

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## 第160回会合議事録

1. 日時 平成29年5月18日（木） 14:00～16:39

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

- ・ ARG-No.4株を利用して生産されたL-アルギニン
- ・ RFESC02株を利用して生産されたりボフラビン

(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、飯専門委員、

(食品安全委員会)

佐藤委員長、山添委員

(事務局)

東條事務局次長、鋤柄評価第二課長、池田評価情報分析官、  
井上課長補佐、山口係長、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 ARG-No.4株を利用して生産されたL-アルギニン
- ② RFESC02株を利用して生産されたりボフラビン

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160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、所用により近藤専門委員、柘植専門委員、中島専門委員、樋口専門委員、山川専門委員が御欠席です。

本日の議題であります、新規の品目でありますARG-No.4株を利用して生産されたL-アルギニン、RFESC02株を利用して生産されたリボフラビン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。

○井上課長補佐 それでは、議事次第に基づき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。

資料としましては、食品健康影響評価に関する資料。

机上配布資料を1つにまとめております。ここでは、①としてL-アルギニンのクロマトグラム。②としてリボフラビンの成分分析結果。③としてベルト型ろ過について。④としてリボフラビンの製造過程に関する安全性評価資料についてとなっております。

この机上配布資料につきましては、調査会終了後、回収させていただきます。

なお、これら以外の参考資料につきましては、ファイルにとじまして委員の皆様の上に乗せていただいております。本ファイルについても調査会終了後、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。

○井上課長補佐 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でした。

以上です。

○澤田座長 既に御提出を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。

それでは、新規の品目でありますARG-No.4株を利用して生産されたL-アルギニンについての審議を行いたいと思います。

まず事務局から御説明をお願いします。

○井上課長補佐 それでは、ピンク色のファイルをお願いします。ARG-No.4株を利用して生産されたL-アルギニンの準備をお願いいたします。タグですが、資料本文というタグの1ページから説明に入らせていただきます。

まず1ページ、L-アルギニンの食品添加物としての概要です。今回、調査審議をお願いしますL-アルギニンは、第8版の食品添加物公定書に記載された既存添加物に該当し、そ

の概要についてはこちら表の記載のとおりでございます。

めくっていただきまして、今回のL-アルギニンの用途でございます。L-アルギニンの用途ですが、食品分野では主に栄養補給を目的とするスポーツ栄養食品飲料及び調味料などに用いられている旨が記載されております。

続きまして、製造方法の概要でございます。「2-1 L-アルギニン生産菌 *Escherichia coli* ARG-No.4株の作製の目的」でございます。今回、L-アルギニンの生産菌ARG-No.4株は、生産効率を高めることを目的とし、L-アルギニン生産菌No.3002株をもとに改変されたARG-No.2株、さらにこの株を改変したものでありますARG-No.3株、このNo.3株をさらに改変した菌株でございます。

次のページからですが、今回の申請品目でありますARG-No.4株及びこのNo.4株を作製するもとなりましたNo.3002株、ARG-No.2株、3株の作成方法について概要が記載されております。今回No.3002株、ARG-No.2株については4ページから9ページに記載されておりますので、御参照いただければと思います。

では、ページは飛びまして10ページをお願いします。ここからですが、本申請品目でありますARG-No.4株及びそのもとなりましたNo.3株について御説明をいたします。

ARG-No.3株の親株ですが、親株はARG-No.2株を親株として使用されています。ベクターですが、ベクターは使用されておらず、相同組換えを利用した方法を用いられており、ただし、構築途中においては一時的にヘルパープラスミドを使用されていますが、No.3株にはこのヘルパープラスミドは除去されているという旨が記載されています。

(4)の挿入遺伝子です。まず●●●が挿入遺伝子としてあり、これら全ては *E. coli* H155株より単離され、トランスポゾンTn2555に由来する遺伝子でございます。いずれの遺伝子も有害性などは知られていないこと、また、*E. coli* H155株についても有害性などの報告はございません。また、●●●を目的として、これら4遺伝子がmini-Muベクターを用いて遺伝子組み込みユニットによって染色体に組み込まれています。

(5)プロモーターです。*E. coli* K-12由来のDNA及び*E. coli*を宿主とするバクテリオファージ●●●由来のDNAよりなるものでございます。これら自身が有害な影響を及ぼす可能性は低い、または生理活性を有さない配列であると考えられる旨が記載されています。

続きまして(6)のARG-No.3株です。こちらNo.2株に対して4つの遺伝子をmini-Muベクターに搭載がされています。幾つかの欠失などを処理しまして、最終的にはARG-No.3株が構築されています。このARG-No.3株は、抗生物質耐性マーカーは有さないことが記載されています。

続きまして、またページが飛びます。14ページをお願いします。ここからは今回の申請品目でございますNo.4株についての説明となります。

まず親株ですが、先ほど御説明いたしましたNo.3株を親株として使用されています。ベクターですが、今回のNo.4株もベクターは使用せず、相同組換えを利用した方法を用いており、ただし、構築途中においては一時的にヘルパープラスミドを使用していますが、こ

のNo.4株でもヘルパープラスミドは除去されていることが記載されています。

挿入遺伝子についてです。挿入遺伝子は、●●●、この4つの遺伝子が挿入されており、いずれも *E. coli* K-12株に由来する遺伝子でございます。同じくいずれも有害性などは知られておりません。

これら挿入遺伝子の目的は、L-アルギニンの生産性を向上させることを目的として挿入されており、No.4株においては、これら4つの遺伝子が相同組換えを利用した方法により染色体に組み込まれております。

続きましてプロモーターですが、*E. coli* K-12株由来のDNAより構成されており、これらの配列はそれ自身が有害な影響を及ぼす可能性が低い、または生理活性を有さない配列であると考えられております。

(6)はNo.4株ですが、これら4つの挿入遺伝子に3つのプロモーター配列を挿入。そして次に2つの遺伝子を復帰導入し、別の7つの遺伝子を欠失導入されております。このARG-No.4株も同じく抗生物質耐性マーカーは有さない旨が記載されています。

18ページからはL-アルギニンの製造方法についての記載となります。製造工程はこちらフローチャートに示されているとおりでございます。こちらをご覧くださいながら説明のほうに入らせていただきます。

L-アルギニンの発酵液から●●●発酵副生物を系外に除去しています。その後、L-アルギニンの●●●がなされています。

そのL-アルギニンの●●●し、精製結晶として分離され、●●●、最終的には高純度のL-アルギニンの精製結晶を取得し、最終製品としての食品添加物L-アルギニンが得られています。

この最終製品の純度は、後にまとめておりますとおり食品添加物公定書規格を満たしている旨が記載されております。

次のページをお願いします。現行製品の品質との比較でございます。L-アルギニンの食品添加物公定書に記載されています成分分析の結果を、今回の申請品目と現行製品でありますL-アルギニンNo.3株の分析結果が、こちらの表としてまとめられています。この結果から、公定書規格においては申請品目の品質は現行製品と同等であると考えられるということが申請者から考察がなされています。

20ページですが、L-アルギニン製品の不純物プロファイルの比較結果となっております。この比較結果ですが、3つの分析法、アミノ酸自動分析、液クロ法では2つのモードで分析がなされており、申請品目と現行製品の不純物のプロファイルの比較がまとめられています。

まず1つ目がアミノ酸自動分析結果による比較でございます。こちらは申請者からは不純物は申請品目中には検出されなかったという結果がなされています。

続きまして、(2)液クロ法による親水性不純物の比較でございます。この不純物、液クロ法では親水性の不純物を検出することを目的とし、分析がなされており、その結果、

表として申請品目と現行製品の結果がまとめられています。この分析の結果からピーク3、4、5を除いたもの、いわゆるピーク1、2につきましては、比較した現行製品3ロットの最大値を超えるものはなかったということが結果として出されています。3、4、5のピーク5につきましては、その一番下の表に示されているとおり、過去の申請時の比較対象品目、これは平成17年に安全性審査が行われた際の従来育種の由来品でございますが、その3ロットのうち最大値を超えるものはなかったという結果が出されています。

22ページをお願いします。残りのピーク3、4については国内流通品をこちら比較として持ってきて、4ロットの分析データが提出されています。この4ロットの最大値を超えるものはなかったという結果から、考察としては、結論としましては検出限界以上の新規不純物及び検出された既存不純物量は、従来の添加物の最大不純物量を超えるものではなかったと結論づけられています。

続きまして(3) HPLC法による疎水性不純物の比較、液クロ法の2つ目になります。こちら分析の結果、検出限界以上の不純物は申請品目中には検出されなかったという結果が出されており、これら3つの分析結果から、新製品は現行製品と同等の品質であることが確認されたと考察されています。

24ページをお願いします。「3-3 L-アルギニン製品中の残存タンパク質分析結果」です。膜濃縮ブラッドフォード法によってタンパク質の分析がなされており、その結果から申請品目中には検出されないことが確認されたという結果が出されています。

申請書の説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして御意見をいただきたいと思えます。

まず1ページから18ページで、アルギニンの食品添加物としての概要と製造方法の概要まででコメント、御意見がありましたらお願いしたいと思えます。よろしいですか。

続きまして19ページから最後までで、申請品目と現行製品の品質の比較等でコメント、御意見がございましたらお願いします。

○飯専門委員 不純物ピークのこと、21ページの表のピーク3から5に関する事なのですけれども、これは後から追加していただいたクロマトグラムについては、机上配布を参照してよろしいのでしょうか。

○井上課長補佐 今、飯先生がおっしゃっている資料なのですけれども、机上配布資料①のL-アルギニンのクロマトグラムが追加で事務局のほうで準備させていただいたものです。なぜ後追いで準備をしたかといいますと、申請書では国内流通品、液クロ法1法の生データがなかったものでして、それを後追いで申請者に求めたというのが経緯でございます。

○飯専門委員 それで、なかったのでありますかと前もって尋ねたこともあったのですけれども、1つに気になるのは、申請書にある現行品と申請品目とのパターンを比べたときに、ピーク3、4に関して、もともと添付の資料についていたリテンションタイムが29分とか37.2分というものが、この机上配布資料のピークのどれになるのか、時間が合わない

のです。その点がひっかかっている、ひょこっと高い、どのピークを指して言っているのか全体に横がもしかしたらずれているのかもしれないのですけれども、どれを見て判断したらいいのか気になっておりました。

