

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第176回) 議事録

1. 日時 平成30年6月22日(金) 14:00～16:55

2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)

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

- ・JPTR001株を利用して生産されたヘミセルラーゼ
- ・JPTR002株を利用して生産されたキシラナーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、小関専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、鈴木専門委員、
柘植専門委員、手島専門委員、山川専門委員、吉川専門委員

(食品安全委員会)

佐藤委員長、山添委員

(事務局)

小平事務局次長、吉岡評価第二課長、池田評価情報分析官、内海課長補佐、
森山評価専門官、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

- ①JPTR001株を利用して生産されたヘミセルラーゼ
- ②JPTR002株を利用して生産されたキシラナーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 それでは、定刻ですので、ただいまから第176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、所用により、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇は御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目である「JPTR001株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」
「JPTR002株を利用して生産されたキシラナーゼ」の安全性の審議です。

それでは、お手元の資料を確認いたします。

事務局からお願いいたします。

〇〇〇 それでは、議事次第に基づきまして、配付資料の確認をさせていただきます。

配付資料ですが、議事次第、座席表、専門委員名簿、食品健康影響評価に関する資料です。

机上配付資料としまして、「1. JPTR001株を利用して生産されたヘミセルラーゼの申請書の追加」「2. JPTR002株を利用して生産されたキシラナーゼの申請書の追加」「3. 遺伝子組換え添加物の生産宿主における導入DNAの構造等の確認方法について」となっております。

なお、これら以外の参考資料については、ファイルに綴じまして、委員の皆様の机の上に置かせていただいております。

本ファイルについては、調査会終了後、回収させていただき、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。

また、本日は新規品目であります「JPTR001株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」及び「JPTR002株を利用して生産されたキシラナーゼ」の申請者でありますノボザイムズジャパン株式会社の方をお呼びしております。申請品目の審議の際に、質疑応答に対応していただくことを予定しております。

〇〇〇 ありがとうございます。

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、報告をお願いいたします。

〇〇〇 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ましたところ、平成15年10月2日委員会決定の2（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。

〇〇〇 既に提出いただいております確認書について、その後、相違等はございませんでしょうか。

（「はい」と声あり）

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、新規品目である「JPTR001株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」について、審議を行いたいと思います。

では、説明をお願いいたします。

〇〇〇 申請書の説明に入ります前に、審議の進め方について御説明をいたします。

先ほど御紹介いたしました、本日は申請者のノボザイムズジャパン株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書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ありましたら、整理していただきたいと思っております。その後に説明者に入室していただき、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。

それでは、お手元の緑色のファイルに沿って説明をさせていただきます。

まず、1ページの左側でございます「はじめに」に沿って概要を御説明いたします。

本申請添加物ですが、生産性の向上を目的として、*Talaromyces pinophilus* ATCC 36839株由来のアラビノフラノシダーゼ遺伝子を宿主*Trichoderma reesei* QM6a株に導入した生産菌（JPTR001株）によって産生されるヘミセルラーゼとなっております。ヘミセルラーゼは植物組織からアルカリ抽出される多糖類ヘミセルロースを分解する酵素の総称でありまして、このヘミセルロースの具体例としてはキシランやアラビノキシランが知られております。本品は、その中でもアラビノキシランを基質とするアラビノフラノシダーゼでして、アラビノキシラン中の α -1,2もしくは α -1,3結合の非還元末端Lアラビノフラノースをキシロース主鎖から特異的に切断する反応を触媒するエキソ型の加水分解酵素となっております。

製品名をAFUTPと申しまして、デンプン糖の製造に用いられます。液化工程の前段階の原料調整工程でありますウェットミリングの工程において使用されまして、デンプンの原料となるトウモロコシ等の植物細胞壁成分を分解することにより、植物細胞壁成分と結合していたデンプン成分が遊離されるため、結果として液化工程に供されるデンプン量が増加する。つまり、デンプン糖製造の歩留まりに資するものとなっております。

Ta. pinophilus ATCC 36839株が産生するアラビノフラノシダーゼですが、至適pHが酸性領域であるという、ウェットミリング工程に適した性質を持つものです。しかしながら、野性株を用いた当該酵素の製品化が困難であったため、同遺伝子のコピー数を増やした生産菌を作製したものが、本申請品目となっております。

1ページ、「第1-1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料」です。

従来品ですが、(1) 製品名はアラビノフラノシダーゼ（BakeZyme ARA 10,000）となっております。基原は*Aspergillus niger*です。

(2) 製造方法は記載のとおりです。

(3) 用途及び使用形態ですが、一番下になりますけれども、従来品は、製パンに使用されておまして、パン原料となる穀物中のアラビノキシランに作用することで生地の水率や弾力の向上等の効果があるとされております。

2ページ、図1に植物における代表的なキシランの構造模式図と対応する加水分解酵素の関係が示されております。

(4) 摂取量ですが、従来の添加物、先ほど御紹介したBakeZymeが全ての製パンに用いられ、さらに100%残存すると仮定して、1日の最大摂取量の試算が行われております。平成27年の「国民健康・栄養調査報告」によりますと、国民1人1日当たりのパン類・菓子パン類の消費量は平均で40.1 gとなっております。酵素重量は100%とし、添加量はパン生地g当たり0.003 mgとした場合に、製パンにおけるアラビノフラノシダーゼの1日当たりの最大摂取量は0.12 mg/日と試算されます。この値を日本人の平均体重で除したところ、3ページが一番上になりますが、0.002 mg/日/kg体重と試算されております。なお、製パンに使用された場合ですが、焼成により酵素タンパク質は最終的に熱変性して失活するものと考えられるとされております。

続いて、「第1-2 宿主及び導入DNA」です。

(1) ですが、宿主は自然界から分離された*Tr. reesei* QM6a株となっております。

(2) DNA供与体ですが、表1に挿入DNAの供与体の一覧が記載しております。このアラビノフラノシダーゼをコードする*afuTP*遺伝子は、*Ta. pinophilus*由来、それから、マーカーとして導入されております*amdS*遺伝子、こちらは*A. nidulans*のGlasgow野性株由来となっております。プロモーター、ターミネーターは、いずれも*Tr. reesei*由来、それから、クローニングの過程で導入されております`*Tamg*`断片は、*A. niger*由来となっております。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法ですが、4ページをおめくりいただきまして、図3に導入される遺伝子発現カセットの概要図が記載されております。ご覧いただきますとおり、*afuTP*遺伝子は発現カセット当たり●●●コピー、これに対してマーカーの*amdS*遺伝子は1コピーという形になっています。

この遺伝子発現カセットを、図2を御参照いただきたいのですけれども、宿主のQM6a株の●●●遺伝子座に導入しております。その際に、●●●遺伝子の欠失が生じておりまして、最終的にJPTR001株が得られるとなっております。

5ページ、表2に各挿入遺伝子、プロモーター等の機能の説明がなされております。

6ページ、「第1-3 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。*Tr. reesei*は40年以上にわたって、食品製造用途、飼料添加物用途及び医薬品用途のセルラーゼの生産菌として安全に使用されてきたとされております。

7ページ、「第1-4 宿主の構成成分等に関する資料」です。*Tr. reesei*がヒトに対して病原性を有することを示した報告はありません。また、カビの中には、胞子がアレルギー原性を有するものが知られておりますが、これまでのところ、*Tr. reesei*がアレルギーの原因であることを示す報告はないとしております。また、真菌は一般的にマイコトキシンを産生し得ますが、*Tr. reesei*は酵素製造における発酵過程ではマイコトキシンや抗生物質を産生しないと報告されているとされております。

「第1-5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」です。

(1) 製品名はAFUTP、有効成分はアラビノフラノシダーゼ。

(2) 製造方法ですが、従来の添加物と同様、培養工程及び精製工程を経て製造されるようになっております。

8ページ、図5にこのAFUTPの製造工程の概略図が示されております。

(3) 用途及び使用形態です。AFUTP製剤は、冒頭で御説明したとおり、デンプン糖製造のウェットミリング工程において使用されます。9ページに摂取量の試算がされておりました。AFUTPが全てのデンプン糖製造に用いられ、さらに100%残存すると仮定した場合の1日最大摂取量の試算が行われております。平成27年の「国民健康・栄養調査報告」によると、国民1人1日当たりの砂糖・甘味料類の消費量は平均で6.6 g、これにTotal Organic solids (TOS) を4%、添加量をデンプン1 g当たり0.9 mgとした場合の1日当たりのAFUTPの最大摂取量ですが、0.24 mg/日と試算されております。

この値を日本人の平均体重で除しましたところ、最終的には0.004mg/日/kg体重となっております。

なお、AFUTP等で糖化されたデンプンは、最終的に精製工程及び加熱処理を経て製品化されるため、最終製品にこのAFUTPが残存することか考えがたいとされております。

10ページ、(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較です。本品の有効成分ですが、アラビノキシラン中の α -1,2もしくは α -1,3結合を特異的に切断するものとなっております。他方、従来の*A. niger*由来のアラビノフラノシダーゼに関しましては、2種類のアラビノフラノシダーゼを含有することが知られておりました。このうち、ABF Aは α -1,5結合を特異的に切断するもの、ABF Bのほうは、 α -1,2、1,3、1,5の3つの部位を加水分解することが知られております。

続きまして、「第1-6- (1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点」です。現行流通品、従来の*A. niger*由来のアラビノフラノシダーゼが入手不可であったため、文献情報に基づきまして、既存添加物の主成分であると考えられるABF Bとの比較を行っております。

11ページ、図8にAFUTPと従来のABF Bのアミノ酸配列の比較がなされております。相同性はトータルで●●●と低いことがわかっております。その原因としましては、加水分解できる α 結合の種類が同一ではないことが考えられ、その結果として、全体の構造の相同性が低いものと推測されたとなっております。しかしながら、これは後ほど御説明をしますが、AFUTPの消化性は高く、また、製剤の純度においても安全性の問題は見られないため、これらの中で高い構造相同性が見られないことに起因する安全性上の懸念はないものと考えられると考察をしております。

12ページ、表4にこのAFUTPと従来品のABF Bの比較が表の形で記載されてございます。

13ページ、(2) 組換え体と宿主の相違点ですが、表5に生産菌でありますJPTR001株と宿主のQM6a株の相違点が表の形になっております。最終的に宿主、生産菌には、遺伝子発現カセットが●●●コピー導入されておりました。その結果として*afuTP*遺伝子は●●●●コピー、*amdS*遺伝子は●●●●コピー、導入遺伝子座の●●●●遺伝子が欠失をしている

という点で相違がございます。

「第2 宿主に関する事項」です。

「第2-1 分類学上の位置づけ（種名（学名）・株名等）に関する事項」は、記載のとおりです。

14ページ、「第2-2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」です。まず、病原性についてですが、先ほども申し上げましたとおり、*Tr. reesei*がヒトに対して病原性を有することを示した報告はないとなっております。

続いて、ページの中ほどですけれども、有害生理活性物質等の生産についてです。*Tr. reesei*は、パラセルシン等の二次代謝産物でありますペプタイボルを産生し得る能力を有することが報告をされております。*Tr. reesei*のゲノムには、2つのペプタイボル合成酵素コード遺伝子が含まれておりますが、発現カセットの導入に伴い欠失した●●●遺伝子がその一つでありまして、ペプタイボルの一つであるパラセルシンの合成にこの●●●遺伝子が関与するのですけれども、これが欠失をされているという形になっております。

*Tr. reesei*は食品等を含む産業用セルラーゼの生産菌として長く安全に使用されてきた歴史がありまして、産業用酵素の製造においてペプタイボル等の二次代謝産物による安全性の問題が生じた報告はこれまでにはなされていないとされております。

