

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第 73 回 会 合 議 事 録

1. 日時 平成 21 年 9 月 14 日 (月) 13:59～17:46

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

- ・ 除草剤グリホサート耐性トウモロコシ NK603 系統と除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ T25 系統を掛け合わせた品種
- ・ PHE-No.2 株を利用して生産された L-フェニルアラニン
- ・ GLU-No.2 株を利用して生産された L-グルタミン酸ナトリウム
- ・ チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統 (食品)
- ・ 高オレイン酸含有ダイズ DP-305423-1 (食品)

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、宇理須専門委員、小関専門委員、鎌田専門委員、手島専門委員、丹生谷専門委員、飯専門委員、山川専門委員、和久井専門委員、渡辺専門委員

(委員)

小泉委員長、長尾委員、畑江委員、廣瀬委員、見上委員、村田委員

(事務局)

大谷事務局次長、北條評価課長、前田評価調整官、鶴身課長補佐、松尾係長

5. 配布資料

資料 1

食品健康影響評価に関する資料

- ①除草剤グリホサート耐性トウモロコシ NK603 系統と除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ T25 系統を掛け合わせた品種
- ②PHE-No.2 株を利用して生産された L-フェニルアラニン
- ③GLU-No.2 株を利用して生産された L-グルタミン酸ナトリウム
- ④チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統 (食品)

⑤高オレイン酸含有ダイズ DP-305423-1 (食品)

資料 2 専門委員からのコメント

- ・PHE-No.2 株を利用して生産された L-フェニルアラニン
- ・GLU-No.2 株を利用して生産された L-グルタミン酸ナトリウム
- ・チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統 (食品)
- ・高オレイン酸含有ダイズ DP-305423-1 (食品)

参考資料 安全性評価に係る指摘事項について

- ・チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統 (食品)
- ・高オレイン酸含有ダイズ DP-305423-1 (食品)

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、少し早目ですけれども、ただいまから第 73 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。

本日は所用によりまして、五十君専門委員、石見専門委員、橘田専門委員、澁谷専門委員、山崎専門委員が御欠席とのことです。宇理須先生は少し遅れて来られるとのことでもあります。

今日の議題でありますけれども、新規品目であります「除草剤グリホサート耐性トウモロコシ NK603 系統と除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ T25 系統を掛け合わせた品種」、「L-フェニルアラニン」、「L-グルタミン酸ナトリウム」、継続品目であります「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統」、「高オレイン酸含有ダイズ DP-305423-1」の安全性の審議となります。

それでは、お手元の資料を確認いたしたいと思えます。事務局からお願いします。

○前田評価調整官 それでは、配付資料の御確認をいただく前に、7 月 24 日付けで事務局の人事異動がございましたので、御報告いたします。私は前田と申しますが、7 月 24 日付けで異動をしまりました。よろしく願いいたします。

それでは、議事次第に基づきまして、配付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、これら以外の参考資料につきましては、ファイルにとじまして委員の皆様の上の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す。次回また配付を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。

また、お手元の資料のほかに、委員の皆様には本日御審議いただきます予定の品目につきまして、申請者作成の資料等を事前に送付させていただきます。なお、この議

事次第に記載してございますが、本日審議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」に基づいて、座長に資料内容の確認をいただき、企業の知的財産を侵害するおそれがある箇所が含まれているということで、非公開で審議を行わせていただきます。

また、審議は非公開となりますが、国民への説明責任や透明性の確保の観点から、開催予定日時などは公開し、会議が非公開であることを明示してございます。今後の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がある箇所を削除した上で、速やかに公開いたします。

審議に用いました各種の試験結果の概要及び評価結果をまとめました評価書（案）を作成し、食品安全委員会へ報告して公開といたしてございます。

事務局からは以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、早速議題（1）の審議に移らせていただきたいと思います。本日は案件が少し多めですので、速やかな進行に御協力のほど、よろしく願いいたします。

まずは新規品目であります除草剤耐性トウモロコシの2つの系統の掛け合わせ品種についてであります。それでは、事務局から説明をお願いします。

○松尾係長 プラスチックの緑のファイルをお手元に御用意いただけますでしょうか。この資料に基づきまして御説明をさせていただきます。

1 ページ、本掛け合わせ品種は改変 *cp4 epsps* 遺伝子から発現する改変 CP4 EPSPS タンパク質によって除草剤グリホサート耐性能が付与されたトウモロコシである NK603 系統と、*pat* 遺伝子から発現する PAT タンパク質によって除草剤グルホシネート耐性能が付与されたトウモロコシ T25 系統を従来の伝統的な交配手法を用いて掛け合わせたものでございます。

次のページにまいりまして、図 1 に本品種の育成図が記載されております。

一番下のパラグラフにまいりまして、掛け合わせの安全性評価の考え方に基づきますと、本掛け合わせ品種は①「挿入された遺伝子によって、宿主の代謝系には影響がなく、害虫抵抗性、除草剤耐性、ウイルス抵抗性などの形質が付与されるもの」同士の掛け合わせに相当すると考えられるということでございます。したがって、以下の項目を満たしているかどうかについて検討がなされております。

「1. 掛け合わせた品種において、組換え DNA 操作による新たに獲得されたそれぞれの性質が変化していないこと」ですが、NK603 系統中で発現する改変 CP4 EPSPS タンパク質と機能的に同一である EPSPS は、シキミ酸合成経路の律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大したとしても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられています。

また、基質であるホスホエノールピルビン酸塩とシキミ酸-3-リン酸塩と特異的に反応することが知られており、これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているシキミ酸は、その反応性が S3P の 200 万分の 1 であることから、改変 CP4 EPSPS タンパク質は、

植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられています。

T25 で発現する PAT タンパク質は、除草剤グルホシネートの有効成分である L 型ホスフィントリシンをアセチル化するが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、転移反応を生じさせることもありません。

また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、PAT タンパク質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は、阻害されることはありませんでした。これらのことから、PAT タンパク質が植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられます。

したがって、本掛け合わせ品種においても、植物代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられます。

実際に親系統由来の発現タンパク質が、相互作用を示していないことを確認するために、生物検定が行われております。

4 ページ、まずは除草剤グリホサートを用いた生物検定でございます。本掛け合わせ品種、NK603、非組換え体に除草剤グリホサートを散布してから 10 日後に、除草剤による植物体の障害程度を調査しました。なお、グリホサート散布量は、通常の散布量及び通常の 32 倍の散布量で検定が行われております。調査の結果、以下の表 1 に示しますとおり、障害の程度に統計学的な有意差は認められませんでした。

続きまして、除草剤グルホシネートを用いた生物検定ですが、先ほどと同様に本掛け合わせ品種、T25 系統、非組換え体に除草剤グルホシネートを散布してから 10 日後に、除草剤による植物体の障害程度の調査がされております。なお、グルホシネート散布量は、通常の散布量及び通常の 32 倍の散布量で検定が行われております。調査の結果、以下の表 2 に示しますとおり、障害の程度に統計学的な有意差は認められませんでした。

以上のことから、それぞれの親系統で発現するタンパク質間で相互作用はなく、導入した遺伝子によって新たに獲得されたそれぞれの性質は、本掛け合わせ品種において変化していないと結論されました。

2. NK603 系統及び T25 系統は、いずれも分類上同一の種であり、亜種間の掛け合わせではありませんということです。

3. NK603 系統、T25 系統、これらを掛け合わせた品種におきまして、摂取量、食用部位、加工法等に変更はございません。

以上のことから、本掛け合わせ品種については、食品としての安全性には問題ないと判断されたということでございます。

説明は以上でございます。

○澤田座長 どうもありがとうございました。それでは、申請書につきまして、先生方からの御意見を賜りたいと思います。

1～3 ページにかけまして、何か御意見ございますでしょうか。よろしいでしょうか。これは CP4 EPSPS と PAT ですので、いつも出てくるものかと思えます。T25 に関しまして

はかなり古いものだと思いますけれども、この委員会に出る前の品種ではないかと思いません。

4 ページから最後にかけて、御意見ございましたらお願いいたします。

特段の御意見がないようですので、引き続きまして評価書（案）の審議に移りたいと思います。事務局の方から御説明をお願いします。

○松尾係長 それでは、評価書（案）の説明をさせていただきます。お手元に配付してあります資料 1 の御用意をお願いいたします。

1 ページからが評価書（案）になっております。4 ページから御説明をさせていただきます。

「Ⅰ．評価対象食品の概要」ということで、名称、性質、申請者、開発者を記載させていただきます。

概要といたしまして、本食品は除草剤耐性の形質が付与された 2 つの系統を、従来からの手法で掛け合わせたものである。本品種の親系統であります NK603 系統及び T25 系統につきましては、それぞれ安全性の評価が終了しており、いずれもヒトの健康を損なうおそれはないと判断されている。

「Ⅱ．食品健康影響評価」にまいりまして、「1．挿入された遺伝子による宿主の代謝系への影響はなく、除草剤耐性の形質が付与されている品種同士の掛け合わせである。」の項に関しまして、NK603 に導入された遺伝子により産生される改変 CP4 EPSPS タンパク質は、シキミ酸合成経路の律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないことから、その作用機作は独立しており、植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

T25 に導入された遺伝子により産生される PAT タンパク質は、特異的にグルホシネートをアセチル化する酵素であり、高い基質特異性を有していることから、その作用機作は独立しており、植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

以上のことから、いずれの形質もその作用機作は独立しており、トウモロコシ NK603 とトウモロコシ T25 を掛け合わせた本品種においては、互いに影響し合わないと考えられる。

2．本品種は亜種レベル以上の交配ではない。

3．本品種の摂取量、食用部位、加工法等には変更はない。

以上 1～3 の結果から、本品種につきましては「遺伝子組換え植物の掛け合わせについての安全性評価の考え方」に基づき評価した結果、改めて安全性の確認を必要とするものではないと判断したとなっております。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、4 ページと 5 ページしかありませんので、まとめましてコメントがございましたらお願いしたいと思います。細かい字句等の修正につきましては、後ほど事務局までお伝えいただければと思います。

○村田委員 1 点教えていただいてもよろしいでしょうか。評価書自体は全然問題ないんで

すけれども、教えてほしいんですが、EPSPSがシキミ酸合成経路の律速酵素ではないと記述されていますけれども、シキミ酸合成の律速酵素は何になるのでしょうか。

○小関専門委員 DHP Synthase だと思います。一番上流の方です。

○村田委員 これは途中にあるというだけになるわけですね。わかりました。ありがとうございます。

○澤田座長 ほかにコメントよろしいでしょうか。それでは、御意見がないようですので、御了承いただいたことにさせていただきます。ありがとうございます。

それでは、次はフェニルアラニンでありまして、本件も新規の品目であります。これは高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方にに基づき申請書が提出されております。事務局から御説明をお願いします。

○鶴身課長補佐 それでは、お手元のピンク色のファイル、ID-175と書かれました「PHE-No.2株を利用して生産されたL-フェニルアラニン」、申請者が味の素株式会社というファイルを御準備いただけますか。

資料本文というタグからになります。「1.L-フェニルアラニンの概要」が記載されております。

1-1として、以下に示されておりますように、L-フェニルアラニンについては食品添加物の公定書に収載をされた指定添加物であり、以下の物理化学的性質が確認できるというものでございます。

次のページ、1-2の用途といたしましては、栄養補給を目的とするスポーツ栄養食品、飲料、調味料等に用いられているということでございます。

3ページ、2.製造方法の概要ということで、2-1は生産菌株の作製です。これはPHE-No.2株となっておりますけれども、PHE-No.1株が既に申請がございまして、そこに記載がされておりますように、平成19年に高度精製ということで申請があり、安全性評価が終わっているものを用いて、更にそれらに従来は利用できなかった●●●の資化能を付与したというものでございます。その下の図にありますように、もともと*E. coli* K-12株を利用してPHE-No.1株を作った。ここまでは安全性評価が終わっているもので、その後●●●の資化遺伝子の導入をして、No.2株を作ったというものでございます。

2-1-1はPHE-No.1株の作製ということで、ここは従来と同じ記載となっております。簡単に申し上げますと、宿主は*E. coli* K-12株を利用して、ベクターはmini-Muを使用しております。挿入遺伝子といたしましては、遺伝子がA~Jまで10個の遺伝子、いずれも*E. coli* K-12株に由来する遺伝子ですが、これを導入して生産効率を高めたものとなっております。

更に内在性の遺伝子Kの下流に*E. coli*由来の遺伝子Lを導入しております。これは●●●させるために導入がされております。これらを利用してPHE-No.1株が作製されております。

4ページの下の方「2-1-2 PHE-No.2株の作製方法」ということですが、先ほど

の No.1 株を用いて、同じくベクターとしては mini-Mu を用いております。

「(2) 挿入遺伝子」ですが、*E. coli* を由来とする遺伝子 Q~T まで 4 つの遺伝子を導入しております。いずれも糖の資化に関連するということで、生産効率を高めるものでございます。

5 ページの下の方に参考として、それぞれ挿入した遺伝子の機能が記載されております。いずれも糖の資化に関連をしたものでございます。

7 ページは構築の概要です。7 ページが PHE-No.1 株で従来のもと同じものとなっております。

8 ページが PHE-No.2 株ということで、PHE-No.1 株から mini-Mu ベクターを用いて、4 つの遺伝子を 1 つの組み込みユニットで導入をしているということでございます。

9 ページ「2-2 L-フェニルアラニンの製造方法」ですが、発酵液に●●●をした後に、生産菌を系外に除去、●●●することで、●●●を得ております。更にその得られた●●●し、●●●を用いて精製をして晶析、分離をすることで、高純度の L-フェニルアラニンを取得したというものでございます。

10 ページ「3. 申請品目と現行製品の実質的同等性の確認」ということで、(1) に規格の分析の結果が記載されております。表 1 にございますとおり、いずれの項目も食品添加物の規格を満たしております。現行品と同等と考えるとされております。

11 ページ(2) に不純物プロファイルの比較ということで、アミノ酸分析と液クロの 2 つの方法、合計 3 つの方法で比較がされております。

i) アミノ酸分析による結果としては不純物を検出せずということで、アミノ酸分析では検出限界以上の不純物は観察されなかった。

ii) になりますけれども、HPLC 法-1 ということで、親水性の不純物を測定しておりますが、不純物は検出されなかったということでございます。

iii) HPLC 法-2 ということで、疎水性の不純物を測定しております。表にありますように、16.4 分のところに現行品と同じピークが認められておりますけれども、いずれのロットも検出限界以下であったということでございまして、上記 i ~ iii の結果から、定量限界以上の新規の不純物、増加の不純物は検出されず、現行製品並みであるということが確認されたということです。

(3) として残存タンパクになります。従来ドットプロットで行ってございましたけれども、今回は膜濃縮ブラッドフォード法という方法で試験がなされております。従来の方法ではばらつきが大きいということで、今回この方法を用いたということでございますが、詳細については添付資料 3 を御覧ください。

「膜濃縮ブラッドフォード法に関する資料」ということで「1. 分析原理」といたしましては、試料溶液の濃縮の過程、タンパク質の定量という 2 つのプロセスを組み合わせているものでございます。それぞれの方法については既存の方法を組み合わせるものということでございます。

「1-1. 試料溶液の濃縮」ですが、試料中の微量タンパクを●●●からなっております。

フィルタについては、●●●となっておりますけれども、これらを用いたということでございます。

「1-2. タンパク質の定量」といたしましては、一般的なタンパクの定量法であるブラッドフォード法を用いたということです。

次のページに概略図が記載されておりますけれども、半分から上のところで試料溶液の●●●という過程を経て、ブラッドフォード法で測定をしているものでございます。

3 ページの下から、本生産株 PHE-No.2 株を利用して生産されたフェニルアラニンのタンパクの定量試験が記載されておまして、4 ページに添加回収率として●●●検体の結果が記載されております。回収率の平均は●●●%ということでございます。下の方に検出限界の値として、1 ppm と記載されております。

5 ページの一番上にまいりまして、申請品目の3つのロットについて本方法で試験をしたところ、いずれも検出限界 1 ppm 未満であったということでございます。

4. は1つのロットについてですが、従来のドットプロット法と比較がされておまして、いずれも検出限界未満であったということです。

以降のページに、日本食品分析センターの試験成績書が掲載されております。

最初のところに戻っていただいて、12 ページになりますけれども、先ほどのとおり残存タンパクについては、検出限界 1 ppm で検出をせずということになっております。

