

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第132回会合議事録

1. 日時 平成26年11月19日（水） 14:00～16:01

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

・ *Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼ

・ GLU-No.6株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、岡田専門委員、小関専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、

手島専門委員、中島専門委員、飯専門委員、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 *Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼ

② GLU-No.6株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム

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132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。

本日は所用によりまして、宇理須専門委員と近藤専門委員が御欠席とのことです。

本日の議題であります、新規の品目である「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼ」、「GLU-No.6株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム」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、配布資料の確認を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。

資料といたしまして、食品健康影響評価に関する資料となっております。

そのほか、机上配布資料といたしまして、宇理須専門委員からのコメントと、もう一つ、添付資料9不純物プロファイルクロマトグラムというものを配布させていただいております。こちらのほうは2つ目のグルタミン酸ナトリウムの御審議のときに見ていただきたいと思っております。

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、委員の皆様の上机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に回収させていただき、次回また配布します。

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、相違等はないのでしょうか。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、「*Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼ」についての審議を行いたいと思います。

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、お手元に黒いプラスチックのファイルをお願いいたします。こちらが *Aspergillus oryzae* NZYM-SP株を利用して生産されたアスパラギナーゼの申請資料となっております。

2枚めくっていただきますと「はじめに」という紙がございますので、若干このアスパラギナーゼについての説明をさせていただきます。

アスパラギナーゼは添加物、酵素になりますけれども、アスパラギンの加水分解を触媒しまして、L-アスパラギン酸とアンモニアを生成させる酵素でございます。

アスパラギンはじゃがいもや小麦などのデンプンを主成分とする食品に含まれておりまして、こういった食品を高温で加工した際に食品中のL-アスパラギンとブドウ糖などが反応をしまして、食品中にアクリルアミドが生成されます。

アスパラギナーゼを食品に添加することによりまして、その中に含まれるL-アスパラギンの含有量を減らすことができまして、その結果、最終製品中のアクリルアミドの量を低減することができるというものでございます。

次のページをご覧くださいなのですが、こちらに従来の添加物について記載がされてございます。比較対象としますアスパラギナーゼは *Aspergillus niger* ASP-72株を由来としたものになってございまして、こちらのアスパラギナーゼにつきましては、こちらの調査会で御審議をいただきまして、セルフとして昨年9月30日付で評価結果を通知したのになってございます。

今回申請されておりますアスパラギナーゼにつきましては、添加物でも評価が必要ということで、別途、厚生労働省から添加物としての評価依頼がされ、添加物専門調査会でも並行で審議をしているところでございます。ちなみに一昨日に添加物専門調査会で審議がなされております。以上が概要です。

1ページの従来の添加物のところからお願いいたします。先ほど申しましたように、こちらのアスパラギナーゼを比較対象としておりまして、名称、製造方法、用途、摂取量については記載のとおりになってございます。

2ページに宿主の説明がございまして、宿主につきましては、*Aspergillus oryzae*のBECh2株になってございます。図1にフロー図がございまして、*Aspergillus oryzae*のIFO4177株、これは野生株になりますけれども、アミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ、これらの3つの遺伝子を欠失させまして、さらに突然変異でシクロピアゾン酸の産生能を欠失しまして、コウジ酸の合成機能を低減したものがこの宿主の株となっております。

第1-2、DNAの種名、供与体等になります。目的となる遺伝子のアスパラギナーゼ遺伝子ですけれども、この *asnA0* 遺伝子の供与体は先ほど申しましたように、IFO4177株でございます。

そのほか、選択マーカー遺伝子としまして、*URA3* 遺伝子と *amdS* 遺伝子が導入されてご

ざいます。

次のページに導入方法が記載されてございますけれども、導入用プラスミドを用いて宿主のほうに導入がされております。

第1-3、*Aspergillus oryzae*が生産するアミラーゼやプロテアーゼなどはアルコール、水あめ、果汁、醸造、製パンなどの食品分野で長年にわたって使用されているということと、菌自身はコウジ菌としまして、発酵食品に広く用いられているということでございます。

宿主の構成成分につきましては、この宿主の菌株ではシクロピアゾン酸の産生能が失われておりまして、コウジ酸産生が低減、 β -ニトロプロピオン酸の産生量が少なくなっているということでございます。

本組換え添加物につきましては、アスパラギナーゼが有効成分ですが、以降、AoASPと表記がされてございます。

4ページ、製造方法につきましては、図2に示されているフローのとおりになってございます。生産菌につきましては、2度の除菌、濾過、膜サイズ0.2 μ mですけれども、これで分離除去されるということでございます。

図2のステップ5の右側で濃縮、試験バッチという記載がございまして、この試験バッチにつきましては、後ほど出てきます安全性試験や生産菌の残存、アレルギーの試験のところで用いられてございます。

4ページの下のように用途等がございまして、アクリルアミドの生成を低減させる加工助剤として使用されまして、アスパラギンと還元糖が高温で反応することによりまして、アクリルアミドが生成されますので、食品の加熱加工の前に添加がされるということでございます。図3のように、このアスパラギナーゼは●●●℃以上で5分間の加熱処理によって失活するというところでございます。

有効成分の性質及び従来の添加物との比較になります。有効成分はアスパラギナーゼでございまして、性質につきましてはアスパラギンを加水分解して、アスパラギン酸とアンモニアを生成する反応を触媒する酵素ということでございます。

6ページ、従来の添加物との相違点になります。表1のように従来の添加物と本添加物について比較がされてございます。

図4にアミノ酸配列が示されてございます。こちらに記載はないのですけれども、この添加物の最初の19アミノ酸につきましては、分泌シグナルであるということを知ってございます。

7ページ、宿主との相違点につきましては、アスパラギナーゼを大量発現する点で宿主と異なるということでございます。

8ページ、こちらが宿主に関する事項になります。この菌株につきましては、図1に出てきましたように、野生株のIFO4177株の夾雑酵素の遺伝子、アミラーゼとアルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼですけれども、これらを欠失させまして、そのほかにシクロピアゾン酸、コウジ酸の産生能を低減しているということでございます。

表2にございますように、この野生株IFO4177株、または宿主のBECh2株につきましては、食品用の酵素として利用されているということでございます。安全性に懸念を生じるような報告等はこれまでないということが記載されてございます。

9ページ、第2-2の病原性等につきましては、宿主につきましては、*Aspergillus oryzae*がアスペルギルス症に関連する可能性がある事例があるということでございますけれども、これはまれな場合でありまして、一般的に非病原性の微生物ということでございます。また、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のリスク分類の1ということでございます。したがって、この宿主は非病原性であると考えられるということでございます。

有害生理活性物質につきましては、コウジ酸につきましては紫外線照射による突然変異により低減されてございまして、含有量を測定しました結果、検出限界未満になったということです。β-ニトロプロピオン酸につきましては、検出限界0.6mg/kg未満であったということです。シクロピアゾン酸につきましては欠失がされておりまして、産生しないということでございます。

10ページ、アレルギー性につきまして説明がされてございまして、文献を検索しましたところ、表3にございますように、5～12までの文献がヒットしたということでございます。このうち参考文献の9ではヘミセルロースの記載がありますけれども、α-アミラーゼに関するものだというところでございます。

申請者としましては、これは実際の食物アレルギーの事例を示しているものはないということで、*Aspergillus*由来の酵素の経口摂取による感作の可能性は低いと考えると結論してございます。

12ページ、寄生性、定着性、外来性のウイルスに汚染されていないことに関する事項について記載がございまして。

そのほか、近縁種の病原性有害生理活性の生産に関する事項になりますけれども、近縁種の病原性につきましては、*Aspergillus*属で*Aspergillus section Fumigati*に属します*Fumigatus*は日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られてございます。

