

食品安全委員会遺伝子組換え食品専門調査会

第84回会合議事録

1. 日時 平成22年9月6日(月) 13:59~16:16

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

- ・pGlu株を利用して生産されたグルカナーゼ
- ・チョウ目害虫抵抗性ワタCOT102系統(食品・飼料)

(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、小関専門委員、鎌田専門委員、橋田専門委員、児玉専門委員、手島専門委員、中島専門委員、飯専門委員、山崎専門委員、和久井専門委員

(委員)

小泉委員長、長尾委員、廣瀬委員、見上委員、村田委員

(事務局)

栗本事務局長、大谷事務局次長、坂本評価課長、前田評価調整官、北村課長補佐、松尾係長、種池技術参与

5. 配布資料

資料1 食品健康影響評価に関する資料

- ①pGlu株を利用して生産されたグルカナーゼ
- ②チョウ目害虫抵抗性ワタCOT102系統(食品)
- ③チョウ目害虫抵抗性ワタCOT102系統(飼料)

参考資料1 食品健康影響評価結果

- ・pCHI株を利用して生産されたキチナーゼ

参考資料2 食品健康影響評価に係る指摘事項

- ・チョウ目害虫抵抗性ワタCOT102系統(食品)

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第84回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催いたしたいと思えます。

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

本日は所用によりまして、澁谷専門委員、海老澤専門委員が御欠席とのことです。

本日の議題であります、新規の品目であります pGlu 株を利用して生産されたグルカナーゼ、継続の品目でありますチョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統の安全性についての審議となります。

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

○松尾係長 まず配付資料を確認させていただく前に、事務局で人事異動がございましたので、御報告させていただきます。

まず7月30日付けで評価課長が北條から坂本に代わりましたので、報告させていただきます。

○坂本評価課長 坂本でございます。どうぞよろしくお願いいたします。

○松尾係長 また、8月17日付けで遺伝子組換え食品等担当の技術参与として、種池が着任いたしましたので、併せて報告させていただきます。

○種池技術参与 種池です。よろしくお願いいたします。

○松尾係長 それでは、議事次第に基づきまして、配付資料を確認させていただきます。

配付資料といたしまして、まず議事次第、座席表、専門委員名簿。

資料「食品健康影響評価に関する資料」。

参考資料1「食品健康影響評価結果」。

参考資料2「食品健康影響評価に係る指摘事項」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、回収をさせていただきます、次回にまた配付いたします。補足等がございましたら、事務局までお知らせください。

○澤田座長 それでは、議題1の審議に入りたいと思えます。まずグルカナーゼであります。この添加物は安全性評価基準の対象とならない、いわゆるナチュラルオカレンスに該当するとされております。したがって、本添加物は安全性評価基準の対象となるか否かについて御確認いただき、対象とならない場合は評価書(案)の審議を行いたいと思えます。対象となる場合は安全性評価を行うための評価基準に沿った資料を提出いただくことを申請者に指摘したいと思えます。

それでは、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、説明させていただきます。本日は pGlu 株を利用して生産されたグ

ルカナーゼについて審議していただきますが、その前に配付させていただいております参考資料1を御覧になっていただけますでしょうか。

参考資料1は、pCHI株を利用して生産されたキチナーゼの評価書になっておりまして、本日御審議をしていただく品目につきましては、このキチナーゼと比較して、導入している遺伝子が異なっている以外の点につきましては、宿主や遺伝子の供与体等を含めて、すべて全く同じになっておりますので、それを前提に説明を聞いていただければと思います。

それでは、資料に基づきまして、説明させていただきます。お手元にごございます水色の紙ファイルの2ページから順を追って説明させていただきます。

「1. 本グルカナーゼの使用・開発目的」。グルカナーゼは、キノコ類などの細胞壁の構成成分の一つである β -D-グルカンの加水分解に使用されている食品添加物でございます。

本グルカナーゼと従来のグルカナーゼの違いは、本グルカナーゼは雑菌汚染のリスクが低減する50~60℃において反応が可能であり、従来の添加物と比べてより高温での反応が可能になったということです。

「2. 宿主」。 *Streptomyces violaceoruber* 1326株が用いられております。

「2.1 非病原性」。本宿主は、植物、動物に対して病原性及び毒性は知られていないということです。

「2.2 その他の有害生理活性物質」。本宿主は、有害生理活性物質の生産についても特に知られていないということです。

3ページ「2.3 食経験について」。 *Streptomyces* 属細菌が基原となる既存添加物は既に豊富な食経験がございます。具体的な例といたしましては、下に書いてありますとおり、 β -アミラーゼ、グルコースイソメラーゼ、セルラーゼの生産に実際に使用されているということです。

「3. プラスミドについて」。「3.1 名称」。使用したプラスミドは記載のとおり、pIJ702が使われております。このプラスミドの由来は *S. violaceoruber* ATCC 35287株となっております。このプラスミドの塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかになっています。

「3.4 薬剤耐性」。本プラスミドにはチオストレプトン耐性遺伝子が含まれておりますが、その生産物であるチオストレプトン耐性タンパク質は、球状構造を有していることがわかっています。一般的に球状タンパク質は水溶性のものが多く、非水溶性の繊維状タンパク質と比べて分解酵素の作用を受けやすいことが知られています。本タンパク質の消化性につきまして解析を行った結果、ヒトの消化管に存在する消化酵素群で容易に消化されることが考えられると報告されているということです。

「3.5 伝達性」。当該プラスミドは伝達性がないことが知られています。

「3.6 宿主依存性」。当該プラスミドは、 *Streptomyces* 属以外の微生物では複製されないということです。

「4. 発現プラスミドに関して」。「4.1 挿入遺伝子の供与体」。表に記載されていま

すとおりに、プロモーター領域が *S. cinnamoneus* TH-2、グルカナーゼ構造遺伝子が *S. violaceoruber* NBRC 15146、ターミネーター領域が *S. cinnamoneus* NBRC12852 株がそれぞれ供与体となっております。

なお、プロモーターの供与株である *S. cinnamoneus* TH-2 株は未同定の分離株であったため、同定が必要であったことから、まず本菌株の 16SrRNA 配列を決定し、決定した配列につきまして、相同検索を行った結果 *S. cinnamoneus* NRRLB-5624 株と 100% 一致することが確認されております。ターミネーター供与株である *S. cinnamoneus* NBRC12852 株と 99.2% の高い相同性を示すことが確認されています。*S. cinnamoneus* TH-2 株と基準株である *S. cinnamoneus* NBRC12852 株の染色体 DNA を用いた DNA-DNA 相同性試験を行った結果、70% 以上の相同性が確認されたため、本菌株を *S. cinnamoneus* TH-2 株と同定したということとして、以下に具体的な DNA-DNA 相同性試験の方法が記載されています。

5 ページ「4.1.1 挿入遺伝子供与体の安全性について」。本構造遺伝子供与体であります *S. violaceoruber*、プロモーター及びターミネーターの供与体であります *S. cinnamoneus* は病原性及び毒素産生性は報告されていないということです。

6 ページ「4.1.2 挿入遺伝子供与体の安全な摂取経験について」。 *Streptomyces* 属が基原となる既存添加物は豊富な食経験があるということです。

「4.2 発現プラスミドの性質」。今回作製しました発現プラスミド pGlu の概要が下の図のようになっておりまして、pIJ702 プラスミドにプロモーターと挿入遺伝子とターミネーターを組み込むことによりまして、発現プラスミド pGlu を作製したということです。

「4.3 発現プラスミド (pGlu) の構築」。上から 2 行目辺りからいきますと、プラスミド pIJ702 から ●●● しまして、その後にプロモーターとターミネーターとグルカナーゼ構造遺伝子を組み込み、更に大腸菌由来の遺伝子を除去することによりまして発現プラスミドができたということです。

7 ページ「4.4 発現プラスミドの宿主への導入方法」ですが、pGlu プラスミドで宿主 *S. violaceoruber* 1326 株をプロトプラスト法で形質転換することによりまして生産株である pGlu を得たということです。

本生産株が産生するグルカナーゼと本遺伝子供与体が産生するグルカナーゼとの同一性について検討されておりまして、その結果、開始コドン以外は遺伝子配列がすべて一致することが確認されていますということと、開始コドンがコードするアミノ酸は、それぞれ同じメチオニンであるということから、アミノ酸配列的には全く同じものが生産されるということです。

