後に、約 62kDa のポリペプチド断片が速やかに分解がされたとなっております。

48 ページ、PMI の人工腸液中での消化性ですが、2 分間の反応で容易に分解することが示されたとされております。

49 ページ、PMI の経時的な消化性について行なわれております。その結果、0.1 倍の腸液では反応開始 30 分後にバンドが検出されなくなった。0.01 倍の濃度では、徐々に分解することが確認されたとされております。

51 ページ「③加熱処理」になります。mVip3A タンパク質を最終濃度が 5 µg/mL になるように調整したもので、4～170℃、30 分間の加熱処理をして、ELISA 分析をされております。その結果、120℃で 30 分の静置で定量限界以下になったということです。

下の方にまいりまして、PMI タンパク質ですが、同じく 4～95℃で 30 分間処理をして ELISA 分析が行なわれており、95℃、30 分の静置で活性を失うことが確認されたということです。

52 ページ、これらの結果に基づいて、mVip3A タンパク、PMI タンパクは消化や加熱に対して安定ではないということが確認されたということです。

(4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関してですが、2段落目になりますが、構造相同性の評価には、80個の連続アミノ酸からなるウィンドウ設定をして、35%以上のアミノ酸配列が一致した場合を、相同性を有するとして行なわれています。

次にエピトープ検索として、8個の連続アミノ酸で一致するものがあるかどうかの確認がされております。

「①mVip3Aタンパク質」ですが、次の53ページ、有意なアミノ酸配列相同性を有する既知アレルゲンや8つの連続アミノ酸が一致するアレルゲンは認められなかった。

PMIの方ですが、有意なアミノ酸配列相同性を有する既知アレルゲンは認められなかったと。しかし、エピトープ検索において、8連続アミノ酸で一致する配列がカエルの一種で確認されたということで、次のページになりますが、IgE結合能の検討がされております。

54ページの(5)になりますが、(1)～(4)までの事項でmVip3Aタンパク質においては、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断された。

一方、PMIタンパク質には8連続アミノ酸で一致する配列が確認されたことから、感受性患者の血清IgEとの結合能の検討が行なわれております。

その結果、感受性患者の血清IgEとの間で交差反応は認められなかったとされております。

56ページ、5番、組換え体に導入された遺伝子の安定性ですが、先の22ページにありました自殖系統のトウモロコシ、3世代を用いてTaqManのPCR分析により検定がされております。いずれも後代に遺伝されているということが示されたとされております。

57ページ、サザンブロット分析でも3世代について確認されておりますが、安定的に遺伝しているということが確認されております。

59ページ、別の制限酵素を用いたサザンブロット分析が計7世代で確認されておりますが、いずれも安定して遺伝されているということが確認されたということでございます。

63ページ、代謝系への影響ですが、*mvip3A*遺伝子は、宿主の代謝系と独立して機能しているということから、代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

それから、*pmi*遺伝子によって発現するPMIタンパク自身は、その基質特異性から他の天然基質は知られていないということでございます。

これらのことから、PMIタンパク質が代謝系に影響を及ぼす可能性は極めて低いとされております。

「7 宿主との差異に関する事項」ですが、MIR162と非組換えトウモロコシの成分分析

が行なわれております。

66 ページからの結果になります。「(3) 成分分析結果」ですが、一部の項目で有意差が認められてはいますが、主要構成成分ミネラルについて、すべての分析値は一般の商業トウモロコシで報告されている文献値の範囲内であったということでございます。

71 ページ、ビタミン、アミノ酸、脂肪酸ですが、これらについても一部の項目で有意差が認められていますけれども、いずれも文献値の範囲内であったということでございます。

75 ページにまいりまして、2 次代謝産物、それから栄養阻害物質ですが、フェルラ酸、それから p-クマル酸において有意差が認められた。ただ、有意差が認められた成分も含めてすべての分析値は文献値の範囲内であったとされております。

77 ページになりまして、④が成分分析のまとめですが、いずれも各種構成成分は従来のトウモロコシと同程度であるということです。

8 番、諸外国における状況ですが、記載のとおりとなっております。栽培方法、それから 10 番の宿主の製法、それから管理方法については記載のとおりとなっております。

第 7 になりますが、これまでの事項によって、安全性の知見が網羅されているということから、特に追加の試験は行われていないということです。

以上です。

○澤田座長 どうもありがとうございました。それでは、項目ごとに委員の先生から御意見をいただきたいと思えます。

まず、概要書の第 1 の 1 ページ～ 3 ページまでで、組換え体との相違に関する事項でいかがでしょうか。

よろしいでしょうか。それでは、第 2 の 3 ページ～ 4 ページ、組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項で、御意見がありましたら、お願いします。

○鎌田専門委員 4 ページ目の下から 5 行目に「後ろ向き研究」というのがあるんですが、ちゃんとした日本語に直していただきたいと思えます。

○澤田座長 これは、英語のレトロスペクティブで、いつも訳が、一番正確には英語で「レトロスペクティブな」と書けば問題ないと思えますが。

どうぞ、五十君先生。

○五十君専門委員 5 ページの 5、ここはまだですか。

○澤田座長 5 ページはこれからですけれども。

○五十君専門委員 失礼しました。

○澤田座長 そうしましたら、第 3 の宿主に関する事項で 4 ページから 6 ページで、五十

君先生、どうぞ。

○五十君専門委員 5ページの「5 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項」というところに一般論が書いてあるんですが、たしかこの部分は、当該植物がウイルスなどの汚染を受けていないというような、そういうことを示す部分だったかと思うんですが、病原性に関するものを具体的に示し、宿主は調べた範囲では感染していなかったとか、そういう情報をいただきたいと思います。

○澤田座長 これは、トウモロコシの一般論でよろしいんですか。

○五十君専門委員 今までは宿主はこういったウイルスに感染するけれども、この当該の育種を行なったものについては、こういったウイルスの汚染を受けていないという、そういう内容を示す必要はなかったでしょうか。

○澤田座長 デント種ですね。どうぞ。

○鎌田専門委員 多分、ここは単にこういう病原体なりがありますよというだけで、ここで感染していないといっても、実際にはフィールドでいっぱい栽培したら何でも感染するので、そこは何も書けなくなるので、この記載のままでよろしいかと思いますが。

○澤田座長 これは、この宿主に特定して書く必要はなかったような気がするんですが、よろしいですか。ちょっと事務局で、一応確認ください。

○鶴身課長補佐 はい。

○澤田座長 他にないようでしたら、第4のベクターに関する事項で、7ページ、8ページはよろしいですか。

そうしましたら、第5の少し長くなりますけれども、9ページ～22ページ、挿入DNA遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築、この関係でコメントはございますか。

どうぞ。

○鎌田専門委員 全体がそうなんですが、例えば13ページの表のすぐ下のところに、MIR162 トウモロコシにおいて発現している mVip3A タンパク質、ここでは Vip3Aa20 タンパク質と書いてあるんですが、実は、その数ページ前の10ページのところに、自分たちで定義していて、ここで言うのは、Vip3Aa19 をコードするものを *mvip3A* 遺伝子とするとか、要するに19の方を自分たちで先に定義をしておいて、それで後の方で、20なんだということを出しているんで、全体を通じて、どれを見ているのか、だんだんタンパクのところになるとわからなくなっている。せっかく 3Aa1 とか 3Aa19 とか 3Aa20 とわざわざ分けたんだから、それをどの試験ではどれをきちんと使っているのかをもっとはっきりさせていただいた方がよろしいのではないかと思います。

○澤田座長 最終的には Aa20 ですので、これを評価しないといけないわけですね。ですから、そこはきちんと書いて、それを評価しているということを確認していただければと思います。

手島先生、どうぞ。

○手島専門委員 12 ページの下から 4 行目ぐらいになるんですけども、今回の Vip3A タンパクというのは、今までと同じ *B. t.* 菌が産生するタンパクの Cry タンパクとは違って、可溶性のタンパクということで、腸管上皮細胞の受容体の結合する仕方も違うというようなことが書かれているんですが、ある意味では Cry タンパク以外の *B. t.* タンパクとしては、初めて出てきたケースですので、選択毒性という意味で、哺乳類の細胞への毒性はないのかということも記述していただいた方がよろしいかと思います。

○澤田座長 どうぞ。

○澁谷専門委員 ここで引用されている論文をさっきちらっと見ていたんですけども、要するに結合をやっている、結合実験をやると、Vip3A の結合するものと、Cry1A や何かの結合するタンパクが違うということが書いてあるんですが、そのときに哺乳類、高等動物の膜でやっていないようなので、今の裏づけみたいなもので、哺乳動物、高等動物の実験結果があれば出してほしいと思います。

○澤田座長 今、お二人の先生のコメントで、これはヒトが望ましいですか。

○澁谷専門委員 一番いいのはヒトだと思うんですけども。

○澤田座長 Cry タンパクの場合は、かなりデータがありまして、ヒトの細胞に毒性を示さないというデータが幾つかあったような気がしますので、ですから、この場合は、初めての新規の毒素でありますので、哺乳類、望ましくはヒトの細胞に毒性がないことを示すデータがほしいと。

