

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## (第201回) 議事録

1. 日時 令和2年7月16日(木) 14:30～17:41
2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)  
(Web会議システムを利用)
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
    - ・JPAN003株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
    - ・JPAN007株を利用して生産されたヘミセルラーゼ
  - (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、小関専門委員、  
小野専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、近藤専門委員、手島専門委員、  
樋口専門委員、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)  
鋤柄事務局次長、箴島評価第二課長、蛭田評価情報分析官、  
松原課長補佐、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
  - ②JPAN003株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
  - ③JPAN007株を利用して生産されたヘミセルラーゼ
6. 議事内容

○中島座長 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第201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、非公開で行います。

皆さん、カメラを入れてお顔を見せてくださいませ。

また「テレビ会議又はWeb会議システムを利用した食品安全委員会等への出席について」に基づき、Web会議システムを利用して行います。

本日、所用により山川専門委員が御欠席でございます。

本日の議題ですが、継続品目であるZGL株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ及び新規品目であるJPAN003株を利用して生産されたグルコアミラーゼ、JPAN007株を利用して生産されたヘミセルラーゼの安全性についての審議でございます。

お手元の資料を確認いたしますので、事務局のほうからお願いいたします。

○松原課長補佐 資料の確認を行います前に、事務局の人事異動がございましたので、御報告いたします。

7月1日付で、課長補佐の飯塚の後任として、私、松原が着任しております。よろしくお願いいたします。

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、専門委員名簿、「食品健康影響評価に関する資料」、そのほか、机上配付資料が1から4までございます。以上となっております。

また、本日は、新規品目の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。当該品目の審議の際に入室いただき、質疑に対応していただく予定でございます。

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、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御報告をお願いいたします。

○松原課長補佐 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、御報告申し上げます。

本日の議事に関しましては、専門委員から頂きまし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でした。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

既に御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。

ありがとうございます。

それでは、まず、継続品目である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行いたいと思います。これは令和元年10月の専門調査会において審議を行ったものです。

では、説明をお願いいたします。

○山口係長 それでは、申請者から提出されております回答書について御説明いたします。お手元に青色のファイルを御用意ください。

まず、1ページをお願いいたします。

指摘事項1でございます。*Penicillium chrysogenum*由来の野生型グルコースオキシダーゼを従来品として、本申請品と比較することにより、その安全性を論じているが、従来品に関する流通実績、生化学的特性などの基本的情報が記載されていないことから、本申請品の安全性評価を十分に行うことができない。このことを考慮した上で、比較する従来品を特定し、そのグルコースオキシダーゼの酵素としての生化学特性及び流通実績、本申請品との相違点並びに安全性に関して、具体的なデータを提示して論旨を記載することといった内容でございます。

これに対する回答としては、次の3ページをお願いいたします。第1-6-(1)に要旨では相当いたしますが、これに比較した表を追記しております。表3にまとめたということですが、●●●についてまとめられております。また、●●●と*Penicillium chrysogenum*由来の●●●のアミノ酸配列は同一であることを確認しております。

続いて、3ページの下から指摘事項2でございます。「最終食品中には酵素活性が残存しないため」とありますが、これに関してデータの提出や文献による説明を求めています。

ZGL株グルコースオキシダーゼが添付資料29-1、野生型由来のグルコースオキシダーゼが添付資料29-2で、2つの資料を基に回答してきております。4ページの下になりますが、図9にもありますとおり、70℃で2分間以上の加熱で失活することが確認されたということです。

続いて、5ページから指摘事項3になります。添付資料10において、Mycotoxinsの分析結果が「absent by test」と記載されておりますが、absentと判断した際の試験法及び判定基準を示すことという指摘内容です。

トリコテセン等をそれぞれGC/MS、HPLCまたはLC-MS/MSで分析しており、検出限界は回答書に記載のとおりでございます。

続いて、指摘事項4です。物理化学的処理に対する感受性試験を実施し、その結果を示すことということです。

申請者は、この指摘を受けて試験を実施してきております。その結果は6ページの図8にもあるとおりでございますが、人工胃液、人工腸液ともに15分以内に消化されるという結果でございました。

その下、6ページの下から指摘4.2ですが、アレルゲンデータベースの検索日が古いこと



それでは、指摘事項1番でございます。要旨の3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、これは遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点。そういったところで、生化学的性質、従来品に関する流通実績などの基本的情報が記載されていないといったところで、その辺をきちんと報告してくれという御指摘でございました。

これはたしか児玉先生でありましたけれども、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 適切に修正されて、これでよろしいかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

私もこのくらい書いていただければいいのかなという印象ですが、先生方、いかがでしょうか。よろしいですね。

ありがとうございます。それでは、ここはクリアということで、次、要旨の4ページ、第1-4-(4)で、摂取量について。これは「最終食品中には酵素活性が残存しないため」と記述にはあるのですが、これを示す具体的なデータまたは文献を基に、ちょっと根拠を示して説明していただきたいという御指摘でございました。

これはたしか川西先生の御指摘ですが、先生、いかがでしょう。

○川西委員 これは大体、適切にお答えいただいている。それから、追加資料も出しているようですので、これで結構だと思います。

○中島座長 私もそれなりに対応していただけているなと思うのですが、先生方、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。

それでは、要旨の9ページ、病原性に関する事項で、添付資料10で、**Mycotoxins**の分析結果が「**absent by test**」と書いてあるけれども、その**absent**と判断した基準等について根拠を示していただきたいという指摘でございました。

これも川西先生の御指摘でしたが、先生、いかがでしょうか。

○川西委員 これも適切な回答だと思います。最初からこういう感じで出していただけると助かります。

○中島座長 同感でございます。そうしたら、お互い手間が省けたのにと実は私も思うのですが、先生方、これはいかがでしょうか。よろしいでしょうか。

オーケーですね。ありがとうございます。

それでは、次に要旨の11～13ページ、第4-2-(3)で、挿入遺伝子の機能に関する事項で、本申請品の消化性に関してはこれを示す根拠データがない。それで感受性試験、これは人工胃液・人工腸液と実施して結果を示していただきたい。また、既知のアレルゲンとの相溶性の検索日が結構古いので、最新のデータベースでやっていただきたい。