○澤田座長 机上配布資料をちょっと見ただけでわからないので、もう少し説明してくださいということですか。

○飯専門委員 もともと22ページの表の根拠となるクロマトグラムが添付資料についていなかったもので、それを取り寄せるようお願いしていたのですけれども、届いたものを見ますと今回のものは。

○澤田座長 ピーク1～5はどれに相当するか。

○飯専門委員 ピークの3と4に関しては、現行製品と申請品目で申請品目のほうが少し高目に出ているからということで、比較対象として、国内流通品を加えてきたという話になっていますけれども、そのピーク3、4の申請品目の表にあるリテンションタイムというのは、ほとんどピークにはなっていないのですが、添付資料では大体その時間にほんの小さな出っ張りが見えるのですが、同じ時間に国内流通品のピークがなくて、横に大きなピーク、不純物としては少し高目のピークがあるということで、それを指して比較しているのかどうか、これだけだと説明がなくてよくわからなかった。その辺はわかりますか。

○井上課長補佐 そちらリテンションタイムなりピークエリアというのものも、確かにないということを確認して、今、厚労省を通して確認しているところではあります。

○飯専門委員 特にピークの4というのが37.2分というところのピークを指しているのですけれども、40分のところに少し大き目のピークがあるけれども、37.2というあたりはほとんど平らですし、どこのピークをもって後ろの表の数値を出してきたのが、これだと判断しにくいというのが正直感じています。

○井上課長補佐 確かに飯先生がおっしゃるように、ピーク3、4というのが国内流通品、例えば①でありましたら約3倍違いますので、理論上はピークが約3倍違うものが出てきてもいいのかなとは思いますが、それを今、確認はしているのですが、まだ回答いただけない状況でございます。

○澤田座長 37と38というのは、どれがどれだかよくわからないと言われるとそのとおりと。

○飯専門委員 ついでに申し上げると、38というピーク5は前に申請しているものの値を見ているのですけれども、それをよく見ると時間が一致していなくて、そちらのほうは由来が同じ大腸菌だと思うので、少しずれているのかなとは想像できるのですけれども、国内流通品は由来もよくわからないから、本当に同じ化合物を見ているのかどうかということのも不安になってきてしまうものですから。

○澤田座長 37.2はちゃんと見られるのかどうか。ピーク4と5が非常に近接していて、実際にピークに分かれていないようなところもありまして、38だけ見ればいいのかないかなという気もしないではないのです。それでHPLC-1で申請品目もピークがよくわからないですね。

実際には。これはもう少し申請品目も拡大したものは入れませんか。

○飯専門委員 これだけ見て、横軸の時間の表との不一致もあるし、どのピークを指して比較したらいいのかがわからないと、いいですよとも言切れないなど。

○澤田座長 もう少し詳しい説明をいただいて、量的には問題ないので、安全性の問題はないかと思えますけれども、後追いで構いませんので説明をもう少し追加していただくということで、よろしいですか。

○井上課長補佐 きちんとデータとクロマトが照らし合わせられるようなクロマトグラムを求めるということで、もう一度確認したいと思います。

○澤田座長 特に37と38のピークをどうやって同定しているのか。

○飯専門委員 あと国内流通品と比較するのであれば、国内流通品のどのピークが37あるいは38なのかというのが、全体のパターンは違いますね。その辺も明確にさせていただきたい。このままだと時間だけ見たらずれているか、ほとんど真っ平らなところを比較しているみたいになってしまうので。

○井上課長補佐 では国内流通品と申請品目のほうにも詳しい情報を求めるということでもよろしいでしょうか。

○澤田座長 ほかは追加で何かありますでしょうか。

それでは、量的には多いわけではありませんで、安全上の問題があるということではないのでありまして、評価書案の審議に入りたいと思います。

○井上課長補佐 では、評価書案の説明に入らせていただきます。

資料の4ページから説明に入らせていただきます。

「Ⅰ.評価対象添加物の概要」でございます。こちら名称、用途、申請者、開発者は記載のとおりでございます。

本添加物は、L-アルギニンの生産効率を高めるため、*E. coli* K-12株由来の突然変異株を宿主として、平成25年に安全性評価を終了したARG-No.3株にL-アルギニンの生合成に関与する遺伝子の導入、復帰導入、プロモーター配列の挿入並びにL-アルギニンの代謝に関する遺伝子の欠失を行ったARG-No.4株を用いて生産されたL-アルギニンでございます。

L-アルギニンは、食品添加物としての使用が認められており、成分規格、食品添加物公定書に記載されています。また、No.4株の宿主であります*E. coli* K-12株は、有害な影響を及ぼす毒素の産生性や病原性は知られておらず、OECDでは優良工業製造規範が適用できる宿主微生物として認定されています。また、このNo.4株は、抗生物質耐性マーカー遺伝子は有されていません。

「Ⅱ.食品健康影響評価」。

1.本添加物は、製造工程において使用微生物、副生成物が除去され、晶析により結晶として高度に精製され、食品添加物含量規格を満たしています。

2.本添加物の非有効成分について、最終製品においては(1)タンパク質は検出限界未満、(2)食品添加物公定書の成分規格を満たしている、(3)アミノ酸分析(液クロ法)によ

る分析の結果、比較対象として用いた従来品のL-アルギニンに存在しない不純物が検出されましたが、当該不純物は比較対象として用いた従来品以外の国内流通品にも含まれており、本申請品における含有量は国内流通品の含有量よりも低かった。また、従来品の含有量を超えて存在する不純物も検出されましたが、平成17年12月15日に安全性評価済みのL-アルギニン申請時の比較対象品目の最大値を超えるものではありませんでした。

以上、(1)～(3)の結果から、従来品と比較して既存の非有効成分の含有量が安全上問題となる程度まで増加していない。かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられます。

3.以上、1及び2の結果から、本添加物について「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」の附則「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」に基づき、安全性が確認されたと判断した。

したがって、本添加物については「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判断したとなります。

評価書の説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案について御意見、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。

短いので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、先ほどの追加の説明をもう少しきちんとしていただくということで、それを事務局と飯先生と私で確認いたしまして、確認できた後、食品安全委員会に御報告して、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。ありがとうございます。

続きまして、新規の品目でありますRFESC02株を利用して生産されたりボフラビ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いたします。

○井上課長補佐 それでは、水色の分厚いファイルの準備をお願いします。本日、調査審議をお願いしますRFESC02株を利用して生産されたりボフラビンでございます。今回、資料の説明に入ります前に、簡単にこの品目に関する経緯について御説明させていただきます。

この品目なのですけれども、2年ほど前に厚労省からセルフとして扱えないかという事前の相談を受けまして、その対応について専門委員の先生方に御相談させていただきました。その際に先生方からの御意見としては、今回の品目についてはセルフとしては扱えない。いわゆるフル評価が必要ではないかという判断をいただきまして、その旨を厚労省にお伝えしました。その伝えた内容に基づいて申請者からは、今回フル評価での評価要請がありました。

リボフラビンというものは既に先生方御存じのとおりビタミンでございまして、当初、高度精製添加物の確認での評価依頼ではないかということで、今回、調査審議を行う前に厚生省に確認したところ、申請者からは要望としてフル評価での審議をお願いしたいということで、本日、先生方にはフル評価での調査新規をお願いしたいものの案件でございます。

今回、申請されたリボフラビンの生産菌株についてであります。このRFESC02株なのですけれども、2001年に安全性審査の手続を経ました遺伝子組換え添加物として公表されています。リボフラビンの組換え生産菌から抗生物質耐性マーカーが2つありまして、このマーカー遺伝子を除いた菌が今回、生産菌として用いられているものでございます。

そういった経緯がございましたので、今回、申請書の資料はフル評価ということで準備をいたしました。

では申請書の12ページから説明に入らせていただきます。第1「1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料」でございます。(1) 名称はリボフラビン、有効成分はリボフラビン、指定添加物として栄養強化あるいは着色料として使用されています。CAS No.、化学名につきましては、こちらに記載のとおりでございます。

基原ですが、従来のリボフラビンは合成法によりつくられたもの、もしくは *Eremothecium ashbyii* や *Ashbya gossypii* など、微生物により生合成されたものでございます。反応特異性ですが、動物の成長促進因子として発見された黄緑色素であること、また、生体内においては補酵素としての働きがあることなどが記載されています。

(2) 製造方法です。製造方法は2つございまして、合成法と発酵法の2つでございます。合成法ですが、まずブドウ糖からDリボースを合成し、このDリボースと3,4-キシリジンとの縮合により合成物が精製され、この合成物と1-D-リビチルアミノ-3,4-ジメチルベンゼンをジアゾカップリングし、さらにバルビツール酸と縮合して、リボフラビンが合成されています。発酵法ですが、*Eremothecium ashbyii* あるいは *Ashbya gossypii* などの微生物を使ってリボフラビンを合成し、精製し、利用されております。

(3) 用途及び使用形態は、主に栄養強化または着色の目的でパンや菓子、スポーツ飲料、マヨネーズなどに使用されています。

(4) 摂取量ですが、平成25年の厚生労働省の調査では、まず1歳以上の日本人においては1人1日当たり平均1.13mg、摂取量の最も多い年齢階級でも1日当たり平均1.21mg摂取されているという報告がございまして。

「2 宿主及び導入DNA」でございます。

(1) 宿主の種名、菌株名の由来でございますが、*B. subtilis* BS5596株でございます。

(2) DNAの供与体の種名、株名ですが、こちらは表3にまとめてあります。挿入DNAは3つございまして、*tkt*●●●遺伝子、*rib*オペロン上流配列、3つ目が*ribC*●●●●遺伝子、この3つでございます。

(3) 挿入DNAの性質、導入方法ですが、こちら表4にまとめられています。*tkt*●●

●遺伝子の性質としては、低活性型のトランフケトラーゼを発現します。*rib*オペロン上流配列については、リボフラビン生合成遺伝子群が恒常的に発現する機能があります。*ribC*

●●●遺伝子につきましては、変異型のフラボキナーゼを発現する性質がございます。

導入方法ですが、2つありまして、形質転換法とPBS1ファージによる形質導入法、この2種類の方法がございます。

次のページをお願いします。14ページの「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。*B. subtilis*は、食品や食品添加物での適用の分野では最もよく知られた微生物の1つであること。リボフラビン以外にも $\alpha$ -アミラーゼなど食添の基原としての既存添加物品目リストに記載され、豊富な使用経験がある旨が記載されています。

