

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## 第137回会合議事録

1. 日時 平成27年5月25日（月） 14:00～17:40

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

- ・ DP-No.2株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミルバリルグリシン
- ・ コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシMON87411系統（食品・飼料）

(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、村田委員

(事務局)

姫田事務局長、東條事務局次長、鋤柄評価第二課長、池田評価情報分析官、高崎評価調整官、北村課長補佐、勝田係員、松井技術参与

### 5. 配布資料

資料1 平成27年度食品安全委員会運営計画

資料2 食品健康影響評価に関する資料

- ① DP-No.2株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミルバリルグリシン
- ② コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシMON87411系統（食品）
- ③ コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシMON87411系統（飼料）

## 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137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、宇理須専門委員及び近藤専門委員は御欠席です。

本日の議題であります、新規の品目であります「DP-No.2株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミルバリルグリシン」、それから「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシMON87411系統」の安全性についての審議となります。

それでは、お手元の資料の確認をいたしたいと思います。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1「平成27年度食品安全委員会運営計画」。

資料2「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、机上配布資料としまして「RNAi機構を用いたトウモロコシの評価について」ということで、先日の勉強会のまとめでございますが、資料と一緒に先生方にはお送りさせていただいております。その他勉強会に使用しましたパワーポイントの資料がございます。

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、調査会終了後に回収させていただきます、次回に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。

また、本日は審議品目の申請企業であります日本モンサント株式会社をお呼びしております。新規品目であります「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシMON87411系統」の審議の際に、質疑応答に対応していただくことを予定しております。

なお、本日は食品安全委員会の村田委員に御出席いただいております。また、少し遅れておりますけれども、事務局長の姫田が出席予定となっております。

○澤田座長 初めに事務局から、今年度の運営計画についての御説明があると伺っております。説明をお願いいたします。

○池田評価情報分析官 それでは、資料1をお手元に御用意ください。

1枚おめくりいただきまして、審議の経緯がございますけれども、平成27年度の運営計画ということで、3月24日の第544回食品安全委員会において御了解をいただいたものでございます。

中身がございますけれども、2ページをお開きください。「第1 平成27年度における委員会の重点事項」がございまして、(2)に5本の重点事項を記載してございます。平成26

年までは4本でございましたが、今年度から④を独立した項目として立てております。

中身を簡単に御説明いたしますと、①の食品健康影響評価につきましては、従来に加えて、新たな評価方法の活用ということを加えております。

②のリスクコミュニケーションにつきましては、リスクコミュニケーションのあり方について御検討いただいております報告書を取りまとめていただいて、戦略的にリスクコミュニケーションを実施するということにさせていただいております。

③でございますが、新たな評価方法の企画・立案ということで立てておりまして、食のグローバル化などに対応するために国内外の最新の知見を収集するとともに、研究・調査事業を活用して、新たな評価方法の検討を行うということにさせていただいております。

④は新たに立てたということで申し上げましたけれども、従来も中身的には行っていたところでございますが、海外の情報発信、関係機関との連携ということで、さらに連携の強化、新たな機関との協力文書の締結についても検討するというところで、今回新たに立てたということでございます。

⑤は従来どおりでございます。

その下の「第2 委員会の運営全般」でございますが、中身は3ページからになりまして、親委員会や専門調査会の開催。委員会と専門調査会の連携等について記載をさせていただいております。「(6) 事務局体制の整備」という項がございますけれども、評価体制等の充実を図るということと、新たな評価方法の企画・立案機能を担う評価技術企画室を設置するということにさせていただいております。この評価技術企画室につきましては4月10日に発足をしております。

「第3 食品健康影響評価の実施」に関しましては、リスク管理機関から要請されました案件につきましては、計画的・効率的な調査審議を行うということで、従来どおりでございますが、企業からの申請に基づくものにつきましては、特に標準処理期間内に通知できるように計画的に行うということにさせていただいております。

4ページでございます。「2 評価ガイドライン等の策定」という項目がございますけれども、平成27年度におきましても、引き続き、ベンチマークドーズ法の適用方法について検討を行うと記載をしております。

3は、自ら評価の案件でございます。中身は記載のとおりでございます。

5ページにまいりまして、「第4 食品健康影響評価の結果に基づく施策の実施状況の監視」でございますが、平成27年度におきましても、年1回ほどリスク管理機関に対しまして調査を実施いたしまして、結果を踏まえて、必要に応じ、勧告、意見の申出を行うこととさせていただいております。

その下の「第5 食品の安全性の確保に関する研究・調査事業の推進」につきましては、これまで研究課題の選定を行う際に食品安全委員会として推進すべき方向性につきまして、おおむね5年間のロードマップを策定して行ってまいったところですが、昨年12月にそのロードマップの全面改定を行っております。

ロードマップというのが、その「方向性について」というものでございますが、6ページにまいりまして、この新しいロードマップに沿った課題に焦点を当てて、必要性の高いものを選定していくということにさせていただいております。

6ページの下段になりますけれども、2のほうに調査の推進について記載がございます。調査に関しましても同様にロードマップに掲げる事項に沿って優先実施課題を定めて、必要性の高いものを選定するというようにさせていただいているところです。

「第6 リスクコミュニケーションの促進」に関しましては、さきに申しあげましたように報告書を取りまとめまして、そこで掲げられました課題への対応に重点を置いて、戦略的に実施をしていくというところでございます。

その下に、そのコミュニケーション手段として（1）～（6）まで掲げておりますけれども、これらについては媒体の特徴を踏まえて、迅速に最新の情報を発信するというようにさせていただいております。

8ページでございます。「2 『食品の安全』に関する科学的な知識の普及啓発」に関しましては、これまで行ってまいりました連続講座のようなものを27年度は地方での開催も含めて実施していくということにしております。また、講義の内容につきまして、インターネットでの公表とともに、多くの方が活用可能な形で提供をしていくということにさせていただいております。

（2）といたしましては、普及啓発に関しましても、季刊誌の「キッズボックス」の総集編など、わかりやすい啓発資料を用いて実施をしていくということにございます。

その下の（3）につきましては、26年度と同様でございます。

9ページにまいりまして、「第7 緊急の事態への対処」でございますが、同様でございます。

「第8 食品の安全性の確保に関する情報の収集、整理及び活用」に関しましては、本文の1行目後半から、国際機関等々と書いてございますが、具体的に情報のソースを書いて、どういう情報ソースからとってくるのかということに記載しているということにございます。

10ページにまいりまして、「第9 国際協調の推進」という項目がございます。予定されております国際会議等への参加について列記をさせていただいております。

この第9に「（3）海外の食品安全機関等との連携強化」の項目がございますけれども、従来から実施しておりました欧州食品安全機関（EFSA）及び豪州・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）との定期会合を行いまして、例えばフランスのANSES等のほかの機関との情報交換、連携強化のための会合を開催して、協力文書の締結も検討していくことにさせていただいております。

本文は以上でございますが、別紙1～5の紙がついております。別紙1につきましては、企画等専門調査会の審議スケジュール。別紙2は、「自ら評価」案件についての選定スケジュール。別紙3～5は、調査研究の実施のスケジュールとなっております。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、ただいまの御説明につきまして、質問等はございませんでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、次に、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、相違等はございませんでしょうか。

○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、DP-No.2株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミンバリングリシン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。

○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「DP-No.2株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミンバリングリシン」の水色の紙ファイルの御準備をお願いいたします。

初めに補足をいたしますと、本品は本年2月に本調査会での審議を終えて、同4月に食品安全委員会への報告を行った「DP-No.1株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミンバリングリシン」のうち、DP-No.1株にさらに変異を加えたDP-No.2株というものを利用しております。

それでは、御説明いたします。申請資料の1ページ、1といたしまして本申請品目であるグルタミンバリングリシンの概要になりますが、本品は指定添加物に該当し、その概要は同ページの表に記載のとおりです。

用途は2ページになりますが、コク味を付与する調味料として使用されております。

3ページ、2といたしまして、製造方法の概要が記載されております。4ページも併せて御参照いただきたいのですが、まず、●●●と●●●を●●●生産菌DP-No.2株が発現する●●●で縮合することにより、●●●が得られます。次に、この●●●と●●●をGG-No.1株が発現する●●●により縮合することで、本物質が生成されます。

作製の目的につきましては、現行製法に比して●●●溶剤等の使用を減らすことで、環境負荷が軽減されるということです。

6ページ以降は、本申請品目の作製過程で用いられるDP-No.2株とGG-No.1株について、

その作製方法が記載されております。まず、DP-No.2株でございますが、こちらは冒頭で御説明いたしましたように、本年2月の本調査会にて御審議いただいたDP-No.1株にさらに変異が加えられたものになります。詳細については添付資料1の3ページに詳細が記載されてございますが、DP-No.1株を作製する際に導入された●●●遺伝子に変異を加えた●●●を作製しまして、それを宿主である*E.coli* ●●●に導入することで作製されております。

申請資料の6ページに戻っていただきまして、作製方法の続きになります。(2)といたしまして、本株の宿主はバイオセーフティレベル1に属する*E.coli* K-12株の突然変異株、*E.coli* ●●●になります。

(3) ベクターについては、GILSPに該当する●●●を利用しております。

(4) 挿入遺伝子については、●●●遺伝子となりますが、こちらはその有害性の報告がない●●●遺伝子に●●●が●●●が導入されたものとことです。

(5) プロモーターについては、●●●の生成効率を高めるため、●●●株由来のプロモーターに●●●を加えたものを用いております。

(6) 抗生物質耐性マーカー遺伝子につきましては、●●●に由来するアンピシリン耐性遺伝子を用いております。

以上を*E.coli* ●●●に導入することで作製されたとのことです。

続きまして、GG-No.1株につきましては、こちらは本年4月に安全性審査が終了した同社のグルタミルバリルグリシンで使用された株と同一になりますので、ここでの説明は割愛させていただきます。

次に10ページ、2-4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3ページで御説明した工程により得られたグルタミルバリルグリシン反応液を殺菌、精製等により結晶を得た後、乾燥・包装することによって製造されるとあります。なお、両株ともアンピシリン耐性遺伝子を有しておりますが、培養工程ではアンピシリンを使用していないとの説明も記載されております。

11ページ、最後に本申請品目と現行品目との比較がなされております。

3-1といたしまして、食品添加物の成分規格分析結果では、現行品と同等であるとの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して、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おります。

14ページには、3-3といたしまして、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」で規定しております表記2つの要件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、先生方から御意見をいただきたいと思います。

まず、申請書の10ページまでで、食品添加物としての概要と製造方法の概要。そこまで御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。よろしいでしょうか。前とほとんど似たようなお話かと思います。

それでは、続きまして、最後の14ページまでで、同等性の確認のところでありますけれども、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。早く進んでおりますけれども、よろしいですか。

それでは、特に御意見がなくて、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、申請書案について御説明いたします。資料2といたしまして、申請書を束ねた冊子を配布しているのですが、そちらの1ページ以降が本申請品目の評価書案になりますので、御準備をよろしく願いいたします。

4ページ、Iとして本申請品目の概要ですが、評価を終了したDP-No.1株及びGG-No.1株を利用して生産されたグルタミルバリルグリシンにおいて使用された2つの株のうち、前者の株に改変を加えたDP-No.2株を利用して生産されたグルタミルバリルグリシンであると記載しております。また、両株とも毒素産生性及び病原性はなく、バイオセーフティレベル1に分類されるとともに、抗生物質耐性マーカー遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子を有するが、その有害性は知られていないことを記載しております。

IIといたしましては、食品健康影響評価に係る事項を記載しております。

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といたしまして、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5ページになりますが、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評価基準」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、評価書案につきまして、御意見、コメントをいただきたいと思います。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います。全体を通しまして、御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、特に修正がないようでありますので、これで食品安全委員会に御報告しまして、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。ありがとうございました。

それでは、次に「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシMON87411系統」についての審議に入りたいと思います。

まず、事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 申請書の説明に入ります前に、冒頭で御紹介いたしましたけれども、本日は申請書の日本モンサント株式会社をお呼びしております。具体的な対応になりますけれども、前回と同様に、申請品目の御審議をいただいた後に申請者に対する質問事項等がございましたら、整理していただきたいと思います。その後に説明者に入室をしていただきまして、質疑応答を行います。質疑応答終了後、説明者には退室していただき、審議を再開していただくこととしておりますので、よろしく願いいたします。

○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「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシMON87411系統」の橙色のファイルをお願いいたします。

初めに補足をいたしますと、本品目には3つの遺伝子が挿入されております。1つ目は、ウエスタンコーンルートワーム由来の遺伝子で、摂取されることによりまして、標的害虫であるウエスタンコーンルートワームの体内でRNAiを誘導することで殺虫効果を示す*DvSnf7*遺伝子断片。

2つ目が、*Bacillus thuringiensis ssp. kumamotoensis*に由来する改変*cry3Bb1*遺伝子で、コウチュウ目害虫に抵抗性を示すBtタンパクを発現するもの。

3つ目は、*Agrobacterium sp. CP4*株に由来する改変*cp4 epsps*遺伝子で、除草剤グリホサートに対し耐性を示すものとなります。

このうち、*DvSnf7*遺伝子以外につきましては、本調査会において、その遺伝子の安全性などを別品目で既に評価した実績があることから、以降の説明では主に新規の遺伝子となります。*DvSnf7*遺伝子及びその生産物について、私の方から御説明いたします。