15ページ、また、ペプタイボルの産生は貧栄養条件下で他の真菌類に対する防御応答であることを示す報告がなされております。工業スケールで酵素を製造するための大量培養プロセスでは、豊富な栄養素のもと行われますので、このような最適条件下では、二次代謝は行われないとされております。

このような知見の蓄積に基づいて、米国EPAでは、QM6a株及びその派生株に関しては、最適化された一般的な工業発酵においてパラセルシンの生産は起こらないことを認めるとするリスクアセスメント結果を発表しております。したがって、QM6a株の病原性及び生理活性物質の産生という観点で、安全上の懸念は極めて低いものと考えられると考察しております。

「第2-3 寄生性及び定着性に関する事項」「第2-4 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項」は、いずれもそのような知見はないとなっております。

「第2-5 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」です。*Trichoderma*属のうち、一部につきましては、臓器移植後の患者やHIV感染者等の免疫機能が極度に抑制されている場合において日和見感染することが知られております。特に、臨床で単離された報告が多いものが、*Tr. longibrachiatum*と*Hypocrea orientalis*となっております。しかしながら、いずれも分類学的には*Tr. reesei*とは独立した種であり、*Tr. reesei*が日和見感染の原因菌として単離された報告はないとしております。

16ページ、真菌においてはマイコトキシンの産生が安全上の懸念の一つとなりますが、*Trichoderma*属のうち、マイコトキシンの一つであるトリコテセン類を産生することが報

告されているのは、*Tr. brevicompactum*、*Tr. arundinaceum*、*Tr. turrialbense*、*Tr. protrudens*の4種のみとなっております。これらはいずれも先ほどと同様、*Tr. reesei*からは系統的に離れた種であるとしております。

「第3 ベクターに関する事項」は記載のとおりです。

17ページ、下段になりますが、「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」です。

「第4-1 挿入DNAの供与体に関する事項」は、表6に一覧が記載されてございます。

18ページ、(2) 安全性に関する事項です。まず、*Ta. pinophilus* ATCC 36839株についてですが、*Ta. pinophilus*に関しては、特段の食経験は報告されておりません。しかしながら、さまざまなバイオマス分解酵素を産生することから、*Tr. reesei*に変わり得る有用微生物であると考えられ、加えて全ゲノム解析の結果、有用な二次代謝産物を産生することも明らかになっております。

国立感染症研究所の病原体等安全管理規程におきまして、バイオセーフティーレベル2及び3には分類されておりません。また、ヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みもございませんで、*Ta. pinophilus*は病原体等のリスク群分類のリスク群1に分類されるとなっております。

他の遺伝子の供与体については、以下、記載のとおりでございます。

20ページ、「第4-2 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項」です。

(1) 挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項ですが、*afuTP*遺伝子は*Ta. pinophilus* ATCC 36839株のゲノムDNAを鋳型として、PCRにより作製されております。

*amdS*遺伝子も同様に、*A. nidulans* Glasgow野生株のゲノムDNAを鋳型として、PCRにより得られております。

第4-2・(2) ですけども、*afuTP*遺伝子の塩基数、制限酵素切断地図は、図12に示されているとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。まず*afuTP*遺伝子ですが、AFUTPをコードするもので、アラビノキシラン中の α -1,2もしくは α -1,3結合Lアラビノフラノース側鎖をキシロース主鎖から切断するものとなっております。

続いて、安全性についてですが、21ページ、*afuTP*遺伝子の供与体である*Ta. pinophilus*、それから、遺伝子産物でありますAFUTP、いずれもアレルギー誘発性を示唆する報告はないとされております。

3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見です。①人工胃液に対する感受性ですが、AFUTPは人工胃液処理開始後30分以内に完全に消化されることが示されております。この図が次のページの図13に記載がございまして、赤い矢印で示されている●●●kDaのタンパク質がAFUTP。それから、21ページの最下段に説明があるのですけ

れども、●●●kDa、●●●kDa、●●●kDaのところに3つバンドがございますが、これらはいずれも宿主由来のセルラーゼとなっております。これに関しては、後ほど御説明をいたします。

②人工腸液に対する感受性ですが、AFUTPは人工腸液処理開始後6時間では消化されないことが示されたとなっております。

机上配付資料をご覧いただきたいのですが、1ページ、申請資料には含まれていなかったもので、追加で提出を求めています加熱処理に対する感受性の結果の記載がございます。AFUTPは、●●●までは60%ほどの活性を維持しておりますが、50℃で急激に失活をするという結果となっております。なお、このAFUTPが使用されるウェットミリング後の液化工程は105℃、最終の精製工程では80℃で30分の処理が施されるため、これらの工程でAFUTPは失活するとされております。

申請要旨にお戻りいただきまして、23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関する知見です。80アミノ酸残基以上で35%以上の一致、それから、連続8アミノ酸配列で完全一致するアレルゲンの検索を行ったところ、AFUTPと相同性を示す既知のアレルゲンは検出されてございません。

また、机上配付資料に戻っていただきまして、3ページ、*amdS*遺伝子に関しましても追記を求めています。機能の説明は省略いたしますが、安全性に関しましては、アレルギー誘発性、毒性を示す報告は、アセトアミダーゼに関してはない。それから、*amdS*遺伝子は、選択マーカーとして長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された遺伝子組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられている。よって、アセトアミダーゼがアレルギー誘発性及び毒性を有するとは考えがたいと考察がなされております。

申請要旨にお戻りをいただきまして、24ページ、第4-3です。(1) (2) プロモーター、ターミネーターに関する事項は、記載のとおりです。

「第4-4 ベクターへの挿入DNA組み込み方法に関する事項」も記載のとおりです。

「第4-5 構築された発現ベクターに関する事項」も記載のとおりとなっております。

27ページ、「第4-6 DNAの宿主への導入方法に関する事項」も記載のとおりです。

28ページ、「第4-7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」も記載のとおりです。

「第5 組換え体に関する事項」です。

「第5-1 宿主との差異に関する事項」ですが、挿入DNA及び欠失DNAは病原性及び有害生理活性物質に関するものではない。したがって、これらの操作が宿主の非病原性及び有害生理活性物質の非産生性に影響することはないと考えられると考察されております。

「第5-2 遺伝子導入に関する事項」です。(1) 制限酵素による切断地図に関する事項ですが、JPTR001株の挿入領域における制限酵素切断地図は、29ページの上段の図16に記載がございます。また、その構成は、その下の表8に示されております。挿入領域の塩基配列はシーケンス解析によって確認をされてございまして、その結果、●●●遺伝子座に

*afuTP*遺伝子発現カセットが●●●コピー挿入され、かつ、これらの挿入領域には抗生物質耐性遺伝子（*amp*遺伝子）が存在しないことが確認されております。また、*afuTP*遺伝子発現カセットが●●●遺伝子座以外の部位に挿入されていないことは、サザンブロット解析により確認されておりました。さらに、アンピシリン耐性遺伝子が存在しないことはゲノムシーケンス解析でも確認されております。このゲノムシーケンス解析には、次世代シーケンスが用いられておりました。その条件等はこちらに記載のあるとおりとなっております。

29ページ、「第5-2- (2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項」です。宿主の●●●遺伝子座の5'側、3'側の近傍配列を含む全長●●●bp長の配列に対しまして、ORF検索を行った結果、260個のORFが検出されております。

30ページ、これら検出されたORFと既知のアレルゲンとの相同性検索を行ったところ、80アミノ酸残基以上で35%以上一致するアレルゲンが2種確認されておりますが、これらはいずれも宿主側の領域のORFであったため、結果としては、既知のアレルゲンとの構造相同性は検出されなかったと結論されております。

また、連続8アミノ酸配列の完全一致が見られるアレルゲンは検出されておられません。

それから、この260個のORFと既知の毒性タンパク質との相同性検索を行った結果、2個のORFで毒性タンパク質とのヒットが確認されております。

まず、一つのORFで、31ページになりますが、Putative amidaseとの相同性が確認されております。こちらは*Escherichia coli* CFT073株の全ゲノム解析で同定された推定アミダーゼですが、アミダーゼが毒性を持つという報告はないことから、このORFがタンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考えがたいと考察されております。

もう一方のORFと相同性を示した既知の毒性タンパク質が2つございまして、その一つがページの下段にございますTssMです。これは類鼻疽菌に由来するものとなっております。この類縁菌であります*Burkholderia mallei*の脱ユビキチン化酵素をコードする*tssM*と完全に相同であることから、同じ酵素活性を有するとされております。NF- κ B及びインターフェロン作動性の炎症反応を低減させる因子であることが報告されておりますが、このTssMは感染細胞内で脱ユビキチン活性を示すことで何らかの抗炎症作用経路に関与するのみであり、単独での毒性は報告されていないことから、このORFが同タンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考えがたいと考察されております。

もう一つヒットが見られたEBNA-2に関しては、32ページに考察がございまして、これはオナガザルヘルペスウイルス12に由来するB細胞を不死化しバーキットリンパ腫等を引き起こす*Epstein-Barr Virus*のEBNA-2のホモログであるとなっております。このものですが、細胞内で機能する転写因子等を中心とした機能のみが報告されており、単独での毒性は報告されていないことから、このORFが同タンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考えがたいと考察されております。

以上の考察から、遺伝子導入によって新たに生じたORFが発現したとしても、本酵素製剤中にアレルギー誘発性又は毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考察されております。

続きまして、「第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項」ですが、記載にありますとおり、AFUTPの製剤に用いられる発酵原料、発酵器材は、いずれも食品用酵素の製造に長年安全に使用されてきた実績があると記載されてございます。

33ページ、「第7 遺伝子組換え食品添加物に関する事項」です。

「第7-1 諸外国における認可、食用等に関する事項」ですが、AFUTPを有効成分の一つとする酵素製品は、米国においてはGRASによる安全性の確認が、フランスにおいては食品用加工助剤としての安全性の確認が終了しております。

「第7-2 組換え体の残存に関する事項」ですが、製品中に組換え体DNAが残存しないことをドットプロット解析により確認しております、その結果が34ページの中ほどに記載がございまして、製品中には組換え体の染色体DNAが残存しないことが確認されたと結論されております。

「第7-3 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、35ページにございまして、製品は米国FCC、それから、JECFAの規格値に適合することが確認されております。

「第7-4 精製方法及びその効果に関する事項」です。このAFUTPのタンパク質純度は、CBB染色の結果●●●%と推定されております。36ページになりますが、他方で、この宿主でありますQM6a株は既存添加物であるセルラーゼの生産菌として使用されているもので、実際にこのJPTR001株を得る過程で、いわゆる従来の手法による突然変異処理によって、セルラーゼの産生性を高めた株が中間株として作られております。したがって、最終製品中には、このヘミセルラーゼのほかにセルラーゼが含まれておりまして、その含量の試算がされておりますが、タンパク質純度及び最終製品中のヘミセルラーゼの組成●●●%からヘミセルラーゼ原体由来のセルラーゼ含量は約●●●%と考えられるとされております。

続いて、第7-5ですが、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられるとなっております。

第8、第2から第7までの事項により安全性の知見が得られているとされております。

申請資料の説明は以上です。

○○○ ありがとうございました。

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っております。まずはベクターに関する事項、1ページから17ページまででございますでしょうか。

挿入DNA、産物に関する17ページから28ページまでで、どうぞ。

○○○ 必ずそうしろというわけではないのですが、今回、*Talaromyces Pinophilus*と*Trichoderma reesei*という2つ名前が出てきまして、どちらも省略形で*T.*

*pinophilus*と *T. reesei*と同じ *T*になってしまうのですね。こういうときは論文だと、どうしても区別したいというケースでは、*Talaromyces*のほうは *Ta.*と2文字にして、*Trichoderma*のほうは *Tr.*と2文字にして区別がつかますよと表示する場合もあるのです。そうしてもらったほうがこんがらがらなくてありがたいと思いました。