「6. 本件製品の製造について」は、その製造工程、製造に用いられる原料及び器材はすべて食品衛生法に準じた添加物製造に合致したものを使用するというものです。

7. からいわゆるナチュラルオカレンスに該当するかどうかについて検討されております。

プロモーターの供与株である *S. cinnamoneus* TH-2 株、構造遺伝子供与株である *S. violaceoruber* NBRC15146 及びターミネーターの供与株である *S. cinnamoneus* NBRC 12852

株の 16SrRNA の塩基配列はそれぞれ高い相同性を示すことがわかっております。

宿主 *S. violaceoruber* 1326 株の 16SrRNA 配列は報告されておられません。同種かつ本グルカナーゼ構造遺伝子の供与体である *S. violaceoruber* NBRC 1514 株の 16SrRNA 配列と 100% の相同性を示すと考えられるということです。

「7.1 *Streptomyces* 属間で遺伝子交換が行われることに対する遺伝学上の根拠」。 *Streptomyces* 属の多くが自然界において、菌と菌との接合による遺伝子交換を行うことが報告されています。

「7.2 *Streptomyces* 属間でプラスミドの転移と染色体遺伝子交換が行われることに対する実験室での証明」。 *S. violaceoruber* 由来の接合性プラスミド及びその派生プラスミドは実験用寒天培地及び土壌環境中において、*Streptomyces* 属間で転移することが報告されています。

また、*S. violaceolatus* 及び *S. lividans* (*S. violaceoruber* の旧名) の土壌中での生活環を追跡し、プラスミド転移、フェージ感染及び細胞の接合がある段階で行われていることが証明されています。また、あらかじめ滅菌した土壌におきまして、水銀耐性遺伝子をコードする 2 つの *Streptomyces* 属由来の巨大線状プラスミドが *S. lividans* に転移されたことが証明されています。

「7.3 自然界において、*Streptomyces* 属間に遺伝子交換が行われる根拠」。 *Streptomyces* 属が自然界において遺伝子交換を行うという事実は、系統学的解析からも報告されているということで、1 つの例といたしまして、*Streptomyces* 属に広く分類されている菌株を土壌より分離いたしまして、これらの 16SrRNA を基に得られた系統樹と芳香族ポリケタイド生合成に関わる遺伝子情報を元に得られた系統樹が比較されております。その結果、相同性の高い芳香族ポリケタイド生合成に関わる遺伝子は、分類学上近縁ではない *Streptomyces* 属の菌株に存在することが示されておりまして、この事実が *Streptomyces* 属間で広く遺伝子が交換されていることを示す証拠であると説明されております。

また、ストレプトマイシン生合成に関する遺伝子を持つ 2 種類の菌株を土壌から分離した結果、そのうちの 1 つの菌株はストレプトマイシン生合成に関する遺伝子クラスターを構成する全遺伝子を持っている一方で、もう一つの菌株につきましては同クラスターを構成する遺伝子の一部分も持っていた。更にその 2 つの菌株は分類学上は近縁でないことが示されているということから、近縁でない 2 種類の菌株が共通の遺伝子を持つことは、*Streptomyces* 属間の遺伝子交換の結果であることを証明しているということです。

「8. 諸外国の規制、認可について」。記載のとおりになっております。

以上のことから、自然界において、*Streptomyces* 属間で遺伝子交換が行われていることが明らかであると考察されます。更に *S. cinamomeus* 及び *S. violaceoruber* では、自然に遺伝子の交換がなされていると考えられる科学的知見があることから、本添加物の生産菌である pGlu と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在し得ると考えられるということです。

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、申請書につきまして、順を追って各先生から御意見をいただきたいと思います。

まず項目 1～3 で申請書の 2～3 ページにわたりまして、御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。

○橋田専門委員 問題がないとは思いますが、チオストレプトン耐性遺伝子が含まれている薬剤耐性のところで、分解されるであろうということが書いてあるんですけども、例えば文献でもいいので、実際にこれくらいというものがあっていいのかなと思いますけれども、そこまでは要らないでしょうか。

○澤田座長 この本来のプラスミドが持っているわけですね。これはセルフの遺伝子ですので、形式的には要らないということになります。これはこの前に承認したキチナーゼでも状況は同じですね。

○松尾係長 全く同じです。

○澤田座長 ということでありますので、これ以上深くは言わないことにしたいと思います。

○児玉専門委員 今のチオストレプトン耐性遺伝子の件ですけれども、私はこの前のものは知らなかったのですが、前にも通っているので、今更必要ないと思いますが、文献をたどっていくと基はストレプトマイセス・アズレンスという別のストレプトマイセスから持ってきているようなので、記述としてはどこかに書いておいた方がいいような気がします。前にも通っているので、いいかなとも思いました。

○澤田座長 由来を一言だけ追加していただければということですね。それもナチュラルオカレンスに入った可能性が非常に高いものであると。それでは、3 ページの下から 5 行目のチオストレプトン耐性遺伝子の前に由来を一言いただくということにしたいと思います。ほかによろしいでしょうか。

続きまして、申請書の 4 ページから最後までということで、項目の 4、5、6、7、8 にわたりまして、御意見がございましたら、お願いしたいと思います。

○中島専門委員 中に入れてある遺伝子の話ですけれども、今回入れているグルカナーゼの遺伝子、●●●を足して、開始コドンは GTG、ATG に変えて、微小な変化とも言えるのですけれども、このくらい変えてもナチュラルオカレンスで問題がないと言えば問題はないでしょうか。私は前回のときに委員ではなかったので、そこはわからないですけれども、前回に何か細工していたのであれば。

○澤田座長 確認したいのですけれども、アミノ酸置換はないですか。

○中島専門委員 アミノ酸の置換はないです。

○澤田座長 インアクティブな配列の追加があるということでよろしいですか。

○中島専門委員 そうということです。

○澤田座長 前回の資料を見れば、その遺伝子の周辺が前回も変わっていた可能性がある

かもしれません。今までのナチュラルオカレンスの認定では直接アミノ酸置換がなく、のりしろ的などころが変わったくらいなら問題ないだろうという判断をずっとしてまいりました。

小関先生、何かございますか。

○小関専門委員 そのとおりだと思います。クローニングサイトが多少加わって、特にアミノ酸配列に影響を及ぼさないのであれば、ナチュラルに残れるとみなしてよろしかろうという判断をしていたかと思います。

○中島専門委員 開始コドンはもともとが GTG で、これを ATG に変えていて、これをやると一般にこの発現量が上がるのですけれども、多分そのためにこの GTG を ATG に変えているのですが、アミノ酸の配列に変化がないからよしとするということであれば、それでいいのですけれども、その辺の御判断はいかがでしょうか。

○澤田座長 N 端のアミノ酸のコドンが変わっているだけであれば、問題ないと思いますけれども。

ほかにいかがですか。どうぞ。

○飯専門委員 最後の諸外国の規制という部分になりますが、これはあるならということなのですが、前のキチナーゼのものが外国に出願されていたり、審査が進んでいるところがあるなら、今回の場合に情報としては加えてあってもいいように思います。

○澤田座長 これは事務局の方で何か情報をお持ちですか。

○松尾係長 キチナーゼが諸外国で認可されているかどうかということですか。

○飯専門委員 これはキチナーゼのときのものそのまま、このパターンで参考文献もあるとまさに自分たちで書いているのですけれども、前回のときはキチナーゼの審査だったからそれでもいいのですが、今回はキチナーゼが終わった段階での審査ですから、キチナーゼに対してはどう扱われたかということが、国外でもし情報があるのであれば、ここに書き加えてあってもいいのではないかという意味です。

○松尾係長 わかりました。諸外国の状況は情報を持ち合わせておりませんので、確認させていただきます。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。

それでは、本件でありますけれども、先ほど申し上げましたように微修正をすれば、特段に安全性上の問題はないということでありますので、引き続きまして、評価書（案）の審議に移りたいと思います。

それでは、事務局から説明をお願いします。

○松尾係長 それでは、評価書（案）を説明いたします。食品健康影響評価に関する資料を御準備いただきまして、1 ページからグルカナーゼの評価書になっています。説明につきましては4 ページから説明いたします。