それでは、1ページをお願いします。第1の1の項目からですが、(1)の宿主については、トウモロコシのうちデント種のLH244系統を利用しております。

(2) DNA供与体について、本系統における導入遺伝子は先に御説明いたしました3つの遺伝子になりまして、*DvSnf7*遺伝子の供与体はトウモロコシの標的害虫であるウエスタンコーンルートワームになります。

(3) 挿入DNAの性質等につきましては、*DvSnf7*遺伝子が標的害虫であるウエスタンコーンルートワームに取り込まれた後、RNAiを誘導して*DvSnf7*遺伝子の発現を抑制することで殺虫効果を示すものになります。当該遺伝子を含む合計3つの遺伝子は、アグロバクテリウム法により導入されております。

第1の4ページの5までは記載のとおりです。

6といたしまして、検討が必要とされる相違点は、組換え由来のdsRNA及びタンパク質

の産生を除き、従来のトウモロコシと相違はないことから、本系統においては比較対象となり得る既存の宿主がある、としております。

第2といたしまして、利用目的等の事項ですが、本系統を栽培することにより、栽培農家はコーンルートワームによる被害を防ぐことができるとともに、異なる作用機作を組み合わせることによりまして、抵抗性獲得品種が出現するリスクを減らすことができる、としております。

続いて、6ページ、第3の宿主に関する事項になります。1～3の項目については記載のとおりです。

4番目といたしまして、アレルギー誘発性に関する事項ですが、トウモロコシはアレルギー誘発性食品とは考えられない、と記載してあります。

5の項目について、トウモロコシに感染する可能性のある病原菌等がヒト等に感染することは知られておりません。

6、7の項目については記載のとおりです。

次に、第4、ベクターの項目について、になります。

1については記載のとおりです。

2の性質についてですが、(3)といたしまして、既知の有害塩基配列を含まないこと、の項目ですが、使用するプラミド中に含まれる全ての遺伝子配列の性質は明らかであり、既知の有害塩基配列は含んでいない、とあります。

(4)ベクター中の薬剤耐性遺伝子の有無について、ベクターにはスペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性遺伝子である*aadA*遺伝子が含まれ、これを選択マーカーとして用いた、とあります。

(5)伝達性につきましては、伝達を可能とする配列は含まれていない、とのことです。

12ページからの第5では、挿入DNA等に関する事項が記載されております。

1の(1)といたしまして、挿入DNAの供与体についてですが、*DvSnf7*遺伝子断片はコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属するウエスタンコーンルートワームに由来いたします。改変*cry3Bb1*遺伝子及び改変*cp4 epsps*遺伝子については記載のとおりです。

(2)安全性についてですが、3つの遺伝子ともヒト等に有害性を示す報告はされておられません。

12ページの後半からは、挿入遺伝子のクローニング方法等について記載しております。*DvSnf7*遺伝子断片についてはウエスタンコーンルートワーム由来の*DvSnf7*遺伝子のRNAを逆転写の後、PCRによって増幅することで得られ、間にIntervening Sequenceを含んで当該断片が逆方向反復の形で含まれることでヘアピン構造のdsRNAとなる、と説明しております。

改変*cry3Bb1*遺伝子につきましては、*cry3Bb1*遺伝子をもとにクローニングの際の制限酵素切断部位の挿入及び殺虫活性を高めることを目的とし、アミノ酸が置換されるような改変がされております。

改変*cp4 epsps*遺伝子については、植物内での発現が最適化されるような塩基配列の改変が加えられている、とのことです。

続く、(2) 切断地図に関する事項については記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能についてですが、ここでは*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAについて説明がされております。

14ページ、i といたしまして、作用機作についてでございます。本トウモロコシにおいて産生されるdsRNAが標的害虫であるウエスタンコーンルートワームに摂取されると中腸細胞内に取り込まれまして、ウエスタンコーンルートワームの細胞の*DvSnf7*遺伝子の発現が抑制された結果、恒常性の維持ができなくなることから殺虫効果をもたらす、といった旨の説明を記載しております。

21ページに飛んでいただきまして、今度はii といたしまして、特異性に関する項目でございます。当該dsRNAの混餌投与試験等の結果から殺虫スペクトルは非常に狭く、コウチュウ目ハムシ科のヒゲナガハムシ亜科のみに限られる、とのことです。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子については、本系統の作製過程において、先のとおり、*aadA*遺伝子が使われているものの、本系統に当該遺伝子は含まれていないことを確認しております。

続いて、3についての事項ですが、挿入遺伝子の発現に係るプロモーター及びターミネーターは(1)及び(2)に記載のとおりです。

29ページのプロモーター及びターミネーターについての事項は記載のとおりになりまして、30ページの(3) その他の配列につきましては、導入した3つの遺伝子の発現抑制に関する遺伝子が各々挿入されております。

4については記載のとおりです。

31ページの5といたしまして、発現ベクターに関する事項になります。

(1) については、次のページの図7とあわせて記載のとおりです。

(2) 目的外オープンリーディングフレームの有無については含まれていないこと。

(3) 意図する挿入領域については、図7のLeft Borderから Right BorderまでのT-DNA領域全て。

(4) 純化の項目については、目的外遺伝子の有無は含まれていない、とそれぞれ記載してございます。

37ページの6として、DNAの宿主への導入方法及び交配についてになります。導入方法は先のとおり、アグロバクテリウム法になります。形質転換を行った未成熟胚をグリホサート及びカルベニシリンを添加した培地にて生育して選抜を行い、得られた再分化後の個体を自家受粉及び交配させることで本系統を育成しております。詳細は38ページ及び39ページを御確認いただければと思います。

40ページ、第6といたしまして、組換え体に関する事項になります。1の(1)の①コピー数等についてでございますが、当該項目につきまして、本品目においては、これまでは

サザンブロット分析をこの項目で行っていたのですが、今回の品目から次世代シーケンス技術及びバイオフィーマティクス技術による解析を行っております。

分析結果等の情報につきましては、48ページ目までにそれぞれ記載されているのですが、概要をお話ししますと、まず、コピー数は1コピーであったこと。外骨格領域は含まれていなかったこと。本システムの挿入部位において内在性配列に118bpの欠失があったこと等が確認されております。本分析方法を用いた当該項目の記載について、先生方のほうで御意見等がありましたら、後ほどお伺いできればと思います。

49ページ、先ほどの項目の続きになりますが、2)の項目については、近傍配列がトウモロコシゲノム由来であること。

51ページ、3)につきましては、内在性の遺伝子に対する影響は考えにくいことがそれぞれ記載してございます。

続く(2)といたしまして、オープンリーディングフレームの有無についてですが、検索によりヒットしたオープンリーディングフレームが8個確認されたものの、これらは全て既知のアレルゲン及び毒性タンパク質及び生理活性のあるタンパク質との構造相同性はなかったとのことです。

54ページからは2といたしまして、遺伝子産物の発現部位等。62ページの3からは1日タンパク摂取量が記載されておりますが、こちらについては記載のとおりとさせていただきます。なお、*DvSnf7*遺伝子由来のdsRNAにつきましては、タンパク質の発現に関与しないことから、その旨の事実関係を記載するに終始した内容となっております。

62ページ、4といたしまして、遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する事項です。本品目は遺伝子産物といたしまして、dsRNAとタンパク質が挙げられますが、食物アレルゲンは全てタンパク質であると考えられていることから、dsRNAについては本項目に係る評価を行っていないものの、参考といたしまして、ヒトに対する*DvSnf7*遺伝子断片のdsRNAの安全性に関しまして、71ページまでにかけて考察をしております。

1)といたしまして、ヒトがRNAを安全に食してきた歴史でございますが、具体例としてイネを挙げておまして、イネ中に含まれる低分子RNAの一部には、ヒトの生理機能等の重要な遺伝子配列と100%の相同性を有しているものがあるが、これまで健康被害等の報告は確認されていないこと。

64ページに飛びまして、2)といたしまして、体内に入ったdsRNAはさまざまな核酸分解酵素による暴露を受けるとともに、細胞内に取り込まれるには物理的な障壁が存在すること。

次に、67ページ、3)といたしまして、経口摂取したRNAによる哺乳動物への影響は、これまでの知見からは想定されにくいこと。

68ページの4)といたしまして、今回の*DvSnf7*遺伝子断片由来のdsRNAとヒトの転写産物配列との間で連続する21塩基の一致がないこと。

最後に69ページになりますが、5)といたしまして、当該dsRNAの殺虫スペクトルは非

常に狭く、暴露量も非常に低い値であり、かつ宿主であるトウモロコシの生育等にも影響を与えないこと、の以上5つの理由から、当該dsRNAがヒトに及ぼす影響は考えられないと考察しております。

71ページの後半からは、改変Cry3Bb1タンパク質及び改変CP4 EPSPSタンパク質についての検討を行っております。

(1)、(2)については記載のとおりです。

(3)といたしまして、物理化学的処理に対する感受性についてですが、まず①の人工胃液処理につきましては、両タンパク質とも15秒以内で消化されることを確認しております。

次に②といたしまして、人工腸液処理についてでございますが、改変Cry3Bb1タンパク質については、分解産物は24時間後も分解されなかったこと。改変CP4 EPSPSタンパク質については試験開始10分後の試験結果から、人工腸液中で消化されることをそれぞれ確認しております。

なお、Cry3Bb1タンパク質を初めとしたCryタンパク質は、トリプシン等のタンパク質分解酵素に対して安定で、この処理によりコアタンパク質に変換されることが知られているため、分解されなかったという先ほどの結果は問題になるような結果ではない旨を記載しております。

81ページになりますが、③加熱処理に関してでございます。両タンパク質とも加熱処理により免疫反応性を失うことが確認されております。

85ページ、(4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性についてですが、両タンパク質とも既知のアレルゲンと相同性が認められたタンパク質はなかったと記載しております。

続く、5については記載のとおり、挿入遺伝子は世代間で安定していることが確認されております。

91ページ、6といたしまして、代謝経路への影響になります。*DvSnf7*遺伝子断片及び両タンパク質ともこれまでの知見から、代謝経路への影響を与える可能性は低いと考察しております。

93ページ、7といたしまして、宿主との差異についてであります。構成成分の差異を見るため、主要構成成分等について分析を行っております。分析値が得られた地上部8項目、穀粒48項目につきまして、非組換えトウモロコシとの比較を行ったところ、地上部については灰分が、穀粒についてはタンパク質やヒスチジン等の計11項目について統計学的有意差が確認されました。

有意差が確認された各項目については、本系統における平均値と非組換えトウモロコシとの平均値との差異が対照としている非組換えトウモロコシの変動の範囲か否かを確認するといった方法をとっております。これは確認された平均値の差が導入遺伝子による差であるとあったとしても、対照の非組換えトウモロコシが示す変動の範囲であれば、それは

生育環境により示す変動の範囲であるとの考え方で、2014年に論文となっているものを引用しております。

この考え方にに基づきますと、有意差が確認された項目は全て非組換え体の変動の範囲内となるため、本システムの構成成分は従来のトウモロコシと同等であると結論づけられるとのことです。このような考え方で構成成分について論じること、あるいはその場合の記載方法について御意見等があれば、後ほどいただければと思います。

なお、参考までに従来どおりにILSIのデータベースとの比較も行っておりますが、有意差が確認された項目でも、その全てについて当該データベースの範囲内であったことも記載されております。

111ページ、8といたしまして、諸外国における認可状況につきましては、先月の勉強会時に御説明した状況と変化はありませんので、ここでの説明は割愛させていただきます。

9の栽培方法、10の種子の管理方法については記載のとおりで、第7といたしまして、以上、第6までの結果から安全性を確認できたため、追加の試験等は不要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、申請書につきまして、項目ごとに御意見をいただきたいと思います。

まず、第1～第4のベクターに関する事項まで、11ページまでで御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。よろしいですか。

それでは、続きまして、「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」のところで12～39ページまでです。この間につきまして、御意見、コメントをお願いしたいと思います。

○橋田専門委員 20ページの図4の右側のBの図ですが、こちらはAの図で進行しなくなる場所をバツ印に入れているだけですが、実際に論文のほうを見ると、脱ユビキチン化が止まるですとか、ちょっと別の説明がしてあるので、論文に沿った形での図にさせていただければと思います。

○澤田座長 本文と図がちょっと違うということですね。詳しいところはまた事務局のほうにお願いしたいと思います。

ほかによろしいでしょうか。

○児玉専門委員 31ページの発現ベクターに関する事項の(1)の制限酵素による切断地図に関する事項に関して、裏の図7を見ると、今回、次世代シーケンズになってしまったので、もう制限酵素を記入していないですけれども、ガイドラインのほうは書くようになっていたのですが、これは運用上の話だけなのですが、その点はもうそれで実質上よろしいとしてしまっているのかどうかということだけ確認願えたらと思います。

