

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第93回会合議事録

1. 日時 平成23年7月27日(水) 14:00~16:44
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が求められた遺伝子組換え食品等の安全性評価について
 - ・BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ
 - ・コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシEvent5307系統 (食品・飼料)
 - ・ステアリドン酸産生ダイズMON87769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、
橘田専門委員、児玉専門委員、澁谷専門委員、飯専門委員、山崎専門委員、
和久井専門委員
(食品安全委員会委員)
小泉委員長、熊谷委員、長尾委員、廣瀬委員、村田委員

(事務局)
栗本事務局長、中島事務局次長、坂本評価課長、前田評価調整官、北村課長補佐、
三木係員、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
 - ①BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ
 - ②コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシEvent5307系統 (食品)
 - ③コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシEvent5307系統 (飼料)
 - ④ステアリドン酸産生ダイズMON87769系統 (食品)
 - ⑤ステアリドン酸産生ダイズMON87769系統 (飼料)
 - 資料2 専門委員からのコメント

BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ

参考資料 1 食品健康影響評価に係る指摘事項

BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ

参考資料 2 食品健康影響評価について

飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号）に基づく組換えDNA技術によって得られた生物を含む飼料について安全性の確保に支障がないものとして基準を定めることについて

参考資料 3 遺伝子組換え植物の掛け合わせ品種の取扱いについて

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、ただ今から第 93 回遺伝子組換え食品等専門調査会を開催いたします。

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

本日は所用により、海老澤委員、手島委員、中島委員は御欠席とのことです。

本日の議題であります、新規の審議品目でありますコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統、それからステアリドン酸産生ダイズ MON87769 系統、継続審議品目であります、BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼ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。事務局からお願いいたします。

○北村課長補佐 それでは、議事次第に基づきまして配布資料の確認させていただきます。配布資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿、資料 1 としまして、食品健康影響評価に関する資料、資料 2 といたしまして、専門委員からのコメントとなっております。参考資料 1 としまして、安全性評価に係る指摘事項、参考資料 2 といたしまして、食品健康影響評価について回答、参考資料 3 といたしまして、遺伝子組換え植物の掛け合わせ品種の取扱い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、次回また配布いたします。不足等がございましたら事務局までお知らせください。

○澤田座長 それでは、議題 1 の審議に入らせていただきたいと思います。

まず、継続の方のグルカノトランスフェラーゼの審議を行いたいと思えます。

本品目は、昨年 11 月の専門調査会におきまして審議を行い、指摘事項が出ていたものであります。指摘事項に対する回答につきまして、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、BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼの回答について御説明いたします。お手元に青いファイルを御用意お願いいたします。

表紙をめくっていただきまして、1 ページ目からが指摘事項の回答になります。指摘事項 1 といたしまして、申請資料に記載されている AqBE は、1 つの語が導入遺伝子発現タンパク質酵素製剤と異なるものを示すために使用されていることから、明確に区別できる記載に修正をすることという指摘になってございます。

回答といたしましては、酵素製剤を AqBE、導入遺伝子は改変 Aq722 遺伝子、発現タンパク質を *Aquifex aeolicus* 由来 6- α -グルカノトランスフェラーゼということと定義をいたしまして、申請資料を修正してございます。

指摘事項 2 番といたしましては、申請資料 6~7 ページの遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主との相違点の記載について、根拠を示して具体的に記載をすることという指摘になってございます。

従来の添加物と基本的に同じであるという根拠につきましては、①としまして α -1,4 グルコシド結合に作用し、 α -1,6 グルコシド結合を合成し、それ以外の作用が認められなかったこと。

②といたしまして、アミロペクチンを基質としたとき、高度分岐環状デキストリンを合成し、その構造が従来の添加物であります 6- α -グルカノトランスフェラーゼをアミロペクチンに作用させたときの生産物と比較して区別ができなかったということを示しております。これを示す結果につきましては参考文献 1 に記載されているということです。

下の下線の部分は申請書の修正箇所となります。

指摘事項の 3 番ですが、申請書 11 ページの遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性につきまして、種子植物の安全性評価基準に基づき検討を行い、検討結果を回答すること。その際に、検討に用いたサンプル等の詳細な試験条件を示すことという指摘になってございます。

まず、人工胃液による酸処理及び酵素処理について、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析の結果がこちらに示されてございます。

3 ページになりまして、被験物質の詳細ですが、この被験物質は申請資料にあります製造工程により得られた酵素剤ということでございます。

試験方法はこちらに記載してあるとおりです。下の部分は申請書の修正です。

さらに、ウェスタンブロットによる分析を実施し、反応 5 分以降はペプシンと考えるバンド以外にはこの 6- α -グルカノトランスフェラーゼポリクローナル抗体に反応するバンドは検出されなかったということでございます。

4 ページにまいりまして、図 2 がウェスタンブロットによる分析結果となつてございます。被験物質は先ほどと同様にこの製造工程により得られた酵素剤でございます。4 ページの下線の部分が申請書の修正となつてございます。

5 ページにまいりまして、②の人工腸液による処理でございます。追加の試験は行ってございませぬけれども、詳細な条件は記載されているとおりでございます。③加熱処理にまいりまして、この AqBE 製剤でございますけれども、●●●、90℃で加熱処理を行

っております。

6 ページに SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果が示されております。

加熱処理によりましてタンパク質の凝集が起こっており、ウェスタンブロットによる分析は困難と判断をしまして、ELISA による分析を新たに行っております。加熱処理を行った場合に、定量値は大幅に低下をしたということで、加熱処理によりまして AqBE の免疫反応性は速やかに失われると判断をしたということでございます。

6 ページに SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による分析の結果が示されております。表 1 が ELISA 分析の定量値になっております。試験の詳細な条件につきましては記載のとおりで、被験物質は先ほどと同様、本品でございます。一次抗体、二次抗体はこちらに記載されているとおりでございます。

6 ページ、7 ページにまいりまして、こちらが申請資料の修正となっております、図 6-2 が SDS の電気泳動の図でございます。この下の下線の部分は申請資料の修正となっております、●●●加熱処理により AqBE の免疫反応性は大幅に低下することが示されたということとなっております。

8 ページにまいりまして、表 2-2 になりまして、ELISA の分析結果の定量値が示されております。

指摘事項の 4 番でございますが、申請資料 19 ページの反復経口投与毒性試験について、被験物質の投与量の設定根拠について回答してくださいということと、被験物質の投与により影響が見られる最小値について回答すること、という指摘になってございます。

回答ですけれども、投与量としまして、現実的に投与し得る最大量であるということから、15 ml/kg 体重/日を設定したということです。この量において影響がないということから、LOEL も 15 ml/kg 体重/日以上と考えているということでございます。

この AqBE 酵素製剤を加工助剤として用いる場合の使用量は、デンプン 1 kg 当たり最大●●●ml で、これが全量残存したと仮定し、日本人の食事摂取基準の推定エネルギー必要量を用いて計算をしまして、●●● ml/kg 体重/日を摂取することになるということから、この投与量については推定の最大摂取量の●●●に相当するということから、十分に安全性を評価し得る量であったと考えるということでございます。

9 ページ以降が修正事項の回答となっております。10 ページまで 5 項目でございます。説明は以上でございます。よろしくお願いたします。

○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つきまして、項目ごとに先生方からの御意見を頂戴したいと思います。

まず、指摘事項の 1 で、これは酵素製剤と導入遺伝子とタンパクの名前を書き分けてくださいということでありまして、中島先生の御指摘なのですが、今日、御欠席で。先生から何か。

○北村課長補佐 先生からは問題ないというコメントをいただいております。

○澤田座長 他の先生方はよろしいでしょうか。

それでは、次の指摘事項の 2、従来品宿主との相違点に関する記載の根拠を述べてくださいということで、これは飯先生。

○飯専門委員 もとの記載では単に同じであるとしか書かれていなかったもので、具体的に示してほしいということで指摘したのですけれども。この追加されている記載自体が正しいければ、それはそれでよろしいかと思うのですが、実際のデータとしては、参考文献 1 というのしか引かれていなくて、それを見ますと、使っているものが大腸菌で発現させたタンパク質であるということと、それから、従来のものとの比較という意味では、必ずしもその文献を見ても正確に読みとれないということがあるので、この後の指摘事項の回答などでは、実際の製剤を使ってデータをとっていることでもありますし、この酵素、製剤そのものを使って行った実験データを持っていないわけではないと思いますので、ここで *Bacillus* で発現させて、実際に使われるものを用いて、ここの記載に間違いがなく、従来品と同じであるということの確認をとりたいと思います。

○澤田座長 遺伝子は同じなわけですか。

○飯専門委員 はい、遺伝子は同じなのですけれども、大腸菌で発現させて変性したものを途中でディネーチャーしてとか、必ずしも使っているサンプル自身が全く同じと言っていいものかと言われると、ここの記載だけではちょっと疑問が残るので、それも含めてこの参考文献での記載が、今回の標品でもちゃんと担保されているのだということを説明してほしいと思います。恐らく自分で実際に製剤として使おうとしているものについてのキャラクタライズはしているはずでしょうから、その結果が示されるのが一番いいのではないかと思うのですけれども。

○澤田座長 そうしますと、この組換え体を使って生産される酵素のデータを出してくださいと、そういうことになりますか。

○飯専門委員 ええ、そうしていただくのが一番問題ないと思います。

○澤田座長 それは多分すぐ出ると思うのですけれども。

○飯専門委員 と思います。持ってなければ商売にならないと思いますので。

○澤田座長 他の先生方、よろしいでしょうか。

それでは、次の指摘事項 3 で、これは遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性について追加のデータを出してくださいということで、これは何人かの先生から御指摘いただいておまして。橘田先生、澁谷先生、小関先生、鎌田先生、それから手島先生からコメントをいただいたと思います。何かありましたら。

○北村課長補佐 それでは、手島先生からのコメントを御紹介させていただきます。資料 2 に手島先生からのコメントを載せてございますので、読み上げさせていただきます。

まず①、人工胃液の処理についてですが、今回は AqBE の SGF による消化試験につきまして、回答書 2 ページの図 1 に新たに行った CBB 染色の結果が、4 ページ図 2 にウェスタンの結果が示されています。SGF と AqBE との反応開始後 0.5 分で AqBE のほとん

どが検出されなくなり、AqBE が易消化性であることがわかりますので、この処理の結果はこれでよいと思います。

なお、図 2 のウェスタンで用いた抗 AqBE ポリクローナル抗体がペプシンとも弱く反応する点が気になりますが、AqBE の SGF による易消化性の結果には、大きく影響はしないと思います、ということです。