それで、もしなければ、急性毒性は多分やっているはずなんですけれども、そのデータでも書いてもよろしいですか、それとも *in vitro* のデータが必要ですか。

○澁谷専門委員 本当は両方ですね。それで、実はそんな大した実験では、彼らにとってはないので、もうラベルしたこのタンパクを持っているので、その論文には昆虫の膜だけやっていますけれども、それは動物からの膜をとってやるだけのことなので、多分そんな大した実験だとは思わないですね。

要するに、違うターゲットタンパクに結合して、しかし、どちらにしても穴を空けてしまっているんで、それでスペクトラムが広がっていることもありますから、念のため、やはり見ておいた方がいいと思います。

○澤田座長 今のは、細胞培養系にかけて毒性を示すことでもいいし、バインディングで見てもいいと。

○澁谷専門委員 両方やれば、一番確実だということだと思います。

○澤田座長 そこら辺のデータは、一応あるかどうか聞いていただいて、少なくとも哺乳動物に対する毒性がないことを示すデータを出してほしい。そういうことでよろしいでしょうか。

○澁谷専門委員 はい。

○山崎専門委員 9ページの「(2)安全性に関する事項」の *mvipA* 遺伝子のところに、これの供与体の *B. t.* は、微生物農薬の基材として長期に利用されているとあるんですが、微生物農薬として使う場合の標準的な使い方、あとは作物の収穫時期に対して、いつごろ散布するのか、あるいはどういう作物に使っていて、使用上の制限が何かあるのか、ないのか、その辺りの情報がないようなので、それは是非ほしいと思います。

○澤田座長 これは、米国で許可されているのでしょうか。日本では、よくわかりませんが、要は微生物農薬としての使用経験が一応あるということで、そこら辺りの情報もほしいということですね。この *Vip3A* を出す株と微生物農薬として使われている株で同じような分泌性の毒素タンパクが本当に出ているかどうかというのは、ちょっと確認しないとわからないのかなと思います。ですから、そこら辺も含めて情報を出していただいた方がよろしいのかなと思います。

ほかに 22 ページまででございますか。

どうぞ。

○小関専門委員 すごく簡単なことなんですけれども、20 ページの表の 3 カラム目というのでしょうか。 *mvip3A* のところの説明の「由来及び機能」の説明のところの文章の第 1 行目のところの括弧の中に「(Estruch *et al.*, 1996) のを」というのは変なので、ここを直してください。

もう一点が、22 ページのところ、④として、ELISA 分析に用いた世代として、一番左の系列ですけれども、これも④でやったと書いてあるんですけれども、データが出ていないんです。ですから、これはないならないときちゃんと書いて、ここを外してもらう必要がありますし、あるのであれば、データは後の方でちゃんと付け加えていただきたいと思います。

以上です。

○澤田座長 今のは、御指摘のとおり直していただければと思います。



ほかに、どうぞ。

○鎌田専門委員 今の22ページの図までいったので、これもいつもと全く同じで、そもそもMIR162は、どれから、全くいつもと同じで、データの一番上はやはり取っていないですね。ですから、何をもってMIR162というかというのも難しいところで、一応、後ろのデータを見る限り、例えば③の数字が付いているのは、サザンで見た限り同じであるから全部認めると、多分そういう論理だと思うんですが、もし、そうならその旨をきちんと書いていただかないと、何が何だかわからないということだと思います。

○澤田座長 いつものお話だと思うんですけども、もし、サザンのデータが安定性に必要だとすると、●●●以降と●●●以降はまだいいかと思いますが、●●●の系列というのは、さかのぼってサザンがないですね。ここまで認めていいのかどうかということになるかと思いますが、①があればよろしいんですか。③以外に①もサザンをやっていると書いてありますけれども、これは一応確認していただいて、どれとどれを承認対象にしてほしいか、確認していただければと思います。

○鶴身課長補佐 いつも言われているので、一応、確認をしているんですが、21ページの最後のパラで商品化を予定している世代というのが、彼らが見てもらいたい世代ということになります。

ですから、●●●/BC1F1、それから●●●/BC1F1、それから●●●/BC4F1です。ここからを見てほしいというのが、彼らの主張のようです。

○澤田座長 どうぞ。

○鎌田専門委員 今のような論理を使ってしまうと、変な話ですが、よくあるのは、ある遺伝子をトウモロコシに入れた、たまたま3系統とれた、それぞれを認定してくれという話になってしまうと。そうすると、例えば一番左側の系列で、では食品安全性、この系列だけでデータが全部補えているかということ、補えていない。右側の方も含めて全部をもって安全性のデータを出しているの、基本的に一番上まで戻らない限りは、やはりこの系統としては認められないとなると思うんです。

ですから、21ページの左下にあるのは、あくまで自分たちがデータを出した系統であって、認定としては全部を認定しない限りはおかしくなるので、ですからどこからをMIR162というかをきちんとしていただきたいということ。

○澤田座長 先生のおっしゃるようになりますと、もっとさかのぼって認定した方がいいということですか。

○鎌田専門委員 ベストとしては、●●●/F1というのが、本当はサザンのデータが1個

あれば、全部に波及できるのではないのでしょうかと、たまたまもしないということならば、サザンで少なくとも●●●/BC1F1と●●●/BC1F1と●●●/BC4F1がサザンで、多分導入に使ったベクター全部を使った、プローブに使ったサザンで全く同じであるということをもきちんと証明しない限りは、勿論同じとは言えないので、そこら辺をデータと書き方をもってきちんとしていただきたいということです。

○澤田座長 ①のサザンは不十分ですか。ちょっと複雑なので、どこに何があるのかよくわからないんですが、要はデータにどのものを使ったかきちんと書いていない、それが一番問題であるということ。

○鶴身課長補佐 56ページの安定性のところでは、22ページの系統図の左側の列を使っています。それが①という安定性評価の話です。

それから59ページの複数世代のサザンについて、ここにある7つを用いて行われており、③と書かれているものは行われているということです。

○鎌田専門委員 例えば59ページだと、先ほどの話の●●●/BC1F1というのが入っていないんです。左側のラインの一番上のところがね。認めてほしいとっておきながら。ほかのところは、結構全体をやっているのもどこかわからないけれども、あるようだけれども、逆に安定性評価の分離比なんかを見ているのは、単にPCRをやっているだけなので、PCRで分離比を見ても、今の全体像はわからない。

○猿田評価調整官 根っこのところでやっているか、途中で全部データが出ているか整理して示すことという指摘事項とさせていただきますので、よろしくをお願いします。

○澤田座長 それは、どこから認めてほしいか決めていただいて、それなりのデータを出していただくということで、他に、どうぞ。

よろしいですか。そうしましたら、組換え体の、今、58ページに飛びましたけれども、23ページ～78ページで組換え体に関する事項でコメントがありましたら、お願いします。どうぞ。

○小関専門委員 それでしたら、今、話題になったところということで、61ページのところでいくと、レーンの3、4、5、6で、偶数番目が非組換え体、括弧で世代が入っているんですけども、これは単なる書き間違いなのか、それともかけ合わせたときにセグリゲートして入っていないものを使ったのか、ちょっと事務局の方で確認していただけますか。

前の58ページでは、レーンの6、7に関して、ただ単に非組換え体と書いてあると思います。ちょっとここは確認していただくということでお願いします。

○鶴身課長補佐 この対象がどういう目的で使われたかということですか。

○小関専門委員 要するに書き間違えているのではないですかということですか。

○澤田座長 この●●●の場合、BC4F1が両方とも書いてあるけれども、片方は要らないのではないかとおっしゃりたい。

○小関専門委員 もう一点よろしいでしょうか。今度はちょっとあれなんですけれども、33ページのところの一番上のところなんですけれども、一方、3'末端近傍配列においてトウモロコシの *cyclophilin* 遺伝子を含むゲノミッククローンとの相同性が認められたが、その相同性配列はこのクローンにおけるコード領域の外側配列にすぎなかったと書いてあるんですけれども、後ろの補遺の4を調べたんですけれども、よくわからないんです。

すなわち、*cyclophilin* 遺伝子の ORF の部分と相同性があるのか、それとも3'の UTR にあるのか、あるいはイントロンに入っているのか、イントロンに入っているとすると、これは遺伝子分断を起こしていることになるので、場合によっては、短い *cyclophilin* ができてくるかもしれないので、どういうところに、どういう構造で入っているのかは、ちょっと確認していただけますか。

以上です。

○澤田座長 それは、もう少し情報を出していただくということですね。

○小関専門委員 そうです。どういう形で、どういう方向に入っていて、いわゆる ORF からは遠いんですけれども、イントロンにこいつが刺さっているということはないんですかということ。

あとは、3'側のノンコーディングリージョンに入ることによって入っているのかどうか、それだけ聞いていただければいいかと思います。

○澤田座長 どうぞ。

○鎌田専門委員 今のことに関わって、例えば34ページの上のところに絵があるけれども、これは検知のためのプライマーA、Bという意味で、系統検知のことはいいんだけど、今のことと関わると、右側のフランキングのところプライマーを設定して、宿主の方のPCRをやったときのデータが、もしあるのならば出していただけると、今の小関先生の質問の、多分、本当のところの答えが出ると思うんですが。