○澤田座長 ガイドライン上は書くことになっています。これは後のほうで制限酵素を使った例が出てきましたでしょうか。出て来ないですか。参考までに一応出してもらいます

か。

○児玉専門委員 もともと制限酵素サイトを入れろというのは、サザンブロットィングの際にリファレンスにするからということだと思っているのですけれども。

○澤田座長 ただ、マイナーはともかくメジャーな場所くらいは。

○児玉専門委員 入れること自体は大した手間ではないと思いますが、こうなってしまうと、入れる意味は実質上はなくなってしまったのかなということ、多分抜いたのではないかと思います。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

○児玉専門委員 33ページの表4のintervening sequenceの*DvSnf7*と*DvSnf7*の間に挟まれた、これはループの配列ですけれども、ここは一応転写されますので、由来が書かれていないので、どういう配列を使ったのかという由来を書いていただきたいと思います。

○小関専門委員 今のところは私も非常に気にかかっている、33ページのところは要するに全部intervening sequenceという格好で書いてありますけれども、すなわちマルチクローニングサイトとか、そういうのと全く同じとしているのですが、ここだけが150bpですね。だから、これはintervening sequenceと書くから、みんな何かおかしいなという気になってしまうので、ここは要するにループ領域とか、そういう書き方にしてもらったほうがいいのかなという気がします。それで要するに何かのプラスミド由来であれば、それ由来ですと書いてもらえれば、全く問題はないと思います。そこは不明確だと思います。

○澤田座長 一部は制限酵素部位の断片みたいなものが入っているかもしれませんが、ループをつくるための設計を工夫している可能性はあるわけですね。

ほかはいかがでしょうか。この殺虫活性がいろいろ説明をいただいているようでありませぬけれども、ここはこれで大体よろしいですか。

○小関専門委員 すみません、もう一点だけよろしいでしょうか。戻って申しわけないのですけれども、これはやはり明記されていないので誤解を生じるのではないかと思います。結局この32ページの図を見るとわかるのですが、P-*e35S*からI-*Hsp70*でこの方向で、方向的には逆向きになるように配列を入れているはずですね。順方向に入れたらフレームができてしまう可能性があるのですけれども、これは逆方向でいいですか。この中には要するに絶対にループになるという保証を言っているのですけれども、ループにならなかったときにここからは何もペプチドが出てこないということでもいいのですよね。何か、あれとってしまったのです。

○澤田座長 よく理解できなかつたのですけれども。

○小関専門委員 ですから、どういう方向で入れたのか、絵では書いてあるのですが、どのような部分配列であるというのか、部分配列であっても、それがまずファーストメチオニンを当然外したら間違いないと思うのですけれども、その部分配列が5'-3'・3'-5'のルーピングにしているのか、この絵でいくと3'-5'・5'-3'のルーピングでいいのかな。そこを明確に、要するにDNAというのは部分の問題ではなくて、方向の問題があるので、そこはも

う少しきちんと書いておいていただければ親切かなと思います。それがないと評価のしようがないです。

○澤田座長 RNAとしては、I-*Hsp70*から始まって、T-*E9*の直前まで行くわけですか。

○小関専門委員 そのはずだと思います。

○児玉専門委員 多分プロモーターから見て、アンチセンス、ループ、センスの形で入れているので、それがわかるように表の中に入れてもらえればいいということではないかなと思います。

○澤田座長 一本鎖。

○児玉専門委員 転写されれば一本鎖。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

○松井技術参与 今の小関先生の質問に関連して、16ページの図2にイントロンと思われるものとターミネーターがあって、それが転写されて、一応ループと赤い色とグリーンの色になっているのですけれども、これはどのように理解をしたらよろしいでしょうか。もしわかりましたら、一本鎖の発現してくるRNAの長さにも対応してくるので、教えていただければと思います。

○小関専門委員 16ページの図ですけれども、これがある意味、不正確。緑が*hsp*の領域で、プロモーターはその前にいなければいけなくて、これだと方向性のある、このところで青印の矢印で、真ん中はさっき問題になったループ配列で、赤の部分というのがターミネーターの途中まで来るはずで、丸の中に書かれているのがDNAですから二重鎖になります。ですから、片側鎖はこの方向で確かに意味があるのですけれども、裏側鎖、相補鎖がありますね。そのところは、この図では意味をなしていない。ところが、それが転写されてきたときに一本鎖RNAとして片側のみ出てくるから、このところの細胞質の図になるという。だから、DNAにおいて書かれる矢印の方向ですね。それを理解していただかないとならないのだと思います。

そういったときに私が確認したいのは、青印の矢印、16ページの図でいったときに、これは本当にこの方向であれば、順方向になりますね。順方向で入れるとすると、*hsp*のイントロンだけではなくて、エクソンが入っているはずですね。エクソンからのスルーで、これは順方向で、この部分、タンパク質、アミノ酸配列ができてしまう可能性があるはず。だから押さえたいと言ったのです。5'-3'で入れているのか、3'-5'で入れているのか。そうでないと、ヘアピンを組めなかったら、ペプチドができますよ。

○児玉専門委員 後半にORFが検索というところがあって、そこで一応保証はとっているの、多分できないのだとは思いますが。

○小関専門委員 私もそう思うのですけれども、後半というよりも最初の段階でびしっと書いてもらったほうが誤解が生じないと思います。コンストラクションのところはそのところを明確に、特に*hsp*のイントロンではなくて、第1エクソンの部分が入っていると彼らは明記しているので、すなわち、そこにはファーストメチオニンがあるということです

から、きちんとそこは押さえてほしいなと思います。

○松井技術参与 ありがとうございます。そうしたら、図のグリーンはイントロンの一部分で、赤はターミネーターの一部という理解でよろしいということですね。

○児玉専門委員 ヒートショック。

○松井技術参与 ヒートショックですね。

○澤田座長 緑が *hsp* ですか。

○小関専門委員 33ページの表を見ていただくとわかるのですが、*I-Hsp70*のところでヒートショックタンパク質 *hsp70*の第1番目のイントロンとその近傍エクソンの一部と書いてあります。すなわちファーストメチオニンがそこにいるのか、いないのか。エクソンが前にあって、コーディングのあるもの。その *hsp* については私は勉強不足なので、そこも含めて教えてもらいたいなと思います。

○澤田座長 説明が不足しているところが何点かあるようで、説明を追加してもらったほうがいいのかと思います。

○小関専門委員 たまに遺伝子で第1エクソンのところにノンコーディングであって、イントロンがいて、第2エクソンの途中からファーストメチオニンが始まるケースですが、この *hsp70* はそうなのかなと。勉強不足だと怒られたらしようがないのですが、教えてくださいということです。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

○中島専門委員 同じように、33ページの表で *DvSnf7P* が2つあるのだけれども、この説明のところは全く同じ記述になっていて、どちらが順方向でどちらが逆方向になっているのかがここを見てもわからないので、そういうところの説明が不足していて、きちんと把握し切れない。

もう一つ、これはもう少し後にも係るかもしれないのですが、今回の試験は全部この *dsRNA* を単離してきて、もしくは合成してきて薬剤試験をしているのですが、その *dsRNA* にこのトウモロコシの中でちゃんとそのとおりの形をとっているかどうかというのは、これは最後までわからないわけで、この量を発現しているトウモロコシでその毒性試験をやってくれないと、*RNA* というのはどういう形をとるかで当然機能が変わってくるので、この試験は全て *dsRNA* で毒性試験とかやっているのですが、そのトウモロコシを食わせて試験をしているわけではないので、そこを確認をとらないと何が起こるのかは読み切れないと思います。

○澤田座長 後のほうのお話は安全性のところ、また御意見がいろいろ出るかと思いますが。とにかく植物の細胞で、この絵のとおりになっているかという情報もないですね。植物細胞の中というのは *RNase* はかなりあって、*ds* 以外の部分はかなり端っこが切れるなどということはあるのでしょうか。短くなる可能性はないでしょうか。

○児玉専門委員 一応ループの部分とか、はみ出た足の部分というのは切られて、普通は速やかに分解されるのですが、形質転換体によってはループの部分はきれいに残っ

たりも、ノーザンをするとききれいにバンドとして出てくるケースもあるみたいで、必ずしも全てが即座に分解されますというわけではないようです。

○中島専門委員 私もこの辺はよく知らないのですが、植物の中でこのステムアンドループを発現させたら、植物の中でRNAiが発動して、こいつが分解されそうな気がするのですが、それは今おっしゃられたように必ずしもすぐに分解されて、なくなってしまうというわけではないということなのではないでしょうか。

○児玉専門委員 今回のこの系統の場合は発現量というか、発現量と書いてあって、発現量を蓄積量に直してくださいと言うつもりではいるのですけれども、蓄積量が非常に少ない計算になってしまっていて、それは基本的にはDicerで分解される経路がきちんと働くはずですので、分解され残りが出てきて、その切れ残りで虫に対して効いているという説明ですので、当然、植物細胞の中でDicerできれいに切られているはずですよ。そうでないとおかしい。

○中島専門委員 私も心配したのが、そうやって植物の細胞で、あちらこちらでDicerで切られているはずだからこそ、この毒性試験でやっているとおりのdsRNAの形にはなっていないだろうと思うのですが、どうなっているのでしょうか。効いていけばいいのかもしれないですけども。

○澤田座長 その点は後でしましょう。

○児玉専門委員 申請者に聞いてもらったほうがいいと思います。

○澤田座長 私も疑問に思うのは、穀粒の場合でこのdsRNAはどのような格好でいるのかなと思うのですが、かなり特殊ですね。普通の葉っぱみたいな普通の細胞と違うのですけれども、全体的にしているのか、局在しているのか、情報が何もないので、よくわからないところがありますね。

○児玉専門委員 余り調べられた例がないのではないかな。

○澤田座長 ほかはいかがでしょうか。

それでは、組換え体に関する事項に移りたいと思います。まず、53ページの遺伝子導入に関する事項、40～53ページにかけて御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。

○小関専門委員 先ほどの児玉先生のお話であつたとおりで、次世代を使ってやっていて、制限酵素が今回は一切入っていないのです。これはもう一度、基準を見たら、要するに組換え体については制限酵素サイトを記せと書いてあるのです。制限酵素サイトを書いてくださいねと言えるところは、32ページの図しかないですね。これは申請者の40ページ以降の図については、これで十分というふういきちんと、これはコンセンサスをとっておかないと今後のときにも引かかるので。先生方、それでよろしいですね。

○澤田座長 よろしいかと思えますけれども、よろしいですか。

先ほど事務局のほうからお話がありましたように、このホールゲノムシーケンスでやった結果が書いてありますが、この書き方等はこのあたりでよろしいでしょうか。

あと、トウモロコシはホールゲノムもかなりわかっているのですけれども、どの **chromosome**に入ったかの記載はありましたか。

○児玉専門委員 私の見た感じでは、1カ所というだけで、どこの **chromosome**とは別に書いていなかったかなと思います。

○澤田座長 1カ所なので、場所もついでに書いてもらったほうがよろしいですか。

○小関専門委員 私の感じでいくと、全ゲノムを決めたトウモロコシがある意味、変なトウモロコシなのです。何であんなのに決めたのだろうと私は思った部分があるので、そう簡単に対応をとれないのかもしれないので、特にゲノムはでかくて、いろいろ吹っ飛んでいたり、トランスポゾンで染色体が千切れてしまったりするという現象も見られているので、それはイネみたいに簡単なものとはちょっと違うので、要求してもいいけれども、それがどれくらいの安全性の情報になるのかなというのは、1カ所だということで十分ではないかなという気がします。

○澤田座長 情報としてわかっているならば、書いていただくということかと思いますが、ほかはよろしいでしょうか。

○児玉専門委員 次世代に関して、今回のサザンの代わりなので、サザンの代わりになり得るのかどうかというのを考えた時に、トウモロコシの配列を使っていた場合に、その部分だけが千切れて、ほかのゲノムに入った場合に、それは引っかけられるのですかということが一番気になったのですけれども、その意味では引かけられるのですが、結局その次世代シーケンスで **T-DNA**の構造自体を決めることが目的ではやっていないというのがどうも本当のところのようで、ゲノムに入った数だけをとにかく引っかけている。構造は **PCR**でジャンクション配列から増やして全体を見るという形で決めているというのが今回のやり方ようです。

○小関専門委員 1つよろしいでしょうか。それはある意味でわかる部分があって、例えば、ある果物のジュースで次世代をかけると、約3割が土中細菌とかそういうものです。地這いで育てるようなものだったら **DNA**が入ってきて、皆さんはかなりゲノム的には汚れたジュースを飲んで健康なのです。健康ジュースとされています。それは事実なので、そうすると、その数でこれで引っかけていって、圧倒的にコピー数で言ったらノイズを拾っているとみなされているのだろうなと私はそこは思っているのです。そうでないと無菌のものでやらない限りは、この議論はひっくり返ってしまうと思います。 **NG**のものを使って、さらに後代までやっているのだから、そこはそれ以上は無理というか、非現実的かなという気はしました。

○澤田座長 今までは一応サザンでコピー数と近傍が同定されていて、何か非常に変なことが起きていないということが言えればオーケーだったと思うのですけれども、ホールゲノムでそれとほぼ同等のことが言えれば、よしとしてもいいのかなと思います。