13 ページ、これらの結果から、高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方の要件をすべて満たすと考えるとされております。

説明は以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。では、申請書につきまして項目ごとに先生方からの御意見をちょうだいしたいと思います。

まず最初の1~2ページ、これは食品添加物としての概要でありますけれども、このページに関しまして、何か御質問ございませんでしょうか。

申請書の3~9ページで、これは製法の概要となりますが、コメント等ございましたら、お願いをしたいと思います。味の素の遺伝子組換えは、いつもプロセスが非常に多くて読みこなすのが大変だと思いますけれども、前回かなりいろいろな遺伝子を入れて、今回また4つぐらい入れたこととなります。いずれも相同組換えかと思えます。よろしいでしょうか。

10~13 ページにかけまして、コメントがございましたら、お願いしたいと思います。

○鶴身課長補佐 山崎先生からコメントをいただいておりますので、御紹介をさせていただきたいと思えます。

本日お配りしております資料2で配付をさせていただいておりますけれども、1ページになりまして、フェニルアラニン、この後のグルタミン酸も同じですけれども、タンパク

の残存試験をドットプロットではなく、膜濃縮後にブラッドフォード法で行っていることについてということで、●●●のユニットを使っているが、一般的にタンパク濃縮に利用される器材である。

●●●を使って添加回収試験を行っている。

3)として、●●●濃縮、添加回収率、ブラッドフォード法の検出限界などを組み込んで、タンパクの残存試験の検出限界値を算出していること。

ブラッドフォード法の測定に妨害を与えないアミノ酸濃度を確認して、試験をしていること。

これらを考慮すると、タンパクの残存試験として適切に計画・実施されていると判断をしますというコメントをいただいております。

○澤田座長 ただいま山崎先生のコメントを御紹介いただきましたけれども、ほかの先生方から何かコメントはございますでしょうか。

それでは、特段の御意見がないようでございますので、引き続きまして評価書（案）の審議に移りたいと思います。事務局の方から御説明をお願いします。

○鶴身課長補佐 本日お配りしております資料1の10ページになります。

「Ⅰ. 評価対象添加物の概要」といたしまして、名称はPHE-No.2株を利用して生産されたL-フェニルアラニン。

用途といたしましては、栄養補給を目的とする食品、飲料及び調味料等。

申請者、開発者は記載のとおりとなっております。

本添加物はL-フェニルアラニンの生産効率を高めるため、*E. coli* K-12株の突然変異株を宿主として、生合成に関与する遺伝子の導入及び糖の資化に関与する遺伝子の導入を行ったPHE-No.2株を用いて発酵生産をされたL-フェニルアラニンである。L-フェニルアラニンについては食品添加物として指定され、成分規格が添加物公定書に記載されている。

宿主である*E. coli* K-12は、有害な影響を及ぼす毒素の産生性や病原性は知られておらず、OECDでは優良工業製造規範が適用される宿主微生物として認定がされている。また、抗生物質耐性マーカー遺伝子を有さない。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」として、1. 本添加物は製造工程において、使用微生物及び発酵副生成物が除去され、晶析により結晶として高度に精製されており、添加物公定書規格の含有規格を満たしている。

2. 非有効成分について、最終製品において、(1)タンパク質は検出限界未満である。

(2)食品添加物公定書規格の成分規格を満たしている。

(3)アミノ酸分析及びHPLC分析による分析の結果、従来のL-フェニルアラニンに存在しない不純物は検出されず、また、従来品に存在する不純物については、従来品の含有量の振れ幅の範囲内であった。

以上(1)～(3)の結果から、従来品と比べて既存の非有効成分の含有量が、安全上

問題となる程度にまで有意に増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられる。

以上1、2の結果から、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方にに基づき、安全性が確認されたと判断をした。したがって、本則による改めての評価は必要ないと判断した。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、ただいまの評価書（案）、10ページ1枚でありますけれども、御意見、コメントを賜りたいと思います。細かい字句等の修正等につきましては、後ほど事務局までお伝えいただければと思います。コメント、御意見がございましたら、よろしくお願ひします。

○澤田座長

それでは、特段の御意見がありませんので、御了承いただいたものとさせていただきます。

次に、同じくアミノ酸でありまして、グルタミン酸ナトリウムの審議に入らせていただきたいと思ひます。本件も新規でありまして、やはり高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方にに基づきまして、申請書が提出されております。事務局から御説明をお願いします。

○鶴身課長補佐 ブルーのファイルでございまして、ID181「GLU-No.2株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム」というファイルを御用意お願ひいたします。

めくっていただいて、タグの資料本文というところになります。1ページから御説明をさせていただきます。

1. は概要ということで「1-1. L-グルタミン酸ナトリウム」については、指定添加物として以下の成分規格が定められているものでございます。

2 ページにまいりまして、用途としては、うまみ成分で調味料として広く利用がされているものでございます。

3 ページ目は製造方法の概要ということで「2-1 L-グルタミン酸ナトリウム生産菌株の作製方法」です。図1に生産菌株の育種過程が記載されております。

Corynebacterium glutamicum ATCC13869株を宿主としておりますけれども、右側の端のライン、真ん中のラインについては、いずれも平成15年に厚生労働省時代のときに評価が終わっておりまして、セルフという判断がされているものでございます。今回は真ん中のところにありますが、19A07という株から左側に伸びまして、濃い緑になりますけれども、プロモーターの部分に●●●塩基の置換を入れている。操作自体は右端のラインと同じ操作になりますけれども、19A07株を使ってプロモーターの増強をしている。

それから、GLU-No.1株を使って●●●遺伝子を欠失させているというものでございます。この操作自体も真ん中のラインの●●●から●●●への操作と同じ操作となっております。同じ操作ですのでセルフでもという話もあるのかもしれませんが、申請者の方では

高度精製で申請をしてきたということでございます。

次のページをめくっていただいて「2-1-1. 19A07株の作製方法」。これは平成15年に厚生労働省へ申請した内容と同じ記載になっております。

簡単に御紹介をしますと、宿主菌としては *C. glutamicum* ATCC13869 株由来の突然変異株を用いて、ベクターといたしましては pHSG299 を用いております。挿入遺伝子としては ●●● 遺伝子の一部、●●● のプロモーター部位を挿入したものであるということで、このプロモーター部位に ●●● 塩基の改変を入れているということでございます。

5 ページの 2-1-2 は、19A07 株を用いて GLU-No.2 株の作製ということでございますけれども、ベクターといたしましては ●●●、pCR2.1 を用いております。挿入遺伝子としては ●●● 遺伝子の一部、それから、そのプロモーター部分を挿入したものである。このプロモーター部分に ●●● 塩基の改変を入れておまして、プロモーターを増強したということでございます。

その次の行になりますけれども、●●● 遺伝子の一部を挿入したものであると、●●● 塩基の欠失をして、この遺伝子自体を欠失しているというものでございます。

(4) に最終的に構築された GLU-No.2 株が記載されておりますけれども、●●● 遺伝子のプロモーターに ●●● 塩基の変異、6 ページ 2 パラ目になります、グルタミン酸前駆体の代謝酵素 ●●● 遺伝子を欠失させているというものでございます。

7 ページ「2-2. L-グルタミン酸ナトリウムの製造方法」ということで、発酵により得られた発酵液を ●●● した後、●●● と書いてありますけれども、●●● と聞いておりますが、●●● により発酵副生成物や生産菌を系外に除去する。次に、得られた ●●● して、●●● した後、晶析、分離をすることで高純度の L-グルタミン酸ナトリウム結晶を得るというものでございます。

8 ページ、同等性の確認ということ (1) に添加物の規格基準の分析結果が記載されております。いずれの項目も適合しており、品質は現行製品と同等とされております。

次のページは不純物プロファイルの比較ということ (i) アミノ酸自動分析計による比較」で 2 つのアミノ酸が検出されておりますけれども、いずれも定量限界未満ということで、新規の不純物は検出されていない。また、検出されたアミノ酸はいずれも定量限界未満だったということでございます。

「ii) 不純物検出 HPLC 法-1 による比較」。これは親水性の不純物の測定ですが、次のページになりますけれども、幾つか確認がされておりますが、新規の不純物は検出されておらず、また、検出された不純物は現行品の振れ幅の範囲内であったということでございます。

「iii) 不純物検出 HPLC 法-2 による比較」ということで、疎水性の不純物の分析を目的として行われております。以下の表にございますとおり、一番最後の ●●● が現行品よりも約 2 倍ぐらいの値にはなっておりますけれども、右端の振れ幅 3σ をとると、その値

よりも低かったということで、11 ページにまいりまして、新規の不純物は検出されず、検出された不純物は振れ幅の範囲内であったということが記載されております。

(3) は残存タンパクとして先ほどのフェニルアラニンでございましたように、膜濃縮ブラッドフォード法で分析がされております。このグルタミン酸の場合、非常に回収率が低くて回収率●●●となっておりますが、補正をして計算がされておりました、検出限界が1 ppm で検出せずという結果になっております。

これらの結果から、高度に精製がされた非タンパク質性の添加物の安全性評価の考え方の要件を満たすと考えられるとされております。

説明は以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思っております。

まず2 ページまでで食品添加物としての規格でありますけれども、何か御質問ございませんでしょうか。

それでは、製造方法の概要で申請書の3～7 ページになりますが、ここに関しまして御意見等ございましたら、お願いしたいと思います。丹生谷専門委員、どうぞ。

○丹生谷専門委員 3 ページの図1 ですけども、後の評価書に少し気になる部分があって、その関係でこの段階で指摘させていただきますが、図の左側の一番下にL-グルタミン酸前駆体の代謝遺伝子●●●消失と書いていますけれども、これは括弧の中にあります構造遺伝子のところに●●●塩基を欠失させたためにタンパク質の活性がなくなったということで、遺伝子自体が消失という、ごっそり抜けるようなイメージがありますが、そうではないということを確認して、後で評価書のところでまた指摘させていただきます。

○澤田座長 今の御意見は、図1 の左側の説明のブルーの「●●●消失」というところが、●●●活性消失ですか。もし直すといいたしましたら、何かこういうふうに書いた方がいいという案はございますか。

○丹生谷専門委員 ついでに、そのことは6 ページの5 行目を見ていただくとはっきりするんですけども「●●●の構造遺伝子内の●●●塩基を欠失した」。この意味では欠失という言葉は正しいんですが、その後の行で「この変異により●●●活性が消失し」と書いています。

一方、そのことを遺伝子の欠失という書き方をしている。例えば4 ページの上から5 行目に、今の内容のことを「代謝遺伝子(●●●)を欠失することによって」と書いてあるので、ちょっと違和感がありました。

○澤田座長 それでは、酵素活性の消失という表現でしたら問題ないわけですね。しかるべく正確に直してもらいたいと思っております。ほかによろしいでしょうか。

それでは、最後の8～11 ページにかけまして、コメントがございましたらよろしく願います。渡辺専門委員、どうぞ。

○渡辺専門委員 ここで今回作ったものの評価をしているんですけども、従来のと少し

違いを感じているのは、GLU-No.1からNo.2を作ったということで、その改良を含めての話だと思うんですが、安全性には全く問題はないんですけれども、出ているデータが申請品目に対して現行製品とあって、理系の感覚で言うと現行製品というのがどれに当たるのか。つまりNo.1で作ったものなのか、もっとさかのぼって前のものなのか、結果は全く問題ないんですけれども、比較した前のものが現行とか従来品目というのがどれに当たるのかが私には見えなくて、明確にさせていただいた方がいいかなと思っただけです。安全性には全く問題ないです。

○澤田座長 事務局の方で、もし何か聞いていましたら。

○鶴身課長補佐 済みません、8ページの現行製品とは、現在販売しているものというところまでしか確認ができておりませんので、ここの部分をもう少し具体的に正確に記載をしていただくことにさせていただいてよろしいでしょうか。

○澤田座長 No.1が承認されたのは大分前ですね。

○鶴身課長補佐 No.1は承認されていないです。右側の●●●、●●●、もしくは全く改変をしていないものもあるかもしれないです。

○澤田座長 それでは、その辺を一応追加で明らかにさせていただくことにさせていただきたいと思います。

ほかに御質問ありましたら、よろしくお願ひします。

それでは、マイナーな点でありましたけれども、消失という言葉は直していただくということと、現行製品の内容をきちんと明記していただくということで、安全性上の問題としては特段問題はないということでありますので、引き続き評価書（案）の審議に入らせていただきたいと思います。事務局から御説明をお願いします。

○鶴身課長補佐 お手元にお配りしております資料1の14ページになります。

「Ⅰ. 評価対象添加物の概要」といたしまして、名称としてGLU-No.2株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウムということでございます。

本添加物はL-グルタミンの生産効率を高めるために、*C. glutamicum* ATCC13869株由来の突然変異株を宿主として、グルタミンの生合成に関与する遺伝子のプロモーターの改変及びL-グルタミン酸前駆体の分解に関与する遺伝子の欠失を行ったGLU-No.2株を用いて発酵生産されたL-グルタミン酸ナトリウムである。L-グルタミン酸ナトリウムは食品添加物として指定され、成分規格が食品添加物公定書に記載されている。

宿主である*C. glutamicum* ATCC13869株は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に分類されている。また、抗生物質耐性マーカー遺伝子を有さない。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」として、1. 本添加物は製造工程において使用微生物及び発酵副生成物が除去され、晶析により結晶として高度に精製されており、食品添加物公定書規格の含量規格を満たしている。

2. 非有効成分について、最終製品において（1）タンパク質は検出限界未満である。

(2) 食品添加物公定書規格の成分規格を満たしている。

(3) アミノ酸分析及び HPLC 法による分析の結果、従来品に存在しない不純物は検出されず、従来品に存在する不純物については振れ幅の範囲内であった。

以上(1)～(3)の結果から、従来品に比べて既存の非有効成分の含有量が安全上問題となる程度にまで有意に増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられる。

以上の結果から、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方にに基づき、安全性が確認されたと判断した。

したがって、本則による改めでの評価は必要ないと判断したとさせていただきます。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、ただいまの14ページに関しまして、コメント、御意見がございましたらお願いしたいと思います。細かい字句等の修正につきましては、事務局まで後ほどお伝えいただければと思います。丹生谷専門委員、どうぞ。

○丹生谷専門委員 先ほども申し上げたのですが、14ページの33行目に「遺伝子の欠失」と言いますと、先ほどの理由で全体がなくなってしまったことになりますから、考えたんですけれども、例えば「欠失変異の導入」と書けば●●●塩基だけの欠失になりますので、一例を挙げさせていただきました。

○澤田座長 要約のところも同じでよろしいわけですね。

○丹生谷専門委員 はい。

○澤田座長 鎌田専門委員、どうぞ。

○鎌田専門委員 すごくマイナーな話ですが、その上に「L-グルタミン酸前駆体の分解」と書かれていて、分解と言うとどちらかというと捨てる方のタイプなので、これはサイクルで回しているものなので、代謝の方がいいのではないかと思います。

○澤田座長 それは代謝に直したいと思います。ほかにございませんでしょうか。

それでは、評価書に関しましては、言葉を2か所直していただくということで御了解いただけたと思います。ありがとうございます。いただいた修正につきましては、事務局と座長の方で確認をして、食品安全委員会にその後御報告ということになるかと思えます。

次の議題であります、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 の食品の審議に入らせていただきたいと思えます。これは継続の品目でありまして、今年7月の専門調査会で審議を行い、指摘事項を出したものであります。指摘事項に対する回答が提出されておりますので、回答書に基づき審議を行いたいと思えます。事務局からよろしく申し上げます。

○鶴身課長補佐 緑色のファイルで ID159 と書かれました「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統に関する回答書(食品)」ということで、9月3日付けのものとなっております。

回答書の記載がされておりますけれども、この MIR162 系統は B. t. が産生をする新たな

殺虫タンパクの Vip タンパクを産生するものですが、前回の調査会でこの細胞毒性に関する点のみが指摘として残っていたものです。

指摘事項の 1 としては、実験可能な最大濃度まで試験を行うことという指摘をいたしております。

指摘 2 としては、実験系の概略や妥当性についての指摘をしております。したがって、指摘 2 の方から御説明をさせていただければと思います。

9 ページの後半になりますけれども、指摘事項として LDH assay において SLS を添加した場合、これはポジティブコントロールでラウリル硫酸ナトリウムですが、吸光度が減少したとされている。しかし、吸光度が減少するということは、本来この LDH assay としては矛盾しているということ。それから、NR assay においてポジティブコントロールの場合、100%をはるかに超える値が示されていることなどから、これらを踏まえて、実施した実験系の概略及び妥当性について、説明をなさいたいという指摘をしております。

