

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第128回会合議事録

1. 日時 平成26年6月20日（金） 14:00～17:02

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

- ・ 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統（食品・飼料）
- ・ *Bacillus subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミラーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、宇理須専門委員、岡田専門委員、小関専門委員、橘田専門委員、
児玉専門委員、近藤専門委員、手島専門委員、中島専門委員、和久井専門委員

(食品安全委員会)

佐藤委員、山添委員

(事務局)

東條事務局次長、山本評価第二課長、池田評価情報分析官、北村課長補佐、
勝田係員、松井技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ①除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統（食品）
- ②除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統（飼料）
- ③ *Bacillus subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミラーゼ

参考資料 食品健康影響評価に係る指摘事項

- ①除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統
- ② *Bacillus subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミラーゼ

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128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います。

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、飯専門委員は御欠席とのことです。

本日の議題であります、継続の品目である、除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統（食品・飼料）、*Bacillus subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミ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います。事務局からお願いします。

○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、食品健康影響評価に関する資料、参考資料といたしまして、食品健康影響評価に係る指摘事項①と②となっております。

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、専門委員の皆様の机の上に置かせていただいております。本ファイルについては、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、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づき、必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について、御報告をお願いします。

○北村課長補佐 本日の議事に関する専門委員の調査審議等への参加に関する事項について、御報告いたします。

本日の議事に関しましては、専門委員の先生方からいただいた確認書を確認したところ、平成15年10月2日委員会決定の2の（1）に規定する、調査審議等に参加しないこととなる事由に該当する専門委員はいらっしゃいません。

以上でございます。

○澤田座長 既に御提出いただいております確認書につきまして、その後、相違等はないでしょうか。よろしいでしょうか。

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。

まず除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統についての審議を行いたいと思います。

この品目は、昨年12月の専門調査会におきまして、審議を行いまして、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につきまして、事務局から御説明をお願いします。

○勝田係員 それでは、申請者から提出されている回答書について、御説明いたします。

お手元に除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統の藤色の回答書の御準備をよろしく申し上げます。

指摘事項は全部で4つ出されております。

回答書の1ページをお願いします。指摘事項1については、申請資料中にDMOタンパク質という名称のものが全部で4つ出てきているのですが、各々のタンパク質がどの試験に用いられたものかわかりにくいので、明確化するとともに、全体を整理すること、また、改変*dmo*遺伝子についても、同様に整理することといった指摘で、整理を行う上では、以降に記載の①～⑤も含めて回答すること、といった内容になっております。

回答といたしまして、修正後要旨P.17の図におきまして、それぞれのタンパク質の説明欄に各々どの試験に用いているかを追記しております。

また、申請資料では、DMOタンパク質と呼ばれるものが4種類あるのですが、各々名称が同一のものは、付加配列の有無等もあわせ、全て同じアミノ酸配列であると回答しております。

回答書の3ページをお願いします。指摘事項1の①及び④については、まとめて回答してございます。ともに改変MON88701 DMOタンパク質のアミノ酸配列に係る指摘ですが、①につきましては、先ほども御説明いたしましたように、名称が同一のものはアミノ酸配列が同一である、との回答です。

④につきましては、ウェスタンブロット分析及びMALDI-TOF法により、9アミノ酸が切れたDMOタンパク質は存在しないといった回答になっております。

4ページをお願いします。指摘事項1の②についてですが、こちらも先ほど御説明いたしましたとおり、同一の名称を用いておりますので、付加配列の有無等もあわせ、全て同じアミノ酸配列である、との回答です。

なお書き以降には、参考として、*E.coil*を用いた改変MON88701 DMOタンパク質の作製方法が記載されてございます。

6ページをお願いします。指摘事項1の③についてですが、改変MON88701 DMOタンパク質の定義に関する指摘です。

改変MON88701 DMOタンパク質は、単量体で発現するものの、DMOタンパク質が機能するためには、三量体を形成する必要があると考察しております。このように、改変MON88701 DMOのタンパク質の機能とは、三量体を指しているとのことから、本申請資料では単量体と三量体を合わせて、改変MON88701 DMOタンパク質と定義する、と回答しております。

なお、ウェスタンブロット分析におきまして、二量体が形成されたのは、単量体の疎水性領域同士が結合したため、と考察しております。

7ページをお願いいたします。指摘事項1の⑤についてですが、DMOタンパク質が何を指すか、といった御指摘です。

回答といたしまして、DMOタンパク質と単に記載してある場合は、同タンパク質の一般

的な機能について記載している、と回答しております。

次に指摘事項2についてです。除草剤ジカンバとDMOタンパク質の反応生成物の1つである、ホルムアルデヒドに関する指摘となっております。

回答としまして、前回の要旨に記載しておりました、713ppmという数値は、食経験のない植物に関するデータであったことから、当該数値を削除するとともに、食経験のあるセイヨウナシの60ppmという数値を引用しております。

また、当該数値と比較するため、除草剤ジカンバの散布を行ったMON88701系統の6葉期及び15日後におけるホルムアルデヒドの最大濃度を算出し、比較しております。6葉期については、ホルムアルデヒドの最大濃度は33ppm、15日後については6.3ppmとなっております。食経験のある植物よりも濃度が低いこと、また、ホルムアルデヒドは植物体内ですぐに代謝される物質であることといった理由から、この数値は問題ない、という考察をしております。

9ページをお願いします。指摘事項3として、前回の申請資料の育成図において、後代分離比分析に供試した世代に係る指摘となっております。

確認したところ、分離比の分析においては、従来品種を用いた分析結果はないため、当該項目については、図から削除したと回答してあります。

併せて、文言の修正が出されておりましたが、上記の分析結果を削除したため、こちらについても、削除するといった内容となっております。

10ページをお願いいたします。指摘事項4になります。こちらは改変MON88701 DMOタンパク質の人工胃液による酸及び酵素処理に関して、原案の表現では意図がわかりにくいため、結果の意図するところを明確にした上で、適切な表現に修正すること、といった御指摘でした。

回答としまして、前回の要旨では、消化前の改変MON88701 DMOタンパク質は、凝集及び分解される、といった形で大まかに記載していた部分を、消化前の時点で改変MON88701 DMOタンパク質のバンドのほかに、4本のバンドが確認されたことを明記して、その内容が伝わるように、要旨中の3カ所の記載を修正しております。

一例といたしまして、改訂版要旨の62ページの2行目から7行目ですが、消化前の時点では、改変MON88701 DMOタンパク質のバンドのほかに、4本のバンド(約75kDa、約30kDa、約20kDa及び約15kDa)が確認されたという形で修正しております。

その他といたしまして、11ページ以降に修正事項が記載されておりますが、文言等細かな修正のほかに、18ページになるのですが、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)から承認を受けたので、その旨を追加したと記載してございます。

説明は以上になります。

○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いただきたいと思っております。

まず指摘事項1で、これは①～⑤までありますけれども、一括で、児玉先生、和久井先生、小関先生からコメントがあったようであります。

鎌田先生はいらっしゃらないので、児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 DMOタンパク質の前後にいろいろ名前がついていて、どれが何を指すのか、いま一つ不明瞭だったので指摘しましたが、今回の回答で、同じ名前のもは全て同じ構造をしていることがわかりましたので、この回答でよろしいかと思えます。

○澤田座長 ほかに、和久井先生、小関先生、いかがでしょうか。よろしいでしょうか。

○小関専門委員 私もこれですっきり理解できました。

○澤田座長 それでは、指摘事項2で、ホルムアルデヒドに関する記載についてのコメントでありますけれども、これは児玉先生からいただいたものです。

○児玉専門委員 ホルムアルデヒドについてですが、食経験のある植物での値に修正した上で、それよりも濃度が低いということと、農薬散布後に一時的に上がるものですので、それから考えても、この回答で問題はないかと考えております。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。

それでは、指摘事項3で、これは系統育成図で、後代分離比の分析の世代についてのコメントです。これは鎌田先生と小関先生からいただいています。

小関先生、いかがでしょうか。

○小関専門委員 結局、不明瞭だと申請者もわかったみたいなので、削除しましたということなので、これでしようがないというか、いいのではないかと思えます。

○澤田座長 もう一つ、T-DNAの分離様式の修正についても同じですか。児玉先生からいただいているようです。

○児玉専門委員 削除ということですので、これでよろしいかと思えます。

○澤田座長 それでは、指摘事項4に移りまして、人工胃液による酸処理に関する記載で、これは児玉先生と宇理須先生からコメントをいただいておりますけれども、いかがでしょうか。

○宇理須専門委員 記載は現象をそのまま表現しています。つまり凝集だとか、分解という言葉を除いて、現象をそのままに表現したという意味では、正確にはなったと思えます。

どうしてこういう分解と凝集になるのか、本当にそれが分解と凝集なのかということに記載していません。ウェスタンブロッティングで抗体と反応しているのだから、同じ抗原性を持っているから、すべてのバンドはそのものだろうという論理だとは思いますが、どうなのでしょう。どうしてかということろまでは、踏み込んで記載されていないので、不満は残ります。いかがでしょうか。分解されるということは事実なので、アレルギー性の評価においては許されると思えますけれども、ちょっと腑に落ちないというか、もう少し説明してもらってもいいのではないかと思いました。皆さんがこれでいいということであれば、私もよろしいです。

○澤田座長 児玉先生、いかがですか。

○児玉専門委員 今回の宇理須先生の御発言と全く同じ感想なんですけれども、タンパク質の調製の過程で4本生じたぐらいは書いてもいいのではないかと思います。そのぐらいないと、何で4本あるのかの説明もなくなってしまいます。

○澤田座長 調製の過程か、もともとワタの種の段階であるのかもよくわかりません。

○児玉専門委員 これは大腸菌でつくられていたものですね。

○澤田座長 大腸菌であれば、児玉先生が御指摘のように、一文だけ追加していただいて、後で先生方に見ていただくことにしたいと思います。

その他の修正事項で、細かいものが幾つかありますけれども、この点に関してはいかがでしょうか。何か追加でコメントございますか。よろしいでしょうか。

どうぞ。

○小関専門委員 1点だけよろしいですか。もとに戻って申しわけないんですけれども、8ページ目の13行目以降「加えて」のところで、摂取するのは種子の油であるからということが書いてあるんですが、これは場合によっては、グリッツに入ってくることもあります。上の文章で、食経験がナシに比べれば圧倒的に少ないとわかっているので、消しておいてもらったほうがいいのではないですか。油だけで評価したのかと言われてしまうと、ちょっと嫌だという気がします。上で十分だと思います。

