

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第194回) 議事録

1. 日時 令和元年10月18日(金) 15:18~16:46

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

・ZGL株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、安達専門委員、飯島専門委員、岡田専門委員、小野専門委員、
橘田専門委員、児玉専門委員、近藤専門委員、山川専門委員、吉川専門委員

(食品安全委員会)

佐藤委員長、川西委員

(事務局)

小川事務局長、小平事務局次長、箆島評価第二課長、蛭田評価情報分析官、
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

①ZGL株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ

6. 議事内容

○中島座長 それでは、皆さんおそろいのようなので、ただいまから第194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」に基づいて、非公開で行います。

本日は、所用により、小関専門委員、手島専門委員、樋口専門委員が御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目にあるZGL株を利用して生産されたグルコースオキシダー

ぜ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。事務局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、資料1として「食品健康影響評価に関する資料」、資料2として「食品安全委員会における調査審議方法等について」に係る「確認書」、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、調査会終了後に回収させていただきます、次回に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ZGL株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼの申請者であるDSM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きまして、相違等はありませんでしょうか。

○中島座長 ありがとうございます。

新規品目である「ZGL株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」について、審議を始めたいと思います。

事務局から説明をお願いいたします。

○山口係長 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DSM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。

申請者から提出されております申請書を説明させていただきます。

お手元の資料の3ページをお願いいたします。

第1の項目でございます。

(1) 名称は、グルコースオキシダーゼでございます。

(2) 製造方法でございますが、糸状菌の培養液より、抽出して得られたもの、または溶菌後、除菌したもの、または濃縮後、冷時エタノールで処理して得られたものでございます。

(3) 用途及び使用形態でございます。グルコースオキシダーゼは、グルコースを酸化しD-グルコン酸を生成する酸化還元酵素でございます。食品の加工貯蔵工程において、グルコースが存在して品質劣化させる場合に、これを除去する目的で、卵白やワイン、果汁等に使用されております。また、生成した過酸化水素が製パンや製菓用等の生地の中で酸化剤として作用し、生地に柔軟性を持たせる機能も知られており、本添加物はこの製パン及び製菓用途で使用されます。

(4) 摂取量です。小麦・加工品のうち、パン類、菓子パン類、その他の小麦加工品が製造されることを仮定して、本酵素の推定摂取量を算出した結果、最大で約0.0094mgTOS/人/日となっております。4ページをお願いいたします。なお、本品は製パン等の製造工程のうち、加熱の工程において失活され、最終食品中には酵素活性が残存しないということでございます。

第1の2、本申請品目の宿主等の項目になります。

(1) 宿主の由来等ですが、宿主は*Aspergillus niger* ISO-528株でございます。*A. niger* 野生株NRRL3122から親株●●●株を経て、変異原処理及びセルフクローニングにより構築されております。本宿主株は食品安全委員会において、セルフクローニングにより得られた株として評価されたアスパラギナーゼの生産菌ASP-72株の中間株として評価済みのものでございます。

(2) DNA供与体等の由来について、挿入遺伝子であるグルコースオキシダーゼ遺伝子の供与体は、*Penicillium chrysogenum*でございます。

隣のページに行きまして、(3) 挿入DNAの性質でございます。挿入DNAは、ZGL遺伝子を含むZGL遺伝子発現カセットで、各構成要素及び性質は、次の6ページの表2に記載されているとおりでございます。宿主には、プロトプラスト・PEG法により形質転換された後、染色体上へは一回交差相同組換えにより、標的部位へ組み込まれております。また、グルコースオキシダーゼの生産性を高めるために、Cre-loxシステムを用いて●●●遺伝子を欠失させ、その際に●●●遺伝子座位にはlox及び*nicB*リンカー配列が残存しております。

第1の3でございます。*A. niger*は、食品や食品添加物の製造で使用されている最もよく知られた微生物の一つであり、クエン酸の商業生産には安全に使用されてきた歴史があります。また、本菌株から生産される複数の酵素は、数十年にわたってさまざまな食品加工に安全に使用されており、日本国内でもα-アミラーゼなどのさまざまな食品用酵素の生産に長年安全に利用されております。

第1の4、宿主の構成成分等でございます。これまで有害生理活性物質等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レベル1に相当いたします。

第1の5、当該GM、遺伝子組換え添加物の性質等でございます。

(1) 製品名はBakezyme GO Pure、有効成分はグルコースオキシダーゼでございます。

(2) 製造方法ですが、従来の食品酵素の製造方法と同様でございます。本生産菌株を培養液に加え、発酵を行い、その後に、●●●、生産菌を不活化、さらに●●●ろ過を行い、精製、最後に製品といたします。

8ページをお願いいたします。(3) 用途及び使用形態ですが、使用形態は顆粒、用途は、製パンや製菓の工程において、酸化剤として働き、生地の柔軟性を改善させるものでございます。

(4) 有効成分等の比較については、記載のとおりでございます。

第1の6、従来の添加物との相違点でございます。

(1) は記載のとおりです。

(2) といたしまして、ZGL株が宿主と異なるのは、ZGL株には、そのゲノム上にZGL遺伝子を含む発現カセットが複数コピー挿入され、グルコースオキシダーゼの高生産性を獲得していること、●●●遺伝子が完全に欠失していること及び●●●遺伝子欠失の過程で挿入されたlox及び*nicB*リンカー配列が残存している点でございます。

第2の1では、分類学上の位置づけについて記載しております。

9ページに行きまして、第2の2、*A. niger*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レベル1に相当します。*A. niger*はオクラトキシンA及びフモニシンの合成遺伝子を保有することが知られておりますが、本酵素原体について試験した結果、これらのマイコトキシンは含まれないことが確認されております。