回答といたしまして、その下にありますけれども、LDH の試験では、細胞膜にダメージを受けた細胞から漏出された LDH を、レサズリン／ジアホラーゼ共役系を介して生成するレゾルフィンの蛍光として定量している。漏出される LDH の量は、細胞に対するダメージに依存するため、蛍光の増加を計測することにより細胞のダメージを測定できるということで、原理についてその図に記載がされております。

前回の LDH 試験ではポジティブコントロール処理において、本来増加するべき蛍光値の減少が認められたということで、これは過去に Shimada 先生のものですけれども、Cry タンパクを用いて行った細胞毒性試験に従って、24 時間処理を行ったことによるものとされております。

ダメージを受けていない通常の細胞でも LDH を放出しており、培養 24 時間後でも若干の LDH を培養液中に放出している。SLS 処理によりダメージを受けた細胞は、24 時間の培養の間にほとんどが死滅してしまい、また、培養液中に放出された LDH も失活したと考えられるということで、この LDH の失活について引用文献がありますが、おおむね 9 時間程度で半減するとなっております。

したがって、24 時間の培養では LDH 自体も失活したと考えられた。そのため、ネガティブコントロールと比べて SLS の処理では測定可能な LDH の量が少なく、結果として測定値の減少になったと考えられた。なお、LDH の測定による検討は、短時間での測定が適しているということが報告されてございます。

11 ページは NR の試験ですが、細胞が NR を取り込むことに基づいた試験ということで、細胞膜にダメージを受けたり、エンドサイトーシスを阻害された場合、NR の吸収量は減少する。そのため、細胞に吸収された NR の量を吸光度として測定している。NR の試験法自身は確立された方法であるが、前回の試験では実験操作の不備等により、低濃度の SLS 処理で 100%をはるかに超える値が観察されたため、結果を解釈する上で妥当ではなかったと考える。今回新たな試験を行ってきておりますけれども、これらの点を踏まえて試験を

行いましたということでございます。

指摘1に戻っていただいて、1ページになりますけれども、実験可能な最大濃度まで試験を行うことという指摘をして、先ほどの件も踏まえて再度試験をやり直したということでございます。

回答として、最大濃度として50,000 ng/ml (50 μ g/ml) の mVip タンパクを 3T3 細胞、Caco-2 細胞に暴露して、LDH の活性、NR の取り込み量を測定しております。

次のページの真ん中辺りに試験方法がありますけれども、mVip タンパクの濃度としては、そこに記載のそれぞれの濃度を用いております。暴露時間としては1時間と24時間とそれぞれを測定した。評価の方法としては、培養液のみで培養したネガティブコントロールの値と比較したということでございます。

最高濃度の設定についてですが、その次のパラに記載がされておりますけれども、5行目ぐらいになります。完全溶解を確認するために水を溶媒として用いて、試験可能な最大濃度の原液を調整したということで、その原液が200 μ g/ml では完全には溶解しなかったため、溶解が可能であった100 μ g/ml を原液としたということでございます。

3ページにその希釈の概要が記載されておりますけれども、100 μ g/ml を原液として、それぞれ培地に添加していったということでございます。

2つ目のパラになります。本試験では50 μ g/ml を最大暴露濃度とした。培地に半量希釈して50 μ g/ml を最大濃度としたということで、前回の試験の約1,000倍に相当するということが記載されております。

次のページにまいりまして、それぞれ試験の流れが記載されておりますけれども、5ページに結果が記載されております。まずこれがLDHの1時間ですが、LDHの結果、1時間の暴露では蛍光の増加は観察されなかった。一番右端がポジティブコントロールですけれども、これでは蛍光の増加が確認されたということでございます。

6ページはNR1時間の結果です。この結果でNRの測定値の減少というものは、観察されなかった。

7ページが24時間の暴露となっておりますけれども、右から2つ目のところ、50 μ g/ml の処理区において、NRの測定値の減少が確認されたということでございます。

考察になりますけれども、LDHの1時間の暴露においては細胞への影響は見られなかった。

NRの測定で1時間の暴露では、細胞への影響は見られなかった。24時間の暴露では50 μ g/ml において測定値の減少が見られた。ここが考察になっておりますけれども、これは先ほどの培地の調整にもありましたが、水を含むmVip原液が50%添加されたということで、培地の希釈による浸透圧等の影響によって、細胞の増殖が阻害された可能性が考えられた。したがって、NR24時間の50 μ g/ml の処理区は、正確な評価が困難であると考えられたとされております。

8ページ、なお、NRの10 μ g/ml の処理では、水溶液が10%以下の添加であったため、

細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。NRの1時間の暴露では暴露時間が短いこともあって、50 μ g/mlの処理区において増殖に対する阻害の影響はなかったのであろう。また、LDHの1時間の暴露でも時間が短いということもあって、細胞増殖に対する影響はなかったと考えられるとされております。

これらの結果から、mVip3Aタンパクが3T3細胞、Caco-2細胞に対して影響を与える可能性は、極めて低いと考えられた。なお、本試験で行った最大濃度の50 μ g/mlというものは、過去にCryタンパクで行われた試験の最大濃度である2 μ g/mlの25倍に相当するとされております。

真ん中から下にヒトの摂取量に関する推定ということで、摂取量の比較が参考として記載されておりますけれども、穀粒におけるmVipタンパクの発現量、穀粒の密度から、その最大暴露量を推定しております。

次のボツのところでmVipタンパクの発現量、穀粒の密度ということで、最大の暴露量を試算すると、下から2つ目の行になりますけれども、57 μ g/mlとなる。

しかし、右のページになりますが、これは最大の暴露を計算したもので、摂取した食べ物がすべてMIR162トウモロコシのみであって、一切の希釈がないということを想定していて、また、加工工程による影響や唾液や水分による希釈、胃液による消化は考慮されていないということです。

ちなみに、これまでの資料から95°C、30分の加熱処理では免疫応答が14%に減少、人工胃液の処理によっては0.0143%以下に消化されるという報告をしている。したがって、現実的にはトウモロコシは摂取前に加熱され、希釈され、消化されることから、実際に暴露されるタンパクの濃度は、非常に低いものになるということでございます。

回答は以上でございますけれども、13ページに3点ほど修正事項がありまして、これらについては適正に修正がされております。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、回答書につきまして、御意見をいただきたいと思っておりますけれども、順番としてはやはり後の方の実験系の概略及び妥当性について説明を行うことから入らせていきたいと思っております。

これは鎌田先生と手島先生からコメントをいただいたかと思いますが、いかがでしょうか。

○手島専門委員 前回の回答の中では、LDH assayの原理というのが正確に記載されておられませんでしたが、今回におきましてはLDH assayというのは細胞障害によって放出されたLDH活性を蛍光によって測定するものであるということ。それから、SLSを添加した場合は細胞が24時間で障害されている。全体のLDH量が低下したために、放出されたLDHも低下したということで、そのような説明がされておりますので、測定系に関する説明はこれでよろしいかと思っております。

○澤田座長 鎌田先生はいかがでしょう。

○鎌田専門委員 今回ののでよろしいかと思えます。特に1時間と24時間と2つを出して、比較をしながら出しているので問題ないかと思えます。

○澤田座長 そのほかの先生方は、この点に関しましてよろしいでしょうか。

それでは、前に戻りまして、実験可能な最大濃度までの範囲について細胞毒性試験を行うことの回答に関しまして、コメントをいただきたいと思えますけれども、これは澁谷先生と山崎先生で、今日御欠席でありますけれども、何かございますか。

○鶴身課長補佐 お手元にお配りしております資料2「専門委員からのコメント」ということで、2ページ目になります。

まず澁谷先生からのコメントですが、mVip3A タンパクの濃度については、実験的に可能な最大濃度に近いと考えられ、ほかのBt タンパクで行われた試験濃度と比べて、比較し得るものであるなら問題はないと思えます。

ただ、先ほどございましたように、24時間のNRの50 μ g/mlの処理区で値が低下していることの説明として、培地の希釈による浸透圧等の影響を挙げているが、これについては報告書の中にもありますけれども、適切なコントロールがなかったため、浸透圧の影響なのか、mVip タンパクによる影響なのかの判断ができません。もし浸透圧の影響であれば、LDH assay の24時間で影響がないことの説明も必要ではないか。

試験設計の段階で適切なコントロールを立てなかったために生じた問題であり、再度試験を求めるか、説明の修正を求めるのか議論をしていただければと思えますというコメントをいただいております。

3ページにまいりまして、山崎先生からもコメントをいただいております。

「I. 細胞培養試験条件の妥当性について」の1. ですが、できるだけ高濃度のmVip3A タンパクを細胞培養系に添加するために、高濃度添加群ほど培養液が水で希釈される結果になっている。

表の下にありますけれども、一般的に考えて、細胞培養系を50%まで水で希釈した培養液中で、細胞を培養することは不適切と考えられる。

2. 細胞を加えずにmVip3A タンパクだけを添加した群では、50 μ g/ml 添加群だけが非添加群と比べて80%及び70~90%に減少している。高濃度のmVip3A タンパクが培地中に共存するだけで、LDH とNRの assay を妨害している可能性がある判断される。

これらのことから、50 μ g/ml の添加群は試験条件として成立しておらず、適切な試験群とは判断できないので、評価対象のデータから除くことが適切と考えられる。

「II. mVip3A の細胞毒性について」ということで、LDH とNRで見える限り、3T3、Caco-2細胞でも1ng/ml~10 μ g/ml の添加群では、明らかな有害事象は認められていなかった。試験可能な範囲の高濃度まで試験した今回の試験からは、mVip3A タンパクが細胞毒性物質としてのハザードは認められなかったと判断をします。

「III. mVip3A タンパク質のヒト摂取量に関する推定」として、生体内動態に関するデータがほとんどないので、今回の推計をした暴露量を精密に推測することは難しいでしょう。

結論として、(1) 3T3 細胞でも Caco-2 細胞でも、50 μ g/ml の添加群は不適切な試験群で、データから除くことが適切と考えるが、10 μ g/ml 以下の添加群は条件としては成立していると判断する。

(2) 今回の *vitro* の試験で、細胞毒性物質としてハザードは認められないと判断します。

(3) 今回の *vitro* の試験で培地に添加した mVip3A タンパク濃度は、ヒトの消化管内細胞に対するタンパクの暴露量と比べて、十分な暴露マージンがあると想像する。

これらのことから、MIR162 を摂取することによって、mVip3A タンパクがヒトの消化管内細胞に対して細胞毒性を示すリスクは、無視できるレベルであると考えられるというコメントをいただいております。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。ほかの先生方からコメント、御意見がありましたらよろしくお願ひします。手島専門委員、どうぞ。

○手島専門委員 私も山崎先生のコメントにございますように、今回の 50 μ g/ml の濃度というのは、試薬の水溶液と培地を 1 対 1 で混ぜたということで、細胞に対する過酷な条件であるということ。そして、NR assay では 24 時間で取り込みは下がっているということがございますので、この 50 μ g/ml という濃度のデータというのは、除いて考えた方がよいのではないかと思います。

10 μ g/ml 以下の濃度では LDH の活性、NR 活性両方ともに毒性が見られていないということでございますし、10 μ g/ml というドーズが以前の Cry1Ab を使った 2003 年の Shimada の論文などの濃度よりも高い濃度で行われているということで、10 μ g/ml までのデータで特に毒性がないという判断をするということで、よろしいのではないかと思います。

○澤田座長 ありがとうございます。山崎先生と手島先生の御意見では、50 μ g/ml の濃度は実験的に浸透圧が半分ですから少し無理が多い。50 μ g/ml のデータは評価の対象にしない方がよろしいということでもあります。この点、ほかの先生方も御異存ありませんでしょうか。50 μ g/ml のデータは一応無視して、一応評価はできるということになるかと思ひすまけれども、いかがでしょうか。

それでは、10 μ g/ml までの濃度で安全性の評価は一応できるということで、委員の先生方の御了解をいただいたことにさせていただきたいと思ひます。

何回か行きがありましたけれども、食品として特段の安全性の問題はないということでもありますので、評価書(案)の審議に移りたいと思ひます。事務局の方から御説明をお願いします。

○鶴身課長補佐 本日お配りしております資料 1 の 20 ページになります。

「I. 評価対象食品の概要」ということで、名称はチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統、性質はチョウ目害虫抵抗性でございます。

本品種は *Bacillus thuringiensis* AB88 株に由来をする *vip3Aa1* 遺伝子の塩基配列を基

に合成をした改変 *vip3Aa* 遺伝子 (*mVip3A* 遺伝子) を導入して作成がされており、改変 *Vip3A* タンパク (*mVip3A* タンパク) を発現することで、チョウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされております。

また、本品種には選択マーカーとして *E. coli* K-12 株のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子 (*pmi* 遺伝子) が導入されております。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」として「第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項」ですが、(1) 宿主はトウモロコシのデント種。

(2) *mvip3A* 遺伝子の供与体は *B. t.* AB88 株。*pmi* 遺伝子の供与体は *E. coli* K-12。

(3) はその性質ですが、先ほども申しあげましたとおり、*mVip3A* タンパクはチョウ目害虫に対して殺虫活性を示す。また、*pmi* 遺伝子は *PMI* タンパクを発現して、形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられております。挿入は発現ベクター *pNOV1300* を用いて、アグロバクテリウム法により導入がされております。

2. 食経験、3. 構成成分等については、記載のとおりとなっております。

21 ページにまいりまして、4. 利用方法等についてですが、いずれの項目も従来のトウモロコシと変わらないということがございます。

5. 宿主以外のは、比較対照としておりません。

6. 検討が必要とされる相違点については、*mvip3A* 遺伝子、*pmi* 遺伝子の導入によって、それぞれのタンパクを発現することが宿主との相違点ということで、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断がされた。

「第 2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項」ですが、22 ページにまいりまして、チョウ目害虫の影響を受けずに成長することができるということがございます。

「第 3. 宿主に関する事項」ですが、従来のトウモロコシの記載となっております。

「第 4. ベクターに関する事項」ですが、1. 名称及び由来は次のページにまいりまして、発現ベクター *pNOV1300* の構築にはプラスミド *pSB12* を用いた。

2. 性質についてですが、塩基数、塩基配列、切断地図等については記載のとおりでございます。

(3) 既知の有害塩基配列は含まれておりません。

(4) 薬剤耐性遺伝子ですが、このプラスミドには *E. coli* 由来の *spec* 遺伝子が含まれております。ただ、最後の行にありますように、宿主ゲノムには挿入がされておりません。

(5) 伝達を可能とする塩基配列は含まれていないということがございます。

「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」として、まず 1. の挿入 DNA の供与体は、先ほどもありましたとおり、*mvip3A* は *B. t.* AB88 株、*pmi* の由来は *E. coli* K-12 株でございます。

(2) 安全性に関する事項ですが、*B. t.* AB88 株が属する *B. thuringiensis* には、微生物農薬の基材として長期に利用がされており、ヒトや動物に対する病原性の報告はない。

pmi 遺伝子の供与体の *E. coli* については、自然界やヒトの消化管に広く存在をしており、ヒトや動物に対して病原性を持たないと考えられている。

次のページにまいりまして、2. 挿入 DNA または遺伝子産物に関する事項ですが、(1) はクローニングもしくは合成方法です。

mvip3A 遺伝子は、*B. t.* AB88 株からクローニングされた *vip3Aa1* 遺伝子の塩基配列に基づいて発現するタンパクのアミノ酸配列を変えずに、宿主のトウモロコシでの発現が最適となるように GC 含量を高め、人工合成をした遺伝子である。

pmi 遺伝子は K-12 株からクローニングした、*manA* 遺伝子ということでございます。

(2) 塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

(3) それぞれの遺伝子の機能ですが、*mvip3A* 遺伝子ですけれども、この遺伝子がコードする mVip3A タンパクは、*B. t.* AB88 株において見出された殺虫性タンパクということで、*B. t.* が産生する殺虫活性タンパクとして知られている Cry タンパクは、芽胞形成期に産生され、細胞内に存在する結晶タンパクであるのに対し、Vip3A タンパクは芽胞形成期及び栄養生長期に産生され、細胞外に分泌される可溶性のタンパクである。この Vip3A タンパクがチョウ目昆虫の幼虫に摂取されて消化をされるとコアタンパクを生じ、このタンパクが腸管に作用して殺虫活性を示すことが報告されている。