○澤田座長 ほかに食べるものは。

○小関専門委員 グリッツとして混じってくる可能性があります。

○澤田座長 グリッツですか。

○小関専門委員 いわゆるコーンスナック菓子です。

○澤田座長 コーンスナック菓子ですか。

○小関専門委員 はい。その原料として入ってくる可能性があります。混入してしまう可能性は否定できません。

○児玉専門委員 ワタです。

○小関専門委員 そうか、ワタですね。間違えました。トウモロコシと間違えました。ごめんなさい。

○児玉専門委員 ただ、強いて油と書かなくてもいいのではないかということは、今、言われてそうだと思いますので、なくてもいいと思います。

○澤田座長 今まで油の場合には、このような考え方が書かれたことがありまして、特に削っていないようです。

○小関専門委員 わかりました。それでは、いいです。

○澤田座長 もしほかの用途が増えて、考え直さなければいけないようなことがあれば、そのときにまた考えたいと思います。

それでは、問題はないということですので、評価書（案）の審議に入りたいと思います。

事務局から御説明をお願いします。

○勝田係員 それでは、評価書（案）について、御説明いたします。

お手元の右上に「資料」と書いてある評価書（案）の冊子をお願いします。

お配りしております評価書（案）のうち、下線を引いてある箇所につきましては、以前、皆様にお送りした内容から、文言等を若干修正している箇所になります。

それでは、評価書（案）の冊子の1ページ以降をお願いします。

5ページ目になりますが、こちらに本系統の要約が記載されております。本系統は、改変ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子及びビアラフォス耐性遺伝子を導入して作出されており、これらの遺伝子が発現することで、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートを散布しても、その影響を受けずに生育できるとしております。

遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準に基づき、挿入遺伝子の安全性等について確認した結果、非遺伝子組換えワタと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかったという形にしております。

したがって、本系統につきましては、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断したと記載しております。

6ページ目をお願いします。

「I. 評価対象食品の概要」となっております。名称、性質、申請者、開発者については、記載のとおりです。

ここの文章の最後から2行目になりますが、本系統は除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートを散布しても、その影響を受けずに生育できると、概要として最後に記載しております。

同じページの「II. 食品健康影響評価」をお願いします。

第1の「1. 宿主及び導入DNAに関する事項」としまして、宿主は、アオイ科のワタ属に属するワタの商業品種Coker130としております。

「(2) DNA供与体の種名及び由来」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」についても記載のとおりで、導入方法については、改変*dmo*遺伝子及び*bar*遺伝子はアグロバクテリウム法によって、宿主に導入されたと記載しております。

「2. 宿主の食経験に関する事項」であります。綿実油及びリンターが食品として利用されております。綿実油は食用油等に用いられ、リンターはセルロースが99%以上含まれ、ソーセージ類のケーシングや増粘剤として利用されております。

7ページをお願いいたします。

「3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項」であります。こちらは(1)(2)の記載のとおりとしております。

「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」であります。こちらにも記載のとおりで、従来のワタと何ら変更がないという記載にしております。

「5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性

質に関する事項」とありますが、今回は比較対象としておりませんので、その旨を記載しております。

「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」であります。改変MON88701 DMOタンパク質、PATタンパク質を発現することが宿主との相違となっております。

以上の1~6によって、本システムは既存のワタとの比較が可能であると判断されます。

8ページをお願いいたします。

「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。改変*dmo*遺伝子及び*bar*遺伝子によってタンパク質が発現することで、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートを散布しても、その影響を受けずに生育できると記載しております。

「第3. 宿主に関する事項」であります。「1. 分類学上の位置づけ等（学名、品種名及び系統名）に関する事項」「2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項」につきましては、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」であります。ワタ種子には、ゴシポール、ステルクリン酸等のシクロプロペン脂肪酸が含まれております。ゴシポールは、単胃動物に対して毒性があり、食欲減退等の症状を引き起こします。シクロプロペン脂肪酸は、飽和脂肪酸の代謝を妨げるとの報告がありますが、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸のいずれについても、加工により著しくその量が減少すると記載しております。

「4. アレルギー誘発性に関する事項」であります。綿実油は長い間食経験を有し、アレルギー反応は報告されていませんが、コットンダストの吸入による綿肺症を引き起こすことが知られていると記載しております。

「5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項」であります。ワタには、細菌及びウイルスによる各種病害が知られているものの、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られておりません。

「6. 安全な摂取に関する事項」であります。こちらは記載のとおりとなっております。

9ページ目をお願いいたします。

「7. 近縁の植物種に関する事項」であります。日本においては、ワタ属と交雑可能な近縁植物は存在しないと記載しております。

「第4. ベクターに関する事項」になります。

「1. 名称及び由来に関する事項」であります。導入用プラスミドの構築には、ベクターBを用いたと記載しております。

「2. 性質に関する事項」ですけれども「(1) DNAの塩基数及びその塩基配列を示す事項」から「(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項」については、記載のとおりとしております。

「(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項」であります。ベクターBには、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遺伝子、ネオマイシン及びカナマイシンに対して耐性を付与する遺伝子が、それぞれ含まれております。

「(5) 伝達性に関する事項」ですが、伝達を可能とする塩基配列は含まれておりません。

「第5. 挿入DNA、遺伝子産物、並びに導入用ベクターの構築に関する事項」であります。

「1. 挿入DNAの供与体に関する事項」については、記載のとおりとしております。

10ページ目をお願いします。

「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」としております。

「(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」ですが、挿入DNAの構成要素につきましては、12ページから13ページに表1がございまして、こちらに記載のとおりとしております。

「(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」ですが、記載のとおり、こちらは全て明らかとなっております。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」ですけれども、改変 *dmo* 遺伝子についてですが、本遺伝子がコードするタンパク質は、DMOの改変タンパク質です。ジカンバモノオキシゲナーゼは、除草剤ジカンバから3,6-ジクロロサリチル酸とホルムアルデヒドを生成する脱メチル化反応を触媒する酵素であり、三量体を形成して機能します。

206行目になりますが、改変MON88701 DMOタンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無について確認したところ、相同性のある既知の毒性タンパク質は見出されませんでした。

次に *bar* 遺伝子についてですが、本遺伝子がコードするタンパク質は、グルタミン合成酵素を阻害する除草剤グルホシネートの存在下でも、グルタミン合成酵素活性を示すことができます。

216行目に飛びまして、PATタンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベースを用いて検索したところ、相同性のある既知の毒性タンパク質は見出されませんでした。

「(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項」ですけれども、ワタMON88701系統には導入されておりません。

3になりますが「(1) プロモーターに関する事項」といたしまして、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、PCISV由来のプロモーターとなっております。 *bar* 遺伝子の発現カセットのプロモーターは、*e35S*プロモーターとしております。

「(2) ターミネーターに関する事項」ですけれども、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*E6*遺伝子の3'非翻訳領域となっております。 *bar* 遺伝子の発現カセットのターミネーターは、*nos*遺伝子の3'非翻訳領域としております。

「(3) その他」についてですが、改変 *dmo* 遺伝子の発現カセットには、遺伝子発現の制

御に關与するTEVの5'非翻訳領域由来の配列が挿入されております。また、*ShkG*遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチド領域である*CTP2*標的配列も挿入されております。

*bar*遺伝子発現カセットですけれども、こちらは遺伝子発現の制御に關与する*Hsp70*遺伝子の5'非翻訳領域*Hsp70*リーダー配列が挿入されております。

「4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に關する事項」については、記載のとおりとさせていただきます。

12ページをお願いします。

「5. 構築された発現ベクターに關する事項」ですが、(1)については、記載のとおりとしております。

(2)オープンリーディングフレームが含まれていないことに関する事項であります。目的以外のタンパク質を発現するようなオープンリーディングフレームは含まれておりません。

「(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が導入用ベクター上で明らかであること」については、記載のとおりとしております。

「(4) 導入しようとする導入用ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること」であります。本導入用プラスミドは、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化されているとしております。

13ページをお願いします。

「6. DNAの宿主への導入方法及び交配に關する事項」であります。目的となる2つのカセットをアグロバクテリウム法によって宿主に導入した後、グルホシネートを含む培地で選抜して、再生個体を得ました。こちらの再生個体の自殖によって得た個体について、除草剤ジカンバ及びグルホシネートに対する耐性を評価し、ワタMON88701が得られたと記載しております。

「第6. 組換え体に関する事項」になります。

「(1) コピー数及び挿入近傍配列に關する事項」であります。ワタMON88701のゲノム中に、改変*dmo*遺伝子発現カセット及び*bar*遺伝子発現カセットが1コピー挿入されていること、また、導入用プラスミドの外骨格領域がワタのゲノム中に検出されないことが、サザンブロット分析によって確認されております。

また、本系統に挿入されたDNAの塩基配列を決定し、導入用プラスミドのT-DNA領域と比較した結果、塩基配列は一致することが示されております。

ワタMON88701の挿入DNA近傍配列と宿主ゲノムを比較した結果、DNAの挿入に伴うワタゲノムの123bpの欠失を除き、塩基配列は一致しておりました。挿入DNAの近傍配列は、ワタゲノム由来であることが確認されております。

DNAの挿入によって、宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、飛びまして14ページになりますが、307行目として、宿主の既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられております。

「(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項」ですけれども、挿入DNA領域、5'末端近傍配列及び3'末端近傍配列の接合部において、意図しないORFが生じていないことについて検索を行った結果、連続する8アミノ酸以上のORFが9個見出されました。これらのORFと既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性を確認したところ、相同性を示すようなものは見出されませんでした。加えて、抗原決定基の有無を確認したところ、既知のアレルゲンと一致するものは見出されませんでしたと記載しております。

「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」については、記載のとおりとしております。

15ページをお願いします。

「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」ですが、こちらは一日蛋白摂取量の有意な量を占めているとは考えにくいと結論づけております。

「4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項」であります、(1) (2)については、記載のとおりとしております。

「(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項」としてしております。

「① 人工胃液に対する感受性」を記載しております。

改変MON88701 DMOタンパク質についてですが、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析でも同様の結果で、試験開始後30秒以内に消化されることが確認されております。

PATタンパク質についてですが、16ページをお願いします。SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析でも同様に、30秒以内に消化されることが確認されております。

「② 人工腸液に対する感受性」であります、改変MON88701 DMOタンパク質、PATタンパク質の両者ともに、ウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後5分以内に消化されることが確認されております。

「③ 加熱処理に対する感受性」であります、改変MON88701 DMOタンパク質については、95℃以上、15分及び30分間の加熱処理でも免疫反応性が失われることが確認されており、PATタンパク質については、75℃以上、15分、30分の加熱処理で免疫反応性が失われていることが確認されております。

「(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。）との構造相同性に関する事項」であります、こちらにつきましては、80以上の連続するアミノ酸配列について、35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン等は見出されませんでした。

また、404行目になりますけれども、連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲン等と一致するものは見出されませんでした。

17ページをお願いします。

「5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項」になります。MON88701について、サザンブロット分析を行った結果、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認されております。

また、改変MON88701 DMOタンパク質とPATタンパク質の発現の安定性を確認したところ、いずれの世代においても、両タンパク質が発現されていることが確認されております。

「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」であります。

改変MON88701 DMOタンパク質についてですが、427行目になるんですけれども、ジカンバと構造が類似しているメトキシ基及びフェニルカルボキシル基を持つ5種類の化合物がDMOタンパク質により代謝されるか否かについて検討した結果、いずれの化合物も代謝されず、DMOタンパク質は植物の代謝経路に影響を及ぼさないことが確認されたと記載しております。

PATタンパク質についてですが、その反応はL-グルホシネートに特異的で、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと記載しております。

「7. 宿主との差異に関する事項」であります。17ページから18ページにかけて、(1)～(6)でいろいろな検討をしております。有意差のある項目も一部ありましたが、全て一般的なワタ品種の許容範囲の中であるから、問題ないという結果となっております。