〇〇〇 実は私も同じことを考えていまして、そうでなくても *Talaromyces*は、これはペニシリウムの有性世代なので、ピンときにくい名前なので、学名のつけ方としては、正式には *T*一文字でいいのでこれで間違っているわけではないのだけれども、*Trichoderma*は *Tr.*で *Talaromyces*は *Ta.*としていただいたほうが、この要旨を読むときのわかりやすさと、明確にこんがらがらずに済みますので、私もそのようにお願いできればと思います。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 それから、22ページ、23ページ、人工胃液、人工腸液でウェスタンブロットをやっている、小さいバンドがこのAFUTP、ヘミセルラーゼで、3つの大きいバンドが *Trichoderma*由来と書いてあるのですが、ウェスタンブロットのデータを見てみると、両方ともきっちりバンドが反応していて、このウェスタンブロットの抗体は何で作ったのかなど、これが少々気になりまして、これについては申請者が来ておりますので、聞いてみたいと思います。

どうぞ。

〇〇〇 私もそれは気になって、それで見ただけです。そうしたら、この資料のところにもついていたのですけれども、これは●●●をホールで使った、これを抗原にしてラビットに全部打ち込んで作ったのですって。それでセルラーゼの混じっているもの、確かに添付資料のほうには遺伝子の入っていない元のものの製剤にも、この上の3つのバンドは出ているのです。だから、これごと抗原にしたのですって。私も先生と全く同じことを、何なのだろうと思ったのですけれども、解決しましたので、そういうことみたいです。

〇〇〇 多分、そんなところではないかとは思っていたのですけれども、資料にありましたか。失礼いたしました。

〇〇〇 非常に見にくく。

〇〇〇 ぱっと見ではわかりません。

〇〇〇 わかりません。

〇〇〇 聞いてもいいと思う。

〇〇〇 一応聞いて、特に書いてあるのならばそれを追及しなくてもいいかとは思いますが、申請者が来ておるのならば、ほかに質問があるならば聞いてみたいとも実は思うのですが。

〇〇〇 わかりました。せっかく来ていらっしゃるので。

〇〇〇 もう一つ、28ページ、この合成の遺伝子は●●●遺伝子の座位に入っていると。これはペプタイボル合成系とあるのですけれども、この●●●の遺伝子がペプタイボル合成系のどの部分の遺伝子なのか、少々気になります。というのも、終わりのほうを下手に

壊しますと、そうすると、有毒な中間体ができる可能性がありますので、これが初期のほうとか制御系ということで、これは壊せばそもそもこれが発現しないということであるならばそれはいいのですけれども、読んでみてもそこはわからなかったのも、それは聞いてみたいと思うのです。

ほかに先生方、ございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 戻ってしまうのですけれども、4ページのところに生産菌の概略図が載っているのですが、今回、もともとセルラーゼの生産菌として使われていたものに入れている形になっているので、従来のこういうケースだと、大体最初はワイルドタイプかそれに近いものからスタートしてたどり着くように書いてほしいというのは、前にはあったと思うのですが、余り詳しく書きたくなさそうな雰囲気書かれているので、そうなのかなとも思ったのですけれども、一応UV照射か何かで中間体があって、それはセルラーゼの生産菌として使われた実績があるみたいことは、なぜセルラーゼのバンドが出てくるのかということも整合性が出てくるので、簡単でいいのですけれども、書いてもらったほうがよろしいのではないかとはいいます。

〇〇〇 確かに同感です。もう少しこの説明をしていただければ。確かに *Tr. reesei* はセルラーゼの生産菌として有名は有名だけれども、だからといって説明なしというわけにはいきませんので、この株を、しかも工業的に作る経緯でどう作ったのか、少々細工もしておるはずなので、確かに簡略でいいのですが、もう少し説明していただくように問い合わせていただければと思います。

最後、36ページまでで、また、全体を通してございましたら、どうぞ。

〇〇〇 36ページ、12行目ですけれども、AFUTPのタンパク質の純度は●●●%とあるのですが、これはどのようにして純度を求めたのかというのは聞かせてもらえればと思います。

〇〇〇 たしか、この記述の中にはSDS-PAGEでバンド等は見ているとはあるのですけれども。

〇〇〇 この資料だけです。

〇〇〇 それだけなので、実際のところ、それでどのくらいの信頼度があるのかとか、そういうことは質問されてもよろしいかと私も思います。

どうぞ。

〇〇〇 戻ってしまっていて恐縮なのですが、11ページ目に図7があるのですが、アラビノキシランの上に1,5というところがあるのですが、これは主鎖がアラビノースなので、4,5だと思ってしまうのですけれども、そうすると数が合わないのです。5のところを上に出して結合させようと思っても、そこは六角形ではなくて五角形にならないと数が合わなくなってしまうので、正しいものにしてほしいと思います。

〇〇〇 確かに五炭糖で5の結合はあるのかなということですね。というか、この形には

ならないと。

〇〇〇 5の結合で分岐させようと思うと、五角形にしないと分岐させられないので、これは六角形になっているので、六角形だと、5はもう取り込まれてしまっているのです。

〇〇〇 ようやくわかりました。六角形、六角形、六角形と3つ並んでいて、その3つ目がおかしいだろうということですね。

〇〇〇 そういうことです。もし、1,5で結合を示すならばですね。

〇〇〇 わかりました。おっしゃるとおりだと思います。3番目の一番右のキシロースだけは五角形の形であるべきですね。そうでないと正しくありません。

〇〇〇 それから、18ページの下のところなのですが、*Ta. pinophilus* は国立感染症研究所云々とあって、2行目に「細菌の項目」とあるのですけれども、*Talaromyces*は真菌なので、ここは「真菌」ですね。細菌と比較しては意味がないと。

〇〇〇 ほかにございませんでしょうか。

安全性に特に問題になりそうなものはないように思いますけれども、幾つか、ウェスタンブロットに用いた抗体はどうやって作っているのかという点、挿入した●●●遺伝子座というのはペプタイボル合成系のどの遺伝子に相当するのかといったこと、AFUTPの純度検定はどのように行ってどの程度の精度があるものか、そういったことを申請者に聞いてみたいと思います。

それから、この宿主の *Tr. reesei* QM6a株の突然変異株、これは既存添加物であるセルラーゼの生産菌として使用されています。この生産菌株はJPTR001株の構築過程で中間体でもありまして、ヘミセルラーゼ、AFUTPの最終製品中にはこの宿主由来のセルラーゼが含まれています。このヘミセルラーゼ●●●%に対してセルラーゼ●●●%、結構な量が含まれているのですが、これはこの安全性について問題がないかどうか、一応先生方の御意見を伺っておきたいと思います。私としては、もともとこの宿主の *Tr. reesei*の安全性はほぼ確認されていることから、宿主由来のセルラーゼが混入していることに問題は特にないのではないかとと思うのですが、先生方、この点はいかがでしょうか。よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

通常であれば、ここで申請者に御登場願うところなのですが、次の品目、JPTR002株を利用して生産された、今度はキシラナーゼ、これは本件と宿主も同じ、導入遺伝子座も同じ、遺伝子の導入方法も同じ、生産菌の選抜マーカーも同じということは、目的の遺伝子発現カセットのみが異なるということになってございます。

これだけ共通点がございますので、今回は先に両方の申請書の審議をした上で、まとめて呼び出して聞いたほうが合理的と思うのですが、よろしいでしょうか。

では、そういうことにしたいと思います。

それでは、審議を急ぎまして、早速「JPTR002株を利用して生産されたキシラナーゼ」についての審議を先にやりたいと思います。

事務局からお願いいたします。

〇〇〇 では、このブルーの紙ファイルを御参照いただきまして、まず、先ほど同様、1ページの隣の「はじめに」のところで概要を説明させていただきたいと思っております。

本品目ですけれども、生産性の向上を目的として、*Talaromyces leycettanus* CBS 398.68株由来のキシラナーゼ遺伝子を宿主 *Trichoderma reesei* QM6a株に導入したJPTR002株によって産生されるキシラナーゼとなっております。こちらはヘミセルロースのうちキシランを基質とするものでして、キシラン中の1,4-β-D結合を特異的に切断するものです。この(1→4)-β-D-オリゴキシランを生ずる反応を触媒するエンド型の加水分解酵素で、pH3.0~5.0の酸性領域で高い活性を示す特徴を有しております。

先ほどのヘミセルラーゼと同様に、デンプン糖製造のウェットミリング工程において使用されます。余談ですけれども、実際は先ほどのヘミセルラーゼとこのキシラナーゼの両方を含む製剤として販売されるようです。

それから、この *Ta. leycettanus* CBS 398.68株が産生するキシラナーゼは、至適pHが酸性領域であるということで、ウェットミリング工程に適した性質を持つものですが、野生株を用いた当該酵素の製品化は生産量の問題で困難であったことから、強力な発現制御因子により、このキシラナーゼをコードする *xynTL* 遺伝子の発現能力を強化した生産菌を作製したものが、本申請品目となっております。

1ページ、「第1-1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料」です。従来品は製品名キシラナーゼ (Pentopan® 500 BG)、基原は *Humicola insolens* となっております。

(2) 製造方法は記載のとおりで、図1に製造方法の概略図が記載されてございます。

2ページ、(3) 用途及び使用形態ですが、先ほどのヘミセルラーゼと同様、従来のキシラナーゼも製パンに使用されておまして、小麦粉中のキシランに作用することで、生地のやわらかさの向上等、小麦粉の改良効果があるとされております。

3ページ、(4) 摂取量ですけれども、従来品のキシラナーゼが全て製パンに用いられ、さらに100%残存すると仮定して、1日最大摂取量の計算が行われております。

平成27年「国民健康・栄養調査報告」の国民1人1日当たりのパン類・菓子パン類の消費量は平均で40.1 g、Total Organic Solidsが27%、添加量を小麦粉1 g当たり0.18 mgとした場合、パン類・菓子パン類における従来のキシラナーゼの1日当たりの最大摂取量は1.95 mg/日と見積もられます。この値を日本人の平均体重で除しましたところ、最終的には0.04 mg/日/kg体重と試算されております。

なお、製パンに使用される場合には、焼成により酵素タンパク質は最終的に熱変性して失活するものと考えられるとされております。

「第1-2 宿主及び導入DNA」ですが、宿主は *Tr. reesei* QM6a株です。

(2) 挿入DNAの供与体は、次のページの表1に一覧がございまして、*xynTL* 遺伝子は *Ta. leycettanus* CBS 398.68株由来、*amdS* 遺伝子、*cbh1* プロモーター、*cbh1* ターミネーターは、いずれも先ほどのヘミセルラーゼと同様となっております。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法ですが、図4にこの *xynTL* 遺伝子発現カセットの概略

図が記載されてございます。こちらに関しては、*xynTL*遺伝子、マーカーの*amdS*遺伝子、いずれも●●●コピーがこの発現カセットの単位となっております。

4ページ、図3に戻っていただきまして、先ほどと同様、この遺伝子発現カセットを●●●遺伝子座に導入していただきまして、その際に、この●●●遺伝子が欠失をしております。

7ページ、第1-3、第1-4は、先ほどのヘミセルラーゼと同様となりますので、説明は省略をいたします。

「第1-5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」です。

(1) 製品名はXYNTL、有効成分はキシラナーゼとなっております。

8ページ、(2) 製造方法ですが、従来の添加物と同様、培養工程及び精製工程を経て製造されるとなっております。

(3) 用途及び使用形態ですが、冒頭に御説明したとおり、デンプン糖製造のウェットミリング工程において使用されます。ページの中ほど以下から摂取量の推定がされております。このXYNTLが全てのデンプン糖製造に用いられ、さらに100%残存すると仮定して、1日最大摂取量の試算が行われております。