「I. 評価対象添加物の概要」は、いつものように名称、用途、申請者、開発者をそれぞれ記載しています。

28 行目、本添加物はグルカナーゼの品質を高めるために、*S. violaceoruber* 1326 株を宿主として、グルカナーゼ構造遺伝子、プロモーター及びターミネーターを結合した挿入 DNA を含む発現プラスミドを導入して作成した pGlu 株を利用して生産されたグルカナーゼであるということです。

35 行目。宿主及び構造遺伝子の供与体である *S. violaceoruber* 並びにプロモーター及びターミネーターの供与体である *S. cinnamoneus* は毒素産生性及び病原性は知られていないということです。

40 行目「Ⅱ．食品健康影響評価」。

「1．pGlu 株の作製について」。宿主は、*S. violaceoruber* 1326 株。挿入 DNA は、*S. violaceoruber* NBRC15146 株由来のグルカナーゼ構造遺伝子に *S. cinnamoneus* TH-2 株由来のメタロエンドペプチダーゼ遺伝子のプロモーター及び *S. cinnamoneus* NBRC12852 株由来のホスホリパーゼ D 遺伝子のターミネーターを結合したものであるということです。

47 行目。発現プラスミド pGlu は、*S. violaceoruber* ATCC35287 株由来のプラスミドを基に作製したものであるということです。

50 行目。pGlu 株は、発現プラスミド pGlu を形質転換することによって作製がされたということです。

53 行目「2．評価対象添加物に該当するか否かについて」。

(1) *S. violaceoruber* NBRC 15146 株、*S. cinnamoneus* TH-2 株、*S. violaceoruber* NBRC12852 株の 16SrRNA 塩基配列は高い相同性を示している。

(2) *Streptomyces* 属の多くの菌株は遺伝子交換を行うことが報告されている。

(3) 寒天培地及び土壌環境中において、*S. violaceoruber* 由来のプラスミドは *Streptomyces* 属間で転移することが示されているということです。

65 行目 (4) ですが、*S. violaceolatus* と *S. violaceoruber* の生活環を調査し、特定の段階においてプラスミドの転移、フェージの感染及び細胞の結合が生じていることが確認されている。

(5) 滅菌土壌におきまして、水銀耐性遺伝子をエンコードする *Streptomyces* 由来巨大線状プラスミドが、*S. violaceoruber* に転移することが確認されている。

(6) 土壌より分離された *Streptomyces* 属につきまして、系統樹を比較したところ、芳香族ポリケチド生合成に関わる遺伝子が分類学上近縁でない *Streptomyces* 属に存在することが示されている。

(7) ストレプトマイシン生合成に関わる遺伝子を持つと考えられる 2 種類の *Streptomyces* 属に属する菌株を分離したところ、1 つの菌株は全遺伝子を持っており、もう一方の菌株は遺伝子の一部を持っていたが、これら 2 つの菌株は分類学上近縁でないことが示されている。

83 行目。以上、(1)～(7)の科学的知見から、*S. violaceoruber* 及び *S. cinnamoneus* の間では、自然に遺伝子交換が行われていると考えられる。したがって、pGlu 株と同等の

遺伝子構成を持つ生細胞は自然界に存在すると考えられる。

87行目。以上、1及び2の結果から、pGlu株を利用して生産されたグルカナーゼにつきましては、添加物の安全性評価基準における組換え体との同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合に該当することから、本基準の対象ではないと判断したと書かせていただいております。

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、ただいまの評価書(案)につきまして、御意見をいただきたいと思っております。なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思っております。

前回のキチナーゼの場合とほぼ同じ表現になっているようでありますけれども、いかがでしょうか。

○五十君専門委員 前回の内容をペーストされた部分がほとんどだと思いますけれども、例えばこの *Streptomyces* がほかの会社から申請されてきたときに、これをペーストするというのも賢明ではないような気がします。前回このキチナーゼの検討で既に *Streptomyces* の遺伝子交換については結論が出ているので、その辺りを受けて、大幅に簡潔にしてもよろしいのではないかと思います。

○澤田座長 それはどういう形がよろしいでしょうか。

○五十君専門委員 *Streptomyces* 属内では遺伝子交換が行われているという事実をキチナーゼの評価で既に確認しているということを受けて、同じ内容を繰り返す必要はないと思っております。

○澤田座長 ただいまの簡略化してもいいという御意見に対して、まだ残しておくべきであるという御意見はありますでしょうか。ないようですので、事務局の方で簡略した形をつくっていただいて、それを委員の皆様にご覧いただいて、それで直すということはいかがでしょうか。前回のキチナーゼのものを引用してということでもよろしいですか。

○北村課長補佐 「Ⅱ. 食品健康影響評価」の2番のところを前回のキチナーゼで評価しているというような書きぶりにするというのもよろしいでしょうか。

○澤田座長 私はそれでよろしいと思っておりますが、いかがでしょうか。

○五十君専門委員 *Streptomyces* 属の菌においては遺伝子交換が自然界でも行われているというところを受けて、根拠にいただければよろしいと思っております。

○澤田座長 ついでながら、承認前例としてキチナーゼもあると。

○五十君専門委員 それで既に確認されていると。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。

それでは、いただきました修正に関しまして、事務局で修正案をつくっていただきまして、これは皆さんに御覧いただいて、委員の方から承認をいただいて、その後に食品安全委員会に報告ということにしたいと思っております。その後はパブリックコメントになるかと思っております。ありがとうございます。

それでは、次に移ります。チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統であります。これは昨年 11 月の専門調査会において審議をいただきまして、指摘事項を出したわけでありまして。それに対する回答が出来ておりますので、回答書につきまして、事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、回答書につきまして、御説明いたします。お手元にお配りしております紫色のファイルを御覧ください。

1 ページ。指摘事項 1 といたしまして、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子の由来について、*E. coli* K-12 株という旨が記載されていますが、この遺伝子の由来について再調査をしてくださいという指摘です。

回答といたしましては、COT102 に導入されました *aph4* 遺伝子はプラスミド pKC203 由来であることを確認いたしまして、概説書の該当部分が修正されています。*E. coli* K-12 株と記載しておりましたのは、*E. coli* K-12 株中に *aph4* 遺伝子を保持した状態で遺伝子が譲渡されたためという理由にしています。

4 ページの指摘事項 2。APH4 タンパク質の毒性試験に関する知見について確認の上、回答してくださいという指摘です。回答ですけれども、マウスの急性経口毒性試験の結果について、資料が追加されています。この急性経口毒性試験の方法ですけれども、APH4 タンパク質標品をマウスに 1,828 mg/kg (APH4 タンパク質の正味投与量: 779 mg/kg) を投与し、14 日間観察したということです。

5 ページ。マウスは CD-1 系統を用いまして、コントロール区、APH4 処理区ともに雌雄 5 匹ずつを使用しています。1 回当たり 914 mg/kg の APH4 タンパク質標品を 2 回投与したということです。

臨床観察、体重測定、食餌消費量の比較、剖検及び組織病理学的検査の結果、その投与に起因した毒性影響は観察されなかったということです。

表 1～3 に剖検及び組織病理学的検査を行った臓器等について記載がございます。

7 ページの指摘事項 3。抗生物質耐性マーカー遺伝子につきまして、他の細菌に移行しないとは必ずしも言えないということから、再調査の上、仮に低い頻度で移行したとしても健康影響を与える可能性が低いということを回答してくださいという指摘です。

回答といたしましては、EFSA におきましては遺伝子組換え作物から微生物への抗生物質耐性マーカー遺伝子の水平移行の可能性は極めて低いものの起こり得ると結論されているということです。*aph4* 遺伝子に関しましては、既に土壌細菌や腸内細菌に幅広く存在しており、このタンパク質が不活化する抗生物質は医薬品としての利用がない、あるいは非常に限られていることから、その使用について規制あるいは制限する理由はないということです。

また、オーストラリア政府保健・高齢化省の遺伝子技術規制局におきましては、*aph4* 遺伝子の水平移行の可能性に関しまして、*aph4* 遺伝子やハイグロマイシン抵抗性を付与する他の遺伝子を有する細菌は、既にヒトの消化管を含め、自然環境に広く存在しているとい

うことから、仮に水平移行が生じたとしても何らかのリスクが生じる可能性は低いと結論されているということです。

これらにつきましては、既に前回提出されました概説書にも記載されている事項です。

APH4 タンパク質につきましては、基質特異性が高く、ハイグロマイシン B、ハイグロマイシン B2、デストマイシン A、デストマイシン B のみを不活化するということとして、この中でヒトの医薬品として我が国で利用されているものはないということです。