第2の3～第2の5については、記載のとおりでございます。

第3、ベクターに関する事項です。

遺伝子導入用プラスミドpGBTOPZGL-1の構築には、大腸菌由来のベクターpTZ18Rが用いられております。

10ページの下、第4の項目になります。挿入DNA等に関する事項です。

1 (1) 名称、由来及び分類については、記載のとおりでございます。

11ページに移りまして、(2) 安全性ですが、*Penicillium*はグルコースオキシダーゼの基原として、長年安全に使用されております。*P. chrysogenum*は、抗生物質ペニシリンの産生菌として広く知られており、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レベル1に相当します。国内では、食品添加物リパーゼの生産菌として、長年安全に使用されております。

2 (1) でございます。グルコースオキシダーゼをコードするZGL遺伝子は、*P. chrysogenum*のグルコースオキシダーゼ遺伝子をもとに、宿主に合わせてコドンの最適化を行ったものを化学合成しております。

(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ございます。ZGL遺伝子により発現するグルコ

ースオキシダーゼは、細胞内で●●●シグナル配列が切断されて、成熟型のグルコースオキシダーゼとなります。このグルコースオキシダーゼは、既存の*Penicillium*属由来のグルコースオキシダーゼと同じであり、既存のグルコースオキシダーゼは何十年にもわたる食経験をもちますが、アレルギー性や毒性は知られていないため、本添加物にも安全性に問題はないと考えられるとしております。

その下、①アミノ酸配列でございます。ZGL遺伝子がコードするグルコースオキシダーゼは、●●●アミノ酸であり、このうち●●●シグナル配列である●●●が細胞内で切断されることにより、成熟型のグルコースオキシダーゼとなります。データベースNCBIに公開されている*P. chrysogenum*由来のグルコースオキシダーゼとアミノ酸配列は同じということでございます。

12ページ、②タンパク質の大きさでございます。アミノ酸配列から推定される成熟型のグルコースオキシダーゼのタンパク質の大きさは●●●で、ZGL株を培養して得られた同タンパク質のSDS-PAGE分析を行ったところ、その大きさは●●●であったことから、意図したとおり、*P. chrysogenum*のグルコースオキシダーゼが得られていることが確認されたということです。

③既知のアレルゲンとの相同性ですが、本添加物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①に示した●●●アミノ酸配列について相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、mala s 12、皮膚常在菌由来のグルコース-メタノール-コリン酸化還元酵素が検出されました。また、連続する8アミノ酸配列が完全に一致する領域はございませんでした。当該アレルゲンは、WHO-IUISが指定するアレルゲンのデータベースに含まれており、接触アレルゲンとして登録されております。以上のことから、ZGL遺伝子がコードするグルコースオキシダーゼにはアレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認したとしております。

第4の3については、記載のとおりでございます。

第4の4でございます。挿入DNAの組込み方法でございますが、挿入DNA構築用プラスミドとして、pGBTOPZGL-1を作製しております。ZGL遺伝子は*A. niger*由来の*glaA*プロモーター及び*glaA*遺伝子の下流に位置する隣接配列とともに●●●で切り出せる形で挿入されており、ゲル電気泳動により分離されたZGL発現カセットのみが宿主に導入されております。

第4の5については、記載のとおりでございます。

14ページをお願いいたします。

導入方法でございますが、14ページから24ページまで続いております。まず、ステップ1、親株●●●の構築でございますが、*A. niger*野生株NRRL3122の変異剤処理により、グルコアミラーゼ高生産株である●●●を誘導しております。野生株では1コピーのグルコアミラーゼ遺伝子が存在しているのに対し、●●●では●●●コピーに多重化して存在し

ております。

次に、ステップ2、宿主ISO-528株の構築ですが、●●●にある●●●カ所の *glaA* 遺伝子座において、*glaA* 遺伝子のプロモーターとコード配列を欠失した Δ *glaA* 座位を、クローン化した *A. niger glaA* 遺伝子配列を用いて構築し、これらの●●●カ所の Δ *glaA* 座位を各々、お互いに異なる短いDNA配列、●●●で標識し、●●●を構築しております。なお、この Δ *glaA* 座位と制限酵素部位の同時構築の過程では一時的に *A. nidulans* 由来のアセトアミダーゼ遺伝子が選択マーカーとして用いられましたが、最終的に構築された株からはこのマーカーは除かれております。

16ページに行きますけれども、さらに●●●における宿主のタンパク質分解酵素●●●をコードする遺伝子の不活化も、*amdS* 遺伝子を一時的な選択マーカーとして用いる遺伝子組換え手法により行われております。同じページの10行目に飛びまして、●●●からランダム組換えを引き起こす●●●遺伝子を欠失させ、また、●●●、●●●も欠失させております。続いて、挿入DNAが、●●●つのプラグ部位のうち●●● Δ *glaA* 座位に特異的に組み込まれる頻度をさらに高める目的で、●●●を●●● Δ *glaA* 座位に挿入しております。これらの過程で、一時的 *amdS* 遺伝子が選択マーカーとして用いられましたが、最終的に構築された各中間株及び宿主ISO-528株からはこのマーカー遺伝子は除かれております。

続いて、ステップ3、生産菌ZGL株の構築でございます。まず、1) 宿主ISO-528株から一次形質転換株への誘導ですが、①挿入DNA発現カセットの調製は、プラスミド pGBTOPZGL-1から●●●でZGL発現カセットを切り出し、ゲル電気泳動により、アンピシリン耐性遺伝子を含む *E. coli* ベクター配列を除いております。同様に、選択マーカーとして利用する *amdS* 発現カセットをプラスミド●●●から切り出し、*E. coli* ベクター配列を除いております。

17ページの②でございますが、ISO-528株の遺伝子導入でございます。ZGL発現カセット及び *amdS* 発現カセットを混合したDNA溶液を用いて、プロトプラスト・PEG法により、ISO-528株の形質転換を行っております。多数得られた形質転換株の中から、グルコースオキシダーゼを高生産し、かつアセトアミドを唯一の窒素源として含む最小培地で生育する株を選択しております。