これは安達先生と私だったと思いますが、安達先生、いかがでしょうか。

○安達専門委員 安達でございます。

適切に修正していただいているものと思えます。

○中島座長 私も最初からこういうふうにやっていただければ手間が省けたのにと実は思

った次第なのですが、先生方、いかがでしょうか。これもよろしいでしょうか。

よろしいようです。ありがとうございます。

それでは、次に進めさせていただきます。次は要旨の19～23ページ、DNAの宿主への導入方法に関する事項で、これは少々手の込んだ方法で挿入しておりますし、また、コピー数についてもありますので、この遺伝子変換による目的DNA配列多重化の概念図は、実際の挿入コピー数に即して修正することと、それから、サザンブロットのデータで、これではコピー数をきちんと判断できないので、バンドが確認できるデータを示すこと。これについては、サザンブロットではなくゲノムシーケンスを行うという方法でデータを示していただいております。

これについて、これは私と児玉先生の指摘で、私は絵は分かりやすく描けていただいていると思いますし、また、ゲノムシーケンスで確認していただいて、これで結局7コピーという数字が明らかになっています。それは当初言っていることから話が違うのではないかと思いますけれども、このゲノムシーケンスで新しい方法できちんとやっていただいて、かつ入っている遺伝子は完全な形であることを確認してあるということなので、私はよろしいかなと思います。

児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 私も、修正とゲノムシーケンスのほうのデータはこれでよろしいかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

ほかは先生方、よろしいでしょうか。

それでは、修正事項です。要旨の2ページ、この菌株系統図のステップ3で「遺伝子変換による」。これは「遺伝子多重化による」とか、この修正について、修正されていると思いますが、児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 これでよろしいと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

要旨の7ページ、図4の製造工程フローチャートで、精製工程及び製品化にあたり添加した物質やその工程を詳しい記載に、詳しいとまでは要求していないのですが、書いていただきたい。これは私からですが、この程度書いていただければよろしいかなと私も思いますけれども、先生方、よろしいでしょうか。

では、要旨の9ページ、第2-4で、病原性のウイルス等に汚染されていないことに関する事項。これは2002年の論文を根拠に記載しているが、もうちょっと新しい知見はないのかという御指摘で、これは吉川先生の御指摘ですが、先生、いかがでしょうか。

○吉川専門委員 これはたしか、この菌がウイルスに感染している報告がないという記載だと思うのですが、ここで言うのはいわゆる病原性ということで、ヒトに対する病原性を示すということだと思いますので、菌類ウイルスがヒトに感染したりヒトに病原性を示すことはありませんので、これで構わないと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

ほかは先生方、よろしいでしょうか。

次に、要旨の13ページで、接触アレルゲンであるmalas 12が検出されていることから「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」というのは書き過ぎで、ヒトの健康影響評価などの考察を、適切に考察し直していただきたいという指摘でございます。

これは安達先生と児玉先生ですね。安達先生、いかがでしょうか。

○安達専門委員 安達です。

適切に修正していただいているものと思います。同じアミノ酸配列の既存品で、アレルギーの報告がないことから、アレルギー誘発性を示す可能性は低いと考えるという記載にさせていただきましたので、これでよいのではないかと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 書ける範囲としてはこれぐらいだと思いますので、これでよろしいと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

確かに、このくらいしか書きようはないかなと私も思いますけれども、先生方、ほかはいかがでしょうか。よろしいでしょうか。

では、もう一つ、要旨の26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、既知のアレルゲンとの相同性検索はE-valueには適切な値を指標として、再度検索を行うこと。もしくは $10^{-7}$ で本当にいいのか。そういった議論に関する指摘でございました。

これも安達先生と児玉先生でございました。安達先生、いかがでしょうか。

○安達専門委員 これは基本的に書き間違いであったということで、正しくはE-valueが10以下ということで検索をしたというふうに修正いただいておりますので、これでよろしいかと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 E-valueが10なら全く文句はありません。これでよろしいかと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

そこまででなくても納得したからですけれども、7乗ではという感じでしたので、私もよろしいかと思います。

ほかの先生方、いかがでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、修正の6番目、要旨の27ページ、第7-1、諸外国における認可、食用等に関する

る事項において、各国ごとの流通実績や認可された年などを詳細に記載し、修正すること。

これは児玉先生の御指摘でしたが、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 販売されている国の数とかが一応追記されていますので、これでよろしいかと思えます。

○中島座長 ほかは先生方、いかがでしょうか。そんなに詳しくなったわけではないけれども、このくらいの実績が書いてあればよろしいかなと私も思います。

それでは、シーケンスの解析で、もとのコピー数の図がこの修正版で新しく●●●コピーであることが判明していて、これが当初の申請とは変わっておるのですが、この点についてはいかがか。一通り先生方の御意見をお聞きしておきたいとは思っています。

私は、ゲノムシーケンスできちんと確認していただいているので、この新しい申請書をもっていいのかなと思うのですが、先生方、この辺、よろしいでしょうか。

○中島座長 ありがとうございます。カードを使っていただけて、とても助かります。

ほかに本申請の修正版につきまして、御意見等はございますでしょうか。

では、安全性については、懸念はないと判定してよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

では、評価書案の審議に入ります。事務局のほうからお願いいたします。

○山口係長 続きまして、評価書案について御説明いたします。下のほうにページ番号を振っておりまして、2ページからが本品目の評価書になります。

まず、7ページをお願いいたします。I.概要でございますが、*Aspergillus niger* ISO-528株を宿主としまして、*Penicillium chrysogenum*由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子を導入して作製したZGL株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼでございます。本添加物は、β-D-グルコースをD-グルコノ-1,5-ラクトンへと酸化する酵素であり、製パン及び製菓工程において生地を柔軟性を改善する目的で使用されます。