更に、APH4 タンパク質が消化に対して安定でないということ、急性経口毒性試験におきましても、このタンパク質投与に起因した毒性影響は見られなかったということからも、仮に低い頻度で移行したとしても健康に影響を与える可能性は低いと考えるということです。

これにつきまして、9 ページに記載のとおり、概説書を修正しています。また、旧概説書に記載していましたが植物ゲノムに組み込まれた抗生物質耐性マーカー遺伝子が食品として摂取され、その腸内細菌に移行して抗生物質耐性を獲得するまでの障壁に関する記述と FAO/WHO (2000) を引用した記述につきましては削除をしたということです。

11 ページの指摘事項 4。「組換え体に関する事項」の「遺伝子に関する事項」のうち、「近傍配列の決定」に関することです。3'末端の近傍配列にワタゲノム由来と考える新たな 690bp の配列が確認されているということから、仮にタンパク質が発現しても食品の安全性の観点から、問題がないかどうかについて追記をしてくださいという指摘になっています。

回答です。この 690bp を含みます 3'末端の近傍配列と隣接する T-DNA 領域の配列につきまして、データベースを用いまして既知のタンパク質と同一性を持つ配列が存在するかどうかを確認しています。その結果、同一性を持つ 740 個のタンパク質が見出されましたけれども、それらは既知のアレルゲンや毒性タンパク質ではなかったということです。

この結果から、仮に本領域からタンパク質が発現しても食品の安全性の観点から問題が起こる可能性は非常に低いと考えたということです。

12 ページの指摘事項 5。遺伝子産物のアレルギー誘発性について、物理化学的処理に関する感受性試験に用いました APH4 タンパク質に関することです。*E. coli* 過剰発現系由来の APH4 タンパク質につきまして、植物体内で産出されたものとの同等性の評価を行うことはできなかつたとありますけれども、同等性を確認できた事項、確認できなかった事項を回答してくださいということです。

また、APH4 タンパク質のアミノ酸配列に糖鎖付加部位があるかどうかについて確認してくださいという指摘になっています。

回答でございますけれども、*E. coli* 過剰発現系由来の APH4 タンパク質と COT102 ワタの花粉から抽出しました APH4 タンパク質の同等性を評価した結果について、新たに補遺 18 として提出されました。

COT102 ワタにつきましては、花粉以外の組織におけます発現量は定量限界以下というこ

とでして、花粉以外の組織から抽出しました APH4 タンパク質につきましては、評価できなかったということですが、花粉からタンパク質を抽出しまして、ウエスタンブロット分析を行いまして、同等性を確認しています。

その結果、両 APH4 タンパク質の見かけの分子量が予想される分子量と一致しまして、また同じ抗体によって検出が可能であるということが確認できました。図 1 にその結果が示されています。なお、図 1 の表題の下に小さい文字で説明がありますが、予想されるタンパク質の見かけの分子量となっていますが、予想されるタンパク質の分子量の間違いです。申し訳ありません。

また、糖鎖付加部位につきましては、13 ページの一番下の段落に記載があります。塩基配列から推定されました APH4 タンパク質のアミノ酸配列に基づきまして、糖鎖付加部位があるかどうかについて、2つのプログラムを用いまして、タンパク質のアミノ酸配列から真核生物における糖鎖付加部位を予測しています。

14 ページ。解析の結果、糖鎖付加部位となり得る配列は認められなかったということです。

15 ページの指摘事項 6。mVip タンパク質の人工胃液中での消化試験及び APH4 タンパク質の人工胃液中での消化性試験につきまして、3 kDa のバンドが出ていたということですが、その由来について確認の上、回答してくださいということです。

まず最初に mVip3A タンパク質についてですけれども、この 3 kDa のバンドの由来としまして、ペプシン、mVip3A タンパク質、*E. coli* 過剰発現系を用いた実験系由来のタンパク質の 3つの可能性が考えられたということです。

まず最初にペプシン由来であるかどうかを確認するための試験を以下の方法で行っています。試験方法は下から 2 番目の段落に書かれています。その結果、いずれの反応時間においても約 3 kDa のバンドは検出されなかったということから、ペプシン由来でないということが示されています。

16 ページ。更に由来を調査するために、その 3 kDa のバンドに含まれるペプチド断片の N 末端側のアミノ酸配列を解析する試験を行っています。試験の概略につきましては 17 ページの図 3 に示されています。

結果につきましては、18 ページの表 4 のとおりになります。配列 4 につきましては 10 アミノ酸のうち、7 アミノ酸については決定することができなかったということから、配列 1、配列 2、配列 3 につきましてのみ、mVip3A タンパク質のアミノ酸配列との比較及びタンパク質との相同性解析を行っています。その結果、mVip3A タンパク質と一致する配列は認められなかったということです。

18 ページ。配列 1、配列 2、配列 3 につきましては、データベースに登録されています細菌以外のものを含むタンパク質との相同性が認められたということです。

以上によりまして、ペプシンもしくは mVip タンパク質由来である可能性は低く、*E. coli* 過剰発現系を用いた実験系由来のタンパク質であることが示唆されたということです。

しかしながら、この 3 kDa のバンドに含まれる複数のペプチド断片を同時に解析しているため、一部のアミノ酸につきまして、正しく解析されなかった可能性もあるということから、アレルゲンとなり得るかどうかについて、更に検討しています。

これらにつきましては、既に概説書に記載がございますけれども、*mvip3A* 遺伝子の供与体につきましては、アレルギー誘発性があるとは考えられていません。発現量につきましては、極めて低いということです。

19 ページ。人工胃液中あるいは人工腸液中での消化性について。既存アレルゲンタンパク質とのアミノ酸配列相同性について。糖鎖付加部位について検討した結果、3 kDa に mVip3A タンパク質の部分断片が含まれていたとしても、COT102 ワタにおいてアレルギー性を付与する可能性は非常に低いと考えるということです。

19 ページの真ん中。APH4 タンパク質につきましても約 3 kDa のバンドについて、同様に検討を行っています。ペプシン由来につきましては、先ほどと同様です。

20 ページ。N 末端のアミノ酸配列を解析する試験につきましては、結果は 21 ページの表 5 に示されています。これは 3 つの配列のうち、配列 3 につきましては 15 アミノ酸のうち、5 アミノ酸は決定することができなかったということから、配列 1、配列 2 についてのみデータベースを用いまして、タンパク質との相同性解析を行っています。

その結果、APH4 タンパク質の配列とは完全には一致していませんけれども、配列 1 につきましては、8 アミノ酸が APH4 タンパク質と一致し、配列 2 につきましては 6 アミノ酸が APH4 タンパク質とアミノ酸配列が一致したということです。その結果から約 3 kDa のバンドに APH4 タンパク質由来のペプチド断片が含まれる可能性があったということから、データベースを用いまして相同性検索を行っています。

その結果、3 kDa のバンドに含まれますペプチド断片の由来を特定することはできなかったということですが、細菌由来のものを含むタンパク質との相同性が認められたということになっています。

21 ページ。これらの結果から、約 3 kDa のバンドがペプシンである可能性は低く、APH4 タンパク質のアミノ酸配列とは完全には一致しないものの、APH4 タンパク質の断片が含まれる可能性を否定することはできなかったということです。

21 ページの最終行からです。アレルギー性を有するかどうかにつきまして、先ほど同様に検討を行っています。

22 ページの真ん中辺です。以上のことから、3 kDa のペプチド断片に AHP4 タンパク質の部分断片が含まれていたとしても、COT102 ワタにおきましてアレルギー性を付与する可能性は非常に低いと考えるということです。

24 ページの指摘事項 7。こちらは遺伝子産物の IgE 結合能の検討についての項目です。APH4 タンパク質の加熱処理感受性試験結果を踏まえ、適切に概説書を記載してくださいという指摘になっています。

回答です。加熱処理感受性試験の結果、加熱処理に対して比較的安定であるということ

が示されましたが、消化に対して安定ではなく、アレルゲンデータベース検索の結果、80個の連続アミノ酸配列で有意な相同性を示す既知のアレルゲンや8個以上の連続するアミノ酸配列と一致する既知アレルゲンは認められなかったことから、ヒトの健康を損なう恐れはないと判断したという記載になっています。