なお、この *mvip3A* 遺伝子を導入する際に塩基置換が起こったため、MIR162 で実際に発現する mVip3A タンパクは、導入する前の遺伝子がコードするタンパクとアミノ酸が 1 つ異なっている。

MIR162 で発現をする mVip3A タンパクと既知の毒性タンパクについて、相同性を確認するために blastp 検索を行ったところ、既知の毒性タンパクとの相同性は見出されなかった。

また、*E. coli* で発現をさせた mVip3A タンパクを用いて CD-1 系マウスにおける急性毒性試験を行ったところ、投与に関連した異常は認められなかった。更に哺乳類細胞に対する細胞毒性試験を Caco-2 細胞、3T3 細胞を用いて行った結果、細胞に対する毒性影響は認められなかった。

次のページにまいりまして、*pmi* 遺伝子がコードする PMI タンパクは形質転換体の選択マーカーとして用いられています。多くの植物細胞はマンノースを炭素源として利用して生育することはできませんが、この PMI タンパクを産生し、マンノースを生育に利用可能なフルクトース-6-リン酸に変換することができることから、形質転換体の選抜が可能となるものでございます。

PMI タンパクについて既知の毒性タンパクとの構造相同性を確認したところ、相同性のある毒性タンパクは見出されておられません。

抗生物質耐性マーカー遺伝子ですが、これらについては導入されていないことが確認されております。

3. 発現に係る領域です。(1) プロモーターに関する事項ですけれども、*mvip3A* 遺伝子、*pmi* 遺伝子とも、プロモーターはトウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来のプロモ

ーター。

ターミネーターについては、*mvip3A* 遺伝子はカリフラワーモザイクウイルスの 35S ターミネーター。*pmi* 遺伝子はノパリンシンターゼ遺伝子由来のターミネーター。その他 *mvip3A* 遺伝子のカセットには、発現量を高めるために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が挿入されているということでございます。

ベクターへの組み込み方法ですが、先ほどのプラスミドにそれぞれのカセットを導入することで、発現ベクター pNOV1300 を得た。

5. 発現ベクターに関する事項として、塩基数、塩基配列、切断地図は記載のとおりでございます。

(2) ORF についてですが、発現ベクターの T-DNA 領域に、目的以外のタンパクを発現する ORF は含まれていない。

意図する挿入領域としては、発現ベクターの T-DNA 領域ということですが。

(4) として純化に関することですが、選択マーカー遺伝子として *spec* 遺伝子を有しておりますので、ベクターの選抜及び増殖を通じて純化されているということでございます。

27 ページにまいりまして、導入方法、交配に関することですが、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入した後、マンノースを添加した培地で選抜をして再生個体を得ております。この得られた個体について導入遺伝子の確認をした後、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、トウモロコシ MIR162 を得たということでございます。

「第 6. 組換え体に関する事項」ですが、1. 遺伝子挿入に関する事項として、(1) コピー数及び近傍配列に関する事項です。

コピー数及び完全性を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、それぞれの発現カセットが 1 コピー挿入されていることが確認されております。

また、発現ベクターの外骨格領域が導入されていないことを確認するために、サザンブロットを行った結果、導入されていないことが確認されています。

MIR162 に挿入された DNA の塩基配列を決定して、発現ベクターの T-DNA 領域と比較をしたところ、5' で 27 ベース、3' で 57 ベースの欠損、それから、*mvip3A* 遺伝子の領域に 2 か所の塩基置換が確認されております。この塩基置換によって、コードする mVip3A タンパクの 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る。そのほかの挿入 DNA は、完全に一致することが確認されております。

近傍配列がトウモロコシ由来であるかどうかを確認するため、近傍配列の塩基配列を決定して、宿主ゲノムと比較をしております。その結果、挿入に伴って 58 ベースの欠失がありましたけれども、それらを除き塩基配列は一致していたことから、近傍はトウモロコシゲノムであることが確認されたということでございます。

挿入によって内在性の遺伝子が損なわれていないかどうかを確認するために、近傍配列を核酸データベースを用いた blastn 検索が行われております。その結果、5' の近傍にお

いて *Ds1* エlement との相同性が認められておりますが、*Ds1* エlement は活性化した Activator エlement を必要とし、転移の際には近傍の DNA が欠損することから、挿入遺伝子によってこの *Ds1* エlement は損なわれていないと考えられた。

一方、3' 近傍において、トウモロコシのシクロフィリン遺伝子を含む配列と相同性が認められましたが、相同性が認められた配列はシクロフィリン遺伝子のコード領域ではないということ。それから、5' 側にはそれらと相同性のある配列は認められなかったことから、遺伝子挿入によって、シクロフィリン遺伝子は損なわれていないと考えられたとされております。

(2) は ORF ですが、挿入領域と近傍配列との接合部において、意図しない ORF が生じていないことを確認するため、ORF の検索がされておりますけれども、その結果、ORF は生じていないことが確認されたということでございます。

2. 発現部位、量等ですが、表の記載のとおりとなっております。いずれも発現をしているということでございます。

3. 遺伝子産物が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かという点で、日本人 1 人が 1 日に摂取をするトウモロコシ、トウモロコシ加工品の摂取量を、すべて本品種に置き換えて計算をしたところ、1 人 1 日当たりのタンパク摂取量に占める割合は、それぞれ $3.2 \times 10^{-5}\%$ 、 $2.0 \times 10^{-6}\%$ となるということ、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

4. アレルギー誘発性についてですが、(1) それぞれの供与体についてはアレルギー誘発性があるとは考えられていない。

(2) それぞれのタンパクについても、誘発性の報告はない。

(3) 物理化学的処理に対する感受性として、①人工胃液ですが、mVip3A タンパクの人工胃液による消化性を SDS-PAGE、ウェスタンブロットにより分析をしておりますけれども、いずれも 1 分以内に消化が確認されております。

PMI タンパクでも人工胃液による消化性を SDS-PAGE によって分析しておりますけれども、1 万分の 1 のペプシン濃度で 10 分以内に消化が確認されたということでございます。

②人工腸液に対する感受性ということで、mVip3A タンパクですが、SDS-PAGE、ウェスタンの分析によって 5 分以内に断片に分解され、それ以上の消化が進まないことが確認されております。

PMI タンパクですが、SDS-PAGE の分析の結果、10 分の 1 のパンクレアチン濃度で 30 分以内に消化。100 分の 1 のパンクレアチン濃度では、30 分以降もタンパクのバンドは認められたということでございます。

③加熱処理に対する感受性ですが、mVip3A タンパクは 150℃、30 分の加熱で、PMI タンパクは 95℃、30 分の加熱で、免疫反応性が失われることが確認されたということでございます。

(4) 既知のアレルゲンとの構造相同性ですが、80 残基以上のアミノ酸において 35%

以上の相同性を有するアミノ酸配列は見出されておられません。

また、連続する8つのアミノ酸の相同性検索の結果、PMI タンパクでカエルの一種由来のパルプアルブミンと相同性が認められたということで、(5) で IgE 結合能を確認しておりますけれども、交叉反応は認められなかったということでございます。

上記の結果から総合的に判断をし、mVip3A タンパク及び PMI タンパクは、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5. 遺伝子の安定性についてですが、3世代の品種について PCR 分析を行い、分離比の確認をしておりますけれども、メンデルの法則に基づいて後代に遺伝していることが確認されております。

また、3世代の DNA について、サザンブロットの結果からも共通のバンドが確認されたということでございます。

6. 代謝経路への影響ですが、mVip3A タンパクは酵素活性を持たず、宿主の代謝系と独立して機能している。それから、PMI タンパクはマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に変換する触媒酵素であって、特異的に反応し、他の天然基質は知られていない。

これらのことから、両タンパクが宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は、極めて低いと考えられるとしております。

7. 宿主との差異についてですが、米国の6か所の圃場で栽培された本品種について、主要構成成分、ミネラル、ビタミン、アミノ酸、脂肪酸、2次代謝物、栄養阻害物質の含量について検討がされておりますけれども、いずれも統計学的な有意差がないか、もしくはあった場合であっても文献値の範囲内であったとされております。

32 ページにまいりまして、諸外国における状況としては、FDA が 2007 年 8 月に食品としての安全性審査が終了している。USDA、EPA は現在申請中。オーストラリア、ニュージーランドの FSANZ において、2009 年 2 月に確認が終了している。

9. 栽培方法に関する点ですが、栽培方法は従来と同じで、種子の製法、管理についても同じとなっております。

「第7. 第2から第6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」ですが、先ほどの再掲となりますけれども、mVip3A タンパクの急性毒性、細胞毒性試験について記載をしております。

509 行目で先ほどの細胞毒性試験ですが、*E. coli* で発現させた mVip タンパクが 1 ng/ml ~ 5 μ g/ml となっておりますが、これは 50 の間違いですけれども、先ほど御議論いただいた点からすると、10 とした方がよろしいかと思っておりますので、10 μ g/ml とさせていただきたいと思っております。10 μ g/ml の濃度で暴露し、LDH、NR の測定をしたところ、細胞毒性が認められなかったということでございます。

「Ⅲ. 食品健康影響評価」として、本品種については「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき評価をした結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判

断をしたとさせていただきます。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして項目ごとに御意見をいただきたいと思います。細かい字句等の修正につきましては、事務局まで後ほどお伝えいただければと思います。

順番にまいります、第1と第2の20～22ページの3行目までに関しまして、コメントがございましたらお願いしたいと思います。

○村田委員 細かいことでよろしいでしょうか。21ページに宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質云々が書いてあって、これ自体はいいんですけども、「栄養阻害物質組成は」で始まっているんですが、以下のものは全部栄養阻害物質と思ってよろしいでしょうか。トリプシンインヒビターなんかは勿論いいんでしょうけれども、フェルラ酸とかクマル酸は栄養阻害物質と言えないところが。

もう一つ、数字の書き方なんですけど、例えばイノシトールの89はいいのかもしれませんが、3,765ppmという書き方は何となく変ではないですか。こういう書き方でみんな書くのでしょうか。大ざっぱにこれぐらいの量ですよということを言いたいんですね。そのときに3,765ppmというのは、どうなのかなと思いました。

○鶴身課長補佐 申請書の記載もあるんですが、いずれも栄養阻害物質として、毒性物質ではないということで記載がされております。また、数字の細かいところは申請書には確かに書いているんですけども、それは評価書の書き方なので、まとめてしまうというのもいいのかと思います。

○澤田座長 イノシトールの幅がかなりあるので、これは少し確認して、もし本当にこれで正しければ問題はないと思います。

○鶴身課長補佐 申請書の記載はこのままでよろしいですか。

○澤田座長 それで本当に正しいのか、確認してください。

○鶴身課長補佐 わかりました。

○澤田座長 ほかにコメントはよろしいでしょうか。

それでは、次の「第3. 宿主に関する事項」で、コメントがありましたら、お願いをしたいと思います。

第4のベクターですけれども、コメントはよろしいでしょうか。

それでは、少し長くなりますけれども、23ページの半ば辺りから27ページの289行まで、第5の挿入DNAの項目でコメントがありましたら、よろしくお願ひします。

○村田委員 1つ教えてほしいんですけども、24ページにこのタンパク質の性質、*mvip 3A*のことが書いてあるんですが、私はちょっと知らなくて、Cryタンパク質とは違うタンパク質で、芽胞形成期及び栄養生長期に産生され、細胞外に分泌される可溶性タンパク質ということなんですけれども、ということは何となくもともと使っているB.t.剤で、農薬として認められているものの中に入っているものなのではないでしょうか。

○澤田座長 恐らく入っていると思われます。

○村田委員 そこそこの量があると思ってよろしいですか。

○澤田座長 量的には、ここでの議論でも同じような質問をいただいて、一応回答はいただいたように覚えています。たしか ELISA か何かのデータを出していただいて、定性的ですが、微量ながらあるということはデータとして出されていたように覚えております。

○鶴身課長補佐 市販の B. t. 剤、微生物農薬で ELISA 分析、特定の商品ですが、 $208\mu\text{g/g}$ 検出をしているというデータはいただいております。既存のものにも含まれています。

○村田委員 その前の 28 ページに、B. t. 剤として長期に使用されて安全だと書いてあったので、私も当然それで大丈夫なのかなと思っていたんですけども、それがマイナーな成分だったら、そういうことは大丈夫なのかなと思ったものですから。

○澤田座長 恐らくロットによって、どのくらいばらついているとか、そういうデータが不足していますので、今まで経験的に使っている生物製剤であるから大丈夫だという結論は得られないということです。

○村田委員 それ以外の先ほどからあるようなデータで大丈夫だという理屈ですね。わかりました。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。飯専門委員、どうぞ。

○飯専門委員 書き方の問題です。25 ページの 245 行目と 26 ページの表の中の 35S のターミネーターの説明なんですけど、以前どういう表現になっていたのか記憶にないんですけども、RNA 由来のターミネーターは表現として適切とはいえず、これはあくまで転写を終結させるエレメントですので、そのような意味になるように表現は変えた方がいいかなと思います。

○澤田座長 これはほかにも何度か確か出てきていたと思いますので、ほかの例にならって、要はポリ A 付加ということが言いたくて書いたんだと思います。

○鶴身課長補佐 ほかの書き方も改めて確認をさせていただきます。

○澤田座長 あと 27 ページの 289 行目まででございませんでしょうか。

それでは、これもちょっと長くなりますけれども、ついですから第 6 と第 7、27 ページから最後までコメントがありましたらよろしく願います。小関専門委員、どうぞ。

○小関専門委員 27 ページの 318 行目「*DsI* エレメントは活性化した」というところから書かれているところですが、本文の方を短く詰めたときに、詰め方があまりよくない文章になっていて、結局 *DsI* エレメントは損なわれていないというのはあまり関係なくて、むしろこれは *DsI* エレメントと相同性が見られたが、挿入遺伝子は *DsI* エレメント 5' 末端から 500 ベース以上離れているため、*DsI* エレメントが転移したとしても挿入遺伝子に影響を与える可能性は著しく低いと考えられたという感じで申請者は書いているので、こう書き直してもらえればと思います。文章は後でお渡しします。

○鶴身課長補佐 わかりました。よろしく願います。

○小関専門委員 *DsI* 自身が壊れているということはあまり関係なくて、むしろ抜けたと

きに今度は挿入遺伝子を壊すのではないかというおそれ、これはまず 500 ベース離れていれば、*Ds1* のときにはないという書きぶりにした方がよろしいかと思えます。

○澤田座長 それでは、小関先生の方から御指示をいただいて、適切に直させていただきますと思えます。

ほかにありましたら、よろしく申し上げます。鎌田専門委員、どうぞ。

○鎌田専門委員 29 ページの人工腸液に対する感受性の後ろの方の PMI タンパクなんです、わざわざ 2 行目から、その結果、10 分の 1 の場合には試験開始後 30 分以内に消化される。わざわざ「また」とあって、100 分の 1 の場合には検出されたと。後ろの段落は要らないのではないかという気がするんですが、消化された方だけが大事だと思います。

○澤田座長 手島先生、何かコメントありますか。

○手島専門委員 従来、濃度を変えてやるようにとまでは言っていない(?) 部分もありますので、確かに鎌田先生がおっしゃるように、10 分の 1 のパンクレアチン濃度で消化されたというところだけでよろしいかと思えます。

○澤田座長 それでは、後の方は特に要らないということで、削っていただくことにしたいと思います。

和久井専門委員、どうぞ。

○和久井専門委員 非常に小さい語句の問題です。ずっと引き続けているので気になるんですが、32 ページの 508 行目に「マウスの繊維芽細胞由来の 3T3 細胞」。この場合の繊維芽細胞の「繊」は、通常これは使わないですね。「線」という字を使うのが一般的です。7 月のを見ますとこの字を使っていますので、語句の問題と言われてしまえばそれまでなんです、fibroblast ですので「線」という字に変えていただきたいと思えます。

○澤田座長 たしか当用漢字を使うようになって、変わっているはずですが。文科省の用語でも「線」になっているはずですね。

○和久井専門委員 辞書的にも「線」になっていると思えます。

○澤田座長 これから忘れないように変えていきたいと思えます。ほかによろしいでしょうか。

ほかに御意見がないようでありますので、おおむね OK だと思いますけれども、何点か御意見、修正の案をいただいておりますので、いただきました修正につきましては事務局で修正をして、私の方で確認、必要に応じまして先生方に確認をいただきたいと思えます。その後に食品安全委員会の方に御報告させていただきます。どうもありがとうございました。