「4 宿主の構成成分等に関する資料」。宿主及び供与体が属する*B. subtilis*は、有害生理活性物質を産生するという報告はなく、また、動植物に対しても寄生性や定着性は報告されていない。また、バイオセイフティーレベル1に該当します。

「5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」。

(1) 製品名、有効成分は、こちら記載のとおりでございます。

(2) 製造方法ですが、こちら次のページの図4の製造方法フローチャートをごらんいただきながら説明のほうに入ります。

この製造方法は従来法と同じく発酵法であり、液体培養にてリボフラビンが精製されます。簡単に言いますと種培養、本培養を行い、リボフラビンは菌体外に産生されます。その後、●●●で熱処理を行い、菌を完全に不活化し、そのため生きた菌は最終製品中には残存しないこと、また、デカンテーションにより菌体画分とリボフラビン粗結晶画分を分離し、●●●酸処理を行い、生産菌株由来のDNA及びその他成分が破壊されます。その後、ベルトろ過濃縮を行い、水で洗浄、粗リボフラビンが得られます。このリボフラビンを●●●を行い、その後、ろ過をし、再度ベルトろ過濃縮及び洗浄を行って●●●します。その後、スプレードライして最終製品が得られ、この最終製品には生産菌が残存しないことがPCR法で確認されています。

(3) 用途及び使用形態。こちらは従来のリボフラビンとは変わりがないということです。

(4) 有効成分の性質、従来添加物の比較ですが、有効成分のリボフラビンは、従来添加物と比較して同一である旨が記載されています。

6 (1) 遺伝子組換え添加物と従来添加物は記載のとおりでございます、(2) 組換え体と宿主ですが、宿主との違いは4つあるということが書かれています。

まず1つ目は、宿主に挿入されているプラスミドの2つが完全に除去されていること。2つ目は、*rib*オペロンの5'リーダー配列がプロモーターにより恒常的に発現するように修飾されていること。3つ目は宿主の野生型か変異型遺伝子に置換されていること。4つ目はポリグルタミン酸生合成遺伝子群が不活化されていることでございます。

続きまして「第2 宿主に関する事項」ですが、1、2、3、4についてはこちら申請書の

記載どおりでございます。

「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」でございます。この *B. subtilis* の類縁種には、*B. licheniformis*、*B. pumilus*、*B. giobigii*、*B. niger*、*B. natto*、*B. amyloliquefaciens* などがございます。これらはいずれもバイオセーフティーレベル1に分類されている。また、*B. cereus* はバイオセーフティーレベル2で、*B. anthracis* につきましてはレベル3に分類されているが、*B. subtilis* とは区別されている旨が記載されています。

続きまして、17ページ「第3 ベクターに関する事項」です。

この野生株からBS5596株を構築する過程で使用したベクタープラスミドは、添付資料6に記載されていますので、こちら御参照ください。

次にBS5596株から本生産菌株の構築過程では発現ベクターは使用されていないこと。また、挿入DNA断片は全てPCRにより合成されており、形質転換及び形質導入法により宿主に導入されているため、以下の1、2の記載は省略されています。

次に「第4 挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項」でございます。

1 (1) は記載どおりでございます。

(2) 安全性に関する事項ですが、まず1つ目の挿入 *tkt* ●●● 遺伝子の供与体であります *B. subtilis* 1A747株は、*B. subtilis* 168株の由来であること。2つ目、挿入プロモーターの供与体であるバクテリオファージSP01は、*B. subtilis* バクテリオファージ由来のものであり、その *B. subtilis* の内在性遺伝子であると考えられております。3つ目の挿入 *rib* オペロンリーダー配列の供与体であります *B. subtilis* ●●●株は、同じく *B. subtilis* 1A747株由来であること。4つ目、挿入遺伝子の *ribC* ●●● 遺伝子の供与体であります *B. subtilis* ●●●株は、こちらも *B. subtilis* 1A747株由来であります。

*B. subtilis* は従来から食添の製造に広く使われた微生物であり、安全性については先ほど説明したとおりでございます。バクテリオファージにつきましては、ヒトに感染することなく、また、病原性などは報告されていない旨が記載されています。

18ページに挿入DNA遺伝子、その遺伝子産物の性質に関する事項でございます。

(1) は記載どおりでございますので、説明は省略させていただきます。

ページ飛びまして21ページをお願いします。(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。挿入DNAの機能に関しましては、こちら表7にまとめられておりまして、まず1つ目、*tkt* ●●● 遺伝子、トランスケトラーゼ遺伝子ですが、こちらは先ほど説明しました低活性型トランスケトラーゼを発現し、その発現によってリボフラビン生合成の方向へ優先的に流れるように、リボフラビンの整合性が増加される機能がございます。

2つ目、*rib* オペロン上流配列ですが、こちらはリボフラビン生合成遺伝子群が恒常的に発現する機能でございます。

続きましてフラボキナーゼですが、こちらは変異型のフラボキナーゼを発現し、その結

果、リボフラビン生合成の抑制機構が解除され、リボフラビンの生合成が増加する機能となります。

これら3つの挿入DNAの産物が有害作用を持つという報告はなく、また、これらの3つの挿入DNAは、いずれもその産物がそのまま添加物として使用されるものではないので、リボフラビンの生合成または代謝経路で働くものという記載がなされています。

続きまして、3 (1) ~ (3) は記載どおりですので、説明は省略させていただきます。

22ページの「4 ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」ですが、こちらも説明は省略させていただきます。

「5 構築された発現ベクターに関する事項」ですが、こちら発現ベクターは使用していない旨が先ほど説明させていただきましたので、こちら説明は省略させていただきます。

23ページ「6 DNAの宿主への導入方法に関する事項」です。この導入方法なのですが、けれども、大きく3つのステップに分かれています。まずステップ1つ目ですが、こちらは野生株からBS5596株を構築する過程となっています。ステップ2は、このBS5596株から●●株の構築が該当します。ステップ3は、最終的にはRFESC02株、生産菌株の構築となっております。

次のページから順にステップ1、2、3について申請書のほうで記載されていますので、できるだけ簡単に説明させていただきます。

では25ページからお願いします。ステップ1なのですが、ステップ1も幾つかのプロセスに分かれておまして、まず野生株からRB50株の構築がステップ1- (1) になります。こちらは野生株168株から最終的には変異体のRB11株が得られており、このRB11株からグアニン構造類似体でありますデコイニンに対する耐性株が得られ、ここからデコイニン含有量最少培地に移し、出現したコロニーを分離し、そのコロニーというものが変異体RB15株となっております。このRB15株には不要な変異が入っておりますので、その除外をする目的で、まずRB15株の全DNAを抽出した後、*B. subtilis* 168 1A382株を親株として、これを受容菌とした形質転換を行っています。そこでRB39株を選択し、このRB39株からさらにGTPに向かう代謝の流れを増強する目的で、メチオニンスルフォキシドに耐性を示す自然変異株のRB46株を分離しています。この46株からリボフラビン構造類似体のロゼオフラビンに耐性を示す自然変異株を選択し、これがRB50株となっております。

27ページはステップ1- (2) になります。こちらはRB50株からBS5596株の構築となっております。こちら構築の目的は、修飾型の*rib*オペロンのコピー数を増大させ、かつ、リボフラビンの高生産性を目指すことにあるということが目的となっております。このリボフラビン生産菌の構築には、形質転換法と形質導入法の2種類の方法が用いられており、この方法が2段階の操作で行われています。

26ページの図にありますとおり、こちら点線で囲ってある部分と二重の四角で囲ってある部分、この系統に分かれておまして、まず2段階のうちの1つ目ですが、図7の右半分

の点線で囲った部分、こちらがまず第1のステップとなります。こちらなのですが、RB50株の全DNAを抽出し、62121株に形質転換法を用いて導入し、デコイニンの耐性、ロゼオフラビンの耐性を獲得したRB52株が得られています。この52株にベクターに修飾型のリブオペロンと、その下流にクロラムフェニコール耐性遺伝子をクローン化したプラスミドを形質転換法にて導入し、最終的にはこちらRB52::[pRF69]株が得られています。この株から全DNAを形質導入法によりRB50株に導入し、クロラムフェニコール耐性コロニーを選択し、多コピーのpRF60を有するアデニン非要求性を示すRB50::[pRF69]m株が得られています。

もう一つの図の左半分の二重の四角で囲った部分についてですが、こちらは2つ目のステップとして、RB52株に制限酵素で線状化したプラスミドpKT2-*tet*を形質転換法を用いてRB54株が得られています。このRB54株に制限酵素で線状化したプラスミドにまた形質転換法を用いてRB55株が得られています。次に、またさらにRB55株にプラスミドを形質転換法を用いて導入し、RB55::[pRF93]株が得られ、さらにこの株に全DNAを形質転換法を用いてRB50::[pRF69]m株が導入し、最終的にはBS5596株が得られています。

続きまして30ページをお願いします。こちらからはステップ2のプロセスに入ります。ステップ2なのですけれども、こちらも幾つかの工程が得られていまして、まずステップ2の1つ目、BS5596株から●●●株の構築となっています。こちらBS5596株をランダムに変異処理し、その後、●●●株が得られています。続きまして、ステップ2- (2) ●●●株から●●●株の構築になります。この構築の目的はトランスケトラーゼの活性を低減させることにより、リボフラビン高生産に有利な代謝の流れを実現することが目的となっております。このためマーカーフリーの遺伝子導入法を用いて、1アミノ酸置換を有する低活性型のトランスケトラーゼ遺伝子を●●●株の野生型トランスケトラーゼ遺伝子と置換がされています。

具体的にどのようなプロセスかといいますと、●●●株の野生型からトランスケトラーゼ遺伝子を、2つの工程を経て活性が低下した変異型のトランスケトラーゼ遺伝子と置換した●●●株が構築されています。この2段階のステップなのですけれども、まず1つ目としては、トランスケトラーゼ遺伝子を不活化する目的で、ネオマイシン耐性遺伝子を活性型トランスケトラーゼ遺伝子に挿入がされています。2つ目なのですけれども、トランスケトラーゼ活性が低下した菌株を得る目的で、最終的にはリボフラビンの生産性のすぐれた菌株として●●●株が選択されています。こちら32ページ、33ページに詳細な説明と図が示されていますので、参照していただければと思います。