25 ページの指摘事項 8。「7 宿主との差異に関する事項」につきまして、ビタミン E について検討の上、回答して下さいという御指摘です。回答につきましてはビタミン E、 α -トコフェロールですが、その測定をした結果を追加しています。COT102 ワタと比較対象の非組換えワタ品種、Coker312 を米国の 6 か所のほ場で栽培いたしまして、それぞれの種子についてビタミン E の分析を行いまして、比較対象と統計学的有意差について比較していますが、統計学的有意差については認められなかったということです。

26 ページの表 6 が結果になっています。こちらの 2001 年は 2007 年の誤りでございます。申し訳ございません。今回 α -トコフェロールのみを分析していますが、栄養学的に重要なものということで、 α -トコフェロールについて分析したという旨が 26 ページに記載してあります。

31 ページ。こちらからは修正事項になります。*B. thuringiensis* について、*B. t.* と記載しているところを *B. thuringiensis* と修正することにつきましては、関係するところの記載を修正しています。

指摘事項 2 につきましては、APH4 タンパク質の由来について、*E. coli* 由来かそれとも植物由来かわからなかったところがありましたので、そちらの記載を修正しています。

修正 3 につきましては、分析条件につきまして、反応後 0 分というところを反応開始直後及び SGF が抜けているところを修正しています。こちらは一番後ろに概説書の修正版が付いてございまして、39 ページの図 13 になります。

修正 4 につきましては、脂質を総脂質と修正しています。

そのほか、32 ページからは概説書を見直したところ、誤りがあったということで修正しています。補遺 16 におきまして、引用文献の文献値につきまして四捨五入をしていた部分を文献どおりに記述したということです。

説明は以上です。よろしくお願いいたします。

○澤田座長 ありがとうございます。それでは、指摘事項に対する回答に関しまして、項目ごとに先生方からの御意見を賜りたいと思います。

まず指摘事項 1、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子の由来に関して、再調査して修正するというので、これは飯先生から。

○飯専門委員 これでもいいのではないかと考えています。

○澤田座長 ほかの先生方もよろしいでしょうか。どうぞ。

○中島専門委員 プラスミドの pKC203 と出てきたのはいいのですが、このプラスミドはもと大腸菌 K-12 の W677 という株由来で、結局のところ大腸菌 K-12 株が持っていたということを最初に出てきたときに書いていただいた方がいいようにも思います。

○飯専門委員 このプラスミドの本当の由来は大腸菌とは言い切れず、論文をたどっていくとはっきりしなくて、動物の糞とかから取ってきたものを大腸菌に移して、初めてプラスミドとして同定している。どこの段階を由来とするかということになると、たどればたどるほど怪しい菌が出てきてしまうんです。はっきりとこのものだと示せる段階が、大腸菌の中に複数のプラスミドがどうも入っているみたいですが、その1つのプラスミドとして大腸菌で解析した。その意味での、ある程度クリアなところがこのプラスミドであるとしていいとするのかなという感じです。

もう一つ、ハイグロマイシンネットというハイグロマイシン専用のホームページがあるのですけれども、そこや他のデータベースを見ても、別の菌や別のプラスミドも出てきていて、別のを出すのがいいのかわからなかったのですが、彼らがこのプラスミド由来のものを自分たちが使っていると言い切るのであれば、これでいいのではないかと判断しました。いずれにしても大腸菌由来と言いきってしまうのは、どうかと。あくまでブロードホストレンジのプラスミドに由来しているというところで止めておいた方がいいと思います。

○中島専門委員 納得です。参考文献に付いていたところにはこう書いてあったもので。

○澤田座長 私ももう一つ前の文献を見ましたが、そこを読むと由来があまり書けないように感じましたので、非常によく素性がわかっているプラスミドの段階にしておいた方がよろしいかと思えます。

ほかにございますか。指摘事項2でAPH4の毒性試験に関することではありますが、これは澁谷先生からのコメントでありましたが今日は御欠席ということですが。

○松尾係長 内容については和久井先生に確認していただいています。

○和久井専門委員 5ページの上から3行目「剖検及び組織病理学的検査を行いました、その投与に起因した毒性影響は観察されませんでした」と記載されております。その根拠となっていますのが資料の17です。

補遺17の17ページの組織学的な所見のところにも文章的には異常はなかったという記載ですが、そのまとめがテーブル6ということで、テーブル6は32ページになります。テーブル6のサマリーですけれども、ここに問題がございまして、雄の方の0 mg群はいいのですけれども、これはコントロール群になりますが、その次の1828群を見ますと、下の方に行きますと肝臓のところですが、5匹を検討しましたと。そのうち正常であったのが1匹、4匹に異常が認められた。

更にずっと見ていきますと、段落の下から2行目、肝炎が2匹あったと。これは横に並べていきますと、ほかの群と比較して、この雄の投与群の試験結果に影響がないと断定したのか、私は理解できません。少なくともこれは5匹中4匹は変化がある。それも被験物質を投与していますので、少なくともこの試験結果から影響がなかったとは言えないと私は判断いたします。

○澤田座長 Mononuclear cell infiltrationが2例で、minimalと書いてありますけれど

も、これは軽度と考えたのでしょうか。あとは Hepatitis が 2 例で、これも minimal。この minimal の意味がよくわからない。これがそれほど重症ではなくて、リスクとしてあまり大きくないと考えて、彼らが毒性影響としてとらえなかったのか。そこら辺も説明していただかないといけないのかなと。

○和久井専門委員 特にこれが対照群でなくて、今回の被験物質の投与した群の方だけに特に出ていますので。

○澤田座長 あとは雄と雌で違いが出ている理由もよくわからないですね。

○和久井専門委員 そうですね。

○澤田座長 理論的に考えますと、食べてもほとんど何も影響が出ない筈なのですけれども。タンパク質を食べさせただけなので、それでこのラットは抗生物質を食べているわけではないですから、おそらく影響は出ないものと思われま。

○和久井専門委員 ですから、何でもこういう試験結果データが上がってきたのかなというところでは。

○澤田座長 これはマウスですね。APH4 に関しましては、海外で安全だというお墨つきが出ていまして、この会社以外にもデータが多分あるとは思いますが、そこら辺りをもうちょっと調査していただいた方がいいのかなと思います。自社だけでやると、もう一回やり直せという話になってしまうかなと。

○和久井専門委員 少なくともこの動物試験データの解釈を認めるのは問題かと思えます。

○澤田座長 この APH4 に関してはヨーロッパで食経験が既にあるのでしょうか。かなり前にヨーロッパの方で EFSA が安全性の評価をしまして、それは食品として出てきたから評価した可能性が高いと思えますので、そこら辺も併せて調査をしていただいた方がいいのかなと思います。この点に関しまして、ほかに先生方から御意見がありましたらどうぞ。

それでは、次も APH4 の遺伝子で、指摘事項 3 で今度は DNA の移行に関してです。これは五十君先生の御指摘ですか。

○五十君専門委員 どうしても低いレベルの移行を阻止することは困難であるから、どういうふうに考えて安全かというのを説明していただいたのですが、かなりしっかりと議論をされていると思えます。この点についてはこの回答で申し分ないと思えます。

○澤田座長 ほかの先生方、何かコメントはございますでしょうか。

それでは、指摘事項 4。これはワタゲノム由来のよくわからない 690bp の断片の話ですが、これは小関先生の御指摘ですか。

○小関専門委員 一応これでやってあるので、私はいいかと思えます。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。

それでは、指摘事項 5。これもまた APH4 の同等性の確認に用いました大腸菌のタンパクですか。この同等性に関する事で、これは飯先生と澁谷先生から御指摘いただきまして、澁谷先生は御欠席ですので、飯先生、お願いしたいと思えます。

○飯専門委員 やれるのではないかということでコメントをした実験をしっかりとやっても

らえていますし、結果も妥当なものとなっていますので、これでよいかと思えます。

○澤田座長 よろしいでしょうか。

そうしましたら、指摘事項6。これは消化の実験に関しまして、両方のタンパクで3 kDaのバンドが出てきて、その由来をきちんとしてくださいということで、これは小関先生、手島先生、中島先生から御指摘いただきましたけれども、手島先生、お願いします。