18ページをお願いします。

「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」「10. 種子の製法及び管理方法に関する事項」については、記載のとおりとしております。

第7として、以上により、安全性の知見が得られているとしております。

「Ⅲ. 食品健康影響評価結果」としまして、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断しております。

説明は以上になります。

○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、まとめて、御意見、コメントを承りたいと思います。

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。

項目で分けないで、一括で何かありましたら、お願いしたいと思っております。

よろしいでしょうか。

それでは、先ほどの微修正以外には問題がないということです。修正案につきましては、もし細かい点がありましたら、後ほどお願いしたいと思っておりますけれども、その後で食品安全委員会に報告して、パブリックコメント等の手続に入りたいと思っております。

それでは、引き続きまして、飼料としての安全性について、審議を行いたいと思っております。

事務局から御説明をお願いします。

○勝田係員 それでは、申請者から提出されている申請書を説明させていただきます。

お手元のピンクのクリアファイルが、当該系統の飼料についての資料になるのですけれども、皆さんお手元にございますでしょうか。もしなければ、予備があります。よろしいですか。

それでは、申請資料を説明させていただきます。

1ページ目をお願いします。

「1) 品目名」であります。食品と同じく、除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統としております。

「2) 本系統の特徴」とありますが、①といたしまして、改変*dmo*遺伝子がコードするジカンバモノオキシゲナーゼを発現することによって、除草剤ジカンバに対する耐性を有するという点と、②としまして、*bar*遺伝子がコードするPATタンパク質を発現することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性を有するとしております。

以上の点を除いて、MON88701系統と宿主であるワタとの間に相違はないと考えられます。

以上のことから、検討が必要とされるのは、遺伝子の導入とそれによって新たに産生されるタンパク質に関する事項と記載しております。

「3) 本系統の使用方法」であります。飼料としての使用方法や利用目的は、従来のワタと変わりないと考えております。

飼料では主に綿実粕の形態で利用されておりますが、綿実そのものも乳牛に給与されていることがあります。

2ページ目をお願いします。

「2. 『除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統』に関する遺伝子組換え飼料としての安全性」になりますが、こちらは28行目に飛んでいただきまして、本系統は除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与させたものであることから、除草剤耐性を付与したものに分類されます。一般的に挿入された遺伝子、もしくは当該遺伝子によって産生されるタンパク質が、肉、乳、卵等の畜産物に移行することは報告されておられません。

また、遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で有害物資に変換・蓄積したり、家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質を産生する可能性は考えにくいと記載されております。

以上のことから、当該飼料を給与した家畜に由来する畜産物を摂取することにより、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性はないと考えられると記載されております。

「3. 除草剤ジカンバが残留する『除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタMON88701系統』を含む飼料を給与された家畜に由来する畜産物のヒトへの健康影響」になります。

既存のワタに除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネート耐性が付与されていることから、生育期間中に散布された除草剤がMON88701系統のリンターつき種子及び綿実粕中に残

留する可能性が考えられたということで、検討がなされております。

「① 除草剤グルホシネートについて」検討がなされております。除草剤グルホシネートの散布様式は既に認可されており、ワタに対する散布様式と同様であるため、除草剤グルホシネートの残留値は、既に認可されている除草剤グルホシネート耐性ワタと同等であることが考えられました。残留した除草剤グルホシネートは、畜産物を介してヒトの健康に影響を及ぼす可能性は極めて低いと結論づけております。

「② 除草剤ジカンバについて」検討がなされております。現在、我が国において、飼料中のジカンバの残留基準値（MRL）は設定されておられません。しかし、畜産物中のジカンバのMRLがそれぞれ設定されており、MRLを超過しない程度の残留量でなければならぬとしております。そこで、申請者は、まずMON88701系統の地毛綿実及び綿実粕における除草剤ジカンバ及びその代謝産物の残留値を測定しております。次にMON88701系統を含む飼料を給与された家畜に由来する畜産物を食するヒトの健康影響評価について考察しております。

4ページをお願いします。

21行目になりますが、米国における除草剤ジカンバの使用時期及び最大使用薬量に沿って、ジカンバ及びその代謝物の残留値が最大になると考えられる2種類の処理を行っております。

31行目に飛びますが、どちらも現行の綿実中のジカンバのMRLである3ppm未満であったという結果になっております。

5ページ目には、詳しい条件等、細かいデータが記載されております。

6ページ目をお願いします。

先の実験に続いて、5ページ目の表3の処理4に示した使用時期及び使用薬量でジカンバ散布を行った本系統を採取して、残留値を測定しております。

その結果、本系統の綿実粕のジカンバ残留量は0.11ppm、地毛綿実は0.65ppmとなっておりまして、いずれの食品のMRLである3ppmより低い値であったと結論しております。

以上のことから、本系統については、米国において登録を予定している除草剤ジカンバの使用方法に沿って、除草剤ジカンバを最大の使用量で散布しても、残留基準値を超えることはない結論しております。

次に混合飼料中におけるジカンバ及びその代謝産物が最大となる残留濃度を試算した上で、畜産物のヒトに対する健康影響を考察しております。

7ページ目の35行目になるのですが、試算した結果、綿実が最大摂取量で配合され、その綿実の全てがMON88701系統由来であると仮定した場合、綿実の全てがMON88701系統以外の綿実由来である場合と比較して、ジカンバの最大残留濃度は増加していたものの、その増加量はわずか0.62ppmであり、割合にして0.32%のみでありました。このことから、MON88701系統が混合飼料中の残留濃度に寄与する割合は、極めて低いと結論づけております。

さらに綿実が全てMON88701系統由来であると仮定した場合でも、その残留値は、現在、乳牛が飼料を通して摂取し得る最大残留濃度よりも低いとなっております。

以上のことから、ジカンバ及びその代謝産物が残留するMON88701系統を含む飼料を給与された家畜に由来する畜産物をヒトが摂取したとしても、従来の混合飼料を通じたジカンバの摂取経験と比較して、十分な安全幅をとることができると、申請者は結論づけております。

説明は以上になります。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、ただいまの申請書につきまして、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。

よろしいでしょうか。

それでは、本件につきましては、特に安全上の問題がないということですので、続きまして、評価書（案）の審議に入りたいと思います。

事務局から御説明をお願いします。

○勝田係員 それでは、次に飼料の評価書（案）について、御説明いたします。

評価書（案）の冊子の23ページ以降が、本系統の飼料に関する評価書（案）となっております。

25ページをお願いします。

「要約」についてであります。申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施しましたと記載しております。

11行目になりますが、本系統では、新たな有害物質が生成されることはないため、畜産物中に新たな有害物質が移行するとは考えられない。また、遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成される可能性は考えられないとしております。

19行目になりますが、以上のことから、安全性の問題はないと判断しております。

26ページをお願いします。

「Ⅰ．評価対象飼料の概要」でありますけれども、こちらは食品における記載と同一としておりますので、割愛させていただきます。

「Ⅱ．食品健康影響評価」についてですが、1として、遺伝子組換え作物を飼料として用いた動物の飼養試験において、挿入された遺伝子また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ことは、これまで報告されていない。

2として、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していると記載しています。

54行目になりますが、使用可能な最大量を散布したときの除草剤ジカンバの残留量について確認しております。その結果、地毛綿実及び綿実粕のジカンバの平均残留値は0.65ppm及び0.11ppmであり、日本における綿実の残留基準値である3ppmを超えることはありません。

んでした。

27ページ目、62行目になるのですけれども、以上の結果から、安全性評価を行う必要はなく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物について、安全上の問題はないと判断しております。

ただし書きといたしまして、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートで処理された飼料の管理については、我が国のリスク管理機関において十分に配慮する必要があると考えられると結論づけて、結びとしております。

説明は以上になります。

○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、コメントがありましたら、お願いしたいと思えます。

これも細かい字句の修正等がありましたら、事務局までお伝えいただければと思えます。コメント、御意見はいかがでしょうか。

それでは、コメントはありませんので、御承認いただいたということで、ありがとうございました。

食品安全委員会に御報告いたしたいと思えます。

それでは、次に*Bacillus subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミラーゼについての審議を行いたいと思えます。

この品目は、昨年5月の専門調査会におきまして、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について、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、回答書について、御説明いたします。

お手元に緑のプラスチックのファイルをお願いいたします。

1ページ目から回答書になってございます。指摘事項が12項目ございます。

1ページ目の指摘事項1になりますけれども、比較対象の添加物TS-25について、生産菌株等の情報を追記してくださいという指摘になっております。

(1)にTS-25の生産菌株の構築について、フローチャートともに説明がされております。生産菌株は*Bacillus subtilis* DN1413株で、プラスミドの状態でアミラーゼ遺伝子を宿主に導入して、作製がされています。

2ページをお願いします。

「(2) TS-25の使用経験」でございしますが、TS-25の α -アミラーゼを有効成分とします酵素製剤は、ノバミルというものになりますけれども、日本を含む世界で、15年以上の使用経験があるということです。

「(3) 酵素製剤中のTS-25含有率及びタンパク質としての純度」になりますけれども、TS-25はノバミルの有効成分でございまして、ノバミルという酵素製剤中には、約4%のTS-25が含まれます。TS-25自体のタンパク質の純度は●●●%ということで、説明がされ

てございます。

その下に表1といたしまして、今回申請がされております、添加物と従来の添加物について、比較の表がございます。

今回申請されているものは、製品名がOptiCake® Fresh、従来のものはノバミルということですが。

3つ目のカラムにございますけれども、製品中に α -アミラーゼがどれだけ入っているかということになりますが、本申請品は1%で、そのほかに賦形剤としまして、小麦粉、塩化ナトリウム、水分が●●●%ということです。従来品につきましては、有効成分の α -アミラーゼが4%になりまして、そのほかに小麦粉が●●●%、塩化ナトリウムが●●●%、水分が●●●%ということでございます。

3ページをお願いいたします。

本申請品の有効成分、NA62-7の酵素タンパク質としての純度を記載することという指摘になってございます。

こちらにつきましては、SDS-PAGE法で得られたバンドの画像解析から分析を行いまして、純度は●●●%という説明がされてございます。このバンドについて、ウェスタンブロット法によりまして、タンパク質がNA62-7であることを確認したという記載がございます。

3番目の指摘になりますけれども、耐熱性の向上について、根拠となるデータを示してくださいという指摘になっております。

3ページには分析方法が書かれてございまして、pH7.0で、50℃から90℃で、15分間加熱処理をしてございます。その後、40℃、10分間の条件で酵素活性を測定してございます。

結果につきましては、4ページの図にグラフで示されてございますけれども、●●●℃までは従来品と本申請品の酵素活性は同じですが、●●●℃では、本申請品が●●●%、従来品が●●●%ということで、本申請品のほうが、高い残存活性があるという説明がされてございます。

5ページをお願いします。

4番の指摘になりますけれども、宿主であります*Bacillus subtilis* A165 Δ 5株の添加物製造への利用経験を追記してくださいという指摘になります。

この株につきましては、プルラナーゼSP962の宿主として使われてございます。SP962は、厚生省での安全性審査が平成14年2月に終了して、官報掲載されているということです。SP962を有効成分とする酵素製剤は10年以上使われているということでございます。