18ページになります。

2) 一次形質転換株から *amdS* 自然脱落株の選択でございます。この *amdS* 自然脱落株の選択は、基質として●●●を用いる *amdS* 遺伝子保持株の負の選択によって行われました。

3) *amdS* 自然脱落株からZGL多重化株への遺伝子変換による誘導です。隣の19ページにも図がございますが、目的DNA配列を有する●●● Δ *glaA* 座位が、菌体内における自然な遺伝子変換によりほかのプラグ部位へ転換していくことにより、目的DNA配列が多重化されていきます。最終的に●●●の●●● Δ *glaA* 座位を有し、1カ所に●●●コピーのZGL発現カセットで、結果としてZGL遺伝子が●●●コピーに多重化した株を得ております。

意図した部位への挿入DNAの組込みとZGL遺伝子のコピー数の確認には、サザンブロット分析及びPCR解析を用いております。

少し飛びまして、22ページをお願いいたします。

4) ZGL多重化株からのZGL株の構築です。グルコースオキシダーゼの生産性が高まることが期待されるということで、●●●遺伝子を欠失させております。この欠失にはCre-loxシステムを用いております。申請書にもあります①及び②に示す3つのDNA断片をPCRにより作成し、これらの断片を●●●*E.coli*由来のベクターに挿入し、●●●欠失導入用ベクター●●●を構築しております。この●●●を鋳型に作成した2つのPCR断片を、プロトプラスト-PEG法によりZGL多重化株に形質転換させ、ハイグロマイシン耐性株を選択しております。その後、pEBA520プラスミドを導入し、Creリコンビナーゼを一時的に発現させることにより、選択マーカー*hygB*遺伝子を除去し、フレオマイシン耐性遺伝子を持つpEBA520プラスミドが、フレオマイシン非存在下での培養により自然に脱落したことをPCR解析により確認しております。また、●●●遺伝子が欠失したこと及び*hygB*遺伝子が除去されたことを、配列決定により確認しております。

25ページをお願いいたします。

第4の7でございます。

(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項ですが、抗生物質耐性マーカー遺伝子はZGL株には残存しないため、遺伝子産物が生産されることはございません。

(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項ですが、抗生物質耐性マーカー遺伝子はZGL株には残存しないため、遺伝子及び遺伝子産物を摂取することはございません。

第5の1でございます。生産菌ZGL株が宿主と異なるのは、ZGL株には、そのゲノム上にZGL遺伝子を含むZGL発現カセットが複数コピー挿入され、グルコースオキシダーゼの高生産性を獲得していること、●●●遺伝子が完全に欠失していること及び●●●遺伝子欠失の過程で挿入されたlox及び*nicB*リンカー配列が残存していることでございます。

2 (2) でございます。挿入DNA断片及び宿主ゲノムとの接合部位において、目的以外のタンパク質を発現する可能性のあるORFの有無を確認するために、終止コドン-終止コドン間で連続する30アミノ酸以上のORFの検索を行っております。ZGL発現カセットは、実際には1カ所の●●● Δ *glaA*座位に●●●コピーが挿入されておりますが、ZGL発現カセットの配列とカセット同士の接合部位については繰り返しになるため、●●●コピーのZGL発現カセットとその周辺領域について検索を行っております。その結果ですが、ORFが36個検出される結果となりました。これらのORFの推定タンパク質と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、Allergen Online™のデータベースを用いて相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンと80アミノ酸で35%以上の相同性を示すORFが1個検出されております。このORFは*Malassezia sympodialis*のアレルゲンと相同性を示しており、当該アレルゲンは、WHO-IUISが指定するアレルゲンのデータベースに含まれており、接触アレルゲンとして登録されております。また、8アミノ酸配列が完全に一致する既知のア

レルゲンは検出されませんでした。続いて、既知の毒性タンパク質との類似性について、 $E\text{-value} < 0.01$ を指標にBLAST検索を行いましたところ、毒性タンパク質との類似性は見出されませんでした。26ページの下に行きまして、さらに、ZGL株の●●●遺伝子座位には、最終的にlox配列と2つの*nicB*リンカー配列が残っているため、当該領域においても同様にORF検索を行ったところ、目的以外のタンパク質を発現する可能性のあるORFが9個検出されまして、これらのORFと既知のアレルゲン及び毒性タンパク質の相同性の有無について同様に確認したところ、相同性を示すアレルゲン及び毒性タンパク質は検出されませんでした。

27ページ、第6でございますが、製造原料等に関する記載が出されております。製造原料等は全て長年安全に使用された実績があるという旨が記載されております。

第7、遺伝子組換え食品添加物に関する事項です。

第7の1として、諸外国における認可等について記載しております。これまでに、オランダ、カナダ、デンマーク、フランス及びメキシコでの食品への使用は許可されております。

第7の2、組換え体の残存ですが、●●●を添加して一定時間培養することにより、生産菌を完全に不活化させ、この不活化工程後の培養液から採取したサンプルを、プレートカウント寒天培地上で培養し、生菌は検出されないことを定期的に確認しているということでございます。

28ページをお願いいたします。

第7の3でございますが、*A. niger*は有害生理活性物質を生産するという報告はなく、本添加物の製剤前のサンプルは、製造に由来する有害物質成分について規格を定めているJECFAの食品用酵素及び食品添加物公定書の規格値に適合していることを定期的に確認しております。また、製造原料は食品原料あるいは食品への使用が認められた品質のものを使用しており、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えられないとしております。

4でございます。発酵終了後、生産菌の不活化の後、ろ過等の工程を経て発酵培地を生産菌や菌体断片を含む固体と本添加物を含む液体に分離します。このような工程において、濃縮精製が繰り返され、本添加物を含む溶液から菌体や固形物が完全に取り除かれるため、本製品には生産菌及び有害物質等が残存することはないと考えられるとしております。