○手島専門委員 これに関しましては、3 kDaのバンドにつきまして、N末端からのアミノ酸配列の解析という試験を行っていますので、よろしいかと思えます。特に気になったのは、mVip3Aの方は人工腸液での分解性が悪いということで、人工胃液でも分解性が悪いとなると消化性が悪いという形になってしまいますけれども、今回の結果からみますと、人工胃液で出てくる3 kDaのバンドに関しまして、これはmVip3Aタンパク質由来である可能性は低いという回答が出てきていますので、全体の回答としてはこれでよろしいかと思えます。

○澤田座長 ほかによろしいですか。1つだけ、APH4の配列1、2、3とありますけれども、これはよく見ると配列1、2、3をつなぎ合わせるとほぼ同じペプチドの配列が出てきますので、可能性がないという表現がありますが、可能性は高いと直した方がいいのかなど。

今、申し上げたのは配列1、2、3をただ横に見るのではなくて、その下の可能性を考えていくとAPH4のペプチドに限りなく似てくるということでもあります。ほかによろしいでしょうか。

次は指摘事項7。これは加熱処理感受性試験の結果を適切に修正することということで、手島先生。

○手島専門委員 こちらもAPH4タンパク質に関しましては、100℃の加熱でもELISAでの反応性が残っているということで、必ずしも安定性がないということではないということで、今回の表現では加熱処理に対して比較的安定であることが示されたものという形での訂正がされていますので、これでよろしいかと思えます。

○澤田座長 ほかの先生方、よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項8。ビタミンEの含有量の宿主との作用をきちんと調べてくださいということで、これは石見先生。

○石見専門委員 ビタミンEにつきましては記載がなかったものですから、可能であれば同族体について御報告いただきたいということだったんですけれども、生体で最も利用率が高い α トコフェロールについて、2007年に収穫された種子を用いて分析していただいておりますので、これでよいと思えます。

表15は2001年を2007年に直していただいて、実際の解説書の方も表15が2001年になっていますので、そこを2007年に直していただければいいと思えます。

○澤田座長 それでは、微修正をお願いしたいと思います。ほかに全般を通しまして、御意見はありますでしょうか。本件につきましては毒性のデータだけ問題がありまして、も

う一回やる必要があるかどうかということですのでけれども、何らかの説明をいただいて、それが委員の方々に御了解いただければよしとするという方向で私はいいいのかなと思うのですが、和久井先生、よろしいでしょうか。

○和久井専門委員 はい。

○澤田座長 そうしましたら、説明と安全性に関する見解をきちんと出していただくということで、それを和久井先生を中心に委員の先生方に見ていただいて、御了解をいただければ食品安全委員会に御報告するというところにさせていただきたいと思います。

それでは、評価書（案）の説明をお願いしたいと思います。

○北村課長補佐 それでは、資料の12ページを御覧ください。こちらがチョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統（食品）の評価書の本文になります。

「Ⅰ．評価対象品目の概要」。名称、性質、申請者、開発者につきましては記載のとおりです。チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統につきましては、改変 *vip3A* 遺伝子を導入して作出されておりまして、チョウ目害虫による影響を受けずに生育することができるということです。また、選択マーカーとしまして、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子（*aph4* 遺伝子）が導入されています。

「Ⅱ．食品健康影響評価」。

「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」。

宿主につきましては（1）のとおりです。

（2）DNA 供与体の種名及び由来ですけれども、*mvip3A* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* AB88 株でございます。また、*aph4* 遺伝子の供与体はプラスミド pKC203 です。

（3）*mvip3A* 遺伝子はチョウ目害虫抵抗性を付与する mVip3A タンパク質を発現しています。*aph4* 遺伝子は形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられまして、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素（APH4 タンパク質）を発現しています。導入用プラスミド pCOT1 を用いまして、アグロバクテリウム法によりまして、宿主に導入しています。

「2．宿主の食経験に関する事項」につきましては、記載のとおりです。

「3．宿主由来の食品の構成成分等に関する事項」です。

（1）主要栄養素等、（2）毒性物質・栄養阻害物質につきましては、記載のとおりです。

「4．宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項」です。収穫時期、貯蔵方法、摂取部位、摂取量、調理及び加工方法につきましては、従来のワタと変わらないということです。

5．宿主以外のものは比較対象にしません。

6．相違点についてですけれども、mVip3A タンパク質及び APH4 タンパク質を発現することが宿主との相違点です。

「第 2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項」。チョウ目害虫の影響を受けずに生育することができるというものです。

14 ページ「第 3. 宿主に関する事項」につきましては、記載のとおりとなっています。従来どおりです。

136 行目「第 4. ベクターに関する事項」。導入用プラスミド pCOT1 の作製には、プラスミド pHiNK078 を用いています。

15 ページ。プラスミド pHiNK078 の塩基数、塩基配列、制限酵素切断地図は明らかになっています。

(3) 既知の有害塩基配列は含まれていません。

(4) 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に対して耐性を付与する *spec* (*aadA*) 遺伝子が含まれています。

(5) 伝達を可能とする塩基配列は含まれていません。

159 行目「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」。

mvip3A 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* AB88 株です。また、*aph4* 遺伝子の供与体はプラスミド pKC203 です。

安全性につきましては、*B. thuringiensis* は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ません。

「2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項」。

(1) *mvip3A* 遺伝子は *B. thuringiensis* 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きまして、発現するタンパク質のアミノ酸配列は改変せずに、発現が最適となるように GC 含量を高め、人工合成した遺伝子です。*aph4* 遺伝子はプラスミド pKC203 からクローニングされています。

16 ページ。*mvip3A* 遺伝子及び *aph4* 遺伝子の塩基数、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います。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」。

まず *mvip3A* 遺伝子でございます。mVip3A タンパク質は殺虫性タンパク質でして、*B. thuringiensis* の芽胞形成期及び栄養成長期に産生され、細胞外に分泌される可溶性タンパク質です。この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ますと、コアタンパク質を生じ、このタンパク質が腸管に作用して殺虫活性を示すことが報告されています。

NCBI データベースを用いまして、blastp 検索を行いました結果、相同性を示す既知の毒性タンパクは見出されなかったということです。

198 行目にまいりまして、*aph4* 遺伝子です。これは形質転換体の選択マーカーとして用いられています。APH4 タンパク質はアミノシクリトール系抗生物質でありますハイグロマイシン B の 4-ヒドロキシル基のリン酸化を触媒することによりまして、ハイグロマイシン

Bを不活化させます。

206行目。NCBIデータベースを用いまして、blastp検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見出されませんでした。

*E. coli*で発現させましたAPH4タンパク質を用いまして、CD-1系マウスにおける急性毒性試験を行った結果、投与に関連した異常は認められなかったということで、今のところは記載しています。

212行目。(4)抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項です。*aph4*遺伝子につきましては、APH4タンパク質はハイグロマイシンB並びに構造が類似しているハイグロマイシンB2、デストマイシンA及びデストマイシンBを不活化しますが、ネオマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、スペクチノマイシン、トブラマイシン及びアミカシンを含めた他のアミノシクリトール系抗生物質またはアミノグリコシド系抗生物質を不活化しないことが示されています。

なお、APH4タンパク質が不活化する上記4つの抗生物質のうち、現在、我が国におきまして、ヒトの医薬品として利用されているものはありません。

223行目。EFSAとオーストラリアでの評価について記載しています。

230行目。ワタCOT102の種子におけるAPH4タンパク質の発現量は定量限界値以下です。APH4タンパク質は胃液や腸液による消化や加熱処理に対して安定的でないということが確認されています。

以上のことから、*aph4*遺伝子がワタCOT102からその腸内細菌へ水平移行すること及びAPH4タンパク質がヒトで利用されている抗生物質を不活化することによりまして、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性は低いと考えたということです。

231行目に加熱処理に対して安定的でないに記載していますが、先ほどの指摘の回答では、加熱に対して比較的安定的であるという記載になっていますので、ここは修正したいと思います。

236行目。*aadA*遺伝子です。導入用プラスミドpCOT1の外骨格領域には、*aadA*遺伝子が含まれていますが、ワタCOT102には挿入されていないことがサザンブロット分析によって確認されています。

「3. 導入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」。

(1)プロモーターです。*mvip3A*遺伝子発現カセットのプロモーターは、シロイヌナズナのアクチン2遺伝子由来のイントロンを含むプロモーター領域です。*aph4*遺伝子発現カセットのプロモーターは同じくシロイヌナズナのユビキチン3遺伝子由来の第1イントロンを含むプロモーター領域です。