○小関専門委員 一応コンタミでさっき言ったようなケースですね。そうすると内在性の遺伝子のコピー数に比べると全然低いとか値がおかしいとか、逆に多いときもあるかもし

れませんけれども、そこで判別は十分につくはずだろうと私は思います。

○澤田座長 よろしいですか。

○飯専門委員 児玉先生の説明を聞いて、あれと思ったのですが、次世代での解析に基づくコピー数とか1カ所に入っているとかいう結論については問題ないと思っているのですが、ジャンクションしか見ていないとなると、今までの考え方からいけば、形質転換体の中でのT-DNA挿入部とその近傍の配列を改めて決め直して、それをクエリーにしてホモロジーサーチをしているのが普通のやり方だったと思うのですが、その内部配列を改めて決めていないということになってしまうのですか。

○児玉専門委員 外側の部分にプライマーをつくって決めてはいます。それは次世代ではなくて、通常のPCRで通常の方法でやっているということです。ただ、今、言った私の説明が正しいのかどうかは後で確認させてほしいと思います。

○飯専門委員 これを読んでいて、ジャンクション部分に関しては1コピーだという結論に持っていくことについてはデータとしてわかったのですが、内部も同じように当てている限りにおいては、ずっとその結果が1コピーを支持するものが出ていておかしくないなと思ったのですが、その部分については全部捨てていると言われると、あれという感じも同時に思うところがあって、データは拾っているはずなので、単にそれはそこでの頻度を見れば、内在性の遺伝子と同じように1が出るか、内在性の遺伝子の断片を使っていれば、そこが何倍かに出るとかいう結果が出てくるはずなので、それは全然やっていないというのであれば、あれという感じを受けるところはあります。

○児玉専門委員 ですから、最初のステップでは拾い上げていって、そのデータは持っているはずなので、やれと言えども多分やれるのですが、次のステップではそのジャンクション以外のものはT-DNAの配列としての認識からは外していますという回答らしいので、データは残っているけれども、解析はしていないということなのかなと理解をしました。

それとジャンクションを見つけるためのいわゆるのりしろの部分は30bpに設定しているということなので、30bpより短い断片の飛んでいったものはもうわからないと思われまますけれども、これは今までのサザンの性能から考えて、いいでしょうという認識でよろしいでしょうか。

○澤田座長 いずれにしても、T-DNA部分と外骨格が重なっているところは拾っているということになっているわけですね。シークエンスを注意して見るところは。

○児玉専門委員 導入ベクター全体の配列をクエリーにしているので、外骨格も含めて全部とりあえず一旦は拾い出しているというステップはやっているということになります。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

それでは、第6の続きで、54ページからちょっと長いですが、84ページまで御意見、コメントがございましたら、お願いしたいと思います。

表7を見ると、葉は割と多いのですが、穀粒にはそんなには残っていないようで、根も

想像以上にそんなに高くないですね。本来は根にあってほしいのかなと思ったのですけれども。

1つ情報として教えていただきたいのは、マイクログラムというのがコピー数でどのくらいに相当するのか、換算係数みたいなものを教えていただければと思います。

○児玉専門委員 表7の定量のところ、これは定量がちょっと変わったやり方をしています、ELISAのRNA版みたいな形のものやっています、実際にどういう長さのものを引っかけられるのかという、その長いのも短いのも引っかかるのか。そこら辺のところを聞きたいので、後の質問事項のときに入れていただければと思います。

○小関専門委員 1つよろしいでしょうか。ここで皆さんでコンセンサスをとっておいたほうが良いと思うのですけれども、評価基準の10ページを開いていただいたほうが良いと思いますが、ここの3と4の遺伝子産物（タンパク質）と書いてあります。これはもうタンパク質についてのお話ですということですからずっとやってきて、今後もこの評価基準のとおりに行くのであれば、RNAのものに関しては3、4でもうそこはスキップですねということでもよろしいかどうか。多分そのスタンスをきちんと決めてからでないと、議論がぐちゃぐちゃになってしまうような気がします。

例えば3のところ、ヒトのタンパク質の一日摂取量の有意な量を占めるのがと明示していますね。タンパク質ではないのだから3も4も、今回この申請書は実際にそうになっていますね。だから、RNAがどう分解されるとか、人口胃液・腸液での話は実際に具体的にやっていないです。それは評価基準がこう書いてあるからですということであれば、もうそのとおりですねと考えなければいけないのかなという気はするのですけれども、その辺はあらかじめどういうスタンスでいくか、皆さんの意見統一を図ってから、申請書のほうに戻っていったほうが良いような気がします。

○澤田座長 むしろ2で読み込んで、それを深掘りするという発想で行ったほうが良いのかなと。

○手島専門委員 今まででもたしかRNAiのものがあつたときは、タンパク質が発現しないということが明らかな場合は、3番、4番はスキップしていたのではなかったでしょうか。それでよろしいかと思います。

○澤田座長 例えば3番目の遺伝子産物をRNAとみなして読むという方法もあり得ることかと思いますが、少なくとも第2項があるので、特にタンパク質は見ないけれども、ほかの発現産物に関しては2項で一応安全性を見てもらおうと考えれば、それはそれでいいのかなと思います。書きぶりとしては、前のほうに移したほうが良いですか。発現量だからいいのですね、2項に一応書いてあるので。

84ページまでということで、RNAですので、アレルギーの話がないわけですが、その後安全性に関して議論がありますが、このあたりはいろいろと御意見があるかと思いますが、いかがでしょうか。

アレルギーのときに加熱の話が出てきたので気になったのですけれども、dsRNAは熱に

かなり安定と考えてよろしいですか。

○児玉専門委員 67ページの「3) 経口摂取したRNAによる哺乳動物への影響についての研究」のところで触れるのがいいのかどうかはわかりませんが、この間の勉強会のときにも質問したのと同じように母乳中のmiRNAが生理作用を持っているかもしれないという、現状はよくわかっていないのですが、そういう議論もありますので、あれは多分エクソソームに入っているので、RNA分解酵素にもやられにくくて、どういう形かはわからないけれども、赤ちゃんに対して何らかの作用を持っている可能性があるということなので、植物内で発現させたdsRNAはそういった形であるということは知られていないくらいの記述はしておいてもいいかなと思いますので、御検討をいただければと思います。

○澤田座長 vesicleには入っていないわけですね。いわゆるnakedのdsRNAとして。

○児玉専門委員 多分タンパクには覆われていると思います。

○澤田座長 植物の場合、どういうタンパクに覆われて保護されているかという情報は御存じですか。

○児玉専門委員 一般的にsiRNAはRISCに入っていないと不安定だとよく言われてはいますけれども、本当のところはよくわかっていないと思います。飯先生、どうですか。

○飯専門委員 私も本当のところはよくわからない。安定であれば、普通は何かとのコンプレックスだと思います。

○澤田座長 動物の場合は1つの例として、ヌクレオホスミンとかがくっついているような話がありましたね。

○児玉専門委員 二本鎖RNAにくっつくタンパク質は植物にもたくさんありますので、裸のままぶよぶよしていることはまずないと思います。ただ、小関先生がおっしゃったように、vesicleの中に入っているというのは今までのところは知られていないと思います。

○澤田座長 RNaseが出てきているのですけれども、ヒトの場合、RNaseにはいろいろな種類がありまして、多分RNaseAというものかな。それが一番多くて、dsRNAを切りうると書いてあったのですけれども。唾液と胃液と腸液ですか。腸液は膵臓から出てくる消化液にRNaseがたくさん入っているという話がありまして、そこら辺の議論を詰めてほしいなという気がしました。

dsRNAでも切れにくいものとか非常に切れやすいものとかがあるのかどうか、そこら辺がよくわからなくて。このdsRNAはRNaseで切れないものなのか、普通のRNAと同じようにどんどん切れてしまうのかという情報があればと思いました。

○小関専門委員 今、先生がおっしゃられたのは結局、64ページ、65ページに一応その辺は書いてあるけれども、このRNAが特異的な格好でというお話でいくということですね。わかりました。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。あと専門の方にお聞きしたほうがいいかなと思ったのは、21塩基で完全一致なのですけれども、miRNAの場合、1個くらい違っていても効く可能性はあるわけですね。相同性検索で、それはやらなくていいのかなという気がち

よつとしたのですが。mRNAを分解してしまいたい場合は全部一致したほうがよく、内在性のmiRNAの場合とは微妙に違うところがあるという話もあります。

○児玉専門委員 今のお話はヒトに対してですか。

○澤田座長 ヒトに対してです。

○小関専門委員 限りないですね。

○児玉専門委員 もともとこの間の勉強会でもありましたように、3'側の9bpだったかな。あの部分は何て言いましたかね。何とか配列と言うのですけれども、そこがあっけと効いてしまうということなので、ヒトの場合は特に実際は9bpとか10bpなのです。植物はもうちょっと厳しいのだと思います。そこまで緩めてしまうと限りなくなってしまうと思うので、その議論は21bpぴったりで今回は収めておくのがよろしいのではないかと思います。

○飯専門委員 今回の問題ではないのですけれども、今までもRNAサイレンシングのパスウェイに入るケースで結局調べてもらったのは、やはり二十数bpの一致があるかどうか。それも背景としては同じようなことがあって、miRNAまでターゲットとして考えると、ほとんど全ての配列を調べなければならないようにだんだん近づいていってしまうぐらいに緩くなっていくということもありますし、今までの植物の内在性の遺伝子を抑えるという目的であったとしても、それでは、その配列はヒトに対してホモロジーのある配列であるかどうかということは調査していなかったこともあって、そうすると今できるのは、やはりsiRNAレベルの分析までが限界なのではないかと思うのですが。

二本鎖RNAが植物の中にあるかどうかと言われれば、ウイルスに感染していれば、確実にその配列はありますし、内在性の遺伝子由来で二本鎖がつくられることも幾らでもあるので、二本鎖RNA自体は幾らでも摂取してきていると思います。そうするとあくまでこの場合に問題となるのは、この配列が特別なことを引き起こしている可能性があるのかどうかという議論になるのかなという気はします。二本鎖そのものがどうかと言われたら、それはもう日常的に二本鎖RNAは取り込んでいると言っていいのではないかと思います。

○澤田座長 今のお話に関して、dsRNAを大量に食べているということですが、何かこの特異的に増やした場合はどのくらい、例えば通常のレベルよりも100倍くらい多いのか、10倍しか違わないのか、どういうイメージで考えたらいいのでしょうか。

○飯専門委員 その辺は分析データがあるとよりよいという気は私もしているところではあるのですが、植物の中で二本鎖ができれば、速やかにDicerで断片化されていくと思います。それがたまたまされにくかったとかいう部分が虫の中に入って効いているという感じなので、二本鎖RNAとしてある程度の長さ以上のものがどれくらいの量、どこの場所にあるか。RNAがどのくらいかと同時に、二本鎖としての量というもの。内在性にどのくらい二本鎖があるかということとの比較において、一度議論してもらおうほうが、こういう話になってくれば、いいのかなという気はしました。

○澤田座長 この点はほかにいかがでしょうか。前例としまして、siRNAを利用した組換

え植物は既に何件か出ていますね。それでdsRNAができるように設計したのも確かあったように思っていますけれども、ホモロジーを見ておいたらいいのではないかということになってきたかと思います。

○児玉専門委員 先生がおっしゃったように、通常はDicerで速やかに分解されるので、通常はそうすると我々が議論をするのはsiRNAの量ということになるのですが、植物の中でsiRNAの量は余りそんなにばかでかく貯めておくことはどうもできないみたいで、あるものが増えるとほかが減ってしまうというような例は結構あります。要するに多分保管しておくとか、siRNAが安定にいるためには何かのコンプレックスをつくらなければいなくて、そのコンプレックスの数が限られているために、あるsiRNAを増やしてしまうと、それがドミナントネガティブみたいな形になってしまって、ほかのmiRNAは減ってしまうよという論文はあります。ですから、siRNAに関して言うと、すごく量を増やすということは実はほとんどできないようです。

ただ、今回ののはdsRNAの切れ残りを使っているの、その切れ残りというのは普通に考えれば、相当少ないと思います。本当にもう微々たる量でやっているというような感じだとは推定できるのではないかと思います。

○澤田座長 要は、前には遡らないということですね。

ほかはよろしいでしょうか。安全性のところでは何か追加でおっしゃりたいことがあったら、お願いしたいと思います。先ほどの安全性で何か追加でありますか。

○中島専門委員 さっき全部言ってしまいました。

○澤田座長 実際に植物、穀粒を食べさせた実験データは提出されていないのですね。今回、理論的にいろいろと何事も起きないだろうということは一応予想されるのですが、動物実験みたいなものが追加で要るかどうか。in vitroでCaco-2みたいな腸管の細胞に対して毒性がないことを確認する必要があるか。これは御意見をいただければと思います。

○児玉専門委員 穀粒を使った動物実験というのは、マウスではなくて虫の話ですか。

○澤田座長 動物、マウス、ラットの話です。ヒトと同じ遺伝子組成かどうかというのはわからないので、意味があるかどうかはわかりませんが、念のためにやる必要があるかどうか。要は動物試験が必要ないという結論があれば、やらなくてもいいということになっているわけですね。