それでは、次の議題でありますけれども、高オレイン酸含有ダイズ DP-305423-1 の審議に入らせていただきたいと思えます。この品目も継続の品目でありまして、今年 6 月の専門調査会で審議を行いまして、指摘事項をいただいたものであります。今回回答書が提出されておりますので、その回答書に基づき御審議いただきたいと思えます。事務局から説明をよろしく申し上げます。

○松尾係長 それでは、説明をさせていただきます。お手元に黄色の資料を御用意いただけますでしょうか。表紙をめくっていただきまして、3 ページに指摘事項 1 がございまして、順を追って御説明をさせていただきたいと思っております。

指摘事項 1 といたしまして「(3) 摂取量」に関しまして「プレミアム油を搾油するダイズとして利用される」とあるが、使用用途を限定するのは難しいため修正すること。もう一点につきまして、従来の油と比べて半量程度大きく変わる可能性があるという記載があるが、根拠が不明瞭なため適切に修正することという指摘になっております。それに対する回答といたしまして、以下のように修正がされております。

一番下の修正後を見ていただきたいと思います。前段の最初の指摘に関しましては、特に修正は行われておりません。後半の方につきましては、半量程度という言葉が削除されておまして、すべてが大きく変わる可能性があるという修正がされております。

4 ページの指摘事項 2 にまいりまして、本品種を「除草剤耐性のダイズとして農家に販売する予定はない」の表現を、適切に修正することということで、回答といたしまして一番下の修正のように、それに関する文章が削除されております。

5 ページの指摘事項 3 にまいりまして、*FAD2-2* 遺伝子と *gm-fad2-1* 遺伝子との構造、機能の違い及び共通点について追記を行うこと。また、PCR 等におきまして、これらの遺伝子をどの程度特異的に検出できるかについて、追記することという指摘になっております。

それに対する回答といたしまして、*FAD2-1* 及び *FAD2-2* 遺伝子は、いずれもオレイン酸からリノール酸への生合成を触媒する ω 6 デサチュラーゼを産生するという一方で、それぞれアミノ酸配列につきましては、約 70% の相同性があるとのことです。*FAD2-1* 遺伝子は種子に特異的に発現し、*FAD2-1* 遺伝子は植物体全体で発現することが報告されているということです。

gm-fad2-1 及び *FAD2-2* のアミノ酸配列は約 70% の相同性がありまして、そのため、サザンブロットにおきましては *FAD2-1* 及び *FAD2-2* は区別されず、*FAD2-2* 由来のバンドは微弱なバンドとして検出される可能性があるということです。

一方、ノーザンブロット分析におきましては、*FAD2-1* 及び *FAD2-2* 由来の mRNA は、サイズが異なるため区別ができるということでございまして、この回答に基づきまして要旨の修正が行われております。

指摘事項 4 にまいりまして、制限酵素名及び制限酵素サイトを記載することということで、御指摘を踏まえまして次に A 3 の資料が付いていますが、このような形で修正がされております。新たに付け加えた部分に点線が記載されております。

指摘事項 5 にまいりまして、発現ベクターの外骨格断片が挿入されていることから、純化に係る工程、断片が混入した理由、安全性上問題がないとする根拠等について記載することということでして、回答といたしましては、本品種の作成に用いました直鎖状 DNA 断片は、プラスミドをそれぞれ制限酵素で処理をした後、アガロースゲル電気泳動により分

離抽出し、精製をしたものです。

本分離過程におきましては、試験精度に注意を払い試験操作を行っていましたが、非常に低濃度の外骨格領域断片がゲルの上流に残され、直鎖状 DNA 断片と一緒に抽出されたと考えられるということでございます。

本品種に挿入された外骨格領域は、抗生物質耐性マーカー遺伝子である *hyg* 遺伝子及び *plasmid ori* 領域ではないことが確認されており、また、本外骨格領域に対して blastx 検索を行いました結果、既知の毒性タンパクや既知のアレルゲンとの相同性は認められなかったということでございます。また、構成成分の分析及び農業形質評価等の結果を踏まえまして、挿入された外骨格領域がヒトの健康を害するおそれはないと考えたということでございます。

この回答に基づきまして、以下のように要旨が修正されております。

10 ページの指摘事項 6 にまいりまして、適切な世代でサザンブロット分析を実施することと、もう一点、T3 世代がホモ化されているとする根拠を示すこととなっております。

これに対する回答といたしましては、以下（１）及び（２）に示す理由によりまして、T3 世代がホモ化されており、かつ、T3 世代において 4 挿入領域以外に遺伝子断片が挿入されていないと考えられることから、T3 の自殖後代である T4 世代を用いて行った詳細なサザンブロットの結果は、T3 世代を代表できると考えるとのことです。

また（３）に示しますように、サザンブロット分析を行った結果、BC1F5 世代と T4 世代のバンドパターンは一致していたという内容となっております。

（１）として T3 がホモ化されている根拠ということで、以下のような操作を行いまして T3 を選択していることから、T3 はホモであるという根拠が記載されております。

（２）として、T3 世代において 4 挿入領域以外に遺伝子断片が挿入されていない根拠といたしまして、T3 世代におきまして 4 挿入領域とは別の遺伝子座に、遺伝子断片が挿入されたと仮定をいたしまして、T4 世代のサザンブロット分析において遺伝子断片が検出される確率を算出した結果から、T4 世代を用いてサザンブロット分析をすることにより、ほぼ 100% の確率で検出は可能だということでございます。

また、T4 世代におきまして 4 挿入領域以外に遺伝子断片が挿入された可能性が示されなかったことから、T3 世代においても 4 挿入領域以外に遺伝子断片が挿入されていないと考えたということでございます。

12 ページ、BC1F5 世代を用いたサザンブロット分析が行われておりまして、遺伝子の安定性を確認するために、BC1F5 の世代でもサザンブロットが新たに行われております。その結果、既に安定性の試験が行われているほかの世代と、バンドパターンが一致をしているということとして、以上のことから挿入遺伝子は、後代に安定して遺伝すると考えたという回答になっております。

以下、その BC1F5 世代で安定性を行いました試験のデータが、23 ページまで記載されております。

24 ページの指摘事項 7 ですが、サザンブロット分析の結果の解釈を、容易に行うことを可能とするための資料を作成し、添付することということで、回答といたしましては、申請資料の回答書添付資料 7 に、この指摘事項に応じた資料が作成され、添付がされております。

指摘事項 8 にまいりまして、プロモーター及びターミネーターをプローブとした場合には、約 3 kbp の位置にバンドが検出されているのに対し、*gm-fad2-1* をプローブとした場合には、このバンドが検出されていない理由を説明すること。また、プロモーター及びターミネーターをプローブとした、レーン 2 と 3 の約 3 kbp のバンドの位置が異なるため、その理由を説明することとなっています。

それに対する回答といたしましては、検出された約 3 kbp のバンドは、非組換えダイズを用いたレーンでも検出されているため、このバンドは内在性遺伝子由来のものとなっております。

また、KTi3 プロモータープローブのパネルのレーン 2 と 3 に検出される約 3 kbp のバンドは、内在性遺伝子由来の同一サイズのものと考えられ、また、非組換えダイズのゲノム DNA に 1 コピー量のプラスミドを加えたサンプルであるため、生じたずれはサンプルによるものではないと考えられるとのことです。

26 ページにまいりまして、指摘事項 9 でございます。KTi3 プロモーター及び *gm-fad2-1* をプローブとした場合に認められる約 4,600bp のバンドが新たな挿入領域由来ではないことについての根拠を説明することです。

それに対する回答といたしましては、本品種のゲノム DNA を *EcoRV* / *Spe I* で一緒に処理した分析におきましては、4 挿入領域の塩基配列から想定されるバンド以外に、約 4,600bp の微弱なバンドが検出されたということでございます。

しかしながら、今回新たに制限酵素 *EcoRV* 及び *Spe I* をそれぞれ別々に処理し、追加試験が行われておりまして、その結果、検出されたすべてのバンドが 4 挿入領域の塩基配列から想定されるバンドと一致し、想定外のバンドは検出されなかったということです。

したがいまして、4,600bp バンドは新たな挿入領域由来のものではないとのことです。

これ以降 *EcoRV* / *Spe I* 処理の場合、約 4,600bp の微弱なバンドが検出されたことに対し、それぞれの酵素を別々に処理した追加試験においては、想定外のバンド、すなわち約 4,600bp のバンドは検出されなかったことについて考察が行われております。

複数の制限酵素で処理した場合、想定外のバンドが検出される可能性があることが示されています。*EcoRV* をほかの制限酵素と一緒に処理すると、本酵素の切断部位特異性が低下し、異なる部位でも切断が起こることが知られております。また、本酵素は非選択的に DNA に結合した後、制限酵素部位を探しながら DNA 上を移動することが知られている。*EcoRV* をほかの酵素と一緒に処理した場合に、先にほかの酵素が DNA に結合すると、*EcoRV* による切断が阻害される可能性も報告されている。更に、*EcoRV* は至適 pH より低い条件下では、まず 2 本鎖 DNA の一方だけを切断することが報告されているということです。

これらの知見及び先ほど説明しました追加試験の結果から、最初の試験におきましては *EcoRV* / *Spe I* 処理により、*EcoRV* の切断部位特異性が低下したため、想定と異なる部分で切断が起こり、*KTi3* プロモーター及び *gm-fad2-1* からなる、約 4,600bp の断片が生じたものと考えております。したがって、本バンドは挿入領域 4 に由来するものではなく、挿入領域 1、2 または 4 に由来するものと考えられるということをごさいます、これらの新たな知見に基づきまして、要旨が以下のように修正されております。

35 ページ、指摘事項 10 ですが、*gm-hra* をプローブしたパネルでは、約 4,600bp の位置にバンドが検出されていますが、このバンドは新たな挿入領域に由来する可能性が考えられるため、新たな挿入領域由来でないとした根拠について説明をすることということで、それに対する回答といたしましては、本試験と同様の条件で行ったサザンブロット分析の結果、陰性対照のレーンにおきまして同様のバンドが検出されているため、約 4,600bp のバンドは、内在性遺伝子由来のバンドであるという回答になっております。

39 ページ、指摘事項 11 ですが、本品種におきまして、内在性 *FAD2-1* タンパク質の発現が抑制されているかどうかを確認することとなっております。

それに対する回答といたしましては、ノーザンブロット分析の結果、種子中の内在性 *FAD2-1* 遺伝子の mRNA 発現が抑制されていることから、内在性 *FAD2-1* タンパク質は、発現が抑制されているものと考えられるということをごさいます。この知見に基づきまして、今回内在性 *FAD2-1* タンパク質の発現量の測定を行っていないということをごさいます。

40 ページ、指摘事項 12 にまいりまして、遺伝子産物の一日タンパク質摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項につきまして、記載内容が矛盾していることから適切に修正することということをごさいます、回答といたしましては御指摘を踏まえ、以下のような形で修正が行われております。

41 ページ、指摘事項 13 にまいりまして、ウェスタンブロット分析を行った結果、免疫反応性は 90% 低下したとあるが、遠心分離等の操作によりサンプルの量が減少した可能性が考えられることから、分析方法を確認の上、修正をすることということをごさいます。

これに対する回答といたしましては、本試験では加熱処理後に遠心分離を行い、その上清を電気泳動しているということをごさいます。したがって、ゲル電気泳動前の遠心分離操作により、凝集したタンパク質が沈殿したのと考えられたということをごさいます、回答に基づきまして、以下のような形で修正が行われております。

42 ページ、指摘事項 14 にまいりまして、導入した遺伝子の安定性の確認のために、制限酵素に *Nco I* を使っておりますが、まず 1 つの指摘では、26 ページ「1 遺伝子導入に関する事項」で提出されている、サザンブロット分析のデータと整合性があることを説明すること。

2 つ目の指摘といたしまして、導入された遺伝子が後代に安定して遺伝していることを示すため、挿入遺伝子のコピー数等の確認の際に使用した制限酵素を用いなかった理由、更に、これらの制限酵素を使用して安定性を確認したデータがあれば提出することとなっ

ております。

それに対する回答といたしまして、まず整合性があることについてですが、(1) 4挿入領域は *Nco*I 処理を含む種々の制限酵素の組み合わせにより、サザンブロット分析及び塩基配列情報に基づいて決定をしたということでございます。これにつきまして、*Nco*I 処理で検出された各バンドは切断部位が異なるため、ほかの制限酵素により検出された各バンドに対応するものではありませんが、*Nco*I 処理における各挿入領域内の切断箇所及び各切断部位の推定最小サイズはわかっており、*Nco*I 処理のバンドパターンが世代間で一致しているということです。

2つ目の指摘に対する回答ですが、これは(2)に記載されておまして、その内容といたしましては、挿入された遺伝子の安定性確認のためのサザンブロット分析は、以下の理由から制限酵素として *Nco*I を用いたということでございます。

まず1つ目の理由といたしましては、*Nco*I はゲノム DNA を特異的かつ確実に切断することが知られていること。

2つ目の理由といたしましては、本品種に導入いたしました直鎖状 DNA 断片を含む発現カセット内に、それぞれ各1か所ずつ *Nco*I の制限酵素切断部位が存在するため、本酵素で処理をすると近傍を含む断片が形成され、このため複数世代のバンドパターンが容易に比較できるからということでございます。

3つ目の指摘に対しまして、43 ページに *Nco*I 以外の制限酵素を使用して挿入遺伝子の安定性を確認したデータといたしまして、T3、T4、T5 世代につきまして、*hind*III で処理をしたサザンブロット分析の結果が新たに回答書の添付資料 10 として提出がされております。

指摘事項 15 は、コントロールとしてヌル分離個体を使用した理由及び使用したコントロールがヌル分離個体である根拠を示すことということで、回答といたしまして、まずヌル分離個体を使用した理由ですが、次のパラの3行目の後半部分からですけれども、ヌル分離個体は挿入遺伝子の有無を除き、遺伝的背景が同等であるため、形質転換作物における遺伝子の影響の有無を確認するのに適した系統であるから、ヌル分離個体を使用したということでございます。

(2)ヌル分離個体である根拠ですけれども、T3 世代におきまして4挿入領域以外に遺伝子断片の挿入はなく、4挿入領域が検出されないことが確認されれば、ヌル分離個体であることが示されると考えられたということで、以下に根拠が示されております。

45 ページ、指摘事項 16 ですが、除草剤を散布した場合の構成成分等及び除草剤の残留量を示したデータを示すことということでございまして、まず構成成分のデータに関してですけれども、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤(クロリムロン及びチフェンスルフロン)を、使用基準の最大薬量を散布した場合の構成成分等の分析結果を、回答書の添付資料 12 として提出がされております。その分析結果によりますと、除草剤非散布時と比較しまして、同様な傾向が見られるということでございます。

錠剤アセト乳酸合成酵素阻害剤（クロリムロンエチル）を、使用基準の最大薬量散布した場合の種子中に残留する農薬の量も測定がされておりまして、その結果といたしまして、残留値は検出限界未満であったということでございます。

46 ページ、指摘事項 17 にまいりまして、必須脂肪酸であるリノール酸と α -リノレン酸の含有量が低下することによる、ヒトの健康への影響について考察することということでございます。

回答といたしまして、①としてリノール酸、 α -リノレン酸の摂取目安量ですが、それぞれの摂取目安量は 8.5g 及び 1.2g ということでございます。

ダイズ油の全体を、本品種由来のダイズ油で置き換えた場合のリノール酸及び α -リノレン酸の一日予想摂取量は、それぞれ 7.0 及び 1.1g となり、この量は現在日本人が摂取している両脂肪酸の摂取量の範囲内であることから、ヒトの健康に対して影響を生ずるおそれはないと考えられるということでございます。

② α -リノレン酸摂取目標量ですが 1.2g に設定されているということです。ダイズ油の全体を本品種由来のダイズ油で置き換えた場合、 α -リノレン酸の一日予想摂取量は 1.1g となり、この減少量は現在日本人が摂取している α -リノレン酸の摂取量から見ても、わずかであることから、ヒトの健康への影響を生ずるおそれはないと考えられるということでございます。

49 ページ、指摘事項 18 ですが、すべてのダイズ油が本組換えダイズ油となった場合の一日最大摂取量について考察を行うこと。また、当該ダイズ油をほかの油の代替として用いた場合の一日最大摂取量についても考察することとなっています。