第7の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をいただきたいと思っております。

本申請書は、株の作製等々で結構手の込んだことをしてございまして、また、いささか読みづらいところが多いように思いまして、私などは結構苦労したのですが、先生方は読

み解かれるのに苦労されたのではないかと。

とりあえず申請書の3ページから10ページ、ベクターに関する事項までのところで、ございましたらお願いいたします。

どうぞ。

○児玉専門委員 事前に事務局には問い合わせはしたのですけれども、3ページのところで従来品の添加物についての情報です。

皆さんもごらんになったらわかると思いますけれども、通常、ここの従来品で物によっては結構詳しい情報があって、こういう製品は、こういう由来で、こういう基原で、こういうpHで、こういう温度で失活しますみたいなところが並んでいるときも多いのですけれども、実質的にはほとんど情報なしで、具体的な情報らしい情報は何も載っていないくて、従来品と比べてどうかという比較が実質的にできない状況になっています。

事前にお伺いしたところ、従来品の情報がとれなかったのだという回答だったのですけれども、もう少し努力してもらって、何とか従来品に対する具体的な知見を少し入れていただきたいなとは思っています。

○中島座長 ありがとうございます。

これについては、申請者に来ていただいておりますので、お呼びして議論したいと思うのですが、いずれにしても従来品との比較検討で本組換え品が安全かどうかということを議論するというのがベースですので、確かにこれだと。

この書き方も、これは同じとは書いてあるのだけれども、実際にこのアミノ酸配列のものがどの程度流通しているのかとか、そういったところがございませんので、本来であれば、新規の組換え品であれば、これに対する人工胃液・人工腸液等による消化性試験なども行っていただいて、それを見させていただいて安全性について審議するというルールにはなっているのですが、同じだからいいとは書いてあるのですが、本当に同じかどうかこれではわからない。

その辺が読んでいて皆さんも少しずつ何かおかしいなという感じを持ったと思うのですが、私もその辺が少々もぞもぞしております、この辺のところは申請者をお呼びしたところできっちり議論をしたいと思うのですが、ここに関係するところ、10ページよりもっと先のところからでも結構ですが、御意見はございますでしょうか。また申請者をお呼びしたときに直接質問していただいても結構ですが。

どうぞ。

○川西委員 今の児玉先生の御指摘とも関係することかもしれないのですけれども、今の中島先生の消化管における消化もそうですが、4ページ目の1行目で「本品は製パン等の製造工程のうち加熱の工程において失活され、最終食品中には酵素活性が残存しないため」と書いてあるのですけれども、このことを示すデータは何もないというのは、もう少し努力してほしいなど。製造工程で除かれるということをもう少し親切にデータも添えて示していただければ、プラス消化管で消化されるということもデータで示していただくと、プ

レゼンとしては、ああ、そうですかと納得できるのですが。

○中島座長 ありがとうございます。

忌憚のない意見交換によって安全性を確認していくというのがこの調査会のルールですし、また、伝統ですので、この際、言いたいことは全部指摘されるのがかえって親切かと私も思いますので、ぜひ。

そうしますと、ZGLについては、2013年にアレルゲンのデータベースでチェックをして調べております。最後に、今度は挿入した菌株については2018年に新しくできたORFについてデータベース検索をしているのですが、その間が5年ありまして、一番肝心のZGLについては、今年が2019年ですから6年前で、その間にそれなりにデータベースもつけ加わっておると思うのですが、この辺についても、私はいろいろお願いするのであれば最新のデータベースでチェックをしてもらったほうがいいと思うのですが、先生方、この辺はいかがでしょうか。

安達先生、いかがですか。

○安達専門委員 ここでなぜ5年間間があいているのかというのは私もちょっと疑問だったので、ORFの2018のデータベースでやっているのであれば、このグルコースオキシダーゼの配列についても同様にそろえていただいたほうが、皆さんにも納得していただきやすいのではないかと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

この7ページに製造工程のフローチャートがございまして、必ず書いてあるとは限らないのですが、私はいつも最終製品の純度が気になりまして、純度について問い合わせさせていただきました。余り明確な答えは返ってこなかったようなのですが、●●●、それだと、菌株、培養についての安全性、ともかく精製工程で通常的安全義務を払っておるかどうかというところも気になりますので、そこも問い合わせさせていただいたのですが、これについては、標準の精製法でよく使われるもので安全な精製方法で行っておるという答えは返ってきてはおりますが、この辺はいささかフローチャートのところをもう少し詳しく書いていただきたいなとも思ったところですが、先生方、いかがでしょうか。

ついでに、これより後、10ページから25ページ、発現ベクターに関するところまで、どこでもどうぞ。

○川西委員 これの9ページ、「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、遺伝子としてはオクラトキシンAとフモニシンの遺伝子を保有することが知られて、これらが実際に含まれていないことを確認したということで、添付資料10で「Mycotoxins」としてオクラトキシンA及びフモニシンについて確認したと書いてあるのですがけれども、添付資料10を読むと、●●●。それから、このときにオクラトキシンA及びフモニシンをどう確認したかという説明は一切なくて、これだけの添付資料でオクラトキシンA及びフモニシンがないことが確認されていると書いてあるのですがけれども、これもサイエンティフィックではないなというのは思うところなのです。

○中島座長 その辺は直接問いただしていただくのがいいように思いますので、よろしくお願ひできますか。

○川西委員 こちらも責任が生じますから、確認したと説明していただきたいなと思います。

○中島座長 私もそう思います。多分この株はないのだとは思いますが、ないならないということがわかるようにいただきたいものですね。

ほかに、先生方からどうぞ。

○安達専門委員 12ページから13ページにかけての既知アレルゲンとの相同性のところなのですけれども、このグルコースオキシダーゼの配列を通常の方法で検索したところ、*Malassezia*菌のアレルゲンとの相同性が見られたということで、ただ、申請者のこの資料では、結論としては、ZGL遺伝子がコードするグルコースオキシダーゼについてはアレルギー誘発性を示唆するデータがないと書かれていて、ないというのは相同性検索の結果と矛盾するのではないかと思います。この記載は不正確ではないかと思います。