○澤田座長 今のは、よろしいですか。

○鶴身課長補佐 はい。

○澤田座長 ほかに、最後までコメントはございますか。

どうぞ。

○橋田専門委員 加熱安定性のところの 51 ページですが、PMI タンパク質と Vip3A タンパク質の加熱時の条件がちょっと違うようです。Vip3A タンパク質の方を、pH を 10.5 という値で行なっていますが、可溶性タンパク質で、特にこの条件である必要があるのでしょうか。なぜ、このような条件になっているのか、教えていただければと思います。

○澤田座長 済みません、ちゃんとフォローできなかったんですけども。

○手島専門委員 51 ページの加熱処理をしているところの Vip3A タンパク質と PMI タンパク質の緩衝液の pH が違っているということがあって、なぜ違う条件でやっているのかという御質問だったと思います。

○澤田座長 Tween ですか。

○橋田専門委員 Tween もそうですけれども。

○澤田座長 Tween がなぜ要るかということですか。

○橋田専門委員 いや、Tween よりも、なぜ pH を 10.5 という値で行っているのかというところの方が、むしろ問題かと思います。また、わざわざ Tween を入れなくては溶けないかも確認したいと思います。

○澤田座長 そうしますと、pH が中性ではない理由と、なぜ Tween が入っているかという理由を聞けばよろしいですか。

○橋田専門委員 はい。

○澤田座長 それでよろしいですね。

○橋田専門委員 はい。

○手島専門委員 別件でよろしいでしょうか。

○澤田座長 どうぞ。

○手島専門委員 41 ページの人工胃液のところコメントさせていただきたいんですけども、41 ページの下から 3 行目なんですけれども、mVip3A タンパク質を人工胃液で分解させたときに、図の 14 のウェスタンブロットの結果では、1 分以降に約 8 kDa の淡いバンドが見られたとありまして、分解性試験の中で 3,000 以上の分子量のものは、少し気にかけないといけないのかと思っているんですけど、ただ、図 13 の結果では、8 kDa というバンドが見られていないので、なぜ図 13 では、8 kDa というバンドが見られていないのかということと、あと図 14 なんかで見られている 8 kDa タンパクというのは、基のタンパクの何%ぐらいに相当するのかというようなことを回答していただきたいと思います。

○澤田座長 それは、聞いていただくだけでよろしいですか。

○手島専門委員 メーカーの方に聞いていただければと思います。

もう一点、人工腸液の方なんですけれども、46 ページ目になるんですが、これは図 17 のパネル A のレーン 2、3、4、これはペプシンを含まないというのは、パンクレアチンを含まないという単純な間違いだと思うんですが、パネル B の方の中で、これは A の方がパンクレアチンを入れて、2 時間までの反応例、B の方は、更に長い、3 から 48 時間の分解のパターンを示しているんですけれども、図 17 のパネル B の 8 というのが 3 時間の反応の結果で、それから 8、9、10、11 と時間が延びて 48 時間にいつているんですが、パネル B のレーン 8 では、60kDa というバンドが見えているんですけれども、次の図 18 の方の同じもの、ウェスタンブロットで見た方のパネル B のレーン 8 では、ウェスタンブロットのバンドが見えていないので、ここの辺りが、ちょっとウェスタンとのパターンが一致していないところがあるので、そこも確認をお願いしたいと思います。

○澤田座長 図 17 と 18 は、基本的に同じ構成のはずなんですね。

○手島専門委員 そうなんですけれども、図 B の方は、レーン 8～11 にかけて時間が長くなっていつているんですけれども、それで、図 17 の 8 番では、まだバンドが見えているんですが、図 18 では見えていないということです。

○丹生谷専門委員 薄いけれどもありますよ。

○手島専門委員 ただ、本来 3 時間の方が 6 時間よりも濃いはずですね。それがちょっとよくわからなかった。

○澤田座長 写真をもう少しきれいなものを出せということによろしいですか。

○手島専門委員 それでもよろしいと思います。

○澤田座長 それでは、ほかに御意見がないようでしたら、先生方から提出されました意見、確認事項を指摘事項案としてとりまとめて、また、先生方に確認いただいた上で厚生労働省を通じて申請者に指摘したいと思います。よろしいでしょうか。

どうぞ、追加ですか。

○小関専門委員 追加というわけではないんですけれども、聞いておいていただきたいんですけれども、諸外国における認可において、アメリカで 2007 年 8 月に出したというけれども、どうなっているんでしょう。通っていないんだとしたら、ちょっと気になることがあるので、そこは情報を入れておいていただいた方がいいかもしれない。

○澤田座長 それは、確認するだけでよろしいですか。

○小関専門委員 そうです。

○澤田座長 それでは、時間がちょっと問題なんですけれども、一応、パパイヤは少しやった方がよろしいですね。

○鶴身課長補佐　そうですね。

○澤田座長　それでは、続きまして、パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統の安全性に関する審査に入らせていただきたいと思います。

本品目につきましては、継続審査品目でありまして、大分前に調査会での指摘事項が outcome しまして、その回答が提出されております。回答書に基づきまして、食品としての安全性を確認し、安全性について問題が残る場合は、もう一度指摘事項を出すということになると思います。

安全性に問題がないとされた場合には、引き続き評価書（案）の審査を行いたいと思いますけれども、今日はちょっと無理かと思えます。

それでは、事務局から御説明をお願いします。

○鶴身課長補佐　2月29日付けでハワイパパイヤ産業協会から提出されております、黄色のファイルに基づいて御説明をさせていただきます。

2枚めくっていただいて、2月29日付けでハワイパパイヤ産業協会から回答書が提出されております。

まず、指摘事項の a の①、概要書を基にして、今回の申請で評価してほしい世代、それから種苗会社へ提供を予定している世代、それから遺伝子解析、成分分析についてそれぞれ行なうことというふうにされております。

回答といたしましては、審査対象としてほしい世代については、次のページの図1に記載されておまして、55-1 系統、パパイヤ R0 世代、それからその後代ということになっております。

それから、種苗会社へ提供している世代については、図1の R3 世代以降の Sun Up。

次のページ、Sun Up と非組換えパパイヤ Kapoho を組み合わせた Rainbow というのが種苗会社に販売されているものになります。

2 ページ目、なお、開発から既に 20 年近くが経過しており、速い世代のサンプルを入手することが困難であった。そのため、新しく行なわれた試験については、入手可能である世代のサンプルを使用して、複数世代での安定性については、R6 の Sun Up、R7 の Rainbow を行なったということです。

5 ページ、サザンプロット分析が不鮮明であるので、やり直して提出をすることということで、回答といたしましては、再試験を行なって概要書にも記載をしているということです。

その下に概要書にも記載されておりますが、その一部が記載されておりますので、御説

明をさせていただきます。PCR 分析の結果、55-1 系統には *bla* 遺伝子断片と *oriColE1*、それから *uidA* 遺伝子発現カセット、それから *PRSV CP* 遺伝子発現カセット、*nptII* 遺伝子発現カセット、*oriV*断片により構成される。これらによって構成される第一挿入遺伝子、それから 222bp の *tetA* 遺伝子の断片、それらが外骨格配列に挟まれた形で構成されている第二挿入遺伝子。

「また」以降になりますけれども、今回、新たにわかったものとして、290bp の *nptII* 遺伝子由来の断片が挿入されていることがわかったということです。

その下に、組換え体に関する事項の箇所ですが、挿入遺伝子領域の解析、コピー数、挿入箇所数ですが、形質転換プラスミドをすべてカバーするように設計されたプローブを用いて試験がされております。

6 ページ、コピー数を確認するために、制限酵素 *BglIII* で消化をして、PA プローブを用いてサザンを行なっております。

55-1 系統からは、予想された約 10.8kb のバンドが検出され、それ以外にも 14.8 と 6.9 のバンドが検出された。

一方、非組換えからは検出されなかった。この検出された 14.8kb のバンドについては、ほかのプローブを用いた場合にも認められたために、部分消化によって生じた可能性があるということから、パピヤゲノムを基にしてつくったプローブを用いてサザンが行なわれました。

その結果、いずれのプローブを用いた場合にも、同じサイズのバンドが確認されたことから、この確認されたバンドは、部分消化によって生じたものであると結論づけられております。

一方、6.9kb の方のバンドについては、*nptII* 遺伝子にハイブリダイズする P6 のプローブを用いて、サザンを行なった場合にも、同じバンドが検出されているので、*nptII* 遺伝子に由来する断片であるということが明らかになったということです。

また、挿入箇所数を確認するために、*BglIII* と挿入遺伝子の 1 か所に制限切断酵素を有する *StuI* で消化して、PA プローブを用いてサザンを行なったところ、予想どおりの 7 kb と 3.6kb が検出された。

それから、これらのバンド以外にも部分消化によって生じた 3 つのバンドと *nptII* 遺伝子に由来する断片が確認された。

これらのことから、第一挿入遺伝子は、55-1 系統のゲノム上に 1 か所 1 コピーで挿入されているということが確認された。また、新たに *nptII* 遺伝子に由来する断片も明らかに