ページが飛びまして35ページをお願いします。35ページはステップ2- (3) ●●●株から●●●株への構築になっています。この構築目的ですけれども、クロラムフェニコール耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子、この遺伝子を除去することが目的となっております。そのためには2種類のプラスミドを削除し、生産菌でありますRFESC02株の両座位において*B. subtilis*野生株のゲノム構造を回復させる準備を行っております。

まず1つ目のプラスミドpRF69のプラスミドの除去ですが、35ページの図10に示されています。こちらですが、●●●株を出発株として中間株であります●●●株が得られています。

続きまして、36ページをお願いします。もう一つ、残りのプラスミドpRF93のプラスミドの除去ですが、こちらは●●●株の**bpr**遺伝子座に組み込まれていますプラスミドをクロラムフェニコール耐性遺伝子カセットで置換し、●●●株が得られています。これによって目的とするプラスミドが除去されていることとなります。

37ページに移りまして、この●●●株のゲノム解析を行った際に、BS5596株が保有していましたフラボキナーゼ遺伝子における変異であり、リボフラビン生合成の抑制機構の解除に働きます変異型リボフラボキナーゼが野生型に置換していることが確認されています。この変異型のフラボキナーゼは、本生産菌構築において好ましい変異であるため、この後、●●●株以降にこの株への再導入がなされています。

続きまして、37ページのステップ2- (4) ●●●株から改変**rib**オペロン組み込み株●●●株の構築でございます。

まず1つ目ですが、改変**rib**オペロンの構築の説明が下記のとおりになっています。こちらプラスミド2つ、pRF69とpRF93を削除した後、新たに*B. subtilis*のバクテリオファージSP01由来の強力なプロモーターを有する改変**rib**オペロン1コピーのみを有するリボフラビン高生産性株を構築しています。まず改変**rib**オペロンを構築するためには野生型の**rib**オペロンの●●●をネオマイシン耐性遺伝子カセットで置換し、中間株であります●●●株が得られています。これにつきましては次のページの図10に概略図が示されています。

38ページに移りまして、改変**rib**オペロンを構築するためには2種類のDNA断片からなるPCR産物を生成されています。この2種類ですが、こちら (1) と (2) に書かれているものが2種類のDNA断片でございます。これらの (1) と (2) の2つのPCR、DNA断片を連結したDNA断片を●●●株に形質転換し、中間株でありますリボフラビン非要求性の●●●株が得られています。この●●●株にまた*B. subtilis*バクテリオファージPBS1を感染させ、リボフラビン非要求性の●●●株が得られています。この●●●株の構築過程につきましては40ページの図10、 (c) に概略図が示されています。

続きましてステップ2- (5) ●●●株から抗生物質耐性遺伝子の削除による●●●株の構築でございます。

まず1つ目のステップとしましては、フラボキナーゼの遺伝子の**ribC**の変異導入でございます。リボフラビン生合成の制御解除をさらに進める目的で、この●●●株が保有していましたフラボキナーゼ遺伝子の変異型であります**ribC** ●●●の再導入が行われており、**ribC** ●●●変異を*B. subtilis* 1A74株由来の●●●株のバクテリオファージの感染溶液を用いて●●●株に導入し、さらに●●●株が得られています。こちらについては41ページの図10、上のほうにありますこちらが概略図となっております。

41ページに移りまして、ネオマイシン耐性遺伝子を除去する目的で**ribC** ●●●変異と

同様に、リボフラビンの生合成の抑制機構を解除する *ribC* 遺伝子の変異型であります *ribC* ●●●を一時的に用いており、この *ribC* ●●●変異を有する野生株 *B. subtilis* 168株由来の●●●株を用いて最終的には●●●株が得られています。このプロセスについては真ん中の図が概略図となっております。

次に、2つ目のステップですが、抗生物質耐性マーカー遺伝子の削除となります。具体的にはクロラムフェニコール耐性遺伝子の *bpr* 遺伝子からの削除。2つ目はエリスロマイシン耐性遺伝子の●●●からの削除及び *ribC* ●●●変異の *ribC* ●●●変異への再置換を2つの工程を経て行っています。

1つ目は、クロラムフェニコール耐性遺伝子カセットを除去するのが1つ目のステップでございまして、2つ目ですが、42ページに移りまして、下の3パラ目ですが、こちらに2つ目のステップとしてネオマイシン耐性遺伝子カセットを除去し、*ribC* ●●●に再度置換し、同時にエリスロマイシン耐性遺伝子カセットを除去する目的で構築がなされています。これらについての説明につきましては、詳細な説明は41～43ページに記載がされていますので、御参照いただければと思います。

44ページ、こちら最終ステップでありますステップ3、リボフラビンの生産菌でありますRFESC02株の構築でございます。この構築につきましても幾つかのステップがございまして、まず1つ目がポリグルタミン酸非産生性のRFESC02株の構築になっています。それはポリグルタミン酸生成遺伝子群の不活化となっており、これは3種類のPCR産物をまず得ることから始まっております。

このPCR産物ですが、45ページの上のほうに(1)から(3)まで書かれておりまして、これらのPCR産物で1A747株を形質転換し、エリスロマイシン耐性変異株を得た後、中間株であります●●●株が得られています。この●●●株からリボフラビン産生能を調べて、すぐれた一株としての●●●株が得られています。こちらのプロセスにつきましては45ページの図10に概略図が示されています。御参照いただければと思います。

続きまして46ページをお願いします。エリスロマイシン耐性遺伝子の除去でございますが、エリスロマイシン遺伝子を除去する目的で2種類のPCRを行っています。1つ目のPCRは(1)の断片を直接連結させ、鋳型として *B. subtilis* 1A747株を用いています。その結果、プラスミド●●●が得られています。こちらは46ページの図10にプラスミドの構築過程が示されています。

続きまして2種類目のPCR産物ですが、3つの断片を得るために行われています。この3つの断片といいますのは、下に示されているとおり(1)～(3)でありまして、これら3断片を連結して得られた1本のPCR産物を●●●株に形質転換し、●●●株が得られています。こちらは47ページの図10にこの概略図が示されています。この●●●株から調製した染色体DNAとプラスミドDNAをともに用いて、●●●株を同時に形質転換を行っています。その後、クロラムフェニコール含有の複合培地で形質転換をし、株を選択し、その形質転換株から最終的には●●●株が得られ、この●●●株のバクテリオファージPBS1

感染溶液を用いて今度は●●●株に導入し、クロラムフェニコール耐性やエリスロマイシン感受性形質導入株であります●●●株が得られています。この●●●株をバクテリオファージでありますPBS1感染溶液を用いて形質導入し、最終的にはRFESC02株生産菌が得られています。

こちら48ページの図10に、RFESC02株が得られる中間株からのプロセスが図としてまとめられています。

続きまして「7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」でございます。こちら本生産菌株構築過程では、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ネオマイシン、エリスロマイシン耐性遺伝子が使用されていますが、全て除去されており、最終の生産菌株には残存しないことが確認されています。

続きまして49ページ、第5「1 宿主との差異に関する事項」。こちらは先ほど説明させていただいた内容と一緒にですので、説明のほうは割愛させていただきます。

「2 遺伝子導入に関する事項」です。

(1) はこちらに記載のとおりです。

(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、発現の可能性に関する事項です。生産菌株でありますRFESC02株に導入されたDNA断片や、その近傍配列を含む領域について30アミノ酸以上の目的以外のタンパク質を発現する可能性のある新規のORFを検索しています。トランスケトラーゼ遺伝子、フラボキナーゼ遺伝子について、それぞれのアミノ酸変異部分にまたがって存在する新規のORFを検索した結果、まず*tkl*には4つ、*ribC*には3つのORFが認められました。これらのORFと既知のアレルゲンの同一性の有無を確認するため、データベースを使って同一性検索を行ったところ、既知のアレルゲンと80アミノ酸以上で、かつ35%以上の同一性を示すORF並びに連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致するORFは検出されませんでした。また、既知の毒素タンパク質との同一性の有無を確認したところ、こちらにも同一性を示す既知の毒性タンパク質は検出されませんでした。

次に*rib*オペロン上流配列についてORF検索を行ったところ、7つのORFが検出されました。この検出されたものと既知のアレルゲンとの同一性の有無を確認し、アレルゲンデータベースを使って同一検索を行ったところ、既知のアレルゲンと80アミノ酸以上で35%以上の同一性を示すORF及び連続する8アミノ酸配列の既知のアレルゲンと一致するORFは検出されませんでした。また、既知の毒素、タンパク質についてもデータベースで使ったところ、同一性を示すものは見つかりませんでした。

続きまして、50ページをお願いします。「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」でございます。こちら「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」ということで、こちら記載どおりでございます。

2についても添加物、製造原料、製造器材としての安全性について知見が得られることについてですが、こちらにも長期にわたって安全に使用された実績を有する旨が記載されて

います。

「第7 遺伝子組換え添加物に関する事項」「1 諸外国における認可、食用等に関する事項」ですが、他国においてはアメリカでは2010年12月にGRASとして自己認証が得られていること。また、EU、カナダ、オーストラリア、ニュージーランドでは、リボフラビンは既に食品への添加が認められていることが記載されています。また、本生産菌株が生産するリボフラビンは、既存のリボフラビンと同一であり、これらの国々での使用が可能である旨が記載されています。

「2 組換え体の残存に関する事項」ですが、こちらPCR法を用いて分析を行ったところ、混入は認められなかった旨が記載されています。

「3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」ですが、こちらは長年、安全に使用されている原料や製造方法を使用しているため、生産される非有効成分も有害ではないと考えられる旨が記載されています。

「4 精製方法及びその効果に関する事項」ですから、こちらは記載のとおりでございます。

「5 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項」ですが、こちら本製品の製造に用いられる原料、製造方法は、従来から食添の製造に使用されているものであることから、有害性はないと考えられる旨が記載されています。

申請書の説明は以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書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。かなりボリュームがありますけれども、まず第1、第2、第3でベクターに関する事項まで、申請書の1～11ページは「はじめに」ということで、実際に始まるのは12ページですので、12～17ページにわたりましてコメント、御意見があればお願いしたいと思います。