②番の腸液による処理につきましては、新しい実験の追加はなく、図 6 の CBB 染色の実験条件の詳細が回答書の方に追記されています。実験の詳細な説明に関する部分は、申請資料の方にも記すことが望ましいと思います、ということです。

③番の加熱処理についてでございますけれども、回答書の 5~6 ページで、●●●加熱処理を 90 °Cとして、ELISA 法にて抗体との反応性の低下がみられ、免疫反応性が低下したことが記されています。加熱による抗体反応性の低下は、定性的には酵素活性の低下の結果も考慮して正しいと思われます。ただ、図 3 に、●●●加熱処理では、AqBE が不溶化し、SDS-PAGE ゲルの開始部分に残ることが示されていますが、今回、申請者らが用いている ELISA 法は、添付資料 1 にある方法に準ずる方法で、抗原を固相に固定化してから、抗体との反応性を調べる方法を用いています。この方法では、加熱処理のために不溶化したままの抗原を固相用の抗原とすることは難しいし、正確な結果は得られないことが懸念されます。

回答書 6 ページの下から 8 行目の加熱処理液を PBS により適宜希釈とありますが、この時点で、●●●加熱処理によって不溶化したタンパクは、可溶化した状態になっているのでしょうか。ここで、十分なタンパクが可溶化していないとすれば、この ELISA 法で定量するのは、難しいと思います。また、ELISA 法での定量値を出しているので、6 ページの下から 14 行目の AqBE の濃度、下から 8 行目の PBS による希釈率は、正確に記す必要があると思われます。なお、固相用の抗原の濃度が一定に調整されていないとすると、AqBE の加熱処理による抗体との反応性の確認は、ELISA inhibition で行う方が望ましいと考えます、ということでございます。

○澤田座長 他の先生方から追加でコメントありましたらお願いしたいと思います。

○澁谷専門委員 ちょっとよろしいのでしょうか。いつもこの加熱のところが迷うのですけれども、目的もそうなのですが。例えば今言われていた ELISA inhibition にしても、不溶性になっているとすれば、inhibition の実験そのものも恐らく難しいですよね。濃度をあれできないから。結局、不溶性になってしまうといずれにしてもこういう実験はほとんど成り立たない。逆に言うと、不溶性になるということは非常に熱不安定ということなので、熱安定のタンパクでないという意味ではその辺でいいのではないかという感じはするのですね。そうしないと、これはきっとできなくなってしまうのではないのでしょうか。

○澤田座長 他に御意見ありましたら。

1 つ、ポリクロで一応免疫反応性が変化していないか下がっていることを示せというのはガイドラインに書いてあるのですけれども、ただ不溶化しているとちょっとテクニカル

に難しいので、もうこれ以上やる必要があるのかという、私もちょっとそういう気がいたしますけれども。

それとあと、これは一応食品ではなくて添加物で、添加物のガイドラインは食品ほど厳密に求めているわけではありませんで、食品製造工程での使用形態や最終食品における推定残存量等を考慮した上で、アレルギー誘発性等の安全性上の問題がないと判断できる合理的な理由があるということとされています。この現在出されておりますデータから合理的な判断ができると、そういうふうと考えてよろしいということであれば、これ以上データを求める必要はないかなと思います。

他の先生方、何かいかがでしょうか。

一度不溶化した場合は、もうこれ以上やらなくていいという話にすると、これからずっとそういう方針になりますので。

今回のデータはプレートのウェルにコーティングするときに PBS 中でコーティングしたわけですが、不溶化しているののでどのぐらいタンパクが固相にくっついているかというデータがありませんので、これはあくまで参考的なデータに過ぎないかなと思います。

それで、定性的で、本当の意味で定量的ではないのですけれども、不溶化したもので一応 inhibition を見た方がいいのか、そこまでやる必要はないのかというその判断になるかと思っておりますけれども。

他に御意見があれば。

とりあえず添加物ということで、未来永劫いらないというのはちょっとまだ結論を出すのは早いかもしれませんので、今回に限ってこれ以上なくてもいいだろうということにしたいと思っております。

それとあと、記述をちょっと直す必要があるかと思っておりますので、それは手島先生に見ていただいて、内容的なところを直したいというふうに思います。

それでは、指摘事項 4 でありますけれども、これは反復経口投与試験における被験物質の投与量の設定の根拠について、これは和久井先生からの御指摘かと思っております。

○和久井専門委員 実際には私自身が求めましたのは、投与量の論理的な説明は非常に難しいであろうというのはわかっていたのですけれども、一切何もそういうことに触れずに出されているものですから、敢えて質問したということなのです。

回答には現実的にと書いてありますけれども、要するにこれを平たく言えば、実験動物でやるときにこれ以上多くの量を飲ませることが技術的にできなかったのではないかなと解釈せざるを得ないのですが。一応安全であることはわかるのですけれども、最大耐量というものが設定されておりますので、その量を目安にさせていただきたかったということですね。

あと、安全性という意味では問題ないかなとは思っておりますけれども、無論今回使った量で変化が出なかったのだから、最小の量で変化が出る量はそれよりも多いだろうと、これはだれでもわかることで、かなり乱暴な回答だという印象を受けました。

従来の添加物の性質及び用途等に関する資料となっておりまして、(1) 名称、基原及び有効成分については記載のとおりでございます。

(2) 製造方法は、この株を培養して得られた培養液中の生産株を●●●した後、精製することによって製品化されます。

(3) 用途及び使用形態でございますけれども、アミロースやアミロペクチンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グリコシド結合を合成する反応を触媒する酵素でございまして、高分子環状デキストリン等の製造に使用されるということです。

摂取量につきましては、最終製品において検出限界 0.3 ppm 以下でございます。

7 ページにまいりまして、宿主及び導入 DNA です。(1) 宿主の種名、株名及び由来については記載のとおりです。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来については記載のとおりです。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法でございますけれども、改変 *Aq722* 遺伝子が 6- α -グルカノトランスフェラーゼを発現します。改変 *Aq722* 遺伝子を含む発現プラスミド pUAQ2 を宿主に導入してございます。

3、利用経験、食経験に関することでございますけれども、*B. subtilis* は、食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験がございまして、OECD の GILSP が適用できる宿主微生物として認定されてございます。

4、*B. subtilis* は有害生理活性物質を産生するという報告はございません。

5、組換え添加物の性質、用途等でございますけれども、製品名、有効成分については記載のとおりです。製造方法、用途、使用形態については従来の添加物と変わりませんで、有効成分の性質については高温において安定でございます。

6、安全性評価において検討が必要とされる宿主等との相違点でございますけれども、AqBE と従来の添加物については、アミノ酸配列が異なっております。

8 ページにまいりまして、組換え体と宿主の相違点は、BR151 株に改変 *Aq722* 遺伝子を含む発現プラスミド pUAQ2 が導入されている点が異なっております。

第 2 にまいりまして、宿主の分類学上の位置づけに関する事項でございます、宿主は、*B. subtilis* 168 株の突然変異株 BR151 株でございます。この株は、食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験がございまして、納豆等の食品を通じて食経験がございまして、また、OECD において GILSP が適用できる宿主微生物として認定されてございます。

2 で、この菌が有害生理活性物質を生産するという報告はございません。

3、この菌が腸管内に定着する可能性はございますけれども、食経験があるということから安全上は問題ないと考えます。

ウイルス感染等の報告はございません。

5 で、近縁株であります *Bacillus cereus* 及び *Bacillus anthracis* は毒性物質を生産することが知られてございます。

第 3、ベクターに関する事項でございますけれども、1 といたしまして、発現プラスミ

ド pUAQ2 の作製には *Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pUB110 が用いられて
ございます。

2、性質に関する事項でございますけれども、プラスミド pUB110 の塩基数、塩基配列
は明らかでございます。

(2) にまいりまして、pUB110 の制限酵素による切断地図は明らかになってございま
す。

(3) でございますが、既知の有害塩基配列は含まれてございません。

(4) 薬剤耐性でございますけれども、カナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシン耐
性遺伝子が含まれてございます。

(5) 伝達性ですが、伝達を可能とする塩基配列は含まれてございません。

(6) プラスミド pUB110 は *Staphylococcus* 属及び *Bacillus* 属で複製されることが知
られてございます。

第 4、挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項でございます。
1、挿入 DNA の供与体に関する事項でございますけれども、供与体は *A. aeolicus* VF5
株でございます。

安全性につきましては、この株は好熱性、微好気性の独立栄養化学合成細菌であること
から、ヒトへの寄生性、感染性を有するとは考えられません。また、ゲノムの塩基配列は
明らかになってございまして、既知の毒性タンパク質及び有害生理活性物質との相同性は
見られてございません。

2 でございますけれども、挿入 DNA 又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事
項でございます。(1) 挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項でござ
いますけれども、改変 Aq722 遺伝子は、Aq722 遺伝子の塩基配列に基づきまして、発現
量を高めるために塩基置換をし、人工合成した遺伝子でございます。この置換によりまし
て、従来の添加物のアミノ酸配列と比べまして 320 のアミノ酸が置換され、アミノ酸数
は 22 アミノ酸少なくなっております。

(2) ですが、改変 Aq722 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
らかになってございます。

10 ページにまいりまして、挿入遺伝子の機能に関する事項でございます。改変 Aq722
遺伝子が発現する AqBE は、アミロースやアミロペクチンの α -1,4-D-グリコシド結合を
切断し、 α -1,6-D-グリコシド結合を合成する反応を触媒する酵素であり、従来の添加物
と比較しまして高温で安定でございます。

1) としまして、アレルギー誘発性に関する知見でございますけれども、供与体のこの
株に関しましては、アレルギー誘発性の報告はございません。

2) で、遺伝子産物のアレルギー誘発性でございますが、AqBE に関するアレルギー誘
発性の報告はございません。

3) 物理化学的処理に関する感受性に関する事項でございますが、①人工胃液に関する

感受性でございます。SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析による結果、試験開始後 5 分以内に消化されることが確認されてございます。

②人工腸液でございますが、ウェスタンブロットを行った結果、試験開始後 120 分を経過しても消化されてございません。

③加熱処理に関する感受性でございますけれども、加熱により酵素活性の変化を測定した結果、90℃ 2 時間の加熱処理で失活することが確認されてございます。また、ELISA 法を用いて分析を行った結果、加熱処理により AqBE の免疫反応性は大幅に低下することが確認されてございます。