これに対する回答といたしまして、まずすべての油を本品種由来のダイズ油に置き換えた場合につきまして、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸のヒトへ与える健康影響の有無について、考察が行われております。

日本人の 1 人 1 日当たりの脂質摂取量に占めるヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の割合は、それぞれ 0.041%、0.072% と低く、ヒトの健康を害するおそれはないと考えられるということでございます。

更に、揚げ油、マーガリン及び生食用の油が、すべて本品種由来の油に置き換わった場合の 1 人 1 日当たりの脂質摂取量に占めるヘプタデカン酸、ヘプタデセン酸の割合はそれぞれ 0.17%、0.29% となり、いずれも低い値となっております。

説明は以上で終わらせていただきます。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、回答書の順番で指摘事項ごとに御意見をいただいきたいと思っております。

3 ページ、指摘事項 1 であります。摂取量に関する記載内容で、これは橘田先生の御指摘ですけれども、今日は御欠席ということですので。

○松尾係長 橘田先生からコメントをいただいております。この指摘事項で 2 つ指摘がされておりまして、1 つはプレミアム油を搾油するダイズとして利用されると限定している

という点と、もう一つ、置き換わる量が半量程度としていることの2つの指摘が出ています。

後半の指摘につきましては修正がされていますが、前半の指摘に関しましては修正がされていないということです。この点に関してほかの先生方等の御意見をお伺いして、特に先生方から問題がないということであれば、それです承しますというコメントをいただいております。

○澤田座長 それでは、ほかの先生方は御意見いかがでしょうか。修正後の摂取量の3行の文章の上の部分になるかと思えますけれども、厳密に言うと利用するために開発されたということですが。

要は、可能性としては100%置き換わる可能性は否定されていないので、このままでも摂取としては問題ないと思えば、とれる内容には変わっております。特に直し方でいい案がもしあれば、お示ししていただければと思います。

○山川専門委員 プレミアム油を搾油するダイズとして利用するというのは向こうの言い分で、現実にはプレミアム油を搾油するダイズとして開発されたんですね。それが本当は正しいと思うんですが、向こうがそれでいいのかわからないです。

○澤田座長 では、一案として、ダイズとして「利用される」を「開発された」に直す案が1つあるということですね。

○鶴身課長補佐 ここ自体は宿主との比較のところなので、末尾が「開発された」だと、摂取量がいかに変わるかという話なので、いかがでしょうか。もともとこのダイズの開発の目的自体が水素添加が減るとか、油になったときに熱安定性が高いとか、もっと言えばトランス脂肪酸の低減にも役に立つのではないかという観点などで、基本的には油を主として考えればいいのではないかと思います。後段のところではヘプタデカン酸等については特に油以外のものも、その部分については特化して見ているので、ここでの記載は、これでいかがでしょうか。

○澤田座長 いかがでしょう。

○山川専門委員 実用上、問題ないと思います。

○澤田座長 では、一応このままでもよしとするということできたいと思います。

○鎌田専門委員 1つだけよろしいですか。そうなったときに「そのため」という言葉はおかしくて、そのためならば半量にならなければいけなくなってしまうので、文章の脈絡はなくなりますが「そのため」は取った方がよろしいのではないのでしょうか。

○澤田座長 そうですね。おっしゃるとおりです。簡潔になりますけれども「そのため」は取る。それでよろしいでしょうか。

それでは、指摘事項2で除草剤耐性のダイズとして販売する予定はない記載云々でありますけれども、4ページの回答であります。これは鎌田先生が御指摘でありましたけれども、いかがでしょうか。

○鎌田専門委員 これでよろしいかと思えます。

○村田委員 今ので少し質問してよろしいでしょうか。これは除草剤耐性をマーカーで使われているわけですね。これは実際の最後のものは耐性のままなののでしょうか。それとも、そういうのは外してしまっているのか。

○鎌田専門委員 最終まで残っているんですが、このセレクションマーカーをその後、例えば除草剤耐性と実質関係は全くない。だから、そういう目的で遺伝子はあるけれども、農家に売る気はないし、使う気もないということです。

○村田委員 変な話ですけれども、農家は使おうと思えば使えるわけですね。

○鎌田専門委員 だから売った方の意図とは別に、農家がこれをやる可能性があるので、わざわざこの書き方にしてくださいという指摘をしたんです。

○村田委員 なるほど。それは勝手にそうやるんだ、私は関係ないという意味ですか。

○鎌田専門委員 はい。最初は販売する予定はないと言ったけれども、予定はなかったって使う可能性があるのだから、あくまでマーカーとしてのみ利用されるということで、付与したものであるという書き方にしました。

○村田委員 わかりました。

○澤田座長 それでは、指摘事項3で *FAD2-1* 遺伝子と *FAD2-2* 遺伝子の相違点について、これは渡辺先生の御指摘で、修正はいかがでしょうか。5ページの下の方です。

○渡辺専門委員 前は不明ということで、実験の内容にも関わるといって、質問させていただいた内容は的確に答えていただいて、明確になったと思います。

○澤田座長 ほかの先生方もよろしいでしょうか。

次の指摘事項4、回答書の6、7ページの部分でA3の紙です。構築過程で使用した制限酵素名とサイトを記載してほしいという御指摘で、これは鎌田先生の御指摘でした。

○鎌田専門委員 これは今回、全部書かれたので、特に問題はないかと思います。

○澤田座長 それでは、指摘事項5で、これは発現ベクターの外骨格の領域が挿入されたことに関する指摘事項であります。これも鎌田先生の御指摘です。

○鎌田専門委員 いろいろ書いてありますが、間違っって混入したことを認めたのでいいかと思います。

○澤田座長 本来純化したつもりでも、足らなかったというところ、エクスキューズを書いていただいたということだと思います。

10ページ、指摘事項6でいろいろな世代でサザンロットをやってほしいという指摘で、これは鎌田先生ですが、いかがでしょうか。かなり長いですね。

○鎌田専門委員 微妙なところがまだいっぱい残されていて、全体としたらほぼいいんですが、逆にこれを書かれたがために、また疑問が出てきてしまいました。

何が問題かという、どの世代から承認してほしいかということにも全部関わってまして、T3世代からということになっているんですが、今のこの回答書の10ページ(1)の後ろの方のところに、T3世代から得たT4世代で、すべてのT4世代個体において分離が起こらなかった親個体(T3世代)1個体を選抜しましたと書かれていて、そうすると、こ

ここで得られた T3 世代のすべての個体が、必ずしも目的のものではなかった。T3 世代は複数あったんですが、その中の 1 株だけを選んで、それがホモであるとかという説明が下になされていて、そうすると、さてどこから承認するのか。

T3 世代からと言われたら、それは外れるものもあるので、T3 世代の中の自分たちで選んだ特定の 1 個体であることを、まず明確にさせていただきたいということと、これは T4、T5 と 12 ページのところと分離されているんですが、要するに 2 つの大きな流れを別の系統としてつくって行って、全部商品化に使っているんですけども、今、選んだ 1 株から作ったものかどうか、これでは全くわからなくなりました。回答が来たおかげで、またわからなくなったということを起こしたので、今のような考え方だと思うんですが、それを明確にさせていただきたい。そこさえ明確になっていれば、データとしては一応そろった形で、ホモであるとかいうことを全部保証されたと思います。

○澤田座長 今のお話は 12 ページの系統図がありますね。T3 の下からメインの 2 系統が出ておりまして、その基が選択した 1 つの個体であるということでないとおかしいとおっしゃりたいわけですね。

○鎌田専門委員 はい。

○澤田座長 それは確認していただけますか。

○鶴身課長補佐 こちらで聞いている限りにおいても、逆に下から選んでいったと。要は分離しなかったものだけを T3 として、残りを T3 としなかったという説明を聞いていますので、そのところが明確になるように、もっとはっきり書いてもらうようにしたいと思います。

○澤田座長 鎌田先生、それ以外の点では、残りはよろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 それさえ確認されていれば、一応それを保証するデータが後ろに全部付いているということです。

○澤田座長 そうしますと、大分飛びまして指摘事項 7 の 24 ページです。サザンプロットの結果がわかりにくいので、解釈がわかりやすいように資料をつくってほしいという、これは飯先生の御指摘でありましたけれども、回答書の添付資料 7 にまとめましたということです。

○飯専門委員 ベストとは言い切れないんですが、最初に比べたらかなりよくわかるようになりましたので、これで回答としてはよろしいかと考えています。

○澤田座長 色が付きまして、なかなか見るのもまた大変にはなっていますが。

○飯専門委員 確かに、まだ見にくいと思うんですけども。今後の申請でも理解のしやすさに配慮していただければと思います。

○澤田座長 一応これは了解していただくということで、指摘事項 8 の同じ 24 ページの下の部分と、次のサザンプロットの図でありますけれども、3 kbp のバンドについての指摘で、これは小関先生の御指摘ですか。

○小関専門委員 前のときの写真でよくわからなかったんです。たしか矢印か何かに隠れ

ていて見にくかったんだと思います。ですから、今回これでわかりました。

○澤田座長 それでは、26～34 ページにわたっておりますけれども、指摘事項 9 で新たな遺伝子の挿入の可能性についてということで、これは前の指摘事項とも関係していたかと思えます。

それから、指摘事項 10 の 35～38 ページの新たな遺伝子の挿入の可能性について。これも同時にお答えいただいた方がいいかと思いますが、小関先生お願いします。

○小関専門委員 これについては、結局 *EcoRV* のスター活性があったということを書いているんですけども、確かにゲノムの DNA を 2 つの酵素で同時に切るというのは、あまりよくない方法なんですけども、それをやっちゃっているんで、そこで出てきた影響だと言われれば、それはそうかもしれないなと思います。

普通は片方ずつ切るはずなんですけれども、1 回 *Spe I* で切って、精製してもう一回 *EcoRV* で切るところをやっていないかみたいなので、多分その影響が出たんだろうと解釈できます。

ですから、今回は個々の制限酵素で一番適した塩濃度で切っているはずなので、スター活性が出にくいような形にしているのではないかと、私は判断しました。ですから、これはこれでいいのかなと思います。

10 に関しても、たしかこれも隠れていたか、見にくかったのか何かしたんだと思います。これも出ていますので、了解しました。

以上です。

○澤田座長 それでは、指摘事項 9 と 10 は回答を了解していただいたということで、また少し飛びまして、回答書の 39 ページ、指摘事項 11 でありますけれども、これは内在性の FAD2-1 タンパク質の発現が抑制されているかどうかということで、手島先生からの御指摘でした。

○手島専門委員 この項目が「遺伝子産物の組換え体における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項」ということがございまして、その中で FAD2-1 タンパク質に関しての記載がなかったんですが、*FAD2-1* 遺伝子の mRNA の発現が十分抑制されているということが書かれていまして、FAD2-1 タンパクの発現量が非常に低いであろうということで、測定を行う方法がないということで行っていないということでございます。

以前の高オレイン酸の方の評価書も見させていただきまして、mRNA の発現の抑制ということでよしとしている部分もございまして、ここの部分はタンパク発現までは見ていませんけれども、mRNA の発現が十分抑制されているということによろしいかと思えます。

ただ要旨の書き方の中で、62 ページになるんですけども、遺伝子産物の発現量という事項の中で「*gm-fad2-1* 遺伝子」とあるんですけども、ここは「*gm-fad2-1* 遺伝子産物」という項目立てにしていなければならないと思います。

○澤田座長 要旨は今、手元にないのですか。

○鶴身課長補佐 黄色い資料の後ろの方、一番最後の「修正版要旨」。タグで言いますと

最後から2つ目の62ページになります。上の2の次の「(1) *gm-fad2-1* 遺伝子」というところを「*gm-fad2-1* 遺伝子産物」とすればよろしいですか。

○手島専門委員 遺伝子転写産物ですね。

○澤田座長 転写産物を付けていただくということですね。わかりました。

それでは、指摘事項12で40ページですけれども、遺伝子産物の一日タンパク質摂取量の記載についてであります。これは小関先生の御指摘で、40ページの下の方のように直したということです。

○小関専門委員 これで私はいいと思います。

○澤田座長 41ページの指摘事項13、加熱に対する安定性の問題で、これは橘田先生の御指摘でして、御欠席でありますけれども、何かコメントはありますか。

○松尾係長 橘田先生から、この回答内容で構いませんというコメントをいただいております。

○澤田座長 宇理須専門委員、どうぞ。

○宇理須専門委員 この回答では私はまずいのではないかと思います。どうしてかと言いますと、その結果、GM-HRA タンパク質の免疫反応性は90%以上低下したという文章を、そのまま残しているんです。そして、その後に凝集しやすい性質だと書いているわけですが、その結果、免疫反応性は90%以上低下したということは、要は検討できていないということなんです。

ですから、凝集しやすいということは遠心して物が下に落ちてしまっただけで、上清をアプラインしたからバンドがなくなったんだろうという理解なのでいいとは思いますが、免疫反応性は検討していないわけですから、この文章は削除しなければいけないのではないかと思います。

○澤田座長 要は沈殿に行ってしまったので、その評価がされていないことを含めて、どういうふうに直せばいいか。全く取ると文章が足らなくなってしまうけれども、何かいい方法はありますか。

○宇理須専門委員 別の組換え食品なんですけど、遠心せずにアプラインしてウェスタンブロットティングして、クマジーの染色とウェスタンブロットティングをやったというのがあるんですけれども、そういうことをすると、恐らくゲルのウェルのところから、あるいは少し中まで入ったようなものが染まって、ウェスタンブロットティングをやるとそれが染まるかどうか。

それはあまり定量的ではなくなりますが、定性的には反応性がかなり落ちているということは評価できると思うので、もしも反応性まで記述をしなければいけないということであれば、そういう方法をやって、正確性は少し欠けますけれども、ある程度は評価できるのではないかと。

しかし、このままの実験で評価をしなければいけないというならば、免疫反応性に関しては評価していないということを明記していただくことになるのではないかと思います。

○澤田座長 ここでは免疫反応性までは沈殿ですからなかなか難しいですね。ですから、最終的には最初におっしゃったように、上の文章を取った方がよろしいのかなと思います。

○鶴身課長補佐 この GM-HRA は今回特にこれで試験をしたわけではなくて、以前、他のアセト乳酸合成酵素阻害剤のダイズで試験をしております、以前も同じような御指摘をいただいて、回答の 2 パラ目にありますが、上清と沈殿でウェスタンをやったんです。両方から認められたという経緯があるので、免疫反応性を見るという観点で見れば、どちらもあるということになります。

○宇理須専門委員 今回に関しては、それをやっていないんですね。やっておりましたか。

○鶴身課長補佐 ですから、HRA のデータをここには全部引用していることになります。

○澤田座長 そうしますと、免疫反応性は明らかに低下したと書いたら、明瞭な間違いなわけですね。

○宇理須専門委員 沈殿物もウェスタンブロッティングをやってあったんですか。

○鶴身課長補佐 そうです。

○宇理須専門委員 それで反応しているんですね。

○鶴身課長補佐 はい。

○宇理須専門委員 それでは、逆に落ちていないことの方が可能性があることになるわけですね。

○鶴身課長補佐 反応性について言えばそうです。書くとしたら凝集して沈殿をしたというところまでなのかもしれないです。

○澤田座長 そうしますと「したがって」という言葉も要らないですか。これはあってもいいですか。そこら辺は後できちんと日本語になるように直していきたいと思います。

それでは、上の方の文章を一応削除ということをお願いしたいと思います。

そうしますと、指摘事項 14 の回答書 42 ページと 43 ページの上半分で、導入された遺伝子の安定性に関する御指摘であります。これは飯先生、いかがですか。

○飯専門委員 ここで気になったこと的前提として、第 5 の挿入がもしあった場合は、このデータの解釈が全部ひっくり返るということがあったんですが、その部分に関しては先ほどの小関先生のお話からも大丈夫だということで、ここに書かれている回答で OK だと思います。

○澤田座長 それでは、指摘事項 15、回答書の 43~45 ページでありますけれども、これはヌル分離個体を使った理由と、ヌル個体であることを示す根拠を示せという御指摘で、これは鎌田先生からです。

○鎌田専門委員 データ的にはいいんですが、先ほどの指摘のとおり、T3 世代全体を書くような記載ではなくて、多分その中の 1 個体で自分たちが使っているものと限定して、きちんと書いていただきたいということです。