その後、II以降には食品健康影響評価に係る個別の項目を記載しております。

まず、第1.1.(1)ですが、名称はグルコースオキシダーゼ、基原は糸状菌、有効成分はグルコースオキシダーゼです。

(2)製造方法ですが、糸状菌の培養液から抽出し、除菌、ろ過等の製剤化工程を経て製造されます。

(3)用途及び使用形態ですが、食品の加工貯蔵工程において、グルコースの存在による品質劣化を防ぐ目的で使用されます。また、反応生成物の過酸化水素が製パン及び製菓用の生地中で酸化剤として作用することから、記事に柔軟性を持たせる目的で使用されます。

(4)摂取量ですが、小麦・加工品のうちパン類、菓子パン類、その他の小麦・加工品の製造に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は0.0094mg TOS/人/日でございます。

続きまして、2.(1)宿主の種名等ですけれども、宿主は*A. niger* ISO-528株。こちらは*A. niger*野生株NRRL3122から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しま

す。

(2)DNA供与体の種名等ですが、グルコースオキシダーゼ遺伝子の供与体は*P. chrysogenum*でございます。

(3)挿入DNAの性質ですが、*ZGL*遺伝子は*P. chrysogenum*由来のグルコースオキシダーゼをコードし、シグナル配列が切断され、成熟型となります。グルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター、*ZGL*遺伝子及び*glaA*遺伝子のターミネーターを含む*glaA*遺伝子の下流配列から構成される*ZGL*遺伝子発現カセットを、プロトプラスト・PEG法により宿主ゲノムの標的部位に導入しております。

続いて、3.食経験等ですが、*A. niger*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。*A. niger* ISO-528系列株は、アスパラギナーゼの生産菌として使用されております。

4.宿主の構成成分についてですが、*A. niger*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レベル1に相当します。

5.組換え添加物の性質です。(1)は記載のとおりです。

(2)製造方法ですが、従来のグルコースオキシダーゼと同様の工程を経て製造されます。

(3)用途及び使用形態ですが、*Bakezyme GO Pure*は顆粒製剤として、従来のグルコースオキシダーゼと同様に、製パン及び製菓の工程において生地に柔軟性を持たせる目的で使用されます。

(4)有効成分の性質及び従来の添加物との比較ですが、こちらは従来のグルコースオキシダーゼと同様でございます。

続いて、6.(1)は記載のとおりです。

(2)組換え体と宿主との相違点ですが、*ZGL*株には*ZGL*遺伝子が複数コピー導入されグルコースオキシダーゼ産生性を獲得している点、また、グルコースオキシダーゼの生産性を高めるために生産性に関与する遺伝子を欠失している点及びその過程で挿入された*lox*及び*nicB*リナー配列が残存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、第2以下の事項について評価を行っております。

第2.宿主に関する事項ですが、1.は記載のとおりです。

続いて、2.病原性について、*A. niger*が病原性を有したり有害生理活性物質を生産するという報告はなく、バイオセーフティレベル1に相当します。また、*A. niger*はオクラトキシンA及びフモニシン合成遺伝子を有しますが、*A. niger* ISO-528株はこれらのマイコトキシンを生産しないことが確認されております。

3.から5.については記載のとおりでございます。

続いて、第3の項目です。遺伝子導入用ベクター*pGBTOPZGL-1*の作製には*E. coli*由来のプラスミド*pTZ18R*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ございます。

続いて、第4の項目です。1.(1)は記載のとおりです。

(2)安全性についてですが、*Penicillium*属は、グルコースオキシダーゼの基原として安全に使用されており、バイオセーフティレベル1に相当します。

2.(1)です。*ZGL*遺伝子は、*P. chrysogenum*由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子の配列を基にコドンの最適化を行い、化学合成されております。

(2)は記載のとおりです。

(3)でございます。*ZGL*遺伝子がコードするBakezyme GO Pureは細胞内でシグナル配列が切断されます。

①挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性ですが、*P. chrysogenum*のアレルギー誘発性は知られておりません。

②ですが、Bakezyme GO Pure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ありません。

③物理化学的処理に対する感受性です。まずa.人工胃液の知見ですが、SDS-PAGE分析を行った結果、試験開始後15分以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。b.人工腸液では、SDS-PAGE分析を行った結果、試験開始後15分以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。続いて、c.加熱処理に対する感受性ですが、70℃2分で失活することが確認されております。

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。Bakezyme GO Pure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、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が検出されております。mala s 12は接触アレルゲンとして登録されております。また、連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは見出されない結果となりました。

3.でございますが、こちらは記載のとおりです。

4.組込方法ですが、プラスミドpTZ18Rに、*ZGL*遺伝子発現カセットを挿入することにより、遺伝子導入用ベクターを作製しております。

5.(1)ですが、遺伝子導入用ベクターより、制限酵素処理を行い*ZGL*遺伝子発現カセットを分離し、単離されたDNA断片を形質転換に用いております。

続く(2)から(4)は記載のとおりです。

6.DNAの導入方法ですが、宿主ISO-528株の親株に複数箇所存在する*glaA*遺伝子座を、プロモーター領域及びコード配列を欠失させ制限酵素で標識したプラグ部位とし、●●●複数の遺伝子の欠失等を行い宿主ISO-528株を得ております。●●●を挿入したプラグ部位に、*ZGL*遺伝子発現カセットをプロトプラスト-PEG法にて導入し、*ZGL*遺伝子発現カセットが多重化した*ZGL*株を得た後に、グルコースオキシダーゼの生産性を高めるために、Cre-loxシステムを用いた遺伝子の欠失を行っております。

7.の項目ですが、導入用DNA断片には、抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれておらず、

ZGL株にも挿入されておりません。生産菌構築に用いたベクターに含まれる抗生物質耐性マーカーの残存のないことをPCR法により確認しております。

続いて、第5.組換え体に関する事項です。まず1.ですが、ZGL株は、ZGL遺伝子の導入によりグルコースオキシダーゼ生産能を有している点、遺伝子の欠失並びに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宿主と異なります。

2.(1)ですが、ZGL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PCR法及びサザンブロット分析を行った結果、プラグ部位に複数コピー導入されていることが確認されております。また、標的遺伝子が完全に欠失していることがシーケンス解析により確認されております。

(2)の項目です。挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるORFの有無を確認するために、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いてORF検索を行った結果、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が合計で36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、先ほどのmala s 12以外に既知のアレルゲンは検出されませんでした。