なったということでございます。

7 ページは、それぞれの試験で使われているプローブです。

9 ページ、これが第一挿入遺伝子で、実際に挿入されているものです。

10 ページ、挿入遺伝子の完全性ということで、確認をするために、先ほどのプローブで P2、P4、P6 を用いてサザンが行なわれています。

いずれのプローブを用いた場合でも予想どおりのバンドが出ていますけれども、P6 を用いた場合には、*nptII* 遺伝子とハイブリダイズした 7 kb のバンド、それから 5.2kb のバンドが検出された。

更にすべてのプローブにおいて、部分消化により予想よりも大きいサイズのバンドが確認された。

これらのことから、各挿入遺伝子は完全な形で挿入されていると結論づけたということです。

それから、目的の挿入遺伝子領域の構成に関することですが、目的の領域に存在する遺伝子発現カセット以外のところについての断片の確認ですが、これらの領域にハイブリダイズする P1、3、5、7 のプローブを用いて行なわれております。いずれも予想されたサイズのバンドは確認されていますけれども、プローブ 1 を用いたときに、3.7kb のバンドが確認されております。

このプローブ 1 に含まれる *uidA* 遺伝子の *nos* ターミネーターの領域が *nptII* 遺伝子の *nos* ターミネーター領域とクロスハイブリしたことによると考えられるとされております。

これらのことから、挿入遺伝子領域の構成要素、それからプラスミド骨格配列は、完全な形で導入されており、この領域に由来する断片は存在しないということがわかった。

11 ページ、目的の挿入領域のまとめとしては、55-1 系統には 1 か所 1 コピー、それから *nptII* 遺伝子断片が挿入されている。各挿入遺伝子は完全な形で導入されており、その他の構成要素やプラスミドに由来する断片はないということが確認されたということです。

13 ページ、*nptII* の断片の解析が記載されております。P6 プローブを用いた際に、予想されたバンド以外にも 7 kb、それから 5.2kb のバンドが確認された。

そこで、これらの構造を明らかにするために、遺伝子配列の解析を行なったところ、この断片というのは、822bp のコード領域のうち、3' 末端の 290bp であって、植物ゲノムに由来する 735bp の左側近傍と 114bp の右側近傍も明らかになった。

この近傍配列に基づいてプライマーを設計して、PCR が行なわれておりますが、その結果、*nptII* 遺伝子断片を含むように設計されたプライマー対、14 ページの図 5 になります



けれども、この4種類のプローブを使ってプライマーを使って行なわれていますが、この含むように設計されたプライマー対1、3を用いた場合には、55-1系統のみ検出がされた。

一方、*nptII* 遺伝子の外側のみに設計されたプライマーでは、55-1系統と nonGM の両方からバンドが検出された。更に、この特定された3'末端の290bpを除いた6-1プローブを用いてサザンを行なったところ、*nptII* 遺伝子断片とハイブリダイズしたと思われるバンドが検出されなかった。

これらのことから、55-1系統には、*nptII* 遺伝子の3'末端290bpに由来する断片が挿入されており、その近傍は、植物ゲノム由来であるということがわかったとされておりま

す。

16 ページ、外骨格領域のところでは、P8からP13のプローブを用いてサザンが行なわれております。

その結果、P8、それから11B、13のプローブを用いた場合には、いかなるバンドも検出されなかった。また、*tetA* 遺伝子と、その近傍にハイブリダイズをするP10それからP11Aのプローブを用いたところ、既にわかっている *tetA* 遺伝子由来の断片が確認された。

そこで、*tetA* 遺伝子断片領域、222bpですが、これを除いた10-1プローブを設計してサザンを行なったところバンドは検出されなかったということで、これらについて、以前の試験でわかっている *tetA* 遺伝子断片と、近傍の解析を支持するものであったということです。

それから、*tetA* 遺伝子にハイブリダイズする11Aのプローブでは、予想された1.3kbのバンドが検出されなかった。更にサイズの大きいバンドが検出された。これは、左側境界領域の配列が葉緑体に由来するような部分消化が起こりやすい配列であるということに起因すると考えられたということが記載されています。

なお、*tetA*の断片の解説は、後に記載がされています。

それから、*tetR*の遺伝子にハイブリダイズをするP9プローブを用いた試験では、*tetA* 遺伝子やその近傍とハイブリダイズする10、11Aと同じサイズのバンドが検出された。これは、*tetR*が*tetA* 遺伝子断片と60bpにわたって、93%の相同性を有しているということから、クロスハイブリではないかと考えられた。

そこで、*tetA* 遺伝子と相同性を示す64bpを除いた *tetR*の遺伝子の9-1それから9-2プローブを用いてサザンが行なわれております。

その結果、*tetR* 遺伝子とはハイブリダイズしなかった。よって *tetR* にハイブリをする9のプローブを用いた試験で検出されたバンドというのは、*tetA* 遺伝子の断片とクロスハ

ハイブリによって生じたものであると結論づけられております。

それから、*aacC3* 遺伝子とハイブリをする 12 のプローブでは、7.3kb の薄いバンドが見つかった。しかし、ほかの特異的にハイブリするバンドよりもはるかに薄いものであった。ゲンタマイシンのような配列が実際に 55-1 の系統に存在するかどうかを確認するために、17 ページのところで更なる解析が行なわれております。

もともと入手先の異なる Sun Up の DNA を用いて、異なる人間が DNA 抽出、制限酵素による消化、更に異なる日にサザンブロットの分析が行なわれております。

ここにありますように、11 月 17 日に行った試験では、弱いシグナルが見つかったが、PCR によって増幅をしようとしたら増幅できなかった。

それから、短い断片で増幅をするプライマーを用いたところでも PCR の産物を得ることはできなかったということです。

また、PCR の標的の一端だけに特異的なプライマーを用いた 3 つの異なる方法によって、その断片を増幅するための網羅的な試みが行なわれたということですが、この *aacC3* の遺伝子配列を特定することはできなかった。

更に、10 倍のパピヤゲノムに相当する BAC クローンライブラリー、それから 3 倍のパピヤゲノムに相当するホスミドライブラリーに対して 12 プローブを用いて行なったところ、陽性のクローンは見つからなかった。

また、更に Sun Up ゲノムの配列は既に解読がされていて、データベース内の配列について、プラスミドベクターの配列を検索したところ、この *aacC3* 遺伝子の配列については、検出ができなかったということから、*aacC3* の遺伝子と特異的なハイブリを起こしたものではないと結論したということでございます。

以上のことから、55-1 系統には外骨格領域に由来する *tetA* 断片のみが存在して、ほかの外骨格領域に由来する遺伝子は挿入されていないということが明らかになったということでございます。

21 ページに、オープンリーディングフレームの形成の可能性について記載があります。

今回、明らかになった *nptII* 遺伝子断片に関して、ORF を形成しているかどうかを検索されております。

この領域と同一性を示す 6 つの ORF が予想されましたが、いずれも既知のアレルゲンや毒性のタンパク質の同一性は認められなかった。これらのことから、*nptII* 断片は、いずれも既知のアレルゲンや毒性と同一性を有しておらず、それらのタンパク質を発現するような ORF も存在していないことから、安全性に影響を及ぼすものではないということを経

論したということです。

それから、複数世代の安定性として、PA というプローブを用いて、R6 世代と R7 世代について試験が行われておりますが、同じサイズのバンドが検出されており、複数世代にわたって安定して遺伝しているということが確認されたとなっております。

22 ページ、指摘事項の③です。アレルギーの誘発性の変化の全体的な確認が必要だということで、1) アレルギーに関して、非組換えと違いがあるか否かについて食経験を基に記載をすることとされておりました、このパパイヤは 98 年に商業栽培が開始されて、総面積は 2007 年の 864ha になっているということで、Rainbow の占める割合は 68% となっている。

このような食経験があるにもかかわらず、これまで 55-1 パパイヤを摂取したことに起因するアレルギー症状の報告はないということです。

2) 組換えパパイヤと非組換えパパイヤの間でタンパク質の含量について統計処理をして確認をするということですが、右のページにまいりまして、2 行目、3 行目ぐらいになりますが、試験に 55-1 系統の Sun Up と Rainbow、それから非組換えパパイヤで Sunset、Sunrise、Kapoho を用いて試験がされております。

2 段落目になりますが、その結果、タンパク質含量が大きくなることが明らかになった。含量の違いについてグループ分けをすると、括弧の中にありますように、3 つのグループに分けられる。1 つは Kapoho で 2 番が組換えの Rainbow、3 番が Sunrise、Sunset、それから組換えの Sun Up というグループでの統計学的有意差が見られた。

3 番の Sunrise と Sunset は姉妹の品種であって、Sun Up は Sunset を基に作出されているので、統計学的有意差は、その中では認められなかった。

②の Rainbow は、①の Kapoho と Sun Up の F1 であるために、Rainbow のタンパク含量は中間に位置した。よって、タンパク質の含量の有意差というものは、遺伝子の組換えに起因するものではなく、遺伝的宿主の持つ遺伝的背景によるものであると結論づけられております。

