

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第188回) 議事録

1. 日時 令和元年5月20日(月) 14:23~16:12

2. 場所 食品安全委員会大会議室(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

- ・JPBL003株を利用して生産されたβ-ガラクトシダーゼ
- ・GLU-No.10株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、岡田専門委員、小関専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、
近藤専門委員、吉川専門委員

(食品安全委員会)

川西委員

(事務局)

小平事務局次長、箆島評価第二課長、池田評価情報分析官、飯塚課長補佐、
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

- ①JPBL003株を利用して生産されたβ-ガラクトシダーゼ
- ②GLU-No.10株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム

6. 議事内容

○中島座長 それでは、皆さん、おそろいようですので、ただいまから、第188回「遺伝子組換え食品等専門調査会」、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」に基づいて非公開で行います。

本日、所用により、飯島専門委員、柘植専門委員、手島専門委員、樋口専門委員、山川専門委員は御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるJPBL003株を利用して生産されたβ-ガラクトシダーゼとGLU-No.10株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウムの安全性についての審議です。

お手元の資料を確認いたします。

では、事務局のほうからお願いいたします。

○飯塚課長補佐 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、食品健康影響評価に関する資料及び机上配付資料となっております。

なお、これら以外の参考資料については、ファイルにとじまして、委員の皆様の上机の上に置かせていただいております。本ファイルについては、調査会終了後、回収させていただきます、次回、また配付いたします。

不足等ございましたら、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JPBL003株を利用して生産されたβ-ガラクトシダーゼの申請者である、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。

○中島座長 それでは、事務局のほうから「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。

○飯塚課長補佐 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（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。

○中島座長 既に御提出いただいております確認書について、相違等ございませんでしょうか。

それでは、新規品目であるJPBL003株を利用して生産されたβ-ガラクトシダーゼについて、審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうから説明をお願いいたします。

○山口係長 それでは、御説明させていただきます。

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いたします。

冒頭で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書に対する質問事項等があれば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、JPBL003株を利用して生産されたβ-ガラクトシダーゼと記載されております灰色の紙ファイルの御準備をお願いいたします。

まず2ページをお願いいたします。

第1、第1-1- (1) としまして、名称はβ-ガラクトシダーゼ。反応特異性はガラクトースを含む二糖中のβ-ガラクトシド結合を加水分解するものです。

(2) 製造方法ですが、基原が動物の場合は臓器から抽出して製造され、また、微生物の場合は生産菌株の培養液から抽出、除菌及び精製などの工程を経て製造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、既存のβ-ガラクトシダーゼは、乳製品中の乳糖含量を低減する目的で加工助剤として用いられます。

ヒトが乳糖を含む牛乳を摂取した場合、乳糖はヒト腸内のβ-ガラクトシダーゼによって加水分解されます。しかし、乳糖を分解できないことから、牛乳を摂取すると腹鳴、腹痛、嘔吐及び下痢などの症状を呈する乳糖不耐症者が数多くおり、そのような人が安全に牛乳を摂取できるように乳糖含量を低減した牛乳が製造されております。

3ページ、上に行きまして、使用形態としましては、原料である牛乳などにβ-ガラクトシダーゼを直接添加する方法が一般的で、また、乳糖低減化後の加熱処理によって、β-ガラクトシダーゼの反応は停止し、さらに酵素自身は失活します。

(4) 摂取量です。β-ガラクトシダーゼは乳製品の乳糖を分解する目的で使用されますが、galT1が全ての乳糖の分解に用いられ、かつ100%残存すると仮定して、我が国における体重1kg当たり1日最大摂取量の計算を行った結果、0.057 mgTOS/日/kg体重と算出しております。

続いて、第1-2、本申請品目における宿主等の項目でございます。

(1) 宿主の由来等ですが、*B.licheniformis* Ca63株でございます。

(2) 挿入DNAの供与体の由来についてでございますが、4ページをお願いいたします。表1に記載されているとおりでございますが、*galT1*遺伝子は*Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171株由来、*prsA*遺伝子は*Bacillus licheniformis* Ca63株由来です。

そのほかに分泌シグナル配列やプロモーター、ターミネーターについても、その性質とあわせて記載しております。

5ページに行きまして、(3) 挿入DNAの性質についてでございますが、こちらは図1に示しておりますとおり、●●●遺伝子座に対して*galT1*遺伝子発現カセットを挿入し、また、●●●遺伝子座に対して*prsA*遺伝子発現カセットを挿入しております。その際には●●●遺伝子を欠失しております。また、欠失導入用ベクターにより、さらに●●●遺伝子を欠失させております。

6ページに行きまして、上に図2というところで、用いた2つの遺伝子発現カセットの模式図というのを示しております。

続いて7ページでございます。「① DNA置換によって起こるDNA欠失」ですが、それ

ぞれの挿入領域でDNA置換が起こり、●●●遺伝子座以外の●●●遺伝子が欠失しております。なお、●●●遺伝子座では、●●●遺伝子座と●●●遺伝子座の間に位置する非コード領域にDNAが挿入されたため、遺伝子の欠失は起こっておりません。

また、JPBL003株作製のための●●●遺伝子座におけるDNA置換の結果、中間株作製段階における一連の遺伝子組換え操作により生じていた●●●遺伝子座の一部欠失は野生型の状態に戻り、かわって、当該操作により隣接している●●●遺伝子座に生じたDNA置換によりその一部が欠失して機能が失われております。その性質については表3に記載されているとおりです。

続いて「② 遺伝子機能を欠失させるために行ったDNA欠失」ですが、●●●遺伝子の機能を欠失導入用ベクターを用いて欠失させております。これは表4に記載したとおりでございます。

8ページをお願いいたします。「(1) DNAの挿入方法」ですが、宿主染色体へのDNA挿入は●●●遺伝子座にマーカー遺伝子を挿入後、遺伝子導入用ベクターに組み込まれたインテグラーゼによって挿入遺伝子等を宿主の染色体に導入し、生産菌としております。

その概要は9ページの図3、それから文章としては10ページに記載しているとおりでございます。

続いて11ページをお願いいたします。

「(2) DNAの欠失方法」ですが、まず「(1) DNA挿入時に起こるDNA欠失」です。目的遺伝子発現カセットを●●●遺伝子座に挿入する際、発現カセットの挿入により遺伝子座の●●●遺伝子は欠失しております。

「(2) 欠失導入用ベクターによるDNA欠失」では、欠失導入用ベクターを用いた相同組み換えにより、●●●遺伝子を欠損しており、これらの遺伝子欠失はセルフクローニングに該当いたします。

続いて1-3、12ページをお願いいたします。利用経験ですとか食経験に関する事項ですが、*B.licheniformis*は自然界に広く分布しており、動物や人間の食べ物の中にも存在しており、同種は長年にわたって食品や食品用酵素の製造に安全に使われてきた経験がございます。

1-4、宿主の構成成分等ですが、*B.licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質等を生産するという報告はございません。また、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のバイオセーフティーレベル2及び3には分類されておらず、病原体等のリスク群分類の1に分類されております。

第1-5ですが、こちらがGMの添加物の性質等についてでございます。

(1) は記載のとおりです。

(2) 製造方法の詳細ですが、こちらは13ページの図5に示したとおりでございます。培養液はろ過等の複数の工程を経て製品化されますが、生産菌は除菌ろ過により、生産物から分離除去されます。