また、既知の毒性タンパク質との相同性ですが、こちらはNCBIデータベースを用いてE-value<0.01を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は検出されませんでした。

欠失させた遺伝子のlox及び*nicB*リンカー配列の残存領域においても同様の検索を行った結果、こちらも検出されない結果となりました。

第6.については記載のとおりでございます。

続いて、第7.1.諸外国における認可の状況ですが、こちらに記載の国で使用が認められております。

2.です。製造工程における不活性化工程後の培養液を用いて培養試験を行った結果、生産菌は確認されませんでした。

3.でございますが、Bakezyme GO Pure製剤前のサンプルは、JECFAの食品用酵素の規格値に適合しております。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としております。

続いて、4.と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、コメントを承りたいと思います。

細かい字句等の修正につきましては後ほど事務局までお伝えいただければと思いますが、先生方、御指摘、御意見等はございますでしょうか。よろしいでしょうか。

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。

それでは、新規品目である、JPAN003株を利用して生産されたグルコアミラーゼについて審議を行いたいと思いますが、これはその次のJPAN007株を利用して生産されたヘミセルラーゼ。これも申請者は同じ、宿主も同じで、導入方法も同じで、●●●入っているということで、違うのは中に入れた目的遺伝子と、それから、その目的タンパク質だけです。それで、目的遺伝子、目的タンパク質の解析方法等も全て共通してございますので、この2件について一括で事務局から説明いただいて審議して、それで質問等につきましても、ノボザイムズの担当者と呼んでありますが、これも一括で行いたいと思いますが、先生方、よろしいでしょうか。

(同意多数)

○中島座長 では、そのようにさくさくと2件まとめていきたいと思います。

事務局のほうからお願いいたします。

○森山評価専門官 それでは、先ほど御説明がありましたが、ノボザイムズ ジャパン株式会社の方をお待ちいただいておりますが、2つまとめて審議いただいた後に質疑応答をしていただきたいと思います。

まず、グルコアミラーゼのほうの説明から入りますので、緑の申請要旨をお手元に御準備ください。

申請要旨の2ページになりますが、今回のグルコアミラーゼと比較対象となる従来の添加物の名称、基原及び有効成分等について、2ページの10行目の辺りから書かれております。

製造方法は、菌株の培養液から抽出、除菌及び精製等の工程を経て製造されるものとなっております。

(3)用途としましては、次のページの図1にありますが、トウモロコシデンプンからデンプン糖を作る製造過程におきまして3つの工程がありますが、その中の糖化工程においてグルコアミラーゼが使われております。

摂取量につきましては、日本の厚労省による国民健康・栄養調査報告の摂取量から算出されました結果、0.029mg TOS/日/kg 体重と算出されております。

次の4ページですが、宿主に関する記載がされております。去年、一昨年ぐらいに既に審議されているJPAN001株、JPAN002株と同じ宿主になりまして、*A. niger* BO-1株となっております。詳細は省略させていただきます。

第1-2-(2)供与体につきましては、次の5ページの表1に挿入DNAの供与体及び性質としてそれぞれ記載されております。ここに使われているプロモーター類についても、過去のJPAN001株やJPAN002株と同じものとなっております。

6ページになりまして、挿入DNAの性質及び導入方法になりますが、宿主の*A. niger* BO-1株に欠失導入用ベクターを用いて*pyrG*遺伝子との入替えにより●●●遺伝子が欠失しております。また、今回の目的である*amgPOPE001/pyrG*遺伝子の発現カセットを●●

●遺伝子座に挿入しております。その際、●●●遺伝子が欠失されて、今回のJPAN003株が作製されております。

次に、7ページからになりますが、それぞれ挿入DNAの性質及び欠失DNAの性質として、図3に目的の発現カセットの記載があります。表2には脱落したDNAについて詳細が書かれております。

8ページ、表3には欠失遺伝子及び欠失に用いられたベクターとして詳細が書かれております。

DNAの挿入方法としましては、8ページの10行目からになりますが、●●●遺伝子座に●●●遺伝子カセットを挿入後、遺伝子導入用ベクターにより組み込まれた●●●遺伝子がコードする●●●インテグラーゼの発現により、この目的カセットを宿主の染色体に導入しております。

詳細は飛ばしますが、10ページの図4に概要が記載されております。

そして、欠失に関しましては11ページから記載されておりますが、まず目的カセットの挿入の際、●●●遺伝子が欠失したこと。そして、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより●●●遺伝子が欠失しておりますが、後ほどまた出てきますが、●●●に関してはセルフクロニングになりますが、●●●遺伝子につきましては異種遺伝子断片の挿入を伴い、一部が残っているので、安全性に関する詳細な解析が後ほどされております。

図5が欠失の概略となっております。

次に、12ページになりますが、第1-3、宿主に関しましては、過去、GMの酵素でも使われているものとなっておりますが、宿主の構成成分として、*A. niger*はオクラトキシンやフモニシンを産生する可能性があるが、このBO-1株に関しましては、マイコトキシンを産生しないことが社内文書で確認されております。

そして、今回の遺伝子組換え添加物の性質及び用途に関しまして、12ページから詳細が記載されております。

製品名等については、ここに記載のとおりです。

製造方法も、従来と同じように、数段階の工程を経て製品化されております。除菌ろ過を繰り返して、生産物から生産菌が分離除去されるということです。

13ページからになりますが、用途についても従来と変わりません。

(4)有効成分の性質及び従来の添加物との比較に関しても従来と変わらず、アミロースを分解する酵素となっております。

14ページ、表4で従来品と今回のGM品との比較がなされております。アミノ酸残基数や性質、至適pH、至適温度について表が記載されております。

15ページの表5には、組換え体と宿主の相違点としまして、目的である *amgPOPE001* 遺伝子が●●●、*pyrG* 遺伝子が●●●挿入されていること。また、欠失されている遺伝子について詳細が記載されております。

続きまして、16ページ、宿主の *A. niger* BO-1株についてのところになりますが、これま

でもGMの酵素の宿主として何度となく出てきております。

17ページになりますが、*A. niger* BO-1株については、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程でバイオセーフティレベル1と分類されております。また、先ほど申し上げましたが、マイコトキシンの産生はしないことが確認されております。