平成27年「国民健康・栄養調査報告」の国民1人1日当たりの砂糖・甘味料類の消費量は平均で6.6 g、Total Organic Solidsを4%、添加量をデンプン1 g当たり0.9 mgとして、デンプン糖におけるXYNTLの1日当たりの最大摂取量を見積もった結果、9ページの一番上になりますけれども、0.24 mg/日となっております。

この値を日本人の平均体重で除しましたところ、0.004 mg/日/kg体重と試算されております。

なお、このXYNTL等で糖化されたデンプンは、最終的に精製工程及び加熱処理を経て製品化されるため、実際に最終製品に残存するとは考えがたいとされております。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較です。従来の添加物は、*Humicola insolens*由来のキシラナーゼでありまして、ただし、このキシランに対する反応特異性には、この組換え由来のものと特段の差はございません。しかし、従来のキシラナーゼは、デンプン糖製造におけるウェットミリング工程において望ましい酸性領域での活性が至適pHに対する相対活性の10%程度であることに対して、このXYNTLは至適pHが4.0であることから、このpH特性において、既存の添加物よりもウェットミリングにおける有用性が極めて大きいとされております。

「第1-6- (1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点」が、表4の形でまとめられてございます。なお、1点、従来の*H. insolens*由来のキシラナーゼに関して、アミノ酸数、分子量が不明とされておりまして、申請者に確認をいたしましたところ、単に同定をしていないとの回答でした。

11ページ、「第1-6- (2) 組換え体と宿主の相違点」が表5にまとめられております。最終的にJPTR002株に遺伝子発現カセットは●●●コピー導入されておりますので、*xynTL*遺伝子、*amdS*遺伝子ともに●●●コピーずつ導入され、これに代わって●●●遺

伝子が欠失しているという点で相違がございます。

12ページ、「第2 宿主に関する事項」は、先ほどのヘミセルラーゼと同様なので、説明は省略いたします。

15ページ、「第3 ベクターに関する事項」も同様に省略をいたします。

17ページ、「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」です。

「第4-1 挿入DNAの供与体に関する事項」、(1) 挿入DNAの供与体は表6にお示しをしているとおりです。

(2) 安全性に関する事項ですが、*Ta. leycettanus*については、特段の食経験は知られておりません。CBS 398.68株は、1968年に英国スタッフォードシャー地方の石炭ぼたより単離されたものでございます。その耐熱性等の特性から、次の18ページになりますけれども、この*Ta. leycettanus*から産業上有用と思われる酵素遺伝子がクローニングされて研究がされているとされております。

国立感染症研究所の病原体等安全管理規程におきまして、バイオセーフティーレベル2及び3に分類されておらず、ヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みがないので、*Ta. leycettanus*は、病原体等のリスク群分類のリスク群1に分類されるとされております。他の供与体については記載のとおりです。

「第4-2 (1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項」です。*xynTL*遺伝子は、*Ta. leycettanus* CBS 398.68株のゲノムDNAを鋳型として用い、PCRにより得られております。

*amdS*遺伝子も同様に、*A. nidulans* Glasgow野生株のゲノムDNAを鋳型として、PCRにより得られております。

第4-2 (2) *xynTL*遺伝子の塩基数と制限酵素切断地図は図12に示しているとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。*xynTL*遺伝子は、XYNTLをコードし、キシラン中の1,4-β-D結合を特異的に切断し、結合数に多様性のある(1→4)-β-D-オリゴキシランを生ずる反応を触媒する。

安全性についてですが、*xynTL*遺伝子の供与体である*Ta. leycettanus*、20ページですけれども、遺伝子産物であるXYNTL、いずれもアレルギー誘発性を示唆する報告はないとされております。

3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見ですが、まず①人工胃液に対する感受性ですけれども、XYNTLは、人工胃液処理開始後2分以内に完全に消化されることが示されております。図13にこのSDS-PAGE、ウェスタンブロットの結果が記載されてございますが、赤い矢印で示している●●●kDaのタンパク質がXYNTL、先ほどと同様ですが、●●●kDa、●●●kDa、●●●kDaのタンパク質は、いずれも宿主由来のセルラーゼとなっております。

21ページ、②人工腸液に対する感受性ですが、XYNTLは人工腸液処理開始後6時間でも

消化されないことが示されております。

ここで、机上配付資料の9ページをご覧くださいまして、先ほどのヘミセルラーゼと同様、加熱処理に対する感受性試験の結果を追加資料として提出を求めています。XYNTLですが、●●●までは90%から100%の活性を維持するが、80℃で急激に失活するという結果が得られております。なお、ウェットミリング後の液化工程は105℃、最終の精製工程では80℃で30分の処理が施されるため、XYNTLはそれらの工程で失活するとされております。

申請要旨にお戻りいただきまして、4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見です。80アミノ酸残基以上で35%以上の一致、それから、連続8アミノ酸配列の完全一致、いずれも相同性を示す既知のアレルゲンは検出されておられません。

それから、先ほどと同様、*amdS*遺伝子についても追加資料の提出を求めています、内容は同様なので、説明は省略をさせていただきます。

22ページ、第4-3から25ページの第4-7までは、先ほどのヘミセルラーゼと同様の記載になっておりますので、説明は省略いたします。

26ページ、「第5 組換え体に関する事項」です。

「第5-1 宿主との差異に関する事項」ですが、挿入DNA及び欠失DNAは病原性及び有害生理活性物質に関するものではないことから、これらの操作が宿主の非病原性及び有害生理活性物質の非産生性に影響することはないと考えられると考察されております。

「第5-2 遺伝子導入に関する事項」、(1) 制限酵素による切断地図に関する事項です。JPTR002株の挿入領域の制限酵素切断地図は、図15にお示しをしており、それから、その構成は表8にお示しをしておりです。挿入領域の塩基配列は、シーケンス解析により確認されておまして、その結果、●●●遺伝子座に*xynTL*遺伝子カセットが●●●コピー挿入され、かつ、これらの挿入領域には抗生物質耐性遺伝子が存在しないことが確認されております。加えて、*xynTL*遺伝子発現カセットが●●●遺伝子座以外の部位に挿入されていないことは、サザンブロット解析により確認されており、また、アンピシリン耐性遺伝子が存在しないことは、ゲノムシーケンス解析でも確認されております。この際の次世代シーケンスの条件等は、以下、記載のとおりとなっております。

27ページ、「第5-2- (2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項」です。宿主の●●●遺伝子の5'領域、3'領域の近傍配列を含む全長●●●bp長の配列に対してORF検索を行ったところ、213個のORFが検出されております。このORFに対しまして、既知のアレルゲンとの構造相同性の検索を行いましたところ、80アミノ酸残基以上で35%以上一致するアレルゲンが3種類検出されてございます。

28ページになりますが、このうち2つは宿主側の領域のものであったため、残る1つのORFと相同性が見られたDer p 15に関して、以下、考察がなされております。このDer p 15ですが、ハウスダストノミ由来のキチン分解酵素となっております。こちらの図16にアミノ酸配列の比較がなされておりますが、C末端側の配列の一部に相同性領域が見られたと

なっております。なお、これまでのところ、Der p 15に関するエピトープの報告はなされておられません。総じて、キチナーゼのグループはヒトにおいてアレルゲンの範疇には入りますが、基本的にはイヌにおいて強い感作性を示すものであることが報告されていることから、このORFとの相同性領域がヒトに対するアレルゲンとなる可能性は低いと考えられると考察しております。また、8アミノ酸の連続完全一致の配列との相同性は観察されていなかったことから併せて考えると、仮にこのORFが転写、翻訳されたとしても、XYNTLの経口摂取により感作性を示すことは考えがたいと考察をされております。

30ページ、このORFと、今度は既知の毒性タンパクとの構造相同性の検索の結果が示されております。相同性を示したORFは3個ございますが、このうち2つに関しては、先ほどのヘミセルラーゼで相同性が示されたタンパク質と同じものになっておりますので、説明は省略させていただきます。

残る1つのORFですが、32ページに記載がございまして、2つの毒性タンパク質とヒットが見られております。まず一つ、hypothetical protein m110446ですけれども、こちらは*Mesorhizobium loti*の全ゲノム解析において同定された機能未知のタンパク質ということで、しかしながら、これまで日和見感染を含めヒトに対する病原性の報告はなく、抗生物質耐性遺伝子も知られていないということで、このORFが同タンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考えがたいと考察されております。

もう一つは、phage-related tail fiber proteinでして、これは植物病原菌である*Xanthomonas campestris*のゲノム解析において同定された機能未知のタンパク質です。先ほどと同様に、日和見感染を含めてヒトに対する病原性の報告はなく、抗生物質耐性遺伝子も知られていないことから、仮にこのORFが同タンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考えがたいと考察されております。

以上の結果から、遺伝子導入によって新たに生じたORFが発現したとしても、本酵素製剤中にアレルギー誘発性又は毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられるという考察がされております。

「第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項」は、ヘミセルラーゼと同様であるため、説明は省略をいたします。

33ページ、「第7 遺伝子組換え食品添加物に関する事項」ですが、第7-1、XYNTLを有効成分の一つとする酵素製品は、先ほどのヘミセルラーゼと同様、米国においてはGRASの確認が、フランスにおいては食品用加工助剤としての安全性の確認が終了しております。

34ページ、「第7-2 組換え体の残存に関する事項」ですが、製品中に組換え体DNAが残存しないことをドットブロット解析により確認した結果、検出限界未満という結果が得られております。

35ページ、「第7-3 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、こちらも製品は米国FCC及びJECFAの規格値への適合が確認されております。

36ページ、「第7-4 精製方法及びその効果に関する事項」です。XYNTLのタンパク質

純度ですが、●●●%と推定されております。この結果と最終製品中のキシラナーゼの組成から、キシラナーゼ原体由来のセルラーゼ含量は約●●●%と考えられると考察されております。

第7-5、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられるとされております。

第8、第2から第7までの事項により安全性の知見が得られているとされております。

申請資料の説明は以上です。

〇〇〇 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っております。先ほどのものと大幅に重複している点もございますので、申請書全部を通して御質問いただければと思っております。

どうぞ。

〇〇〇 28ページのORFのアレルゲン性に関する記述ですけれども、記載に問題があるのかなと思ひまして、まず、6行目ぐらいのハウスダストノミはダニだろうというところが一つです。

それから、参考資料31というものを引いて、このDer p 15というものが、アレルゲン性がヒトにはないのだという言い方をしていますけれども、参考資料31にはヒトのIgEが反応する、少なくともDer p 2よりも強く反応すると書いてあります。もう一つ、8アミノ酸以上連続の完全一致は観察されなかったということと併せて考えてアレルゲン性が低いという論法ですけれども、いずれもなかなかそうは言えないのではないかと思います。結論としては、そういう問題はないのだと思うのですけれども、少なくとも論旨の進め方はおかしいと思ひます。

〇〇〇 これは環境アレルゲン等の相同性なので、食品アレルゲンではないという論法であればまだ納得がいくということによろしいでしょうか。

私も実はそういう印象は少々受けましたので、ここは少々記述を、実際に文献を当たってみるとこの内容からだけではアレルゲン性がないと十分には確認できないということだそうでありますので、環境アレルゲンであるから問題は大きくないという論法にさせていただければよろしいかと思ひますが、先生方はこの点、よろしいでしょうか。

〇〇〇 本当のことを言うと環境アレルゲンだけではないかと。ダニの入ったお好み焼きを食べて食物アレルギーを起こすという事例もあります。ですから、本当はいけないと思うのですけれども、どうしたらいいかと思ひますが。

〇〇〇 それを厳密に言うと今度は食べるものは本当になくなりますので、今まで食品アレルゲンと相同性のあるものについては、これは神経質にチェックしてまいりましたけれども、〇〇〇、そういう考え方でよろしいのでしょうか。