○澤田座長 それ以外はよろしいですか。

続きまして指摘事項 16、回答書の 45 ページで、これは除草剤散布条件下の構成成分の

残留量等の御指摘でありまして、これは飯先生、手島先生、橋田先生から御指摘をいただいておりますけれども、橋田先生から何かコメントはございますか。

○松尾係長 回答の内容で、特に問題はないというコメントをいただいております。

○澤田座長 手島先生はいかがでしょう。

○手島専門委員 特には問題ないと思います。

○澤田座長 飯先生はいかがでしょう。

○飯専門委員 回答としては添付資料の表を見て問題ないと思いますが、要旨の方に一切記載をしていない、その気がないということか分かりませんが、それでいいかどうか。その辺は議論していただいてもいいのかなど。あえて要求する必要がないならデータとしては付いていますので、いいかなということもあります。

○澤田座長 修正版の要旨にこの内容が移っていないということですか。

○鶴身課長補佐 そうです。

○澤田座長 これはせつかくあるので、入れた方がよろしいですね。

○鶴身課長補佐 わかりました。

○澤田座長 それから、指摘事項 17 の 46～48 ページ、これは脂肪酸の減少がヒトの健康に与える影響の問題でありまして、これは石見先生の御指摘でありますけれども、コメントをいただいておりますでしょうか。

○松尾係長 お手元の資料 2 「専門委員からのコメント」の中に、石見先生のコメントを掲載させていただいております。

コメントの 4 ページを御覧になっていただけますでしょうか。最初に「リノール酸、 α -リノレン酸の摂取目安量について」ですが、2. を見ていただきたいと思います。

回答書では、N-6 系脂肪酸の摂取目安量で、摂取目安量というのは性年齢別に設定されており、本回答書の内容では正確な目安量とは言えないということから、記載を適切な表現に改めることという指摘をいただいております。

3. で同じく α -リノレン酸の目安量につきましても、同様に改めることという御指摘をいただいております。

「 α -リノレン酸の摂取目安量について」ですが、これも 2. を見ていただきたいと思います。回答書では α -リノレン酸の摂取目標量は性年齢別に記載されており、本回答書の内容では正確な目標量とは言えないため、記載を適切な表現に改めることというコメントをいただいております。

○澤田座長 ほかの御意見、それから、もしほかの先生方から石見先生のコメントに対する御意見がございましたら、お願いしたいと思います。

○鶴身課長補佐 済みません、補足をさせていただきます。石見先生のコメント自体は、基本的にこの試算で問題はない。ただ、詳細な記載についてはそれぞれ年齢別の設定になっているので、正しく修文してほしいという趣旨でございますので、補足をさせていただきます。

○澤田座長 これは多分、性別と年齢別にもう少しデータとして細かい数字を挙げて、記載を少し追加するということでのよろしいのかなと思いますけれども、ほかの先生方の御意見がもしありましたら。よろしいでしょうか。

それでは、そういうふうに一応直させていただきたいと思います。

49～51 ページの指摘事項 18 であります。組換えダイズの日最大摂取量についての御意見で、これは小関先生からの御指摘でありますけれども、いかがでしょうか。

○小関専門委員 これ以上書きようがないかなと思います。いいです。

○澤田座長 一応、幾つか御意見をいただきましたけれども、修文的な御意見が多かったかと思しますので、確認事項以外には、大きな指摘事項はなかったかと思します。

したがいまして、特段、安全上の大きな問題がないということでもありますので、評価書（案）の審議を行いたいと思います。説明をお願いします。

○松尾係長 それでは、評価書（案）の説明をさせていただきます。資料 1 の 37 ページからが本品種の評価書（案）になっております。説明は 42 ページからさせていただきたいと思します。

42 ページ「Ⅰ．評価対象食品の概要」、名称は高オレイン酸含有ダイズ DP-305423-1、性質は高オレイン酸含有ということで、申請者、開発者は記載のとおりとなっております。

本品種は、ダイズ由来の脂肪酸不飽和化酵素をコードする遺伝子の一部の領域からなる、*gm-fad2-1* 遺伝子を導入して作成されている。本遺伝子によりジーンサイレンシングが誘導され、ダイズ内在性の遺伝子がコードする ω -6 デサチュラーゼの発現が抑制される。その結果、オレイン酸からリノール酸への生合成が阻害され、種子中のオレイン酸含有量が高まるとされている。なお、選択マーカー遺伝子としてダイズ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子を改変した、*gm-hra* 遺伝子が導入されている。

「Ⅱ．食品健康影響評価」にまいりまして、第 1 の 1．宿主及び導入 DNA に関する事項ですが、（1）として宿主はダイズの商業品種である Jack を用いております。

（2）2 つの遺伝子の供与体は、ともにダイズである。

（3）挿入 DNA の性質及び導入方法ですが、*gm-fad2-1* 遺伝子はジーンサイレンスを誘導し、その結果として種子中のオレイン酸含有量が高まるとされています。

gm-hra 遺伝子は、アセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤に対する耐性を付与するタンパク質を発現するとされており。これらの挿入 DNA は、パーティクルガン法によって宿主に導入されており。

43 ページ、2．宿主の食経験ですが、宿主は古くから食品として利用されており。

3．宿主の構成成分等に関する事項ですが、（1）可食部分の主要栄養素、

（2）毒性物質・栄養阻害物質につきましては、記載のとおりとなっております。

4．食品としての利用方法及び相違に関する事項ですが、（1）収穫時期と貯蔵方法につきましては、従来のダイズと変わらない。

（2）可食部位も従来のダイズと変わらない。

(3) 摂取量につきましては、従来のダイズ油が本品種を用いて製造した油に置き換えることが考えられるという記載をさせていただいております。

44 ページにまいりまして、(4) 調理方法、加工方法につきましては、従来のダイズと変わりがないということでございます。

5. といたしまして、本品種は宿主以外のものは比較対象としていない。

6. の相違点に関する事項は、*gm-fad2-1* 遺伝子発現カセットの導入により、種子中のオレイン酸含有量が増加及びリノール酸の含有量は減少していること、*gm-hra* 遺伝子発現カセットの導入により、GM-HRA タンパク質が発現すること、並びに種子中のヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の含有量が、有意に増加している点が、相違点であるということでございます。

以上1～6により、本品種の安全性評価においては、既存のダイズとの比較が可能であると判断されたということでございます。

「第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項」ですが、119行目の後半部分からいきまして、オレイン酸はヒト血中のLDLコレステロールを低下させるが、HDLコレステロールを低下させないことが報告されている。また、多価不飽和脂肪酸の含有量の低下により、水素を添加しなくても油の熱安定性を保つことができる。更に、水素添加量が減少した場合、油中のトランス脂肪酸の生成が抑制され、ヒトにおけるトランス脂肪酸の摂取量が減少することが期待されてございます。更に、本品種には選択マーカーとして利用するため、*gm-hra* 遺伝子の導入がされているということでございます。

「第3. 宿主に関する事項」ですが、1. 宿主は商業品種の Jack である。

2. 遺伝的先祖は記載のとおりでございます。

45 ページにまいりまして、3. 有害生理活性物質の生産に関する事項ですが、いつものように記載をさせていただいております。

4. アレルギー誘発性に関する事項ですが、ダイズはアレルギー誘発性が知られている主要な食物の1つであるということでございます。

5. 大豆にはウイルス、細菌及び糸状菌が原因の各種病害が知られておりますが、それらがヒトや動物に感染することは知られておりません。

6. 安全性や摂取に関する事項ですが、ダイズは古くから食用として利用されていたと考えられるという記載をさせていただいております。

7. ダイズの近縁種にはツルマメが存在するが、これ自体は食用に供されることはないという記載をさせていただいております。

「第4. ベクターに関する事項」ですが、46 ページに行っていただきまして、1. 名称及び由来ですけれども、プラスミド pSP72 を基に、直鎖状 DNA 断片が作成されたということでございます。

2. 性質に関する事項ですが、(1) プラスミド pSP72 の塩基数及び塩基配列は明らかとなっております。

(2) プラスミドの制限酵素切断地図は明らかになっております。

(3) プラスミドの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れていないということでございます。

(4) 本プラスミドには、アンピシリン耐性マーカー遺伝子が含まれておりますが、直鎖状 DNA 断片には含まれていないということでございます。

(5) プラスミドには伝達を可能とする塩基配列は含まれていないということです。

「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」にまいりまして、(1) 挿入 DNA の供与体は、ともにダイズであるということでございます。

(2) 宿主の供与体であるダイズは、古くから食用に供されているという記載をさせていただきます。

2. (1) 挿入遺伝子のクローニングに関する事項ですが、まず *gm-fad2-1* 遺伝子に関しましては、ダイズ内在性の *FAD2-1* 遺伝子の一部の領域を、制限酵素で処理することによって得たということでございます。

gm-hra 遺伝子ですが、これまでに発見されているアセト乳酸合成酵素阻害剤に耐性を有する植物のアミノ酸配列を参考に、アミノ酸を置換させるような改変を加えることによって作製したということでございます。

(2) 挿入 DNA の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっております。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項ですが、まず *gm-fad2-1* 遺伝子に関してですけれども、*gm-fad2-1* 遺伝子は *FAD2-1* 遺伝子の一部の領域からなる遺伝子であるということでございます。この遺伝子はオレイン酸からリノール酸への生合成を触媒する $\omega-6$ デサチュラーゼをコードしております。この遺伝子の導入によりまして、内在性の *FAD2-1* 遺伝子との相互作用によりジーンサイレンシングが起こり、その結果としてオレイン酸からリノール酸への生合成が阻害されることによって、種子中のオレイン酸含有量が高まるということでございます。

本遺伝子の発現を確認するために、ノーザンブロット分析を行いました結果、微弱なバンドが認められましたが、一般にジーンサイレンシングでは mRNA は分解されることが報告されていることから、タンパク質に翻訳される可能性は低いと考えられたということでございます。

gm-fad2-1 遺伝子を含む DNA 断片につきまして、ORF 検索を行いました結果、4 つの ORF が検出されましたが、これらの ORF は既知の毒性タンパク質との間に構造相同性は認められなかったということでございます。

249 行目から *gm-hra* 遺伝子に関する内容になっております。本遺伝子は GM-HRA タンパク質を発現し、アセト乳酸合成酵素の活性を阻害する除草剤の下でも酵素活性を示し、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸が合成される。その結果、アセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤に対する耐性を有するということでございます。

GM-HRA タンパク質と既知の毒性タンパク質との間に構造相同性がないことを確認するために、blastp 検索によるアミノ酸相同性検索を行いました結果、相同性を有する既知の毒性タンパク質は見出されなかったということでございます。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項ですが、記載のプラスミドを構築する過程におきまして *amp* 遺伝子を除去し、また、ハイグロマイシン耐性マーカーである *hyg* 遺伝子を挿入いたしました。宿主に導入した直鎖状 DNA 断片には、これらのマーカー遺伝子は含まれていないということでございます。

3. として (1) のプロモーター、276 行目の (2) ターミネーター、282 行目の (3) その他につきましては、記載のとおりでございます。

4. ベクターへの組み込み方法に関する事項です。(1) 直鎖状 DNA 断片 PHP19340A ですが、プラスミド pSP72 に *hyg* 遺伝子発現カセットを挿入後、*amp* 遺伝子を除去し、次いで KTi3 プロモーター、KTi3 ターミネーター及び *gm-fad2-1* 遺伝子を挿入して構築し、制限酵素処理をすることによりまして、直鎖状 DNA 断片を得たということでございます。

(2) 直鎖状 DNA 断片 PHP17752A ですが、これも同じく pSP72 に *hyg* 遺伝子発現カセットを挿入後、*amp* 遺伝子を除去し、次いで FRT1、SAMS プロモーター、SAMS イントロン、*gm-hra* 遺伝子、*gm-als* ターミネーター、FRT1 及び FRT6 を挿入し構築し、制限酵素で処理することによって直鎖状 DNA 断片を得たということでございます。

49 ページの 301 行目からですが、ここからは発現ベクターに関する事項になっております。

(1) といたしまして、直鎖状 DNA 断片の塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は、ともに明らかになっている。

(2) 目的以外の ORF が含まれていないことに関してですが、①PHP19340A に関してですけれども、この断片につきまして ORF 検索を行いました結果、4 つの ORF が検出されましたが、それらの ORF と相同性を示す既知の毒性タンパク質やアレルゲンは見出されておられません。

また、既知のアレルゲンとの相同性検索を行いました。その結果、80 個以上のアミノ酸について、35% 以上の相同性を示すアミノ酸配列は見出されなかった。更に、抗原決定基の存在の可能性を確認するために、8 アミノ酸について検索を行いました結果、一致する配列は見出されなかったということでございます。

更に *gm-fad2-1* 遺伝子の相補 RNA をプローブとして、ノーザンブロット分析を行った結果、微弱なバンドが認められたが、一般にジーンサイレンシングでは mRNA は分解されることが報告されていることから、タンパク質に翻訳される可能性は低いと考えられたということでございます。

②PHP17752A ですが、①と同様に ORF 検索を行った結果、目的以外のタンパク質を発現する ORF は検索されなかったということでございます。

(3) 意図する挿入領域は、直鎖状 DNA 断片の全領域であるということでございます。

(4) 純化に関する事項ですが、直鎖状 DNA 断片はプラスミド制限酵素処理した後、アガロースゲル電気泳動によって分離が行われております。

組換え体に PHP19340 の外骨格領域の一部が導入されていることが確認されたが、これはアガロースゲル電気泳動による分離の際に、断片が混入したものと考えられている。なお、導入された外骨格領域の一部には、*hyg* 遺伝子及び DNA 複製起点が含まれていないことが確認されているということでございます。

それぞれ導入された2種類の遺伝子発現カセットの構成を表としてまとめております。

6. DNA の導入方法及び交配に関する事項ですが、直鎖状 DNA 断片をパーティクルガン法により宿主に導入後、アセト乳酸合成酵素阻害剤であるクロロスロフロン（クロロスロフロン？）を含む培地で形質転換したカルスを選抜して再生個体を得た。得られた個体についてサザンブロット分析を行い、挿入遺伝子の確認を行った後、一般的な育成プロセスに従い組換えダイズを得たということでございます。

51 ページ「第 6. 組換え体に関する事項」でございます。

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項ですが、ゲノム中に挿入された遺伝子発現カセットのコピー数及び完全性並びに中間ベクターの外骨格配列が挿入されているかを明らかにするため、サザンブロット分析、塩基配列の解析及び PCR 分析を行った結果、以下に示す4つの DNA 領域が、1 コピーずつ宿主ゲノムに挿入されていることが確認されたということで、以下それぞれ4つの挿入された DNA 領域を示しております。

①挿入領域 1 ですが、375～380 行目に記載されているような構成の領域でございます。

382 行目から、挿入領域 1 の近傍配列がダイズゲノム由来であることを確認するため、PCR 分析、blastn 検索を行いました結果、挿入領域 1 の近傍配列はダイズゲノム由来であると考えられたということでございます。

挿入領域 1 の挿入によって、既知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、上述と同じように blastn 検索等を行いました結果、既知の内在性遺伝子が損なわれている可能性は低いと考えられたということでございます。

②挿入領域 2 ですが、404～405 行目に記載されているような構成の領域でございます。

挿入領域 2 の近傍配列がダイズ由来であることを確認するため、PCR 分析及び blastn 検索を行いました結果、挿入領域の近傍配列はダイズゲノム由来であると考えられたということでございます。

挿入領域 2 の挿入によりまして、既知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、blastn 検索を行いました結果、相同性を示す推定 mRNA 配列、更にダイズ EST 配列の一部が検索され、これらの配列の全長につきまして blastn 検索を行いました結果、いずれの推定 mRNA 配列及び EST 配列も、近傍配列とは異なるダイズゲノムに由来することが確認されております。

更に 5' 末端及び 3' 末端近傍配列につきまして blastx 検索を行いました結果、相同性を示す断片が検索されましたが、これらは一般に植物ゲノムに見られる、レトロトラン

スポンソン因子に由来する繰り返し配列の多い領域で、機能を有する遺伝子である可能性は低いと考えられた。

以上のことから、挿入領域 2 の挿入によって、ダイズの既知の内在性の遺伝子が損なわれている可能性は、低いと考えられたということでございます。

③挿入領域 3 につきましては、430、431 行目の記載内容で構成されている領域でございます。

挿入領域 3 の近傍配列がダイズゲノム由来であることを確認するため、PCR 分析及び blastn 検索を行いました結果、挿入領域 3 の近傍配列はダイズゲノム由来であると考えられたということでございます。