そのほか、近縁種につきましては、アフラトキシンを産生するものが4種類ほどございますけれども、*Aspergillus oryzae*につきましては、ほとんどの菌株におきまして、アフラトキシン生合成遺伝子が転写機能を失っているということと、この宿主の株につきましては、アフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログが欠落しているということが遺伝子解析によって確認されてございます。添付資料10で示されてございます。

13ページ、「第3 ベクターに関する事項」につきましては、pUC19ベクターを使っております。

15ページ、第4で、挿入DNA等に関する事項になります。供与体につきましては、こちらに記載があるとおりでございます。マーカーとして使いました*URA3*遺伝子につきましては、*S. cerevisiae* FL100株由来です。*amdS*遺伝子につきましては、*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株由来でございます。

16ページ、こちらは安全性に関する事項になってございます。*A. oryzae*につきましては、宿主と同じですので、先ほど御説明したとおりでございます。*S. cerevisiae*につきましては、有害生理活性物質を生産することは知られていないということと、パン酵母やアルコール発酵用酵母として安全に使われてきた長い歴史があるということです。

*A. nidulans*につきましては、食経験は特に知られていないということですが、この導入プラスミド全体が同定されましたORFの中に既知のアレルゲン、既知のトキシンの同一性のあるものはなかったということが確認されているということと、選択マーカー遺伝子として長年使われてきた実績があるということでございます。安全性審査が終了していません遺伝子組換えの添加物でありますリパーゼ、グルコアミラーゼにも使われているということでございます。

次に、第4-2になります。

まず、クローニング方法につきましては、*asnA0*遺伝子につきましては、野生株のIFO4177株からクローニングされたものでございます。この塩基配列につきましては、野生型の遺伝子の塩基配列と同じということでございます。

17ページ、*URA3*遺伝子と*amdS*遺伝子について記載がでございます。

第4-2-（2）で、図6にそれぞれの挿入遺伝子の塩基数と制限酵素による切断地図が記載されてございます。

18ページ、挿入遺伝子の機能に関する事項になります。

まず、*asnA0*遺伝子になります。この遺伝子から発現いたしますアスパラギナーゼについては、アレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はないということでございます。

以下、①で人工胃液、②で人工腸液によります消化性が調べられております。

①の人工胃液ですけれども、試験バッチは先ほどの製造工程のフロー図の試験バッチを使っております。こちらはSDS-PAGEの分析しか行われていませんけれども、0.25分以内で消化されるということが記載されてございます。ただ、一番小さいところで14.4kDaとなっております。

19ページ、人工腸液に関する感受性の試験が行われてございます。こちらの試験サンプルは最終製品であります、アスパラギナーゼの製剤を使っております。こちらは2.5分以内に消化されるということが示されてございますが、先ほどと同様、SDS-PAGEしか行われておらず、一番小さいマーカーのところは14.4kDaとなっております。加熱による免疫反応性の変化については、今のところは資料の提出はされてございません。

次に、19ページの真ん中辺の*URA3*遺伝子になります。こちらは大腸菌を用いまして、この導入プラスミドを調製の際に選択マーカーとして用いられたものでございます。安全性につきましては、これはマーカーとしましては長年使われてきておりまして、この遺伝子が導入されております遺伝子組換え微生物は食品用酵素の生産菌として用いられているということでございます。

*amdS*遺伝子につきましては、導入プラスミドを宿主の菌株に挿入する際の選択マーカー

一として用いられているものでございます。安全性につきましても、選択マーカーとして長年使われていた実績があるということでございます。アレルギー誘発性や毒性を有するとは考えにくいということでございます。

第4-3にまいりまして、プロモーターに関する事項が記載されてございます。*asnA0*遺伝子のプロモーター、次に*URA3*遺伝子のプロモーター、21ページにまいりまして、*amdS*遺伝子のプロモーターに関する記載がございまして。

次に、ターミネーターに関する記載がございまして。それ以外には、発現制御に関する塩基配列は組み込まれておりません。

ベクターへの導入遺伝子の組み込み方法につきましては、構築されました導入のプラスミドでありますpCaHj621をベクターとして用いております。

22ページの図9に導入プラスミド制限酵素の地図と、表4に構成要素が記載されてございます。

第4-5・(2)になりまして、ORFにつきましては、図9にございまして導入プラスミド全体についてORFの検索がされてございます。

23ページ、開始コドンから終止コドンまでの10アミノ酸以上の領域をORFと定義しまして検索を行ったところ、95個のORFが検出されてございます。これについて相同性検索を行ってございます。

①になります。アレルゲンにつきましては、i. で、80アミノ酸で35%以上の既知アレルゲンの検索、そのほかに連続する8アミノ酸が完全に一致する条件の既知アレルゲンの検索が行われてございまして、いずれも相同性のあるORFは見出されなかったということでございます。

トキシンにつきましては②になりまして、MvirDBデータベースを用いて検索が行われてございます。その結果が25ページの表5に示されてございます。この相同性を示したタンパク質につきまして、23ページのほうから、それぞれ検討がされています。

以上、それぞれ検討しました結果、既知のアレルゲン・毒性タンパク質と相同性のあるものは存在しないと考えるということでございます。

26ページ、導入される領域につきましては、導入用プラスミド全体でございまして。このプラスミドにつきましては、目的以外の遺伝子の混入がないように純化されているということでございます。

宿主への導入方法になりますけれども、プロトプラスト形質転換法によりまして、導入プラスミドを環状のまま宿主に導入されてございます。染色体に導入されたものだけが菌体内で維持されまして、この方法によりまして、導入プラスミドのいずれかの位置を末端としまして、染色体上の任意の位置に多コピーがタンデムに染色体に導入されると考えられるということでございます。

抗生物質耐性マーカー遺伝子については、使われていないということです。

27ページ、宿主との差異に関する事項になります。目的遺伝子と選択マーカー遺伝子

を含む導入プラスミド全体が宿主に導入されておりまして、AoASPを大量に発現するという点で宿主と異なるということでございます。

次に、遺伝子導入に関する事項になります。遺伝子導入には環状のプラスミドを用いております。このプラスミドが染色体のどの位置に導入されたかを調べるために、全ゲノムの解析が行われてございます。その結果、内在性のものと導入遺伝子は●●●番染色体上にあるということがわかったということでございます。

この導入された遺伝子につきましては、機能未知の遺伝子の5'末端に近接する位置に導入されてございまして、導入されたプラスミドの5'側の末端は、このベクター上の塩基番号●●●番、3'側は●●●番の位置ということで、導入された位置はわかっておりますけれども、導入領域全体の配列を解読することはできなかったということです。導入領域全体が解読できなかった理由は、多コピーのプラスミドがタンデムで染色体に導入されているためと考えられるということでございます。

30ページに染色体上のプラスミドの推定図が示されておりまして、真ん中のところに約●●●コピーとありますが、この部分は読めなかったということです。そのため、この*asnA0*遺伝子のコピー数を推定するためにサザンブロット分析が行われてございます。

28ページの図10にプローブの図がございまして、このプラスミドでは2つの制限酵素を使いますと、1.5 kbのものが検出されますが、内在性のものは2.3 kbということでございます。

結果が29ページの図11に示されてございまして、そのバンドの濃さから約●●●コピー入っていることが推定されたということが示されてございます。

31ページ、こちらでORFの検索を行ってございます。3'末端の近傍配列1,327 bpと5'末端の近傍配列2,535 bpとの接合部の塩基配列で検索が行われてございます。ORFは開始コドンから終止コドンまでの10アミノ酸以上の領域と定義をしてございます。検索に用いた塩基配列の位置は図10と書いてありますが、30ページの図12でございまして。

近傍配列では、それぞれ3'末端で37個、5'末端で29個のORFがありまして、こちらについて既知のアレルゲンとトキシンのとの同一性について検討がされてございます。