〇〇〇 アレルゲンとしては、比較対象としては食品に限らず環境中のアレルゲンも比較対象には今までもしてきてはいたと思うのですけれども、ただ、今回の場合は。

〇〇〇 少なくとも今回相同性が見られているのは環境アレルゲンであるので、ヒトに直接の影響はそれほど大きくないという論法ならば、まだよろしいということ。それでもまずいですか。

〇〇〇 環境アレルゲンであっても、そういう環境アレルゲンに感作された人が交差性のあるものを食することもあるので。

〇〇〇 製品中に相同性を持ったタンパクが入ってくればそれに反応し得るわけですから、それはいけないと思います。だから、それは入ってこないだろうということですね。最終的にタンパクはORFであるし、作られて入ってくる可能性は非常に少ないだろうと思うのでいいのでしょうか、というところですね。

〇〇〇 いずれにしろ、外に説明できる形でなければいけないので、オープンリーディングフレームとしては存在しても、それが実際にこの製品に混入する可能性は非常に低いであろうということならばよろしいということでしょうか。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 確かに環境アレルゲンならばいいというわけでもありませんので、これが実際に混入する可能性は非常に低いだろうということで、そういう論点で安全性は確認できたという形にしていただければ説明できるかと。先生方、よろしいでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 ノボザイムズへの質問ではないのですが、参考のために、今までずっとこういう申請資料で、組換え体の残存に関する事項というところで、いつもドットプロット分析を使う。これはそういう決まりがあるのでしょうか。

〇〇〇 これはそうとは限りません。もっといい方法もあるとは思いますが、ドットプロットのデータでこれまで申請資料を我々はこれでいいたらと認めてきましたので、そうしたら、多分申請側としてもドットプロットでいいのならばドットプロットでとっているのではないかと思います。これよりも検出の感度のいい近代的な方法は、実は私も幾らでもあると思うのですが。

〇〇〇 私はウイルス検定などをしてしていると、これはどちらかというと感度は低いほうの部類に入るもので、それでもいいと思いますが、ただ、結論の表現として、DNAが残存しないという言い方をするのですけれども、これはこういう表現でよろしいのでしょうか。これは例えばレポートを見ると、検出限界以下であるとは書いてあるのですが、残存しないというような言い方でいいのであれば、別に問題なければいいのですが。

〇〇〇 これは事務局サイドとしてはいかがなのでしょう。

〇〇〇 〇〇〇の御指摘は、このドットプロットの結果をそのまま記載するのであれば、あくまで検出限界以下であったというほうが事実関係に即しているということでしょうか。

〇〇〇 そうですね。社内文書ですか、これを見るとないとは書いていないのですね。検出限界以下と書いていますので、正確に言えばそちらのほうが良いのかもしれない。

〇〇〇 多分御指摘のとおりで、科学的に言うとは検出限界以下と書くのが正しいような気がするのですが、今まで先ほど座長が言われたように、これをもって残存しないというような言い方をして来たこともあったかなと思います。言いぶりの整合の問題もありますので、過去の書き方を確認させていただいて、もし正確に書けるようでしたらそのようにさせていただきますが、今までそのような形で書いてきたということであれば、少しここで急に変更しづらいところもありますので、少し確認させていただければと思います。よろしいでしょうか。

〇〇〇 ほかにございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 10ページの図7なのですけれども、六角形と六角形の間がCになっているのですが、Oだと思うのです。誰か言うかなと思って言わないでいたのですけれども、終わりそうになってしまったから。

〇〇〇 私のメモにもあったのですけれども、言い出すのを忘れていました。ここはOでないにつながりませんね。というか、こういう形になりませんね。

本製品にもヘミセルラーゼのときと同様に、キシラナーゼの最終製品にはこの宿主由来のセルラーゼが含まれておりますが、この製品の場合、当該組換え体から見れば不純物ではあっても、実際にこの製品として利用する場合は有効成分とも考えられますし、また、もとの宿主の株の安全性は確認されていることから私は問題ないと思うのですが、先生方、いかがですか。この点はよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

ほかにございますでしょうか。

〇〇〇 先ほど出ました抗体の関係で、ヘミセルラーゼのほうはトックスバッチ、●●●と書いてありまして、キシラナーゼのほうは要旨の21ページなのですけれども、●●●とあります。添付資料の社内文書5なのですが、抗体は、●●●というような記載があるので、トックスバッチを用いた抗体と違うのかどうか聞いていただきたいと思うのですが、よろしいでしょうか。

〇〇〇 そうですね。トックスバッチが違うのと、あと、少々意地悪な質問かもしれないけれども、この単一に精製したタンパクを使って抗体を作ればこうはならないはずなので、そうはいかなかった理由があるのかなと。そのような感じのことも聞いてみようかと思うのですが、そういったことでよろしいでしょうか。

多分、きれいに精製するのが、分子量が近くて難しかったという理由ではないかと思えますし、そのようにきちんと説明していただければ私もいいかなと思うのですが、その辺のところを聞いてみたいと思います。

ほかによろしいでしょうか。

では、お呼びしていただけますか。

準備が整うまで休憩にいたします。

(休 憩)

〇〇〇 お忙しいところをお越しいただきまして、ありがとうございます。

自己紹介をお願いいたします。会社名とお名前だけで結構です。

〇〇〇 ノボザイムズジャパンの〇〇〇でございます。

〇〇〇 ノボザイムズの〇〇〇でございます。

〇〇〇 同じく〇〇〇と申します。

〇〇〇 今回の申請は、宿主もベクターも導入遺伝子座もみんな同じで、中身だけが違うというキシラナーゼとヘミセルラーゼの申請でございますので、2つまとめてお聞きしたいと思います。

まずは、どちらもペプタイボル合成系の遺伝子の中の●●●遺伝子のところに挿入しておるのですが、●●●という遺伝子はペプタイボル合成系の中のどんな遺伝子なのでしょう。つまり、初期のほうとか転写調節などの遺伝子であれば、全体が全くできなくなってしまうからいいのですけれども、変なところが壊れるとかえって有害な中間体も蓄積し得る可能性もございますので、この遺伝子を潰すことによってペプタイボル合成系にどのような影響があるのか情報をいただけるとありがたいのです。

〇〇〇 詳細は確認して書面で回答させていただきたいのですけれども、この遺伝子自体はBLAST検索をかけますと、文献上で回っているテックスワンという遺伝子のオルソログになりますので、そこから情報を再度確認して、回答させていただきたいと思います。

〇〇〇 中間体等々の蓄積がなさそうな遺伝子であるということさえ確認できればよろしいので、よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 AFUTP、キシラナーゼ、それぞれ純度検定は、たしかここでは申請書によりますとSDS-PAGEで行っておるといことです。これはほかに方法はあまりないのかということと、精度等については信頼のおけるものと考えてよろしいでしょうか。

〇〇〇 純度の確認につきましては、CBB染色像の画像の解析によるのですけれども、信頼性の確認という観点から申し上げますと、繰り返し実験での再現性の確認というところに主眼は置いているのですが、それ以上のことは逆にはできておりませんので、現状やらせていただいている方法は、今、申し上げたとおりになります。

〇〇〇 比活性等からもおおむね矛盾のない結果が得られておるのでしょうかということでもあるのですが、どうでしょうか。

〇〇〇 純度というのは、セルラーゼとかほかのタンパクも一緒に入っている中で、このタンパクのデンシティーでのみしか計算していませんので、それ以上のこととか、各々のタンパクの比活性であるとかを加味した計算ではなく、本当に流したままのSDSのクマシーの染色した濃さでしか見てはおりません。

〇〇〇 わかりました。だからといって安全性の担保に関して問題に直結するというわけではないのですが、少々お聞きしたかったものです。

では、それぞれの酵素単体についてもう一つお聞きしたいことがございまして、両方ともタンパクの分解性の試験を行っておりまして、それについてSDS-PAGEとウェスタンで見えております。ウェスタンで見えておるところでは、酵素そのものと、もとのツチアオカビ、*Tr. reesei*の生産するセルラーゼも両方ともこの反応をしておるのですが、これはどのようにこの抗体を作ったのか、酵素バッチの●●●、酵素バッチ●●●より作成とあるのですが、その辺のところをもう少し御説明いただけるとありがたいのです。

〇〇〇 今、御指摘いただいたとおり、抗体の作製に関しましては試験バッチのPPHから始まるバッチのタンパク質を粗精製しまして、それでウサギを使ってレイズしたものですので、本件のように目的遺伝子以外に収量の大きなタンパク質、今回はセルラーゼになりますけれども、こういった割合の大きいタンパク質が共存する場合には、どちらに対しても抗体ができてくるという形になります。ほかの案件で、例えばSDS-PAGE上はシングルでバンドが見えるような形で組換えタンパクのみを高収量に発現している場合は自然とそれに対する抗体しかできてこないという形になりますので、高度に純化精製したものを使ってレイズした抗体ではないという形になります。

〇〇〇 御事情もあるのかもしれませんが、それぞれ組換え体なわけだから、その遺伝子を使って純正にとることもできないこともないと思うのですが、それぞれヘミセルラーゼ、キシラナーゼに対する純化したタンパクについての抗体が使われていないのには何か理由がございましたのでしょうか。

〇〇〇 理由といたしましては、酵素製剤に含まれ得る全タンパク質の消化性を確認するという観点で抗体を作っておりますので、もちろん御指摘のとおり純化したタンパクで個別に見ることもできるのですけれども、含まれるタンパク質全ての消化性を確認するという意味で、抗体に関しては試験バッチの粗精製品を抗原に実施をしております。

〇〇〇 本件の場合は、目的のタンパク質の分子量から宿主のものと見分けることができますので、まあいいかとも思うのですが、こういうデータの場合は宿主だけについて消化酵素を反応させたものを流していただけると、宿主由来のタンパク質が途中で分解産物が出てそのバンドが重なるようなケースというのもございますので、それとこの場合だと見分けがつかない可能性もございますので、空のものとデータをお持ちなら結構なのですけれども、なくても直ちに安全性に問題が生じるということは少ないと考えるのですが、もしそういうデータをお持ちでしたら出していただけるとありがたいかと思えます。

先生方はほかによろしいでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 こっちの001のヘミセルラーゼのほうなのですが、`Tamg`というのが、*Aspergillus niger*由来ということで●●●短いが入っているのですが、有意に入っているのですよね。というのは、2つ比べるとよくわかってしまうのですが、2のほうは余分なものを入れてないのですけれども、001のほうは`Tamg`を●●●入れている、しかもバックボーンサイトではなくて今言った●●●のところになんか入れているので、

これは何か入れる必要があってこれが発現を左右しているのか疑問に思ったのです。

〇〇〇 これに関しましては株の製作者に確認をしたのですけれども、ターミネーターを選別している過程で残ったものをコンストラクトに最終的に含めたまま001株を作成したという情報が得られましたので、意図があって残したということではないと理解しているのですけれども、機能上、安全上問題がないという理解のもと削除しなかったという形で聞いております。

〇〇〇 恐らくそこは問題ないと思うのですけれども、これが何由来でどういう機能のものでという記載はどこにありましたか。

〇〇〇 5ページの表2のその他のところに、よくほかのコンストラクトでは用いています *A. niger* のグルコアミラーゼのターミネーターの切れ端なのですけれども、恐らく制限酵素が合わなくて切れ残ってしまったのだと思うのです。●●●という説明を受けました。

〇〇〇 わかりました。すみません。私はこのところ見落としていました。ありがとうございます。

〇〇〇 こちらの遺伝子に関してはタンデムで●●●コピーが入っているので、そのときの都合か何かなのでしょうか。

〇〇〇 恐らく。

〇〇〇 よくあることだとも思いますので、だからといって直ちに問題とは考えておらないのですが。

ほかに先生方、よろしいでしょうか。

ありがとうございます。これで終わります。

(説明者退室)