(3) 用途等についてですが、これは既存のものとは変わりはありません。

(4) 有効成分等の比較につきまして、既存の β -ガラクトシダーゼと同様にガラクトースを含む二糖中の β -ガラクトシド結合の加水分解を触媒する酵素です。また、至適pHですとか温度は既存の β -ガラクトシダーゼと大きく異なっておりません。

14ページをお願いいたします。従来の添加物との相違点ということでございますが、まず(1)、本品目の販売実績ですが、海外では2年あり、既存のものは日本を含め世界各国で30年以上あるということです。そのほか、性質や反応特異性については記載のとおりです。

15ページに行きまして(2)組換え体と宿主の相違点ですが、JPBL003株では、*galT1*遺伝子が●●●、*prsA*遺伝子が●●●となっております。

続いて16ページをお願いいたします。第2でございますが、2-1では分類学上の位置づけについて記載しており、これまで生産菌として使用されてきた実績があるということでございます。

2-2から2-5については記載のとおりでございます。

続いて「第3 ベクターに関する事項」ですが、遺伝子導入用ベクターの構築には*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドであるpE194が用いられております。

続いて第3-2については記載のとおりでございます。

19ページをお願いいたします。第4の項目ですが、挿入DNA等に関する事項が記載されております。

1-(2) 安全性に関する事項でございます。

まず*B. bifidum* NCIMB 41171株でございます。*B. bifidum*はビフィズス菌の一種で、ヒト体内を含む自然界に広く分布し、食品中にも存在している微生物でございます。長年にわたる安全な食経験がある上に、当該菌種から病原性及び有害生理活性物質が生産されることは知られておりません。

B. licheniformis Ca63株については記載のとおりでございます。

続いて、*B. amyloliquefaciens* DSM7株でございますが、*B. amyloliquefaciens*は自然界に広く分布し、食品中にも存在している微生物でございます。長年にわたりノボザイムズ社の食品用酵素の生産菌として用いられてきた実績がございます。

続いて、*B. thuringiensis subsp. tenebrionis* DSM 5525株です。*B. thuringiensis*は、一般に昆虫に対して殺傷効果を示す結晶性のタンパク質を産生する微生物でございますが、このタンパク質がヒトに有害であることは知られておりません。また、この結晶性タンパク質は人体や環境に安全な微生物殺虫剤として広く使用されております。食品用酵素の生産菌として用いられたことはありませんが、この株由来の*cryIII A*プロモーター及び*cryIII A*mRNA安定化配列は食品用または工業用を問わず、遺伝子組換え技術を用いて酵素の生産菌を構築する際に長年ノボザイムズ社で用いられております。

20ページをお願いいたします。続いて*Bacillus clausii* PP159株です。*B. clausii*は、EFSA

が提供する安全性適格推定ステータスに認定されており、安全面に懸念がないとされております。食品用酵素の生産菌として用いられたことはないというのですが、この株由来の*aprH*ターミネーターは食品用または工業用を問わず、遺伝子組換え技術を用いて酵素の生産菌を構築する際に長年用いられているということでございます。

最後にLactococcal bacteriophage TP901-1株です。こちらは乳酸菌に溶原することが知られており、乳酸菌とともに食経験がございます。

続いて、4-2- (1) といたしまして、挿入遺伝子の合成方法に関する事項です。*galT1* 遺伝子は*B.bifidum*が有するβ-ガラクトシダーゼの遺伝子配列をもとに合成し、*B.clausii* 由来の*aprH*遺伝子の分泌シグナル配列が付加されております。

*prsA*遺伝子はCa63株の染色体よりPCRによって増幅することで得ております。

(2) については記載のとおりです。

続いて21ページをお願いいたします。4-2- (3) 挿入遺伝子の機能に関する説明になります。ここで済みません、事務局から今日お渡しした資料の一番最後に机上配付資料というのがございます。こちらは児玉先生から御意見もいただいたことも含めまして申請者に連絡をとり、事前に提出していただいたものです。

21ページのところ、本文のほうは大体同じことが書いてあるのですが、まず図7としましてアミノ酸配列。もともとの●●●で切れていましたので、これの全長を記載してもらおうように修正しました。また、この図7のアミノ酸の数の下のところに色でいろいろ小さな字で記載されていますが、これがドメイン構造別に分けてもらったものになります。

机上配付資料の2枚目のほうがそれを補足するための説明資料になります。2つ、A、Bということで、*galT1*と*Bacillus circulans*由来のβ-ガラクトシダーゼのドメイン比較ということで、結論としては参考情報の2パラグラフ目からなのですが、*galT1*遺伝子からコードされる*galT1*のアミノ酸配列は既存のβ-ガラクトシダーゼの製品の生産菌である*Bacillus circulans*由来のβ-ガラクトシダーゼと●●●アミノ酸長で●●●%程度の相同性を有しております。また、図1にお示したようにということで、*galT1*と*B.circulans*由来のβ-ガラクトシダーゼのドメイン比較を行ったところ、2つのタンパク質は同様のドメイン構成を有していることが明らかになっているというように記載してきております。

それでは、本文のほうに戻りまして、22ページをお願いします。

まず「1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見」ですが、*galT1*遺伝子の供与体である*B.bifidum*について、アレルギー誘発性を示唆する報告はございません。

「2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見」でございますが、遺伝子産物である*galT1*を有効成分とする酵素製品について、アレルギー誘発性を示唆する報告はないということでございます。なお、*B.bifidum*のβ-ガラクトシダーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるためにPubMedを用いて文献検索を行った結果、ヒットする文献は得られなかったということでございます。

ページ中ほど、15行目からが物理化学的処理に対する感受性試験でございます。

① 人工胃液でございますが、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで分析した結果、galT1は人工胃液処理後10分以内に完全に消化されることが示されたとしております。

なお、図8AのSDS-PAGEで観察された約5kDaのサイズ付近のバンドは、この自己消化産物と考えられたということでございますが、図8Bのウェスタンブロットでは検出されず、これは人工胃液処理によって免疫原性が喪失したためだと考えたということでございます。

22ページが人工腸液でございます。SDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した結果、6時間の処理ではほとんど消化されないことが示されたということでございます。

24ページに行きまして、加熱処理に対する感受性です。pH6.5、30分の条件で調べた結果、62℃付近で完全に失活することが示されたとしております。使用が想定される乳糖分解乳の製造プロセスでは、酵素処理後に加熱殺菌処理が行われるため、その工程で失活すると考えられるとしております。

4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンの構造相同性ですが、アレルギー誘発性の可能性を調べるために既知のアレルゲンとの相同性検索を行っております。

①として80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索、②として連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索という2つの条件で相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンは検出されなかったということです。

続いて、*prsA*遺伝子、25ページをお願いいたします。安全性でございますが、PrsAタンパク質のアレルギー誘発性及び毒性について示唆する報告はなく、既知のアレルゲンとも相同性検索を行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは検出されなかったということでございます。