その結果、先ほどの発現ベクターのORF検索で得られたもの以外に、挿入によって新たに生じた接合部を含みます5個のORFが検出されてございますけれども、いずれも既知のアレルゲンと既知のトキシンのとの同一性はなかったということでございます。

このものにつきましては、導入領域全体の配列が解析できなかったということで、第8に示してありますように、安全性試験によって安全性を確認することにしましたという記載がございまして。

32ページの第6になります。製造原料、製造器材の使用実績につきましては、この製造に用いられます発酵原料や精製・濾過助剤、安定化及び製剤化原料を含む全ての製造原料はどれも食品への使用が認められた品質のものであるということでございます。器材につきましても、食品用酵素の製造に長年安全に使用された経験があるということござい

す。製造原料、製造器材等について、詳しい説明がされてございます。

33ページ、製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に長年安全に使用された実績を持ちまして、製造原料は食品への使用が認められた品質のものであるということが記載されてございます。

34ページ、第7のうち、諸外国における認可、食用等に関する事項になります。

本添加物につきましては、2007年の販売が開始されまして、諸外国で使用されているということでございます。

デンマークにおきましては、SCFガイドラインに準拠した酵素剤としまして承認を受けて使用されているということでございます。

米国におきましては、2006年11月にFDAの届出GRASリストに収載されたということでございます。

JECFAにおきましても、2007年6月にその製造、使用に問題ないと判定されたということでございます。

なお書きにありますように、欧州では2008年に公布されました新たな欧州会議・欧州理事会規則によりまして、食品に加工助剤として用いられます酵素につきましては、EUの定める規制の対象になったということで、このものについても申請がなされておりまして、現在、EFSAで審査がされているということでございます。

次に、組換え体の残存に関する事項になります。ドットプロット解析によりまして、確認がされてございます。このサンプルは試験バッチのPPV24743になります。

35ページに結果が示されてございまして、DNAが残存しないことが確認されたということでございます。検出限界は20ng/gでございます。

36ページ、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項が記載されてございます。表6のほうに試験バッチの分析値とFCC、JECFAの規格値との比較がされております。このものはその規格値を満たしているということでございます。

37ページ、精製方法等につきましては、生産菌の培養物は固液分離、除菌濾過等の精製工程を経て製剤化されるということでございます。先ほど示されておりますように、FCCやJECFAの基準を満たしているということでございます。

次に、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つきましては、組換え技術で構築された生産菌でありましても、生産される生産物の構成・成分の変動の範囲は、従来の酵素剤の変動の範囲でありまして、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられるということでございます。

38ページの第8で、安全性試験に関する事項になります。表7にこの試験バッチのPPV24743とアスパラギナーゼ製剤の比較がされております。TOS、アスパラギナーゼ活性、比活性、含有率、タンパク質純度等でございます。

「1. 遺伝毒性」としまして、微生物を用いる復帰突然変異試験が行われてございます。

39ページに結果になりますが、代謝活性化の存在下及び非存在下にかかわらず、変異原

性を示さなかったということでございます。

(2) で、ヒト末梢血リンパ球を用いる染色体異常試験が行われておりまして、こちらのほうもヒト末梢血リンパ球において染色体異常を誘発しないと結論したということでございます。

2番で、ラットを用いました13週間反復投与毒性試験が行われてございます。投与量は最高用量0.88 g TOS/kg 体重/日ということでございます。10mlの本添加物を強制経口投与したものでございます。

40ページに結論がございますように、無毒性量については最高用量の0.88 g TOS/kg 体重/日ということでございます。

以下、このNOAELの値から安全マージンの計算がされてございます。

41ページの表8に最大摂取量の計算がございまして、こちらを用いて算出されますと、安全係数については約10,000ということでございます。

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、申請書につきまして、項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思えます。

まず、第1、第2、第3で、申請書の1～14ページにかけまして、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。

○橘田専門委員 6ページの表1にあります分子量のところに、糖鎖部位を除去後、SDS-PAGE解析の結果を添付資料5に示すと書いてありましたので、この添付資料5を拝見しました。添付資料5についての言及ですけれども、よろしいでしょうか。

こちらの資料を見ますと、SDS-PAGEはCBBで染色したときには、ここに説明があるような形なのですけれども、ウエスタンを行うとCBB染色では見られない領域のところはかなり強く抗体と反応するブロードのバンドがあって、それはデグリコシラーゼをかけた後も特に変化はみられません。抗体に対して反応しているにもかかわらず、この部分のものについての説明がないのでこのバンドの正体について量りかねます。

そうなってくると、このウエスタンで使った抗体自体の特異性がどの程度のものかも分からなくなります。実際、グリコシラーゼをかけることによって、もう少し小さなものが出てきており、それは酵素のデリバティブだという形で説明されているのですが、抗体の特異性がわからないので、この説明自体も信頼に足るものか分かりません。

ウエスタンでかなり反応してくるものは見えてきているのですけれども、先ほど北村さんのほうからもあったように、後のほうの話なのですが、消化性のところで抗体に対して反応性のあるバンドがどのように分解されてくるかがわからないというところもありますので、説明があるとよいと思えます。

○澤田座長 SDS-PAGEでは、余り出ないわけですね。ウエスタンだと出る。

○橘田専門委員 ウエスタンだとかなり出て、それに対して全く説明がなされていないで

す。

○澤田座長 量的には、そんなに多くないかもしれない。

○橋田専門委員 タンパク質そのものとしては多くないと思いますけれども、ウエスタンで、ここでアスパラギナーゼだと言っているところとほぼ同じくらいの濃さで出ているので、かなり反応性が強いのかなと思うので、そういうものに対して説明がないのが気になりますし、そうすると抗体の特異性がどの程度のものなのかというところについて、疑問を挟まざるを得ないというところです。

○澤田座長 それはポリクロなのかを含めて、抗体のことの説明を追加していただかないといけませんね。それから、抗体で染色されるバンドの説明をしていただくということでもよろしいでしょうか。

ほかはいかがでしょうか。

○小関専門委員 1点よろしいですか。最初に2ページの図1を私は見たときに、宿主をつくるのに遺伝子欠失、突然変異誘導とただ単にそう書いてあるだけで、これは遺伝子欠失をどうやってやったか、後ろに行くを書いてあるのですけれども、要するにγ線を当てたりとか、紫外線を当てたりとかして、要するに組換えではないということがわかるように付記してほしい。

後ろのほうで書いてあるのですけれども、12ページに書いてあるのですが、アフラトキシンのクラスターホモログ欠落とあるので、これも一応書き加えてもらったほうがいいのではないかという気がします。これがごそっと落っこちていますので、誤解を与えないように、図1をバージョンアップしてほしいなと感じました。

○澤田座長 たしか、これは前にも問題になったような覚えがあります。欠失だけなので、セルフクロニングだからいいだろうということになったのか。伝統的な手法で欠失されたのか、覚えていませんけれども。

○小関専門委員 ですから、そこを明確に記載してもらったほうがいいと思います。

○澤田座長 BECh2は今までいろいろなもので宿主にしてきているので、説明を追加してもらいたいと思います。

アフラトキシンの生合成系は死んでいるはずですがけれども、これはどういう書きぶりにしたらよろしいですか。

○小関専門委員 ですから、もともと死んでいるということなので書かなかったと思うのですけれども、クラスターホモログの欠失という格好でそのまま書いてもらえれば、私はいいように思います。何があっても絶対にアフラはできこないということが、これでもう確定しますし、より親切かなと思いました。

○澤田座長 直し方はまた後で見ていただきたいと思います。

どうぞ。

○中島専門委員 アフラトキシンの遺伝子については、コウジ菌は日本中のコウジ菌について非常に大規模な調査が行われていて、3つのタイプにあって、タイプの3と2は欠失し