○児玉専門委員 これはフル評価の形で最後までいくのですよね。そこを前提、途中から高度精製に変わるのだったら別にコメントをしなくてもいいことがいっぱいあるのですけれども、13ページのところのまず宿主ですが、通常こういう場合、(1)の宿主の種名、由来ですが、BS5596株は既に1回認可された株ですので、こういうものはスタートの168株になるのではないかと思うのです。

○井上課長補佐 申請書の3ページをお願いします。こちらに野生型から今回の生産菌株の構築の概略図が示されています。今回、申請者からはHostと書かれておりまして、こちらBS5596株を申請書では宿主とされているのですが、その宿主の考えというか今回のリボフラビンについて、そのあたり御審議いただきたいと思います。

○澤田座長 この中間宿主みたいなBS5596株は明らかに組換え体ですので、通常は宿主には用いないというのが前例になっておりまして、今まで例外的に、セルフクロニングでありますとか、ナチュラルオカレンスに該当する場合は宿主にする場合があります。でも、このように明瞭に組換えが行われていて、組み換えの痕跡が残存しているものは一

応、宿主には採用しないというのがよろしいかと思えます。

どういう場合に宿主にしないかというのは、もう少し事務局で資料をまとめていただいて、もう少しきちんと説明できるようにしたいと思えますけれども、今回に限って言えば、これは明らかに宿主は168株にしたほうが良いと思えます。

問題は、宿主を168株にする場合に大分書きかえなければいけないところがありまして、あと、24ページを見ていただくと、168でもGP205株と1A382株というものがありまして、これは本来の宿主は親株がどちらかというといいいのかもしれませんが。そこら辺の情報がよくわかっていけませんので、というのは168のGP205株由来のDNAを親株の1A382株にかけてトランスフォーメーションしているのです、本来のゲノムのバックグラウンドは親株になるのかなどこの図からはとれる。そうしますと、168のGP205株から1A382株をつくった過程も含めて説明する必要が出てくるかもしれません。そこら辺は申請者に確認して、どちらを宿主にすべきかは検討していただいたほうが良いかと思えます。

宿主に採用する場合には、一般論としては情報が公知で、なおかつ誰でも手に入るような、いわゆるポピュラーな株をなるべく宿主にするのが本当はベターということになっています。

この点に関しまして何か追加で御意見、コメントございましたらお願いしたいと思えます。この点はよろしいでしょうか。

○井上課長補佐 では、今回の申請書は宿主が今の時点ではBS5596株になっていますので、全面的にそこは修正ということで、わかりました。

○澤田座長 ほかにございますか。

○児玉専門委員 同じページの13ページですけれども、最初にこれをざっと読んだときにごくわかりにくくて、四苦八苦した理由が、13ページの表4の下の行にある生産菌株構築には形質転換法とPBS1ファージによる形質導入法の2種類を用いてあるのですが、形質転換法というのは遺伝子を入れて形質が変われば形質転換法なので、特定の方法を普通は指さないのです。なので、多分ここはプロトプラスト法とかスフェロプラスト法ではないのかなと思っているのですけれども、それを形質転換法と言い、ファージの溶菌溶液を用いた遺伝子導入法を形質導入法というみたいな、言葉の定義とか説明をどこかにきちんと書いていただかないと、最初、形質転換法と書いてあったから形質転換法と読んでしまって、途中でこんがらがってしまって何が何だかさっぱりわからないという感じでえらく苦労したので、まずそこをきちんと書いていただいて、この申請書ではこのワードはこういう言葉で使いますというか、その定義をきちんと書いていただきたいと思えます。

○澤田座長 今、17ページまで、追加よろしいでしょうか。製造法のところでベルトろ過濃縮というものがありまして、これが何かよくわからないということで、一応、資料を出してくれるように言ってあったのですが。

○井上課長補佐 机上配布資料に③のベルトろ過についてということで、準備のほうはさせていただきました。

○澤田座長 これを読むと、要は詰まりやすいものを詰まりにくいように動かしているだけなのかなと思われまますが、それでこれだけでかなりきれいになるとは思えないので、もう一回読み直してみますと、14ページの製造方法の真ん中あたりに粗結晶画分と書いてありますね。だから結晶化のようなことを1回やっているのではないか。もし結晶化をやっているのだったら、それは重要なステップですので、ちゃんと明記していただいたほうがよろしいかなと思います。

○井上課長補佐 そこは申請者に製造工程を確認しまして、必要に応じて追記を依頼したいと思います。

○澤田座長 補足で言いますと、純度が非常によい割には精製法が余り書いていないので、もしほかにやっているステップがあるのだったら、もう少し詳しく書いていただいたほうが良いと思います。

○井上課長補佐 わかりました。

○澤田座長 あとほかにありませんでしょうか。

第3のベクターに関する事項で、これは遺伝子を導入するときにプラスミドを使っていない場合には、これでいいのですけれども、もしプラスミドを使っている場合には一応、情報として通常は書いていただいていますので、もしあれば書いていただいたほうが良いのですが、宿主を前にさかのぼった場合は明瞭に使っていますので、それは情報を書いていただかないといけないことになるかと思えます。

それから、16ページの納豆菌の名前は、前にこれは使われなくなったとおっしゃっていたような。納豆はバリエーションみたいなものですね。だから*B. natto*は削除していただいて構わない。

○井上課長補佐 わかりました。

○澤田座長 ほかよろしいでしょうか。

○児玉専門委員 1ついいですか。15ページの6(1)の遺伝子組換え添加物と従来の添加物のところなのですけれども、素朴な疑問として、生産菌株5596は認可されている株ですよ。

○井上課長補佐 はい。

○児玉専門委員 それでつくったリボフラビンのデータというのは出てこないのですか。

○井上課長補佐 机上配布資料に厚労で安全性審査を行った際の資料を準備させていただきました。それが机上配布資料④の「リボフラビン製造過程に関する安全性評価資料について」でございます。

○澤田座長 これを読むと理解しやすく、その途中経過が非常によくわかります。

問題は、食品安全委員会ができる前の厚労省時代に承認されたもので、それは法的義務化が行われる前ということで。義務化されたときに一応、簡略でオーケーを出したはずでありまして、この品目に関してはまだ生きているということですのでよろしいですね。

○井上課長補佐 はい、そのように聞いています。

○澤田座長 それと今回の品目は大分いじっていますので、一応、別の品目という取り扱いになります。

あと、製法が大分違うみたいで、後で不純物の問題とか多分出てくると思いますけれども、そこら辺に影響する可能性があります。

それで、このロシユの製品なのですが、それは今、売っているかどうかというのは情報がわからないとお聞きしたのですが。

○井上課長補佐 済みません、そこは今、確認中です。

○澤田座長 ついでに、旧リボフラビンの菌に関して何か追加で疑問がありましたらどうぞ。

○松井技術参与 厚労省で認可されましてリボフラビンは、宿主がRB50株になっているのですが、今回は*B. subtilis* 168株を。

○澤田座長 それはかつてそうしたのですけれども、RB50株まではたしか自然の変異なので、そこは許された可能性がある。ただ、今回情報が大分ふえまして。

○松井技術参与 情報がふえたということで、先ほどおっしゃっていましたがGP205株とか。

○澤田座長 何を宿主にすればいいかというのは考え直したほうがいいかもしれません。

○松井技術参与 わかりました。

○池田評価情報分析官 1つ今の関係で、RB50株まではspontaneous mutationでできているので、こちらが宿主だと言ってきた場合に、それもあり得るということですか。

○澤田座長 要は組換えでない、普通の伝統的な技術で作製された株は一応宿主にしてもよろしいということになっています。ただ、どちらかというよりポピュラーな菌から始めていただいたほうがベターということですよ。

○池田評価情報分析官 そうしますと、ベターなのはどちらかというのと168株なのだけでも、RB50株だと主張してきた場合に、それもあり得なくもないということでしょうか。そこだけちょっと。

○澤田座長 RB50株にしてはいけないということではないです。

○池田評価情報分析官 そうすると、できるだけ汎用で入手しやすいもので組換え等が含まれないものを宿主とすべきであるため、そういう観点で宿主について考え直してくださいということよろしいですか。

○澤田座長 はい。

追加よろしいでしょうか。そうしましたら、今度は第4で17ページから48ページにかけてまして御意見、コメントをいただきたいと思えます。

○児玉専門委員 1つよろしいですか。細かいところですけども、31ページの上から2つ目のステップ2・(2)の3行目に、マーカーフリー遺伝子導入法という新しい導入法の名前が出てくるので、これも定義してほしいということをお願いいたします。

○井上課長補佐 では、そこは追記するようにいたします。

○澤田座長 申請書を読んでいまして非常にわかりにくいのは、ロシユでゲノムの2カ所

ぐらいに入っている図みたいなものがあるのですけれども、そういう概略的な図はどこかにありましたか。枯草菌のゲノムの中でどこどこが変わっているのか直感的にわかるような図があると、さらに理解が進むのではないかと思いました。というのは、特に途中過程でリボフラビンのオペロンを入れているのです。そのときに抗生物質耐性マーカーも同時に入れていて、それで遺伝子を増やしているということを確認やっていたわけで。それにプラスアルファでいろいろなことをやっているわけなのですけれども、一体どこら辺がいじられているのかというのが非常に理解しにくい書きぶりになっています。

○井上課長補佐 ロシユの申請資料、机上配布資料の例えば何か参考になるものがあれば教えていただきたいのですけれども。

○澤田座長 今回、宿主がさかのぼりますので、ここに書いてあるようなことを多分書かないといけなくなる可能性が高いのです。ロシユの情報を今の申請者がもらっているかどうか気になりますので、それを確認していただいたらいいかと思います。

○山口係長 ロシユと今回のDSM社の関係性について厚労省に確認したのですけれども、ロシユのビタミン事業部をDSM社が買収したということなので、全てのこういう製造に関する情報はお持ちだと聞いております。

○澤田座長 そうしますと、旧厚労省時代の内容を申請に使うてよろしいということになりますね。だからそれを追加して全編がよりわかりやすくなるように書いていただければと思います。