(2)ターミネーターです。両カセットのターミネーターは*Rhizobium radiobacter*のノパリンシンターゼ遺伝子由来のポリアデニル化シグナルを含む配列です。

(3)その他につきましては、プロモーター及びターミネーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は用いていません。

「4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項」。

18 ページ。プラスミド pHiNK078 の T-DNA 領域に、*mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 遺伝子発現カセットを挿入しまして、導入用プラスミド pCOT1 を作製しています。

「5. 構築された発現ベクターに関する事項」です。

(1) 導入用プラスミド pCOT1 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となっています。

(2) 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ません。

(3) 導入プラスミド pCOT1 の右側領域から左側領域までの T-DNA 領域が挿入領域です。

表 1 に挿入 DNA の機能及び由来について、それぞれの発現カセットについて記載しています。

19 ページ「6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項」。アグロバクテリウム法によりまして、宿主に導入した後、ハイグロマイシンを添加した培地で選抜して再生個体を得ています。得られた個体につきまして、PCR 分析を行いまして、既存の優良品種との戻し交配または自殖を行って、ワタ COT102 を得ています。

「第 6. 組換え体に関する事項」。

「(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項」です。サザンブロット分析の結果、*mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 遺伝子発現カセットがそれぞれ 1 コピー挿入されていることが確認されています。

外骨格領域については、サザンブロット分析の結果、挿入されていないことが確認されています。また、挿入 DNA の塩基配列を決定しまして、導入用プラスミドの T-DNA 領域と比較しました結果、右側境界配列の 19bp 及び左側境界配列の 24bp の欠損を除きまして、塩基配列は一致することが確認されています。

挿入 DNA の近傍配列につきましては、5´末端領域の 82bp の検出及び 3´末端近傍配列に 690bp の新たな DNA 断片の挿入を除きまして、宿主ゲノムの塩基配列と一致するということが確認されています。

この 690bp の新たな DNA 断片の由来につきまして、ワタ属のゲノム配列データベースを用いまして相同性検索を行いました結果、ゲノム配列と高い相同性が認められました。また、挿入用プラスミド pCOT1 の T-DNA 領域及び外骨格領域との相同性は認められませんでした。

この DNA 断片にコードされていますタンパク質につきましては、データベースを用いまして blastx 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見出されませんでした。したがいまして、この DNA 断片からタンパク質が発現したとしても、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性は低いと考えるということです。

内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5´末端近傍配列及び隣接する T-DNA 領域並びに新たに確認された DNA 断片を含みます 3´末端近傍配列及び隣接する

T-DNA 領域につきまして、データベースを用いまして blastx 検索を行った結果、相同性を示す既知の宿主由来のタンパク質は見出されていません。したがって、DNA の挿入によりまして、宿主の既知の内在性遺伝子が損なわれていないと考えるということです。

図の下に行きまして、(2) オープンリーディングフレームについてです。5' 末端近傍配列、3' 末端近傍配列及び隣接する T-DNA 領域の接合部におきまして、ORF 検索を行っています。その結果、連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 5 個見出されました。

これらにつきまして、データベースを用いまして、blastp 検索を行いました結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見出されませんでした。また、抗原決定基の有無を確認するために相同性検索を行いました結果、連続する 8 アミノ酸と一致するものは見出されませんでした。

21 ページ「2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項」。

mVip3A タンパク質及び APH4 タンパク質の発現量を、ELISA 法を用いまして分析を行っています。結果を表 2 に示しています。

「3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項」。

精製しました綿実油中のタンパク質含量は検出限界以下ということが示されています。また、APH4 タンパク質につきましては、種子においては定量限界以下です。したがって、ワタ COT102 由来の綿実油に含まれますタンパク質につきましては、ほとんどヒトに摂取されることはなく、その摂取量は無視できるレベルであると考えています。

4. タンパク質のアレルゲン誘発性に関する事項です。

(1) *mvip3A* 遺伝子の供与体であります *B. thuringiensis* AB88 株は細菌でありまして、細菌にアレルギー誘発性があるとは考えていません。

22 ページ。これらのタンパク質に関しましては、アレルギー誘発性の報告はありません。

「(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に関する感受性に関する事項」です。

①人工胃液です。まず mVip3A タンパク質につきましては、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析の結果、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認されています。

APH4 タンパク質につきましては、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析を行いまして、SDS-PAGE 分析におきましては、試験開始後、1 分以内に約 3 kDa のポリペプチド断片に分解されまして、その後、徐々に消化されることが確認されています。ウエスタンブロット分析におきましては、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認されています。

「②人工腸液に対する感受性」です。

mVip3A タンパク質につきましては、同じく SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析を行いまして、試験開始後 5 分以内に複数のポリペプチドに分解され、それ以上の消化は進まないということが確認されています。

APH4 タンパク質につきましても SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析を行いまして、試験開始後 5 分以内に消化されることが確認されています。

③は加熱処理に対する感受性です。mVip3A タンパク質は 150℃、30 分間の加熱で、APH4 タンパク質は 170℃、30 分間の加熱で免疫反応性が失われるということが確認されています。

(4) mVip3A タンパク質及び APH4 タンパク質の既知アレルゲンの構造相同性の有無を確認するために、FARRP を用いて相同性検索を行いました結果、連続する 80 以上のアミノ酸で 35% 以上の相同性を示す既知のアレルゲンは見出されなかったということです。

また、抗原決定基の有無を確認するために、FARRP を用いて相同性検索を行いました結果、連続する 8 アミノ酸配列と一致するものは見出されなかったということです。

430 行目。上記 (1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断しまして、mVip3A タンパク質及び APH4 タンパク質につきましては、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことが確認されています。

「5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項」。遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のワタにつきまして PCR 分析を行いました。その結果、挿入遺伝子はメンデルの分離の法則に基づきまして、後代に遺伝しているということが示されています。

また、後代における安定性につきましては、4 世代のワタについてサザンブロット分析を行いました結果、各世代において共通のバンドが確認されています。

「6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項」。mVip3A タンパク質は、酵素活性を持たず、宿主の代謝系と独立して機能しております。APH4 タンパク質は基質特異性が高いということです。また、植物には APH4 タンパク質の基質となり得る物質が存在することは知られていません。したがって、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えるということです。

「7. 宿主との差異に関する事項」。米国のは場で栽培されました COT102 と非組換えワタの種子との比較を主要構成成分、ミネラル類、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成及び有害生理活性物質の分析を行いまして、検討を行っています。

その結果、24 ページに続いていますが、統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合でありまして一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内でした。

「8. 諸外国における認可、食用等に関する事項」、「9. 栽培方法に関する事項」は従来のワタと同じです。

「10. 種子の製法及び管理方法に関する事項」についても従来のワタと同じです。

第 7 につきましては、APH4 タンパク質の急性毒性試験につきまして、記載させていただいています。

25 ページ「Ⅲ. 食品健康影響評価」。チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統につきましては、「遺伝子組換え食品の安全性評価」に基づきまして評価した結果、ヒトの健康を損

なうおそれはないと判断したと記載させていただいております。

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、ただいま御説明いただきました評価書（案）について、御意見、コメントがございましたら、お願いしたいと思います。また、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思います。

それでは、項目ごとに見ていただきたいと思います。第1に関しまして、御意見はいかがでしょうか。

それでは、第2はいかがでしょうか。第3の宿主のところ。第4のベクター。第5の挿入 DNA 遺伝子産物並びに発現ベクターの構築に関する事項。

17 ページは先ほどおっしゃった比較的安定である云々は、胃液と腸液で表現を変えた方がよろしいですか。手島先生、いかがですか。

○手島専門委員 先ほど消化ということでもとめていたので、加熱処理に対して比較的安定であることが示されたものの、消化に対して安定でなくということでもとめてしまってもよろしいかと思えます。

○澤田座長 すべての項目で、比較的安定であるという表現でよろしいですか。

○手島専門委員 加熱に対しては比較的安定であることが示されたものの、胃腸液中による消化に対しては安定ではなくということでしょうか。

○澤田座長 文言は後で正確を期していただくということで、もう一回見直していただくことにしたいと思います。

○山崎専門委員 この部分は1つのパラグラフを全部削除してしまっても構わないのでしょうか。後で詳しい解説というか、評価の文章が出てきますから。

○澤田座長 そうですね。20 ページのアレルギーのところできちんと書いてあるので、これは削除して問題がなければ、削除いただくことにしたいと思います。

それでは、次の第6の組換え体に関する事項ですけれども、どうぞ。

○児玉専門委員 22 ページの396 行目に「試験開始後1分以内に約3 kDa のポリペプチド断片に分解され」と断定してしまっているのですけれども、回答書では、ということが考えられるというくらいの表現だったと思いますので、回答書と合わせた方がいいのではないかと思います。