ている。タイプの1は欠失ではないのだけれども、何か所か重大な変異が5~6発入っていて、全部が復帰することはないというような理由で安全性宣言を出されていて、この株もタイプ1になるのか、2になるのか、3になるのか、ちゃんと調べれば、データは出てくるはずなので、それを要求すれば、こういう理由でアフラトキシンはつukらないというのは、わざわざ調べてもらわなくても調査結果は報告されているはず。それがあればいいということですね。

○松井技術参与 添付の10にグループ1、2、3についてどれか、調べた結果が出ていて、野生株はグループ1で、この宿主のBECh2は遺伝子がサザンで欠失しているという、つまりグループ3になっている結果です。

○中島専門委員 なるほど。グループ1だったら欠失ではなくて、変異のはずです。それからさらに欠失しているということもあると思うので、そこはわかりやすく書いていただかないと、とは思いますが。余り詳しくずらずら書く必要はないと思いますけれども、アフラトキシンで気になる場所ですから、本文の中に記載していただきたいと思います。

○澤田座長 多分グループ3の欠失型であるとかを、書いていただければいいのですか。

○中島専門委員 欠失していることは確認したとか、要するに安心できるように、そういうことが書いてあれば。本来、グループ1だったら欠失ではないのですが、彼らはその後、ちゃんとサザンをやって欠失していることを確認したと言っているわけなので。

○松井技術参与 サザンの図も載っています。

○中島専門委員 アフラトキシン生合成遺伝子系のどの領域が欠失しているとか、はっきり記載していただければと思います。

○小関専門委員 ですから、それも結局後ろに書いてあるのですけれども、 γ 線照射で欠失させて、組換えで突発したのではないということがわかるように書いておけば、誤解は生じないと思います。 γ 線照射で3型になっていますと書けば、それで済むだけの話で、それを図1の中にも入れておけば、わかりやすい話だと思います。

○澤田座長 IFO4177の段階で既にないのですね。

○中島専門委員 IFO4177がたしかグループ1ですね。

○松井技術参与 1ですけども、いろいろなところの変異が入っていて、遺伝子はあっても転写はされていないという論文が添付されています。

○中島専門委員 だから、もとの株はそのタイプだったはずですね。

○澤田座長 そこは微妙なところがありますので、追加で書いていただくことにしたいと思います。

ほかに14ページまででいかがでしょうか。

○児玉専門委員 先ほど橘田先生のほうから御指摘のあったところですけども、前回、同じ会社だと思いますが、キシラナーゼを審査したときにも同じようなことがあって、あちら糖鎖付加はしていないのですが、そのときにコントロールとしてBECh2の上清を同じように調製してもらって、一緒に並べて電気泳動をしてもらっています。

今回は特に上部のほうに何かよくわからない抗体反応性のものがありますので、できればホストの宿主の培養上清によくわからないものがあるのかどうかということとか、それがグリコシレーションしたときに下に小さいバンドが出てこないとか、コントロールの実験をできれば足してほしいと思います。前はそういう要求をして、やっていただいています。

○澤田座長 これは内在性のものもあるんですね。

○児玉専門委員 上のものは恐らく導入に起因していないんですね。ですから、宿主の培養上清にいるのだと思うのですけれども、それがわからないので、コントロール実験として、それを足していただければ、はっきりするかなと。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

○北村課長補佐 すみません、宇理須先生からコメントをいただいておりますので、御紹介させていただきます。申請資料の10ページのアレルゲン性に関する事項の記載についてのコメントになります。

1番といたしまして、表3の5に示されている文献についての御指摘です。この論文では1例は経口負荷試験で陽性で、経口摂取で過敏症状が惹起されることが示されているということで、申請資料の10ページの表3の一番下にございます「パンを食べて症状が出ない」という記載は、経口摂取では無症状の印象を与えますが、経口負荷試験のほうが信頼性が高いので、経口摂取でも過敏症状が出ると結論すべきですという御指摘です。

2番といたしまして、7の論文では、患者は経口負荷試験を受けておまして、このAsp o 2を含むパンで鼻症状が出現。一方をこれを含まないパンでは無症状であるということで、Asp o 2によるアレルギーであることを証明しているということです。感作成立だけでなく、発症まで引き起こしているということを記載すべきということです。また、筆頭筆者に間違いがあるという指摘もあります。

3番で、新しく文献を添付いただきまして、後ろのほうにつけているものになります。この論文でもcooked α -Amylaseとuncooked α -Amylaseを用いた経口負荷試験で原因であることを証明しているということです。

「以上から」のところは、申請資料11ページの表の下の記述についてのところになりますが、1パラ目の一番最後に書いてあります、「実際の食物アレルギーの事例を示していない」は誤りで、「実際の食物アレルギーの事例を示している」ということです。

2番といたしまして、11ページの最後のパラになりますが、これは言い過ぎということで、例記された論文は吸入感作の事例ですが、経口摂取によって感作は引き起こされないことを証明することを目的とした論文ではないということで、経口摂取に関して何らかの結論を導き出すには、「対象と方法」が適していないということです。

3番といたしまして、この株の安全性に問題はないと考えるということですが、この結論も、食用に使われている既存の*A. oryzae*や産生物と比較して同等であることを証明することが必要であると考えますという御意見になっております。

以上です。

○澤田座長 指摘いただいた表現を変えるということと、最後の「可能性は低い」と「安全性に問題はない」というところは、削除すればいいですか。

手島先生、いかがでしょうか。

○手島専門委員 そう思います。経口摂取でアレルギーが起き得るということが示されているということですので、実際の食物アレルギーの事例を示していないという言い方は改めるということではよろしいかと思えます。

ただ、これは宿主の*A. oryzae*のアミラーゼに対するアレルギー性の問題なので、今回のアスパラギナーゼに関するものではないのですけれども、やはり*A. oryzae*のアレルギー性について正確に記しておく必要があるのではないかと思います。

○澤田座長 そうですね。 α -アミラーゼにはアレルゲン性があるのだけれども、宿主には含まれていないのですね。欠失になっているわけですね。アミラーゼが欠失型になっているので、このBECh2株では発現していないはずなので、そういう意味では問題はないと記載を改める必要があるのかなと思えます。

○中島専門委員 同感です。この株についてはアミラーゼの遺伝子をつぶしてあるので大丈夫と思うので、その辺がちゃんとわかりやすく記載していただければ、書きぶりだけで問題ないと考えます。

○手島専門委員 そうですね。だから、最後の1行のBECh2株に関しての欠失のところも、その遺伝子は欠失しているという旨を書かれるとよろしいかと思えます。

○澤田座長 それでは、最後の行だけ書き直していただくことにしたいと思います。

14ページまで、ほかにいかがでしょうか。よろしいですか。

続きまして、15～26ページで、第4のところコメント、御意見がありましたら、お願いしたいと思います。

○橘田専門委員 先ほどの続きになります。人工腸液、人工胃液のところウエスタンの結果を入れていただけると、もう少しわかりやすいかなと思えますので、お願いします。

○澤田座長 抗体が余りよくなかったら、多分SDS-PAGEだけのほうがデータとしては信頼性があるので、それを考えて判断していただければ。

○小関専門委員 先ほど北村さんがおっしゃったように、それだったらSDSが14.4kDaというのは余りにも大きいのではないかと思うので、これはもっと小さいほうが見えるようなSDS-PAGEに差し替えてほしいなと思えます。

○澤田座長 これはゲルをもうちょっと固くして、やり直してもらわないといけませんか。

○小関専門委員 そうですね。でも、そんなに難しい実験ではない。グラジエントゲルを使えば、もうはっきり低いほうまでわかるので、やってくださいと言ったほうが良いと思えます。