18ページからになりますが、*A. niger*由来のタンパク質によるとして報告されたアレルギーは基本的に特定職種での高頻度暴露によりもたらされるものと考えられるということで、特定職種による暴露によるアレルギーが確認はされております。食経験はあるが、アレルギーとの関連性を否定できなく、孢子が飛散しないよう十分、注意が必要であると書かれております。

以上のように、適切な環境で扱われている限りにおいては、このBO-1株によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられております。

次の第2-3、第2-4、第2-5に関しましては省略させていただきます。

19ページ、第3、ベクターに関する事項になりますが、ベクターの構築に用いたpBluescriptにつきましては、これも過去のJPAN001株、JPAN002株のときと同じものとなっております。詳細は省略します。

21ページ、挿入DNAの供与体に関しまして、今回、目的である*amgPOPE001*遺伝子の供与体は*P. oxalicum* LCT23株。そして、選抜マーカーとして用いている*pyrG*遺伝子は*A. nidulans*のNRRL1092株となっております。

21ページの後段になりますが、安全性に関しまして、*P. oxalicum*は農業やバイオ技術等の分野で広く利用されている旨が記載されております。また、*A. nidulans*につきましても、過去何度となく選抜マーカーの由来として使われているものとなっております。どちらもバイオセーフティレベル1に相当するものとなっております。

次に、22ページ、挿入遺伝子のクローニング・合成方法に関する事項ですが、目的の*amgPOPE001*遺伝子につきましては、*P. oxalicum*のゲノムDNAを鋳型として用い、コードする遺伝子をPCRで増幅して断片を得ております。また、その際、●●●に置換し、この目的の遺伝子を得ております。

続きまして、22ページの後段になりますが、この目的の*amgPOPE001*遺伝子につきましては、●●●を示しております。

そして、23ページからになりますが、この遺伝子の供与体である*P. oxalicum*につきましてPubMedでアレルギーに係る文献検索を行ったところ、ヒットするものは得られておりません。

24ページになります。遺伝子産物につきましても、同様に文献検索を行って、ヒットするものは得られておりません。

続きまして、物理化学的処理に関する感受性につきましてですが、人工胃液に対する感受性は、図9にありますように、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、ともに30秒以内で消化されることが確認されております。

人工腸液につきましては、図10に表示されておりますように、6時間以内で完全に消化されないことが明らかとなっております。

25ページ、加熱処理に対する感受性ですが、30分でそれぞれの温度で加熱処理をしたところ、70℃以上の処理で急速に安定性を喪失し、80℃の処理で完全に失活することが確認されております。

26ページ、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というところになります。FARRP、アレルゲンデータベースを用いて2つの手法で検索を行ったところ、どちらもSch c 1がヒットしております。

その考察が後段に書かれておりますが、このSch c 1は*Schizophyllum commune* H4-8株由来のグルコアミラーゼとなっております。この菌は一般的に観察される真正担子菌で、特定のアレルギー疾患原因菌として認知されるようになったと記載されております。ただ、アレルゲンとして報告されている論文は1報のみで、エピトープレベルの解析には至っておりません。

27ページからになります。申請者としては、このSch c 1と目的のamgPOPE001のアミノ酸配列の相同性は●●●であること。また、一致するアレルゲンのエピトープは認められていないこと。次の28ページに続きますが、人工胃液処理を行ったところ、消化性が高いことが知られていること。そして、想定摂取量のところになります。この目的のamgPOPE001の摂取される可能性は非常に低いこと。

以上のことから、amgPOPE001がアレルギー誘発性を持つ可能性は低く、仮に有するとしても、易消化性及び使用状況からリスクを最低限抑えることができると考えられる。よって、誘発性を有するとは考え難いとしております。

*pyrG*遺伝子の機能等につきましては、従前、これまでも出ているものと同じになりますので、省略いたします。

29ページからのプロモーター、ターミネーター、その他、使用した配列につきましても詳細は省略いたします。

33ページ、第4-5-(2)としまして、ORFのところですが、それぞれの遺伝子座のシーケンス解析は後ほど述べさせていただきます。

第4-6としまして、DNAの宿主への導入方法に関する事項になりますが、●●●遺伝子座に●●●等を挿入し、この形質転換体を●●●による測定で選抜を行いました。次に、●●●を行い、形質転換体を得ております。この中で最も産生量の高いものを最終的にセレクトされております。

34ページの各遺伝子座での詳細は省略します。

35ページになります。抗生物質につきましても、次の36ページに述べているので、省略します。

36ページになります。第5-2-(1)、19行目ぐらいからになります。目的のamgPOPE001遺伝子は●●●あることがシーケンス解析により確認されております。ま

た、挿入領域に抗生物質耐性遺伝子が存在しないことも確認しております。また、●●●遺伝子座において、*pyrG*遺伝子が重複し●●●挿入されていることの確認がされております。

それぞれのシーケンス結果等につきましては、詳細は省かせていただきます。

飛びまして、41ページ、第5-2-(2)で、ORF検索についての記載になります。●●●遺伝子座に組み込まれているわけですが、その●●●遺伝子座と、欠失導入用ベクターを用いた際に欠失した遺伝子の中で、断片が残っている●●●遺伝子座、合わせて●●●につきましてORF検索を行ったところ、41ページの下のほうにそれぞれの結果が記載されております。

そして、42ページ、検出されたORFについて、アレルゲンとの相同性検索を行ったところ、2つの条件で行いまして、先ほどと同じSch c 1が検出されております。

考察につきましては、先ほどと同様となっております。

次に、43ページ、検出されたORFにつきまして、毒性タンパク質との相同性検索を、データベースを用いて行っております。

それぞれの結果が記載されておりますが、44ページの表12、まとめるとこの3つということ記載されております。

それぞれにつきまして、簡単ではありますが、考察が書かれております。いずれにおきましても毒性を起こすという報告はないということで、したがって、これらのタンパク質が毒性を有することは考え難いと考察がなされております。

次に、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につきましては、ここに記載のあるとおりです。これまで従前、長年安全に使用されているものを使っている旨、記載されております。