それから、タンパク質のバンドの比率の検討もされておりますが、それぞれのパパイヤ種で認められるバンドは同一のものであって、特に目立った差異はない。よって 55-1 系統と非組換えパパイヤでタンパク質含量やバンドの比率に目立った違いはなく、55-1 系統においてアレルギーが高まっている可能性は極めて低いと判断されたということでございます。

26 ページにまいりまして、パパインの量についてサンプル数を増やして考察を下さい

ということです。再試験が実施されておりました、①、Kapoho の試験圃場から採取されたものをサンプルとしています。

②は、パパイアの卸売業者から入手したものの。

③は、Hilo の地域の農場から採取したもの、それぞれがサンプルとして使われています。

27 ページ、その結果ですが、1 のサンプルで処理を行なったところ、分散分析では有意差が見られたことから、 $t$  検定が行なわれています。それが、次のページの表の 10 になります。

これらの結果は、Rainbow のパパインの含量が非組換えの Sunset との間に統計学的な有意差は見られなかったけれども、Kapoho と Sunrise の間に有意差が認められた。

この有意差というものは、非組換えパパイアの木がウイルス感染したこと等による生理学的な違いによるものではないかと考えられた。

一方、55-1 系統の Sun Up と非組換えの Sunrise、Kapoho の間では、統計学的な有意差は認められなかった。

Sun Up のパパイア含有量は、非組換えの Sunset と比較したところ、有意に低いものであったということです。

次の段落にいきまして、未熟パパイアも試験がされておりますけれども、55-1 系統の Sun Up と非組換えの Sunset の間では有意差は認められなかった。

それから、55-1 系統の Rainbow と非組換えの Kapoho では、Rainbow の方は有意に高いという結果であった。この有意差は、非組換えパパイアの Kapoho の木がウイルス感染をしていたことから、ウイルス感染による生理学的な違いではないかと考えられたということです。

②のサンプルでいきますと、55-1 系統の Rainbow が非組換えよりも有意に高いという結果でありました。

試験に供されたサンプルは異なる圃場から取られたものではないかということで、実際に③の同じ圃場から取られたものでは、組換えと非組換えに有意な差が認められなかったということで、これらの結果から幾つかの比較で認められた有意差というものは、遺伝子組換えによるものではなく、55-1 系統においてパパインの含有量は高まっているものとは考えにくいと結論づけております。

31 ページ、アレルギー患者の血清を用いた IgE 結合能について確認をしてくださいということですが、患者の血清の入手は困難であるということからデータは得られなかった。しかし、以下の理由から安全性は担保されているのではないかということです。

1 番として、98 年の商業栽培以降、健康被害の報告がないこと。

2 番として、総タンパク質量の比較が行なわれておりますが、有意な差が認められていないこと。それから、SDS-PAGE によるタンパク質の分離、染色を視覚的に確認しておりますけれども、それについて違いは認められなかったこと。

3 番で、主要なアレルゲンとそれぞれパパインの量の比較をしておりますけれども、遺伝子組換えに起因するような差が認められなかったこと。これらのことからアレルギーの誘発性が非組換えと比べて高まっているとは考えられず、患者の血清を用いた IgE 結合能について試験を行なわなくても、その安全性は担保できていると判断したということでございます。

④、大腸菌から調整した PRSV CP タンパクの調整方法について忠実に記載をということで、32 ページの記載が修正された概要書の方にも記載がされております。

33 ページ、修正事項になりますが、①、宿主に関する事項については、宿主のこのみを記載することということで、以下のとおりの修正がされております。

②、系統樹、それから③の修正についてはそれぞれ修正がされております。

34 ページ、④、ベクターについてですが、発現ベクターを作成するのに用いた基のベクターについて整理をして記載をすることということで、その下のかぎ括弧のところからになります。それぞれのベクターの由来について記載されております。

35 ページ、ベクターの切断地図、PRSV CP タンパクの毒素、構造相同性について整理して記載をし直しているというものでございます。

36 ページ、発現ベクターの作成方法についてきちんと修正をするということ。

⑧、コピー数、挿入箇所。⑨の修正については、それぞれ修正がされているということです。

37 ページの⑩ですが、*nptII* 遺伝子産物と *GUS* 遺伝子産物について記載するということです。

38 ページからずっと記載がありまして、結論といたしましては、39 ページの中段落目ぐらいになりますが、遺伝子産物が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かということで、日本人の成人一人当たりのタンパク質摂取量に対する PRSV CP タンパクの量は約 5.04 かける  $10^{-3}\%$ 。

次の段落、*GUS* タンパク質である  $\beta$ -グルクロニダーゼについては、 $1.6 \times 10^{-5}$  である。それから *NPTII* タンパクについては、 $5.77 \times 10^{-5}$  である。いずれも微量なものであって、一日タンパク摂取量の有意な量を占めるとは考えられないと記載されております。

⑪については、それぞれの世代について、40 ページにあるとおり記載がされております。

⑫、主要構成成分の分析値についてですが、日本における分析値について記載をしたということでございます。

41 ページの⑬で、木で成熟した果実と保管中に成熟した果実の成分変化について記載をすることとされています。パパイヤが収穫される時期は、変色が始まったころで、通常7～16日と短期間で果実は熟す。

関連する文献として、保管中に成熟した果実等の比較において、大きな成分変化はないと考えられる。

また、糖度を比較した既報によると大きな差はないということがわかっているというものでございます。

⑭、次のページの⑮については、それぞれ修正がされております。

43 ページ以降は、その他の事項として申請者の方で修正されております。

以上でございます。

○澤田座長 どうもありがとうございました。それでは、ただいまの回答につきまして、順番に指摘事項ごとに御意見をいただきたいと思っております。

まず、①の世代の確認と安定性、1～4 ページですけれども、これはいかがでしょうか。これは、恐らく小関先生が指摘されたと思っておりますけれども、どうぞ。

○小関専門委員 これでよくわかるようになりました。問題ないと思っております。

○澤田座長 これは R5 以下ですか。

○鶴身課長補佐 回答書によると、R0 以降を評価してほしいということなんですが、実際に販売されているのは、1 ページの下の方にある R3 世代以降だということです。

ただ、評価をしてほしいのは、R0 以降なんですが、実際に R0 とか R1 とかのサンプルは入手が無理だということです。

○澤田座長 業者の方は、R0 を要望しているんですけれども、この委員会としては R5 以降ということでよろしいのでしょうか。

○鶴身課長補佐 R0 と R1 と R2 のところに③という数字が付いていて、タンパクの安定性をそこでしかやっていないですね。その取扱いだけだと思っております。

○澤田座長 実際に売っているものを考えると問題はないと思うんですけれども、今回は、特にどこ以降という指摘を出す必要はない。問題がないからと。それで小関先生、よろしいですか。

○小関専門委員 はい。

○澤田座長　それで、②のサザンプロットの再試験ですけれども、これは、かなり長くて21 ページまであります。

結局、たしか3か所ぐらい違うものが入っているということになっておりますけれども、このデータに関しましては、これ以上、追加は要りませんか。

どうぞ。

○丹生谷専門委員　このサザンプロットの写真を見る限りは、特にこれでサザンプロット自体はよろしいと思うんですけれども、解説というか、申請書の書き方が非常に読んでいていらいらしてしまう。

なぜかといいますと、具体的には6 ページの上から3行目、右側に予想された約10.8kbと書いてあるんですが、これは9 ページのところから予想されるサイズは、11.326kbでありまして、このバンドのことを10.8と呼んでいるわけです。

そのデータとしては、12 ページの実際のサザンを読み取ったバンドのサイズを書いてある表がございまして、そこで言いますと、Aというところのプローブの2つ目のグレーの10.796、これを10.8と呼んでいるんです。予想サイズはあくまでも先ほどの図から11.326でありますから、数字が合っていない。そういうふうに突っ込みたくなるんですけれども、実際問題として、サザンプロットのは恐らく1%ぐらいの程度のゲルで、これぐらいのサイズを正確に測定することは無理だということは言うまでもないんです。

しかしながら、そうはいつても、こんなに堂々と違う数字を書かれると読みにくいというのが私の印象でありまして、更には6 ページの上から3つ目の「また」というところから始まる段落の3行目の右側にも、予想どおり約7.0kb、3.6kbと書いてあるんですけれども、これは実際には9 ページの表から実際のシーケンスに基づく長さは7.6kbなんです。7.6kbを7.0と書いてあるんです。これもはかった結果がそうだったので仕方がないと同情するんですけれども、あまりにも数字が違う。ですから、いらいらしたんです。

ところが、追加資料の英文を見ますと、具体的な数字を書いていないんです。さらっと、突っ込まれないような英文になっているんです。むしろ、これも回答書なので、これ以上直せと、私はそんなに厳しい人間ではないんですけれども、むしろ英文を忠実に訳した方がまだ読みやすいものになったかと思えます。