4) 既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項でございます。既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、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いだされてございません。AqBE と既知のアレルゲン等との相同性の有無を確認するために、データベースを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示すオープンリーディングフレームは見いだされてございません。また、抗原決定基との相同性の有無を確認するために、ADFS データベースを用いて検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列と一致するものは見いだされてございません。

3 ですが、挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項でございます。プロモーター、ターミネーター、そのほかについては記載のとおりになってございます。

4 のベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項でございますけれども、プラスミド pUB110 に改変 Aq722 遺伝子及び SD 配列を挿入することによって、発現プラスミド pUAQ2 を作製してございます。

5 で、発現ベクターに関する事項でございます。(1) で発現プラスミド pUAQ2 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ございます。

(2) のオープンリーディングフレームに関する事項でございますけれども、発現プラスミド pUAQ2 の全塩基配列について、6 つの読み枠において ORF 検索を行った結果、連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 100 個見いだされてございます。これらについてデータベースを用いて検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされてございません。

また、これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性を確認するために、データベースで相同性検索を行った結果、80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す ORF は見つかってございません。

また、抗原決定基との相同性についても検索を行った結果、12 ページになりますが、連続する 8 アミノ酸配列と一致するものは見いだされてございません。

(3) で、意図する挿入領域は、発現プラスミド pUAQ2 の全塩基配列でございます。

(4) 純化に関する事項ですが、目的外の遺伝子の混入がないように構築され、電気泳

動によって純化されてございます。

6 の宿主への導入方法でございますが、発現プラスミドを宿主に導入後、カナマイシンを含む培地で選抜することによって **BR151** 株を得てございます。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項でございますけれども、カナマイシン耐性遺伝子が発現するカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ (**KAN**) は、カナマイシンのアミノ酸残基中の水酸基にヌクレオチドを付加することによって活性を不活化します。また、ブレオマイシン耐性遺伝子が発現するタンパク質は、ブレオマイシンに結合し、**DNA** 鎖切断作用を阻害します。

AqBE にこれらの耐性遺伝子を含む発現プラスミド由来の **DNA** が含まれていないことを確認するために、サザンハイブリダイゼーション分析を行った結果、発現プラスミド **pUAQ2** 由来の断片は検出されてございません。**KAN** は、**55℃**以上の加熱、**BRP** は **50℃**以上の加熱によって不安定化するということが知られてございまして、**AqBE** の製造工程中の加熱工程において失活することが考えられます。また、プラスミド **pUB110** は食品用酵素の製造において、安全に使用されてきた経験がございます。

したがいまして、カナマイシン耐性遺伝子及び **KAN** 並びにブレオマイシン耐性遺伝子及び **BRP** は、ヒトの健康に悪影響を与えるおそれはないと考えるとしております。

第 5、組換え体に関する事項でございます。宿主との差異でございますけれども、発現プラスミド **pUAQ2** 中の改変 **Aq722** 遺伝子が **AqBE** を発現することが宿主との差異になってございます。

遺伝子導入に関する事項でございますが、**pUAQ2** の制限酵素による切断地図は明らかになってございます。

(2) オープンリーディングフレームに関する事項でございますけれども、13 ページにまいりまして、**ORF** について既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性は認められてございません。

第 6 にまいりまして、組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項でございます。この製造原料、製造器材は、従来の添加物で使用する製造原料及び製造器材と同じものを使用するという事です。

2 で、製造原料、製造器材は、従来の添加物で使用するものと同等のものという事です。

第 7、遺伝子組換え添加物に関する事項です。諸外国における認可、食用等に関する事項で、**AqBE** は、2010 年に米国において **GRAS** として認定されてございます。

2、組換え体の残存に関する事項でございますが、サザンハイブリダイゼーション分析を行った結果、**pUAQ2** に由来する **DNA** 断片は検出されてございません。

3、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項でございますが、**AqBE** は **JECFA** の食品用酵素剤に対する一般規格を満たしてございます。また、亜急性毒性試験、変異原性試験及び染色体異常試験を行った結果、被験物質に関連した異常が認められな

ったということから、製造に由来する非有効成分の安全性に問題はないと考えられるとしております。

4、精製方法でございますが、AqBE の精製工程においては、●●●等が行われており、その効果は明らかでございます。

5、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項でございますが、AqBE の製造原料、製造方法は、従来の添加物の製造に使用されているものと同じでございます。JECFA の食品酵素規格に適合しているということから、有害性はないと考えられます。

第8でございますが、14 ページにまいりまして、(1) 亜急性毒性試験の結果でございます。SD ラットを用いて 13 週間の反復強制経口投与試験を行っておりまして、その結果、被験物質の投与に関連した異常は認められてございません。

(2) 変異原性試験でございますけれども、この条件で試験を行いまして変異原性は認められてございません。

(3) 染色体異常試験においても、染色体異常は認められてございません。

Ⅲ番でございますが、食品健康影響評価結果ということで、「BR151 株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼ」につきましては、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断したという記載にしております。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして御意見、コメント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ければと思います。まず、順番に、評価書の第 1 から第 3、9 ページの真ん中のあたりまでで、御意見、コメントありましたらお願いしたいと思います。

○鎌田専門委員 多分この手の評価書は余り記憶にないので、こんなことを言っているのかどうか分からないのですが、例えば 7 ページの製造方法、AqBE の製造方法は従来の添加物と変わらないと。従来は単に微生物の培養物から抽出した、今度は全然違う組換えを使って、オリジンが全然違う微生物のものを組換えであえて増やしてというのは、同じと言うのですかね。

○澤田座長 この部分、従来の表現はどうなっていましたか。

○鎌田専門委員 安全性に疑義があるわけではなくて、書き方の問題だけだと思うのですが。

○澤田座長 6 ページの製造方法がありますね。それとほぼ同様であるという意味で書いている可能性はありますが。

○鎌田専門委員 だから、宿主は……

○澤田座長 生産菌は違う。

○鎌田専門委員 生産菌は違うけれども、培養液から先はほぼ同じであると、そういう意味なのですかね。

多分ここだけでなく、同じようなことが例えば7ページ目の6の(1)、一番下のところに、これもこういうのでいいのかな。AqBEと従来の添加物の相違点は、アミノ酸数及びアミノ酸配列が異なる点であると。これだけ書かれると何でもいいのだよねと、似てるところはなくてもいいのだよねというふうになるわけですよ、逆に言うと。これ永遠と続いていまして、多分次のページの8ページのところも基本的に同じで、例えば8ページの第2の5は、これもこういうふうに言えるかどうか、*Bacillus cereus*ですから、これクラス2のかなり危険な微生物ということになるわけですが、「毒性物質を生産することが知られている。」で切ってしまうと、では安全性上何か考えなくてもいいのですか、記載がなくてもいいのですかという。その次の第3の1のベクターのところもそうですね。*Staphylococcus*はクラス2ですから、クラス2に由来するプラスミドを使ったとだけ書かれると、安全性上の判断はどこにもないという。由来はそうなのだけれども、このプラスミドは毒性はないというふうに書かれればまあ多分納得できると思うので。

だから、従来のタイプとが違うやつなので、記載の仕方が食品として使ったときの安全性上問題がないというふうな書き方に全体がなっていないと、何か危険性があるものもあるというような形だけで終わってしまっているような気がするのですが、どうでしょう。

○澤田座長 かなりいろいろ注意すべきところはあると思いますので、これは、過去の書きぶりともちょっと比較して。

○北村課長補佐 製造方法に関しましては、過去 α -アミラーゼLE399というものを評価しているのですが、製造については通常の方法と同様であるという記載がまずありまして、生産菌が製造工程で分離除去されるという記載がございます。

近縁種の病原性等につきましては、その毒性があるものとは明確に区別はされているといった記載もあります。

○澁谷専門委員 過去ほとんどないのだと思うのですよ。みんなほとんど適用除外で全部きていて、最初のころ間違っ出てきたというか、 α -アミラーゼもね、あれぐらいしかやってないのですよね、フル評価は。なので、いろいろな表現も練られてないと思うのですよ。だからこの際、内容的な問題よりもどういうふうに正確に書くかはこの例で少しやっておいた方がいいのではないのでしょうか。

○鎌田専門委員 と、私も思います。

○澤田座長 まず、製造方法は生産菌が違うことを明記して、それ以外は同じであること。それから、従来の添加物と本添加物の違いですけれども、こちらは。

○鎌田専門委員 例えば活性は同じなのだけれども、こうですと言ってくればまだわかるのですが。

○澤田座長 確かにアミノ酸の数も違いますし、配列も違います。

○澁谷専門委員 あと、ここに耐熱性が付与されているとかそういうことを入れた方が親

切な気がします。

○澤田座長 従来の添加物として、何を選ぶかが問題で。

○鎌田専門委員 そうですね、そこが一番問題で、例えば 9 ページの第 4 の 2 番のところの途中から、AqBE は 6- α -グルカノトランスフェラーゼのアミノ酸配列と比較して、320 残基のアミノ酸が置換され、アミノ酸数は 22 アミノ酸少なくなっているというのも、そもそもこれが何と比べたのかがまず出ていない。だから、そこで本当は明確にしなければいなくて、その上で 320 残基もアミノ酸が変わっていたら普通だと違うよねとなると思うので、まさに何と比較してと。既存の今まで認められている添加物はこういうもので、これと比較してこうこうこうで、アミノ酸残基も何残基のうちの幾つと書いてくれないと。例えば 400 アミノ酸残基の 320 残基が違ってましたと言われたら、それは全く違うものだよ、になってしまうので、そういう全体の書き方だけだと思うのですが。

○澤田座長 これは今日ご意見をいろいろ出していただきまして、次回直した後で、もう一度検討した方がいいかと思います。

9 ページの真ん中まで、他によろしいでしょうか。

○山崎専門委員 酵素の場合は、酵素タンパク質単独で製品にはなっているわけではないです。今回の場合は薬剤耐性遺伝子を持っているプラスミドが入っている生産菌でつくっていますから、製品中に薬剤耐性遺伝子産物が入っているかもしれない。それで、ポイントになるのは、酵素タンパク質だけではなくて、その製品の中に入っている成分全部を見比べて従来品との比較をするという観点が必要かなと思いました。もしもそのための資料がもし足りなければ、追加で資料を求める必要が出てくると思います。