続きまして、46ページですが、今回のamgPOPE001につきましては、フランス、カナダにおいてポジティブリストに掲載されている旨、記載されております。

そして、47ページ、組換え体の残存に関する記載になっておりますが、ドットプロット分析をした結果、DNAが残存しないことが確認されております。

48ページから製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項としまして、表13に日本の食品衛生法規格基準との比較で分析値が記載されております。

また、49ページ、第7-4、精製方法及びその効果に関する事項としまして、今回の生産菌の培養物は、複数のろ過等の精製工程を経て製品化されている。試験バッチは、培養物をろ過した後に濃縮処理を施したものであるが、SDS-PAGE電気泳動による純度確認において目的以外のタンパク質は認められておらず、純度は●●●以上であったと記載されております。

最後の後段は省略させていただきます。

グルコアミラーゼの説明はこれで終わりますが、このままヘミセルラーゼの説明をさせていただきます。オレンジのファイルをお開きください。

同じく2ページからになりますが、今回、ヘミセルラーゼの比較対象となる従来の名称、基原、反応特異性等が2ページの10行目辺りから記載されております。

製造方法につきましては、同じように菌株の培養液から抽出、精製等の工程を経て製造されております。

用途につきましてはですが、ヘミセルロースの中でも今回はマンナナーゼになりますが、マンナナーゼはインスタントコーヒー製造において、コーヒー豆からの抽出率の向上及びフリーズドライ時のゲル形成抑制を目的として使用されております。そのため、このマンナナーゼにつきましてはインスタントコーヒー製造において使われるもので、添加された酵素は加熱処理によって失活する旨が記載されております。

3ページになりますが、全日本コーヒー協会が実施した調査に基づく消費量が3.95杯/週間/人とありますが、これを基に算出したところ、摂取量としまして33.8 $\mu$ g TOS/日/kg 体重と記載されております。

次に、第1-2、宿主及び導入DNAのところになりますが、宿主は先ほどと同じ*A. niger* BO-1なので、省略いたします。

挿入DNAの供与体及び性質につきましては、表1に記載があります。ここも先ほどとほぼ変わらず、●●●が先ほどと違うところ。あと、*amdS*遺伝子が選抜マーカーとして使用されております。

続きまして、6ページ、第1-2-(3)導入方法につきましては先ほどと同じです。入れている目的のカセットが違うのみとなっております。

7ページ目からですが、入れている遺伝子発現カセットの図が図2に描かれております。そして、表2が脱落したDNAに関するもの。8ページの表3が、欠失された遺伝子に関しまして記載されております。ここは先ほどのものと同じです。

次に、8ページの10行目辺りからDNAの挿入方法ですが、これも先ほどと遺伝子が違うだけですが、●●●遺伝子座に●●●遺伝子カセットを挿入し、組み込まれた●●●遺伝子がコードする●●●インテグラーゼの発現により、今回の目的カセットを宿主の染色体に導入しております。詳細は省略します。

11ページで(2)のほうですけれども、欠失導入用ベクターによるDNA欠失になりますが、先ほどと同じように、●●●遺伝子のDNA欠失操作はセルフクロニングですが、●●●遺伝子につきましては断片が一部残っているため、後ほどORF検索等も行っております。

次に、12ページ、宿主につきましては省略いたします。

第1-5、今回の商品は製品名がmanATL、有効成分がマンナナーゼと記載されております。製造方法も次の13ページにあるとおりで、従来と変わらず、ろ過等をして製品化されるものであり、用途につきましても同様に、インスタントコーヒーにおいて使われる目的のものとなっております。

有効成分につきましても同様となっております。

次に、14ページの表4に従来品との比較表が記載されております。

そして、15ページの表5が、それぞれの相違点として、目的遺伝子と選抜マーカーのコピー数の違い等が記載されております。

次の第2の宿主とベクターのところは省略します。

21ページで、今回挿入している遺伝子の *manATL* 遺伝子の供与体は *Talaromyces leycettanus* CBS398.68株ということで、JPAN002株の時と同様で、以前使われているものと同じとなっております。

安全性に関しまして、21ページ後段にあります。特段の食経験は知られていないと記載はありますが、従前から過去のGMの酵素において評価済みの供与体となっております。

*Aspergillus nidulans*につきましても、選抜マーカーとして、GMの酵素に長く使われている実績が認められております。

次に、22ページ、挿入遺伝子のクローニング・合成方法ですが、目的の *manATL* 遺伝子につきましても、供与体由来のゲノムDNAを鋳型として用い、コードする *manATL* 遺伝子をPCRで増幅して断片を得ております。この断片にはイントロン配列も含まれると記載されております。

次の23ページに機能が書かれておりますが、●●●ということで、図7に記載されております。

続きまして、24ページから安全性につきましても記載されておりますが、挿入遺伝子の供与体のアレルギーにつきましてもPubMed検索を行ったところ、ヒットする文献は認められておりません。

遺伝子産物につきましても同様に文献検索を行い、ヒットするものは認められておりません。

人工胃液に対する感受性につきましては、図8に記載がありますように、SDS-PAGE、ウェスタンブロット、ともに30秒以内に完全に消化することが確認されております。

人工腸液につきましては、図9にありますように、6時間ではほぼ消化されていないことが示されております。

次に、加熱処理につきましてもですが、pH5.0の各温度帯で30分処理を行ったところ、26ページの図10にありますように、68℃付近で活性が減少、87℃以上で失活することが確認されております。

続きまして、26ページの後段になりますが、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としまして、FARRPのデータベースで相同性検索を、2つの手法を用いて行ったところ、どちらにおきましてもアレルゲンは検出されております。

27ページの *amdS* 遺伝子と *pyrG* 遺伝子の機能、安全性につきましても、従前から出ておりますので、詳細は省かせていただきます。

28ページ、プロモーターについても、先ほど同様なので、省略します。

ちょっと飛びますが、33ページ、第4-6としまして、DNAの宿主への導入方法に関する事項となります。これにつきましても先ほどと同様で、選抜マーカーが違うぐらいだと思