5番の指摘になります。本添加物は、アミノ酸が4つ改変されておまして、先ほどの指摘事項3の回答にもありますように、耐熱性が向上していることから、アレルギー誘発性に関しまして、検討してくださいという指摘になってございます。

なお書きは、当該事項の記載位置を移動してくださいという指摘になります。

5ページが一番下から回答になりますけれども「1）挿入遺伝子の供与体のアレルギー

誘発性に関する知見」「2）遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見」について、データベースで検索をした結果、なかったという記載がございます。

「3）遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見」です。

①で人工胃液、②で人工腸液、③で加熱処理に対する感受性について、試験を追加で行ってございます。

まず人工胃液になりますけれども、7ページの上の図が人工胃液の消化性試験の結果になっておりまして、開始後1分以内にほぼ完全に消化されるということでございます。

人工腸液につきましては、7ページの下図になりますけれども、360分の処理でもほとんど消化されないということです。

8ページにまいりまして、加熱処理になりますけれども、pH7.0、90℃の条件で、15分、30分、45分間の加熱を行ってございます。こちらは、基質ありと基質なしの2通り行ってございます。基質がない条件では15分、基質がある条件では30分の加熱処理で免疫反応性をほとんど失うという説明がされてございます。

「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知見」になります。検索につきましては、以前の要旨にも書かれておりましたけれども、3行目にありますように、amyE_111を用いて検索を行ったこととなりますが、amyE_111は、NA62-7のアミノ酸配列の全体を含めまして、●●●にアミノ酸残基を●●●余分に持つORFであります。ORF検索のときに、検索により得られましたORFでございます。

この検索には、ネブラスカ大学のアレルゲンデータベースに登録された1,471種とWHO/IUISのデータベースに登録された718種を既知アレルゲンとして用いて検索を行ってございます。

9ページになりますけれども、その結果、80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンが2つ見つかっております。1つは*Aspergillus oryzae*由来のTAKAアミラーゼ、もう一つが*Aspergillus fumigatus*由来のセリンプロテアーゼです。

ここまでは以前の要旨に記載がされておりました、それに対しまして、指摘事項6、13ページになりますけれども、これにつきましては、全体の配列で相同性が低かったので、問題ないという説明がされていたところです。

ちなみに、TAKAアミラーゼは全体の比較で22%、セリンプロテアーゼにつきましては11.3%でした。

その説明について、さらに考察を求めておりまして、TS-25と野生型の α -アミラーゼのアミノ酸配列との比較を行って、4アミノ酸との相同性についても検討してくださいということと、エピトープとなります8アミノ酸について、データベースを用いて相同性の検索をしてくださいという指摘が出されております。

以降の説明は、14ページをお願いいたします。

回答になりますけれども「1）TAKAアミラーゼとの相同性について」に説明がされております。TAKAアミラーゼは、食品の加工助剤として用いられて、食経験があるという

ことです。感作につきましては、パン職人などの事例が幾つか報告されているということで、NA62-7とTAKAアミラーゼとの相同領域を調べるために、アミノ酸配列の比較を行ってまいります。

15ページの図に、このものとTS-25、TAKAアミラーゼのアミノ酸配列の比較がごさいます。こちらにありますように、 α -アミラーゼファミリーに属する酵素間で高度に保存されている触媒領域、オレンジの四角で囲ってあるところにおいて、高い相同性がありましたけれども、連続した8アミノ酸配列が完全に一致する配列はなかったということです。あと、赤い矢印が変異の4つのアミノ酸になりますけれども、こちらについて、相同性には影響していないという回答になっております。

15ページの2) がセリンプロテアーゼとの相同性についての考察になります。

16ページの図にアミノ酸配列の比較がなされております。

セリンプロテアーゼについては、吸入による感作がされておまして、16ページの図の下のほうに緑の枠がありますけれども、緑の枠のように、エピトープ領域が同定されているということでごさいます。エピトープ領域とNA62-7との相同性はないということと、変異の4つのアミノ酸について、相同性に影響はしていないという説明がなされております。

16ページの(2) になりますけれども、連続した8アミノ酸についての相同性検索がなされております。

17ページの7の指摘の上になりますけれども、結果といたしましては、連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンはなかったということでごさいます。

17ページの7をお願いいたします。こちらはORFとトキシンとの相同性についての指摘になります。データベースについて、WHOのトキシンデータベースを網羅しているか報告してくださいということと、不適切であれば、適当な手法を用いて検索を行ってくださいということでごさいます。

(1) にデータベースについて検討した結果がごさいます。当初、Uniprotのトキシンデータベースで行ってございましたけれども、今回、米国のローレンス・リバモア国立研究所のMvirデータベースを用いることを検討してごさいます。以前のUniprotデータベースよりも、今回のMvir データベースのほうが、薬剤耐性遺伝子が発現する酵素や病原性細菌が発現する全てのタンパク質を含んでいるということで、こちらを用いて検索をし直してごさいます。

18ページをお願いします。

(2) に結果が示されてごさいます。その結果、①に示されておりますように、109個のタンパク質が*cat*遺伝子またはその相同遺伝子だったということですが、生産菌株のMDT121では、*cat*遺伝子は欠乏しているため、機能することはないとされております。

「② NA62-7との相同性を示すタンパク質について」でごさいます。表に7個タンパク質が示されてごさいますけれども、同じものがありますことから、4つのタンパク質の毒性について考察がされてごさいます。

19ページをお願いします。

1つ目のZinc metalloproteinaseについては、黄色ブドウ球菌由来で、プロテアーゼとして感染経路にかかわっているということをごさいますけれども、アミノ酸配列の比較によって、活性に必要な領域はないので、プロテアーゼとして働くことはないという説明がされてごさいます。

2つ目につきましては、このタンパク質が人間及び動物に害を与えるという報告はないということです。

3つ目になりますけれども、こちらは類鼻疽菌の鞭毛の構成タンパク質でありまして、それ自体毒性は持たないということです。

最後のものにつきましては、B群連鎖球菌が生産する毒性物質は、既に同定されておりますけれども、 α -アミラーゼファミリープロテインが毒性を示すという報告はないということで、この相同性により検出されたタンパク質は、それ自体毒性を持つものとは考えにくいという考察がされてごさいます。

21ページをお願いいたします。こちらはRB143株に*amyM62.7*遺伝子を導入している図について、正確に記載をしてくださいという指摘になります。

22ページが修正された図になります。

23ページに正しい説明が追加されてごさいます。

飛びまして、27ページをお願いします。

指摘事項9になります。こちらは、製造過程におきまして、pH調整剤と発泡防止剤を添加する工程を明記してくださいという指摘になります。

こちらは指摘事項11に関連しますので、後ほど詳しく説明しますが、まずpH調整剤につきましては、製剤化の前の濾過後の工程で使われておりますので、発酵工程の製造原料からは削除されてごさいます。

また、27ページの一番下にごさいます発泡防止剤ですが、これは●●●と記載されておりますけれども、これは●●●に含まれるということをごさいます。

28ページの10の指摘になります。こちらは組換え体の残存に関する実験で、記載のキットでは、染色体DNAを調製できないことから、確認をしてくださいという指摘になってごさいます。

当初、申請書に書かれておりましたキットは間違えだということで、ゲノムDNA抽出用キットである、FastDNA®SPIN kitに記載が修正されてごさいます。

「(2) 生産菌の有無の確認方法」につきましても、29ページの第7-3の青字のように記載が修正されてごさいます。

次に指摘事項11になります。29ページの真ん中辺です。第8の安全性試験には、PPY29413という試験バッチが使われてごさいますけれども、こちらについて、 α -アミラーゼの純度、不純物の含有量等の成分について、最終産物と比較して説明してくださいということをごさいます。

30ページにフロー図がございまして、PPY29413というのは、ステップ5の除菌濾過1を濃縮して、試験バッチとしたものでございます。

先ほどの指摘事項9にありました、pH調整剤と発泡防止剤につきましてですが、まず発泡防止剤はステップ2のところで添加されますので、この試験バッチに含まれます。pH調整剤はステップ7のところで添加されますので、この試験バッチには含まれていないこととなります。

29ページに戻っていただきまして、この最終製品はOpticake® Freshというものになりますけれども、この製品について、説明がされてございます。Opticake® Freshという酵素製剤につきましては、本 α -アミラーゼ（NA62-7）が1%、そのほか、小麦粉、塩化ナトリウム、水が入っているということと、酵素の活性値が1グラム当たり50SDMUでございまして。

30ページをお願いします。

最終的な酵素製剤には、NA62-7が1%含まれるということが、酵素活性の値から算出がされてございます。

フロー図にありますけれども、Opticake® Fresh中のNA62-7以外の成分については、先ほども申しましたが、賦形剤である小麦粉、塩化ナトリウムが安定化剤として添加されるということでございます。

31ページをお願いします。

「(2) PPY29413の成分について」の説明になります。PPY22413中の成分につきましては、総有機固形分が10.7%と算出されてございます。その内訳といたしましては、酵素タンパク質のNA62-7が約●●●%、それ以外の酵素原料の残存物、糖類などが●●●%ということで、計算がされてございます。また、水分が89.3%です。PPY29413 1グラム当たりの酵素活性値は●●●SDMUと算出されてございます。

i) になりますけれども、先ほどの●●●%の説明がされておりまして、これは酵素活性値からの計算になります。

ii) になりますけれども、NA62-7以外の成分につきましては、●●●%の有機固形分が含まれておりますが、主に製造原料由来の残存物でございます。

31ページの一番下の行になりますけれども、発泡防止剤が用いられておりまして、PPY29413中では、●●●mg/kgであることを確認しているということでございます。

(3) ですが、最終製品と試験バッチのPPY29413の成分を比較してございます。PPY29413は、約●●●%の α -アミラーゼのNA62-7と、そのほか●●●%の有機固形物を含むということございまして、最終製品と比べまして、製造原料の残存物等の有機固形物をより多く含むということでございます。

「(4) 動物試験にPPY29413を被験物質として用いる理由」が記載されてございます。酵素につきましては、活性値で流通をしてございまして、TOS値を用いることが理にかなっているという説明がされてございます。TOS値と動物試験から、酵素製品のマージンを

計算しますという説明がされてございます。

33ページの指摘事項12になります。こちらは、13週間の毒性試験において、最高用量で認められた所見を毒性影響と評価して、無毒性量を中用量の33%としていますが、その設定根拠について説明されていないので、考察を行ってくださいということと、TS-25で同様の毒性試験があれば、その結果と比較をしてくださいという指摘になってございます。

34ページをお願いします。

試験実施機関へ再考察を求めて、その結果の回答がでございます。腎臓の絶対重量と補正重量に有意差があったということと、白血球数が有意に減少していたというのが、この所見になってございます。

最高用量群については、明らかに検体投与の影響があったということですが、病理組織学的な所見はなく、ほかにも意義のある所見は得られていないことから、有害性ではないと考えられるという考察がされてございます。

3) で下顎リンパ節の腫脹についても考察がされてございますけれども、アレルギーの誘発性が示唆される場合には、ほかのリンパ節でも腫脹ですとか、形質細胞の明らかな増加が見られることが予測されますが、この試験ではそのような変化はないことから、検体投与の影響はないという結論は、妥当だという説明がされてございます。