○澤田座長 これ従来品の特定がまず前提ですね。今回に限っては、精製タンパクが製品になるのですか。

○山崎専門委員 いや、そんな精製していないと思いますよ。ここに製造方法では、培養液中の生産菌を●●●した後に●●●するとされています。これは普通の精製と同じなので、医薬品のような精製はしていないと思います。

○澤田座長 培養上清でクルードな段階のものをさらに一工程ぐらい経て出たようなものですか。

○山崎専門委員 詳細はわからないのですが、●●●をしているのではないかなと推測はします。

○北村課長補佐 すみません、回答書のファイルに申請資料が添付されています。まず、従来の添加物については、2 ページに、*Geobacillus stearothermophilus* を基原とした 6- α -グルカノトランスフェラーゼとしてございます。本添加物の製造方法につきましては、5 ページにフロー図がございます。

○澤田座長 この 5 ページの製造方法を見る限り、タンパクとしての精製は全然してないですね。また、製法が若干変わっていると書いてあります。

では、よろしいですか、先へ行って。

○飯専門委員 今、比較対象はこの前の製品ということで。先ほどの指摘事項とも関係するのですが、記載としては前のものと基本的に同じであるということであったのですが、引用している文献の中には従来品と比較しているようなデータとしては出されていない。ですので、従来品と今回の酵素剤というものを並べた形での比較データが欲しいという意味での指摘というふうにしておいていただけたらと思います。

○澤田座長 従来品は同じ *stearothermophilus* の TRBE14 ということであれば、それといろいろ比較してください。

それでは、もうちょっと先にいきまして、9 ページの中からもう最後までで構いませんので、コメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

○澁谷専門委員 よろしいでしょうか。12 ページの 7 番の抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性のところ、これ非常にわかりにくいような気がするのですね。最初の段落でそれぞれのタンパク質が例えば DNA 鎖切断作用を阻害するとか何か書いてあって、その後、製品中にその遺伝子断片、DNA が入っていないというのが出てきて、それからその後製造工程できっとそれぞれの酵素は失活するというのは書いてあるのですね。それで、その後最終的にこのカナマイシン耐性遺伝子、それからそれがつくる酵素、ブレオマイシン耐性遺伝子、それとそのつくる酵素はヒトの健康に悪影響を与えるおそれはないと、これちょっとわかりにくい。前の方で、こういう酵素活性を持っていて、それだけ見ると問題なのだけれども、実際には酵素は製造途中で失活するから最終製品では問題がないというような話とか。あるいはその中に遺伝子断片は入っていないとか、ちょっと整理して書いてもらわないと、何か一般論としてブレオマイシン耐性酵素とかそれからカナマイシンとかがヒトの健康に悪影響を与えることはないみたいな、ちょっとそんなになっっていて、そこはちょっとわかりにくいような気がするのですね。だから、少し整理した書きの方がいいように思いますけれども。

○澤田座長 ちょっと書く順番を検討して。

○澁谷専門委員 そうですね、タンパクの酵素としての部分は酵素としてまとめてしまう、その DNA 断片の混入はないならないとか。それと、結論もちょっと。

○澤田座長 ブレオマイシンとカナマイシン耐性のタンパクは一応生産されてしまうわけですね。それで、菌体を破碎すると漏れて出てきていると。

○澁谷専門委員 ということなのでしょうね。

○澤田座長 それを失活させるために加熱工程をつけ加えたという理解ですが。

○澁谷専門委員 結果的に失活しているのでしょうかね、ここのあれで。

○澤田座長 今ちょっと気がついたのですが、KAN と BRP という略語は普通大文字ではなくて小文字で。

○澁谷専門委員 ただ、これタンパクの方。

○澤田座長 タンパクですか。

○澁谷専門委員 ええ、そこがややこしいのですよ。使い分けているのですよね、これ。

○澤田座長 タンパクだったら大文字でも構いません。でも、そうか、わかりました。

○鎌田専門委員 略記としてはいいのですが、普通だとカナマイシン耐性は **KAN** と書かないで、**KAN-R** と書かないとカナマイシンそのものになってしまうので。プレオマイシンも全く同じで。

○澤田座長 申請書の方が確か **neor** になっていて、同じものですね、これ、統一した方がいいかもしれません。

他によろしいでしょうか。

○橋田専門委員 単なる確認ですけれども、先ほどの議論で加熱処理に対する感受性のところがあったかと思えます。それについて実際手島委員からの御指摘にもありましたように、不溶化した状態でコーティングしたときに十分量くっついているかどうかというのはきちんと確認されておられません。10 ページの加熱処理に対する感受性のところで、**ELISA** を行ったところ免疫反応性が大幅に低下することが確認されたように書いてありますが、このところは手島委員と話し合っただけでどういう表記にするかということを決めるというお話でしたので、それに応じた形で変更した方がよろしいかと思えます。

○澤田座長 はい。ここは調整したいと思えます。

○鎌田専門委員 13 ページの第 7 の 2 というのはものすごく気になるところで、菌の残存性の確認をするのに、ここだとプラスミドの断片は検出されなかったと書いてあるのですが、菌のゲノムを使わないと本来の菌の残存性というのは出てこないの。さてデータがあったかどうか覚えてないですが、少なくともこの書き方ではまずいだろうというのが 1 つです。

それから、同じく第 7 の 5 のところに、これがさっきからの議論なのですが、**AqBE** の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様というふうになっていて、この場合の同様というのは何を、従来のというの。今回のケースに限ってなのか、それとも **JECFA** が言っているような一般論としての議論をしているのか、ちょっと書き方からはわからない。

○五十君専門委員 組換えの残存に関してですが、添加物として評価するときには生菌が出てこないことを確認する必要があると思えますので、確認していただきたい。もし生菌が出てくるとすると、微生物のガイドラインで評価しなくてはいけないということになってしまいます。

○澤田座長 まず、生菌が残っていないことは確認したほうがいいと思えます。

○五十君専門委員 特にこれは芽胞形成菌なので、加熱処理で死滅しない可能性があります。あと、フィルターを通したりしているだけであれば、やはり生菌がいるかどうかの評価をしておかないといけないと思えます。

○澤田座長 あと、組換え体の残存に関する事項ですが、ガイドライン上はドットハイブリダイゼーション等と書いてあるのですね。

○児玉専門委員 一応生産菌は芽胞形成能を失っているというふうに書かれていますので、

芽胞はもう使われないというふうに理解していいのではないかと思います。そういうふうに申請書に書いてありますので。

○澤田座長 他によろしいでしょうか。

○山崎専門委員 12 ページの第 5 の 1 の宿主との差異に関する事項なのですが、今回の場合はプラスミドを持っているということが宿主との差なので、そういう記載の方がいいかなと思います。申請書の中でも 19 ページに宿主との差異に関する事項と書いてあるのですが、その部分には、発現プラスミドが入ってますよということと、プラスミドには薬剤耐性マーカー遺伝子が入っていますよということの 2 つの事実が書いてあります。評価書の中で、宿主との差というのは、このプラスミドが入っているということが差になると思います。

○澤田座長 書きぶりとしては、AqBE を発現すると同時に、薬剤耐性の 2 つのタンパクですね、それを発現していることを書いた方がいい。

○山崎専門委員 そういう書き方ができると思うのですけれども、今までのこういう酵素をつくる生産菌は大体ゲノムに遺伝子を入れているのですよね。今回はプラスミドなのでここが違うので、従来の書き方と変えないといけないかなと思うのです。

○澤田座長 発現プラスミドを有し、3 つのタンパクを生産すると、そういうことで。

○山崎専門委員 そうですね、はい。

○和久井専門委員 ちょっと先生よろしいでしょうか。14 ページのところの (1) の亜急性毒性試験なのですけれども、どうも今まで引っかかっていたのが、この AqBE を 1.7、5、15 ml で投与した。これは AqBE 完全にピュアリファイされた物質ではないわけですよ。そうすると、この書きぶりはピュアリファイされた物質を投与しましたよ。そのときこうでしたということなのですね。そこがずっと前から引っかかっていたのですけれども、それでよろしいのですか。どう変えていいのか僕もよくわからないのですけれども。

○澤田座長 多分申請者が言っている精製というのは、ほとんどタンパク質としては精製してないのですけれども、精製品と称している。

○和久井専門委員 ええ。ですから、それをもって量的に、量がダイレクトに書かれているのはこの部分なのですよ。このまま外してしまつてというか、いいのかなと。

○澤田座長 製品としてのもののボリュームで書いてあるわけですね。

○和久井専門委員 ですから、となるとこれは AqBE という物質というか酵素というか単体ではないですよ。

○澤田座長 どこかに GRAS 云々と書いてありましたね。FDA で GRAS の承認をとるときに、必ずこういう実験しないとけないので、そのデータをそのままこちらに出しているのだと思います。

それで、日本の添加物の場合、もし純品だったら変異原性試験等はいらないのですよね。タンパク質の場合は、もしきれいだったら。ただ、大分混じっているものがあるのでやった方がいいという判断だったのかもしれないけれども。

いずれにせよ、このボリュームに関してはどこかで定義をしておいた方がいいですね。
製品としての。

○小関専門委員 今この申請書を読んでいたら、申請書の 20 ページあたりにそういうことが書いてありまして。要するにこの実験は不純物を含む AqBE を評価していると、その結果不純物に関しては問題ないのだよというそのための実験みたいなので、これはその AqBE のための実験ではないと、申請書にはそういうふうに書いてありますが。

○和久井専門委員 評価書と違いますね。

○小関専門委員 ええ。

○橘田専門委員 よろしいでしょうか。評価書の書きぶりのことと言えば、先ほどの組換え体の生菌の残存云々に関しても、資料の 19 ページでは生産菌株が含まれていないことを確認しているということで、添付資料 14 が引用されているのですが、それが評価書の方では引用されていないので、多分そちらの方をきちんと引用すれば問題なくいくかと思えます。

○北村課長補佐 今先生に御助言いただいたのですが、添付資料 14 で、培養によってですが、酵素生産菌が存在しないということは確認されてございます。

○澤田座長 今引用が添付 17 だけなのですけれども、添付 14 も引用した方がいいと。

○北村課長補佐 残存がないことを確認しているという文言を入れればよろしいでしょうか。

○飯専門委員 この製品がピュアでないという議論を聞いていてちょっと気になってきたのは、ここで使っているプラスミドの上には抗生物質耐性の産物以外に複製に関わる遺伝子が乗っていて、その産物も出てくるのですが。そのものに対する検討というのは実はどこにもされていないのではないかなと。