そういう中で、1点質問なんですけれども、9 ページの図の中で、右と左にゲノム上の*BglIII*というのがあります。この赤字で書いてあるゲノムの中に*BglIII*があると書いてあることは、これは彼らがシーケンスして*BglIII* サイトを確認したのであれば、サイズの中に、例えば8,052bpの頭に、英語では約という意味の記号ですけれども、日本ではあま

り約をこの記号では書きませんが、英文でも波線が書いてありますね。約というのは、本当はシーケンスがわかっているのであればおかしいので、そういうところからしますと、これは *BgIII* というのは、逆にサザンの結果からパーシャルが出たので、ここに *BgIII* があるんだろうという話になっているのか、それがちょっと詳しく読み取れなかったもので、その点を確認していただきたいんです。それに、約と言うんだったら、52 という数字を書くのも変だなと思いました。

以上です。

○澤田座長 まず、「約」の方の問題は、一応、確認して頂くと、もし近傍配列をきちんと決めていて、取ればいいだけなのか。

○丹生谷専門委員 大事なことを言うのを忘れていました。なぜそこにこだわるかというところ、その予想よりも大きいバンドを彼らはパーシャルだと、ゲノムの *BgIII* のところが完全に切れていないパーシャルのバンドがあるんだというふうなことを言っているんですけども、その根拠がシーケンス上に *BgIII* を見つけているのであれば、それはよろしいんですけども、そうではないんだしたら、そういうふうに推定しているだけでありまして、これは別のコピーがあるのかという可能性も出てきますので、そこは非常に重要なポイントかと思って質問いたしました。

○澤田座長 それは、どうしましょう。確認して、先生に見てもらえばよろしいでしょうか。

○丹生谷専門委員 その回答として、*BgIII* はゲノム配列上に確かにシーケンスで存在したということなのか、そうではなくて、推定上の *BgIII* を設定しているのかということの回答がほしいんです。

○澤田座長 とりあえず、そういうことで、それでは、まだ先がありますので。

まず、③のアレルギーに関する違いの有無はいかがでしょうか。回答書の 22 ページ以降、全部で項目が 4 つありますけれども、まず 1 番目の組換え体パパイヤと非組換え体パパイヤの間で、アレルギーに関して違いがあるか否か。

これは、いかがでしょうか。この申請が出てもう大分時間が経ちまして、ハワイでかなりの方が食べていて問題がないようなことが書いてありますけれども、宇理須先生、これはよろしいですか。

○宇理須専門委員 例えば 22 ページのところ、健康被害の報告はありませんと書いてありますけれども、彼らが知る限りはなかったんだと思います。しかし、実際この文章はどう理解していいかが難しいわけです。つまりパパイヤにはアレルギー性があります。実際、



申請者も報告書で引用文献を引いてあると言っているんです。パパイヤによるアレルギーの報告は、彼らは入手してはいないんでしょうけれども、文献的にはあるんです。にもかかわらず報告はありません、だから大丈夫という彼らの理解している安全性と、実際の論文上の安全性のどちらに重きを置くかみたいなのところがあると思います。

とって、組換えのパパイヤを危険だからだめという根拠には当然ならないんですけれども、ただ、報告書として、これを素直に受け取っていかどうかという問題だとは思いますが。自分たちのデータとしてはないから大丈夫だという論理の運び方をすんなり受け入れていかどうかだと思います。

○澤田座長 これは、調べたくても実際にはわからないですね。

○宇理須専門委員 そうですね。きちんとしたデータを取ろうと思えば取れるんですけれども、かなり大変な労力だろうと思います。

○澤田座長 ですから、アレルギーであることは間違いなくて、アレルギーが起きていることも多分間違いなだろうと。ただ、それ以外の重大な有害事象は恐らく報告されてないだろうというぐらいの書きぶりだったら納得できるのですが。

ですから、この書きぶりではおかしい。

○宇理須専門委員 根拠としては弱いにもかかわらず言っているように聞こえました。

○澤田座長 これは、修正版の方もそのように直ってしまっているんでしょうか。もし修正版に反映していないのだったら、修正版の方を直す必要がなければよろしいかと思いません。

○宇理須専門委員 書き方を訂正していただければ、問題ないと思います。

○澤田座長 そうしますと、2)のタンパク質の電気泳動の方はいかがですか。22～25ページです。

○手島専門委員 組換え体パパイヤと非組換え体パパイヤ 10検体でタンパク量の定量をしているということで、両者に有意差がないという結果ですので、これはよろしいと思います。

それから、タンパク質の電気泳動を用いてバンドを見るようにということで、これも数検体での比較をしているのでよろしいかと思うんですが、若干目視で比較したことがあって、本当ですとデンシトメトリーとかで解析していただくのがよろしいかと思えます。デンシトメトリーとかで解析したデータがあれば、それも示してもらえればという感じはあります。

ただ、大筋において違いがないということは見えますので、そういうデータを持ってい

るかどうかという確認だけしていただければと思います。

○澤田座長 それは、出していただきたいということですか。

○手島専門委員 あればですね。

○澤田座長 あれば出していただいて、もう一回やらないといけなければ、どうしますか。

○手島専門委員 そうしましたら、可視的な形で差がないということですので、デンシトメトリーでもやったかどうかだけ聞いていただいて、特にデータとしては。

○澤田座長 参考まで、もしあれば見せていただけるとありがたいということですね。

3) のパインの含有量は、26~30 ページですが、どうぞ。

○山崎専門委員 ちょっと戻るんですが、2) の 24 ページの表 8 で、Student の t-test をしているんですが、これは多重比較なのでこの検定法を使ってはいけません。間違いです。ただ、結論に影響はないと思いますので、概要書にこの表が入ってなければ無視していいと思います。

○澤田座長 概要書に入っていますか。88 ページに入っていますね。

○山崎専門委員 Student の t-test は 2 群比較に用いる検定法ですが、これは幾つもの群の多重比較ですから、Student の t-test ではない検定法を使います。

○澤田座長 この場合は、何をやればよろしいですか。多重検定もいろいろあるんですけども。

○山崎専門委員 全部の郡を総当たりで比較するのであれば、何種類かあるんですが、どれがいいかというのは即答はできません。

○澤田座長 どうぞ。

○石見専門委員 一番簡単なのは ANOVA という方法で、3 群以上の群間の比較ができる。通常よく使うのは ANOVA という方法をやってから、その後の検定ということで多重比較をやるということですが、

○澤田座長 結局、この表 24 で何が言いたいのか、わかりにくいですね。

○石見専門委員 これを見ると、一つ一つそれぞれ  $t$  検定で比較して見ているわけですが、 $t$  検定は先生おっしゃったように 2 群間の比較ですので、これはまずいと思います。

ただ、組換え体と非組換え体を比較したい場合は、2 つの品種で比較して、 $t$  検定でいいと思うんですけども、全体を見るときはそれではまずいと思います。

○和久井専門委員 今、石見先生がおっしゃられたように、個々のデータに単純に  $t$  検定を行った後、このような変な表記したのか。または、個々のデータでノンパラメトリック

検定を行ったのかがわからないですね。いい方に判断すれば、表に  $t$  検定を行ったと記載していますから、石見先生が今、おっしゃったように、一つずつ  $t$  検定をやって、それを 2 群間で表記すればよかったのを、非常に誤解を招きやすい多群検定の表記をしていますね。それもコントロールに対してではない、全群の関係についての検定結果の表記ですから、F 検定か U 検定の結果のように見えてしまうんです。

この表に  $t$  検定としっかり記載しててあるところが問題ですね。

○澤田座長 これは、本質的には差が大きいですということを言いたいわけですね。

この表 24 というのは必要ですか。なくても余り評価には影響しないような気がして、かえって誤解を招きやすいかと思います。

どうぞ。

○丹生谷専門委員 これは、我々がそれを求めたことでありますから、2) に 10 個以上を用いて測定し、統計処理をし、考察することという求めたことに対する答えなんですから、それはなくてもいいと言うとかわいそうですね。

○澤田座長 この 10 以外に別表でデータが出ているわけですね。出てないですか。

○鶴身課長補佐 先ほどお話がありましたように、どういう検定をして、どういうあれでこれを書いているのかを確認して、紛らわしい表記であれば訂正するように。

○澤田座長 それでは、そのようにお願いします。

そうしますと、次のアレルギー患者血清を用いた IgE 結合能ですけれども、どうぞ。

○鎌田専門委員 4) に行く前に 3) なんですが、さっき丹生谷先生がおっしゃったように、今回の報告書を見ると、すべてが論理的でない。ここのことで言うと、そもそも全体の中で完熟したものにはパパインはないというふうに頭に入っていて、それなのにこれを検査して引っかかっているじゃないか、検査できているではないかというのは、そもそも論理的に自分たちがおかしい。

ここではなくて全体の要旨の最終のものを見ると、例えば 4 ページの下から 2 つ目の段落のところ、果実が成熟するにつれて乳液成分が減少するため、完熟果実に乳液は含まれておらず、よってパパイン活性はないとわざわざ書いてあって、その上でこれを使っているのは完熟のものを使っています。それはすごく矛盾したことだと思うんですが、そういうことはきちっとしていただきたい。