○井上課長補佐 では可能な範囲でロシユでの申請を行った際の情報を追記するという理解でよろしいでしょうか。

○澤田座長 全部丸ごとではなくてもいいのですけれども、一部採用していただいたほうが多分わかりやすいと思います。

○小関専門委員 余りに昔のことだったので、今、話をお聞きしているうちにだんだん思い出してきたのですけれども、PB50株というのは、いわゆる組換えDNA技術を用いて得られた生物とは判定しないでスタートしたような気がするのです。それは何かというと、定義をもう一度読み直してみてもう良かった、良かった、あのときたしかこういう話をしたんだというのを思い出してきたのですけれども、酵素等を用いた切断及び再結合の操作によってできたDNAを導入するというのが技術という定義であって、24ページのフローを見るとわかるのですが、いわゆる切った貼ったをやっていないのです。だからここにいるRB50株は、組換えDNA技術を用いて得られた菌ではないよねというような議論がたしかあったような気が今になってしてきました。

以上です。

○澤田座長 だからRB50株を採用することも可能だということですね。

○小関専門委員 そうです。これを組換え体というカテゴリの中に入れるのは、入れなかったはずだった。

○澤田座長 DNAで形質転換した場合は通常入れていない。

○小関専門委員　ですから定義が組換えDNA技術を応用してという表題になっているのではないですか。この組換えDNA技術というものの定義というのは、切った貼ったということ。

○児玉専門委員　*vitro*で操作したものをもととした場合が組換えDNA実験。

○小関専門委員　そう。それで切った貼ったしないで入れたものではないよねということをお話した記憶を思い出しました。

○澤田座長　逆に言うと、今だとだめだということですか。そうではないですか。

○小関専門委員　今でも、だからそれでやった場合は組換えDNA技術は使っていないということになるはずですので、単にDNAをかけた、要するにこれというのはわかりません。例えばここでは*B. subtilis*から取ったDNAだけれども、場合によってはほかのものから取った薬品として売られているDNAを*B. subtilis*に振りかけましたと言ったのが組換えDNA実験ですと言えるかどうかということにまでたしかさかのぼるというか、議論したように思うのです。単にそれというのは薬品をかけただけではないかという議論があったような覚えが今になって、古いですけども、思い出されてきました。

○澤田座長　そこは申請者に任せるところでも。

○小関専門委員　いや、申請者に任せるといっても、こちらのスタンスとしてはっきりしておかないと、今後いろいろな新技術のことを考える上においても、組換えDNA技術とはというところに抵触してくる話なので。

○澤田座長　これは組換えではないと。

○小関専門委員　そうです。これはですから組換えDNA技術を用いてつくられた生き物ではないという定義できちんと押さえておいたほうが、今後のためにもなると思います。

○澤田座長　先ほどの、どの宿主がベクターかという話は、それとは別で、宿主はどこまでもさかのぼれるのですけれども、一番手に入りやすいものを宿主にしたほうがいい。

○小関専門委員　それは先生のおっしゃるとおりであって、いわゆる寄託されているような菌から考えてくださいね、やってくださいね、誰でも手に入るという議論というのは先生のおっしゃるとおりで、それと組換えDNA技術とはという議論とは切り分けたほうがいいのではないかと思ったのです。

○澤田座長　わかりました。ありがとうございます。

　ほかはいかがですか。48ページまでで追加で何かありますでしょうか。

○児玉専門委員　1つよろしいですか。35ページの6～7行目のところに2種類のプラスミド、pRF69とpRF96を削除しとあるのですけれども、これはゲノムに入った断片をプラスミドと呼んでいるのです。それが最初非常に私は苦勞しまして、通常はそうってしまったものはプラスミドと言わないのではないかと思うのですが、もとはプラスミドだったと思うのですが。

○澤田座長　これはpUCの断片がそのまま入っているのです。

○児玉専門委員　これがついていれば非常にわかりやすかったのですけれども、これがな

かったものですから、最初ゲノムの外にある環状のプラスミドとして入っていて、それを削除するという意味なのかか思いながらも、途中から気がついたのです。そうではないと。

○澤田座長 私もおかしいなと思うのは、オペロンそのものは残っているはずで、要はプラスミド由来の部分だけ、抗生物質耐性マーカーの領域だけ除いたという意味で。pRF93とかpRF69はもっと広いプラスミド全体の名前なのです。だからこの表現はおかしいのかなと思います。

○松井技術参与 pRF93と69は、パックの外骨格を持つオペロンと抗生物質耐性遺伝子からなるプラスミドなのですが、それがゲノム上に何コピーも入っていて、削除されているときはそれが全部削除されて、もとに戻る。

○澤田座長 最初私もそう思ったのですが、そうすると産生性がなくなってしまう。

○松井技術参与 そのかわりに改変型オペロンが入っているのではないですか。

○澤田座長 それは1個だけにしてしまったわけですか。むしろ減らしてしまった。

○松井技術参与 はい、そのように理解しました。

○澤田座長 私も最初そう思ったのですが、何かおかしいなと思って。オペロン自身はもとに戻っていることを確認したという文章がどこにあるのですか。だからそれを読んでおかしいなと思ったのです。そこはもう一回確認していただけますか。

○松井技術参与 わかりました。

○澤田座長 私の理解では、抗生物質のマーカーの部分をとったのかなと。

○児玉専門委員 そんな感じには読めるのですが、外骨格が残っているかどうかというのははっきりさせないといけないような気はしなくもない。

○澤田座長 そこは後のほうの資料で、残っていないことは確認しているみたいです。

○小関専門委員 その辺の話というのは、要は書きぶりがすごく悪いのです。後でお話しましょう。データはあるのですが、組換え体についてというところが全くぼろぼろだということなのです。

○澤田座長 48ページまで追加でありますか。

○飯専門委員 新たにトランスケトラゼですか、1アミノ酸の変異を導入しているかと思うのですが、読んでいてなぜこのアミノ酸変異が導入されたかというリファレンスに当たる情報が見つけられなかったのですが、どこにあるのですか。この変異自体が自然に見出されている変異なのか、彼らが何らかの根拠を持って自分たちの知見に基づいて導入したのかというあたりをできたら知りたいというところです。

○井上課長補佐 そこは申請者に一度確認をとってみます。

○澤田座長 21ページの説明だと、トランスケトラゼが活性がわざと低いものに人工的に直しているというニュアンスなのです。それで代謝系の流れを変える機能的な意味があるみたいで、それがポイントかなと。

○飯専門委員 なぜ変えているかという意味は、そこで理解できたのですが。

○澤田座長 その文献とか説明が足りないということですね。

○飯専門委員 もしあればと思ったのですが、これは実際にフル審査なのですけれども、ナチュラルオカレンスの変異が導入されたのかどうか疑問に思ったものですから。

○澤田座長 それでアミノ酸の変異は人工的に変えたわけですが、それが復帰する場合があった。ただ、その逆はないみたいなので、ナチュラルオカレンスには進行しないだろうという理解でいるのです。それで *ribC* ●●● は天然にある可能性はあるのですね。ナチュラルに該当する可能性があるかもしれない。

ほかよろしいでしょうか。

○井上課長補佐 事務局からなのですけれども、先ほど澤田座長がおっしゃっていましたがロシュの前の資料を参考に追記するということなのですが、例えば机上配布資料のロシュの申請資料なのですけれども、37ページ、イメージとしてはこういったものなのでしょうか。そこを確認させていただければと思います。

○澤田座長 このように書いてあると非常にわかりやすいですけれども、これがさらにどのように変えられたかとか、そこら辺の情報があるといいかなと思います。

○井上課長補佐 わかりました。申請者にはその旨を伝えます。

○小関専門委員 このときはロシュさんの昔のものは厚生省時代で議事録は残っていないのですけれども、私の頭の中に残っている議事録を、大分思い出しまして、もう17年前なのですが、このとき出てきた議論は、グリフィスの実験がありますね。あれは遺伝子組換えではなくて形質転換の一番最初です。あれというのはDNAは切った貼ったしていない状態。だからグリフィスの実験をどう考えるかという議論をした覚えがあるのです。

そうすると、これというのは全DNAをとってきて入れたというのは、R菌、S菌で菌を煮たものを炊いたものの煮汁をまぜてやった実験は、形質転換という言葉で確かに正しい。だからある意味、ここのロシュさんはそういう意味では正しい書き方を当時からしていた部分と、その後、ですから24ページのところの形質転換というのは古い狭義の定義に対して、26ページのところの、いわゆるこれも正しいのですけれども、組換えDNAを形質転換しているという、いわゆる遺伝子組換えという部分です。これも正しい学術用語は使っていられるのですけれども、そこがすごくわかりにくいというか、分けて、意識して読んでいかないとこれというのは混乱するということ。そうです。当時もそういう話をした私の中の記憶の中には思い出してきました。

ということなので、ただ単にDNAをまぜた実験というのはグリフィスの実験と等価であるという考え方で、組換えDNA技術ではないとはっきりさせたほうが良いと思います。

○澤田座長 後のほうでも、単にDNAを放り込んでいる場合がありますね。それは組換えに当たらなくなります。どれが組換えで、どれが組換えでないかというのもチェックしていく必要がありますね。

○小関専門委員 ですから言葉の定義ということで、変な言い方をすれば言葉遊びの話であって、そういう部分でごちゃごちゃ言うよりも、基本に戻って、食品安全委員会からいったときにどうなのでしょうと立ち返っていきませんか。そういうふうに行くと、今後で

は試験管の中で切った貼ったしないDNAの話って何だろうというところも整理整頓しやすいとか、見やすいように思います。

○澤田座長 後のほうで、DNAを切り貼りしたりしている場合、それは昔の定義だと組換えになります。

それでは、48ページまででよろしいでしょうか。

そうしましたら49ページから最後まで、51ページまででコメント、御意見をいただきたいと思います。

○小関専門委員 よろしいでしょうか。先ほどそこで発言をある意味、とめたというところがあるのですが、これは兎玉先生がおっしゃったのと全く同じことを聞いてから言いたいのですが、これは高度精製にしないでフルスペックですよねと。いいんですねというところを確認して次に行きますと、第5というのは組換え体に関する事項です。申請される方はそこを理解されていらっしゃらなくて、遺伝子導入に関する事項で(1)の切断地図に関する事項というのは、これは設計図の上で切断地図がこうなっていますという話ではなくて、これまでもほかの植物や種子植物も含めて、ここではできた遺伝子組換え体の遺伝子構造がどうなっているかということを示してくださいね。それが制限酵素でありますし、次の(2)オープンリーディングフレームも後ろにデータは出ているのですが、これというのははっきり書いていないのです。遺伝子導入した組換え体の塩基配列なのかどうかははっきりしない。