○澤田座長 このコウジ菌は、食経験が既にかなりあるものですか。

○小関専門委員 そうなると6ページに戻ってくるわけで、これだけアミノ酸配列が既存のものとは違うので、ある意味、新規で扱うから、ここに出てきたのではないかと思いません。そうすると当然消化性も違ってくるでしょうねと。

○澤田座長 Existingのほうが*niger*で、AoASPのほうが今回の*oryzae*で、コウジ菌の菌体全体をかなり食べている可能性はあって、ヒトで食経験があるかどうかという判断ができるかということです。

○小関専門委員 それを言われるのであれば、そののところをきちんと書いてもらわないと、この図が最初に出てくると、要するにここで見てわかるのですけれども、酵素学的にかなり変えています。至適pHを7まで持ち上げるとかいうことをしているので、何か手を加えたのかなと思うのですが、そうではないのであれば、そうではないという形の記載をきちんとしておいてもらったほうが、誤解を生じない。

○澤田座長 まず、アミノ酸を改変していないか。

○小関専門委員 そのはずだと思います。

○澤田座長 それから、摂取量の考え方で説明ができるかどうか。できないのだったら、もうちょっと短いペプチドまで見てくださいということになる。

手島先生、コウジ菌でアレルギー、このタンパクでアレルゲン性の話を聞いたことはありますか。

○手島専門委員 やはり α -アミラーゼでアレルゲン性があるということしか、私は情報を持っていません。

○澤田座長 そこら辺は確認していただいて。

○山添委員 これはほぼ並行して添加物でもやっていて、先ほど小関先生がおっしゃっていたところが、やはり皆さんの気にしているところで、14,000というのは高過ぎるのではないかと。それは人工胃液だからと言っても、全部切れなくてもいいにしても、あちらの意見としては腸液と組み合わせて、本当に両方で切れてしまうのか。そこまで見てほしいという意見まで出ました。

私はそこまではわかりませんが、ともかく通常でそのグラジエントゲルで見られる3,500とか、過去にあったその辺のレベルまでのデータを出していただけると、添加物の先生方のほうも納得しやすいかと思えます。

○澤田座長 その御意見も考慮して、短いところまで見ていただくことにしましょう。

○北村課長補佐 すみません、あと一つお伺いしたいのですけれども、アレルゲン性について見るときに胃液、腸液のほかに加熱試験での免疫反応性の変化も見ていることが多いのですが、そちらについてはどうしたらいいのでしょうか。

○澤田座長 添加物に関してアレルゲン性を食品と全く同じように、全てフルにやらなければいけないということは必ずしも決まっていなくて、そこら辺はどのくらいリスクが高そうかに応じて、ディスカウントはできる場合もあるかなと思います。今回は加熱のデータまで要求するかどうか。

○手島専門委員 添加物ということもありますので、そこまで要求しなくてもいいかと思
います。

○小関専門委員 1点よろしいですか。まさしくそのとおりですけれども、実はこれは評
価基準のところの9ページには、「調理過程及び」と入ってしまっています。だから、こ
れは今後消していいということにつながっていくのですけれども。

○澤田座長 添加物に書いてありますか。

○小関専門委員 机上に置かれているものの3. 添加物の9ページの上から5行目の最後の
ほうに、「摂取量、調理過程及び消化管内における分解量」と記載しています。そうする
と、これがないと不備だということにするか。それともケース・バイ・ケースで判断をす
るかを明確にここでしておいたほうがいいと思います。

○飯専門委員 今の場所は抗生物質マーカーに対する記載ですね。

○小関専門委員 そうです。これはそこだけに限った形になっているのですけれども、入
れたものについてはどうでしょうかという記載が、実ははっきりと特性に関する事項の
ところには、8ページの下から7行目、遺伝子産物の各種処理に対する感受性」ということ
で人工胃液、人工腸液による酵素処理、加熱等の物理的処理と入れたものもやはり書かれ
ています。

○手島専門委員 ここに関しまして、今回の酵素に関しましては、申請書の5ページ目に
温度安定性、酵素活性のデータは出ています。そういうこと言えば、加熱による酵素活
性を調べていることになるかとは思いますが。

○小関専門委員 結局、今までもそのところが問題になりました。酵素活性が失活して
もタンパクが残っているのではないか、ペプチドという形ですね。さっきのSDS-PAGEに
しても結局、本来であれば抗体を持っているのだったら、胃液、腸液処理をしたときに
ELISAでサンドイッチか何かで調べるとというのが今までのスタンスだと思ったのです。

○手島専門委員 植物の場合ですね。

○小関専門委員 ですから、添加物のときにどう考えるかというのを一度ここで明確にし
ておきませんか。そのほうが今後は楽だと思います。

○北村課長補佐 過去の事例を御紹介します。α-アミラーゼですが、そのときにはアミノ
酸が改変されて耐熱性が向上しているということで、御紹介いただいたファイルのタグの
6に食品（微生物）の安全性評価基準があるのですが、そちらの12ページを引用しまして、
（3）の人工胃液、人工腸液、加熱処理の結果、これに基づいて検討してくださいという
ことで試験を求めた事例があります。

○澤田座長 混乱していますが、抗生物質耐性マーカーはそこまでやらなければいけない
と。それ以外のものは安全上の問題がないと判断するために必要だったら、やらなければ
いけません。

○小関専門委員 ですから、言ってみれば、アミラーゼのときには耐熱性ということもあ
って、ケース・バイ・ケースの判断でやってもらったけれども、この場合には要らないケ

ースであるという判断をこれからもやっていくということで、ここでそれさえ申し合わせておけば、私はいいのではないかと思います。

○澤田座長 今までフルで添加物をやった事例が余りないので、どちらにしようかという判断例が余りなかったということはあると思います。やはりアレルギー性が疑われる場合には、きちんとみましようというスタンスで今まで来たように思いますので、これからもそういうスタンスでいいのかなと思っています。

○小関専門委員 ただし、このケースの場合には、アレルギー性の上で導入して発現されたタンパク質に問題はないことから省略できるものがあると。今後もこれはケース・バイ・ケース・スタディーでやっていくと。アミラーゼのような場合にはアレルギー性が高いと知られているので、フルスペックにしてくださいね、そうでなければフルスペックの必要なしに懸念される場所だけ、きちんとやればいいというスタンスでよろしいですね。

○澤田座長 原則としてはそうです。ただ、問題は摂取量が非常に多い場合は、食品並みに考えないといけないという例外はあると思います。

○小関専門委員 それも含めたケース・バイ・ケース・スタディーになってくるのではないですか。

○山添委員 先ほども小関先生がおっしゃっていたように、このアスパラギナーゼがいわゆるネイティブのもので、アミノ酸の配列が変わっているか、変わっていないかということにも関係してこないのですか。

○澤田座長 それは一応確認していただくことに。

○北村課長補佐 一応、申請者に確認をしましたところ、ネイティブからアミノ酸の改変はしていないということです。

○澤田座長 先ほどのお話で、例えばデンプンとかポテトチップに多めに入れる可能性はありますので、そういう意味では、慎重に先ほどのSDS-PAGEくらいまでは見ておいたほうがいいかもしれません。

ほかはよろしいでしょうか。26ページまで。

○飯専門委員 20ページの上から3～4行目とその下の*amdS*遺伝子の最後の段落のところで、「菌体外酵素ではないので、本添加物に含まれることはないと考えられる」と書いてありますが、壊れていない菌が皆無というわけでも多分ないと思うので、ここは削除でいいのではないかと思います。