挿入領域 3 の挿入によって、既知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、blastn 検索を行いました結果、推定 mRNA 配列及びダイズ EST 配列が検索されました。これらの配列につきまして blastn 検索を行いました結果、いずれの配列につきましても近傍配列とは異なるダイズゲノム由来であることが確認されております。更に blastx 検索を行いました結果、ダイズゲノム断片が検索されましたが、これらは機能を有する遺伝子である可能性は低いと考えられたことから、ダイズの既知の内在性の遺伝子は損なわれている可能性は、低いと考えられたということでございます。

④挿入領域 4 ですが、挿入領域 4 は 459～461 行目の記載内容で構成される領域でございます。

挿入領域 4 の近傍配列がダイズゲノム由来であることを確認するため、PCR 分析及び blastn 検索を行いました結果、挿入領域 4 の近傍配列は、ダイズゲノム由来であると考えられたということでございます。

挿入領域 4 の挿入によって、既知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、blastn 検索を行いました結果、ダイズ由来の推定 mRNA 配列及びダイズ EST 配列が検索されております。これらの配列の全長につきまして blastn 検索を行いました結果、いずれの配列も近傍配列とは異なるダイズゲノム由来であることが確認されております。更に近傍配列につきまして、blastx 検索を行いました結果、既知のタンパク質と相同性のある配列は見出されなかったということでございます。

これらのことから、挿入領域 4 の挿入によって、ダイズの既知の内在性の遺伝子が損なわれている可能性は、低いと考えられたということでございます。

以下、483 行目から挿入された DNA の模式図を記載させていただいております。

55 ページ 511 行目からですが、(2) ORF に関する事項ですけれども、各挿入領域と 5' 末端及び 3' 末端近傍配列 (各 600bp) との接合部並びに各挿入領域における遺伝子発現カセット断片の接合部におきまして、意図しない ORF が生じていないことを確認するため、記載の条件におきまして ORF 検索を行いました結果、挿入領域 1、挿入領域 2、挿入領域 3、挿入領域 4 につきまして、合計 53 個の ORF が検索されております。

これら検索された ORF につきまして blastp 検索を行いました結果、既知の毒性タンパ

ク及びアレルゲンは見出されなかったということでございます。更に既知アレルゲンとの相同性検索を行いました結果、80 残基以上のアミノ酸について 35%以上及び連続する 8 アミノ酸については、一致する配列が見出されていないということでございます。

2. 遺伝子産物の発現部位、発現時期に関する事項です。まずは *gm-fad2-1* 遺伝子につきまして、米国で栽培された本品種の葉、種子における *gm-fad2-1* 遺伝子及び内在性 *FAD2-1* 遺伝子の mRNA の発現量をノーザンブロット分析により測定した結果、非組換えダイズと比較して低下しており、*gm-fad2-1* 遺伝子及び内在性 *FAD2-1* 遺伝子の発現が抑制されていることが確認されております。

56 ページ、GM-HRA タンパク質につきましても、発現量を ELISA 法を用いまして測定した結果、以下の表のとおりとなっております。

3. 一日蛋白摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項ですが、本品種による遺伝子産物は、日本人 1 人が 1 日あたりに摂取するダイズ及びダイズ加工品を、すべて本品種に置き換えて計算いたしますと、GM-HRA タンパク質の 1 日 1 人当たりの最大摂取量は記載のとおりとなりまして、1 人 1 日当たりのタンパク質平均摂取量に占める割合は、 $2.3 \times 10^{-4}\%$ となることから、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断されるということでございます。

4. 遺伝子産物のアレルギーに関する事項です。

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性につきまして、供与体であるダイズにつきましては、ヒトに対するアレルギー誘発性について一般的によく知られており、研究も多く行われているということでございます。

(2) 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関してですが、GM-HRA タンパク質がアレルギー誘発性を持つという知見の報告はされていません。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性に関する事項ですが、①人工胃液に対する感受性についてですが、*E. coli* で発現させた GM-HRA タンパク質の人工胃液中における消化性を、SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法による分析を行った結果、いずれの方法におきましても、試験開始後 30 秒後に消化されたということでございます。

②人工腸液に対する感受性ですが、同じく *E. coli* で発現させたタンパクの消化性を、SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法による分析を行いました結果、SDS-PAGE につきましては試験開始後 30 秒以内、ウェスタンブロットにつきましては試験開始後 2 分以内に消化されたということでございます。

③加熱処理に対する感受性ですが、同じく *E. coli* で発現させましたタンパクにつきまして、加熱による酵素活性の変化を測定いたしました結果、50℃、15 分の加熱処理で失活することが確認されております。

また、70℃、15 分間加熱処理し、ウェスタンブロット法により分析を行いました結果、熱処理に対して不安定であることが確認されておるということでございます。

(4) 既知アレルゲンとの構造相同性につきましてですが、アレルゲンとの構造相同性

を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行いました結果、80 残基以上のアミノ酸について 35%以上の相同性を示すアミノ酸配列は見出されなかったということでございます。また、抗原決定基の存在の可能性を確認するため、連続する 8 つのアミノ酸の相同性検索を行った結果、一致するものは見出されなかったということでございます。

以上（１）～（４）及び前項 3 から総合的に判断し、GM-HRA タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認したということでございます。

5. 導入された遺伝子の安定性に関する事項ですが、後代における挿入遺伝子安定性を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、各世代において共通のバンドが確認されたということでございます。

6. 代謝経路への影響に関する事項です。まず *gm-fad2-1* 遺伝子ですが、ダイズ内在性の *FAD2-1* 遺伝子がコードする $\omega-6$ デサチュラーゼは、種子中のオレイン酸からリノール酸への生合成を触媒する酵素である。*Gm-fad2-1* 遺伝子の導入によってジーンサイレンスが誘導され、オレイン酸からリノール酸への生合成が阻害される。この結果、種子中のリノール酸の含有量は減少し、オレイン酸の含有量が高まるという記載をさせていただいております。

GM-HRA タンパク質ですが、本タンパク質は分枝アミノ酸合成において、共通経路となるアセト乳酸合成を触媒する酵素であるアセト乳酸合成酵素にアミノ酸変異が導入された酵素であり、アセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤に耐性を示す特徴があるということでございます。一方、内在性のアセト乳酸合成酵素は、このような除草剤によって阻害されることが知られております。

一般的に分枝アミノ酸合成経路のうち、バリン・ロイシン合成経路におきましては、バリンによってアセト乳酸合成酵素がフィードバック制御を受け、また、イソロイシン合成経路におきましては、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラターゼがイソロイシンによって、フィードバック制御されていることが知られております。

また、本品種の変異バリン、ロイシン、イソロイシンの含有量は非組換えダイズと比較しまして、有意に変化していないことから、仮に GM-HRA タンパク質によってアセト乳酸合成酵素の触媒活性が高まりましたとしても、これらのフィードバック制御が働いていることが推定されることから、本品種における GM-HRA タンパク質は、宿主の持つアミノ酸合成経路に大きな影響を及ぼさないと考えられます。

一方、本品種におきまして、ヘプタデカン酸、ヘプタデセン酸の含有量は非組換えダイズと比較して有意に増加しておりますが、この増加は GM-HRA タンパク質が有するアセト乳酸合成酵素を阻害している除草剤の耐性を付与するために導入された、アセト乳酸合成酵素アミノ酸変異により、基質の 1 つである α -ケト酪酸に対する GM-HRA タンパク質の基質親和性が低下し、ヘプタデセン酸等の奇数鎖脂肪酸の合成の基となる α -ケト酪酸が蓄積し、それら奇数鎖脂肪酸への合成量は増加した可能性があるという推測されたということ

でございます。

7. 宿主との差異に関する事項ですが、米国の圃場で栽培されました本品種及び非組換えダイズにつきまして、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類及び栄養阻害物質等の分析を行いまして、本品種と非組換えダイズとの間に統計的有意差がないことについて、検討を行いました。

(1) 主要構成成分につきまして検討を行いました結果、統計的有意差が認められないか、または認められた場合であっても、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値または文献値の範囲内でありました。

(2) 脂肪酸組成につきましてはオレイン酸、ヘプタデカン酸、ヘプタデセン酸が有意に増加し、リノール酸が有意に減少しております。これら以外の脂肪酸につきましては、統計学的有意差が認められないか、または認められた場合にありましても、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値または文献値の範囲内でありました。

有意な増加が認められましたオレイン酸、ヘプタデカン酸、ヘプタデセン酸並びに有意な減少が認められましたリノール酸のヒトへの健康影響について考察を行っております。

本品種のオレイン酸含有率は、オリーブ油等の高オレイン酸含有油のオレイン酸含有率と同等であるということでございます。

ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸につきましては、種々の食品に含有されており、日常的に摂取されている。また、日本人1人が1日当たりに摂取するダイズ油をすべて本品種に置き換えた場合の、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の摂取量の増加量につきまして計算を行いました結果、それぞれ記載の割合でありました。

リノール酸等の必須脂肪酸欠乏症は、少量の摂取により予防可能とされており、日本人1人が1日当たりに摂取するダイズ油を本品種に置き換えた場合のリノール酸の摂取量は、日本人が一般に摂取している摂取量の範囲内であった。

以上のことから、ヒトの健康を損なうおそれはないと考えられたということでございます。

(3) アミノ酸組成につきましては統計学的有意差が認められないか、有意差が認められた場合にあっても、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値または文献値の範囲内でありました。

(4) ミネラル類につきましても同じく同様に統計学的有意差が認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値あるいは文献値の範囲内でありました。

(5) ビタミン類につきましても、同様の傾向が認められたということでございます。

(6) 栄養阻害物質等につきましても、同様の傾向が認められたという記載をさせていただいております。

8. 諸外国における認可状況につきましては、記載のとおりでございます。

60 ページにまいりまして、9. 栽培方法に関する事項につきましては、従来のダイズと同じということでございます。

10. 種子の製法及び管理方法につきましても、従来のダイズと同様でございます。

「第7. 第2から第6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」ですが、第2から第6までにより安全性の知見が得られており、以下に示された試験は必要ないと判断したということでございます。

「Ⅲ. 食品健康影響評価」の結果に関してですが、本品種につきましては、種子植物の安全性評価に基づき評価を行った結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断したということでございます。

説明は以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。時間的にはどのぐらいですか。

○鶴身課長補佐 あと15分ぐらいです。済みません。

○澤田座長 では、限られた時間ではありますけれども、細かい字句等の修正は御連絡いただくということで、大きな点でこの場で直す方向だけでもおっしゃっていただきたいと思います。コメントがあれば、よろしく願います。鎌田専門委員、どうぞ。

○鎌田専門委員 44ページのところで、比較対象とするもののお話というのが「宿主以外のものは比較対象としていない」なんですけど、申請者側の方の資料ではダイズだけではなくて、既存の油もということなんです。

○鶴身課長補佐 オリーブオイルとかも多分引用しておりました。

○鎌田専門委員 書き方がかなり違っていると思いますので、これは直された方がいいかと思います。それに伴って、114、115行目が全く同じように、油も比較対象にしないと成り立たないので、そこもそういうふうに変えられたらと思います。

○澤田座長 それは追加していただきます。

ほかにありますでしょうか。宇理須専門委員、どうぞ。

○宇理須専門委員 57ページの578行目の「加熱処理に対する感受性」ですけれども、先ほど言いましたように、データにより正確に表現した方がいい。これで見ますと「熱処理に対して不安定であることが確認された」とありますが、免疫反応性に関してはどちらかわからなかったのか、見ていないのか、あるいは先ほど言ったように、そういうデータがあれば反応性は残っているとか、より正確な表現にした方がいいのではないかと思います。

○澤田座長 先ほどの修正と同調して、同じように直すんですね。

飯専門委員、どうぞ。

○飯専門委員 49ページの322行目からの段落ですけれども、ここは構築された発現ベクターに関する事項なので、この段落では場所が違うかなと思います。

○澤田座長 内容的に別のところに移した方が多分いいと思います。

○飯専門委員 55ページの一番下のところにある内容と重複しています。

○澤田座長 これは削除した方がいいですか。

○飯専門委員 今、確認したら要旨の方に入っていないので、削除ですね。

○澤田座長 ほかにありますでしょうか。

○宇理須専門委員 もう一つよろしいですか。59 ページ 689 行目の「諸外国における認可、食用等に関する事項」ですけれども、アメリカのところが 2009 年 1 月に確認が終了したと書いてありますが、確かに要旨でも食品・飼料の確認終了となっていますが、確認という意味は、受理されたと理解でよろしいのでしょうか。

○鶴身課長補佐 そうです。

○宇理須専門委員 確認でよいのでしょうか。受理の方がよりわかりやすいかなと思ったんです。

○澤田座長 日本では安全性が確認されたという意味で確認と。

○鶴身課長補佐 どのような表記が最も正しいのかというのを、もう一度確認をさせていただきます。

○澤田座長 村田委員、どうぞ。

○村田委員 1 つよろしいですか。微量成分の話なんですけれども、いろいろ書いてありますが、サポニンとかリポキシゲナーゼというものは、ダイズの場合にははからなくてもよろしいものなのでしょうか。

○澤田座長 サポニンはたしか今までは書いていなかったと思います。

○村田委員 それは安全性の対象にはならないということではよろしいですか。

○澤田座長 サポニンの含量自身がそれほど高くないせいですか。普通は高いと調べることが多いものですが、これは少し確認して、もし高くて書いていないんだったら問題がありますけれども、低くてあまり対象にする必要がないということであれば、書く必要はないかと思えます。

ほかによろしいでしょうか。

○村田委員 リポキシゲナーゼは、別に特段ダイズの場合にはやらなくてよろしいものなのですか。何となくよく食品の教科書だとリポキシゲナーゼはと書いてありますが、それ自体は毒性は別にないですから。

○澤田座長 リポキシゲナーゼは今まで検討した例がありません。

飯専門委員、どうぞ。

○飯専門委員 どの段階でお尋ねしたらいいかわからないですけれども、これは②と考えるとよろしいんですか。

○鶴身課長補佐 勿論そうです。

○飯専門委員 前のときに、最後の一文に。

○鶴身課長補佐 そうですね。前回は除草剤耐性だったので①の可能性があるということでしたけれども、これは高オレイン酸で明らかに②ということですよ。

○飯専門委員 特別ここにそのことが書かれていなくて、自明だからという意味で解釈していいんですか。

○澤田座長 小関先生、対処法はありますか。②であると明記する必要はありますか。

○小関専門委員 それはもう明らかだからいいのではないかと思います。前回のときには

限りなく②に近い①なのか。今後どういうふうにさばいていくのかについて、要するにあの時点で②と完璧にするかどうか、できるかどうかちょっとわからなかったので、ああいうリマークを置いたという判断でいかがでしょうか。そう思っただけであれば多分いいかなと思うんです。

○鶴身課長補佐 たしか文字面だけ読めば①に入るという解釈もできたので、その点のただし書をあえて付けたというのが前回です。

○澤田座長 時間はもうそろそろでしょうか。

○鶴身課長補佐 もし、よろしければ。

○澤田座長 それでは、大きな問題点は大分いただいたと思いますので、細かい点を事務局にお送りいただいて、大きいところは御指摘いただいた先生と事務局と私の方で直させていただきますと思います。

議題（１）についてはこれで終わりたいと思います。

議題（２）その他でありますけれども、私の方から１つ報告があります。

５月の専門調査会で審議いたしましたキチナーゼでありますけれども、プロモーターの供与株の同定方法を回答する等の指摘を出しまして、その回答の取扱いについては御担当の委員に御協力いただき、座長預りとなっております。確認した結果、適切な回答が得られましたので、評価書（案）を食品安全委員会へ報告、パブリックコメントの募集の手続の後、評価書を食品安全委員会へ報告いたしました。

食品安全委員会での審議の結果了承され、評価結果が９月３日付けで厚生労働省に通知されたと聞いております。

私からの報告は以上であります。事務局から、ほかに何かございますか。

○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、本日の議題につきましては、これで終了とさせていただきます。今後の予定をお願いします。

○鶴身課長補佐 次回でございますが、日程を確認させていただいたところ、10月19日月曜日の午後が御都合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、10月19日の午後ということで、またよろしく願いします。

現在の専門委員による調査会の審議は今日が最後となります。２年間どうも長い間ありがとうございました。再任される方におかれましては、引き続きよろしく願いします。

以上をもちまして、第73回遺伝子組換え食品等専門調査会を閉会させていただきます。長い間ありがとうございました。