それと遺伝子が入っている入っていないという話をするにしても、PCRを後ろのほうでもやっているのですが、それというもどの領域に入っているかという話も絶対にしていないですね。要するに設計図どおりにちゃんと入って、あくまで第4までのところは設計図の話をしているのであって、第5ではできた微生物のことをきちんと言っていたかないと、全面的に書き直してもらう、もしくはそのデータがなければ、それは組換え体に対する情報がないのではないか。したがってフルスペックの評価はできないということになってしまう。第6まで踏み込んでしまいますけれども、結局そこでいったときに、先ほどのこの前にやったものも同じなのですが、いわゆるコンパレーターとの比較を必ずしているわけです。既存のものとの。それは種子植物も全く同じで成分分析を必ずしているわけで、添加物の場合には成分分析を必ずコンパレーターと組換え体との間でして、要するに比較対象との上でやるというスタンスに立っているのですが、その情報が全くないのでフルスペック評価はできないと私は、要するに申請書としてはデータが完全に欠失していると思えてしまいますので、一度そのところを申請者の方によくもう一度理解して考えていただいて、第5以降を全面的にあるデータとないデータで書き直してもらわない限りは、フルスペック評価はできませんというふうに私は思います。

○池田評価情報分析官 今、先生がおっしゃった成分比較の話は、植物で検討している主要構成成分などの比較のことを想定されておっしゃっていますか。

○小関専門委員 いえ、ですから植物にしても添加物にしても、基本の考え方は何でしょ

うかと考えたら。

○池田評価情報分析官 それで確認をしたかったのは、種子植物の安全性評価基準と添加物の安全性基準は別々になっていますので、今、先生がおっしゃった種子植物のところの成分分析は、添加物の場合、宿主との差異に関して検討される事項に含まれるのかということなのですが。

○小関専門委員 ちょっとよろしいですか。今、私が申し上げたことは何かというと、種子植物であろうが、微生物であろうが、微生物の添加物であろうが、基本的な考え方というのは何でしょうと考え立つと、それというのは比較対象にするものは必ずいて、それに対して組換え体ではこうですねというところでやっていくのが安全性評価というものの基本姿勢ではないですか。組換え生物に対して。それが重要な基本であって、これは国際的なコンセンサスがそのように得られているはずなのです。そういう見地から立つと、そういうところは全く考えられずに、この申請書は第5、第6のところが記載されているので、評価のしようがないではないですかという、基本がずれているというか、抜けているという意味でお話をしたわけです。

○澤田座長 これは例えばサザンとかそういうデータがあればまだいいのですね。組換え体のDNAを使って。

○小関専門委員 ですからそれが第5のところの要するに組み換えた生き物と非組換えの生き物で、遺伝子がこうなっているのでしょうかというのを明らかにするところ。その方法の1つがサザンですよ。あるいは場合によっては*B. subtilis*で全ゲノムを決めたほうが早いような気がするのです。シーケンスを決めてしまったほうが楽ではないかと思うのです。

○児玉専門委員 でも繰り返しフェージでやっているのです、ゲノムは結構ずたぼろになっているかと思います。

○小関専門委員 わかっています。おっしゃるとおり。いかもこういう形質転換をやっているのです、全部を1回どしゃっと入れている。

○児玉専門委員 要するにフェージ系というのは全部どしゃっと入れるタイプなので、それをこれだけの回数やっているのです、多分全ゲノムシーケンスすると何が何だかよくわからないという感じになるのではないかと私は思っています。

○小関専門委員 私もそう思いますけれども、まだそのほうがやれるのではないかと、今だったらお値段も安くなりましたし、冗長度でばさっとやれば。

○澤田座長 このロシュの時代のもので何か所入ったかというデータがあるのです。それプラスアルファでどこが変わっているかということをおある程度言っていただければ、それでいいのではないかという気がしないではない。それとサザンです。

○小関専門委員 先生のおっしゃるとおりで、要は何かというと申請者側が全くそこがわかっていないで第5を書いているというところなのです。詳しいやり方は、まさしく座長のおっしゃるとおりで、要するに前のときにはこのように遺伝子がなっていました、今回

のものはこうでしたと組換え体という生き物のDNAについての構造はこうですというふうに出すのが第5なのですという、まずそこから理解してもらわないと多分これは話が全然伝わらないのだと思います。

○手島専門委員 それから、もし高度精製するにしてもコンパレーターとの比較というのは必要になってくるので、例えば51ページとかでは3とか5とか、非有効成分であるとか、あるいは有効成分などコンパレーターとの比較というものが必要になってくるのではないかと思うのですけれども、例えば添付資料の24には今回の分に関しての成分分析をした結果が出てるのですが、その中には4つほどのImpurityというものがA、B、C、Dで4つ出てきているのですが、その部分に関してはなかなか同定していないという話ではあったかと思うのです。ただ、ロシュのデータを今日見させていただいて、162ページですか。中に幾つか不純物が量的に合計1%と定量されているということが入っていて、こういったものがどれに相当するのかが出てくれば、比較というデータができるのではないかと思うのですけれども、このあたりは難しいですか。

○井上課長補佐 でも調査会の見解として不純物のデータが必要であるということであれば、こちらからは指摘事項という形で出すことは可能だと考えております。

○手島専門委員 コンパレーターというか、やはり比較するものがあって、それとの比較でまず純度がどれくらいで、あとはできれば未知のものにない不純物がないということが示されて、それで同定もできていけばそのほうがいいのかなと思うのですけれども。

○澤田座長 非有効成分は、その前にもう少し片づけないといけないことがありますので、その後でやりましょう。

先ほどのゲノムですね。組換え体のゲノム上の変化というのは、一応どのように変わっているかという情報は書いていただかないといけないということですね。それから、ORFは組換えがきちんと予想どおりにいってれば、それほど変わらないから、ある程度のデータとしてこれは受け付けることは可能かなと。境界領域みたいなものが植物とかの場合は随分切り貼りがあることはありますけれども、この枯草菌の場合にそれがめちゃくちゃ起きていないのであれば、ORFの検索はこれでもいいのかなと思いますが、これはいかがでしょうか。

○小関専門委員 要は何かというと、先生のおっしゃるとおりなのですが、49ページの2(2) オープンリーディングフレームのところというのが、これがだから申請者側に確認してほしいのですけれども、設計図上こうでしたという話をここに書いてもらっても困るのですよと。要するに組換え体という生き物の中の話でこうですよと。恐らくだから澤田座長のおっしゃるとおりで、ほぼ変わっていないはず。場合によってはポイントで少し変わっているかもしれませんが、だからそういうことも含めてひょっとしたら変わっているかもしれないけれどもと言われたときに、絶対に変わっていないんですね、押さえましたかと聞いていただいて、そこは組換え体からきちんと要するに塩基配列が決まったので変わっていませんというお答えが得られれば、結局それでいいわけですね。要するに、

その部分が見えない書き方になっているので、判断を保留せざるを得ないというところだと思います。

○澤田座長 49ページはそれでよろしいでしょうか。

それでは、非有効成分の議論に移ります。手島先生がおっしゃったように、ロシユのほうはかなりデータを出しています。HPLCもやっていますし、一応、出てくる可能性のある不純物も例示しておりまして、そこら辺の含量的なデータがあるのです。だからこのくらいのことは一応、もしできたらやっていただいたほうがいいのかと思います。

問題は、含量だけで許せるか、それともHPLC的なものでどういう分布が違うか。そこまでやって頂きたいと言うかだと思いますけれども、まず、含量で99%でいいかと言われると、それでいいかどうかはわからないのですが、御意見いかがでしょうか。

○手島専門委員 含量が高いので、不純物に関しても液クロのパターンのなところまで出してもらえば、もし不純物の中で少し含量が高いものがあれば、こういうものだろうという予測がつくのであれば、それでいいのではないかと思うのです。新しいピークが出ていなければ。

○澤田座長 組換え体、一応、中間の宿主みたいなもののデータはあるのですけれども、それ以降、代謝を抑えてリボフラビンの合成系に振り向けたりとか、大分いじっていますので、もう少し成分的なところも押さえていただいたほうがいいのかという気がします。

○井上課長補佐 ではこの不純物、非有効成分については、理解としては液クロのいわゆる定性と定量を求めるということでしょうか。それとも定性のみでいいのか、そこを具体的にいただければと思います。

○澤田座長 多分、液クロをやると定量になってしまいますね。実質的に。

○手島専門委員 定量して、検出限界以下の場合は検出限界以下でいいと思うのです。

○井上課長補佐 例えば万が一、未知物質が出てきた場合、そうなりますと定性が増すのかなと。そこが分析する際に、一度でできるだけ分析が終わるほうが申請者にとっては負担が少ないかなと考えておりますが、どうでしょうか。一度に定性、定量を求めるとか、定性の分析結果次第で定量を求めるとか、そこなのですけれども、済みません、よろしくをお願いします。

○手島専門委員 まずLC-MSまででなくても、まずLCとかでパターンを見て、同定までできるような量があればLC-MSしてもらったほうがいいのでしょうか。

○澤田座長 ロシユでHPLCのメソッド1とメソッド2をやっていますね。ロシユの方法の添加物があれば、それと同時に比較するのが本当は一番いいですね。さもなければ、手に入る現行品でしょうか。単品で不純物がありませんという場合もあるかと思いますが。

○児玉専門委員 ただ、そこまでやってしまうと結局、高度精製とほとんど変わらないことになってしまうので、高度精製にしてしまったほうがサザンもやらなくて済むし。

○小関専門委員 まず第1点、リボフラビンは公定書の中に規格基準として純度はないは

ずです。あれはアミノ酸等とは違って。高度精製という定義は、ここの委員会で定義しているものだというのが1つのポイントかと思います。

もう一つは、親委員会にお伺いしなければいけないのですけれども、これというのは高度精製で安全ですかというふうに厚生労働省さんから聞かれたのか、それともこれは食品として安全でしょうかと聞かれたのであるか。これは暴論だといってすごい怒られるかもしれないのですけれども、もしも安全ですかと聞かれたときに、専門調査会においてきたときに、専門調査会としてこれは評価基準を見つつ、この申請書をつらつら見るに、これは私たちの専門委員会の考え方としては、この考え方で高度精製で見えていくべきものではないですかというふうに、親委員会に逆にこちらから出してしまったら怒られますでしょうかということなのですから。