いますが、●●●遺伝子座に●●●等を挿入し、この形質転換体を●●●による測定で選抜を行っております。次に、●●●を行い、形質転換体を選抜しております。その中で産生量が最も高いものを最終的にセレクトされております。詳細は省略します。

続きまして、35ページ、第5-2としまして、制限酵素による切断地図に関する事項になりますが、20行目辺りになりますが、シーケンス解析を行って、設計どおりに目的の挿入領域にのみ、目的の*manATL*遺伝子が●●●挿入されていることが確認されております。

40ページになりますが、こちらにおきましてもORF検索ですが、導入した●●●遺伝子座及び欠失した遺伝子の中で、断片が残っている●●●遺伝子座、合わせて●●●遺伝子座についてORF検索を行った結果、後段のほうにそれぞれの数が書かれております。

41ページになりますが、検出されたORFと既知のアレルゲンとの構造相同性に関しまして検索をしたところ、どちらの方法におきましても一致するアレルゲンは認められておりません。

42ページ、検出されたORFにつきまして、既知の毒性タンパク質との相同性検索をデータベースで行ったところ、それぞれの詳細が書かれております。

まとめると、次の43ページの表12になりますが、5つ確認されております。

そして、それぞれのタンパク質について記載されておりますが、例えば1つ目であれば単独での毒性は報告されていない。タンパク質自体が毒性を持つという報告はないということで、いずれにおきましても毒性を有することは考え難いとしております。

45ページは、同様ですので、省略いたします。

46ページ、この*manATL*製品は、デンマークやフランス、また、アメリカのGRASのリストに掲載されている旨、記載されております。

47ページ、組換え体が残存しないことも、同様にドットプロット分析を行い、残存しないことが確認されております。

48ページにつきましても、同様に非有効成分につきまして、試験バッチと食品衛生法規格基準との比較で問題ないことの記載がされております。

そして、49ページ、第7-4、精製方法及びその効果に関する事項につきましても、先ほどと同様になりますが、試験バッチは、培養物をろ過した後に濃縮処理を施されたものであるが、SDS-PAGE電気泳動による純度確認において●●●以上であった旨が記載されております。

その後は省略させていただきます。

説明は以上になります。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、この申請書につきまして、先生方から御意見を頂きたいと思っております。

まずは、JPAN003株について、御意見を頂ければと思っております。

15ページの、これは細かい書き方の問題なのですが、*pyrG*遺伝子。これは●●●が染色体に挿入されていると。4行目です。その後に、●●●とあるのですが、でも、これは最

後のほうでは、●●●と書いていて、ここが文章のつくり方の上で矛盾するように思います。

●●●というのが正しいと思いますので、最後のところ、どこかおかしいのではないかと思いますのですが、この点については申請者に確認して修正していただく。一見しておかしい文章ではないように直していただきたいなと私は思うのですが、ほかは先生方、何かございますでしょうか。どうぞ。

○橋田専門委員 すみません。安全性に係るものでもないですし、分野外なところではあるのですが、49ページの純度のところで、純度は●●●以上であったという記述があります。確かにSDS-PAGEを見ますと、客観的に●●●以上であるということは言えると思いますが、社内資料のほうを見ても、特に●●●以上という数値が出ているわけではないようです。デンストメーターで測ったようなわけではないので、そのところにあえて●●●以上という数値を入れる必要があるのかと感じました。

ただ、実際、評価書のほうではこの数値は入っていないので、問題になるものでも何でもないのですが、根拠がない数字なので、非常に純度が高かった程度の言い方でも良いのではないかと思います。

○中島座長 ●●●以上の濃度自体、数字自体についてはこれでいいかなということでもよろしいでしょうか。

○橋田専門委員 数字自体は確かに●●●以上なのだろうとは思えるのですが、●●●という数値を出した根拠がどこにもないので、その数値をあえて載せる必要があるのかどうか、疑問ですということです。

○中島座長 ありがとうございます。ところどころ、声が飛んでいたもので、失礼いたしました。

この点は、純度について申請書に書いていなければいけないということは確かにないですね。要するに、この●●●以上と言っているけれども、それは書いてあるならあるで、この根拠なりなんなりを示して、ちゃんと言ってくれということでもよろしいでしょうか。

それは後ほど申請者を呼びますので、そこで聞いて、ですけれども、これ自体で安全性に特に懸念ということではないように私は思うのですが、先生、その点はいかがでしょう。

○橋田専門委員 安全性に関しては全く懸念は持っておりませんし、評価書のほうでも●●●という値については一切触れていないので、ここについては問題ないと思います。単にこちらのほう、資料の数値として根拠がない値をあえて載せている必要があるのかどうか、ちょっと疑問ですという、それだけのことです。

○中島座長 ありがとうございます。おっしゃりたいことははっきり分かりました。

ほかにごございますでしょうか。

どうぞ。

○川西委員 川西です。

私自身は、これは特に非常にきちんと純度を求めているわけではないのですけれども、ほかのものとの比較でいくと、こういうことをきちんと確認しているものといいますか、注意を払っているというもの自体がそんなに多くないような気がしています。コメントの方向によって純度はあまり気を配る必要はないという話になると、ちょっと逆かなと思う部分もあるので、私自身は目安としてそのぐらいであったという、数値としてはいいのではないかなと思わないわけでもありません。

○中島座長 この点についても、どのくらいの確信と根拠があって●●●という数字を出したのかを問いただせばいいように思います。それでよろしいですか。

ありがとうございます。

先生方、ほかにございますでしょうか。

この株は、もう安全性審査の終了しておるJPAN001株とか、それと同じですね。たしか、そのときと挿入方法も同じですし、遺伝子座も同じですし、また、本申請株についても●●●入っていることを確認しておりますので、カビだとそういうところが問題になることもあるのですが、本申請の場合はその辺は大丈夫なように私も思います。カビの話だと何か言わないと私も気が済まないのですけれども、この申請書ではそこはきちんと押さえられているかなという印象でございました。

このタンパク質について、人工胃液・人工腸液、アレルゲン等々についてはいかがでしょうか。例えば安達先生あたり、いかがですか。

○安達専門委員 安達でございます。

Sch c 1とホモロジーが合ったということなのですけれども、そこに関してはきちんと説明を書きいただいているので、その説明に関しては私は恐らく問題ないのではないかなと思います。