○小関専門委員 先生のおっしゃるとおりで、そうなってくるとすると一番問題なのは、dsRNAを例えば化学合成でも、あるいはプラスミドを使っているので大量合成系でもいいですし、大量に作って餌に混ぜて食べさせると。混ぜて置いておいたら壊れてしまったというふうになる落ちが。あとはCaco-2細胞の培地に入れたら、Caco-2細胞の培地はRNaseフリーですかね。絶対にそれは私などはやっていた経験で言うと、あり得ないと思うので。

○澤田座長 多分血清が入っていますから、RNaseが混じっていると思います。

○小関専門委員 与えたけれども、壊されて何を見ていたのだろうかという。

- 澤田座長 動物に関してはヒトに外挿できるかという問題がまずあると思います。
- 小関専門委員 穀粒の形では食べさせることはできませんから、栄養失調で先に死んでしまいますから、そうするとやはりさっき言ったような合成のものを餌に混ぜますね。
- 澤田座長 どちらかと言うと、むしろ純品をやるしかないかなと。
- 児玉専門委員 一般的に考えれば、RNAはGRASであり、日本はそれに対しての動物実験を初めて要求するという感じになってしまうのか、という気がします。
- 澤田座長 ヨーロッパはわかりませんが、多分FDAは要求しなかった可能性が高いと思います。
- 飯専門委員 これは、FDAはもう終わっているのですね。
- 勝田係員 既に終了しています。
- 飯専門委員 この前の勉強会の際にいただいた資料で、EFSAのを見ると、確かにここまで慎重になるのかというぐらいに動物実験のことが書いてはあったのですね。一方では、その前に口からdsRNAを入れたら、腸までどのくらいの量が生き残っているのかということを知りたいなとは思って。それは多分何かラベル、標識的なことをメインにやれば、動物だったら追跡できるのかなとは思ったのですけれども、ほとんど到達しないのであれば、それを掛け算した量しか取り込まれなくなるのかなと思うので、よくわからないときには直接食べてみるというのももちろん一つの手であると思っはいます。
- 澤田座長 デント種ですから、普通は生では食べないですね。多くの場合はスターチとして食するので、まずそこまで行かない可能性は非常に高いと思います。ただ、問題は将来的に掛け合わせでスイートコーン。
- 飯専門委員 私も全く同じことを思っはいて、今の段階はそのとおりでけれども、将来的にはスイートとデントの区別をしなくなるということは想定されるころであったので、あくまでそこなのかなと思っはいました。
- 澤田座長 一応スイートコーンまで行くことで生食も考えて評価していただいたほうがいいでしょうね。その場合、生で食べる場合というのは、植物の細胞の中に入ったまま食べて、多分胃でかなり壊れて腸に行くのではないかと思うのです。だから、唾液でそんなに壊れない可能性はあるかもしれません。
- 和久井専門委員 動物実験でいろいろな結果が出てしまった場合に、どういうふうに評価をしたものかというところが問題となるころです。基礎的なデータが想像の域を超えていないということですが、その想像の域の段階で評価してはいけないことです。dsRNAの問題に関してはこれからずっと全て要求するというわけではないにしても、初めのうちは動物を使ってdsRNAの体内動態に関する程度のデータをできれば要求したいと思っはいます。
- いつまで経ってもわからないまま引きずっていくのは問題ですので、申請者の方々には大変でしょうけれども、データをつけていただければ、我々としても、自信を持った評価ができるのではないかと考えます。

○澤田座長 多分もしやるとしても穀粒ですね。最大で可能な量は33%でしたか。それでちゃんとデータが得られるかなという気はします。

○和久井専門委員 結局何もしなければ、データは全くないですから。

○澤田座長 あとは、まず腸管のバリアがありますから、血中にはまず入らない。入っても無視できるくらいのものだと思います。一番影響が出て腸管系だけかなと思います。それで腸管系に到達するコピー数とかの差を考えて、実際に動物実験をやるのが現実的かどうかという判断をするほうがいいのかと思います。ただ、Caco-2の系にしても、どのくらい使えるかどうかはわからないですね。それこそ腸液で分解実験をしてもらえばいいのかもしれないです。

○山添委員 人工の腸液とか胃液を使えるかどうかはわからないですけども、胃液と腸液でどのくらいのパーセンテージを分解してしまうかによって、以降のことは余り考えても仕方がないのかもしれないし、それは例えば200bpくらいの塩基のところ。

○澤田座長 一般論としては、dsRNAはすぐなくなるという文献はあるのですね。ただ、このもので本当になくなるかというデータがない。

○山添委員 この文章のどこかに、虫のところに60bpくらいのものだと何とかと書いてありましたね。その長さだと入る。そういう機構があると考えているみたいなのだけれども、それが哺乳類にあるかどうかは知らないし。

○澤田座長 それで思い出しましたけれども、全身にスプレッドするという話がありました。あれはほかの昆虫ではないし、動物でも多分あり得ないと思いますから、それも安全性を考える上で一つのかなり重要なファクターになるのかなと思いました。

○児玉専門委員 この間の勉強会でもありましたけれども、通常は動物細胞で、動物で*in vivo*でRNA治療みたいなものをしようと思うと、通常は細胞膜を通過できませんので、そこを追加させるためにモルホリンの修飾とかインビボモルホリンの構造体とか、何か特殊な構造体にしないと細胞の中に入りませんというのがもう一般論ではあるかと思います。

それを考えると、もし追加のデータを要求するのであれば、あとはこの配列で腸液とか胃液で分解しますかということをお願いするので十分なのではないかという気はします。ただ、そういう実験系は過去に多分ないので、いわゆるプロトコルとして、そういうのがあるのかどうかということも非常に気になるころではあります。

○澤田座長 RNaseですけども、ヒトと動物で少し違うという話はあるみたいです。ヒトのほうはdsRNAをより壊しやすいという話を聞いたような気がします。

○小関専門委員 結局だから、それを求めるのであれば、既存の人工胃液、腸液というのはタンパクのことをメインに考えているわけで、そうしたら、それでは不向きとすると、何を使ってやりなさいとこちらから指示を出さないとならないでしょうね。何がいいのでしょうかね。

○澤田座長 ヒトのRNaseですね。ヒトのRNaseは多分売っていると思いますけれども、RNaseAとか、double strandに効くRNaseはわかっていると思いますので、それでやって

もらうことになるのかなと思います。ただ、動物の場合だと弱さや強さが違う可能性もある。

○小関専門委員 大事なのはRNaseを買ってもらうといったときに、ヒトの胃の中にどういいうRNaseがどのくらいあってという情報は多分あると思うのですが、そういう調査をしたものを人工胃液・腸液にきなさいと言うしかないのではないですか。そうでないと何か変なことになります。

○山添委員 加えてやる実験で難しいのは、例えば酸性の中でRNaseはどれだけ安定かどうかはわからないですね。我々は知らないし、混ぜたら機能するかどうかという保証はないですね。そこのところがなかなか言い出しにくいところだと思います。

○澤田座長 だから、胃の中はちょっとできないので、腸液、pH中性でやるしかないのかなど。膵臓から出てきた直後のpHはちょっと上がりますね。もし要求するのだったら、その条件でやっていただく。

○山添委員 それであれば、もしどうしてもやってもらうのであれば、RNAを注射で胃の中に入れて、下のほうを結紮しておいて、ある一定時間をとってきてから、どれだけ消えてしまっているかでいいと思います。要するに外から加えずに、ラットでいいと思うのですが、もうそれで多分分解してしまっていると思うので、ある期間でその中から消失したと。時間経過から見てもらえれば、それで済んでしまう話だと思います。それはもしやるとすればですよ。

○澤田座長 私が考えたのは、全くの*in vitro*です。植物の中にあるdsRNAの形状の、根本的な情報がないのですが。

○児玉専門委員 一応、別添資料を見ると、発現しているのは1,000bpくらいのものが発現していて、二本鎖の部分だけ残してダイジェスチョンすると200bpくらいのものがディテクトされますというデータは出してあります。ですから、いわゆる本当に切れ残りかなという。多分切れたものも当然あって、切れ残りがそういうものでディテクトされているということだと思います。量的にはかなり少ないはずではあります。

○澤田座長 そのPCRで定量したときは短いものも検出していると考えていいですか。

○児玉専門委員 それが先ほどの表7のところの私の質問で、その検出法は長さはどういいうものを検出できるのですかというのがわからなかったので、そこを聞きたいなと思います。

○澤田座長 そのRNaseの話は一応そういうデータがあるかどうか、やる意味があるかどうかというのを聞いてみるというくらいでしょうかね。絶対に必要かどうかと言われると判断が難しいところがあります。

では、この話はここまでで、あとは組換え体の第5項で85～111ページにかけまして、御意見、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。

○和久井専門委員 私が一番危惧している点は何かと言いますと、以前、遺伝子改変穀物を用いた動物実験で悪影響がでるとする論文が出て、一時期対応に困ったことがありまし

た。

それと同じようなことが今回も予想されますので、そのときに理屈を持って、明確に答えられるだけのベースを持っている必要があると考えます。

○澤田座長 パブコメの段階では、いろいろな御意見が出てくると思います。それに先だって、あらかじめ安全性に関する考え方を整理しておく必要はあるかと思います。ただ、では、何をすれば一番いいかと言われると、余りいい手がないというのも事実です。

○児玉専門委員 その議論ではなくて、先に進んでもよろしいですか。85ページの複数世代における導入遺伝子の安定性のところですが、評価基準ではサザンとウエスタンをやってやりなさいということですからけれども、これはタンパク質を多分念頭に置いている表現になっているかと思うのですが、今回はRNAiですので、これは前にも求めてもらったような気がするのですが、後代でちゃんとdsRNAが発現していますよというデータは出しておいてもらったほうがよろしいかなと思いますので、85ページの最初のところを次世代でジャンクションだけ検出するだけではなくて、後代でdsRNAの定量をやってくださいということをお願いしたいと思います。

○松井技術参与 その場合は別添3にあったような1,000bpの発現と。

○児玉専門委員 表7にあるような。

○松井技術参与 わかりました。

○澤田座長 では、先に安定性と種子の製法のところで、ほかによろしいでしょうか。

○小関専門委員 仮にの話ですけれども、今の安定性というものを虫の殺虫活性というので、今まではBtに関して、それでやってきましたね。まだ事例がないから調べろというふうにするのかどうかというスタンスはちゃんと伝えないと、おかしいではないかと反論されると思います。そこはしっかりしておいたほうが良いような気がします。

○澤田座長 掛け合わせのときにやるような殺虫活性ですか。それは今までこちらには出ていなかったのですね。それはないけれども、代わりにRNAの量は見てオーケーとするか。

○児玉専門委員 要するにBtタンパク質の場合はウエスタンをやって、後代はちゃんとタンパク質がありますよという見せ方ですね。それが実際に殺虫活性を持っているかどうかは、この段階で申請書では見ていなかった。

○小関専門委員 最近のものは後代を見ていましたか。

○北村課長補佐 ウエスタンでは見えています。

○小関専門委員 では、それだったら、それと同じ扱いですね。統一性の問題だと思います。

○澤田座長 今のお話で気になったのは、Cry3Bb1とこのdsRNAは標的が同じ昆虫なので、相乗効果があるのかないのかという情報が何も書いていないので、それは追加していただいたほうが良いです。

○小関専門委員 おっしゃるとおりで、次世代、これの後代をやるときにどう見ていくかというところに実は絡んでくるのです。評価書のところの書き方をどうするか、あらかじめ

め検討しておかないとならない。

○澤田座長 それでは、話を戻しまして、何か将来的にいろいろな実験がされて、問題があるという意見が出てくる可能性はあります。その場合に備えて、どこまでデータをきちんとっておかなければいけないかという話があります。動物実験というのは、やってあれば、一般の方々には非常に説得力があるのですが、専門的に言って、それをやる意味があるかと言われると、クエスチョンマークがつく訳で、そこら辺はいかがでしょうか。

○小関専門委員 やはりここは先ほど和久井先生がおっしゃられたのが、ある意味というに変な言い方ですけども、正論ですね。全て想像の段階ではないかと言われてたら、ぐうの音が出ないというのが事実です。それこそ人工腸液でもいいから、壊れていますというプルーフがあるだけで、和久井先生、それであればよろしいということですね。

○和久井専門委員 そういことです。

○澤田座長 現在の安全性の議論は全て理論的なレベルの話ですね。実際の量的なとか、具体的なデータは余りないですね。量だけですか。

○小関専門委員 量というか、要するにタンパクのときは消化性とか、そういうのを要するに実証してきましたね。和久井先生のおっしゃられたのは、この物に対しての実証が全くないということですね。要するに理論上これは壊れますよと。タンパク質は消化酵素で壊れますよと言っているのと同じ議論ではないかというのが多分、和久井先生のおっしゃることかと思います。

○和久井専門委員 そうです。

○澤田座長 それでは、一応、消化のデータはできるだけ出していただくと。生データがあったほうがいいということですね。よろしいですか。ほかに追加で。

○児玉専門委員 その方法はさっき山添先生もおっしゃったような結紮みたいな方法がいいのか、それとも人工腸液みたいなものでいいのかというのはどうなのでしょう。

○小関専門委員 和久井先生のお勧めの方法がいいですね。

○児玉専門委員 我々は植物なので全然さっぱりわかりません。

○山添委員 多分、澤田先生が心配されているのは、ヒトと動物での違いがあって、ヒトで切れるかどうかを心配するのであれば、ヒトのRNaseでの切れ方を見たい。それが澤田先生の御意見だと思います。私が言っているのは逆に言うと、そういう人工のシステムで機能するかどうかは誰も試したことがないからわからないので、人工ではなくて、ともかく生き物に放り込んで消えるかどうかを見ましようという、何か非常に明確な手法がないので、相反したような言い方をしています。RNaseがちゃんと胃液と消化管から分泌をされて、そういうものがデータがあって、ヒトのRNaseで切れるのであれば、*vitro*の系でも構わないと思います。