もしアレルゲン性について言うのであれば、例えば、これまでグルコースオキシダーゼでアレルゲン性や毒性が問題になったことはないので、恐らくこのZGLの産物がアレルギーを誘発する可能性は低いと考えられるとか、そういう記載のほうがよろしいのではないかと思います。

○中島座長 ごもつともだと思います。この辺については、データベース検索を改めてお願ひすることになるかと思ひますので、そのときには、書きぶりについても先生から御指摘いただけると、話の通りがよくなると思ひますので、お願ひできますか。

どうぞ。

○児玉専門委員 今のところなのですけれども、結局、接触アレルゲンだけでも、既知のアレルゲンでひっかかったものが1個ありますよとなっていて、ただ、その元データは実質的には開示されていなくて、事前に事務局にアラインメントを見せてくださいとお願ひしたものが皆さんの机上配付の参考資料1というところ、iPad上に載っているのですけれども。

○山口係長 iPadの一番上に保存してある参考資料1というものです。

○児玉専門委員 これをごらんいただくと、●●●という感じなので、以前にもたしか接触アレルゲンは経口で摂取する場合に問題になるのかならないのかという議論があったかと思ひますので、そこら辺はこの申請書上で議論していただいて、問題になるのかならないのかというのは書いていただいたほうがよろしいのではないかなと思ひました。

こっちは2018年の実施になっているようなのですけれども、後ろのORF検索の26ページでもアレルゲン検索で検索をやっている、こちらはE-valueを使っているのですが、 10^{-7} は切っている閾値がめちゃくちゃ低いですね。この委員会ではE-valueをどこで切るかということは特に決めないということになっているのですけれども、 10^{-7} は相当厳しい条件なので、ほとんどのものは落ちてしまうのですね。国際的には数値は決めていないけれども、 10^{-4}

ぐらいでしょうということはそのことを研究している先生から聞いたことがありまして、この委員会ではどことは決めないのですけれども、 10^{-7} は幾ら何でも厳し過ぎだろうと思いますので、もう少し緩めた条件でもう一度やっていただいたほうがよろしいのではないかと思います。

○中島座長 26ページの上から7～8行目のところ、アレルゲンデータベースを用いて $E\text{-value} < 10^{-7}$ を指標にという、ここですね。こんな条件でスクリーニングをしたら、少々危ないものもみんな落ちてしまうだろうということですね。この $E\text{-value}$ については、アレルゲンについて詳しい先生方、コメントをいただけるとありがたいのですが。

○安達専門委員 これはなかなか難しいところかと思えます。確かに 10^{-7} は、少し厳し過ぎるというか、低過ぎるとは考えております。ただ、具体的に幾つがいいのかということとはなかなか難しいところかと思えますけれども、確かに、もう少し緩くした場合にどんなものがひっかかってくるかというのは、一度データを示していただいたほうがいいのではないかと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

終わりまで含めまして、どこでも結構ですので、いただければと思います。少々この *ZGL* 遺伝子のこの発現カセットを増幅させるところでいろいろと手の込んだことをしております、19ページにその概念の図があるのですが、これはあくまでも概念図でして、実際はこの●●●コピーずつが●●●に入って●●●コピーになっているのです。幾ら概念だからイメージだけが伝わればいいとはいえ、これだとぱっと見ですと●●●コピーにも見えますし、概念とはいえ、もう少しミスリードをしない絵を要求したいなと思うわけです。

もっと問題は20ページでございまして、この発現カセットが挿入された位置についてサザンの絵があるのですが、レーン5、矢印のところにはバンドがあるはずなのと言って、薄いからバンドを示していると言っているのですが、確かによく見ると見えるような気もするのですけれども、これをもって認めていいか、その辺も御意見をいただきたい。どうぞ。

○児玉専門委員 今のサザンのところは、肝心かなめのところが薄いので、コントラストを上げて、ほかのものが真っ黒になったときにきれいに見えてくれればそれでもいいとは思いますが、それでも見えなかった場合はやり直してもらったほうがよろしいかなとは思いますが。

○中島座長 私もそう思います。要は、バンドが確認できるということが重要なので、全体が汚くなってしまってもいいから、バンドを確認できるようなデータを出していただきたいと私も思うわけなのです。

ほか、先生方はございますでしょうか。

どうぞ。

○児玉専門委員 もう一点、よろしいですか。27ページを見ると、幾つかの国では承認されているようなので、流通実績が実際にあるのかないのかということは、来られるのでお聞きすればよろしいかなとは思いますが、その点を何も書いていないので、流通しているのだ

ったらこのくらい流通していますよということはお聞きしたいなと思います。

○中島座長 許可にはなったとは書いてあっても、これがどの程度流通しているのかが書いて
ごさいませんので、私もそこは安全性のところでは重要だと思いますし、また、それが物すごく
たくさん流通しておるのであれば、考えようによっては物理化学試験を免除してもいいのかな
とも思うのですが、これが許可はされたけれどもよくわからないとか、そういう答えであつた
ら、安全性を担保するためには物理化学試験をお願いしたほうがいいかなと、私もそのように
思いますので、その辺の感触をいただくためにも申請者に直接問いただしたいと思います。

ほか、先生方、よろしいですか。

少々整理いたしますと、児玉先生から、従来品の情報がほとんどないということでこの比較
検討が難しくなっていると。既存なのか、流通はどうなっているのか、アミノ酸配列とか、こ
の辺はもう少し従来品についてきちんと書いていただきたいということ。