「4) 結論について」は、この考察をもとに、最初の報告書では、中用量をNOAELとしておりましたが、最高用量をNOAELと考えるということが記載されてございます。

36ページにまいります。こちらは文言の修正をあわせて行いましたということです。

37ページの「(2) TS-25の毒性試験結果について」に記載されておりますけれども、混餌投与の13週間の試験の結果でございます。その結果ですけれども、最高濃度50,000 ppmで混餌投与をしても、毒性学的意義のある所見はなかったということでございます。

37ページからは、その他の修正事項があります。

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、項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思えます。

指摘事項1で、TS-25に関する情報の追記につきましてでありますけれども、コメントを出されました澁谷先生がいらっしゃらないので、代わりの先生で、何かコメントがありましたら、お願いしたいと思えます。

どうぞ。

○中島専門委員 *Bacillus*のバクテリアに関しては、このぐらいの情報を寄せていただければ、どんな菌なのかわかりますので、これぐらいで十分だと思います。恐らく澁谷先生もそのようにおっしゃると思えます。

○澤田座長 ほかに追加でなければ。よろしいでしょうか。

指摘事項2で、NA62-7の純度を記載すること。これは宇理須先生のコメントです。

詳細なデータは別にあって、ウェスタンブロットで物のピークが同定されていると思

ます。

○宇理須専門委員 この程度でいいのかどうかあれですけれども、いいのではないかと思います。この程度の純度でいいかと思います。

○澤田座長 よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項3で、耐熱性に関する説明を追加してほしいということで、これも澁谷先生がいらっしゃらないのですが、●●●℃と●●●℃では変わらなくて、●●●℃だけで耐熱性が変わっている。これが最初から出ていれば、劇的な変化ではないという印象でした。変化があることは間違えありません。製品としては価値があるそうですけれども、これはいかがでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項4で、A164Δ5株の利用経験を追記すること。これは児玉先生のコメントです。

○児玉専門委員 利用経験について記載されていますので、これでよろしいかと思います。

○澤田座長 それでは、指摘事項5で、アレルギー誘発性に関するデータを追加してほしいというところでもあります。これは回答書の5ページから13ページです。とりあえずそこまで、コメント、御意見がありましたら、お願いしたいと思います。これは宇理須先生と手島先生、事務局からコメントをいただいています。

○宇理須専門委員 人工胃液に対して不安定だというのはいいと思うんですけれども、人工腸液に関しては、安定だという結果が報告されています。

あと、耐熱性ですけれども、これは90℃でしかやっていないので、90℃だけで不安定だと言っていいのかというのは、ちょっと引かかると思います。酵素活性で見ると、●●●℃ではなくなって、●●●℃でTS-25よりも、NA62-7は耐熱性が強くなっておりまので、そういう意味で、90℃だけでいいのかというのは、少し議論があるのではないかと思います。

もう一つは、耐熱性をうたっている酵素なんです。耐熱性が増すことによって、製品価値を上げようという酵素なので、そういう意味でも、もう少し詳しいデータが要るのではないかと思います。

そうすると、消化酵素で、人工胃液に関しては不安定なのでいいんですけれども、腸液に対して安全だということと、ひょっとして、これが耐熱性のある物質だということになりますと、少し慎重な扱いをしなければいけないと思いました。

6番の他のアレルゲンとの相同性というところも加味して、少し検討する余地がある物質だと思いましたけれども、いかがでしょうか。

○澤田座長 手島先生はいかがですか。

○手島専門委員 アレルギー性を調べてくださいということで、4つの項目についてやられているということでは、それを満たしていると思うんですが、宇理須先生がおっしゃられたように、1つ、人工胃液ではすぐに消化されるということと、人工腸液で残ることがあるんですが、その後、加熱、耐熱性なんですけれども、温度を上げていったとき

に、アレルギー性のあるものは、温度を高くしても安定であるということで、100℃前後で見てもらうということは、以前にもあったと思うんですが、そういう意味では、90℃で見ているので、熱に対して抗原性が下がるというところは示されていると思います。実際にこの酵素がどれぐらいの温度で使われるかというところもあるとは思うんですが、酵素の性質として、温度が上がれば、抗原性が下がるということは示されていると思いました。

○北村課長補佐 この酵素の使用方法ですが、パン・ケーキ等の老化防止で使われるということなので、添加をしてから、高い温度になります。

○手島専門委員 それを使った後は、また温度を上げて、かなり高い温度にするということなんですか。

○北村課長補佐 パンやケーキなので、もっと高い温度になろうかと思えます。

○手島専門委員 現実的に高い温度で使われているということであれば、熱に対しての免疫性が落ちるということは、示されていると思います。

○澤田座長 これは小麦粉に混ぜて、その後、オーブンで焼くわけです。その途中で●●●℃ぐらいがクリティカルで、そこで効くか、効かないかの差で、パンのできがよくなる。そういう話らしいです。耐熱性自身は、対照の酵素と大きく変わっていないようですので、余り問題ないと思います。

あと、胃液で壊れるけれども、腸液で壊れないというのは、ほかにもいろいろありまして、事実としてはしょうがない。

この点に関しては、特に追加でデータを出してもらわなくてもいいように思いますが、いかがでしょうか。

○宇理須専門委員 もうちょっと詳しいデータがあったものもありましたね。実際にパンを焼いて、熱を加えたら、どれだけ免疫反応性を保った物質が残っていたかという、実際の加工の過程で、どれだけ残っていたかということ調べたものがあったような気がします。できることなら、これは●●●℃、●●●℃と、温度を見るべきではないかと思いました。

○澤田座長 ただ、最終的には100℃を超えるわけです。実際に使う温度としては。

○宇理須専門委員 これは未処理だと免疫反応性はあるわけですがけれども、いきなり十何分で落ちていきます。途中のものがないと、本当はきちんと測定できているかという点も気になります。これはサンドイッチELISAか何かでやったんだと思いますけれども、加熱処理のときは、結構難しいという印象があります。ドーズディペンデントに、熱処理の温度で落ちていっているのかどうかも気にはなります。

○澤田座長 加熱処理は、特に全部落ちなくても、どういう傾向があるかが見られれば、よろしいのではないかと思います。

○宇理須専門委員 実際にこれはパンなどに入れて、ヒトの口から入っていく物質そのものですから、そういう意味では、慎重な対応が必要ではないかという気がします。

○池田評価情報分析官 1つ教えていただいていたいいですか。これは加熱をされて、分解さ

れるのであれば大丈夫という御議論になっているのか、あるいは胃液で分解されるところを見ると、ある程度落ちない形で入っていても大丈夫という御議論なのか、教えていただいてよろしいですか。

○澤田座長 いろいろなデータを総合して考えることになっています。

免疫反応性に関しては、エピトープが耐熱性の場合もありますので、必ずしも全部落ちない場合もあるので、それだけで判断することではないと思います。

それから、食品の場合はかなり厳しいことを要求しておりますけれども、これは添加物なので、実際に使われる量は非常に少ないという安全マージンがありますので、食品と同じように、必ずしも考える必要はないと思います。もし耐熱性の変化とアミノ酸の変異がなければ、ここまで詳しいデータは要求されなかったわけでありますので、そこも考慮してもよいかと思えます。

○北村課長補佐 すみません。説明が漏れていたのですが、この製品の改良の目的は、パンやケーキに使用するためなのですけれども、もともとのアミラーゼにつきましては、でん粉糖を作る目的でも使われます。そこで加熱がどれぐらいされるかは、確認ができません。

○澤田座長 加熱で免疫反応性が落ちる場合は、それはそれでいいとして、必ずしも落ちない場合もあるので、ほかの性質も考慮して考えるというスタンスだと思っております。

先ほどおっしゃったように、指摘事項6も一緒に考えないといけないということでありますので、指摘事項6も先にやっていきたいと思えます。

指摘事項6に関しましては、澁谷先生と手島先生からコメントをいただいておりますけれども、まず手島先生いかがでしょうか。

○手島専門委員 指摘事項6は2つの質問になっていて、まず最初は、80アミノ酸の35%以上では相同性が認められたんですけれども、全体の配列の比較では相同性が低いと結論されている。80アミノ酸で35%以上の相同性が認められたことについて考察を行うこととあるんですけれども、これに関しては、15ページにあるんですが、今回のものがNA62-7で、アミノ酸に改変する前のものがTS-25、TAKAアミラーゼがその下にありまして、NA62-7とTAKAアミラーゼで比較をしたときに、アミラーゼの保存領域があって、その部分をとったときには、相同性が35%以上見られたということだと思います。

ただ、NA62-7の改変された4アミノ酸との影響についてなんですけれども、改変されたアミノ酸は赤の矢印で示されているんですが、矢印のところが変わっているんです。アレルゲンとして知られているTAKAアミラーゼとの相同性には影響していないということでありまして、そういう意味では、4つのアミノ酸が改変されたことで、TS-25よりも、さらに相同性が上がったということではないので、この説明でよろしいかと思いました。15ページの一番下に書かれていることになります。

2番目は、エピトープとなり得る連続した8アミノ酸について、データベースを用いた相同性検索を行うこと。また、改変された4アミノ酸部分との相同性について、あわせて考

察を行うこととありまして、それが16ページからの説明になるわけですが、17ページの7行目ぐらいから、連続する8アミノ酸配列が完全に一致する条件において、NA62-7と既知のアレルゲンの相同性検索を行った結果、NA62-7と連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかったとあります。従いまして、エピトープとなりうる連続した8アミノ酸も存在しないということで、アレルギー性が従来のものに比べて上がるということは、特に心配しなくてもいいのではないかと思います。この回答でいいと思います。

以上です。

○宇理須専門委員 これはTAKAアミラーゼと比較をしているわけですから、変わらないということを証明してほしいと思います。例えば耐熱性に関しても、酵素活性に関しては、TAKEアミラーゼと比較をして、余り変わらないと言っているのに、耐熱性に関しては、TAKAアミラーゼを比較対象にはしていないとか、あるいはエピトープには入っていないというんですけれども、むしろ変異が入ったことによって、逆にその部分がエピトープになる可能性はあるわけですから、十分な説明がなされていないという印象を持ちます。

もう一つは、耐熱性をうたっているのに、耐熱性がないという表現は、矛盾しているような気がします。

○澤田座長 耐熱性はわずかにあるのですが、強くはない。うたっているほどの耐熱性ではないのです。

○北村課長補佐 すみません。補足なんですけれども、16ページの図がセリンプロテアーゼのアミノ酸の比較になっておりまして、こちらで緑の枠で囲っているところが、セリンプロテアーゼのエピトープ領域でございます。

○澤田座長 TAKAアミラーゼのエピトープはわかっていないのですか。

○手島専門委員 はっきりとはわかっていないと思います。

○澤田座長 TS-25とNA62-7ですが、TS-25はかなり長い使用経験があって、NA62-7の使用経験はまだ4年ぐらいです。今のところは、問題となる報告はないみたいです。4つアミノ酸が変わっていることから問題が起きているのか、よくわからないのですけれども、耐熱性変化もそんなにドラスティックではないようで、立体構造も微妙に変わっているぐらいだと、推測ですが、考えることは可能だと思います。