続いて、第4-3、4-4、そして、4-5-（1）までは記載のとおりでございます。

少し飛びまして30ページをお願いいたします。目的外のORFの有無についてでございます。発現ベクター、pJPV013、pJPV014について、相同組み換えにより宿主に挿入される領域はそれぞれ明らかであり、挿入遺伝子座のシーケンス解析により確認されております。そのため、それらの全配列を対象としたORF解析は実施していないということです。宿主ゲノムと境界部位を含む遺伝子導入座位のORF解析については後ほど第5のほうで御説明いたします。

(3) (4) については記載のとおりです。

31ページ、第4-6でございます。●●●遺伝子座に対してそれぞれマーカー遺伝子発現カセットを挿入しております。*galT1*遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターpJPV013を菌体内に導入し、*galT1*の産生量が高い形質転換体を選択したところ、要旨に記載のある●●●遺伝子座に*galT1*遺伝子発現カセットが挿入されております。また、産生量を促進するために*prsA*遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターpJPV014を菌体内に導入すると●●●遺伝子座に*prsA*遺伝子発現カセットが挿入されております。

その下、15行目からが一つ一つの遺伝子座について細かく説明されております。

●●●ということでございます。

残りの遺伝子座についても32～33ページに記載しております。こちらは記載のとおりです。

34ページ、第4-7をお願いします。抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性でございますが、遺伝子導入用ベクター013及び014はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主の染色体には導入されません。また、●●●遺伝子座に導入されたマーカー遺伝子発現カセットにはネオマイシン耐性遺伝子が存在しますが、これはループアウトによって脱落し、したがって、生産菌JPBL003株には抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないということでございます。

続いて「第5 組換え体に関する事項」です。

5-1については記載のとおりでございます。

2- (1) でございますが、シークエンス解析について記載されております。

35行目にありますとおり、各サンプルについて最低50の冗長度を担保するため、約200～400万のリードが生成され、平均リード長は100以上であったということでございます。

続いて、少し飛びまして41ページをお願いします。5-2- (2) といたしまして、遺伝子導入におけるORFの有無について記載されております。6通りの読み枠で終始コドンと終始コドンに挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義して検索を行った結果、合計で約600弱のORFが検出される結果となりました。

これらのORFのアレルギー誘発性及び毒性の可能性を調べるために、42ページ以降で既知のアレルゲン及び毒性タンパク質の相同性検索を行っております。

まず42ページが既知のアレルゲンとの相同性検索です。

①及び②の2つの条件で検索を行った結果、②において1つのORFが生コーヒー豆に存在するアレルゲン、ここではCof a 1と記載されております。こちらと連続した8アミノ酸配列の1つと一致する結果となりました。

この該当したORFはgalT1をコードする*galT1*遺伝子の部分配列で、*galT1*遺伝子のORFとは逆方向の読み枠で検出された64アミノ酸長のORFであったということです。

生コーヒー豆については、その粉じんがコーヒー豆産業の従事者に職業性アレルギーに関連があるとして知られております。そのようなコーヒー産業従事者の中で鼻炎、結膜炎、またはその両方を患っている従事者の血清を用いて行った研究では、幾つかの血清でCof a 1に対して感作性が認められているということです。

しかしながら、*galT1*遺伝子からコードされるタンパク質のアミノ酸配列は80アミノ酸残基で35%以上の条件では、全ての読み枠で既知のアレルゲンとは相同性を示さず、また、Cof a 1のエピトープは同定されておられません。AFDSで登録されているアレルゲンエピトープと比較したところ、一致するアレルゲンエピトープは認められなかったということです。

以上のことから、仮にこのORFが転写・翻訳されたとしても、アレルギー性を有するとは考えにくいというようにしております。

続いて、43ページ、既知の毒性タンパク質の相同性検索でございます。

E-value、0.02未満を指標にして検索を行った結果、重複したのをまとめますと3つのORFがデータベース上のタンパク質と相同性を示す結果となりました。そのまとめた結果というのが44ページの表14にまとめられております。

ORF1では6つ、ORF2では3つ、ORF3では13のタンパク質の相同性を示しております。44ページ下からその考察になっておりますが、いずれの考察の結果もこの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しておりまして、結論が46ページの下になりますが、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製品中にアレルギー誘発性及び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しております。

第6といたしまして製造原料等に関する事項が記載されております。製造原料等は全て長年安全に使用された実績がある旨が記載されております。

48ページ、第7でございます。「遺伝子組換え食品添加物に関する事項」ですが、まず7-1、諸外国における認可等について記載しております。galT1を有効成分とする酵素製品、Sapheraは、欧米等で2016年に販売が開始され、従来のβ-ガラクトシダーゼと同様、食品中の乳糖を分解する目的で使用されております。カナダ、フランスではポジティブリストに収載されております。米国ではGRAS認定されているということでございます。

続いて「第7-2 組換え体の残存に関する事項」でございますが、ドットプロット解析によりましてgalT1製品にはJPBL003株由来のDNAが残存していないことというのが確認されております。

続いて50ページをお願いします。第7-3、非有効成分についての記載がこちらにあります。試験バッチの分析と我が国の食品、添加物等の規格基準に定める規格値をそれぞれ記載しております。いずれの項目についても我が国の規格基準というのを満たす結果となっております。

第7-4、7-5については記載のとおりでございます。

第8ですが、第2から第7までの事項により、安全性の知見が得られるとしております。説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして専門委員の先生方から御意見いただきたいと思っております。

では、まずベクターに関する事項、18ページくらいまででございますでしょうか。

どうぞ。

○児玉専門委員 2ページ目、3ページ目なのですがすけれども、従来のものがβ-ガラクトシダーゼで基原が細菌の場合は*Bacillus circulans*と*Streptococcus*属に限ると書いてあるのですけれども、今回は基原が*Bifidobacterium*になるのですが、これはどういう扱いになるのですか。

○池田評価情報分析官 先生がおっしゃっているのは1- (1) の基原のところですか。

○児玉専門委員 従来品のものは細菌由来の場合は *Bacillus* と *Streptococcus* に限ると書かれてあるので。

○池田評価情報分析官 大丈夫です。既存のものについてはこの範囲なのですが、新たにこれ以外に組換えで出てきた場合には、安全性の審査が終わったものについては対象としてここに入っていないなくてもオーケーという扱いになっています。

○児玉専門委員 *Bifidobacterium* もここに加わるということですか。

○池田評価情報分析官 ここに書かれなくても、遺伝子組換えに係る安全性の審査を受けたものについては、基原に係る定義が適用されない、つまり、ここに入っていないでもいいということになっていると思います。

○児玉専門委員 では、これ以外のものは、ここは文章が変わらないけれども、それ以外につけて加わるという形。

○池田評価情報分析官 はい。そういう扱いになっていたと思います。

○中島座長 今のでバクテリアの学名だから *B.* と省略するのはいいのだけれども、*Bifidobacterium* と *Bacillus* とまざって、初出のところは確かに2ページのところでは *Bifidobacterium*、*Bacillus* とスペルアウトしているのでルールどおりはルールどおりなのですが、そこから後、全部 *B.* になっていて、いささかわかりにくい。こういうのは前例がありますか。可能であれば、例えば *Bifidobacterium* だけ *Bi* とか、*Bacillus* は *Ba* とか何とかわかるようにしてほしいことはしてほしいのだけれどもね。