○澤田座長 これは*amdS*のことですね。*URA3*のことですか。

○飯専門委員 *URA3*も*amdS*も両方とも同じ書き方です。

○澤田座長 両方関係してくる話ですね。

○飯専門委員 はい。全く壊れていないとも言いきれないから、無理にこの言葉を入れる必要はないのではないかと思います。

もう一つあるのですけれども、よろしいですか。23ページの最初の行にORFを開始コドンから終止コドンまでとしています。最近では終止コドンから終止コドンスタンダード

にして解析してもらっているのです、この場合も同じようにして解析してもらったほうがいいのではないかと思います。

○手島専門委員 ストップ・トゥー・ストップということに関して、ネガティブなものもかなり拾ってきてしまうということがあって、それに対して少し考えていったほうがいいかなという気はしています。ただ、今は確かにストップ・ストップを求めているということになりますね。

○飯専門委員 一応、念のためですね。結局万が一もないかもしれないけれども、アレルギー性があるようなペプチドが生産される可能性がないということをきっちりさせておいてくださいね、ちょっと手間はかかるけれども、という趣旨でやってきているのかなと思うのですけれども。理屈からいくと必ずしもAUGコドンだけが開始コドンではないとか、いろいろなことが現実にはあるので、ホモロジーサーチの手間がかかるけれども、それだけなので、やっておいてもらえればいいかなというのが私の気持ちです。

○澤田座長 これはアミノ酸の長さが10だと小さ過ぎるのではないですか。

○飯専門委員 別のときは幾つでやりましたか。

○澤田座長 30とか。

○飯専門委員 アミノ酸で30にしましたかね。

○澤田座長 どうぞ。

○児玉専門委員 この間、アレルギーのシンポジウムがありまして、そのときにラディックさんの講演でストップ・トゥー・ストップの意味について講演があって、ゲノム上にどれだけあるか調べたと。そうするとものすごい数があると。現状はそれについて何も我々は評価していないので、ストップ・トゥー・ストップが実際に発現している例とか、発現して何か影響が出た例はないし、この評価法は余り意味がないのではないかという議論が出て、確かにストップ・トゥー・ストップを念のためというのはわかるのですが、実質上これまで問題になったことは一例もないし、ゲノム上にもものすごい数があるということを見ると、その評価法自体がどれだけ意味があるのかというのは、1回議論をしておいたほうが、実質上はいいのではないかと感じています。

ただ、今の段階では、それはまだ変えるということにはなっていないので、求めること自体は全然問題ないのですが、今後ともそれをずっと続けていくかどうかは、一度考えてもいいのではないかと思います。

○澤田座長 イントロンがある場合はストップ・トゥー・ストップでみなければいけない可能性はあるのですけれども、バクテリアの場合でイントロンがなければ、必ずしも考えなくてもいいのかなという気がします。

○飯専門委員 これはバクテリアではないので。

○澤田座長 これは、イントロンはありますか。

○飯専門委員 結構難しいところがあります。何をしているかがわからないというところがあるので、かと言って細かい分析をするのもどうかというのはもちろんあって、ある意

味、配列をいじるところだけで解決するものだからということかなと。もともと植物の場合はイントロンとかで、何か入ると割とネイティブなスプライシングなどは幾らでも起きているので、ある程度のイントロンの長さをカバーできるくらいということで、ストップ・トゥー・ストップで見た方がいいかなとは思いますが。やらなくていいかと言われると、議論をした上で決めないといけないことのような気がします。

○澤田座長 アミノ酸の長さは、今までどのくらいにしていましたか。10は短過ぎるような気がしました。

これは2つ考えなければいけないことがあって、発現しうるORFであるものをピックアップすると、アレルギー性を考えた場合に、まず機械的にやっている場合とがあるのではないかと思います。

○飯専門委員 今回はアレルギーとホモロジーということだけで考えれば、ORFを一つ一つ使って当てなくても、途中でターミネーションコドンというか、アミノ酸に相当しないターミネーションコドン込みの長い一つの配列を放り込んでやれば、それに対してのホモロジーサーチでアレルギーのペプチドと一致するものがあるかは、1回のホモロジーサーチでも出せるのではないかと思います。

○澤田座長 私の印象としましては、今まで10個でこれほど多数でやった例がないような気がします。

○飯専門委員 私ももうちょっと長かったと思います。

○澤田座長 非常に小さいプラスミドで、ORFで95個も見て意味があるかと言われると。

○飯専門委員 植物のもっと大きなケースでもこんなにならなければいいのかなとは思いますが。

○松井技術参与 組換え植物の場合は、ストップ・トゥー・ストップでORF30アミノ酸で見ているのが普通の例です。ストップ・トゥー・ストップは、先ほど手島先生や児玉先生からも御意見がありましたように、いろいろなところで議論になっているようなので、今後のお話というか、皆さんのお考えを決めていただけたらと思います。

○澤田座長 今その考え方をここですぐまとめるのは無理かと思えます。とりあえずの案としては、30アミノ酸でORFをやって、もっと数を少なくしてくださいということでしょうか。それでかなり減ると思います。

○中島専門委員 コウジ菌の場合は、ほぼ9割の遺伝子にイントロンがありますけれども、イントロンの形はおおむね決まっています、植物よりはるかに限定されていますので、少なくとも植物より辛いルールにする必要はないと思います。植物で30であれば、コウジ菌ではそういう非常に小さいものはあつという間に分解されて、ばらばらになってしまいますので、10とかそういうものが実際に問題になることはないと思われるので、植物で30であれば、それより辛くする必要はないと思います。

○澤田座長 とりあえず、今の私の提案でよろしいでしょうか。

○北村課長補佐 すみません、確認させていただきたいのですけれども、30アミノ酸でス

トップ・トゥー・ストップで、やってくださいということでしょうか。

○中島専門委員 私は、それで十分過ぎるくらいだと思います。

○山本評価第二課長 今後のことがあって、毎回ストップ・トゥー・ストップを求めるといふのだと、ルール化しないと、毎回足りないですよという指摘になるので、今後の議論としてもどうするかをあれしないと、申請する業者のほうの立場からもありますので、今回はわかには結論を出せないにしてもですね。

○飯専門委員 大分昔、私がこれに加わったころだから、もう5年くらい前にどうするかと一度、この会議とは別に何回か議論をして、それでストップ・トゥー・ストップでたしか30アミノ酸というのを、植物のほうですけども、やり方にばらつきがあつたので、そういう形を基本にするという申し合わせはしました。その後は事務局サイドから、そうでない場合は申請者側にそういうので出すようになっていたのかなと思っていました。

○山本評価第二課長 実態上、ストップ・トゥー・ストップで上がってきているのは、我々もあれしているのですけれども、今回以外のメーカーさんもいろいろあるものですから、今、議論があるのであれば、またもう一度、例外的にこういうケースはいいよというようなのがあるのかもわかりませんので、必ずということで行くのであれば、我々もそういうことで業者を指導していく必要があります。

○山添委員 一応ルールは今、残ってしまっているもので、別の機会にきちんと変えた段階で、それをやってもらうということはどうですか。

○手島専門委員 たしか幾つか最近の論文も出ているということで、そのあたりを少し整理していただいて、いつか議論する時間も設けていただければと思います。

○山本評価第二課長 ありがとうございます。それでよければ、作業をさせていただきたいと思います。

○北村課長補佐 たびたびすみません。今、植物の過去の事例を見ているのですが、8アミノ酸以上のORFで検索しているというのが何個か出てきています。

○澤田座長 それは、たしかORFではないケースではないですか。

○北村課長補佐 ORFと評価書には書いてあります。

○澤田座長 ORFで数が少なければやってもいいのですけれども、ただ、短いORFを全部やり出してもきりがないので。

○北村課長補佐 やって少なければ、それはそれで厳しいのでいいということですね。ありがとうございます。

○澤田座長 今の問題は、ほかはよろしいですか。

それでは、26ページまでで、ほかには御意見はいかがでしょうか。

今、第4の6のところ、タンデムにたくさん入るところの説明をもうちょっと追加していただいたほうがいいかなと。多分、参考文献に何かいろいろとその理由が書いてあると思いますので、そこら辺を2～3行でも追加していただければと思います。