○松井技術参与 先ほどちょっと出ました耐熱性を持つエピトープということで、(2)のエピトープとなり得る連続した8アミノ酸、この検索が耐熱性を持つエピトープの種類を含んでいれば、熱耐性エピトープがなかったということにならないでしょうか。教えてくださいたいと思います。

○澤田座長 アレルゲン性のあるエピトープではなかったのですね。

○手島専門委員 そうですね。

○松井技術参与 それでは、解釈としては違うんですね。

○澤田座長 もしTAKAアミラーゼのエピトープがわかっていたら、多分説明できたはず

なのですけれども、わかっていないようで。だから、未知のTAKAアミラーゼのエピトープがあることが否定できていない。

○手島専門委員 ただ、連続した8アミノ酸で一致する部分はないということなので、そういう意味で、TAKAアミラーゼの未知のエピトープがあったとしても、8残基連続した一致がなかったということは言えます。通常8残基のアミノ酸の連続したものでの一致がなければ、エピトープの可能性はかなり低いという考え方だと思います。

○澤田座長 よろしいですか。

○中島専門委員 TAKAアミラーゼと確かに相同性でヒットはしているけれども、TAKAアミラーゼのアミノ酸配列と8アミノ酸が連続でヒットしているところはないので、たとえTAKAアミラーゼでアレルギーのある人であっても、これでヒットすることはない。今まで受け入れられてきた考え方は、ここでも適用できると思います。

○宇理須専門委員 8アミノ酸はTAKAアミラーゼと比較したのではなくて、セリンプロテアーゼとやっているんです。

○手島専門委員 既知のアレルギーのデータベースを用いて8アミノ酸が連続で一致する部位があるかどうかを調べてあります。

○澤田座長 TAKAアミラーゼ等とは比較しているんですね。8個ずつ並べてね。

○手島専門委員 はい。

○北村課長補佐 あと、TAKAアミラーゼとの相同性についても、15ページの図でアミノ酸を並べて比べておまして、8連続アミノ酸の一致はないということです。

○宇理須専門委員 読み方がわからないんですけれども、セリンプロテアーゼのところで「ー」が入っています。これは一緒という意味ではないんですか。

○松井技術参与 「ー」はギャップです。そこはアミノ酸が抜けてないということです。

下の*は相同ということです。

○北村課長補佐 NA62-7とTS-25とが一致しているところが「ー」になっているように思います。

○澤田座長 セリンプロテアーゼのほうは、かなり違って、エピトープもずれているから問題ないだろう。

それから、TAKAアミラーゼとの相同性については、8個連続で一致するところはない。

○宇理須専門委員 TAKAアミラーゼとは8個連続してませんか。TAKAアミラーゼとは一致するんですね。

○松井技術参与 一致しないです。

○澤田座長 微妙にずれているようです。

○宇理須専門委員 これはセリンプロテアーゼとは一致しないのかもしれませんがね。

○松井技術参与 どちらもしないんです。

○北村課長補佐 連続していないんです。

○宇理須専門委員 これは8個連続しているところが何カ所かありますね。

- 北村課長補佐 *の青字が一致しているところになるんですけども、連続で6個ぐら
いはあるんですが、8個連続はないかと思えます。
- 澤田座長 TAKAアミラーゼの図で、上から7段目の赤い印の左側の6個が一致していま
す。それ以外、懸念はほとんどないだろうと。ここだけ懸念があるかもしれません。
- 宇理須専門委員 前回も同じようなものがありましたね。アミラーゼみたいな酵素だっ
たと記憶しています。パンに入れて加熱したら、どれだけ残っているかというものです。
あれはOKになったと思いましたがけれども、あれと同じような基準で見ればいいと思いま
す
- 松井技術参与 グルカノですか。
- 宇理須専門委員 あのとときもエピトープがどうかとありました。
- 松井技術参与 これですか。これは前回審議しました。
- 宇理須専門委員 これでしたか。エピトープが出ているから、もういいのではないかと
したものが1つあったような気がします。
- 松井技術参与 1つずつアミノ酸を見ていったものですか。あれは何でしたか。
- 澤田座長 よく覚えていませんが、別のアミラーゼだったと思います。
- 宇理須専門委員 アミラーゼか、ほかの酵素か、とにかくパンの中に入れるものです。
テクスチャーを変えるために入れる酵素がありましたね。違いましたか。
- 澤田座長 1つだけよろしいですか。TS-25とTAKAアミラーゼは、懸念がある部分が同
じです。だから、その点ではいいだろうということもできるかと。
- 松井技術参与 宇理須先生、ありました。
- 北村課長補佐 以前、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの評価をいただ
いたときにも、TAKAアミラーゼと当たっているものがありまして、そのときにも、アミ
ノ酸の比較をして、変異が導入されたことで、35%以上の相同性がふえるかどうかとい
うことで、検討がされておりました。
- 松井技術参与 1つずつアミノ酸をずらして、見ていったものです。ところどころで35%
以上になったものがあって、それがエピトープとずれていたというものです。
- 北村課長補佐 これよりも、もうちょっと詳しくやっていたね。
- 宇理須専門委員 その消化酵素はどうですか。
- 北村課長補佐 これと同じで、胃液では1分以内で、腸液では6時間でも消化されないとい
うことです。
- 松井技術参与 加熱は80℃です。
- 中島専門委員 もう一つ、これは4カ所アミノ酸が変わっているんですが、4カ所変わっ
たアミノ酸のうち、2カ所については、TAKAアミラーゼとの相同性が減る方向で変わっ
ていて、あとの2つは全然違う変わり方をしている。要するに今回出てきたNA62-7がだめと
いうことであれば、その比較対象の従来品のほうがもっとだめということにもなるので、
少なくとも比較対象の従来品に比べて、こちらのほうが、アレルギーが高いとは見えない

んですか。

○宇理須専門委員 変異の程度が低いということですか。

○中島専門委員 はい。その変異もTAKAアミラーゼから遠ざかるほうに変異していると見えます。

○宇理須専門委員 むしろセリンプロテアーゼに近いほうが危ないわけです。セリンプロテアーゼがアレルギーとして問題になっているので、セリンプロテアーゼに近づくほうが、むしろ危ないということになるのではないですか。

前のときの手法をもう一回見直して、たしかデータベースレベルでの検索で答えが出て、解決したような気がしました。

○勝田係員 当時の申請資料を持ってきます。

○澤田座長 時間がありませんので、先にいって、後でまた戻るということでよろしいですか。

○宇理須専門委員 はい。

○澤田座長 指摘事項7で、ORFの問題と対象にしたデータベースがこれでいいかという問題ですけれども、これは鎌田先生のコメントで、いらっしゃいませんので、ほかにコメントはいかがでしょうか。

1つだけ気になるのは、これがバクテリアを中心にしたデータベースで、ほかの生物を含んでいるのか、含んでいないのか、よくわからない点が問題だと思っています。要は下等動物の毒素が入っていないかもしれないというだけで、そんなに数は多くないと思いますが。

小関先生、どう思いますか。

○小関専門委員 これでいいのではないかと思いますけれども、普通にやるとしたら、そんなに当時のデータベースは特殊なものではなくて、植物のときにも、それほど、こういうデータベースということによってきて、それで、それでは足りないということを言った覚えはなかったような気がするので、彼らはちゃんとやっているから、いいのではないかと思います。

○澤田座長 いかがですか。

○児玉専門委員 4つのアミノ酸の置換が入っていて、その前の先行品は既に認可されていて、今回、毒性タンパク質の比較が、E-Valueが0.2以下という基準で考えますと、もしこれでだめとなってしまうと、先行品もだめだと自動的にになってしまう可能性がかなり高いと考えられますので、この程度やっていただいていますので、これでよろしいのではないかと考えます。

○澤田座長 ほかに御意見はありますか。

よろしいということですね。

指摘事項8で、挿入DNAの宿主への導入に関する図を適切に修正すること。これは児玉先生と私ですが、先生いかがですか。

○児玉専門委員 構築の仕方がプルラナーゼのものに改変する形で入っていましたので、その形で修正されていますので、これでよろしいかと思えます。

○澤田座長 私もこれでよろしいかと思えます。

それでは、指摘事項9で、pH調整剤等を添加する工程を明記すること。これは和久井先生と私がコメントしておりますけれども、和久井先生、何かありますか。

○和久井専門委員 これはこれでよろしいかと思えます。

○澤田座長 私も、pH調整剤の話は、情報としてはこれでよろしいと思えます。

あと、修正した後の概要の2ページの図1が、TS-25の製造の概略となっていますけれども、これはNA62-7の概略と全く同じなので、ついでにTS-25及びNA62-7の概略と入れておいていただいたほうが良いと思えました。後のほうで、NA62-7の製造の概略はどこにも書いてありません。

指摘事項9に関しては、それだけであります。

よろしいでしょうか。

指摘事項10は、第7-2の組換え体の残存でありまして、適切なデータを提出して、生産菌の有無の確認方法について説明をすることとあります。これは回答書の28ページから29ページであります。これは飯先生のコメントでありましたけれども、きょう御欠席で、特に御意見はいただいてないですね。

○勝田係員 事務局に事前のコメント等はいただいておりません。

○澤田座長 ほかの先生方、いかがでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 飯先生の指摘の主だったところは、使ったキットはプラスミド用で、ゲノム用になっていないということでしたので、そこは修正されていると思えます。

あと、確認の有無についても、形態と酵素生産性と孢子非形成性を見ておりますので、これでよろしいのではないかと思えます。

○澤田座長 ほかになければ、これでよろしいかと思えます。

それでは、指摘事項11、第8の安全性試験でありますけれども、これはPPY29413が用いられていることから、最終産物であるNA62-7と比較して、説明することという御指摘です。これは和久井先生のコメントです。

○和久井専門委員 これで内容はわかりませんが、ちょっとわからないので、教えていただきたいんですけども、小麦粉が多量です。小麦粉の影響というのは、全くないんでしょうか。

○澤田座長 安全性試験に使ったものはPPY29413で、実際の最終的な製剤は小麦粉が入っているということです。ですから、小麦粉が入ったものよりも、その前のものを動物試験の対象にしたほうが良いだろうと、彼らは考えたものと思えます。

賦形剤として小麦粉というのは、その前の製剤でも使っていますので、よく使うのではないかと思えます。

これはこれでよろしいですか。

それでは、次の指摘事項12で、13週間の反復投与毒性試験の無毒性量の設定根拠について、毒性試験結果の総合的評価、考察を行うことということです。和久井先生、御意見はいかがでしょうか。

○和久井専門委員 結果からいいますと、新たな試験を求めているわけではございません。過去の安全性の試験をもう一回細かく説明してくださいという意味だったんですが、回答書では、過去に実施した安全性試験の報告書の結果を再考察して、内容を違った形で直しています。医薬品ではありませんが、本件はGLP基準で試験をしておりますので、このように最終報告書を変えた場合には、試験責任者（SD）による最終報告書の訂正書と、信頼性保証者の信頼性保証書を添付していただくべきと考えます。これは試験結果を総合的にSDの方が考察して、NOAELを設定しているんですけども、NOAELを変えているんです。変えている以上は、訂正書と信頼性保証書を添付していただかないと、筋が通らないところがあります。