〇〇〇 それでは、審議のほうを再開したいと思います。もちろん個別の案件ではございますが、非常によく似た案件でもございますので、キシラナーゼの案件とヘミセルラーゼの案件、両方とも合わせて審議していきたいと思います。何かただいま申請者の答弁も含めまして、御質問、疑問点等ございますでしょうか。

私の印象では、組換え体としての個々のタンパク質についてはあまりきちんと詰めてはいないのかという印象ではあるのですけれども、添加物としての安全性ということを考えますと、私は安全性としては担保できているように考えます。

先生方はいかがでしょうか。両件ともよろしいでしょうか。

ありがとうございます。それでは、キシラナーゼの件、ヘミセルラーゼの件、両方とも問題ないということです。

それでは、安全上問題がないということでもありますので、引き続き評価書案の審議に入りたいと思います。評価書は1つずつお願いします。

〇〇〇 評価書案のほうを御説明させていただきます。

東の6ページから、まず、ヘミセルラーゼのほうから御説明をいたします。

「I. 評価対象添加物の概要」です。本添加物は、*Trichoderma reesei* QM6a株を宿主

として、*Talaromyces pinophilus* ATCC 36839株由来のアラビノフラノシダーゼ遺伝子を導入して作成したJPTR001株を利用して生産されたヘミセルラーゼ（アラビノフラノシダーゼ）である。本添加物は、アラビノキシラン中において、 α -1,2及び α -1,3結合を有する非還元末端のLアラビノフラノースを主鎖からエキソ型で加水分解する酵素であり、デンプン糖製造における収量向上を目的として使用される。

本生産菌には、選択マーカーとして、*Aspergillus nidulans*に由来するアセトアミダーゼ遺伝子が導入されているとしております。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」。第1の「1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料」です。

(1) 名称は、アラビノフラノシダーゼ (BakeZyme ARA 10,000)。基原は、*Aspergillus niger*です。

「(2) 製造方法」、「(3) 用途及び使用形態」、「(4) 摂取量」は記載のとおりです。

続いて、「2. 宿主及び導入DNA」。(1) 宿主は自然界から分離された *Trichoderma reesei* QM6a株である。先ほどの指摘を踏まえまして、評価書上もここは「*Tr. reesei*」とさせていただきますと思います。

(2) ですが、アラビノフラノシダーゼ (*afuTP*) 遺伝子の供与体は、*Talaromyces pinophilus* ATCC 36839株である。こちらは以降、「*Ta. pinophilus*」と表記させていただきます。選択マーカーであるアセトアミダーゼ遺伝子の供与体は、*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株である。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」です。*afuTP*遺伝子はアラビノフラノシダーゼ (AFUTP) をコードする。自身の野生型分泌シグナルを有し、AFUTPは菌体外に分泌される。

*amdS*遺伝子は、アセトアミドを分解するアセトアミダーゼをコードし、選択マーカーとして用いた。

*amdS*遺伝子を含む*afuTP*遺伝子発現カセットを、相同組換えにより宿主ゲノムの1つの遺伝子座に導入した。その際、導入遺伝子座において宿主遺伝子の欠失が確認された。

「3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料」、「4. 宿主の構成成分等に関する資料」は記載のとおりです。

「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) 製品名は、AFUTP。有効成分は、アラビノフラノシダーゼ。

「(2) 製造方法」ですが、AFUTPはJPTR001株を生産菌として、従来の添加物と同様に、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、2回の除菌ろ過により分離除去される。

「(3) 用途及び使用形態」です。AFUTPはデンプン糖製造の原料調整工程において、植物組織の細胞壁成分を分解することにより、デンプン糖製造時の収量を向上させること

を目的として使用される。AFUTPが全てのデンプン糖製造に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大1日摂取量は、0.004 mg TOS/kg体重/日と試算されている。

(4) 事前にお送りしたもののから記載の修正がございまして、該当箇所を下線にしております。AFUTPの有効成分は、従来のBakeZyme ARA 10,000と同じく、アラビノキシランの α 結合を非還元末端から加水分解するアラビノフラノシダーゼである。従来品は、 α -1,2、 α -1,3及び α -1,5結合を加水分解する一方、AFUTPは、 α -1,2及び α -1,3結合を加水分解する点で異なる。

「6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点」です。(1) AFUTPと従来のBakeZyme ARA 10,000との相違点は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なる点並びにアラビノキシランの α 結合を加水分解する際の反応特異性が異なる点である。

(2) JPTR001株と宿主との相違点は、JPTR001株には*afuTP*遺伝子が複数コピー導入され、AFUTP産生性を獲得している点、*amdS*遺伝子が導入されている点及び標的遺伝子座において遺伝子欠失が生じている点である。

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

「第2. 宿主に関する事項」。1. 宿主は*Tr. reesei* QM6a株である。「2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」は、*Tr. reesei*が病原性を有するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティーレベル1に相当する。

*Tr. reesei*は、カビが産生する抗生物質や抗菌物質を含む二次代謝産物の一種であるペプチン酸を産生し得る能力を有するとの報告がある。しかしながら、ペプチン酸は、貧栄養条件下で産生されるとの報告やこれらの知見に基づく米国EPAのリスク評価結果から、栄養素が豊富な産業利用においては、安全上の懸念は低いと考えられる。

なお、JPTR001株の作製過程において、ペプチン酸の一つであるパラセルシンの合成に関与する酵素遺伝子は欠失しているとしています。

「3. 寄生性及び定着性に関する事項」、「4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項」は記載のとおりです。

「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」ですが、*Tr. reesei*の近縁種にはヒトへの日和見感染が知られている*Tr. longibrachiatum*等やトリコテセンを産生し得る*Tr. brevicompactum*等が知られている。

「第3. ベクターに関する事項」は記載のとおりです。

第4の「1. 挿入DNAの供与体に関する事項」です。(1) *afuTP*遺伝子及び*amdS*遺伝子の供与体はそれぞれ*Ta. pinophilus* ATCC 36839株及び*A. nidulans* Glasgow野生株である。

「(2) 安全性に関する事項」です。*Ta. pinophilus*の食経験は知られていないが、*Ta.*

*pinophilus*が生産するバイオマス分解酵素及び二次代謝産物の食品産業への応用可能性が報告されており、また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティーレベル1に相当する。

*A. nidulans*の食経験は知られていないが、*A. nidulans*のアセトアミダーゼをコードする *amdS* 遺伝子は、選択マーカーとして長年利用されてきた実績がある。また、*A. nidulans* は国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティーレベル1に相当する。

「2. 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項」です。「（1）挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項」、「（2）塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項」は記載のとおりです。

「（3）挿入遺伝子の機能に関する事項」です。まず、*afuTP* 遺伝子についてですが、*afuTP* 遺伝子が発現するAFUTPは、アラビノキシラン中において非還元末端の α -1,2又は α -1,3結合を有するLアラビノフラノースを主鎖からエキソ型で加水分解するアラビノフラノシダーゼである。

a.ですけれども、*Ta. pinophilus*のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b.は、AFUTPを有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。*Ta. pinophilus*のヘミセルラーゼにおけるアレルギー誘発性の可能性を調べるため、文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

「c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見」です。（a）AFUTPの人工胃液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において試験開始後30分以内に分解されることが示された。

（b）人工腸液に対する感受性ですが、AFUTPの人工腸液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後6時間においても分解されないことが確認された。

（c）AFUTPの加熱処理に対する感受性について確認した結果、50℃30分で失活することが確認された。

d. AFUTPと既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

amdS 遺伝子の機能、安全性に関しては記載のとおりです。

以上のことから総合的に判断し、AFUTP及びアセトアミダーゼは、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

「3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現にかかわる領域に関する事項」

は記載のとおりです。

「4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」です。プラスミドpUC19に、宿主ゲノム上の標的遺伝子座への相同組換えに必要な配列並びに複数コピーの*afuTP*遺伝子及び1コピーの*amdS*遺伝子からなる遺伝子発現カセット等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクターpJPV007を作製した。

「5. 構築された発現ベクターに関する事項」は記載のとおりです。

「6. DNAの宿主への導入方法に関する事項」です。宿主ゲノムの標的遺伝子座に、相同組換えにより遺伝子導入用ベクターpJPV007の目的とする領域を挿入した。挿入領域に含まれる*amdS*遺伝子が付与するアセトアミド要求性を指標に形質転換体を選抜し、JPTR001株を得た。

「7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」です。遺伝子導入用ベクターpJPV007は、アンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムには導入されていない。抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことは全ゲノム解析により確認している。

「第5. 組換え体に関する事項」、「1. 宿主との差異に関する事項」です。JPTR001株は*afuTP*遺伝子発現カセットが導入され、導入遺伝子座において遺伝子欠失が生じている点で宿主と異なる。

「2. 遺伝子導入に関する事項」、「(1) 制限酵素による切断地図に関する事項」です。*afuTP*遺伝子発現カセットの宿主ゲノムへの導入を確認するためシーケンス解析を行った結果、標的遺伝子座に導入されていることが確認された。また、遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素切断地図は明らかになっている。

「(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項」です。導入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレームの有無を調べるために、導入DNAの5'近傍領域及び3'近傍領域を含む領域におけるORF検索を行った。その結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計260個検出された。これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDBデータベースを用いて、E-value<0.02を指標として検索を行った結果、2個のORFがデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれのタンパク質も毒性を有するとの報告はなかった。

「第6. 組換え体以外の製造原料及び製造機材に関する事項」は記載のとおりです。

「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」。AFUTPは米国で2017年にGRASとして認証され、フランスでは食品用加工助剤として安全性が確認されている。

「2. 組換え体の残存に関する事項」。ドットプロット分析により、AFUTP製剤中には組換えDNAが残存しないことが確認された。この点については、過去の評価書、申請書等も確認の上、後ほど記載ぶりに御相談をさせていただきます。

「3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」。AFUTPの製剤前の酵素サンプルは、JECFAの食品用酵素の規格値及びFCCの規定値を満たしている。また、製造原料は食品用酵素への使用が認められた品質のものが用いられ、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えにくい。

「4. 精製方法及びその効果に関する事項」。AFUTPは、生産菌の培養物を粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経て製造されるため、安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。なお、AFUTPは宿主由来のセルラーゼを含有する。

「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」は記載のとおりです。

第8、第2から第7までの事項により、安全性の知見が得られている。

ヘミセルラーゼの評価書案の説明は以上です。

続いて、キシラナーゼの評価書案の御説明に移ります。

24ページを御参照いただきまして、「I. 評価対象添加物の概要」です。本添加物は *Trichoderma reesei* QM6a株を宿主として、*Talaromyces leycettanus* CBS 398.68株由来のキシラナーゼ遺伝子を導入して作製したJPTR002株を利用して生産されたキシラナーゼである。本添加物は、キシランの1,4-β-D結合をエンド型で加水分解する酵素であり、デンプン糖製造における収量向上を目的として使用される。本生産菌には選択マーカーとして *Aspergillus nidulans* に由来するアセトアミダーゼ遺伝子が導入されている。

「II. 食品健康影響評価」。第1の「1. 従来 of 添加物の性質及び用途等に関する資料」です。(1) 名称はキシラナーゼ (Pentopan 500 BG)。基原は *Humicola insolens* です。