○小関専門委員 1 つよろしいですか。それは、既にこれアミラーゼか何か別のときに pUB は使っているので、そのところはそこで問題ないという言い回しして、ですから言い方としてはプラスミドのバックボーンはありますよね、それ自身とそれが発現するタンパク質については既に使用経験があるというところを根拠にしていくしか手はないのではないかなと思います。

○飯専門委員 そのときもやはりこれと同じような粗製品みたいな扱いの審査であったということで。わかりました。

○小関専門委員 そんなにきれいではなかったはずです。

○澤田座長 ORF について、 α 、 β とか、記載がありました。どこだったか、17 ページですが、 γ がブレオマイシン耐性で。 α がプラスミド複製でこれは ori かどうか。いずれにしるこのタンパクは出ているということなので、追加で情報だけは追加で書いておいていただいた方がいいですね。

他にありましたら。

○児玉専門委員 先ほど AqBE の容量の定義というところに付随する話なのですけれど

も、評価書の 14 ページ、申請書も今見たらそうなっているのですが、1 の亜急性毒性と変異原性試験と AqBE の容量が上は ml で、下は μg なのですよね。ですので、その容量の定義のときにこの関係についてもちょっと一言触れておいてもらわないと、どっちをどう見たらいいのかさっぱりわからなくなってしまうということがありますので、そこをちょっとどういうことになっているのかというのをつけてもらおう。これは申請書もそうなっていますので。そこをお願いしたいと思います。

○澤田座長 他によろしいでしょうか。

○村田委員 先ほど鎌田先生が御指摘になったのですけれども、P9 のところのアミノ酸の記述がおかしいので、例えばこの塩基置換によって変わったわけではないので、こちら辺はちょっと表現を変えていただいた方がいいと思いますけれども。塩基置換ではなくてもともと違うのですよね、これ。

○澤田座長 かなり記載整備的なことが大分ありますので、これは次回直していただいたものをもう一回見たいと思います。

○北村課長補佐 全体に見直しまして、次回御審議をお願いいたします。

○澤田座長 はい。それでは、次に、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統に移りたいと思います。事務局から御説明をお願いします。

○三木係員 それでは、お手元に灰色の大きなドッチファイルを御用意くださいますようお願いいたします。

こちらをめぐっていただいて、概説書の 1 ページ目から御説明させていただきます。

第 1 の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となりますが、1 の宿主及び導入 DNA に関する事項といたしまして、

(1) 宿主の種名につきまして、宿主はイネ科のトウモロコシであり、デント種に属するとなっております。

(2) の DNA 供与体の種名につきましては、グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* の *cry3A* 遺伝子に由来する改変型 *cry3A* 遺伝子及び *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製された *ecry3.1Ab* 遺伝子と大腸菌由来のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子の 2 つを供与したとなっております。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法に関する事項といたしまして、*ecry3.1Ab* 遺伝子によって産生される eCry3.1Ab タンパク質は、米国のトウモロコシ栽培で問題となっているコウチュウ目害虫であるウェスタンコーンルートワーム等に対して高い殺虫活性を示すとなっております。

一方、*pmi* 遺伝子によって産生される PMI タンパク質は、*E. coli* のマンノースリン酸イソメラーゼでマンノース-6-リン酸のフルクトース-6-リン酸への異性化を触媒する酵素タンパク質です。これが遺伝子導入された形質転換体の選抜マーカーとして用いられております。

T-DNA 領域にこれらの遺伝子の発現カセットを組み込んだ導入用プラスミド pSYN12274 を構築し、アグロバクテリウム法によりトウモロコシ細胞に導入したとなっております。

2 ページの 2 宿主の食経験に関する事項といたしまして、宿主であるトウモロコシは古くから、そして広く食品として利用・摂取されていたということになっております。

次に 3、宿主由来の食品の構成成分等に関する事項といたしまして、(1) 宿主の可食部位の主要栄養素等、(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質につきましてそれぞれ記載がされております。

その下の 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といたしまして、(1) 収穫時期と貯蔵方法、(2) 摂取部位、(3) 摂取量、(4) 調理及び加工方法についてはそれぞれ従来のトウモロコシとの相違はないとされております。

5、比較対象といたしましては、宿主であるトウモロコシのみを比較対象としております。

6、安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項といたしまして、相違点は *ecry3.1Ab* 遺伝子の導入によって eCry3.1Ab タンパク質、また *pmi* 遺伝子の導入によって PMI タンパク質をそれぞれ産生していることとなります。

第 2、組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項といたしまして、eCry3.1Ab タンパク質は米国のトウモロコシ栽培で問題になっているコウチュウ目害虫に対し高い殺虫性を示しますが、食品としての利用目的や利用方法に関しては従来のトウモロコシと相違がないとなっております。

第 3 の宿主に関する事項といたしまして、4 ページ目にまいります。1 の分類学上の位置付け等については、宿主はイネ科トウモロコシ属のトウモロコシであり、デント種に属します。

2、遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項としては、記載のとおりです。

3、有害生理活性物質の生産に関する事項といたしまして、トウモロコシにおいて栄養学的に有意と考えられるレベルの有害生理活性物質の産生は知られていないとなっております。

4、アレルギー誘発性に関する事項といたしまして、トウモロコシについては植物アレルギー性に関する報告はわずかであり、トウモロコシタンパク質が有力な食物アレルギーでないことが示されております。次のページにまいりまして、CODEX におきましてもアレルギー性の表示をつけることを要求する穀物にトウモロコシは入っておりません。また、日本の厚生労働省の方でもアレルギー性の表示を義務あるいは推奨する食品のリストにトウモロコシを挙げていないとなっております。

5、病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項といたしまして、トウモロコシはウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られているが、それらの病原菌の摂取によりヒトの健康が害されることはないとされております。

その下の 6、安全な摂取に関する事項といたしまして、宿主であるトウモロコシは世界的に古くから食品として利用されてきたとなっております。

6 ページ、7 の近縁の植物種に関する事項といたしまして、トウモロコシの近縁種はブタモロコシとトリプサカム属等が知られているが、これらについて有害生理活性物質の報告はないとされております。

7 ページの第 4、ベクターに関する事項といたしまして、1、名称及び由来に関する事項としまして、5307 トウモロコシの作製に用いた導入用プラスミド pSYN12274 の構築には、バイナリープラスミド pVictor 由来の pNOV2114 を用いたとなっております。

その下の性質に関する事項といたしまして、(1) DNA の塩基数及びその塩基配列に関する事項といたしまして、ベクター pNOV2114 の塩基数は 5,760 bp ありまして、その塩基配列も明らかにされております。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項といたしまして、8 ページの図 1 に示されたとおりとなっております。

(3) ベクターの pNOV2114 の構成 DNA 及び塩基配列は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていないとされております。

その下の (4) 構築ベクターの細菌中での選抜・維持のために、*E. coli* Tn7 由来の *spec* 遺伝子が含まれております。*spec* にコードされるストレプトマイシンアデニリルトランスフェラーゼによってストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性が付与されているとされております。

(5) 伝達性に関しましては、ベクター pNOV2114 には伝達を可能とする塩基配列は含まれていないとされております。

9 ページの第 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の 1 挿入 DNA の供与体に関する事項の (1) 名称、由来及び分類に関する事項といたしまして、① *ecry3.1Ab* 遺伝子につきましては、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* の *ecry3.1Ab* 遺伝子及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製されております。

② *pmi* 遺伝子につきましては、マンノースリン酸イソメラーゼを産生する *E. coli* K-12 株由来の遺伝子となっております。

(2) の安全性に関する事項です。*ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* につきましてはヒトの食経験はありませんが、微生物農薬の有効成分として利用されており、ヒトや動物に対する病原性は報告されておられません。

pmi 遺伝子につきましては、こちらの供与体であります *E. coli* は、自然界やヒトの消化器官に広く存在していることが知られており、*E. coli* K-12 株における病害も報告されておられません。

10 ページの 2、挿入 DNA 又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項となります。(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項といたしまして、

① *ecry3.1Ab* 遺伝子については、グラム陽性土壌細菌である *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 由来の *cry3A* 遺伝子を基にした *mcry3A* 遺伝子及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製されたとなっております。

ここでの *mcry3A* 遺伝子につきましては、宿主であるトウモロコシでの発現に最適な塩基配列に置換を行い、人工合成されたものです。さらに、標的コウチュウ目害虫に対する抵抗性を高めるために、155 番目、156 番目、157 番目のアミノ酸配列をカテプシン G プロテアーゼの認識配列であるアラニン・アラニン・プロリン・フェニルアラニンの 4 アミノ酸となるように改変されております。

その下のパラグラフにまいりまして、*cry1Ab* 遺伝子につきましては、トウモロコシでの発現に最適な塩基配列となるように置換、人工合成されたものであります。

その下にまいりまして、*ecry3.1Ab* 遺伝子は、*mcry3A* 遺伝子のドメイン I 領域、ドメイン II 領域及び一部のドメイン III 領域、*cry1Ab* 遺伝子のドメイン III 領域以降と融合するように作製されております。具体的には次のページの図 2 に示されたとおりです。

12 ページ、② *pmi* 遺伝子になりますけれども、この遺伝子は *E. coli* K-12 株からクローニングされたマンノースリン酸イソメラーゼを産生する遺伝子であります。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項といたしまして、13 ページ、*ecry3.1Ab* 遺伝子の塩基数は 1,962 bp であり、*pmi* 遺伝子の塩基数は 1,176 bp となっております。これらの遺伝子の塩基配列は明らかにされております。

その下の (3) 挿入遺伝子の機能に関する事項となります。① *ecry3.1Ab* の機能といたしましては、従来の Cry タンパク質と同様の立体構造及び基本的特性を持っていると考えられ、Cry1Ab タンパク質等の *B. thuringiensis* で産生される結晶タンパク質である Cry タンパク質は特定の昆虫種に対して殺虫活性を示すことが知られております。その感受性昆虫種がこの Cry タンパク質を摂取しますと、体内で活性ポリペプチドを生じ、中腸上皮細胞の特異的受容体に結合してイオンチャネルを形成、その結果、消化器官が損傷を受けて摂食障害を起し、死に至ることが知られております。

この eCry3.1Ab タンパク質が発現する 5307 トウモロコシは米国のトウモロコシの栽培で問題になっておりますコウチュウ目害虫に対して高い殺虫活性を示すとなっております。