○澤田座長 パンクレアスですから外分泌でRNaseは出るのですね。

○山添委員 そうすると人工腸液のところにパンクレアスのヒトのものがあれば、それを加えて切れればいとするのも手ですね。

○澤田座長 それは申請者に検討してもらいますか。

○和久井専門委員 OECDのテストガイドラインをモディファイすれば可能であると考えます。ネズミを使って腸を吻合することは、適切な動物実験試験方法を設定して実施できると考えます。

○澤田座長 RNaseによって、どのくらい切れるかということを示すデータを出していただく。方法は技術的な問題もいろいろある可能性がありますから、それは申請者の答えも見ながらということになるかなと思いますけれども、ほかはよろしいでしょうか。

それでは、きょうは日本モンサントさんがいらっしゃっているのです。

○北村課長補佐 1点よろしいですか。構成成分分析のところですが、今回は新しい手法で比較をしています。今回は対照と本品種の平均値で有意差があった場合、対照品目で分析をしたものの最大値と最小値の差、その範囲に入っていれば問題ないという説明をしてきているのですが、こちらについてはいかがでしょうか。

○勝田係員 考え方の概要につきましては、今、北村が申し上げたとおりですけれども、お手元に前回の勉強会で使いましたモンサントの本系統のパイプラインを詳しく書いたパワーポイントをお配りしているのですが、その後ろから1枚めくっていただいて、18ページと書いてあるところの2枚スライドがあるうちの上のほうです。構成成分分析結果の新しい解釈の方法（例）というスライドがあると思いますが、今回はこれに準じて検討しておりまして、そもそもこういった方法でやるのが適切かどうかということも含めて、御意見等をいただければと考えております。少しややこしい考え方ではありますので、きょう申請者も来ていますし、直接聞いてもよろしいかなとは思っております。

○澤田座長 そうですね。説明をいただいて、もう一回質問をしていただくということにしましょうか。

それでは、何点かいろいろ質問が出たと思うのですが、私もまとめ切れていないので、ピックアップしていただけますか。質問として、先生のお話と、まず種子の植物の中での存在状態に関する情報がありましたね。あと聞いたほうがいいということはPCRの先ほどの方法と、ホールゲノムのシークエンスの話ですか。ほかにきょう聞いておいたほうがいい点がありましたら、もう一回思い出して御指摘いただけますか。

○勝田係員 全てがカバーできているかはわからないのですが、先生たちから幾つかいただいた御意見の中で、申請者に聞いて答えが返ってくる、あるいはこの場で確認をできるかなと我々のほうで思っているのは以下の内容です。まず、小関先生が33ページの表のところでおっしゃっていただきました、第1イントロンと近傍エクソンのところにメチオンがあるのかどうか。これは事実関係なので聞けば、もしかしたら答えが出てくるのかなと思います。

それと座長がコメントしていただきました、dsRNAの穀粒中での局在がどうなっているか。あとは第何染色体にこのT-DNAが入っているのかということのも、わかる、わからないも含めて一応聞いてみてもいいのかなと思います。

児玉先生が54ページのところでコメントしてくださいました、今回のRNAの検出の方法。それと次世代シーケンシングの方法ですね。ジャンクションだけでやっているのか、ほかの部分は捨てているのかどうかという事実関係。

あとは児玉先生から御指摘いただきました、植物で発現したdsRNAがエクソソームに入っているか否か。

○児玉専門委員 知見としてあるのかどうかということです。エクソソームではなくて、そういうvesicleに包まれていることがあるかどうか。

○勝田係員 あとは今回のdsRNAが切れやすいかどうか。その周辺情報でもし何か聞けることがあれば、あわせて聞いてみるのもいいのかなと思っております。

○澤田座長 もう一回確認しますと、まず、コンストラクションの問題ですね。方向とか。それから、ホールゲノムの話とゲノム上の位置とそこら辺の話。あとはPCRの方法。

○児玉専門委員 PCRといいますか、表7の定量の仕方。これは定量はPCRではないので。

○澤田座長 PCRではないのですね。それから、もしわかっているのだったら、RNaseの切れ方をチェックしたことがあるかどうか一応聞いてみますか。

ほかにちゃんと聞いておいたほうがいいことはついでにありますでしょうか。

○松井技術参与 1μgに何コピーあるか。

○澤田座長 コピー数ですね。よろしいですか。

○橋田専門委員 そのほかに何か相乗効果の有無を聞かれるという話があったかと思えます。

○手島専門委員 殺虫効果。

○澤田座長 何点か出てきましたけれども、説明者に入室していただくことにしたいと思います。準備等もありますので、5分間だけ休憩しますか。では、今からあの時計で37～38分までということ。

(休 憩)

○澤田座長 それでは、再開してよろしいですか。

それでは、申請者の方がいらっしゃっていますので、この際、質問等が幾つかありましたので、お聞きしたいと思います。

まず、説明者の方で自己紹介をお願いします。

○説明者 どうもお世話になっております。日本モンサントの山根精一郎と申します。よろしくお願ひいたします。

○説明者 同じく、中井秀一と申します。よろしくお願ひいたします。

○説明者 同じく、高橋無盡と申します。よろしくお願ひいたします。

○説明者 同じく、谷村竜太郎と申します。よろしくお願ひいたします。

○澤田座長 どうもありがとうございました。

それでは、先ほどいろいろ議論いたしまして、何点かこの際お聞きしたいことがあるということで、まず、遺伝子の構成体のコンストラクションの説明のところですか。ループを挟んで順方向と逆方向に配置しておりますけれども、その方向等の説明がよくわからない点がありますので、何ページを見ればよろしいですかね。

○北村課長補佐 申請書の33ページです。

○澤田座長 33ページのT-*E9*からI-*Hsp70*に至るところで、*DvSuf7*が2カ所あって、同じことしか書いていなくて、どちら向きになっているのか。それともセンスなのかアンチセンスなのか、そこら辺の情報がなかったものですから、そこら辺がもしわかるようでしたら、説明いただければということです。

小関先生、補足でよろしいでしょうか。

○小関専門委員 結局これは32ページの図で行くと、矢印が外向きになっていますね。これが35Sのプロモーターに*Hsp70*があって順方向に*Snf*が5'から3'のほうに入っていくって、ループ領域があって、その逆方向で5'、3'の格好で入れているのか、それともに*Hsp70*に対して、この図でいくと、この断片は3'から5'にループを入れて、インバーテッドリピートの5'から3'という図ですけども、そこは明確に全く書かれていないので、そこはどちらですか。

○説明者 おっしゃるとおり、この図に示しているのはプロモーターイントロンからで、*DvSuf7*の3'から5'、そして、intervening sequenceがありまして、また、5'から3'というふうに、確かにおっしゃるとおり、表4には記載がありませんでした。

○小関専門委員 では、そこの追加をお願いして、もう一点が*Hsp70*の第1イントロンと近傍エクソンの一部というのですが、これは正確には第1エクソン+イントロンなのか、第1イントロン+第2エクソンなのか。

○説明者 今、手元にシーケンスの詳しい情報がないので、確認をさせていただきます。

○小関専門委員 お願いします。さらに追加で確認をお願いします。それが第1エクソンにファーストメチオニンがあるタイプのものなのか。それとも第1イントロンはノンコーディングであって、エクソンの直下にイントロンがつながって、第2エクソンにファーストメチオニンがあってORFが続くタイプの後ろにつけているのかどうか。それをつけることによって、*DvSuf7*の逆方向に入れていきますけれども、もし*Hsp70*が今、言ったもので第2エクソンのメチオニンのところを一部含んであるのであれば、逆方向であったとしてもフレームが出てくる可能性があるのでは、そこは確認してください。

○説明者 確認いたします。

○小関専門委員 それから第2点、そこのところのループの構造ですけども、intervening sequence、いわゆるクローニングしたと書いてあるのですが、これは150bpにクローニングされたのですか。何の配列なのかがここは一切記載されていないです。表4の1,388~1,537で約150bpですけども、これは何でしょうか。

○説明者 それはもちろん*DvSuf7*の配列とは全く関係ない話です。

○小関専門委員 何のシーケンスですか。プラスミド由来ですか、何由来ですか。それは記載すべきことではないですかと聞いているのです。

○説明者 確認させてください。

○小関専門委員 多分150bpだと、ほかのところがintervening sequenceと書いているのではないですか。これは多分クローニングサイトでサイトがあると思うのですけれども、150あるとすると、これは相当長い、端から端まで入れたのかなと思っていて、そうでないと、この長さにはならないだろうと思うので、これは記載が余りよくないと思います。むしろここはinterveningというよりもループシーケンスとか何とかにさせていただいたほうが多分誤解が生じないと思うので、そこをお願いします。ここはコンストラクションについての質問です。よろしくをお願いします。

○説明者 はい。

○中島専門委員 先ほどのイントロンの向きの話で、33ページでは外向き、外向き、つまり3'から5'、5'から3'ということであるならば、16ページのFig.2の左は、これは内向き、内向きとなっています。これが矛盾しているので、だから、どちらかなと御質問させていただいたのです。

○説明者 先ほどのプラスミドのマップ、あちらのほうが正しいです。こちらは模式図なので、こちらのほうが正しくないかと思います。

○澤田座長 最初の質問はよろしいでしょうか。

次は、ついでに16ページの話が出ましたので、このdsRNAの細胞、植物の中の存在状態なのですけれども、これは実際にはかなり切れている状態で存在して、どのくらい安定なのかとか、そこら辺の情報を御存じでしたら。

○説明者 それはつまりdsRNAがどのくらい分解されているかということですね。それに関しましてはデータはございませんで、dsRNAが一番最初に転写されるトランスクリプトをはかっているのが評価書中の表7になります。

○澤田座長 そうすると測定しているのは一番長いもので、切れて短くなったものは測定していないのでしょうか。

○説明者 そうですね。ある程度、この分析方法では240bpのプローブを使っておりまして、そのプローブで発光度を見るという試験ですけれども、240bpですので例えば21くらいに切れたsiRNAのですとなかなか検出は難しいということで、ある程度240よりもちょっと下くらい、そこら辺はどの程度まではかれるのかはわかりませんが、一番はかっているのはトランスクリプトとして発現したdsRNAの量ということです。

○児玉専門委員 その検出方法のときにプローブは240bpということで、実際にはどのくらいの長さのものが検出できるのかという情報がないので、結構長いのも引っかけられるのか、あの方法を厳密には完全に理解していないので、siRNAの多分無理だというのは私もわかるのですけれども、例えば80bpは検出できるのかとか、そこら辺の情報があれば、教えていただきたいと思います。

○説明者 今やっているQuantiGeneという手法ですけれども、その試験で80bpが検出できるかというのはわからないので確認をさせていただきたいのですが、手法自体はもう既に文献として報告をさせていただいています。ただ、詳しい情報については確認をさせていただきたいと思います。

○澤田座長 ついでながら、植物の細胞の中で、このdsRNAがあると思いますけれども、穀粒の場合は局在性とか何かわかっているのでしょうか。

○説明者 使っているプロモーター自体は*e35S*と先ほどのヒートショックプロテインのイントロンなのですけれども、これは以前に申請させていただきました除草剤耐性の作物と一緒にして、通常使われているもので、花粉では発現が弱いとは言われているのですが、特にそのほかの組織で局在性があるとかの報告はありませんので、そこら辺の情報は特にないです。

○澤田座長 特に穀粒の場合はどういうふうに存在しているのかなというのが気になった点です。

○説明者 それは細胞の中で、核の中であるとか、細胞質の中に多く局在しているとか、そういう意味での局在ということですか。

○児玉専門委員 座長がお聞きしたいのは、穀粒は結構乾燥した状態で、通常の生の組織とはちょっと違う状態にあるものですので、そういったときにdsRNAが要するに切れた形でののか。それとも長い形で安定しているのか。そこら辺の情報があれば教えてくださいということによろしいですね。

○澤田座長 はい。

○説明者 確かに先ほどの話ですけれども、どのように分解されて存在しているのかはわからないのですが、今ある技術ですと穀粒中のあれも一応サンプルとしてとった後、乾燥させてミキサーにかけてやっていますので、量としては表7でdsの量というのはわかるのですが、どのような形、どのくらい分解されて、どの程度の量がというのは、ちょっと難しいかと思います。

○小関専門委員 確認させていただきたいのですけれども、57ページの表7の穀粒、成熟期というのは、成熟して採取して直にやったわけではなくて、乾燥させたものですか。

○説明者 そうです。例えば実際の農場で乾燥処理とかがありますので、水分等をまずとってからということだと思います。

○小関専門委員 そうすると茎葉の成熟期も、要するに刈り取る直前ですか。

○説明者 刈り取る直前か、刈取の適期です。

○小関専門委員 わかりました。ありがとうございます。

○澤田座長 この点に関しまして、ほかに追加で御質問はよろしいですか。

○飯専門委員 今のお答えでもう一回確認したかったのですけれども、表7はあくまでプローブとくっついたRNAの量で、二本鎖RNAは定量しているというわけではないですね。