川西先生から、4ページ、加熱で失活は本当なのか、消化管で消化されるかどうか、こうい
ったところについての情報。

安達先生から、一部私から、直接先生からも質問していただければと思うのですが、これは
アレルギー等の検索についての一連の御指摘がございました。

川西先生から、マイコトキシンをどうやって調べたのか、●●●となっているけれども、こ
の辺の根拠を示していただきたいといったこと。12ページで、既知アレルギーのところもヒッ
トをしておるのですが、接触アレルギーは経口アレルギーとしては問題になるのか。この条件
でアレルギー検索をすると大抵は1つや2つひっかかったりもしまして、ひっかかりはするけれ
ども、実際にヒトに健康被害を及ぼす可能性は少ないといった考察をしていただくことになる
のですが、その辺は説得力のある考察をお願いしたいということで、趣旨としてはそんなと
ころでよろしいですよ。E-valueについても、ルールで決まっているわけではありませんが、
 10^{-7} は少々厳し過ぎると。みんな可能性のあるものは落ちてしまいかねないレベルなので、こ
の辺のところをもう少し一般的なレベルでお願いしたいといったこと。また、この流通実績に
ついて。

大体こういったところかと思うのですが、申請者の方をお呼びしたいと思うのですが、また
その場でお気づきになりましたことがあったら、直接お尋ねいただければと思います。

申請者を呼んでいただけますでしょうか。用意ができるまで少しだけ休憩になりますので、
トイレ休憩等をどうぞ。

○中島座長 お忙しいところ、お越しいただきまして、ありがとうございます。

それでは、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。

○DSM株式会社（渡辺氏） DSMの渡辺と申します。よろしくお願いいたします。

○DSM株式会社（星野氏） 星野と申します。よろしくお願いいたします。

○DSM株式会社（佐藤氏） 同じく、DSMの佐藤でございます。よろしくお願いいたします。

○中島座長 いろいろ見させていただきまして、少々読みにくくて、あちこち意味がとりづら
くて困ったところとかもあるのですが、最初に、3ページ、安全性というのは従来品との比較

検討で行うのですが、この従来品についての情報が、既存のものをどのように使っているかとか、流通実態はどうかとか、そういったことが具体的にほとんど書いてありませんので、これですと、従来品との比較も何も、ベースのところがよくわからないので、これだと困るのですが、もう少し充実して書いていただきたいと思うのです。従来品については、このぐらいしか情報は無いということなのでしょう。

○DSM株式会社（佐藤氏） 弊社としまして、この *Penicillium* の遺伝子を使ったというか、この *Penicillium* で製造しましたグルコースオキシダーゼを持っていないということで、比較対照がなかなか難しかったのですが、ほかの微生物でつくったもの等の比較でよければ、持ち帰って確認して解答させていただければと思います。

○中島座長 グルコースオキシダーゼというものは、いろいろな微生物でつくられたものが、また、近縁の *Penicillium* なり何なりでつくられたものが既に流通して使われておりますので、そういったものに関する情報をできる限り詳しく記載していただきたい。

児玉先生、つけ加えることはございますか。

○児玉専門委員 *Penicillium* に限らなくて、ここに書いてあります *Aspergillus* でも *Acremonium* でも、そういったもので手に入る情報があれば、それを記載していただいて、それと本品との比較検討で我々は判断していくというところもありますので、そういったところの情報を、他社さんのものでもなるべく手に入るころは入れていただいて載せていただきたいなと思います。

似たような話になるといえばなるのですけれども、グルコースオキシダーゼは酵素なので、この申請書は酵素としての記述が全くなくて、酵素ですので、至適pHとか、失活する温度とか、そういった基本情報みたいなものを、できればきちんとこの本品に関して載せてほしい。完全な新規の場合ですと、本当にそれはグルコースオキシダーゼなのかというところから入ったりもするので、そこは今回で求めるか求めないかは内容次第だとは思いますが、非常に厳しく言うと、本当にグルコースオキシダーゼかというところから始まって、それはグルコースオキシダーゼと証明するに当たっては、立体構造をモデリングして、同じ構造をしていますと求める場合もあるわけですね。今回で求めるか求めないかというのはケース・バイ・ケースなので何とも言えませんけれども、少なくとも、グルコースオキシダーゼという酵素、本品の酵素についての説明も少し足してほしいと思います。

○川西委員 付随した話なのですが、添付資料でアミノ酸配列が同じですよというものがありますけれども、そもそもがこのアミノ酸配列はわかるけれども、スタンダードとして使ったものが一体何かということを示して、その上でそれをしないと比較したことにならないと思うのです。これはその辺が全体に甘いと思います。

○中島座長 おわかりですか。不明瞭なところがあつたら、そちらからこの点はどうなのかと言っただけであれば。なるだけコミュニケーションをとって、こちらからも、要求したいことはわかりやすく誤解なく伝えたいと思いますので。

○DSM株式会社（佐藤氏） お聞きしてもよろしいですか。特に酵素としての情報、従来品の

情報としては、特に使い方と流通の状況ということなので、どのような他社品でも、販売しているとか、そういうこともという感じでしょうか。

○中島座長 実態がわかるように、これの一番最も類似しているものはどのように使われているか、そういった情報をいただければ、こちらとしても判断しやすくなりますので、お願いしたいと思います。

○DSM株式会社(佐藤氏) あとは、その酵素自体の特徴として、至適pHと温度の耐性とか、そういう情報ということですか。

○中島座長 本品についてはまた別でして、この本品についての至適pH等々の情報は当然必要でして、何でないのかなと思ったわけでございます。

それから、これを実際に使用した場合、パンですから、加熱をして失活、消化管で消化されると簡単にあるのですが、この辺は川西先生から御指摘があったので、今度は先生から聞いていただけますか。

○川西委員 こういうものの評価のときに、最終的に私たちが口にするときに残っているかどうか。消化管中で分解されてその物自体が完全に消化されるということをきちんとデータとともに示すということはとても大切なことだと。

3行で書かれても、はい、そうですかという具合にはなかなかいかないもので、まず、最初の「本品は」から「残存しないため」というのは、何かの文献でも今までのこういうことで通常使われる条件だとなくなりますよということでもいいのだろうなどは私は思います。いずれにしても、「残存しないため」とここで説明の根拠になるようなことをいただきたい。