○山口係長 ここは両者の区別がつくように申請者のほうに連絡をとって修正してもらおうと思います。

○中島座長 できればそうしていただけると、*Bifidobacterium* の *Bi* とか何とか、*Bacillus* は *Ba* とか、たしかそういう感じで。

○児玉専門委員 前に一例あって区別するとき *Ba*、*Bi* にしましょうと。

○中島座長 *Ba*、*Bi* という感じだった。なので、今回も *Ba* と *Bi* がよろしいかなと思いますので。

それから12ページ、下から3行目、除菌ろ過はいいのだけれども、膜のサイズが $0.2\ \mu\text{m}$ になっていて、膜のサイズではなくて膜の穴のサイズのはずなのだが、これは多分凡ミスだと思うので、申請者に指摘して、多分そうだよねと思うので、お願いします。

挿入DNA等を含めまして、34ページまで含めましてございましたらお願いいたします。

21ページのアミノ酸配列が尻切れとんぼになっているものは差しかえていただいたものですね。

どうぞ。

○児玉専門委員 22ページの25行目でSDS-PAGEで観察された5kDaのサイズ付近のバンドはgalT1の自己消化物と考えられたがと書いてありますけれども、galT1はガラクトシダーゼで別に自己消化しないので、自己消化してしまったらペプチターゼになってしまうので、これは多分、部分分解物とか、自己消化にしないほしい。

○中島座長 少なくとも自己はおかしいですね。そこも多分指摘すれば、ごめんなさいと向こうも言うてくると思いますので修正をお願いします。

この辺、人工胃液、人工腸液等々については、本日欠席の手島先生あたりの御意見が欲しいところなのですが、来ていますね。事務局のほうから説明をお願いします。

○山口係長 きょう、手島先生と柘植先生のほうが御欠席というように連絡があったので、お二人に連絡を事前にとり、コメントをいただいております。

こちらは人工胃液の部分なのですけれども、ここと後々の42ページです。

○中島座長 では、そこになったときにまとめてお願いします。お二人からちゃんと御意見いただいておりますので、その辺については専門のお二人の先生がきょう御欠席ですけれども、意見を寄せていただいておりますので、それを聞かせていただけてということにしたいと思います。

ということなので、一番最後の35～51ページまで、全部含めまして御指摘、御意見等ございましたらよろしく願いいたします。

どうぞ。

○児玉専門委員 24ページの上から6行目の加熱処理のところ、乳糖分解乳の製造プロセスでは加熱滅菌処理が行われるため、失活すると考えられると書いてある。ここの加熱殺菌処理のときの想定温度は書いていただいて、それと見比べてちゃんと失活するねというのがわかるような感じで一応想定温度は書いていただければとは思っています。

○中島座長 これはpH6.5、もしかすると図10にあるそれぞれの温度でやったということなのかな。

○児玉専門委員 いや、これは市販される乳糖分解乳の製造過程で恐らく分解した後に加熱殺菌処理が行われるので活性は残りませんよという文章だと思うのですが、その実際の市販される乳糖分解乳のときの加熱殺菌の一応想定される温度というのはきっとあると思いますので、それと見比べて、それと対応させると失活していると考えてよろしいみたいな感じの文章のほうが説得力はあってよろしいかな。

○中島座長 ごもっともだと思いますので、これは申請者に連絡して、多分それはデータを持っているはずですので、お願いいたします。

35ページ、次世代シーケンズによるJPBL003株のゲノム解析で、シーケンズは最低50の冗長度を担保するため、200～400万のリードが生成された。サザンではなくて次世代シーケンサーの場合は一応目安があって、デプス75以上で継ぎ目、配列がちゃんと出てくることというのがあったようにも思うのですが、これは植物ではなくバクテリアですので単一ゲノムですから、私としては50も確保していただければ十分かなと思うのですが、先生方、いかがでしょうか。これはよろしいですね。ありがとうございます。

あとは最後の純度については明確な数字はいただいておりますが、galT1以外はほとんどなしといった感じの記述ではあるのですが、それでもいいかなと思うのですが、この点、いかがでしょうか。特に何かございますか。

どうぞ。

○川西委員 これは50ページに、表15に試験バッチの分析値及び我が国の食品、添加物等の規格基準に定める規格値、参考資料1を示すとあるのですけれども、この社内文書20というのを見てみると、データは7割方、黒塗り。意図することはわからないわけではないのですが、この部分は厚労省側がちゃんと見ているので、この資料では伏せたということでしょうか。この資料を出されると私は幾ら何でも、これは公開ではないですね。ここでの審議に使うということなのだけれども、これだけ徹底されるとどうなのかなと思う部分があるのですが、皆さん、ごらんになっていかがですか。社内文書20です。

キャラクタライズの方法、その分析値も全部、物の見事に黒塗りです。私自身は、これを厚労側で見ているのだったら、それは相互補完であり。だけれども、向こう側もこれでオーケーと言っているような話だったら、それでは、やはりまずいのではないかとは思いますが。

○中島座長 これはいかがなものかという感じですね。これについては、担当者が来ていますので、呼んでみて、我々にもちゃんと守秘義務がかかっているのだから、もう少し開示してもらわなければ困ると言って、そこが確認できたらオーケーということでしょうか。

○川西委員 はい。ここは製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項というところなので、だけれども、物のキャラクタライズを含めてちゃんとやっているというところは確認しないと、安全性の評価と言っても、我々はプロダクトの評価をしているはずだが、これだけ隠されてしまうと困ったものだと言わざるを得ません。

○中島座長 特にどこが問題。確かにこれだけ隠されるとと思いますけれども、特にどの項目のブラックが、プロテインキャラクタライゼーション6の6のあたり。

○川西委員 私の感覚だと、隠しているものは一応全部。もちろん、一般に公開する必要は全然ないことだけれども、これを審査といいますか、評価している人間は当然見せても別に何が困ると私自身は思います。

○中島座長 私も結構同じように思います。

先生方、いかがでしょうか。やはりこのぐらいはと。多分、言えば出してくると思うので、それを確認させていただいてということで、それは前提でもいいかなと思うのですけれども、その点はよろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、ほかにございますでしょうか。

どうぞ。

○児玉専門委員 結局、呼ぶ。

○中島座長 せっかくだから呼ぼうかとも思います。

○児玉専門委員 呼ぶのだったらそのときでいいと思うのですけれども、消化性テストのところを見ると●●●ので、あそこは一応ちゃんと聞いておかないといけないかなとはちよっと。

○橋田専門委員 ウェスタンでひっかかっているからということは、もとのデータを見れば書いていると思います。

○児玉専門委員 一応N末ぐらいを読んでいるのか、読んでいないのか、どう考えているのかというのは一つ聞いておきたい。

あと、こちらは文章の修正だけでよろしいので別に聞かなくてもいいと思うのですが、34ページの5行目ですが、最終的には染色体は残らないのですが、一旦は入って抜けるので、その下の*prsA*のほうはちゃんと書いてあって、挿入された後にループアウトで脱落すると書いてあるので、上の部分についても「導入されない」ではなくて、挿入された後にループアウトで脱落するという形の文章にしておいていただけると、全然これだと1回も入っていないみたいな形になっているようなので、そこはそのように直していただければと思います。