○池田評価情報分析官 指定されてきているわけではないです。ただ、申請書をつくるときに高度精製で見てほしいというふうに、その形でつくってくるというのがいつものパターンだと思います。

○小関専門委員 いつものパターンならそうですね。別にそういうパターンではないから、高度精製の考え方ペーパーで当専門調査会でやってはいけないというものではないのか。

○鋤柄評価第二課長 いずれにしても現時点ではデータがないので、高度精製でやると言われてもできないということなのです。ですからデータセットをきちんと申請者のほうでそれなりに集めていただければ、高度精製でも評価できますし、フルでも評価できますし、そういうことなのかなと思っております。

○小関専門委員 そういう整理でよろしいですか。そのところがちょっと何か高度精製という先ほどの児玉先生と私とで思わず言ってしまったのですけれども、高度精製ではないですよというところで、ここの専門調査会の中で私自身も非常にどうしたものかなと整理がはっきりつかなかったので、それでお伺いした。暴論だと言われるかもしれないというのはそういうところなのです。すみません。

○山添委員 基本的には、高度精製にすれば既存のものとの対比において新規の不純物がないとか、そういうことで結局、安全性の試験にとってかわれるわけです。フルで今回、今の状態であれば、プロダクトの安全性を評価するのに評価ができるかどうかということになってきてしまうと思うのです。動物実験をするか、あるいは先ほど純度のお話がありましたけれども、非常に純度の高いものであって、ではアンノーンの不純物が極性なりから考えると、持っている特性が1つと、もう一つは量、個々の量というものがいわゆる毒性の例えば極端な言い方をすると、例えばCramerの分類にはめる香料なんかの分類と同じようにして1.5 $\mu$ g以下だと少量とか、そのような分類になっていて、要はその含量から毒性を起こすとは考えられないとか、何らかの結論がつけられる。つまり何らかの方法で安全性について判断ができるのであれば、評価できるという方向で進めることになるのではないかと思います。

○澤田座長 たしか、リボフラビンの使用量は極端に少ないです。摂取量と言うのですか。

○山添委員 基本的に動態から言いますと、飽和をしてしまいますので、実際に大量投与をしても生体の中に入る量はリミットがあると思います。ある程度実際のところは。だから量をたくさん入れたからといって、たくさん入るといった性質のものではないことも事実ではありますけれども、ただ、もう一つは例えばリボフラビンは若干不安定で、光に感受性があるので、ここには出ていませんが、胃まではかるとパーオキシドの形が付加したOHになったようなものも、製品の中にはかってみると今の技術でははかれてしまうと思うのです。それは当然既存の今、使っているものにも多分あるのだと思っています。ですけども、それが生体に影響を及ぼすということは今のB2の製剤でも出てきませんので、それは含量がふえていなければ問題にならないので、その辺のところの含量というのは1つの大きな尺度になるのだらうと思います。

○児玉専門委員 添付資料4、2007年で古いような気もしなくもないですけども、ここに一応リボフラビンの公定書みたいなものがあるので、私はこの公定書を見て高度精製に持っていけるはずだよなと思ったので、事務局にあらかじめ公定書に沿ったデータはないのですかとお伺いしたところ、それはここの認可がおりてからとる予定だという返事だったようで、今はないということなので、それはちょっと残念ですねというお答えだったのです。

以上です。

○手島専門委員 私も今そこを見ていて、含量が大体公定書だと98~102%ということで、添付資料24のデータの中では純度が99という形が出てきています。なので純度としてはそこに合致したものがつくられているというふうに思っていたのですが。

○小関専門委員 もう一つ暴論よろしいですか。今の児玉先生のお話のとおりで、いわゆる公定書を満たしているかどうかわからないものという形で受け付けられた場合には、これは添加物で考えるのではなくて、微生物食品で見なければいけないねという議論も出てきてもおかしくなくなってしまうのです。ですからここはかなり慎重に出す側にしてもしていただかないと、この形で公定書を満たしていることがわかりませんと言われたら、では微生物の食品でやるしかないですねというのが、はっきり言うと専門調査会としてはどの評価基準を使いましょうかと言ったら、そこに行きついてしまうことにもなりかねないかなと思います。

○澤田座長 菌体が入っていない場合は添加物。

○小関専門委員 いや、違います。菌体が入っていないもので微生物の評価基準は、入っている入っていない、要するに生きています生きていない、そして死んだときに入っている入っていないという場合分けになっているので、入っていないの場合分けのところでの評価の仕方になってしまいますね。

○澤田座長 今の場合は、食品ではなくて添加物の基準を使わなければいけないのですね。

○手島専門委員 添付資料4のようにリボフラビンの場合は、添加物公定書での評価基準

が決められていますので、状況が整えば、この基準を使って添加物としての高度精製の評価も可能な状態にあるということだと思います。

○飯専門委員 整理してほしいのですが、一番最初に井上さんから紹介されたときに、たしか厚労か何かは高度精製か何かでどうですかと問いかけて、申請者側がフルスペックでお願いしますというような説明だったような気がするのですが。

○井上課長補佐 はい、そうです。

○飯専門委員 なぜフルスペックを申請者がお願いしたのかということがわかれば、今の議論は整理しやすくなるのかなと思ったのです。

○池田評価情報分析官 これははっきり確認したわけではなく、多分なので、今回の申請者はそういう高度精製というスペックで申請したことがないので、その方法になれていなくて従来法というか、自分たちがなれている方法でやるのがやりやすいというようなことだったようです。

もう一つ、添加物の話に関してなのですが、結局、今回のものについてつくるものが公定書に合致するかどうか、確かに今わからない状態なのですが、売るときには合致しているものしか売れないことは確かなのです。ただ、その場合であっても恐らくいつも添加物として遺伝子組換えで安全性を評価していただいているときは、遺伝子組換えの方法に由来して何か問題になるものができていないかという観点で見ているのだと思っているので、今回もそれを評価するのに純度が高いとか、不純物が安全上問題にならない量かといったいわゆる高度精製的な観点で見るとか、製造方法を中心にいただくのかということによって、評価すべきデータにある程度違いが出てくるのかなという気がしています。今回のようにフルで見ると、遺伝子組換えの製法の観点からみて問題のあるものができないかということに加えて、今おっしゃっていただいたように、ある程度最終産物の不純物のところで問題になるものがないかもあわせて見ていただく必要があるのかもしれないと思って、どの程度見ておく必要があるのか、それを今、お聞きしているという感じなのです。

○澤田座長 1つの考え方として、先ほどの1.5 $\mu$ gの話がありましたけれども、その議論で摂取量を考えて、それに到底及ばないような議論ができれば、それで済む場合もあります。それができないのであればどういう不純物があって、それぞれの量が非常に少ないとか、そういう議論を次にすることになるのでしょうか。その場合、物が同定されているのであれば、その毒性情報を使えば安全性は担保される。そのような評価が可能になるかと思えます。

参考になるのはロシュのHPLCのパターンで、これと全く同じようなピークしか出ないのであれば、議論は非常にしやすいのかなと。多分ロシュのものよりも理論的には夾雑物は減っている可能性はあるのですが、新しいピークが別にふえている可能性はあります。ですからそこはデータを1回とってもらわないといけないのかなと。

あと、いろいろ申請者のほうで考えて高度精製に乗ってもあるねということも理解して、

そちらでもう一回出し直したいというのであれば、それはそれで結構ですよという話になるかと思うのですけれども、いかがでしょうか。

○井上課長補佐 では、申請者のほうにはその旨を伝えます。

○澤田座長 それでは、最後まで追加でありましたらお願いしたいと思います。

これは多分、もう一回出し直しということになると思いますので。

○飯専門委員 よろしいですか。次にどういう申請になるかわからないのですけれども、高度精製でなかった場合にはゲノムの中にどういう、本当にきれいに抜きたいところだけがきっちり抜けているのかというのが、どうも読んでいても把握し切れなかったところがあって、質問としては先ほども議論にあったのですけれども、全ゲノムの解析はしていないのでしょうかということを知りたいというのを聞いてもらえたらなど。寄託したりすることを考えれば、今の時代、していてもおかしくないなという気もしますし、そうすればベクター由来の小さな断片がどこかに飛び込んでいるというような可能性も配慮できるかなど。

今、もともと入れていたプラスミドのタンデムだったりするところが抜けているというような形としての解析はされているかなと思うのですが、本当にサザンで全ての領域をカバーしたプローブになっているのか、読んでいてわからなかったところがあります。特定の抗生物質のマーカー遺伝子の範囲だけしかプローブにしていない可能性もあって、その辺、高度精製でないようにした形で次出てくるのであれば、その辺もわかりやすくデータとして出してくださいということをつけ加えたい。

○鋤柄評価第二課長 御指摘については申請者に伝えて、どのような資料があるのかというのを確認してみたいと思います。

ちなみに22番にORFの検索をすることに関する資料があるのですけれども、1枚めくった3ページ目のMethodsのところ「ORFs were searched using the whole-genome DNA sequence of RFE.SC02 (Illumina Hi-Seq)」と書いてあるので、もしかしたらやっているかもしれませんので、そこは確認してみたいと思います。

○飯専門委員 やっているのであれば、多分明確に意図した変異というものがきっちり入っているかどうかわかるので、その説明をしっかりとしてくれたら、それである意味、十分になってしまうという部分があるかと思いますが。

○澤田座長 ホールゲノムをやった余計なことがわかる可能性がありますけれども、添加物の場合は少し残っていても産生されなければいいのですね。

○飯専門委員 私もそう思います。基本的にはin silicoの解析で解決できるのではないかという気がするのです。

○井上課長補佐 申請者には全ゲノムの解析データを求めるようにしますか。もし出てきた場合も、先ほどいただいた御指摘をあわせてと考えてよろしいでしょうか。

○鋤柄評価第二課長 まずは高度精製でやるのかどうかということをきちんと判断させていただいて、それに合ったデータセットをくださいというような頼み方になるかと思いますが、そういうことでよろしいでしょうか。

○澤田座長 それでは、ほかはよろしいでしょうか。

大分意見等をいただいておりますので、一度先生方に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御指摘を出したいと思います。

議題1についてはこれで終わりということで、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。

○井上課長補佐 特にございません。

○澤田座長 ありがとうございました。

それでは、本日の議題はこれで終了ということで、第160回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会させていただきます。きょうもどうもありがとうございました。