それから、消化管で「他の摂取タンパク質と同様に消化される」も、こういう論法で自分たちは消化されることが言えるということであればまた別なのですけれども、これはただ「消化される」で終わっていますので、もし何か論法を持っていないなら、きちんとデータで示していただきたい。これはほかでも共通していることなので、そこはぜひともお願いしたいと思います。

○中島座長 それでは、根拠を示せということで、川西先生から、もう一つの御指摘、9ページ、マイコトキシンのところについても先生からコメントをいただけますか。

○川西委員 この手のもので、先ほどの分解するかというのはグルコースオキシダーゼそのもののほうですけれども、同時に、製品に混入してしまうものの評価は極めて重要で、9ページ目、「2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」の最後で、「本酵素原体について試験した結果、これらのマイコトキシンは含まれないことが確認されている(添付資料10において、「Mycotoxins」としてオクラトキシンA及びフモニシンが確認されている)」と書いてあるのですけれども、添付資料10は●●●と書いてあるのですね。これは、●●●のほうには書いてあるだけで、何をやったのかということは何も示されていない。いろいろなプレゼンの方法はあると思いますけれども、これは、「含まれないことが確認されている」の証拠というか、その説明にはなっていないと思いますので、そこは非常に重要なポイントでもありますので、ぜひともお願いします。

○DSM株式会社（渡辺氏） 今のところは、具体的にどういった試験を行ったのかということをお知らせして御提示したほうが良いということでしょうか。

○川西委員 通常は、それで●●●とか、そういうものが多分あると思うのですよね。公定試験法で、例えば、JECFAの規格などに入っていればまた別なのだけれども、それは特段この物に対してはないので、どういう方法、基準で自分たちは評価しているかということをお知らせした上で●●●と言わないと思います。

○DSM株式会社（渡辺氏） わかりました。

○中島座長 この遺伝子につきまして、11ページには、本品は「既存の*Penicillium*属由来のグルコースオキシダーゼと同じであり」とあるのですが、この宿主に使った*Penicillium*のグルコースオキシダーゼがそのまま流通しているということなのでしょうか。

○DSM株式会社（星野氏） 流通品の遺伝子組換えの*Penicillium*グルコースオキシダーゼ由来のグルコースオキシダーゼは流通として認められていないので、その流通しているものの配列は私どもではわからないという状況です。

○中島座長 そうなことでありますと、本品は遺伝子組換えの酵素として安全性試験を受けるものとしては新規のものであると考えられるので、流通品でこれと全く同じのものであってそれがかなりの量が流通しているということであれば話は別なのですが、わからないと、それは事情としてはわかるのですが、そういうことでありますと、本品についての安全性を担保するためには、通常は人工胃液試験や人工腸液による分解試験をお願いしておりますが、本品についても、人工胃液でどのくらい溶けるのか、人工腸液についての試験をお願いしたいと思うのです。これがルールにもなっておりますので。

安達先生からつけ加えることはございますか。

○安達専門委員 今の点に関しては、私からは特にはございません。

○中島座長 通常の物理化学試験のデータを、そんなに難しい実験ではないと思いますので、本品をそのまま試験にかけていただければそれでよろしいと思いますので、よろしくお願いたしたいと思います。

○DSM株式会社（佐藤氏） もし流通していれば不要という理解でよろしいのですか。

○中島座長 それでも無条件に不要になるかどうかはともかく、わからないとおっしゃったので。

○DSM株式会社（佐藤氏） 調べてみて、もし存在していれば。既に前例があるということであれば。

○中島座長 その場合は、その流通品がめちゃくちゃメジャーに流通していて、しかも事故なく相当の期間広まっているということであるならばいいのかなという話にもなるのですけれども、その辺の判断はまた個別になりますので、物理化学試験はぜひお願いしたいとお考えいただければと思います。

ついでなのですが、このZGL遺伝子については、アレルゲンのこのデータベースで検索をして、その結果について1つヒットしていると。既知のアレルゲンの皮膚の常在菌とこれとのア

レルゲンがヒットをしておるということで、これについて、何しろこれだけアレルゲンのデータベースで検索をかけますので、ちょっとでもヒットをしたら絶対にだめというわけではないのですが、ヒットはしているけれども、こういう理由で実際にヒトに健康被害を及ぼす影響はほとんどないと考えられるときちんと考察していただきたい。これだと考察とは言えなくて、このまま見ると、これがあるからだめなのではないかと言われたら終わりという書き方にもなっておりますので、その辺を考察のところをお願いしたいと思います。

つけ加えることはございますか。

○安達専門委員 先ほどのデータベースを検索した時期に関して。

○中島座長 それもなのですが、この挿入遺伝子について、周辺の新たなオープンリーディングフレーム等々については2018年にデータベース検索をかけておられるのですが、肝心かなめのZGLについては2013年にかけておられて、5~6年ありますとその間にアレルゲンのデータベースの更新等はあったと思いますので、再度アップデートをされたデータベースで、アミノ酸配列について検索を行って、ヒットをするようなものがございましたら、だからといってそれは健康被害を及ぼすものではないといった考察をきちんとお願いしたいと思います。

よろしいですか。

19ページのところ、多コピー化するために割と手の込んだことをしておりまして、そこは一生懸命書いていただいている、なかなかわかりづらい。これは仕方がないと思うのですが、図10のところにはこれを説明する概念図がございます。これはあくまでも概念図でして、実際は●●●コピーずつ●●●で●●●コピーを得ている。でも、この概念図はぱっと見ですと●●●コピーにも見えまして、かえってミスリードをしますので、もう少しわかりやすくというか、この菌株のZGL遺伝子の増幅についてきちんと把握できるような図にさせていただくと、ありがたく思います。