それから、今の回答書の方の 27 ページの上の方には有意差が認められたというのが一番上の段落に書いてあって、それはウイルスが感染していたからだと、感染していると高いということの説明として書いてあります。ところが、下から 3 つ目の段落のところは、逆

に低くなっている。低いのもウイルス感染しているからだと書いてあって、これはどう考えても論理的な議論をしているとは、私にはとても思えないので、先ほどの話も含めて全体なんですけど、もっと論理的にきちっと書いてほしい。そうしないと、何の説明にもなっていないというのが意見です。

○澤田座長 論理的な問題は、回答書はともかく概要の方が論理的に書かれてないと直さざるを得ないと思います。そこは直していただかないと。

次のアレルギーの血清の話は、これは宇理須先生ですか。

○宇理須専門委員 これをどうして求めたかというところ、相同性検索をしたところ6つのアミノ酸がアニサキスで引っかかったため、申請者がいろいろ考察をしたと思います。そこで、このIgE結合能チェックの話が出たのではないかと思いますけれども、違いますか。

○澤田座長 私もよく覚えていませんが。

○宇理須専門委員 むしろ、先生が6つで意味があるかどうかという検討をやられて、たしかIgE結合能はなかったんじゃないですか。

○手島専門委員 そうですね。6つのここで問題になっているアミノ酸を合成して、それでアニサキスの患者のIgE抗体と反応させたらば、反応はしなかったというデータは持っております。

○宇理須専門委員 そうですね。相同性検索で6つのアミノ酸でアニサキスがリストアップされ、いろいろ議論が起きました。アニサキス特異的IgE高値の血清も手に入るから、IgE結合能を示してほしいとなったんだと思うんですけども、その前にこちらで手島先生がやられて、IgE結合能がないというデータが出ているんですね。

○手島専門委員 私も正確に覚えていないんですが、1つはPRSV CPタンパク質とアニサキスタンパク質で、6残基の連続するアミノ酸で一致する配列があったので、血清試験をした方がいいかという議論があって、その部分は私たちもやっていたということ、あるいは6残基の相同性だからということ、アニサキス患者の血清を用いた試験までは求めなくてもいいかという状態だったと思います、もう一つ、余り正確に覚えてないんですけども、以前のデータでパピンの含量の報告を申請者が出したときに、アレルゲンであるパピンの含量がGMで少し高いというデータを出してこられたので、であるとすると、パピンのアレルギーの患者さんの血清を使ってノンGMとGMで主要アレルゲンのIgE結合能に差があるかということをしてできれば検討するというコメントになったんだと思います。それで患者血清は使えなかったからという結果が出されてきたんだと思います。

私が思いますのは、パピンをこの前の3番の中でポリクローナルの抗体を使って、EL

ISA で解析してしまして、その量を見ているので、これに関しては患者血清でなくてもポリクローナルの抗体でやっているということによろしいかと思えます。

○澤田座長 この(4)は内容的には概要書には反映されてないわけですね。そうすると、これは実質的に問題にはならないという解釈でよろしいですね。

そうしましたら、大腸菌の PRSV CP タンパク質の問題で、31、32 ページですけれども、これは手島先生、いかがでしょうか。これは、大腸菌で調製したものと実際のものが同じかどうかという問題ではないですか。

○手島専門委員 ちょっと正確には覚えていないんですけれども。

○澤田座長 結局、調製方法をきちんと書いてくれと、書いてあればよしとするということによろしいですか。

○手島専門委員 はい。

○澤田座長 あとマイナーな修正の方は、何か特段の御意見はよろしいですか。

○鎌田専門委員 マイナーもさっきと同じようなことがいっぱいありまして、1つは38ページのタンパク量を測定して、一日摂取量の有意なという話の中に、ほかのタンパクはちゃんと抗体を使ってやっているのに、GUS だけはなぜか MUG 分析ということで、蛍光基質を使った活性測定法で総抽出物の酵素活性を見て、酵素活性からタンパク量を推定するという非常に奇妙なことをやっていて、それでなぜこいつだけがこうなのか、ある意味では総抽出液の中のタンパク量を酵素活性で見て本当にいいのかと、要するに純品の濃度依存性から逆算してということをやっているんだけれども、普通はタンパク量推定という意味ではそういうことはしないと思うんですが、純品でないものをそんなやり方をすることは全くナンセンスなことだと思うんですが、それが1点おかしいことです。

○澤田座長 今のは38ページ一番下のところですね。

○鎌田専門委員  $\beta$ -グルクロニダーゼについては、55-1 系統から採取した葉及び果実の発現量を、MUG 分析法により測定したとなっていて、MUG 分析というのはあくまで GUS の活性を測定する方法です。本来、量を逆算するための方法でも何でもないのに、それから強引に逆算していること自身はかなりおかしいことなので、これは本当はちゃんと抗体を使って出していただくのが本来だと思うんです。

その上で、40 ページ一番上のところに、その全体の結論、⑩の修正としての結論があつて、その途中ぐらいから、なお、 $\beta$ -グルクロニダーゼに関しては通常呈色反応による発現を確認することから、定量値はありませんとわざわざここに書いてある。自分たちでいろんなタンパクの定量をしておいた上で、定量値はありませんと。

要するに、言っていることが全然一貫性がない、かなりひどい話なので、それも是非一貫性を持って説明してくださいということです。

もう一点、41 ページの⑬の回答の下のアンダーラインがあるところに「Color break が認められてから約7日～16日という短期間で果実は完熟するため、Color break で収穫され保管中に成熟した果実と成熟した状態で収穫された果実との間に大きな成分変化はないと考えられます」というのは、何が根拠なんですかと、1日だって保存の仕方が違えば、勿論、成分は変わるものなので、なぜこんなことをもって変らないというのか、全く理解に苦しむ表現だと思います。

○澤田座長 これは、成熟と未熟の違いがないという根拠がないということで、データを出し直せということになりますけれども。

○鎌田専門委員 逆に言うと、なぜ⑬の質問というか修正が出たのか、私には元がわからないので何とも言えないんですが、少なくともこの質問に対する回答にはなっていない。

○澤田座長 とにかく、これは何年前の申請でしたっけ。

○丹生谷専門委員 2年前ですね。

○澤田座長 実際に食べるのは成熟した果実で、木になっているもののデータを出したということですね。

○石見専門委員 想像なんですけれども、前の委員の先生が質問されたと思うんですけれども、日本の食品標準成分表というものがあるんですけれども、そこには完熟と未成熟と2つ記載があるんです。だから、このものについても、日本のスタンダードに合わせて記載するべきと思われたのだと思います。

○澤田座長 それは、今、考えると必要と思われませんか。

○石見専門委員 実際に摂取するのは完熟だと思いますので、安全性という意味からいって、未成熟、未完熟のものを食べたときに、どうなるかということをおっしゃりたかったと思うんですけれども、実際上はどうなのでしょう。

○澤田座長 概要書の方はどうですか。

○鶴身課長補佐 この⑬に関連するところとしては、記載はないです。

○石見専門委員 ただ⑫の方で、提出された概要書以降の主要構成成分の文献値には、日本における文献値も記載することという質問がありまして、実際に概要書のp87の表16なんですけれども、日本での文献値は完熟と未熟の2つを実際は載せているんですけれども、この組換え体自体に関しては、データはありません。

○山川専門委員 組換え体も元の非組換え体と同じように追熟し、成分が同じになること

を聞きたいわけですね。それが組換えのときの安全基準なんですけれども、重要な点ではないかと思います。

○澤田座長 どうぞ。

○日野事務局次長 想像なんですけれども、パパイヤは未熟果実も食べますので、概要の4ページには、未熟果実・完熟果実両方の平均値が書いてあります。ただ、ハワイの場合は多分完熟のものしか日本には入ってこないはずなので、それを明記させるとか、向こうがどれを意図しているのかわからないですけれども、向こうのデータとして出ているのは有害成分、BITCでしたか、それについてだけ未熟と完熟が出ているようなんですけれども、何を考えて、鎌田先生おっしゃるように、論理一貫性がこの辺でもないのかなと思います。言われたことは書くけれども、全体を見てないで部分的にばらばらになっているというのがあるのかもしれない。

○澤田座長 この概要に載っている構成成分とアミノ酸等の分析値は、完熟のデータなんですね。それは確認しておいた方がよろしいかもしれません。実際に食べる場合は完熟を食べるわけですね。安全性の観点から見ると。

○日野事務局次長 東南アジアとか沖縄ですと、青パパイヤを細かく切ってサラダにして食べます。ハワイのこの品種のパパイヤをそういうふうで日本で食べるのかわかりません。

○山川専門委員 最初の1月19日の概要の60ページに表13があるんですが「同じ成熟度の果実を選んだにもかかわらず、何らかの環境要因により生じたわずかな成熟度の違いが、このような結果をもたらした」と言っているのです、やはり組換え体と非組換え体でちゃんと同じように追熟してくれるんだということを言ってくれないと、まずいと思います。

○澤田座長 その成熟云々という話は、概要のどこに出ているんですか。

○日野事務局次長 76ページに「分析試料の調製」というのが書いてあります。BITCだけ成熟と未熟について両方分析したと書いてありますので、多分それ以外はどちらか、多分完熟の方だと思います。想像の域ですけれども。