○中島座長 もっともだと思いますので、そういうように指摘していただけますでしょうか。

それでは、手島先生、柘植先生の御意見をお願いします。

○山口係長 それでは、申請書ですと42ページをごらんください。この部分を中心に、まず手島先生のほうからの御意見について紹介させていただきます。

本品目については、22～24ページに書かれております物理化学的処理に対する感受性に関する知見と既知のアレルゲンとの構造相動性に関する知見から考えて、アレルギー誘発性に対する可能性は低いと結論して問題ないと思われまますということでございます。

42ページ、検出されたORFと既知のアレルゲンとの相同性検索において、生コーヒー豆に存在するアレルゲンが検出されたということでございますが、これについてはコーヒー豆産業従事者のアレルギーに関連があると報告されておりますが、エピトープに関する報告はないということ。また、Cof a 1と一致した該当するORFの8アミノ酸配列はADFSにアレルゲンエピトープとして登録されている配列と一致しないとの申請者の報告があることにより、仮に転写翻訳されたとしても既知のアレルゲンとの交差反応性により、アレルギー誘発性を生ずる可能性は低いと考えてよいと思われまますということでした。

なお、細かい点ということなのですが、27～28行目の文章で、幾つかの血清でCof a 1に対して感作性が認められているという部分は正確ではないので、例えば幾つかの血清中、IgE抗体とCof a 1の結合が認められているというような記述が望ましいと思われまますということでした。

続いて、柘植先生のコメントについて御紹介させていただきます。今回の挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるORFとアレルゲンの相同性検索で検出されたCof a 1の8アミノ酸配列に関しては、アレルギー誘発性を生ずる可能性は低いと考えまますということでした。その理由について幾つか御説明いたします。

まず今回想定されるβ-ガラクトシダーゼの摂取量は最大3.16 mg/日ということございまして、摂取に至るタンパク質としてはごく微量だと考えられるということ。ADFSに

登録されているアレルゲンエピトープには含まれていないこと。それから、当該8アミノ酸がエピトープとしてもORF産物中では1価であり、アレルギー誘発は考えにくいということ。該当するORFは本来の*galT1*遺伝子のORFとは逆方向の読み枠であること。一つ一つの根拠は確定的とは言えないので総合して判断することになるのでしょうかということでございます。

○中島座長 ありがとうございます。

お二人ともアレルゲンに関してはそれほど心配しなくてもよいのではないかという御意見だと思います。かなり丁寧に考察していただいておりますし、また、内容から言ってお二人の先生方と私も御意見は同じなのですが、先生方、この点についてはいかがでしょうか。

あと手島先生の細かい点ですが、42ページ、27、28行目の記述について指摘がございしますが、私もごもっともだと思いますので、そこだけもう一回読んでいただけますか。多分、そのまま手島先生の指摘のとおり直していただくのがいいように思うのです。

○山口係長 もう一度、読み上げます。

まず該当箇所は27～28行目、「幾つかの血清でCof a 1に対して感作性が認められている。」この部分を「幾つかの血清中、IgE抗体とCof a 1の結合が認められている。」このように記載したほうが望ましいのではないかということでした。

○中島座長 手島先生のおっしゃるとおりかなと思いますので、そういうように直していただければと思います。

ほかにございますでしょうか。

どうぞ。

○岡田専門委員 50ページで先ほどお話が出ました社内文書20と関連しているのですが、社内文書20の10ページのところに●●●というように出ておまして、この50ページの最後の行には安全性に問題がある非有効成分などが含まれているとは考えにくいとあるのですが、●●●でもあるので、●●●というように書いてあると気にかかる気がいたします。

○中島座長 それは呼びますので、直接聞いてみていただけますか。

○岡田専門委員 はい。

○中島座長 この点について、では、ただいまの岡田専門委員の御指摘と川西先生のおっしゃったとおり黒塗りが多過ぎるという点、それから、児玉先生の消化性テスト、この部分分解物についてお聞きしたいかと思えます。ほかに思いついたことがございましたら、呼びますのでそのときに聞いていただければと思います。

では、申請者をどうぞ。

(休 憩)

○中島座長 それでは、皆さんおそろいでしょうか。ありがとうございます。

お忙しいところ、お越しいたきましてありがとうございます。説明者の方、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。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） ノボザイムズの高橋と申します。よろしくお願ひします。

○ノボザイムズジャパン株式会社（橋田氏） コンサルタントの橋田でございます。

○中島座長 それでは、申請書では50ページ、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項の中で規格基準に関する試験バッチの分析値というので社内文書20になって、その社内文書20を見るとあちこち黒塗りだらけですが、守秘義務がかかっているの、公開すべき情報は公開していただかないと困るのですが、その辺いかなものでしょうか。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） 社内資料の20は第7-3の項目についてのみのところだけ開示させておりましたが、やはり全部を黒塗りしているというのは不適當であるというように思いますので、開示させていただきたいと思ひます。

○中島座長 ありがとうございます。では、よろしくお願ひいたします。我々、守秘義務がかかっているの、こういう黒塗りはできるだけ避けていただきたいのですが、万やむを得ない場合以外、避けていただきたいと思ひわけなので、今後ともよろしくお願ひいたします。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） はい。今後出すものに関しましては黒塗りをしないようにいたします。

○中島座長 では、岡田専門委員のほうからどうぞ。

○岡田専門委員 1つお伺ひしたいのですけれども、同じく社内文書20の中で表の6の3というのが10ページにございまして、こちらの資料のほうでは50ページに相当するのですが、こちらの中で、まず●●●でしょうか。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） それは●●●となっています。

○岡田専門委員 ●●●ということはないのではないかと思ひたのです。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） それは●●●になっていまして。

○岡田専門委員 ●●●という意味ですか。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） そうです。確かにちょっとおかしいですね。これは本社に確認させて。

○岡田専門委員 特に気になりましたのが●●●、それはやはり何も問題がないというのは表現としてよくないのではないかしらと思ひました。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） ●●●に関しましては確認させていただきまます。また、一応今回、第7-3で掲載させていただいているのが食品衛生法の食品添加物の規格基準に載っている項目でして、●●●も弊社のほうの中での試験では項目に載っておるのですが、食品衛生法のほうでは載っていないので、まず第7-3のほうには掲載しなかったというところでは。

一応、試験をしているのは基本的に酵素をつくる生産菌の一番濃縮物になっておりまして、生産過程の中でも濃いものをやっております。ですので、生産物になるともう少し薄まって、これもかなり薄まってくるというところもあるとは思いますが、一応社内的にこれで安全というように考えて結論はしているというところなのですが、確かに●●●というのが出てきているというところで、完全に問題があるものが検出されなかったという言葉自体が適当ではないというように考えますので、少し文言の修正をして対応させていただきたいと思います。

○中島座長 文言の修正だけではなくて、ゼロでないのであればそのレベルでヒトの健康に影響を与えるレベルではないということを別の根拠をもとに示していただきたい。ただ単に文言のゼロではないというそれだけではなく、このレベルではヒトの健康影響に評価を与えるレベルではないということの根拠を持ってちゃんとディスカッションして示していただきたいと思います。お願いできますか。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） はい。承知しました。