○澤田座長 これは表現を直していただきたいと思います。量的には3 kDa は多いわけではないので、表現としてはおかしいです。ほかにございましたら、お願いしたいと思います。

それでは、最後の「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、急性毒性のお話がもう一度出てまいります。この書きぶりは第2から第6で問題がない場合は、昔は違った書きぶりを書いていたような気がします。安全性のデータとして、必ず要る場合にたしかこういう書きぶりになっていたのかと思いま

すけれども。

○松尾係長 今回、澁谷先生から毒性試験結果を提出しなさいという御指摘がありましたので、一概にその必要はないとは書けないということでしたので、この第7に付け加えたということになります。

○澤田座長 わかりました。前回、本体の安全性もきちんとやっておいた方がいいということで、今回はこういう書きぶりになったということです。

○村田委員 16ページの208～210行目にほとんど同じような文言があって、参照と補遺も同じになっているんですけれども、これはこれでよろしいですか。

○松尾係長 内容的には全く同じ内容でして、24ページの第7項目を読んでいただくと、第2から第6までの事項によって安全性の知見が得られていない場合については、いわゆる適切な毒性試験を行うことという形になっています。

○北村課長補佐 16ページのところは挿入遺伝子の機能に関する事項ということで、安全性も含めて記載をさせていただきます。第7につきましては、こちらは安全性試験の項目になるので、そこにも記載が必要になってきますので、第5の2の(3)に関わる安全性試験のためということを書いた上で、記載をしているものでございます。

○澤田座長 以前に同様な例がありまして、それでこういう書きぶりになっていましたでしょうか。

○北村課長補佐 以前のももそのような記載になってございます。追加の御説明ですが、お手元に緑色の参考資料がありまして、安全性評価基準というタグの1に「種子植物の安全性評価基準」というものがあります。12ページが第2から第6までの事項により安全性の知見が得られた場合に必要な事項ということで、毒性試験(1)～(7)までの試験に関する項目がありますので、こちらに基づいて記載しています。

○澤田座長 前例がこうなっているのですでしたら、よろしいかと思えます。ただ、理論的に第2から第6までと最後に書いてあるので、違和感を覚える人がいるかもしれないです。

それでは、ほかに全般を通じて御意見、ございますでしょうか。

○山崎専門委員 22ページの413～418行目の加熱処理に関する感受性ですが、概要版の表を見ますと、mVip3AとAPH4は感受性が違うので、2つを分けて書いた方がいいと思います。mVip3Aは65℃でもかなり免疫反応性が落ちているのに対して、APH4は100℃で処理をして、ほとんど免疫反応性が落ちていなくて熱に比較的安定ということなので、これは耐熱温度を分けて書く必要がある。APH4は比較的安定だということを文章の中に書く方がいいと思います。

○澤田座長 それは修正したものを後で、山崎先生と私で見るということにしたいと思えます。要は完全になくなる前のどこら辺で減り始めるかという情報も入れた方がいいという御意見かと思えます。ほかによろしいでしょうか。

それでは、先ほどの毒性の話も含めまして、修正をいただいたものをチェックしていただくということにしたいと思えます。その後で事務局の案をチェックした後で、食品安全

委員会の方に御報告して、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。ありがとうございました。

それでは、飼料の方に移りたいと思います。事務局から御説明をお願いいたします。

○北村課長補佐 それでは、飼料の御説明をいたします。透明の薄いファイルを御用意いただけますでしょうか。

1 ページ。遺伝子組換え飼料チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統の概要です。

「1」品目名」につきましては、チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統です。

「2」本飼料の特徴」といたしましては、(1) mVip3A タンパク質を発現していること。(2) APH4 タンパク質を発現していることとでございます。aph4 遺伝子は、選抜マーカーとして利用されています。

「3」本飼料の使用方法」です。mVip3A タンパク質を産生することによりまして、チョウ目害虫に対する抵抗性を有しますが、その飼料としての使用方法や利用目的につきましては、従来ワタと相違はありません。

2 ページ「2. 遺伝子組換え飼料としての安全性」です。ガイドラインに基づきまして、こちらに記載されております①、②、③の可能性につきまして検討をしています。

mVip3A タンパク質によりまして、チョウ目害虫に対する防除作用を有するということから、害虫抵抗性形質を付与されたものに分類されています。したがって、上記の①、②、③の可能性は考えにくいということです。

一方、APH4 タンパク質をコードします aph4 遺伝子につきましては、既に土壌細菌や腸内細菌が幅広く有しているということが明らかになってございます。このため、これを摂取しました家畜由来の畜産物につきまして、安全性の問題はないと考えるということです。

以上のことから、COT102 ワタを飼料として家畜に給餌しても、上記①～③の可能性はないと考察されまして、当該飼料に由来します畜産物を摂取することによるヒトの健康に及ぼす影響はないと考えられるということです。

「3. その他」といたしましては、諸外国におけます認可の状況等について記載しています。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございました。申請資料につきまして、御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただければと思います。

非常に薄い資料の2～3ページだけですけれども、何かコメントはありますでしょうか。飼料の方はあまり大きな問題はないかと思っておりますけれども、よろしいですか。

それでは、飼料の方は御了解いただいたということで、ありがとうございました。

○北村課長補佐 そうしましたら、評価書(案)につきまして、御説明をいたします。

資料の29ページからが飼料の評価書(案)になります。

32ページを御覧ください。「I. 評価対象飼料の概要」。名称、性質、申請者、開発者

につきましては、記載のとおりです。

チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統につきましては、改変 *vip3A* 遺伝子を導入して作出されていまして、チョウ目害虫による影響を受けずに生育することができるとされています。選択マーカーとしまして、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子が導入されています。

「Ⅱ．食品健康影響評価」。ワタ COT102 は、チョウ目害虫抵抗性の形質を付与したものです。害虫抵抗性の遺伝子組換え作物を飼料として用いました植物の飼養試験におきまして、導入された遺伝子もしくは当該遺伝子によって産生されるタンパク質が畜産物に移行するという事はこれまで報告されていません。

2 です。こちらの日づけと番号につきましては、食品についてパブリックコメントが終了しまして、食品安全委員会です承されましたら、日づけと番号を入れさせていただきますと思います。

ワタ COT102 は食品安全委員会において遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価に基づく食品としての安全性評価を終了しており、ヒトの健康を損なうおそれがないと判断されていると記載しています。

43 行目。上記 1 及び 2 を考慮しましたところ、ワタ COT102 に新たな有害物質が生成され、これが肉、乳、卵等の畜産物中に移行することは考えられず、また、畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や遺伝子組換えに起因する成分が家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成されることは考えられない。

48 行目。以上のことから「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」に基づき評価した結果、改めて食品健康影響評価の必要はなく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物の安全上の問題はないと判断したと記載しております。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。評価書（案）につきまして、御意見、コメントがありましたら、お願いします。

それでは、いただいた評価書（案）を食品安全委員会に御報告したいと思います。ありがとうございます。議題（1）に関しましては、これで終わらせたいと思います。

議題「（2）その他」でありますけれども、私の方から御報告があります。7月の専門調査会で審議いたしましたワタ3品種の掛け合わせ品種、バリンについてでありますけれども、申請資料の修正に関する指摘を出しておりました。

この品目の取扱いにつきましては、御担当の先生に御協力いただきまして、座長預かりとなっていたところであります。いずれの品目に関しましても、指摘に基づきまして修正された旨を確認いたしましたので、評価書を食品安全委員会に御報告いたしました。

なお、掛け合わせ品種については食品安全委員会での審議を経て、厚生労働大臣に通知いたしました。また、バリンについては現在パブリックコメントの募集中であると聞いております。

私からの報告は以上であります。ほかに事務局から何かございますでしょうか。

○松尾係長 特にございません。

○澤田座長 それでは、本日の議事については、これで終了とさせていただきます。

以上をもちまして、第 84 回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。どうもありがとうございました。