○説明者 そうです。ただ、結局その発現量をはかる前には二本鎖を一本鎖にする処置を

していますので、そのプローブでつかまえてくる量はdsRNAの量とほぼ等しいというところ  
です。

○飯専門委員 それが等しいなら、等しいという別の実験的根拠はしっかりあるということ  
でいいのですか。最初に転写されるとタンパク質と核酸のコンプレックスがまずできると  
思うので、幾らヘアピンがあったとしても、全てがきっちりとした二本鎖構造をとると  
いうわけではないと思います。ここで定量しているやり方は私も余りなじみがなくて、よ  
くわからないところがあるのですけれども、何を定量しているのかということをはっきり  
と認識しておかなければ、データの解釈が間違っただけのものになりかねないので、その辺のそ  
ういう意味での確認ということですね。

○説明者 一応やっている手法としてはアンチセンス鎖のほうのプローブを出します。転  
写産物自体はそのまま先ほどのプロモーターから転写されて、アンチセンスとセンスとい  
う形で出てきますので、それはつかまえられる。ただ、それが例えばアンチセンス鎖だけ  
離れている状態になると、確かにそのプローブでは捕まえられませんが、基本その  
一番最初にプロモーターから発現するのは連続で二本鎖を形成しますので。

○飯専門委員 それがすぐに二本鎖ができるという保証はどこにもないと思います。

○説明者 特にそういうのはないのですけれども、一応相補鎖なので、例えば二本鎖がで  
きなかつたとしても、転写産物として一本鎖のものがありますね。その一本鎖のものをプ  
ローブがつかまえられる。例えばアンチセンスのところ途中で切れたりすれば、わかり  
ませんが、転写産物として転写されたものはある程度ディテクトできると。

○飯専門委員 ディテクションをしているのはあくまでプローブの位置だけですね。

○説明者 プローブがくっついた位置ですけれども、そのプローブがくっついたものに関  
してディテクトしますので、転写産物自体がとれると。ちなみにその二本鎖だけを厳密に  
定量する技術はありませんで、一本鎖にしないとどうしてもRNAをディテクトできないと  
いうのがありまして、dsRNAを正確に定量化するというのはなかなか難しいというところ  
です。この技術が一番、定量的にかなり正確にできると考えています。

○澤田座長 説明はまたいただくということで、次はホールゲノムのシーケンスの話で。  
まず最初にトウモロコシのゲノムの染色体が技術的に同定が難しいのがどうかという話と、  
どこに入っているかの情報がなかったのですが、それはわかっているのですしたら、説明を  
いただければと思います。

○説明者 まず、2つ目の御質問からですが、今、私どもが持っている情報で、どこに入  
っているかという情報は持っておりません。一般的に申請する内容で、そこまでの情報は  
持ち合わせておりませんというのが正直なところですね。

1点目ですけれども、トウモロコシのゲノムを使って、この手法をすることの難しさとい  
うことでしょうか。

○澤田座長 そうではなくて、トウモロコシでもいろいろな品種で違ったりするところが  
多分あるかと思うのですけれども、この宿主の場合にどのくらいバックグラウンドのデー

タとしてホールゲノムのシーケンスがわかっているのかという話です。もしわかっているのであれば、すぐにこれはどこに入ったと言えるのかなと思ったのです。

○説明者 ただ、今回のこの解析で目的としておりますのが、どこに入っているかといいますよりも、従来のサザンで確認しておりますような箇所数とコピー数のところを主眼に解析しておりますので、あくまでジャンクションの数、つまり導入遺伝子が何カ所何コピーあるか、今回は1カ所1コピーが入っているのですが、それを目的としております。そのジャンクションの内側の配列につきましては、別途PCR解析を行うことでT-DNAがインタクトな状態に入っているというところを確認するという目的で実施しております。

○児玉専門委員 別添資料8のところに次世代シーケンス解析の図でAppendix8ファイナルグラフというのがあります。T-DNAの配列があって、上にこういう波線が出てくるものですが、結局その図は今回つくっていないのですね。

○説明者 つくっております、トウモロコシの内在性の配列は確かにT-DNAの中にはありまして、これが従来のトウモロコシもあるような今回のHSPのプロモーターみたいなものは、これは非組換えでも出ますし、今回の遺伝子組換え系統でも出ますので、そういったものは相殺という形でデータとしては挙がってこないのですが、T-DNAの内側にあるものにつきましては、これは非組換えのほうにはないことが確認できますので、これは別途ヒットしたものとして扱いますので、結果的にこういった折れ線グラフのようなものが書けるということになります。

○児玉専門委員 相殺というのは、要するにコントロールで読んだ数を引いてしまうということですか。

○説明者 単純に言いますと、コントロールで出てきた同じ配列がジャンクションのようなものとして内在性の配列の隣のゲノム配列がある場合には出てくるのですが、それについては非組換えでも組換えでも同じように出てきますので、これは相殺という形で消します。これはノーマライゼーションと呼んではいるのですが、そういった形で消します。

○児玉専門委員 そのファイナルグラフというのは、ノーマライズした後のデータをT-DNAの片方のものは、要するにトウモロコシの配列を使ってもコントロールのT-DNAの配列に対してはピークは出てきませんよと。それでT-DNAのほうにだけ、要するに引き算しているのということですか。

○説明者 おっしゃるとおりです。

○児玉専門委員 そうであれば、その上でいいのですけれども、今回、実際のデータを見ると100くらいの冗長度になっているので、実際の申請書には75と書いてありますけれども、データは百幾つとか110とかになっていますので、モンサントさんは今後も次世代のほうで楽だから次世代のほうで行くのだと思いますけれども、どういう配列に対して、どのくらい実際に読めているのかというのを一度、私たちは確認したいです。こういう配列だと、その部分はどうしても読みにくくて落ちてしまいますよと。落ちてても、これくらいの冗長度だったら、少なくとも50くらいの冗長度くらいには読めているのですよという

のを我々はここで一回確認しておく必要があるのではないかと思います。ですので、そのデータをできれば出していただきたいと思います。

○説明者 確かにそういったデータも御用意できると思いますし、同じ別添資料の46ページのテーブル4。

○児玉専門委員 そのページしか抜き出していないので、もうわかりません。

○説明者 テーブル4に示しておりますのは、従来のサザン解析と同じように10分の1等量のプラスミドをスパイクした非組換えのゲノムを用いまして、それでT-DNA領域の何パーセントが実際に読めているかというところを見ているのですが、その10分の1等量のプラスミドをスパイクしたものでも99.64%読めていると。1コピーをスパイクしたものはもちろん100%読めているということを確認しているのですが、これをもってT-DNAは安定して検出できているとは考えられないでしょうか。

○児玉専門委員 そうですね。それでもいいのですけれども、やはりどういう配列が読みにくいのかというのは、我々は1回見ておいたほうがいいのではないかと思います。ぼんと落ちてしまうところが出てくると思うのですけれども。

○説明者 恐らくおっしゃるとおり、GCのコンテンツのパーセンテージによりまして、一部読みにくい部分があったりということがあると思います。

○児玉専門委員 将来そういうのが出てくる可能性もあるわけですね。高GCのT-DNAを使ったとか、そういうことも将来出てくるかもしれない。

○説明者 可能性はないとは言えないと思います。

○児玉専門委員 そうしたときに、それを次世代でやるときに今の考え方から言うと、もうちょっと読んだほうがいいのではないですかとか、それでも十分読めていますねという判断ができるのか。そこら辺はサザンの代わりに使っていこうと思いますので、一度確認しておきたいです。

○説明者 そのあたりはイルミナの文献がたくさん出ておりまして、GCバイアスですと大体30~60%までのところで読めてくる配列が大体2倍くらいしか変わらないというところの確認は文献でされているのですけれども、このものも同じイルミナを使っているということで、理論的には同じことが起こると考えてはいます。

○児玉専門委員 それは出したくないということですか。もう出してしまったほうがいいのかと思います。

○説明者 わかりました。では、データを出させていただきまして、イルミナも文献も後ほど御紹介させていただきます。

○澤田座長 ほかはよろしいですか。

○小関専門委員 1点よろしいでしょうか。先ほど座長の御質問と申請者の方のお答えがすれ違っていたのですが、先ほどのこの委員会の中での議論は何だったかというのと、今まではほかのものと全ゲノムがわかっているものだったら、第何染色体のどの位置に入っていると記載されている例が多いのですが、これは全ゲノムがわかっているのだから、

第何染色体のどこに入っているという情報がありますかという質問で、要するにリピートのほうに落ちこちてしまってわからないのであれば、わからないということだったのですけれども、その辺の情報を教えていただきたいということです。

○説明者 ありがとうございます。この解析ですが、短いリードをたくさん読むというタイプの解析になっておりまして、実際にゲノムを決めるような解析ですと、さらにその短いようなものをつなぐような読み方をしまして、それらをあわせて第何染色体のどこに入っているという解析をするのですが、この解析の性質上そういったことではなく、あくまで短いシーケンスだけを読み取りますので、その端っこにあるものがどこの染色体にあるのかということまでは解析できないというところが本解析の特徴になります。

○澤田座長 では、次に移りたいと思います。まず、安全性の話でRNaseで非常によく切れるというのは、普通のRNAは切れるというのは常識だと思いますけれども、dsRNAがどのくらいRNaseで切れるかというのが、我々が一番知りたいところだと思います。理論的な考察はいろいろあるのですが、実際にこのものがどのくらい切れるかというデータは出ていないということがあると思います。まずはRNaseの議論で、いろいろな唾液とか胃液とか腸液とかがありますけれども、それぞれ効いているRNaseは1つと考えてよろしいですか。

○説明者 おっしゃるとおりで、基本的に知られているRNaseとしてはリボヌクレアーゼIIIのタイプ3の第3に近いものですが、それがほとんどdsRNAの消化分解に関して、かなり多くなっていると。唾液や腸液や胃液の中にも入っています。また、胃液のほうになりますと、酸性条件とか過度のpH条件になりますので、さらに分解が進むと報告されておりますけれども、そこら辺がどの程度の活性が、リボヌクレアーゼがどのくらいの量でどのくらいのものを分解するか、そういう研究はまだ報告がそんなに多くないので、正確にそういうものを出しているものは少ないです。ただ、細胞に取り込まれないというような細胞膜の性質もありますし、消化されなくてもdsRNAはヒトの細胞内に入るだろうということは考えにくいと考えています。

○澤田座長 一番知りたいところは、例えば腸管に行くまでにどのくらい残っているのか、そこら辺の本当のデータをとったことがあるかどうかですけれども。

○説明者 先ほどの話ですけれども、どのくらいの量でどのくらいのRNAが分解されるのかというのを、特に胃腸はもっと複雑なシステムでして、補酵素とか補酵素因子とかいろいろなpH条件とかがかかわってきますので、そういうような技術的な難しさがあって、完全にそういう人間のものを再現して、その消化性を見るということがなかなか難しいところがありまして、そのシステムを再現する代わりに、例えばRNA、この系統のgrainをマウスに90日とか食事させて影響がないかというような試験であれば、そういう試験でしたら、やっております。

○澤田座長 このものの穀粒をマウスなりラットに食べさせた動物の非臨床の実験はあるのですか。

○説明者 遺伝子はないですけれども、一般的な90日の食事試験で食事させた後に臓器ですとか組織等に悪影響はないかと調べているかなり一般的な毒性試験で、よく毒性を調べる試験でやっている試験です。

○澤田座長 このもの自身のデータはあるということですか。

○説明者 この穀粒の全部を餌にあげると栄養学的にバランスが崩れますので、食料の30%をこの系統に置き換えて食事をさせて、その影響を見ている試験はございます。

○澤田座長 今のところはよろしいですか。

○和久井専門委員 90日試験をやったということは、28日試験もやっているということですね。

○説明者 はい。

○和久井専門委員 その前の急性毒性試験もやっていますか。

○説明者 急性毒性試験に関しましてはやっていないのですけれども、特にこの作用機作に関しまして。

○和久井専門委員 そのとき、用量設定はどうだったのですか。

○説明者 28日のdsRNAは、先ほど言ったトランスクリプトの状態ですけれども。

○和久井専門委員 穀粒をやったのではなくて、dsですか。

○説明者 28日のほうはdsRNAを混餌しているものです。90日のほうは穀粒を与えているものです。

○和久井専門委員 28日のときの結果はいかがでしたか。

○説明者 特に悪影響が認められたということはありませんでした。

○和久井専門委員 それは血液学的にも。

○説明者 今、手元にないのですけれども、通常の毒性試験の結果ですので、血液等にも問題はなかったということです。

○和久井専門委員 それを今回は載せなかった理由は何かあるのですか。

○説明者 やはりRNA自体が安全に食されてきた歴史が、評価書中の62ページに記載させてもらっているのですが、もともと作物にはヒトとか家畜等に100%一致したsmallRNAというのが存在しておりまして、人間はそれをずっと安全に食してきた歴史があると考えておりまして、核酸自体もアレルゲンとは思われていませんし、毒性物質であるとも考えられておりませんので、特に毒性試験のような試験は一応バックアップとしてはやっているのですが、必要はないかなと。今までの知見から安全だということが言えるのではないかと我々は考えまして、まずはバックアップということでした。