○澤田座長 その前にNOAELとNOELですけれども、一番高い用量がNOAELとは言い切れないと思います。

○和久井専門委員 通常の試験では、最高用量は毒性が出る量に設定するのが通常です。

○澤田座長 だから、もとに戻していただいて、全く影響が出ないのは2番目の用量で、それと比較して、セーフティーマージンが十分にあるという説明をしていただければ、問題はないと思います。

○和久井専門委員 はっきり言いますと、そうなんです。確かに細かいことを言い出しますと、切りがないんですが、個人的には、先ほどから出ているアレルギーの問題で、リンパ節が腫れている動物が多く認められています。回答書では「他のリンパ節でも腫脹及び形質細胞の明らかな増加がみられることが予測されるが、本剤ではそのような変化がなく」と記載していますが、そんな結果は報告書の中にはどこにもありません。観察しているのは、腸間膜リンパ節だけで、他のリンパ節の検討は行っていません。プラズマサイトーシスを起こしていますので、アレルギーが起きていないとは言い切れないところがあります。

総合的な判断として、前回の試験結果を変える必要性はなかったし、なぜ変えたのか。変える以上は、ちゃんと訂正書を出してくださいということです。

○澤田座長 指摘事項を出したので、対応しないといけないととった可能性があります。

○和久井専門委員 指摘したから変えなければいけないというのは、申請者によほど自信がないことになります。

○澤田座長 指摘事項が理解されなかったようですね。

○和久井専門委員 はっきり言うと、そうだと思います。今、ここに過去の別件に関する書類があります。この案件では、最終報告書を変えた場合には、訂正書、陳述書、信頼性保証の証明書を出しています。

○澤田座長 これは海外の受託機関が、報告書自身を変えているわけではなく、追加のものを出したんですね。

○和久井専門委員 出していません。

○澤田座長 出していないのですか。

○和久井専門委員 はい。

○澤田座長 もともとの資料を変えないで、それを使って、再考察していただければいいのですね。

白血球とリンパ球と好酸球、白血球系の細胞が有意に落ちているというデータが最高用量でありましたので、それを完全に有害性がないと言うのは難しいと思いますので、0.37の用量は有害性がない用量と考えて、セーフティマージンがそれでもまだ十分にあると書き直していただければ、それでいいと思います。

それから、担当者には、GLPのことは非常に大事なことなので、よく言っておいていただければと思います。

よろしいでしょうか。

○和久井専門委員 はい。

○澤田座長 それでは、指摘事項5と指摘事項6に戻りまして、アレルギーの誘発性について、いかがでしょうか。

○宇理須専門委員 前はシクロデキストリンという酵素を扱っておりまして、このときに8個の連続はなかったんですけれども、35%以上の相同性を示すという、非常に類似したものがあつたわけですが、何をやったかという、35%の相同性が比較対象よりもより強くなっているかどうか。強くなっていない、あるいは変わらなければいいのではないかという論理でやったんです。

○松井技術参与 そうですね。変異を入れたことに対してです。

○宇理須専門委員 それと同じような見方をすれば、35%相同性で問題があるかどうかを判定する1つのメルクマールになるのではないかというやり方をしています。それと同じようなことをすれば、35%相同性というものの1つの回答になるかもしれませんけれども、そういう意味では、変異を入れて、TAKAと比較するのはTS-25です。TS-25とこのものを比較すればいいということです。変異が4カ所で、むしろ先ほどおっしゃったように、違っている箇所が2カ所一緒で、2カ所違うんです。だから、計算すればいいんです。多分より離れていくだろうと思います。ただ、TAKAと比較すると、違うということですね。

○松井技術参与 はい。

○宇理須専門委員 TAKAと比較すると、TS-25と変わらないか、むしろ低くなる可能性があるということです。全体で見ると何パーセントになるか、一度、計算すると思います。前はそうやって、35%をクリアしたようです。

○松井技術参与 変異を入れたことにより、変異を入れた場所を含めて、相同性が上がっているのかどうかをシクロデキストリンでは調べた。今回はアライメントによって、変異の箇所に相同性の箇所が含まれているのかどうかということで見えて、趣旨は前回と同様であるとは思われます。

あと、シクロデキストリンの加熱試験の件ですが、温度は1点、80℃だけで、経時的に見ていまして、今度は90℃の1点のみで見ているということです。

○澤田座長 どうぞ。

○手島専門委員 あと、ペプシンとか、人工胃液での分解が早いということがありまして、胃液で分解されるかということは、アレルギー性の1つの判断にすることが多いんですけども、そこがクリアされているということです。

それから、加熱性の試験をやられているということと、35%で80アミノ酸が相同だった場合でも、変異を入れたことにより、より相同性が強くなることはないということから、ウェート・オブ・エビデンスという立場では、アレルギー性の上昇は考えられないという考え方でよろしいかと思います。

○宇理須専門委員 35%相同性がありましたというだけではなくて、記述の仕方を変えていただけるといいですね。

○手島専門委員 そうですね。

○宇理須専門委員 前回のものは、1つ参考になるのではないかと思います。

○澤田座長 理論的な書きぶりは直していただいて、それをチェックしていただくことでよろしいでしょうか。

○手島専門委員 14ページの一番下の部分「導入された4つのアミノ酸置換はTAKAアミラーゼとの相同性に影響していない」と書かれていますが、そこをもう少し詳しく書いていただいて、TS-25と比較したときに、アミノ酸の置換がTAKAアミラーゼと離れるような状況になることを含めて、少し変えていただければと思います。

○澤田座長 あと、具体的には4カ所の変異がありまして、その変異がどういうふうに動きうるかということをも、もう少し詳しくということですね。

○手島専門委員 そうですね。相同性からです。

○澤田座長 どうぞ。

○小関専門委員 先ほど北村さんがおっしゃっていたことはあると思うんですけども、要するにシロップをつくる时候にも使えるわけですね。結局、アミラーゼとして、申請者から買った会社がどう使うかは、その人の勝手ということがあります。そうすると、耐熱性、熱で壊れる、壊れないだけの議論でやっていくのは、危険ではないか。シロップづくりに使われる可能性があります。

それと、4カ所入れたということで、しかも、耐熱性が少し上がっていると書いてありますけれども、彼らの一番大きな目的は、これはスクロース耐性を付与しているので、4つのうちのどれかは、その辺に効いているようなところがあると思います。そこまで詳しく聞く必要はないと思うんですけども、耐熱性とか、そこに固執するよりも、先ほどおっしゃられたように、胃ですぐに分解されるということ、リサーチの上でも、問題があるものはないということをあれして、きちんと書いてもらうほうがいいのではないかと思います。

○澤田座長 それでは、また説明を見ていただくことにします。

私も気になっていたのですけれども、スクロース耐性の話が、情報としてどこにも書いてないようです。それはちょっと説明を加えていただいたほうがよろしいですか。

○小関専門委員 その辺はどうですか。製品の特質という意味でいったら、彼らは当然データを持っていると思います。既存のTS-25に比べると、こうですというものは、データを持っていると思うので、付記してもらえれば。簡単に出るのではないのでしょうか。

○澤田座長 よろしいですか。

○北村課長補佐 スクロース耐性が上がりますという記載あるんですけども、確かにデータの的にそれが示されたものは見たことがないので、それを加えるということですね。

○小関専門委員 申請者としては、それを売り文句にして、各会社さんに売っていくわけですから、そのデータを持っていないはずはないので、聞けばすぐに出てくると思います。

○北村課長補佐 わかりました。

○澤田座長 余り長大な追加をしていただく必要はなくて、概略を簡略に追加していただくことでいいと思います。

○北村課長補佐 従来の添加物との比較のところ、追加をする形でよろしいですか。

○小関専門委員 そうですね。

○北村課長補佐 わかりました。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

それでは、情報を追加するというところで、安全性上の問題はないということですので、評価書（案）の審議に入りたいと思います。

事務局から説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、お配りしております、食品健康影響評価に関する資料の29ページ目からが、このアミラーゼの評価書（案）になります。

めくっていただきまして、34ページをお願いします。

こちらに「Ⅰ．評価対象添加物の概要」を記載してございます。

品目は記載のとおりです。

用途といたしましては、グルコース重合体の α -1, 4結合の加水分解を触媒し、主にマルトースを生成させる酵素である。パンの老化防止及びハイマルトースシロップ等のでん粉糖の製造に使用されると記載してございます。

申請者と開発者は、記載のとおりです。

29行目が本添加物の概要になりますけれども、 α -アミラーゼの品質を高めるために、*Bacillus subtilis* A164Δ5株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* C599株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子と*B. licheniformis* ATCC9789株由来の分泌シグナル配列を融合させた*amyM62.7*遺伝子を導入して作製したMDT121株を利用して生産された α -アミラーゼであるとしております。

「Ⅱ．食品健康影響評価」になりますけれども、第1の1に従来の添加物について記載が

あります。

「(1) 名称、基原及び有効成分」になりまして、**TS-25**としております。

「(2) 製造方法」ですけれども、*Geobacillus stearothermophilus* C599株を生産菌として用い、培養工程、濾過等の製剤化工程を経て製造されるということと、生産菌は2回の除菌濾過により、分離・除去されるとしております。

「(3) 用途及び使用形態」といたしましては、先ほどの概要と同じでございますけれども、グルコース重合体の α -1, 4結合をエンド型で加水分解し、主にマルトースを生成される酵素である。パンの老化防止のため、パン生地に添加されたり、でん粉からマルトースやハイマルトースシロップ等のでん粉糖を製造するために用いられるとしております。

35ページで「(4) 摂取量」を記載してございますけれども、最終段階で高温により失活するという事実と、1日摂取目安量について計算した値をTOS値で書いてございます。

すみません。記載ミスがございまして「**Substance**」ではなくて「**Solids**」が正しいので訂正いたします。申し訳ございません。

「2 宿主及び導入DNA」につきましては「(1) 宿主の種名(学名)、株名等及び由来」でございますけれども、宿主が*Bacillus subtilis* A164 Δ 5株で、こちらは5つの遺伝子が欠失された株でございます。

「(2) DNA供与体の種名、株名又は系統名等及び由来」は、記載のとおりです。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」になりますけれども、*amyM62.7*遺伝子は、改変 α -アミラーゼ遺伝子と分泌シグナル配列からなりまして、 α -アミラーゼを発現します。

ここも記載ミスでございまして、申し訳ございません。「遺伝子導入用ベクターに組み込まれた後、二重交差相同組換えにより宿主の染色体に挿入された」。

「3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料」ですけれども、*Bacillus subtilis*は、長期にわたり食品や食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験があるとしております。

「4 宿主の構成成分等に関する資料」については、記載のとおりになります。

「5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」になりますけれども、NA62-7で、有効成分は α -アミラーゼでございます。

36ページをお願いします。

「(2) 製造方法」につきましては、従来品と同様の記載をしてございますが、MDT121株を生産菌として製造されるとしております。

「(3) 用途及び使用形態」については、従来の添加物と変わらないということです。

「(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較」については、耐熱性とスクロース耐性が向上しているとしております。