○中島座長 では、児玉先生、何か。

○児玉専門委員 消化性テストのところ、申請書の22ページ、22ページです。製品のSDS-PAGEが載ってまして、あとウェスタンブロットも載ってまして、両方とも基本的には同じバンドパターンになっているとは思いますが、●●●ということに対して、一応社内的にどう考えているかといいますか、どういった由来のものかとか、そういったものについて何かしら情報があれば教えていただきたいと思います。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） 弊社としましては、一応もともと出ているgalT1というタンパク質なのですが、●●●というように考えております。ドメイン情報も今、図7のほうにお示ししていますが、●●●というように推測しております。ただ、安全性の観点から言いますと、一応胃液の中での消化性は非常によいかというように考えて安全性には問題ないであろうというように考察をしております。

○児玉専門委員 一応、ウェスタンブロットも同じパターンになっているので、そういう答えでよろしいかなとは思いますが、どうせ先ほどの●●●の件で本社に問い合わせるのしょうから、この点についても確認を念のためにしておいていただければと思います。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） 承知いたしました。

○中島座長 申請者に来ていただいておりますので、ほかに御質問はございますか。よろしいですか。

どうもありがとうございました。本日は御足労ありがとうございました。

（説明者退室）

○中島座長 それでは、審議に戻ります。

ただいまの回答を踏まえた上で御意見、コメント等ございましたら、お願いしたいと思います。

本件については、それでは、幾つか宿題を出させていただきましたので、この点につい

て後ほどしっかり確認したいと思うのですけれども、確認はできるだろうと思いますので、それ以外に本件について特に安全性上の問題、懸念等はございますでしょうか。

では、ただいまの宿題の点について確認するということを前提で、特に安全性の問題はないということで、まず評価書案を審議しておきたいと思いますが、よろしいでしょうか。

(首肯する委員あり)

○中島座長 では、評価書案の審議に入りたいと思います。

事務局のほう、よろしくお願ひいたします。

○山口係長 それでは、評価書案のほうについて御説明させていただきます。

評価書案を束ねた資料の1ページ目からがβ-ガラクトシダーゼになります。

それでは、下のほうにページを振ってありますが、6ページをお願いします。

まずⅠ、概要でございます。

本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63株を宿主としまして、*Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171株由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子及びタンパク質の分泌に関する*prsA*遺伝子を導入して作製したJPBL003株を利用して生産されたβ-ガラクトシダーゼでございます。本添加物は、二糖中のβ-ガラクトシド結合を加水分解する酵素であり、乳製品中の乳糖含量の低減を目的として使用されます。

続いて「Ⅱ. 食品健康影響評価」に関する事項です。

第1の1の(1)でございます。名称はβ-ガラクトシダーゼ。基原は*Bacillus circulans*。有効成分はβ-ガラクトシダーゼです。

「(2) 製造方法」でございますが、培養液から抽出し、除菌、精製等の工程を経て製造されます。

「(3) 用途及び使用形態」についてでございますが、乳製品中の乳糖含量を低減する目的で、原料である牛乳に直接添加して使用されます。

「(4) 摂取量」です。牛乳及び乳製品の乳糖分解に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は0.057 mgTOS/kg体重/日でございます。

2の(1)といたしまして宿主の種名等ですが、宿主は*B.licheniformis* Ca63株です。

(2) DNA供与体の種名等です。β-ガラクトシダーゼの供与体は、*Bifidobacterium bifidum* NCIMB41171株。*prsA*遺伝子の供与体は*B.licheniformis* Ca63株です。

(3)挿入DNAの性質等ですが、*galT1*遺伝子は*B.bifidum*由来のβ-ガラクトシダーゼを、また*prsA*遺伝子は宿主由来の菌体外分泌タンパク質の分泌量を高めるPrsAタンパク質をコードします。

*galT1*遺伝子発現カセット及び*prsA*遺伝子発現カセットをインテグラーゼにより宿主ゲノムの標的遺伝子座に導入し、挿入遺伝子座のうち、一部の遺伝子座において遺伝子欠失が確認されております。

なお、生産菌の作製に当たり、複数種類の遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組み換えにより欠失させております。

3、食経験等に関する事項ですが、*B.licheniformis*は、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されております。

4、宿主の構成成分等についてですが、*B.licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティーレベル1に相当します。

5、組換え添加物の性質等ですが、こちらは記載のとおりでございます。

続いて6の(1)といたしまして、添加物の相違点でございますが、基原並びに至適温度、pHが異なる点でございます。

組換え体と宿主との相違点は、JPBL003株には*galT1*遺伝子が複数コピー導入され、*galT1*生産性を獲得している点。*prsA*遺伝子を導入している点並びに*galT1*の生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点でございます。

以上から、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ております。

「第2. 宿主に関する事項」ですが、1については記載のとおりでございます。

2、病原性等でございますが、*B.licheniformis*が病原性及び有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティーレベル1に相当します。

3～5については記載のとおりでございます。

続いて「第3. ベクターに関する事項」についてですが、遺伝子導入用ベクターpJPV013及び014の作製には、*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドpE194が用いられております。

2、性質については記載のとおりです。

続いて、第4でございます。1の(1)については記載のとおりです。

(2) 安全性についてですが、*B.bifidum*は、ビフィズス菌の一種で、ヒト体内や食品を含む自然界に広く存在し、長年にわたる安全な食経験がございます。

*B.licheniformis*については記載のとおりです。

続いて2の(1)クローニングに関する事項でございますが、*galT1*遺伝子は*B.bifidum*由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子の配列に基づき合成しており、また、*B.clausii*由来の*aprH*遺伝子の分泌シグナル配列が付加されております。

*prsA*遺伝子は宿主のゲノムからPCRにより得られております。

(2)について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。

①、まず*galT1*遺伝子です。こちらは二糖中のβ-ガラクトシド結合を加水分解するβ-ガラクトシダーゼでございます。

続いて「a. 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見」ですが、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ございませんでした。

「b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見」ですが、galT1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す報告はございません。

また、*B.bifidum*が産生するβ-ガラクトシダーゼ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ございませんでした。

続いてc、物理化学的処理でございます。

まず人工胃液に対する感受性ですが、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析を行った結果、SDS-PAGE後のCBB染色では試験開始後10分以内に、ウェスタンブロット分析では試験開始後0.5分以内に分解されることが示されたとしております。

b、人工腸液でございますが、SDS-PAGE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ております。

c、加熱処理についてでございますが、62℃・30分で酵素活性が失活することが示されております。

続いて、既知のアレルギーとの構造相同性に関する知見でございます。galT1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ませんでした。

②、続いて*prsA*遺伝子です。これは細胞膜タンパク質であるPrsAタンパク質をコードし、細胞内のPrsAタンパク質が増加するほど、菌体外分泌タンパク質の分泌が促進されます。PrsAタンパク質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、galT1と同様の手法にて行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは検出されませんでした。

以上のことから総合的に判断し、galT1及びPrsAタンパク質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としております。