② eCry3.1Ab タンパク質の既知の毒性タンパク質との構造相同性について、eCry3.1Ab タンパク質と既知の毒性タンパク質の構造相同性を相同性の指標である期待値 (E-value) に基づき評価しております。

その結果といたしましては、14 ページ、eCry3.1Ab タンパク質との相同性に有意性がないと判断される E-value の上限を 0.32 に設定したところ、この数値以下となるデータベース上の登録タンパク質は 495 件となりました。これらにつきましては、他の *B. thuringiensis* の Cry タンパク質を除き、eCry3.1Ab タンパク質と有意な構造相同性を持つ既知の毒性タンパク質は見いだされなかったということです。

③ *pmi* 遺伝子の機能につきましては、多くの植物細胞において生育する上でマンノースを炭素源として利用することはできませんが、*pmi* 遺伝子の導入により 391 のアミノ酸からなる PMI タンパク質を産生する細胞はマンノースを生育に利用可能なフルクトース-6-リン酸に変換して成長することができるとされており、マンノースを組織培養培地に添加することで形質転換体の選抜が可能となるということで利用されております。

16 ページ、④ PMI タンパク質の既知毒性タンパク質との構造相同性についてです。こちらにつきましても、相同性が高くないと判断される E-value の上限値を 0.16 として設定し、データベース検索を行ったところ、この値以下の登録タンパク質は 962 件となりました。この検索結果から、PMI タンパク質と有意な構造相同性を持つ既知の毒性タンパク質は見いだされなかったということです。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項といたしまして、導入用プラスミドの T-DNA 外骨格領域には、本プラスミドの細菌中での選抜・維持のために抗生物質耐性マーカー遺伝子が組み込まれておりますけれども、作製された 5307 トウモロコシにはこの外骨格領域は存在しないことが確認されております。

3 挿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といたしまして、(1) プロモーターについては、以下の 2 つのプロモーターが用いられております。

17 ページ、(2) ターミネーターに関する事項といたしましては、ターミネーターとして NOS ターミネーターが利用されております。

(3) その他の挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列といたしまして、上記以外に導入用プラスミドには組み込まれていないとされております。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項といたしまして、以下の手順で作製されております。

5 構築された発現ベクターに関する事項の (1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項につきましては、構築された導入用プラスミド pSYN12274 の配列及びその制限酵素による切断部位については 18 ページの図 5 に、構成 DNA については 19 ページの表 1 にまとめられております。

20 ページ、(2) オープンリーディングフレームに関する事項といたしまして、T-DNA 領域に目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームは含まれていないとされております。

(3) 意図する挿入領域に関する事項といたしましては、宿主への導入にはアグロバクテリウム法が用いられ、また、意図する導入領域は導入用プラスミドの右側境界から左側境界までの T-DNA 領域であるとなっております。

(4) 導入用プラスミドにつきましては、その T-DNA の外骨格領域に細菌選抜マーカー遺伝子として *spec* 遺伝子を有してございまして、細菌における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す。

6 DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項といたしまして、宿主への導入方法

にはアグロバクテリウム法を用いて導入用プラスミドをトウモロコシの未熟胚に接種しております。その後、マンノースを添加した組織培養培地で形質転換体を選抜して、再生個体を得たということです。なお、トウモロコシ細胞に残存するアグロバクテリウムの除菌のため、抗生物質を添加しております。

導入遺伝子の確認された 5307 につきましては、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従い、それらによって得られたものを各種の分析及び評価を行っております。

なお、5307 トウモロコシとして商品化を予定しているのは、●●●世代以降のものとなっております。これらにつきましてサザンブロット分析を行い、挿入遺伝子の安定性を確認しております。

22 ページがトウモロコシの育成図です。

23 ページにまいりまして、第 6 組換え体に関する事項の 1 遺伝子導入に関する事項となります。(1) コピー数及び挿入近傍配列に関しまして、まず、①コピー数については、それぞれのトウモロコシの葉からゲノム DNA を抽出し、制限酵素で処理したものについて、T-DNA 領域の各構成要素のプローブ及び外骨格領域で特異的なプローブを用いてサザンブロット分析を行っております。これらの結果から、5307 トウモロコシのゲノムには 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており、導入用プラスミドの外骨格領域は存在しないことが確認されております。

それぞれの具体的な結果につきましては、24 ページから 44 ページまでに示されております。

45 ページ、②挿入遺伝子の塩基配列の決定に関する事項といたしまして、5307 トウモロコシにおける挿入遺伝子の全塩基配列を抽出ゲノムから決定しております。その結果、T-DNA 領域における右側境界のすべてと、それに続く T-DNA の 3 bp 及び左側境界の 8 bp をそれぞれ欠損していました。また、挿入遺伝子における CMP プロモーターの 49 bp 上流の非翻訳領域に 1 か所の塩基の置換が認められたということです。しかし、この塩基置換による挿入遺伝子への影響はないと考えられたということです。

③近傍配列の決定につきましては、5307 トウモロコシの挿入遺伝子の 5' 及び 3' 末端近傍配列の塩基配列を決定した結果、遺伝子の挿入に伴いトウモロコシゲノムの 33 bp が欠損していたものの、挿入遺伝子の近傍配列についてはトウモロコシのゲノム配列と一致していることが確認されております。

また、両近傍配列におきまして、既知のタンパク質と相同性を持つ配列が存在するかどうかについてデータベースを用いて検索を行っております。このことから、トウモロコシの既知のタンパク質の配列は見いだされなかったことからトウモロコシの既知の遺伝子が損なわれていないことが示唆されたとなっております。

その下の (2) オープンリーディングフレームの有無に関する事項といたしまして、挿入遺伝子及び両近傍配列の接合部位において意図しない ORF が形成されるかどうかについて分析をしております。

46 ページ目にまいりまして、その ORF 検索の結果、計 6 個のオープンリーディングフレームが検出されたとなっております。これらのオープンリーディングフレームにつきましてデータベース検索を行った結果、1 つの ORF につきましては相同なタンパク質が見いだされたものの、既知の毒性タンパク質やアレルゲンではなかったとなっております。また、残りの 5 つの ORF につきましても相同なタンパク質は見いだされなかったということです。

アレルゲン検索としては、80 個以上の連続するアミノ酸を有する ORF について、30%の相同性を持つ配列であるかどうか FASTA を用いたデータベース検索を行っております。また、8 個の連続するアミノ酸で一致するエピトープがあるかどうかの検索を行っております。その結果、アレルゲン及びエピトープとの相同性は見いだされなかったということです。

さらには両近傍配列につきまして、既知のタンパク質と相同性を持つ配列が存在するかどうかについてデータベース検索を行った結果、既知のアレルゲンや毒性タンパク質との相同性は見いだされなかったとなっております。

以上のことから、5307 トウモロコシにおいては遺伝子導入によりアレルゲンや毒性タンパク質が発現している可能性は極めて低いと考えられるという結果になっております。

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としまして、植物体の分析サンプルを調整し、ELISA 法により eCry3.1Ab タンパク質と PMI タンパク質の発現量を分析しております。その結果が以下に記載されており、具体的には 48 ページ、49 ページの表に示されております。

50 ページ、3 遺伝子産物が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるかどうかに関する事項としましては、日本人 1 人当たりの蛋白質の総摂取量 69.8 g に占める割合として試算を行ったところ、eCry3.1Ab タンパク質については 0.000004 %、PMI タンパク質については 0.000001 %となり、極めて微量であったとのことです。このことから、これらのタンパク質の一日蛋白摂取量に占める割合は極めて微量であることが示されたということです。

4 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する事項の (1) 挿入遺伝子の供与体のアレルゲン性につきましては、*ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* と *pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* について、いずれも細菌であり、アレルギー誘発性があるとは考えられていないということです。

(2) 遺伝子産物につきましてのアレルギー誘発性に関する事項といたしましては、eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質につきましてはアレルギー誘発性の報告はないとされております。

51 ページ、(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項となります。①人工胃液に関する酸処理及びペプシン処理につきましては、ペプシン処理を行い人工胃液中での消化性を SDS-PAGE 及びウェスタンブロット分析で評価しております。その結

果、SDS-PAGE 分析においては、eCry3.1Ab タンパク質は反応開始 30 秒後で完全にそのタンパク質は検出されなくなり、反応 10 分以降にはそれらの断片についても検出されなかったということです。

eCry3.1Ab タンパク質のウェスタンブロット分析におきましても、反応開始 30 秒後で完全長のタンパク質やポリペプチド断片のバンド等は検出されなくなったということで、eCry3.1Ab タンパク質は人工胃液中で速やかに分解されることが示されております。その結果が 52 ページ、53 ページの図となります。

54 ページ、PMI タンパク質について、こちらも同様に人工胃液中での消化性を SDS-PAGE 分析とウェスタンブロット分析により評価をしております。その結果、反応開始 5 分後にはバンドとして検出されなくなったということです。また、PMI タンパク質のウェスタンブロット分析につきましては反応開始 1 分後で完全長タンパク質や 4 kDa のバンドが検出されなくなったということです。以上のことから、PMI タンパク質につきましても人工胃液中で速やかに分解されることが示されたということです。その結果が 54 ページと 55 ページの図となります。

56 ページ、人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理につきましては、eCry3.1Ab タンパク質について人工腸液中での消化性を SDS-PAGE 分析とウェスタンブロット分析により評価しております。SDS-PAGE 分析の結果、eCry3.1Ab タンパク質は、反応開始後 48 時間後でもポリペプチド断片が検出されたことから、人工腸液中ではこのタンパク質は消化が進まないことが確認されております。その結果が、56 ページ、57 ページの図 26、27 に示されております。

58 ページ、PMI タンパク質につきましては、タンパク質の人工腸液中での消化性について、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、PMI タンパク質のウェスタンブロット分析においては反応開始後 15 分後で完全長のタンパク質やポリペプチド断片のバンドが検出されなくなったということです。以上の結果から、PMI タンパク質は人工腸液中で速やかに分解されることが示されたということです。58 ページと 59 ページの図 28、29 に図が載っております。

60 ページ、③加熱処理に関しましては、eCry3.1Ab タンパク質については、4℃、25℃、37℃、65℃、95℃の条件下で 30 分間静置した結果、65℃の 30 分間の加熱処理により eCry3.1Ab タンパク質の免疫反応性は検出限界値以下となり、eCry3.1Ab タンパク質は加熱処理に対して安定でないことが示されております。