「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等の相違点」になります。

組換え添加物と従来の添加物の相違点ですけれども、アミノ酸が4個置換され、従来の添加物と比較して、耐熱性とスクロース耐性が向上している点である。

「(2) 組換え体と宿主」になりますけれども、改変 α -アミラーゼ遺伝子を含む *amyM62.7* 遺伝子が導入され、 α -アミラーゼ産生性を獲得している点であるとしています。

以上1~6により、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、第2以下の各事項について評価を行ったとしております。

「第2 宿主に関する事項」になります。

「1 分類学上の位置づけ(種名(学名)・株名等)に関する事項」は、記載のとおりで、*Bacillus subtilis*の食経験と使用経験について、記載をしております。

「2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」になりますけれども、有害生理活性物質を生産するという報告はなく、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ーレベル1に相当するとしております。

37ページをお願いします。

「3 寄生性及び定着性に関する事項」「4 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項」「5 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項」については、記載のとおりです。

「第3 ベクターに関する事項」になりますけれども、遺伝子導入用ベクターの作製には、プラスミドpDG268が用いられたとしております。

「2 性質に関する事項」ですけれども「(1) DNAの塩基数及びその塩基配列を示す事項」。

「(2) 制限酵素による切断地図に関する事項」。

「(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項」。

「(4) 薬剤耐性に関する事項」になりますけれども、アンピシリン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれております。アンピシリン耐性遺伝子は、宿主の染色体には導入されません。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は、宿主に導入された後、部分欠失され、薬剤耐性の機能が失われるとしております。

「(5) 伝達性に関する事項」「(6) 宿主依存性に関する事項」を記載しています。

38ページにまいりまして「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」になります。

「1 挿入DNAの供与体に関する事項」につきましては、*amyM62.7* 遺伝子は、改変 α -アミラーゼ遺伝子と分泌シグナルペプチドをコードするDNAから構成されます。改変 α -アミラーゼ遺伝子の供与体は *Geobacillus stearothermophilus* C599株で、分泌シグナルペプチド配列の供与体は *Bacillus licheniformis* ATCC9789株でございます。

「(2) 安全性に関する事項」については、記載のとおりです。

「2 挿入DNA又は遺伝子(抗生物質耐性マーカーを含む。)及びその遺伝子産物の性

質に関する事項」になります。

「(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」でございます。改変 α -アミラーゼ遺伝子は、*Geobacillus stearothermophilus* C599株の α -アミラーゼ遺伝子の塩基配列に基づき、成熟型タンパク質をコードする領域をクローニングした後、耐熱性及びスクロース耐性を高めるために塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子であり、従来の α -アミラーゼと比較して、4個のアミノ酸が置換されている。また、*amyM*遺伝子中の分泌シグナルペプチド配列を*amyL*遺伝子の分泌シグナルペプチド配列に置きかえて、この遺伝子を構築した。

「(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」。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」でございます。214行目から、先ほど御議論いただきましたアレルギーについて記載をしております。

「(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見」でございますけれども、*Geobacillus stearothermophilus*のアレルギー誘発性に関する報告はない。

39ページにまいりまして「(2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見」ですが、NA62-7を有効成分とする酵素製剤及びこの菌由来の α -アミラーゼについて、アレルギー誘発性を示唆する報告はないとしております。

「(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見」です。

「① 人工胃液に対する感受性」。試験開始後1分以内に消化されることが確認された。

「②人工腸液に対する感受性」で、試験開始後360分後においても、消化されないことが確認された。

「③加熱処理に対する感受性」ですが、pH7.0、90℃の加熱処理により、基質非存在下では15分間、基質存在下では30分間で免疫反応性が消失することが確認されたとしております。

「(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知見」になりますけれども、相同性検索の結果、連続する80以上のアミノ酸配列について、35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンが2個見出された。1つはTAKAアミラーゼで、 α -アミラーゼファミリーに保存されている触媒領域にNA62-7と高い相同性が見られたが、連続する8アミノ酸が完全に一致する領域はなかった。他の1つは、セリンプロテアーゼで、エピトープ領域も同定されているが、エピトープ領域にNA62-7と高い相同性はなかったということ。なお、4個のアミノ酸置換は、これらの相同性には影響していなかったとしています。

抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見出されなかった。

257行目から、以上のことから、総合的に判断し、NA62-7に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。

40ページにまいりまして「3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」になります。

(1) でプロモーター、(2) でターミネーター、(3) でその他ということ、SD配列と *cry3A stab*配列を付加したということに記載してございます。*cry3A stab*配列は、殺虫活性を示すタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域に存在する配列であり、タンパク質をコードする領域は含まれないとしております。

「4 ベクターの挿入DNAの組込方法に関する事項」になりますけれども、プラスミド pDG268に、pUB110に由来するカナマイシン耐性遺伝子を組み込み、*amyE5*及び*amyE3*'配列の間に、プロモーター配列等を挿入することによって、遺伝子導入用ベクターが作製されたとしています。

「5 構築された発現ベクターに関する事項」になりますけれども、(1) は塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項、(2) はオープンリーディングフレームの件についてでございます。

292行目からになります、遺伝子導入用ベクターの *amyE*遺伝子5'末端側領域及び *amyE*遺伝子3'末端側領域に挟まれた領域のみが、宿主の *amyE*遺伝子座に挿入される。最終的に宿主に導入される遺伝子発現カセットを含む断片と、*amyE5*'及び*amyE3*'の合計5,280bpについて、オープンリーディングフレームの検索を行った。

41ページにまいりまして、その結果、連続する10アミノ酸以上のORFが272個見出されたということと、ヒットしたTAKAアミラーゼとセリンプロテアーゼについて、記載をしてございます。

抗原決定基の有無について、304行目から記載をしております。

ORFと毒素タンパク質の相同性につきましては、新たに行ったMvirDBを用いた、E-Value0.2を指標として検索を行った結果を記載しております。

(3) の意図する挿入領域については、遺伝子導入用ベクターの *amyE5*及び*amyE3*配列に挟まれた *amyM62.7*遺伝子発現カセットとクロラムフェニコール耐性遺伝子を含む領域であるとしております。

目的外の遺伝子の混入がないように、構築されています。

「6 DNAの宿主への導入方法に関する事項」につきましては、相同組換えによりまして、*amyM62.7*遺伝子を宿主に導入し、クロラムフェニコール耐性及び α -アミラーゼ活性により選抜をした。さらにクロラムフェニコール耐性遺伝子を欠失させ、MDT121株を得たとしています。

「7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」ですが、導入用ベクターには、アンピシリン耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子が存在するが、宿主の染色体には導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子については、宿主に導入された後、部分欠失させるため、生産菌はクロラムフェニコール耐性を示さないとしています。

「第5 組換え体に関する事項」です。

「1 宿主との差異に関する事項」については、NA62-7を生産する点で宿主と異なるとしております。

42ページにまいりまして「2 遺伝子導入に関する事項」です。

「(1) 制限酵素による切断地図に関する事項」「(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項」につきましては、第4-5-(2)のとおりとしております。

「第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項」です。

「1 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること」につきましては、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であり、製品規格については、JECFA及びFood Chemical Codexの食品酵素規格に適合していることから、有害性はないと考えられる。

「2 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること」でございますが、製造原料は食品または食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

第7の「1 諸外国における認可、食用等に関する事項」でございますが、2009年から欧州において販売されている。そのほか、オーストラリア、ブラジル、中国等においても、食品添加物として認められており、製パン・製菓用及びでん粉糖製造用酵素として使用されている。

「2 組換え体の残存に関する事項」ですが、サザンブロット分析によりまして、NA62-7の精製前の試験サンプルには、組換えDNAが残存しないことが確認されたとしています。

「3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」「4 精製方法及びその効果に関する事項」を記載しています。

43ページにまいりまして「5 含有量と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」があります。

第8に変異原性と亜急性毒性試験に関するデータを記載してございます。被験物質については、先ほどのPPY29413ですけれども、NA62-7の製造過程における除菌濾過後の培養液を濃縮したものが用いられているとしております。

「(1) 遺伝毒性試験」ですが「①復帰突然変異試験」「②小核試験」の結果を書いております。

「(2) 13週間ラット反復経口投与毒性試験」になりますが、先ほど御議論いただきましたように、回答書の修正が必要ということですので、407行目からについては、修正させていただきたいと思っております。

「Ⅲ. 食品健康影響評価結果」になりますけれども、今のところ「・・・・」にしてございますが、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。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

○池田評価情報分析官 すみません。ちょっと補足させていただいてよろしいですか。

○澤田座長 どうぞ。

○池田評価情報分析官 今、第8のところ、変異原性と亜急性毒性試験については、第2から第7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となっているんですが、もしこの表題の下に書くんだとすると、第7までの事項で安全性の知見が得られていない部分がないといけないことになってしまうので、もしそうでなければ、その他か何かの事項にしたほうがいいと思っているんですが、そこもあわせて御意見をいただければと思います。

○澤田座長 第8の書きぶりは、今まで統一されていないところがありまして、食品の場合、最近は参考になっているのですね。

○北村課長補佐 前回、御審議いただいたものは、参考ということで書いています。

○澤田座長 第2から第7までで懸念があって、念のためにやった場合には、一応その旨を書いて、要らないけれども、データとしてある場合は参考になっているのですね。

○北村課長補佐 参考の情報ですが、以前、御評価いただいた6- α -グルカノトランスフェラーゼというものがあるんですけども、その場合は、第7-3の確認のためということで、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項の確認のため、動物試験をやったという書きぶりにしています。

○澤田座長 今の書きぶりは、要らないけれども、念のためということですね。

○小関専門委員 そうだと思います。

○澤田座長 それでよろしいですかということですが、いかがでしょうか。

これからのこともありますので、書きぶりは、事務局にお願いいたします。

○北村課長補佐 御判断としては、必須ではないということではよろしいですか。

○澤田座長 必須ではないけれどもということです。

○北村課長補佐 安全性が確認ができなかったから、要るというものではないということですね。

○澤田座長 はい。

全体を通しまして、コメント、御意見がありましたら、お願いしたいと思います。

41ページの304行から306行は、前の記述と重複しているところがありますので、上の表現を変えれば、要らなくなると思います。相同性があるのは、既に述べたTAKAアミラーゼとセリンプロテアーゼ以外はなかった。それで切ってしまうといいと思います。

細かい修正、記載整備等につきましては、修正箇所を事務局までお伝えいただければと思います。

ほかに何かコメントはありますか。よろしいでしょうか。

それでは、何点か説明を加えることがありましたので、事務局で修正したものを先生方にごらんいただいて、直した後で、食品安全委員会に報告して、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

それでは、議題（1）につきましては、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、私から報告があります。

3月の専門調査会で審議しました、ステアリドン酸産生ダイズMON87769系統については、申請書等の修正の指摘を出したところであります。この品目の取り扱いについては、御担当の先生に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。指摘に基づきまして、修正されましたことが確認されましたので、評価書(案)を食品安全委員会に御報告いたしました。現在、パブリックコメントの募集が終了したところと聞いております。

私からの報告は以上であります。

ほかに事務局から何かありますでしょうか。

○北村課長補佐 特にございませぬ。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、本日の議題については、これで終了とさせていただきます。

以上をもちまして、第128回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。熱心な御討議、どうもありがとうございました。