○和久井専門委員 我々が一番気にしているのは、各種のdsRNA全て同じ影響を示すとは考えられないということです。今回申請なさったものは違うかもしれないですね。消化に関しても違う可能性もあるのではないのでしょうか。

○説明者 ただ、今までのところは、核酸で普通に特異な構造をするのであれば、あれかもしれないけれども、化学修飾等をいろいろ安定的な処置ですとか、リボヌクレアーゼ

に対して分解されないような処置を施したものでないと基本的に、これは医薬品業界のほうで核酸はよく研究されているのですが、そういうものでない限り、RNAが細胞内に入るとか分解されないとか、そういう知見はありませんで、基本的に植物内でこういうふうに発現したものは、普通の植物中で発現しているRNAとほぼ同じものだと考えていて、リボヌクレアーゼ自体配列特異性がありませんので。

○和久井専門委員 わかります。ほぼ同じですね。では、今回申請なさったものは、ほぼ同じですか。その辺をクリアカットにさせていただきたかったということです。そのデータをお持ちのようですので、添付していただきたいと考えます。動物実験についてもネガティブで構わないです。90日と28日で投与したものが違っていたというのも、初めて聞きました。それもつけていただきたい。

○説明者 データとして、こういうデータは国によって、今回のRNAにかかわるどんなタンパク質でも最初から出すようにというガイドラインがある国のために一応90日と28日はつくっておりますので、隠していたというわけではなくて、それ用につくったのを今回これは特異的ということで御要請いただいたということであれば、提出させていただきたいと考えております。

ただ、最初に出さなかった理由は、先ほど御説明しましたように、今までの文献の結果、配列にかかわらず、基本的にリボヌクレアーゼはほぼ全体的に均一に分解するというところで、我々もそう考えておりますので、動物試験ではなくて、今までの知見をもって安全性は担保できると考えていたので出さなかったと。

ただ、唯一担保するために出させていただいているのが、68ページの26行目からの4)にありますように、仮に万が一、消化されなくて、ヒトの細胞に取り込まれたとしても、ヒトの転写物は配列がわかっておりますので、転写産物とこの21bpを比較して一致するものがあるかないかというところをもって、一応安全性の担保という形でデータを出させていただいておりますので、それで基本的にはヒトへの安全性は担保できるのではないかと考えました。

○小関専門委員 先ほどから和久井先生が、ほぼと言っているところはすごく大きな問題で、ほぼないということは、あり得るということをおっしゃられているということですのでよろしいですね、ということをおっしゃりたいのですね。

○和久井専門委員 そうです。

○小関専門委員 これは議事録にしっかり残りますから、和久井先生、これは非常に重要なポイントでしょう。

○説明者 いろいろと行き違いがございまして、申し訳ございません。私どもとしては、データについては必要なデータは提出させていただきたいと考えておりますので、今お話しに出ております90日、28日、これを提出することによって審査が進むのであれば、それは提出させていただきたいと思っております。

○澤田座長 普通、非臨床のデータは、もし懸念がなければ、原則必要はないというのが

日本の立場なのですけれども、今回は微妙なところかなという気がしておりますので、一応つけていただいたほうがいいのかなと思います。

それから、よろしいですか。実際の穀粒の $\mu\text{g/g}$ ですか。これはどのくらいのコピー数なのかはわかりますか。大体、分子量を計算すればいいのでしょうかけれども、それでいわゆる非特異的なdsRNAの量から考えて、実際にこの特異的なRNAのコピー数がどのくらいレベルが高いのかというのは、情報としては知りたいところだと思います。それは後で構いません。

○説明者 コピー数自体は調べていないのですけれども、例えば植物中、ダイズとかですと、どのくらいのdsRNA量があるかというのと量を比較したものであれば、69ページにあります。

○澤田座長 単なる量ではなくて、いろいろ違う非特異的なdsRNAがたくさんあるわけですね。それで1つに注目したら、それとこの特異的なものは量的にどのくらい違うのでしょうか。

○説明者 これは確認させていただいてよろしいでしょうか。

○澤田座長 ほかはよろしいですか。

○小関専門委員 さっきのところ、あれ、おかしいなと思って、次に行ってしまったのですけれども、戻ってしまいますが、今回のものは結局ボーダーのところの配列は次世代で読んだとおっしゃるのですが、結局入っている場所のゲノムの位置として大体3.5キロぐらい読めているはずなので、3.4キロの配列が染色体のどの辺にあるということもわからないということでもよろしいのですね。

○説明者 結局ある程度の長さがあれば、トウモロコシのゲノムと比較をすれば、大体の位置は出てまいりますので。

○小関専門委員 捕まりますね。

○説明者 はい。それは今回、NGS/JSAだから捕まるというよりも、今までも近傍配列を1キロ、2キロ読んで、それと比較すれば、基本的にはある程度の位置情報はわかっているのですけれども、安全性を担保するガイドラインで基本的にそこまで求められていないので、今までも今回も提出させていただいていないというのが回答になるかと思います。

○小関専門委員 わかりました。どうしますか。今までは、わかるのであれば、書いていただいたケースが多いということでしたね。

○澤田座長 わかる場合には書いていただいていますね。例えば4倍体みたいなもので非常にわかりにくい場合にはなかったケースもあったかもしれないのですけれども。

○小関専門委員 50ページの図14で見ると3.5キロちょっと配列があるので、これは塩基配列がわかっているの、トウモロコシのゲノムに当たるときにどの辺に落ちてくるかの情報があれば、できれば書いておいていただきたい。ほかの申請書でそういうのが出ているので、情報的にはお願いしたいということです。お願いします。

○説明者 わかりました。

○澤田座長 もう一点ありまして、*cry3B*と*dsRNA*を同時に入れてありますね。それでどのくらいの相乗効果があるのかという情報が何も書いていないのですけれども、単独のデータは多分とれないと思うのですが、もしあれば。

○説明者 それはよく環境のほうでは虫に対しての相乗効果がないかどうかということで調べているものがありますけれども、今回はヒトに対してのものでしたので、作用機作からいいますと、基本的に*RNAi*と*Bt*プロテインということですので、理論的に考えると相乗効果があるとは考えられないのですが、物質同士がインタラクションを起こすというのは考えにくいと考えております。ただ、環境のほうで虫に対して、どのような相乗効果があるのかなのかというのであれば、虫に対してのものであればデータがございまして、環境のほうには提出させていただいています。

○澤田座長 環境というのはカルタヘナということですね。

○説明者 そうです。

○澤田座長 その相乗効果は単独よりもどのくらい相乗効果は出ますか。

○説明者 具体的なものは確認させていただきたいのですが、相乗効果というものは認められません、ある程度、相加的な効果、 $1+1$ は $2$ になったと、そういうような結果でした。

○児玉専門委員 今の議論はこの後、カテゴリ-1になるのか2になるのかというところにも微妙にかかわってしまっていて、将来これがスタックになりますね、みたいなときにそのことを我々は考えなければいけないのかどうかという基礎的な情報が今回欲しいなということで、そういう質問が出たとお考えいただければよろしいかと思います。

○小関専門委員 したがって、後代での安定性という意味で、そこが引っかかってくるということです。相乗効果と相加効果は議論が、反対から質問が行ってしまっている形なので、スタックしたときに要するにどういう形になっていくかということ。実はこれは後代でタンパクのほうで落ちこちてしまっている。あるいは逆に*ds*のほうで落ちこちてしまっているということになってくるとすると、スタックのときにどうしていきましょうかというところで問題と言ってはあれですが、考え方を整理していかなければいけなくなるので、この後代のところでの安定性ですね。それについては何も書かれていませんね。

NGSでの結果しか出ていなくて、その発現量の安定性が記載されていないので、別のものとかけ合わせたときにはどうなるのでしょうかというところで、要するに今、言ってみれば、害虫抵抗性で言う、導入遺伝子由来のフェノタイプで後代の安定を見ているケースもありますから、それではもう見られないとなるとすると、常にそこを押さえていただく必要が出てくるのかとか、いろいろなことを評価する場合もそれを見た上で評価して、管理する側の人はどうされるかということになってくるかと思うので、現段階において、その情報は適切につけ加えておいていただいたほうがよろしいのではないかと思います。

○説明者 安定性に関しましては、この形質は殺虫活性なので、それを複数世代の虫に食べさせてということで、*cry3Bb1*も入っていますので、どちらの効果かというのはなかなか

か難しいところがあります。複数世代でちゃんとRNAを発現しているかというのをノーザンブロットで確認した試験がございますので、それを安定性の試験として提出させていただきたいと思います。

○澤田座長 大体メインの質問は出したつもりですが、ほかに追加で先生方から何かお聞きしたいことはございますか。

○山添委員 dsRNAのことでお伺いしたいのですが、これが植物体の中で常に大体安定して、ずっと合成が持続するのか。植物のホルモンとか、あるいは環境下でいろいろな薬剤とかを投与することによって、このdsRNAの植物体の中でのレベルが大きく変化をするとか、そういうことを調べられておられますでしょうか。

○説明者 特にそういうものを調べているというのはないですが、薬剤を投与した発現量は、例えば表7のdsRNAを調べているものも除草剤グリホサートを散布した条件での発現量となっていて。

○山添委員 通常の想定された条件下におけるということですね。

○説明者 そうです。通常の栽培条件における条件でとったもので、それは葉っぱから根から時期を追って見ていますけれども、ずっと発現しているというところだと思います。

○山添委員 これは入っている場所のことも関連するのかわからないですが、いわゆる酵素誘導を受けるとか、そういうようなことが仮にあるとすると、変化をしてしまうということもわからないので、そういうことが一応調べられているのかなというので一つお伺いしたということです。

もう一つ、全然別のことをお伺いしていいですか。もう一つは、15ページのところに昆虫の中腸細胞のところにRNAの取り込みの選択機構があるという記載があります。これで60bp以上のものを取り込むと記載されているのですが、こういうものの機構は哺乳動物にあるかないかということの知見はあるのでしょうか。

○説明者 こういう取り込み機構は哺乳類にあるという報告はございません。そういう知見も今のところはありませんで、これは例えば線虫ですとか、いろいろ研究されていて、そういうのがあるというのはあるのですが、今のところ例えば哺乳動物とか、もうちょっと高等な生物で選択的に取り込むというような知見はございません。

○山添委員 ありがとうございます。

○小関専門委員 今の御質問に対する最初のほうの御質問ですが、発現量は確かに変わらないかもしれませんが、蓄積量、安定量は乾燥ストレス等によって変わるのではないですか。それでRNA binding proteinを入れた乾燥耐性のトウモロコシがつくられたように思うのですが、それと掛け合わせることによって、やはり違いが出てくる。要するに乾燥によってdsRNA自身が安定化して蓄積量が普通のものよりも高まるということ考えてよろしいのですか。

○説明者 乾燥耐性のトウモロコシに関しましてはRNAシャペロンで、乾燥条件下にはRNAをもうちょっと安定的にするという作用があったと思うのですが、それは通常

の状態でのRNAは働かずに乾燥条件で働く。そのRNAが減少するのを食い止めるという作用だったと思うのですが、それから考えますと *DvSnf7* の dsRNA を乾燥条件になったときにものすごい量を引き上げて、量を多くするというようなことは考えられないかなと思います。

○小関専門委員 乾燥耐性のときは下がるのでしょうか。要するに劇的に上がるということは確かにないかもしれませんが、要は何かというところをスタックのことを考えています。ですから、その辺の情報があれば、即答ではなくてよろしいのですが、あらかじめ教えていただければ幸いかなと思います。

○説明者 データについては確認させていただきたいと思います。

○村田委員 先ほどの山添先生の質問の続きになるのですが、全身に伝播するという話があったと思うのですが、哺乳動物では知られていないと思ってよろしいのでしょうか。

○説明者 これに関しましては哺乳類、特にヒトに関しましては核酸医薬の関係で医薬品業界で多くの研究がなされているのですが、例えば全身への伝播がするというような報告はありませんで、特にRNAを用いる核酸薬ですと全身に伝播するというところは非常に重要なところでして、それをどうしてもやりたいという研究者や会社さんも多いのですが、それはなかなかできないというところで皆さんがいろいろな試みをしておりますけれども、そういうようなことは非常に困難であるというところではあります。

○澤田座長 よろしいでしょうか。大分時間もたってまいりましたので、説明者の方、どうもありがとうございました。

(説明者退室)

○澤田座長 それでは、審議に戻りたいと思います。先ほどの説明者からの回答を踏まえた上で、追加の御意見、コメント等がございましたら、お願いしたいと思います。よろしいですか。話は十分出尽くしたかなと思っています。

それでは、先生方からいただきました意見、確認事項を指摘事項案として取りまとめまして、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せん。

それでは、議題1につきましては、これで終わりたいと思います。

議題2のその他でありますけれども、事務局から何かありますでしょうか。

○北村課長補佐 特にございません。

○澤田座長 ありがとうございます。

以上をもちまして、第137回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。きょうもありがとうございました。