一方、PMI タンパク質につきましては、4℃、25℃、37℃、65℃、95℃の条件下で 30 分間静置して ELISA 分析により加熱処理感受性を評価しております。その結果、95℃の 30 分間の加熱処理で PMI タンパク質の免疫反応性は定量限界値以下になり、PMI タンパク質についても加熱処理に対しては安定でないことが示されたとなっております。

61 ページ、これらの結果から eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質の両方について、人工胃液中で速やかに分解され、加熱処理によっても容易に活性を失ったことから、

両タンパク質は消化や加熱に対して安定ではないことが確認されたとなっております。

(4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項といたしまして、遺伝子産物のアミノ酸配列について 80 個の連続アミノ酸配列のデータベース検索を行い、35%以上のアミノ酸配列が一致した場合を有意な配列相同性を有すると定義をして行っております。

エピトープ検索としては、8 つの連続するアミノ酸について同様にデータベースを用いて検索を行っております。その結果、①eCry3.1Ab タンパク質については、有意なアミノ酸配列相同性を有する既知アレルゲンや 8 つの連続アミノ酸が一致する既知のアレルゲンは認められなかったとのことです。

②PMI タンパク質につきましても、有意なアミノ酸配列を有する既知アレルゲンは認められなかったということです。一方で、エピトープ検索において PMI タンパク質のアミノ酸配列につきましても、カエルの一種の既知アレルゲンである α -パルブアルブミンとの一致が認められたとのことです。

次のページの (5) の遺伝子産物の IgE 結合能の検討につきまして、先ほど PMI タンパク質において一致の見られた α -パルブアルブミンの感受性患者の血清 IgE を用いて結合能の検討を行っております。その結果、感受性患者の血清 IgE との間に交叉反応は認められず、PMI タンパク質はアレルゲンのエピトープとして認識されないことが示されたということです。

64 ページ、5 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項といたしまして、5307 トウモロコシにおける挿入遺伝子の分離様式を *ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子に対する PCR 分析による検定を行っております。その結果、5307 トウモロコシの挿入遺伝子はメンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝することが示されております。

また、挿入遺伝子の安定性を確認するために、葉由来のゲノム DNA についてサザンブロット分析を行っております。その結果、5307 トウモロコシの挿入遺伝子は複数世代でも安定的であることが示されております。具体的な結果といたしましては、66 ページから 71 ページにまとめられており、72 ページがサザンブロット分析法に基づく 5307 トウモロコシの挿入遺伝子の模式図となっております。

73 ページ、遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項といたしまして、*ecry3.1Ab* 遺伝子についてはコウチュウ目害虫に抵抗性を付与する eCry3.1Ab タンパク質を産生しており、eCry3.1Ab タンパク質は酵素活性を持つとは考えておらず、宿主の代謝系とは独立して機能していることから、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られるということです。

また、その次の PMI タンパク質につきましても、反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的であり、他の天然基質は知られていないということです。

以上のことから、PMI タンパク質の発現が宿主の代謝系への影響を及ぼす可能性は極めて低いとされております。

7 宿主との差異に関する事項といたしまして、5307 トウモロコシと宿主の従来のトウモロコシとの差異を評価するために、植物体における各種構成成分の分析を行っております。分析項目については75ページの表17となっております。

その結果がそれ以降のページに示されており、89ページの⑤成分分析結果のまとめとなりますけれども、5307の主要構成成分、ミネラル成分、ビタミン類、アミノ酸類組成、脂肪酸組成、二次代謝産物及び栄養阻害物質についての分析結果については、対象の非組換えトウモロコシあるいは従来のトウモロコシと同程度であることが確認されております。

その下に8諸外国における状況と、9栽培方法に関する事項、10種子の製造及び管理方法に関する事項として、それぞれ記載されております。

90ページ、第7の第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に関しましては、これまでの事項により、5307のトウモロコシの安全性に関する知見については網羅されていると考えられたとされております。

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先生方から項目ごとに御意見をいただきたいと思えます。まず、申請書の1ページから8ページ、第1、第2、第3、第4にわたりまして、コメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

○児玉専門委員 ちょっと1つよろしいですか。1ページ目の書きぶりの問題なのですが、2のDNA供与体の説明ですが、最初私が読んだときに *cry3A* と *cry1Ab* と *pmi* と3つ入ってるなというふうに読めまして、何で2つなのだろうと思って随分困惑したのですけれども。これは *mcry3A* と *cry1Ab* のキメラなので、そのキメラだということをはっきり書いていただいた方がこちらとしては理解しやすい。あたかも3つ並べて書いてあって、3つ入っているのかなと一瞬最初に読めてしまったので。

○澤田座長 確かに、ちょっと読んでいてよくわからない。

○児玉専門委員 *ecry3.1Ab* というやつは *cry1Ab* からつくられた、何かちょっと改変したやつを *ecry3.1Ab* と読めてしまうので、キメラだというふうにはちょっと読めないのです。

○澤田座長 *ecry3.1Ab* の前にキメラという言葉を入れればまだよろしいですかね。

○児玉専門委員 もしくは融合遺伝子であるとか何か、2つ合わせたものだということがわかるような表現になっていれば。

○澤田座長 それは直していただくということで。

ほかに、8ページまでいかがでしょうか。

それでは、第5、9ページから22ページまで、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いうところでコメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

○澁谷専門委員 よろしいでしょうか。幾つかあるのですけれども、まず11ページのと

ころなのですが、11 ページの下から 10 行目ぐらいですかね、今のキメラのところ、コウチュウ目害虫への殺虫活性を持つ eCry3.1Ab 云々を選抜したから、要するに eCry3.1Ab タンパク質は CB1 から CB3 が mcry3A タンパクで、従来の Cry タンパク質と同様の立体構造及び基本的特性を持つと書いているのですよね。これはまずいと思うのですね。それは一般論としてもこれだけキメラをつくったときに、キメラの立体構造がもとのものと同じだとアプリアリに言うことはできないはずなのですよね。特に特性で言えば、Cry1A はコウチュウ目抵抗性で、Cry3A はチョウ目抵抗性ですね、このキメラはコウチュウ目抵抗性なので、Cry3A の特性は保持されていないのですよね。

しかも、この目的としているのが、これが本当にうまくいっているのかどうかわかりませんが、抵抗性を持ったコウチュウに効くようにと言っている、つまり特異性を変えと言っているわけですね。

そういうことを全部考えると、ここの言っていることは受け入れられないと思うので、この文章は削除してほしいと思います。3 行ですね。

○澤田座長 3 行をすべて削除ですね。

○澁谷専門委員 これ結構さらっと書いてありますけれども、結構重要で、つまりこれまで安全性評価終わっている Cry1A とか Cry3A の仲間だよということを強調したいように見えて、それはちょっとフェアでないと思うのですね。

○澤田座長 ほかに。

○鎌田専門委員 21 ページのまたいつもと同じで、どこからを言うかというのが。これ全部見たのですが、22 ページを見ていただくとわかるのですが、上から 3 つ目の●●●以降を認定していただきたいということで、この一番上のものは、T-DNA 全体のプローブでは確認されていたのですが、外骨格が入っていないことのでデータをとったのは実は一番下のです。だから、そこまでの間、外骨格が入っている可能性については全く否定していない状況なので、このままでは途中で枝分かれさせて実用品種をつくってしまうとわからなくなってしまう。現状で言えば、これを認めてほしいのならば一番上の●●●を使った外骨格がないというデータをきちっと出していただきたいと。それができないのならば、承認するときには一番下からしか承認しないという、どちらかかなと思います。

○澤田座長 これはサンプル保存してあるのですか。

○北村課長補佐 確認してないので、確認します。

○澤田座長 では、サザンのデータを追加していただければ。

○鎌田専門委員 外骨格をプローブしたサザン。

○澤田座長 他によろしいでしょうか。

○澁谷専門委員 ちょっとよろしいでしょうか。14 ページの真ん中辺なのですけれども、毒性タンパクとの検索ですね。これでパラスポリンという *in vitro* でがん細胞に細胞失活性を持つという、それとの相同性が出ているのですよね。これはもともと Cry1A とか Cry3A でも出ていたのか、キメラにしたから出てきたのか、それを確認していただきたい

いのですけれども。これも関連して、私は最終的にはこれ動物細胞の毒性試験やるべきだ
と思うのですけれども、これはどこで議論したらいいかわからないのですが、とりあえ
ずこのところでは、これはキメラで出てきた話か、前々から出ていたかを確認をしてい
ただきたいと思います。

○澤田座長 パラスポリンは前に議論がありまして。

○澁谷専門委員 ありましたっけ。では、Cry1A や何かにみんな共通して。

○澤田座長 かなり相同性が高いというわけではないのですけれども、一応出てくるので。
要するに系統樹みたなのを書くと、ちょっと離れたところにたしか出てきたと思います。

それで、このパラスポリンががん細胞に特異的に細胞毒性があるという話が以前に問題
になりまして、その時の Cry タンパクで、培養細胞に対する *in vitro* のデータを要求し
た覚えがあります。

ほかによろしいでしょうか。

それでは、23 ページから 50 ページ前半で、第 6 の組換え体に関する事項というところ
で御意見、コメントありましたらお願いしたいと思います。

○児玉専門委員 よろしいでしょうか。35 ページのサザンの図なののですけれども、これ
はユビキチンのイントロン付きのプロモーターを使っているのが内在性のバンドが出てく
るのですが。評価対象が 22 ページの、さっき鎌田先生もおっしゃったように、一番下の
●●●なので、遺伝的なバックボーンは上の図を見ていくと、●●●で随分戻し交配やっ
ていますので、●●●みたいな形のバックボーンに読めるのですけれども。出てきたバン
ドパターンはそうは見えず、●●●と●●●のバックボーンに見える。3 番が●●●、
これは評価対象ですね。3 本バンド見えるのですけれども、恐らくその導入遺伝子は 3 本
目の一番下のバンドが導入遺伝子で、上 2 本は内在性の遺伝子なののですけれども、その
上 2 本に相当するのは 5 番と 6 番ですね。5 番が●●●で、6 番が●●●なのですね。シ
ンジェンタさんは育成図からいうと、4 番がそのバックボーンになるようになっているの
で、4 番がわざわざ載ってあって、●●●と●●●なののですけれども、合わないのです
よ。これはちょっと困ったなという。バックボーンは、このパターンだけから言えば、●
●●がバックボーン。●●●戻し交配がないというか、に見えるのですよ。