「(2) 製造方法」、 「(3) 用途及び使用形態」、 「(4) 摂取量」は記載のとおりです。

「2. 宿主及び導入DNA」。(1) 宿主は自然界から分離された *Tr. reesei* QM6a株である。

(2) キシラナーゼ (*xynTL*) 遺伝子の供与体は *Ta. leycettanus* CBS 398.68株である。選択マーカーであるアセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子の供与体は、*A.nidulans* Glasgow 野生株である。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」です。*xynTL*遺伝子は、キシラナーゼ (XYNTL) をコードする。自身の野生型分泌シグナルを有し、XYNTLは菌体外に分泌される。

*amdS*遺伝子は、アセトアミドを分解するアセトアミダーゼをコードし、選抜マーカーとして用いた。

*amdS*遺伝子を含む *xynTL*遺伝子発現カセットを相同組換えにより宿主ゲノムの1つの遺伝子座に導入した。その際、導入遺伝子座の宿主遺伝子の欠失が確認された。

3.及び4.については、ヘミセルラーゼと同様なので省略をいたします。

「5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」です。(1) 製品名はXYNTL、有効成分はキシラナーゼです。

「(2) 製造方法」ですが、XYNTLは、JPTR002株を生産菌として従来の添加物と同様に培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、2回の除菌ろ過により分離除去される。

「(3) 用途及び使用形態」です。XYNTLは、デンプン糖製造の原料調整工程において、植物組織の細胞壁成分を分解することにより、デンプン糖製造時の収量を向上させることを目的として使用される。XYNTLが全てのデンプン糖製造に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大1日摂取量は0.004 mg TOS/kg体重/日と試算されている。

「(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較」。XYNTLの有効成分は従来のPentopan® 500 BGと同じく、キシランの1,4-β-D結合を特異的に切断するキシラナーゼであるが、XYNTLはPentopan® 500 BGと比較して酸性領域での活性が高い。

「6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点」です。(1) XYNTLと従来のPentopan® 500 BGとの相違点は、構造遺伝子の基原が異なる点及びXYNTLはPentopan® 500 BGと比べ、高温及び酸性領域で高い活性を示す点である。

(2) JPTR002株と宿主との相違点は、JPTR002株には*xynTL*遺伝子が導入され、XYNTL産生性を獲得している点、*amdS*遺伝子が導入されている点及び標的遺伝子座において遺伝子欠失が生じている点である。

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

「第2. 宿主に関する事項」、「第3. ベクターに関する事項」はヘミセルラーゼと同様なので説明は省略いたします。

第4の「1. 挿入DNAの供与体に関する事項」です。(1) *xynTL*遺伝子及び*amdS*遺伝子の供与体はそれぞれ*Ta. leycettanus* CBS 398.68株及び*A. nidulans* Glasgow野生株である。

「(2) 安全性に関する事項」。*Ta. leycettanus*の食経験は知られていないが、高い耐熱性を有することから、産業上有用と考えられる酵素遺伝子がクローニングされ研究されており、また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティーレベル1に相当する。*amdS*遺伝子の説明は省略をいたします。

「2. 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項」、「(1) 挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項」。*xynTL*遺伝子及び*amdS*遺伝子はそれぞれ*Ta. leycettanus* CBS 398.68株及び*A. nidulans* Glasgow野生株のゲノムからPCRにより得られた。

(2) *xynTL*遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」。①*xynTL*遺伝子についてですが、*xynTL*遺伝子が発現するXYNTLは、キシランの1,4-β-D結合を特異的に加水分解するキシラナーゼである。

a. *Ta. leycettanus*のアレルギー誘発性の可能性を調べるため、文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. XYNTLを有効成分とする酵素製剤についてアレルギー誘発性を示唆する報告はない。*Ta. leycettanus*由来のキシラナーゼにおけるアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

「c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見」です。(a) XYNTLの人工胃液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において試験開始後2分以内に分解されることが示された。

(b) XYNTLの人工腸液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において試験開始後6時間においても分解されないことが示された。

(c) XYNTLの加熱処理に対する感受性について確認した結果、80°C30分で失活することが示された。

d. XYNTLと既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

②*amdS*遺伝子の機能等に関する説明は省略します。

「3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」から、次のページの一番下段「7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」までについては、ヘミセルラーゼと同様なので説明は省略いたします。

「第5. 組換え体に関する事項」、「1. 宿主との差異に関する事項」です。JPTR002株は*xynTL*遺伝子発現カセットが導入され、導入遺伝子座において遺伝子欠失が生じている点で宿主と異なる。

「2. 遺伝子導入に関する事項」、「(1) 制限酵素による切断地図に関する事項」です。*xynTL*遺伝子発現カセットの宿主ゲノムへの導入を確認するために、シーケンス解析を行った結果、標的遺伝子座に導入されていることが確認された。また、遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素切断地図は明らかになっている。

「(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項」です。導入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレームの有無を調べるために、導入DNAの5'近傍領域及び3'近傍領域を含む領域におけるORF検

索を行った。その結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計213個検出された。これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとしてDer p 15が検出された。ここの記載については、御相談をさせていただきたいと思いますが、原案では、Der p 15はノミのキチン分解酵素であり、C末端領域との相同性が示されたが、連続する8アミノ酸以上の連続一致は認められずアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられたとしております。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDBデータベースを用いて、E-value<0.02を指標として検索を行った。その結果、3個のORFがデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれのタンパク質も毒性を有するとの報告はなかった。

「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」、「第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項」、第8については、先ほどのヘミセルラーゼと同様なので説明は省略をさせていただきます。

評価書案の説明は以上です。

○○○ 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、コメントを賜りたいと思います。

アレルゲンに関する記述等々は、後ほど事務局のほうで修正の上、御指摘をいただいた先生と私のほうで確認して手続に入りたいと思いますが、ただいまの説明につきまして、御質問、御指摘等ございますでしょうか。

○○○ 一応念のためですけれども、2つとも関係するのですが、例えばヘミセルラーゼのほうに行くと9ページの154行から157行のところですが、ここは*Trichoderma longibrachiatum*とか*Trichoderma brevicompactum*とかと出てくるのですけれども、どちらも「Tr」になりますので、修正するのであれば統一して修正するようにお願いします。

○○○ ほかにございますでしょうか。

どうぞ。

○○○ 01のほうのお話なのですけれども、先ほど私が言ったところなのですが、挿入DNAのところで言ったときに、申請者側から`Tamgが「その他」という格好で書かれているのですけれども、相当記憶が失念しているのかよく覚えていないのですけれども、評価書の記載において、例えばマルチクロニングサイトとか挿入DNAに書くかどうかということをお話したようなことがあって、そういうのを書き始めたら*Escherichia coli*由来どうたらこうたらとかそんなことまで書くことになるから、評価書の形としてはターゲットとして見たものが何かというのがすっきりわかる形でということで、そういうものは記載しないという議論が私の頭の片隅にうろ覚えですけれどもあるので、ここでも評価書のほうとしてはその他とかそんなことは書かずに、実際の評価の上では先ほどの議論にもあった

ようにちゃんと評価しましたけれども、評価書としてはわかりやすくするために無駄なことは書かないということもここにおいても踏襲して、今後もそれで踏襲していただければと私は希望するのですが。

〇〇〇 私も特にそういうことまでごちゃごちゃ書かなくてもよろしいかと思ひますし、どうしても気になるということであれば、これはたしか*A. nidulans*由来のスペーサーということでもよろしいかと思ひますので、この場合は遺伝子を組むときの都合で入っているスペーサーと考えてよさそうなので、そういう言い方でよろしいかと思ひます。いいですよ。

ほかに先生方いかがでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 事務局から御相談と申しますか、先ほどの既知のアレルゲンとの相同性が見られたORFの考察の記載ぶり、申請書も評価書も含めなのですが、この場で御議論いただきたいのは、そもそもアレルゲンあるいは毒性タンパク質と新たに生じたORFとの相同性というのは、ORFがタンパク質として翻訳され発現する可能性を考慮して、相同性を示したアレルゲンであったり、毒性タンパク質の安全性の評価をさせていただいていると認識しておりますので、この部分をORFとして発現する可能性は低いとか発現したタンパク質が含まれる可能性が低いというところでの考察でまとめてしまうと、何とヒットしても問題ないという話にもなり兼ねませんので、この部分はいま一度御議論いただけるとありがたいのですが。

〇〇〇 〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 今回のキシラナーゼのほうの第5-2-2の2段目の書き方で、私は従来と同じような書き方になってきているので特に問題はないのかと思ひたのですが、申請書の書き方が引用した文献の書き方というのに問題があったとは思ひますが、評価書のほうの表現は。

〇〇〇 評価書の何ページの何行目のあたりですか。

〇〇〇 31ページの320~323行目です。Der p 15はノミヤダニだと思ひますが、その後はこういう書き方でよろしいのかと思ひたのです。

〇〇〇 〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 80アミノ酸以上の配列35%以上というのと8アミノ酸以上の連続一致は、少なくとも両方満たす同等の意義があるだろうと解釈すべきなのではないかと、両方満たすべきなのではないかと思ひるので、片方が大丈夫だから大丈夫だとは言えないのではないかと思ひます。

〇〇〇 今までの書き方ですと、一致するところがあるけれども、一致するところがエピソードになり得るところではないということも根拠として書いていただいたり、先ほどお話があった環境アレルゲンだということも理由にした例もたしかあったと思ひます。多分環境アレルゲンということも根拠として書いたときに詳細な御議論はなかったのですけれど

ども、そもそも環境アレルゲンとして問題がある場合も混入の可能性が低ければいいのではという先ほどあったお話などが文章上はないけれども頭にはあって、そういう書き方になったのかもしれないと伺いながら思いました。今までの事例としてはそのようなものがあつたかと思ひます。御参考として申し上げておきます。

〇〇〇 ここはオープンリーディングフレームとして実際にタンパク質として発現する可能性が低い点と人工胃液等で速やかに分解される点を加味して、アレルギー誘発性を維持する可能性は低いといったように記述してよろしいかと私は考えるのですが、先生方はいかがでしょう。

〇〇〇 これはもともと食品添加物ですので、植物だったら多分通らなくて、交差性をやってくれという話になってメーカーは泣きを見るという話になるわけですがけれども、添加物の場合はならないということを考えると、ある程度食べるものは素性がきちつとわかつていて、しかもORFですので発現する可能性も非常に少なく、最終産物中に残つて出てくる可能性もほとんどないという複合的な要因で、アレルゲンとしての可能性は否定できないけれども、消化性とかいろいろ考えた上で、実際の問題としてアレルゲン性として問題になる可能性は非常に少ないという書き方でいくしかないのかとは思ひました。

〇〇〇 実際のところ、確かにこれは添加物ですから、これでアレルギーの患者が出る可能性があるかというところもまた非常に低いと思ひますので、議論としては〇〇〇に御指摘いただいたような議論でよろしいかと思ひます。

どれとどれを使って評価書を書くかということにもなるのですが、そこはお任せしてよろしいですか。

〇〇〇 先ほど申し上げましたような過去の書き方というのもありますのと、今の御議論では、添加物の場合は植物と違つてそのものを食べるわけではないので、例えば植物の場合よりは条件がそろつていなくてもいいのではというお話もありましたので、過去の事例の書き方を参考にしてこちらで文案を考えさせていただいて御相談をさせていただければと思ひますが、それでよろしいでしょうか。

〇〇〇 そのために最大摂取量の可能性等々が議論されておるといふこともありますので、その辺、御検討いただければと思ひますが、先生方、この件につきまして御意見ございますか。

どうぞ。

〇〇〇 一応確認です。環境アレルゲンとして認識されているのはいわゆる吸入されるということがメインだと理解しているのですがけれども、そういうものと口から摂取して消化されるというところで、ちよつと違ふものとして扱えるのではないかと思ひているのですが、そのところの一番最初の前提のところはそれでいいのかなかといふことを御確認いただければと思ひます。