それでは、27～33ページで、第5と第6につきまして、コメント、御意見がありましたら、

お願いいたします。

○飯専門委員 今回のタンデムというところに関してですけれども、27ページの真ん中辺りから説明があるのですが、以前もこうやってマルチで1カ所に入って、これでは困るよねとかいう議論があったかなと思うのですが、そのときの指摘と同じような指摘をしておかないと整合性がとれないのかなという気がしました。

○澤田座長 たしかに、シーケンスができないのが困るのですけれども、ものが量的にふえるだけなら問題はない。

○飯専門委員 今回の場合、タンデムだと本当に言っているのか、サザンのデータのとり方を見る限り、一部逆向きに入っていたとしても同じ結果になりそうだったり、本当に一つのプラスミドがきちんと長くつながって入っているのかがデータからはよくわからなくて、本当にタンデムと言い切っているのかが若干疑問に感じるデータではあったのですけれども、その辺はどう扱うのかが、前例も含めてどうしたらいいのかなと思っています。

○澤田座長 今までにもタンデムがあったと思うのですけれども、添加物に関してはプロダクトがよければいいという考え方が一つありまして、ゲノムレベルのことは余り深追いしなかったと思います。

○飯専門委員 何かこの食品添加物で、カビか何かで同じようなことが起こっていて、それをどう扱ったかを確認も含めて。

○北村課長補佐 過去にキシラナーゼがありまして、それもタンデムで30コピーくらい入っていますという説明があったものがあります。それは途中で申請が取り下げになってしまっているので、最終的に結論が出ていないのですが、指摘は出していますので、確認いたします。

○澤田座長 プローブが短すぎるのも問題だと思います。

○飯専門委員 ここの部分だけプローブにすると、いかにも1本のバンドで出てきてしまうけれども、ほかのところを使ったら、何かばらばらと。それがこのデータだけだとわからないのが気になります。本当にタンデムなのですかと。

○澤田座長 ただ、植物に入れる場合と違って、プラスミド全体がそのまま入ってしまうと、やりようがないですね。端だけ違いが出るかもしれませんが、どのプローブを使っても同じように見えてしまうので。

○飯専門委員 本当にぐるぐると何回も一方向の繰り返しで入っているというのであれば、きちんと定量さえしてくれれば、これも定量の仕方もあるけどインターナルの遺伝子か何かを比較対象にするとかでききちんと定量してほしいとは思いますが、それがこれだとよくわからない。1カ所で、本当に一方向でタンデムであるというのであれば、いいのかなという気がしてはいます。

○澤田座長 1カ所に本当にタンデムに完全に並んでいるのを証明するのは、なかなか難しいかなと思いますね。

○中島専門委員 たしか以前のキシラナーゼのときには、染色体のどこに入っているのか

もわからなくて、しかも●●●コピーでコウジ菌の常識からはあり得ない数字だったので、その辺に疑義が差し挟んだように記憶しています。

今回の●●●コピーくらいは、これは割とよくあるパターンで、しかも全部、次世代シーケンサーか何かでゲノムまで決めて、どこに入っているかを決めていますので、●●●コピーで●●●カ所でこのくらいで、生産量の多い株を選ぶと大体3コピーだの5コピーだの、このくらい入っているものが大抵選ばれてきますので、このサザンのデータを見てみる限り、それほどおかしいとは思わないです。この件に関しては、私はこの程度のデータを出していただければ、おおむね安全性は担保できていると考えてもいいように考えます。

○澤田座長 27ページの中段に「全ゲノム解析を行った」と一言あるのですが、どこまで詳しくやったかはよくわからない。

○中島専門委員 恐らくは次世代でざぱっとやって、そうするとかなり粗っぽくても、これはどこに入っているかの検討はつくので、それで染色体は●●●番で●●●カ所と言っていて、●●●カ所で合わせて●●●コピーなら、これは普通にあるパターン。普通はタンデムにきれいに入りますから、サザンのプローブの長さは多少気にはなるけれども、このサザンのデータを見る限りには、同じようにタンデムに入っていると信じてよさそうなデータだと考えます。

○澤田座長 それでは、今回はよろしいということ。

○飯専門委員 この1カ所でこれだけ本当かというのは、若干気にはなるところがありますが、挿入は1カ所ですね。●●●カ所のうち1つは内在性の遺伝子。

○澤田座長 33ページまでで、ほかはよろしいでしょうか。

それでは、第7と第8につきまして、34～42ページでコメント、御意見がありましたら、お願いします。

○和久井専門委員 39ページに記載している13週間の反復投与毒性試験ですが、その試験で使っているPPV24743の用量が少なかったのが一番ネックになってしまうのだと思いますけれども、記載として、投与量の10%、33%、100%は不相当と考えます。ガイドライン408では最高用量は、何らかの毒性が発現する量を最高用量として設定として規定されています。

従って、最高用量が実質0.88 gで、無毒性量は最高用量の0.88 gとするのはガイドライン408として考えると矛盾します。これに対し、通常、OECDのガイドライン408では、限度試験を設定してそれ以上投与しても毒性が出ないといった場合には、安全であるということで、これ以上の用量を用いた試験は求めていません。

結論として、少なくとも、今回の試験結果の記載には、用量のパーセンテージ記載はやめていただきたい。

この試験でNOAELの提示は必要であることは共通の理解だと考えますが、NOAELを0.88 gとするという解釈は、ガイドライン408から考えると適当だとはいえないと考えます。

○澤田座長 まず、OECDガイドラインのくだりを削除すればいいですか。

○和久井専門委員 そういう解釈もできます。

○澤田座長 それから、10%と33%と100%を削除すれば、問題はないですか。

○和久井専門委員 ないです。

○澤田座長 NOAELは、もし残すのであれば、0.88 g以上にすればいいですね。

○和久井専門委員 適切とはいえませんが、再試験を求めないのであれば、記載しているNOAELを採用するしかないと考えます。しかし、こういう場合は、できるだけ限度試験を実施することが適切であると考えます。

○澤田座長 これはもう一回やり直されるのは大変なので。

○和久井専門委員 ただ、1つだけ気になったのが、この3つの試験が全部8年前にやっている試験です。8年も何でためておいたのかなど。

○澤田座長 これは、まずデンマークですか。欧州でも10年くらい前に許可されているので、そのときの承認のデータをそのまま使っているのか。

ほかはよろしいでしょうか。

それでは、何点か御意見をいただきましたので、意見・確認事項を指摘事項案としてまとめまして、先生方に御確認いただいた上で、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。

それでは、次に「GLU-No.6株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム」についての審議を行いたいと思います。

○池田評価情報分析官 すみません、よろしいですか。今の毒性試験のところですが、先ほどから添加物専門調査会で並行してやっているという話をさせていただいています。添加物専門調査会のほうでは、反復投与毒性の試験について、基本的にはガイドラインに沿ってやるというのが原則になっているということで、実際に沿っているという前提で審議をしているので、ガイドラインへの適合性については確認をさせていただいてよろしいでしょうか。

○澤田座長 これは新規の添加物の場合、向こうで安全性を見れば、こちらはそれほど見なくていいということもあり得るのですか。両方同時にやって、それぞれ意見が少し違うこともあるかと。

○池田評価情報分析官 毒性試験のところについては、添加物専門調査会が主として見ることになると思います。

○澤田座長 それでは、グルタミンの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資料について御説明いたします。お手元に「GLU-No.6株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム」の緑色の紙ファイルの方、よろしく願いいたします。