これはほかのパターンでもそうなっているもので、ここだけが間違っているわけではなく
て、ほかに出てきている内在性のバンドが見えるやつはみんなそうなっているもので、ちょ
っと育成図とこのサザンプロットの結果は合わない。

○澁谷専門委員 育成図が間違っている。

○児玉専門委員 どっちかが間違っているのではないかなと僕には思えるのですけれども。

○澁谷専門委員 間違ってる。

○児玉専門委員 どっちか間違ってますよね。ただ、これは結構意図して間違っているとい
うか、4 番は向こうが用意しているバックボーンが 4 番の例なので、これに合ってなけ
ればいけないのですけれども、評価対象はそうならない。向こうはそういうつもりで

やったのだけれども、実験結果はそうっていないと。

○北村課長補佐 すみません、事務局なのですが、事務局でも育成図の確認はしたのですが、間違っているわけではなく、一番上の方の●●●の内在性のバンドが出てきてしまったという説明はされております。理由はわからないのですが。

○児玉専門委員 難しいですよ。

○鎌田専門委員 ある染色体に外来遺伝子が入っていて、その染色体がどういうふうに移動しているかが。

○児玉専門委員 すごい近いところに入ってしまったらリンクして、どうしても抜けられないというか。

○鎌田専門委員 としか思えないですね。という解釈はできます。

○児玉専門委員 ただ、このままでは受けられないというか、育成図と合わないの。リンクしてるのだったらリンクしていると言ってもらわないと。しかも、かなり近いですよ、これだけバッククロスやって抜けないので。

○澤田座長 では、それはきちんと説明してもらおうということで。

ほかよろしいでしょうか。

○澁谷専門委員 45 ページもいいですかね。

○澤田座長 45 ページも大丈夫です。

○澁谷専門委員 45 ページの (2) の上のところなのですが、ちょっとわかりにくい、その結果という文章なのですが、E-value が 10 以下の既知タンパク質がそれぞれ見つかったのだけれども、その中に既知のタンパク質の配列は見いだされなかった。多分これは 5' と 3' 側に既知のタンパクらしいものが見つかったのだけれども、シーケンスをよく見たらそれではなかったということかと思うのですが、この文章だとすごくわかりにくいように思うのですが、いかがでしょうか。

○澤田座長 要はタンパクをコードしているものがないと言いたいのですね。

○澁谷専門委員 多分配列で投げかけると近い配列が見つかったのだけれども、シーケンスを調べるとそれとは違うということなのではないですかね。何か既知のタンパクが見つかったけれども、その中に既知が入ってなかったという。文章がちょっとわからない。

○澤田座長 多分言いたいことは、遺伝子を破壊してないということが最終的に言いたいのでは。

○澁谷専門委員 だから、その両端の近傍配列読むと、それらしいものが浮かび上がってきたのだけれども、よく見ると壊してはいなかったということだと思うのですが、それが何かわかりにくい表現。翻訳の間違いか何かではないかと思うのです。ちょっとわかりやすい表現に。

○澤田座長 多分英文に戻れば理解ができるかと思しますので、それを確認したいと思います。

他によろしいですか。

○飯専門委員 25 ページからのサザンブロットの図なのですが、最後の方のレーンですが、1 コピー分のプラスミドを混ぜて流しているレーンが必ず右端にあるのですけれども、その 1 コピー分だということを明記しておいていただいた方がいいかと思います。そのバンドの濃さでコピー数が 1 だということの確認になるものだと思いますので。

○澤田座長 図の説明すべてに入れた方がいいですか。

○飯専門委員 図の説明すべてに。

○澤田座長 他によろしいでしょうか。

それでは、50 ページから最後の 92 ページまででコメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

○澁谷専門委員 ちょっと細かい点なのですが、63 ページで、パルブアルブミン感受性患者の血清 IgE の結合性のデータ、63 ページの右上にあるのですが。これ何かミスだと思うのですけれども、C というのの 5 番というレーンがあつて、これはウシ血清アルブミンなのですね。ウシ血清アルブミンのサンプルの中に患者の IgE と反応するバンドが出ているのですよね。これ何かおかしいと思うので、ちょっとどうしてこんなバンドが出たかを、この実験の信頼性にかかわるので、BSA と違うところに患者の IgE と反応するバンドが出てしまっているの、これだけ確認しておいてほしいのですが。一番右のレーンです。パネル C の。

○澤田座長 30 kDa ぐらいの薄いバンドですね。

○澁谷専門委員 そうですね、これが何でこんなのが出ているかをちょっと。

○澤田座長 一応 67 kDa は出てないので、何かコンタミが反応している可能性は。

○橘田専門委員 67 kDa もうっすら見えるようなので、これ 2 つバンドがあるように見えるのですけれども。だから、多分上の方はノンスペ、かなり過剰量あるのでノンスペかと思うのですが、それであるのにもかかわらず下に普通にクマシーで染めたときに見えないバンドに反応するというのはちょっとかなり特異性の高い、何か入っているのかなと。

○澤田座長 他によろしいでしょうか。

○澁谷専門委員 よろしいでしょうか。ここに書かれてないのですが、さっきもちょっと申し上げたのですけれども、これやはり新しいタイプの Cry タンパクと考えざるを得ないと思うのですね。特にこの申請者が言っていることの特異性を変えるのを目的にしているわけですね。つまり、これまでのものに抵抗性が出て大丈夫なことを狙う。つまり、特異性を変えるということは、これはやはり特異性を変えてターゲットが変わったときに、哺乳動物には大丈夫だということを何かの格好で担保しないといけないと思うのですね。それを考えると、これまでの新しい Cry タンパクの場合には動物細胞の実験ぐらいまでは要求していたのではないかと思うので、そうであれば同じようなことを何かの格好でやってもらう必要があるのではないかと思うのですが。

○澤田座長 同じ昆虫のトキシンでも、従来にない場合はできたらヒトの細胞に対して毒性を見た方がいいという。

○澁谷専門委員 だから、これまでは培養細胞でやっていたと思うのですね。だから、同等で結構だと思うのですけれども。同等で結構ですけれども、やはり新しいものとしてのことをやっておかないとまずいのではないかと思うのですが。

○澤田座長 前はヒトの細胞に 2 つぐらい選んで、それに対して細胞毒性がないということを出してくださいということがありました。それでよろしいでしょうか。

ほかに。

いただいた指摘事項でやはりデータの追加的なことがありますので、一応意見確認事項を指摘事項案としてとりまとめて、先生方に一応確認していただいた上で厚生労働省を通じて申請者に対して指摘を出したいと思います。

したがって、飼料の方はまた次回以降ということで。ちょっと時間が余りないのですが、どうしましょう。

○北村課長補佐 次回で、すみません。

○澤田座長 説明だけしますか、それとも。それでは、次回に回すということで、議題 1 はこれで終わりたいと思います。

それで、議題 2 のその他ですけれども、事務局からありますでしょうか。たしか何か追加の資料が出ていたように思います。

○北村課長補佐 事務局から 2 点報告がございます。まず、参考資料 2 をご覧いただきたいと思います。こちらは 7 月 7 日付けで農林水産省から食品健康影響評価の依頼があった件でございまして、2 枚目が農林水産省からの文書になってございます。

内容といしましては、次のページになりますが、組換え DNA 技術によって得られた生物を含む飼料について、安全性の確保に支障がないものとして農林水産大臣が定める基準についてということになってございます。この基準を定めようとするときには、食品安全委員会の意見を聞くということとされていますので、食品安全委員会に対して意見を求められたものでございます。

このものにつきましては 2 番に記載がございますように、通常であれば食品と餌、例えば、ダイズやトウモロコシ等であれば食品と飼料と同時に諮問がされてくるのですが、専ら食品に利用される組換え DNA によって得られた農作物につきまして食品としての安全性が確認されていることを要件に、飼料としての安全性の確保に支障がないものとする基準を定めたいということでございます。

現在この基準の対象となり得るものにつきましては、パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 のみでございまして、これにつきましては飼料として流通、利用されないということから、農林水産省としては、飼料としての安全性の確認を行う必要はないとされてございます。しかしながら、食品のリサイクルの進展により、このパパイヤの残渣が飼料に再利用される可能性があり、この食品専用 GM 農作物が食品残渣等に混入した結果、家畜が摂取する可能性を否定できないということから、農林水産省では基準を定めて、飼料としての安全性の確認を不要としたいということでございます。

次のページにまいりまして、その基準の内容はこちらに記載されておりますとおり、飼料として安全性が確認されていない農作物であって、飼料に供することが目的とされていないものの全部または一部を含む飼料ということで、我が国において農作物の食品としての安全性が確認されていることというものでございます。

先ほど申しましたように、この基準の対象となりますのは現在のところパパイヤリングスポットウィルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統だけでございます。

その回答としましては、参考資料 2 の 1 枚目でございますように、この基準を定めてパパイヤ 55-1 にこれを適用する場合に限りましては、人の健康に及ぼす影響が変わるものではないということから、食品安全基本法第 11 条 1 項第 2 号の人の健康に及ぼす悪影響の内容及び程度が明らかであるときに該当すると認められるということで回答をしたものでございます。

参考資料 2 については以上になります。

次に、参考資料 3 ですが、こちらは前回の調査会で御検討いただきました掛け合わせ品種の取扱いについてでございます。調査会での議論を踏まえまして、7 月 21 日に食品安全委員会で決定をしております。

この内容でございますけれども、2 パラ目になりますが、この掛け合わせの考え方において、「挿入された遺伝子によって宿主の代謝系には影響なく、害虫抵抗性、除草剤耐性、ウィルス抵抗性などの形質が付与されるもの」同士の掛け合わせ品種について、関係大臣が提出された資料により委員会委員長の指名する委員を中心に検討を行いまして、下の①から③のいずれにも該当する場合にありましては、調査会の調査審議を経ることなく健康影響評価を行うということで、親委員会で判断をするということにしております。

まず①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おいて、安全性の確認を必要とするものに該当しない掛け合わせであるということ。

②は、委員会で安全性審査を行った掛け合わせの親品種であるということと、親品種の安全性の審査において掛け合わせの場合は詳細な審議が必要とされているものではないということ。

③は、そのほか新規性の高い内容を含まないということを条件としてございます。

ただし、一番下になりますけれども、この①から③にかかわらず、委員会が必要と認めた場合には遺伝子組換え食品等専門調査会において調査審議するということとしております。

報告は以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

一応報告ということでありますけれども、何か御質問がありましたら、この際。よろしいでしょうか。

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いたしました。

以上をもちまして、第 93 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。