20ページでございますが、これが●●●コピーになっていると。この肝心なところを示すサブプロットのデータが、見えにくいから矢印で示していただいているのですが、そこを一生懸命見ても、あるのかな、ないのかなといったところです。このバンドがきちんと確認できることが重要だと思いますので、例えば、これは全体が少々汚くなってしまってもいいからもう少し濃くして、それでバンドの確認ができればいいですし、できないということであれば、これはゲルの上のところを見てみますと、それなりにDNAはアプライしていると思いますので、それでもだめということであれば、この実験は少々不備があるように思われますので、それだったらさっさとやり直すほうが早いかと思います。

26ページ、既知のアレルゲンデータベースとの相同性の検索のところは、E-value<10⁻⁷をこの指標とある。どのレベルでカットをしていいか、これは統一基準とかが指定されているわけではないので、直ちにこれではいけないというわけではないのですが、10⁻⁷は一般的にやるときにおいて少々辛くないかということです。つまり、これは辛過ぎると当然ひっかかるべきものが落ちてしまうことにもなりかねませんので、どのくらいのレベルならいいのかという話にもなるのですが、通常、10⁻⁴とか、そのくらいのところがよく見かけるという話等も来ており

ますので、この辺は、単にコンピューターワークですので、もう一度再検討していただければと思います。また、10⁷でもいいというのであれば、それで十分であるという根拠を示していただければと思います。

○児玉専門委員 今の点から1つ、先ほど事務局に確認したところ、表現にも不備があるので、検索条件を正しく記載していただいて、こういうものがヒットをしましたよという形で表現をも一度見直していただいて、正しく伝わるように記載していただきたい。

○中島座長 よろしいですか。

最後に、27ページ、諸外国における認可、食用等に間する事項で、オランダ、カナダ、デンマーク、フランス、メキシコ等で使用が許可されている。これは実際のところどのくらい流通しているのかといった、許可はされていても種々の事情で実際に販売されていないとか、流通していないとか、そういったこともあり得まして、それは必ずしも安全性に問題があつてということではないかとも思うのですが、可能であれば、これがどの程度流通して、実際のところ流通しているのか、その辺もお願いできれば。できれば、それぞれの国で何年に許可になってとか、もう少し詳しく記載していただけますと、その流通実態を見て、そういうことであるならば、人体実験というのはなんですが、既にこの安全性は十分に担保されておるとも判断できますので、もう少し詳しい情報をお願いしたいと思います。

先生方、ほかにこの場でお気づきになったことでもございましたら。この場でできる限り全て指摘しておきたいと思っております。

○吉川専門委員 9ページですけれども、これは安全性にかかわることではないのかもしれませんが、「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「ウイルス等に汚染されているとの報告はない」とありますけれども、この菌からもウイルスは出てきますので、ちゃんと分離されていますので、添付資料7は2002年ですけれども、最近マイコウイルスもたくさん報告されていますので、正確に記載したほうが良いと思います。

○中島座長 どうぞ。

○児玉専門委員 いろいろ調べ直してもう一度提出されるということになるかと思っておりますので、細かいところですが、23ページの図13ですが、最後、Creリコンビナーゼでマーカーが抜けたという図になっていますけれども、この間に次のページのリンカーが挟まって残っていて、これを足すと●●● bpぐらいという結構大きいものが残るので、図にもそれが反映されるようにしてほしいのです。本当にきれいに抜け落ちていて、何も問題ないですよみたいな図になっているので、そこはリンカーが●●● bpぐらい残ってしまっていますよみたいなものが、簡単でいいので、わかるような図にしてもらえると、より正しいかなと思います。

これは座長の御意見にもよるかとは思いますが、2ページの菌株系統図で、●●●「遺伝子変換による」と書いてあるのですが、2ページの「多重化」かなと思うのですが、「遺伝子変換による」よりは多重化●●●というほうが良いかなと思うのですが、「遺伝子変換」というのは私は余りなじみがなくて、「多重化」なら非常にわかりやすいかなと思ったのです。

○中島座長 もっともだと思っておりますので、誤解のない書き方に。「変換」と言うと、また何を

やったのかと細かく見ないといけないのですが、「多重化」と言っていただければ、そうかで済みますので、その辺はよろしく願いいたします。

先生方、ぜひこの場で指摘できることは全部指摘しておきたいと思いますので。何回もやりとりをするというのはこちらも不本意ですので、小野先生、よろしいですか。

○小野専門委員 大丈夫です。

○中島座長 よろしいでしょうか。

それでは、言いたい放題言わせていただきましたが、御検討をよろしく願いしたいと思います。どうぞ。

○DSM株式会社（佐藤氏） 1点、よろしいですか。

販売に関する27ページのところなのですが、既に諸外国で販売はございます。使用もございますが、お客様あってのことなので、そういうところも加味いただければと思います。売れる、売れないというのは、弊社が売りたいくても売れないということもございますので。

○中島座長 その辺は御心配なく。できれば、結構な量が売れているのであれば、何トン程度売れているとか、そんなことも書いていただけるともっと安心できるのですが、そうでなければ何年に流通しているとかと、データをお願いいたします。

○DSM株式会社（佐藤氏） 何年に開始ぐらいかと。

○中島座長 先生方、ほかによろしいでしょうか。

ありがとうございました。お疲れさまでした。

○中島座長 審議に戻ります。

ただいまの回答を含めて、コメント等はございますでしょうか。それも何もと思いますが、先生方からいただきました意見、確認事項等、今度は指摘事項案として取りまとめまして、その作業は結構大変かと思いますが、御指摘された先生にこれでよいかと事務局から行くと思いますので、後ほど御確認をお願いいたします。その後、厚生労働省を通じて申請者に対して文書で指摘したいと思いますが、それ以前にきょうのこれで大体伝わったとは思いますが、手続上、こういうことになってございますので、よろしく願いいたします。

今のうちに、つけ加えたい、お気づきになりました点や御意見はございますでしょうか。

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、その他ですが、事務局から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。

本日の議題については、これで終了でございます。

以上をもちまして、第194回「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。ありがとうございました。