本件については初めに補足をいたしますと、本品は本調査会での審議を終えて、平成23年2月に食品安全委員会への報告を行ったGLU-No.3株を利用したL-グルタミン酸ナトリ

ウムで使用した菌株であるGLU- No.3株に新たに組換えによる変異を加えてつくられたGLU-No.6株を利用してつくられております。

それでは、説明をいたします。申請資料の1ページをお願いいたします。

1として、本申請品目であるL-グルタミン酸ナトリウムの概要ですが、本品は第8版食品添加物公定書に収載された指定添加物に該当し、その概要は同ページの表の記載のとおりです。

用途は2ページになりますが、うま味成分として、調味料の形で使用されております。

3ページ、2といたしまして、本申請品目の製造方法の概要が記載されております。今回申請されているL-グルタミン酸ナトリウムは、L-グルタミン酸生産菌であるGLU-No.6株により作製されておりますが、先ほども御説明いたしましたとおり、今回の株は平成22年に安全性審査が終了したGLU-No.3株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウムで使用した株を改変することによって作製されたものです。

以下、2-2には、GLU-No.3株及びGLU-No.6株の作製方法について、その概要が記載されております。

GLU-No.3株については、本資料の3ページに作製の概要が記載されております。本株における宿主は腸内細菌科に属する植物常在菌の*E. coli*近縁種で、これはバイオセーフティレベル1に属するものです。その安全性については、ヒトに対する病原性を示唆する文献は特になく、動物を用いた安全性試験でも病原性が認められる所見はなかったと記載してございます。腸管定着性試験及び植物病原性試験でも同様に影響が考えられる結果はなかったとあります。

5ページ以降には、本株を作製する際のベクター、挿入遺伝子、プロモーターが記載されており、6ページには作製のフロー図が記載されてございます。

GLU-No.6株については、7ページ以降に説明がされてございます。

(1)、(2)は記載のとおりで、(3)ベクターの項目になりますが、本株は●●●により作製されております。

(4)挿入遺伝子につきましては、●●●株由来のL-グルタミン酸の生合成に係る●●●●を利用しております。

(5)プロモーター及びターミネーターについては、●●●由来のものを使用しております。

(6)といたしまして、本株の構築方法ですが、こちらについては10ページを御参照いただければと思います。

11ページ、2-3といたしまして、本品の製造方法が記載されてございます。本品は発酵により得られたL-グルタミン酸発酵スラリーを●●●、●●●後に粗結晶を得た後、精製等の過程を経て精製結晶を得て、乾燥、包装されることによって製造されると記載されてございます。

12ページ、最後に本申請品目と現行品目の比較がなされております。

3-1といたしまして、食品添加物公定書規格分析結果では、現行品と同等である結果が得られております。

3-2といたしまして、不純物プロファイルとアミノ酸自動分析計及び親水性、疎水性のHPLC法分析の計3つの分析を用いておりますが、いずれの結果も現行製品と同等であることを示唆する結果であったと記載されてございます。

15ページには、3-3として、残存タンパク質について分析した結果が記載されておりますが、こちらにも非有効成分であるタンパク質は検出されなかったとのことです。

以上の結果から、同ページの3-4のまとめになりますが、本申請品目は「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方」で規制しております表記2つの概要を満たしていると結論づけられております。

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、申請書につきまして、御意見をいただきたいと思えます。

まず、グルタミン酸の添加物としての概要と製造方法の概要のところ、1～11ページにかけて、コメント、御意見がありましたら、お願いしたいと思えます。

○児玉専門委員 用語の修正だけかと思えますけれども、8ページの「2. 構築方法」のところ、(1) -1で「●●●由来突然変異株への各遺伝子の染色体組込み」とありますが、これは●●●ですよ。GLU-No.3株の構築なので、●●●に入れているわけではないかと思えます。

○澤田座長 これは単なるワープロ上のミスですね。

○児玉専門委員 多分コピーをしてしまっただけではないかと思えます。

○北村課長補佐 すみません。

○澤田座長 *Pantoea ananatis*は大腸菌に近い菌と書いてありますが、それに●●●の遺伝子をどんどん入れているので、かなり●●●に近くなったような。

ほかはよろしいでしょうか。

それでは、12～15ページで、HPLCとか同等性の確認のところ、御意見がありましたら、お願いしたいと思えます。

今回、いつも出している不純物のプロファイルが本文のほうになくて、非常に見にくいということがありまして、次回から今回追加で出していただいた部分を出していただくことにしたいと思います。

○北村課長補佐 申し訳ございません。CDのほうに文献等を含めて、添付になってしまっていますので、前のスタイルに戻したいと思えます。

○澤田座長 何かコメントはいかがでしょうか。

1つだけ、14ページの●●●というものの説明がないので、それだけちょっと。

○勝田係員 申請者のほうに確認をしましたところ、14ページにある●●●というものは

●●●、つまり●●●と●●●が結合したものであるという回答を得ています。

○北村課長補佐 追記をしていただくようにお願いします。

○澤田座長 それは追記していただきたいと思います。

ほかはよろしいでしょうか。

それでは、本件については特に安全上の問題が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。評価書案を束ねた冊子の17ページ以降が本品の評価書案になりますので、お手元に御準備のほうをよろしくお願ひいたします。

20ページ、Iといたしまして、本申請品目の概要ですが、L-グルタミン酸の生産性を高めるため、既に安全性の確認が終了したGLU-No.3株にL-グルタミン酸の生合成に関する遺伝子を挿入するとともに、プロモーター等に改変を加えてGLU-No.6株を作製し、この株によりつくられたL-グルタミン酸ナトリウムであると記載しております。

また、本株には、毒素産生性及び病原性がなく、バイオセーフティーレベル1に分類されるとともに、抗生物質耐性マーカーは含まれていないことも記載してございます。

IIには、食品健康影響評価に係る事項を記載してございます。

1といたしまして、本申請品目は高度に精製されていること。

2として、最終製品において、タンパク質が検出限界未満であり、食品添加物公定書の成分規格を満たすとともに、新たな不純物は検出されず、従来品にも存在する不純物の含有量が既存製品よりも低かったことから、非有効成分の含有量が安全性上、問題となる程度に増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含んでいないことから、3といたしまして、高度精製の考え方にに基づき、安全性が確認されたと記載してございます。

最後に21ページになります。結論といたしまして、本申請品目については、「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表基準」による評価は必要ないと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、評価書案は20～21ページですけれども、これについて御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。今までの書きぶりとはほぼ同じかと思っておりますけれども、いかがでしょうか。

もし細かい字句の修正等がございましたら、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思ひます。

それでは、この案の形で食品安全委員会に御報告したいと思ひます。どうもありがとうございました。

それでは、議題（1）につきましては、これで終わりたいと思ひます。

議題（２）の「その他」でありますけれども、私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「AHD株を利用して生産されたL-ヒドロキシプロリン」、9月の専門調査会で審議いたしました「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ81419系統」、さらに「ATC1562株を利用して生産された25-ヒドロキシコレカルシフェロール」、10月の専門調査会で審議いたしました「チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシDP-004114-3」につきましては、申請書等の修正の指摘を出したところでもありますけれども、これらの品目の取り扱いにつきましては、御担当の先生に御協力いただき、座長預かりとなっていたところでもあります。指摘に基づき修正をされ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。

なお、現在、ダイズ81419系統はパブリックコメントの募集が終了したところでありまして、L-ヒドロキシプロリン、トウモロコシDP-004114-3、25-ヒドロキシコレカルシフェロールはパブリックコメントの募集中であると聞いております。

私の方からの御報告は以上です。

ほかに事務局から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。

以上をもちまして、第132回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

きょうも御熱心に御討論いただきまして、ありがとうございました。