○澤田座長 どうぞ。

○石見専門委員 少し戻って申し訳ないんですけれども、⑬の質問は、木で成熟した果実と保管中に成熟した果実の成分変化について求めているので、今、議論しているのは、完熟と成熟の値を出せということになっているので、⑬の質問の答えにはなっていないと思います。

○山川専門委員 なってないですね。確かにそのとおりです。

○山崎専門委員 日本に入る場合は、未熟の状態日本で輸入して後熟させるわけですね。

ですから、日本で食べることを考えたならば、木で完熟させたもののデータだけでは不足なんだろうと思います。ですから、⑬の回答は石見先生おっしゃられるように、きちんと回答してもらう必要はあると思います。

○澤田座長 そうすると、組換え体と非組換え体を用意して、時間を置いて成分の変化があるかないかを調べてくださいと。その成分に関しては、どれをやればいいですか。BITCですか。

○丹生谷専門委員 BITCは毒性成分として知られているので、ほかのものはわかりませんが、BITCは明確に毒性を持つということですから、本来、非組換えの場合は未成熟なものを収穫して、放っておいても成熟するんでしょうけれども、遺伝子組換えでも同じようにそうなるのかが知りたいんじゃないでしょうか。

○石見専門委員 やはりその場合も主要構成成分とビタミンC、ビタミンE、ミネラル辺りも調べていただいた方がいいと思います。

○澤田座長 少し頭が混乱してきましたけれども。

○日野事務局次長 当時の議事録を見て、何でこの質問が出たのか確認をして、その質問をされた先生、ひょっとすると私かもしれませんけれども、確認した上で皆さんに回覧して、その上で申請者にもう一回検討していただくということでいかがでしょうか。

○澤田座長 わかりました。そうしますと、いろいろ御意見をいただいたので、これはコメントをまとめて、一度、厚労省を通じて戻しまして、再度資料を提出していただきたいと思いますが、それでよろしいですか。

どうぞ。

○澁谷専門委員 少し戻ってしまって申し訳ないんですが、先へ進んでしまったので言いそびれたんですが、気になっているのはサザン分析のところで、フラグメントが3つぐらい入っている。最近だと、両側の配列を解析して、それで挿入された部位で内在性の遺伝子に影響しているか、していないかというのを、できるだけ調べるようになっていきますね。

特にはパパイヤは、ここに書いてあるように、ゲノム解析が終わっていると書いてあるので、そうするとやはり内在性の遺伝子に被っているか、被っていないぐらいのことはやってもらわないと、ほかの最近出ているものとの公平性がまずいという気がします。

最近、この前の案件もそうだったけれども、大体そういうものを付けてくるんですね。できる範囲でいいから、一応そういう観点の解析もやってもらわないと同列にならないのではないかとあって、少し気になったところです。

○澤田座長 パパイヤは全ゲノムの解析は終わっているんですね。



○澁谷専門委員 ここにショットガンで、この品種については全配列終わっていると書いてあります。書いているので、余計気になったんです。

○澤田座長 そうすると、ゲノム情報を考慮して周辺の配列を見て、ほかに悪さをしていないか確認してくださいということですね。

○澁谷専門委員 ほかとの横並びで考えれば、そういうことになると思います。

○澤田座長 どうぞ。

○小関専門委員 結局、1つの問題は、ここにあるのではないかと思うのは、彼らは最初の18年に出したものを第1版として、それに対して今回リバイス版という格好で出しているのですが、非常にわかりにくくなっているんです。今、先生おっしゃられたことは一応リバイス版の58ページに書いてはあるんです。だけれども、先ほど鎌田先生おっしゃられたとおり、変な付け加えとか、変なことをしたために、要するに概要書として最終的に出るのはこの本体ですね。この本体の中での矛盾点がわらわら出てしまっている。

例えばこれでいったときに、第一挿入部位と第二挿入部位と書いてあるけれども、NPT IIについては今回新たに見つかったと。では、次回も新たに見つかるのかと言いたくなるような書き方をしているので、そうではなくて、首尾一貫した形の要旨を一度書き直してもらった方が多分、そこできちんと見た方が、何かこのまま出て行くとすごく危ない気がするんですけれども、どう思われますか。今までリバイスした格好でやっていたけれども、ここまでぼろぼろというのは余りないですね。その辺はどうでしょうか。

○鶴身課長補佐 過去の経緯は多分、先生方の方がよく御存じだと思うんですが、確かに概要書自体がばらばらになっているので、全体をもう一度見直すようにという指摘をすればいいと思います。

石見先生からもコメントをいただいていた、先ほどの⑫のところも資料として用意していますし、コメントもいただいておりますので、その辺も踏まえて指摘をしたいと思いません。

○石見専門委員 その件ですが、概要書の78ページの表16と80ページの表18、それぞれ日本の文献値を2つ載せているんですけれども、現在使われているのは、この五訂増補日本食品標準成分表という方です。その前の五訂方式というのはわからないんですけれども、この数値を見るとおそらく四訂のものではないかと思われます。食品成分表は2000年に四訂から五訂に改訂されまして、恐らくこれは四訂の値を出していると思うので、この表16では文献1を、表18では文献5を削除していただいて、適正に表示していただければと思います。

以上です。

○澤田座長 それを含めまして、概要書を改訂して、論理的に読みやすくしてくださいということですね。

どうぞ。

○丹生谷専門委員 2年かかって書き直したものがこれではだめだということでしたら、もう一度と言っても埒が明かないのではないかという心配があるんです。ですから、そこはより親切に、ここはこういうふうに書きなさいというのを、この時間ではとても言えませんが、何らかの形で相手側に示してあげないと、これが2回目だとしても、3回目がそんなに期待できるとは私は思えません。

○和久井専門委員 コメントなんですけれども、今やっと理解できたのですが、改訂版概要書のデータは全部再度測定し直しているんですね。改訂版の概要書のパインの量も旧版のものと数字が合わないのでおかしいと思ったんですが、改訂版概要書・追加資料8のところのP値を概要書に記載しているんです。ところが、追加資料8にはt検定を行ったとは記載していないんです。違う検定法が記載されています。

ですから、他の点もありますが、改訂版概要書の日本語の文章はかなり粗雑というところと語弊があるんですけれども、英語のレポートの方は結構しっかりしているんです。ですから、むしろ英文のレポートの方をもう少し正確に翻訳していただいてまとめ直していけば、結構きれいな形の概要書になるのではないかと思います。幾つかの英文の訳に間違いがあります。

○小関専門委員 私が思ったことも似たようなことで、丹生谷先生がおっしゃられていることについてなんですけれども、結局、彼らは元のをリバイスする形で提出しなければいけないと誤解している可能性がある。だとすると、こんな形になってきてしまうんです。それはそうではないですと言ってあげて、それできれいにしてくださいと。だから、そこが誤解なのか、もともとこういうふうにやろうと思ったのかわかりませんが、そこは一度相手に聞いてみないとわからないと思います。元のを何とか生かして無理突っ込んできているんですね。

最終的に出て行くのはこの概要ですね。概要がきちんとした論理構成の上に立ったものでなければ、やはりこの委員会から外には出せないというのは、基本的な原則になるのではないかと思いますので、やはり矛盾点があるとか、記載が途中から付け加えたような形になっているのでおかしくなっている。本来だったら、第一、第二、第三挿入という形で並べて書いていくべきところがそうになっていないとか、その辺は最終的に出て行く形を我々

は責任を取らなければいけないと思うので、そこはそのようにしてくださいという指摘をせざるを得ないのではないのでしょうか。

○澤田座長 どうぞ。

○丹生谷専門委員 先ほど和久井専門委員がおっしゃったように、分析し直しているというのがありましたね。サザンプロットも全く新しくしているんです。ですから、やはり彼らは努力して新しいものにしたというのは評価してあげるべきだと思います。あとはそれ以外のデータの問題ではなくて、書き方、表現の仕方、論理の進め方なので、例えば今、小関専門委員が言われたようなことは、相手に具体的なストーリーをちゃんと何らかの形で伝えない限りは、この委員会でそうだと言っているわけで、相手に伝わってないとそれは相手にとっては何のことかわからないと思います。

○澤田座長 結局、いろいろ御意見が出ましたので、コメントをとりまとめて一度皆さんにお配りして見ていただいた上で、どうするか決めさせていただきたいと思いますけれども、よろしいでしょうか。

(「はい」と声あり)

○澤田座長 それでは、大分時間がかかりましたけれども、議題1につきましては、これで終わりたいと思います。

その他で、何か事務局からございますでしょうか。

○鶴身課長補佐 特にございません。

○澤田座長 ありがとうございます。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。

今後の予定等について、事務局から御連絡いただければと思います。

○鶴身課長補佐 次回の日程ですが、御都合を御確認させていただいたところ、4月18日の金曜日の午後がよろしいかと思っておりますので、よろしく願いいたします。

○澤田座長 それでは、次回は4月18日ということで、よろしく願いします。

以上をもちまして、第60回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。長い間、どうもありがとうございました。