続いて3、4、5の(1)までについては記載のとおりです。

少し飛びまして317行目でございますが、こちらは第5-2-(2)に記載のとおりである旨を記載しております。

(3)でございますが、遺伝子導入用ベクター013及び014上の意図する領域はgalT1遺伝子発現カセット及び*prsA*遺伝子発現カセットの領域でございます。

(4)については記載のとおりです。

続いて6と7の説明ですが、ここは先日、児玉先生のほうから御意見をいただいたことも踏まえまして事務局のほうで修正させていただきました。修正箇所は下線部を引いたところと取り消し線が入っているところの2カ所でございます。

まず6のほうでございますが、DNAの導入方法については、各標的遺伝子座にマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えにより導入し、各マーカーにより形質転換体を選択しております。

遺伝子導入用ベクターpJPV013をインテグラーゼの作用によって挿入し、galT1の産生

量が高い形質転換体を選抜した後、遺伝子導入用ベクター014のほうも同様に導入しております。各導入遺伝子座においては、*cry3A* mRNA安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子、*int*遺伝子及びインテグラーゼ認識配列が宿主ゲノムから脱落しております。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子に関してですが、遺伝子導入用ベクター013及び014は、エリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主のゲノムからはループアウトにより脱落しており、また、1カ所の遺伝子座にマーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子が導入されておりますが、ループアウトにより脱落しております。この抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことは標的遺伝子座のシークエンス解析により確認されております。

続きまして「第5. 組換え体に関する事項」です。

1については記載のとおりでございます。

2の(1)でございますが、*galT1*遺伝子が複数コピー、また、*prsA*遺伝子が挿入されていることというのが確認されております。

続いて(2) ORFの有無の項目ですが、挿入DNAの5'近傍配列を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行った結果、6つの読み枠において終始コドンから終始コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計で562個検出されております。

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は検出されませんでした。

連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして生コーヒー豆に存在するアレルゲン(Cof a 1)というのが検出されております。Cof a 1はコーヒー豆産業従事者の生コーヒー豆粉じんに対する職業性アレルギーに関連があるとの報告がありますが、Cof a 1と一致した8アミノ酸配列はアレルゲンエピトープとして登録されておらず、ORFは本来の*galT1*遺伝子のORFとは逆方向の読み枠であることなどから、当該ORFによりアレルギー誘発性を生ずる可能性は低いと考えられたというようにしております。

さらに、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、E-value、0.02未満を指標として検索を行った結果、3個のORFがデータベース上のタンパク質と相同性を示しましたが、いずれも毒性を有するとは考えがたいタンパク質であったという旨を記載してございます。

第6については記載のとおりです。

第7でございます。諸外国における認可の状況でございますが、フランス、カナダにおいて食品用加工助剤のポジティブリストに掲載されております。また、米国ですが、申請書のほうに具体的な記載はなかったのですが、申請者に問い合わせをしまして、GRASの認証をされたのが2015年ということを確認し、その旨もあわせて評価書案のほうには記載しております。

続いて、第7の2、ドットプロット解析によりまして、*galT1*製剤中には組換えDNAが検

出されないことが確認されております。

続いて、3、4、5及び第8については記載のとおりでございます。

評価書案の説明は以上でございます。

○中島座長 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、コメントをお伺いしたいと思います。ございませんでしょうか。

どうぞ。

○橋田専門委員 253行目のところの記述なのですが、ウェスタンブロットとSDSで、CBBとウェスタンの結果で、確かにここに書かれていることは間違いではないのかもしれないのですが、CBBで10分以内に、ウェスタンでは0.5分以内に分解されることが示されたということが、分解そのものがこの時間内に終わるといように捉えられてしまう可能性もあるのかなというように読んでいて違和感を覚える文章であるのかなと思います。

あくまでバンドが見えなくなったのが10分以内、0.5分以内ということではあるのですが、分解されることがそれで示されているかということ、CBBで0.5分以内に別に分解されているわけではないですし、表現だけなのですが、工夫していただければと思います。

以上です。

○山口係長 例えばバンドが何分で消失したとか。

○橋田専門委員 消失したため、総合すると10分以内には分解されることが示唆されるのか、そういう形のほうがわかりやすいかなと思うのですが、御検討いただければと思います。

○山口係長 わかりました。そのように修正させていただきます。

○中島座長 では、その修正と確認につき合っていただけますか。

○橋田専門委員 はい。

○中島座長 ほかにございますでしょうか。

それでは、よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、先ほどの指摘につきまして、それから、今の評価書案の修正について、私と関係の先生方で確認し、確認がとれたところで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、次の議題に行きたいと思います。新規品目であるGLU-No.10株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウムについて審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうからお願いいたします。

○飯塚課長補佐 それでは、申請者から提出されている申請書を説明させていただきます。

オレンジ色のファイルを御用意ください。済みません、グレーのファイルですね。失礼しました。

○中島座長 我々はグレーです。そちらはオレンジなのですね。

どうぞ。

○飯塚課長補佐 1ページをお願いいたします。

グルタミン酸ナトリウムは食品添加物公定書に記載された指定添加物に該当いたしまして、その概要は下の表に記載のとおりでございます。

2ページに参りまして、用途は昆布のうま味成分であり、調味料として広く使用されているものでございます。

3ページ、製造方法の概要ですが、L-グルタミン酸生産菌の *Pantoea ananatis* GLU-No.10株はL-グルタミン酸の生産・蓄積能が向上した生産菌株を構築することを目的に作製されておりまして、平成27年に安全性審査がなされておりますGLU-No.6株をもとに改変した菌株となっております。

下にフローがございますが、GLU-NO.6株からGLU-No.10株の間でL-グルタミン酸生合成関与遺伝子を導入とありますが、導入していないと思われまますので修正を求めたいと思います。

9ページをお願いいたします。GLU-No.10株の作製方法です。親株はGLU-No.6株を使用しております。各遺伝子組み込み及びプロモーター領域の改変においては、●●●を利用した方法を行っております。構築途中においては●●●を使用しておりますが、●●●は除去されているということでございます。

GLU-No.10株の構築においては、挿入遺伝子は存在していないというものです。

プロモーターは●●●由来のDNAからなっておりまして、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しております。

GLU-No.6株に対して●●●遺伝子の上位に●●●を置換したというものでございます。さらに●●●遺伝子に欠失変異を導入したというものです。

15ページをお願いいたします。L-グルタミン酸の製造方法になっております。発酵によって得られたグルタミン酸の発酵液を●●●しております。それから精製を行って製品化しているものです。

16ページをお願いいたします。申請品目と現行製品の品質の比較ですけれども、こちらは添加物公定書に記載されている規格を満たすというもので、品質は現行製品と同等と考えるというものです。

17ページですが、不純物のプロファイル比較結果になります。アミノ酸自動分析計による比較をしております、検出限界以上の不純物は検出されなかったというものです。

18ページになりますが、不純物HPLC-1法では親水性の不純物を検出しておりますが、検出限界以上の新規不純物は検出されなかったというものです。また、申請品目中の検出された既存不純物では現行製品の最大不純物量を超えるものはなかったというものです。

19ページはHPLC-2法で疎水性の不純物を検出しておりますが、申請品目の結果は保持時間4.9のピークを除きまして比較した現行製品3ロットの最大不純物量を超えるものではなかったというものです。