〇〇〇 〇〇〇。

〇〇〇 吸入性のアレルゲンであっても、既にそれに対して感作をされている人が交差性

のあるものを食したときにアレルギーを誘起する可能性があるということで、感作のされ方としては食物だけではなく吸入でも起きるということもあるので、アレルゲンとしては広く相同性は環境アレルゲンも食物アレルゲンも評価の対象にしてきたというような経緯があると思います。

〇〇〇 だけれども、食物アレルゲンの場合は直ちに消化液に触れて分解される点が環境アレルゲンとの違いでもあるのですけれども、この場合は環境アレルゲンとしては感作される可能性があり得るものであっても、食品として摂取されるとこれは直ちに分解されるわけですから、そうであればさらに可能性が低くなりますという議論だったと思うのです。

〇〇〇 直ちに分解されるかどうかはオープンリーディングフレームのものは調べていないわけなので、わからない。

〇〇〇 そうなのです。

〇〇〇 直ちに消化酵素に触れることには変わりないとは思いますが、粘膜等に接触するものとの差はそこかと思うのです。

〇〇〇 口腔アレルギーを起こすこともありますので、そこは言い切れないのですが、比較するアレルゲンを今までは環境と食物とを余り分けてはいなかった。ただ、事実としてこれは環境アレルゲンであるという表現はよくってはいたと思うのです。

〇〇〇 教えていただきたいのですが、環境アレルゲンと食品アレルゲンは、由来以外に根本的に違うところは何かあるのですか。

もちろん食品に由来するものとダニだの何だの環境の中にあるものに由来するものという由来の違いはあるのはわかりますが、それ以外に環境アレルゲンと食品アレルゲンとの違いというのは、これは専門の先生に教えていただきたいのですけれども、どのように認識しておけばよろしいものなのでしょうか。

〇〇〇 先ほどもお話ししたように、ダニが小麦粉の中に入っておって、それで作ったお好み焼きを食べて食物アレルギーになるということは事実としてあるわけですので、それが食物であろうがなかろうが食べてアレルギーを起こしてしまうわけですので、そういうアレルゲンは排除しておかなければいけないというのがスタンスだと思います。今回問題になっているタンパクに関していえば、少なくとも遺伝子産物を消化して流したところ、目に見えなかったわけですから、それとか量の問題とか消化性の問題とかオープンリーディングフレームであって可能性が低いということとか、それも複合して書いていただくのが一番筋が通っているのではないかと、〇〇〇がおっしゃるようだと思います。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 先ほど〇〇〇がおっしゃったとおり、植物でしたらというお話でいったときにこれは加工助剤なのです。ですから、として口に入るものであるデンプン糖はその前に精製されているということもひとつ考えて見たときに、人の口にこれが入ってくるリスクというのはものすごく低いだろうということも植物と違うのですということに加味していいのではないかと私は思います。

〇〇〇 そもそもそういう議論で添加物の場合は基準が多少甘くなっているというか、そこまで厳密に言わなくても安全性は担保できるという理論で今までやってきていたと考えられますし、それで事故も報告されていませんので、そういう考え方でよろしいかと思うのです。

実際、書きぶりが余りに長々とあれもこれもあってと全部書くのも何なので、どこを主眼に書いていったらいいのか、今回書きぶりが決まると毎回多少苦心しているいろいろな書き方をしておるのですが、似たような案件の場合はこう書けばいいという、ここでは少し議論して決めておいたほうが良いように思うのです。

〇〇〇 今の御議論を踏まえて、今後も類似の案件に使えるような案文を事務局のほうで考えさせていただいて、御相談させていただきます。

〇〇〇 関係の先生と私とで、確かに今まで環境アレルゲンという言葉を使ったりとか分解といういろいろな言葉を使って少々触れていたようにも思いますので、この際こういうときにはどのようにして説明するかという外部への説明の仕方も定めていきたいと思いません。先生方に御相談させていただきますので、御協力をお願いいたします。

ほかにございますでしょうか。

それでは、ただいまの議論も含めまして、いただいた修正等についてはまた修正して議論した後で確認して食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

それでは、議題1についてはこれで終わりたいと思います。

議題2ですが、ありますでしょうか。

〇〇〇 時間も差し迫ってまいりましたので手短に。前回の専門調査会の「CIN株を利用して生産されたキモシン」の審議の際に、〇〇〇から御指摘をいただいております「組換え体の遺伝子導入に関する事項」における「制限酵素による切断地図に関する事項」に関して、事務局にて整理を行いましたので、今日この場で御審議をいただきたいと思いません。

机上配付資料3、17ページをご覧くださいと幸いです。「遺伝子組換え添加物の生産宿主における導入DNAの構造等の確認方法について」ということで整理ペーパーを作らせていただいております。まず、「1. 経緯」ですけれども、先ほども御紹介したとおり〇〇〇のほうから「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」の第5-2-(1)で制限酵素による切断地図に関する事項を明らかにすることを求めているものの、CIN株を利用して生産されたキモシンについては、宿主ゲノム上の挿入遺伝子の構造がはっきりわかっておらず、サザンブロッティングのプロファイルもない。他方でNGSによるデータが提出されているのだけれども、組換え体の遺伝子導入に関する事項が明らかになっていると、このデータをもって認めて差し支えがないか整理が必要だという御指摘をいただいております。

御参考までに、下に参考1として評価基準の抜粋を記載しておりまして、評価基準上は

宿主に導入されたDNA断片について、切断地図が明らかにされていること。なお、この場合、用いた制限酵素の名称、断片の数、サイズ及びサザンブロットィング解析パターンが明らかにされていることを求めています。

この指摘に対しまして、〇〇〇、〇〇〇より次のような見解が示されました。まず、微生物はゲノムが小さく繰り返し配列も限られているため、NGSによって全ゲノムを把握することは容易となっていることからNGSのデータをもって遺伝子構成を担保できたと考えてもよいのではないかと。タンデムリピートに対する解析の限界から必ずしもNGSのほうがサザンブロットィングよりも得られる情報量が多いとは限らないが、NGSで意図しないDNA断片が挿入されていないことを担保することは可能である。添加物の場合は食べるもの、つまりタンパク質の性質が明らかになっているのでコピー数が明らかにならなくても安全性評価の上では問題とはならない。ただし、組換え体そのものを食べるような、要は微生物そのものを食べるようなケースが出てきた場合は慎重な検討が必要だろう、といったコメントをいただいております。

これらを踏まえまして、「2. 整理」としまして、事務局のほうで整理を行いましたので御説明をいたします。

まず(1)ですが、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」の第5-2-(1)において導入DNAの制限酵素による切断地図を明らかにすることを求めているのは、特定の制限酵素処理によるサザンブロットィングの解析パターンにより、組換え体における導入DNAの構造等の推定が可能であるからである。

したがって、NGS解析により得られた挿入領域のマッピングデータが、サザンブロットィング解析パターンと同様に、組換え体における導入DNAの構造等を推定し得る情報であると考えられるのであれば、必ずしも導入DNAの制限酵素による切断地図や、サザンブロットィング解析パターンを明らかにすることを求める必要はないものとして整理して差し支えない。

なお、遺伝子組換え植物や遺伝子組換え微生物など「組換え体を食べる」ものについては評価基準においても遺伝子組換え添加物に比べてより精緻な情報を求めています。サザンブロットィング解析によらずNGS解析によって検証が行われている場合には、これらが十分に明らかにされているか否か慎重な検討が必要、としております。

参考までに、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」の抜粋を参考2として記載しておりますが、ご覧のとおり、塩基配列等を明らかにすることであるとか、例えば挿入DNAの近傍のDNA配列も明らかにした上で、その挿入によって宿主の遺伝子配列の変化が生じる可能性がないことを可能な限り明らかにすることといった詳細な情報を求めています。したがって、もともと評価基準の上でも組換え体を食べる植物、あるいは微生物の評価基準でも同様の記載となっておりますが、それらと遺伝子産物を食品製造に利用する添加物とは、ここで求める情報の量というのはもとより異なっていることから、扱いに差異が生じても合理的と言えるだろうと考えております。

この整理に基づきまして、「3. 今後の対応」なのですが、添加物の評価に当たってはの話ですけれども、(1) サザンブロットィング解析によらずNGS解析等により組換え体における導入DNAの構造等を推定する場合にあっては、申請書の制限酵素による切断地図に関する事項には、NGS解析の条件、例えばリード長であったり冗長度であったりといった情報に加え、参照情報として挿入領域におけるマッピングデータを示した上で、NGS解析により確認し得た情報、例えば推定される導入DNAの構造やコピー数、意図しないDNA断片の挿入有無等の記載を求めることとしたいと思います。

なお、繰り返し配列等により、挿入領域の塩基配列が決定できない場合には制限酵素による切断地図は明らかになっていないが、NGS解析や必要に応じてその他の解析を組み合わせることによってサザンブロットィング解析と同様に組換え体における導入DNAの構造等を推定可能な情報が得られている旨の考察を申請者によって記載をしてもらうということを求めることとしたいと思います。

それから、これまで安全性評価をいただく中でNGSのデータが提出されていた場合は、個別にリード長とか冗長度の情報を確認して、その信頼性を確認してきたところですが、(2) 今後NGS解析によって宿主ゲノム上の導入DNAの構造と明らかにする上での信頼性に関するクライテリアについて、例えば評価対象が植物であるのか微生物であるのか、評価の目的、要は組換え体を食する食品であるのか遺伝子産物を食する添加物であるのかといったことの別によって検討を行って、先ほど御説明した取り扱いの整理と併せて、評価基準の見直しであったり、あるいはNGS解析等に関するガイダンスの作成を行うこととしたいと思っております。

机上配付資料3の説明は以上です。

〇〇〇 ありがとうございました。

組換え遺伝子がどのように組み換えられているかの情報が欲しいわけですが、従来はほかに有効な手段がないということもありまして、サザンハイブリダイゼーションのデータを要求し、制限酵素切断地図を明らかにすることを求めてきたわけですが、技術は日進月歩でして、ほぼ同等のデータは次世代のシーケンサーで得られるようになってきている。この時代に対応していくという趣旨でございます。

ただいまの事務局からの説明に御意見、コメント等ございましたら、お願いしたいのです。次世代シーケンサーにも繰り返しに弱いとか弱点はあるわけですが、この点については組換え体そのものを食品にするような植物とかそういう微生物が出てきた場合と従来の添加物の場合とは別に考えるということで、現状の少なくとも添加物に使う微生物のようなものについては、私は次世代シーケンサーで申請者側が提供してくるデータで十分に必要なデータは確保できると考えるのですけれども、先生方はいかがでしょう。

特に御異論はないようですので、今後はこの整理に従って申請書の記載を求めたいと思います。次世代シーケンサーのデータの信頼性に関するクライテリアにつきましては事務局にて検討に向けて準備作業をお願いいたします。また、その場合、例えば冗長度が幾

つ以上あるとかということ明記してしまうと、それがひとり歩きすることにもなり兼ねませんので、そういうことは避けていただくようお願いしたいと思いますが、準備作業をお願いいたします。ほかに何かございますでしょうか。

〇〇〇 実は、本専門調査会の担当委員であります〇〇〇が今月をもって御退任されることになっておりますので、この場で御挨拶を頂戴できればと思います。

〇〇〇 長らく先生方の楽しい議論を聞かせていただいたのですが、やっと卒業させていただけるということになりました。本当に特にこの調査会は活発な議論があって楽しく過ごさせていただきました。

本当にこれまでどうもありがとうございました。

〇〇〇 ありがとうございました。議論が煮詰まったところとか先生がずっと出てきてくださるので、いてくださらないとちょっと不安なのですが、本当にお世話になりました。メンバーを代表して御礼申し上げます。

本日の議題についてはこれで終了しました。

以上をもちまして、第176回「食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

お疲れさまでした。