RT4.9のピークにつきましても表4でさらに現行製品2ロットを加えて比較をした結果、

申請品目の最大不純物量は現行製品の最大不純物量を超えるものではなかったというものです。

20ページは残存タンパク質ですけれども、非有効成分であるタンパク質は申請品目中には検出されないことを確認したというものでございます。

説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

この味の素さんからの株、GLU-No.3が2011年でNo.6が2015年で、今回No.10、4年おきに改良されてレベルがよくなってくるとまた申請に上がってくるというパターンかな。なので、この菌株にしても、もとの宿主にしても、以前に確認したものです。

最後、No.6からNo.10については事務局の指摘のとおり、もはやここまで来ますと製造に関するグルタミン酸の生産に関する遺伝子が入っていないで、フラックスをいじってということなので、代謝関連遺伝子ということで、その訂正を求めるのは私も妥当かと思えます。

それでは、余り長い申請書ではございませんので、最初から21ページまで全てにつきまして御意見ございましたらお願いいたします。

15ページの製造工程のところ、確かに概略だから概略でいいのでしょうかけれども、ここで●●●を記載していただいて、我々はそれを確認して、これなら菌体等々はまざらないだろうというのを判断しておりますので、それは申請者に求めたいと思いますが、よろしいでしょうか。

○飯塚課長補佐 座長、済みません。申請者のほうに事前にお伺いしたところ、回答がございましたので御報告いたします。

実際、こちらの●●●という回答が来ております。

○中島座長 では、菌体を除くのは●●●という工程でもって菌体、DNAを除いているということなのでしょうね。それでも十分除けるかとは思いますが、という回答が来ておるのだそうです。ありがとうございます。そういうもので、●●●のですね。

どうぞ。

○児玉専門委員 これは前に事務局に事前に問い合わせしたことでもあるのですけれども、こういうように菌株を改良していった高度精製品の場合は、皆さんの机の上にある緑色のファイルの5番にあるように、届け出で済むような制度をつくってあって、我々の負担を減らしましょうという話になっていたと思うのですが、今回、それに当たるのではないかとというように聞いたところ、メーカーさんのほうで申請したいということなので上がってきたということなのです。それは窓口でこれに当たりますよねで済ませてほしいのですけれども、どういうことなのかなとちょっと。

どういうことなのかなというわけではないのですけれども、余りこれが適用されないとすると、これのつくった意味もなくなってしまうなというそこら辺もあって、議事録で一応議論はしたよということにしておきたいなと思ひまして発言した次第です。

○中島座長 そうですね。確かに遺伝子をいじってはいるのだけれどもね。この場合、たしか●●●が増えているわけではないので、●●●でもあるし、自主判断してもいいというか、そういうものは自主判断でいいよというようにしたようにも思いますので、本申請の安全性に直接関係する問題ではないのですが、我々のあり方についての問題になりますし、また、こういうものを削っていかないと次から次へもっと厄介なものが将来待っているような気がしてなりませんので、この辺は合理的にこの制度を運用していただけるように検討いただければありがたい。

○松井技術参与 なぜここに来たのかということは、非有効成分の比較に用いられている現行品の株を見ていただければいいのですが、こちらが食安委で評価した株ではないのです。この高度精製が省略できるという議論のときに、現行品は食安委が評価した株のときという条件が加わっていたからこちらに来たのだと思うのです。

○中島座長 我々の意図は、こういうものこそ自主判断にしてほしいからという意図だったと思うのです。

○児玉専門委員 前に評価したものの現行品と違う。

○松井技術参与 評価したものを使えばオーケーだということだと思ったのですが、違いますか。

○児玉専門委員 ただ、要するに現行品が前回の組換え体に相当するもの。

○松井技術参与 現行品はセルフクロニング、ナチュラルオカレンスに判断される株で、なぜこれがセルフ、ナチュラルオカレンスかというのは問い合わせたけれども、わかっていないので。

○中島座長 だって、これは *Pantoea* で●●●とかが入っているのだから、●●●、No.6 はたしか2015年に審査してオーケーになっているので、児玉先生のおっしゃるとおり、No.6とNo.10と比べると●●●、余計なピークがふえているわけでもないし、これだけクリアしているのだったら自主判断でオーケーと思うのですが、何でこちらに来たのだろうね。

○松井技術参与 企業側の意向であったということで、こちらで評価せざるを得なかったという背景だと思います。

○中島座長 企業がどうしても出したいと言ってしまったら仕方がないということなのでしょう。多分そういうことなのだろうと思いますので、今回、これはこれで4年に一遍、改良品を出さないと気が済まないようなのでというように考えます。我々のほうの意図も伝わるように情報を言っただけならばと思います。

○児玉専門委員 絶対やらないよというわけではないのですけれどもね。

○飯塚課長補佐 御指摘を受けまして、適切に運用がなされるように厚生労働省には申し入れをしたいと思います。

○中島座長 よろしく願いいたします。

ほかに特に御質問等ございますでしょうか。よろしいですね。では、安全性は問題ない

と思われまので、評価書案の審議に入りたいと思います。評価書案をお願いいたします。

○飯塚課長補佐 それでは、資料の②、評価書案をごらんください。

資料で言うと20ページをお願いします。評価対象添加物の概要です。

名称はGLU-No.10株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウム。用途は調味料です。申請者、開発者は味の素株式会社。

本添加物は、*Pantoea ananatis* No.359株由来の突然変異株を宿主として、既に安全性の確認が終了したGLU-No.6株にL-グルタミン酸生合成に関与する遺伝子のプロモーター配列の改変。先日お送りした評価書案では、こちら、遺伝子の導入としておりましたが、導入がされておられませんのでプロモーター配列の改変に修正しております。

及びL-グルタミン酸の代謝に関与する遺伝子の欠失を行って作製したGLU-No.10株を利用して生産されたL-グルタミン酸ナトリウムである。L-グルタミン酸ナトリウムは食品添加物としての使用が認められており、成分規格が食品添加物公定書に記載されている。

GLU-No.10株の宿主である*P.ananatis*No.359株は、ヒトへの有害な影響を及ぼす毒素産生性及び病原性は知られておらず、*P.ananatis*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に分類されている。

なお、GLU-No.10株は抗生物質耐性マーカー遺伝子を有さない。

「Ⅱ．食品健康影響評価」です。

本添加物は、製造工程において使用微生物及び発酵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ており、食品添加物公定書の含量規格を満たしている。

2番、本添加物の非有効成分については、最終製品において、タンパク質は検出限界未満である。食品添加物公定書の成分規格を満たしている。アミノ酸分析及びHPLC法（親水性及び疎水性）による分析の結果、従来品に存在しない不純物は検出されず、また、従来品に存在する不純物は、従来品の含有量（実測値）の最大値を上回っていなかった。

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にまで増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられる。

3番、以上、1及び2の結果から、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」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。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、ただいまの評価書案について御意見ございましたらお願いいたします。

短い評価書案ですし、ほぼ定型ですので、これで問題ないかと思うのですが、よろしい

ですね。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、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。

議題（1）については、これで終わりたいと思います。

議題「（2）その他」ですが、事務局のほうから何かございますでしょうか。

○飯塚課長補佐 特にございません。

○中島座長 ありがとうございました。

では、本日の議題については、これで終了いたしました。

以上をもちまして第188回「遺伝子組換え食品等専門調査会」、閉会いたします。お疲れさまでした。