若干、私が気になりましたのが28ページの一番上の人工胃液処理に対する易消化性というところなのですが、参考資料20についての説明のところ、食物アレルゲンは人工胃液処理に対する消化性耐性を示し、アレルゲンではないタンパク質は極めて消化性が高いことが知られておりという形で参考資料20が引用されているのですけれども、これは確かに、この参考資料20の論文の中では実際に幾つかの食物において実験がなされていて、このような事実が報告されているのですが「知られており」と断言してしまうと、そこは少し言い過ぎではないのかなという印象を私は持ちました。

人工胃液処理の結果だけで全てが決まるわけではないと思いますし、アレルゲンのタンパクでも多少時間がかかっても分解されるものもありますので「知られており」という表現よりは「幾つかの食物において報告されてあり」という形の記載のほうが事実をきちんと反映した記載になるのではないかと考えております。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

確かにこの辺、従来の申請書ではこういう書き方まではしていなかったように思います

し、また、これが独り歩きされると誤解を招く。その点は私も同感でございます。

樋口先生あたり、いかがですか。

○樋口専門委員 先生方がおっしゃっているようなところで特段問題はないと考えております。

○中島座長 ありがとうございます。

橋田先生、ほかはいいですか。

○橋田専門委員 はい。大丈夫です。

○中島座長 特に御意見ございますでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、幾つか質問が出てきましたので、この点については後ほど申請者をお呼びして質問したいと思います。

次に、JPAN007株を利用したヘミセルラーゼについて、こちらの申請について、御質問、御指摘等はございますでしょうか。

○橋田専門委員 橋田です。よろしいでしょうか。

○中島座長 どうぞ。

○橋田専門委員 すみません。また安全性に係るところではないのですが、1点質問させていただきたい点がございまして。2ページの最後の部分なのですが「なお、上記のインスタントコーヒー製造では、添加された酵素は加熱処理によって失活する」という記載がございまして。この上のところに、抽出工程ではこの酵素にまだ活性がある旨の記述があるのですが、一般的なフリーズドライ、インスタントコーヒーの製造において、多分、抽出したものをフリーズドライする前の段階であえて加熱処理等はしていないのではないかと思いますので、この「添加された酵素は加熱処理によって失活する」という部分はどの工程で起きるのか、教えていただければと思っております。

○中島座長 では、この点につきましては、申請者を後ほどお呼びしますので、これは先生から直接問いただしていただけますか。よろしく願いいたします。

○橋田専門委員 了解しました。

○中島座長 ほかに。

川西先生、どうぞ。

○川西委員 これはどちらにも共通したことで、申請会社にもっと早く聞いておけばよかったかもしれないのですが、オクラトキシンAとフモニシンの産生に関しては、これの宿主のBO-1株はこれらのマイコトキシンを産生しないことは確認されていると書いてありますが、実はこれは試験バッチというもので、ここでいうと48ページの分析値で、これは試験バッチでオクラトキシンAとフモニシンB<sub>2</sub>に関しては一定値以下であることは確認しているということです。

そこでちょっと聞きたいのは、ちょうどこの試験バッチというものは1回だけ、これは13ページの図5の製品製造の概略で見ると、試験バッチは結局、毒性試験を行ったサンプルですが、これを非常に詳細に分析しているものなのですが、これは念のため1回

きり、オクラトキシシンAとフモニシンB<sub>2</sub>を確認しているのか。それとも、ワーキングセルバンクを作り直すごとに、こういう確認を定常化しているのか。その辺りの基本的な考え方、どうして測っているかということも含めて、申請会社は非常に進んでいる会社ですので、どういう考え方かなということを知りたいと思っています。

○中島座長 では、これも先生、直接聞いて、多分、これは遺伝子が欠けているのも確認しているので、私でも1回しか見ないかなという気もするのですが、これは直接御質問していただければと思います。

ほかに。

それでは、申請者をお呼びしたいと思いますので、先生方、その場で思いついた質問でも結構ですので、質疑の中で疑問点をできるだけ明確にいただければと思います。

では、準備ができるまで少し、5分ほど休憩にいたします。

(休 憩)

○中島座長 それでは、皆さんおそろいですので、再開したいと思います。

本日はお忙しいところをありがとうございました。

自己紹介をお願いします。お名前と会社名だけで結構です。

○高橋氏 ノボザイムズ ジャパンの高橋と申します。よろしくお願いいたします。

○井上氏 ノボザイムズ ジャパンの井上と申します。よろしくお願いいたします。

○中島座長 マスクの上なので声がこもるので、マイクに近づいて、はっきりした声でなるべくお願いいたします。

今回の件、申請書2つまとめて御質問させていただきます。

まず、JPAN003株を利用したグルコアミラーゼのほうからです。

これは、15ページ。これは記載の問題なのですが、*pyrG*遺伝子。マーカーにして使って、それでマーカーなので、●●●という記述なのですが、終わりのほうを見ても、●●●となっていて、この文章の中で矛盾しているように聞こえます。

●●●なのでしょうか。それとも●●●でしょうか。どちらでしょうか。

○高橋氏 ●●●ということになっております。

●●●です。

○中島座長 そういうことなのですか。●●●というふうに解釈しておったのですが、これはそうではなくて、●●●ということよろしいのですか。

○高橋氏 まず、●●●いるのですが、その中でちょっと書き方が恐らく間違えているところがあるかと。

○中島座長 書き方がおかしいので、●●●にして、それでこの中でつじつまが合うようにきっちり書き直していただければと思います。

どういう操作をやったのかというのは分かりますので、そこはいいと思うのですがけれど

も、何ほ何でもこれはあまりになので、工程で何コピー入れて、それで最終的に残っているのが何コピーであるのか。これがきちんと分かる形で書き直していただければと思います。よろしいでしょうか。

○高橋氏 はい。修正させていただきます。

○中島座長 それから、それでは、これは私のほうから聞かせていただきましょうか。

28ページ、人工胃液処理に関する易消化性について、これは参考文献が引かれておりまして、当該アレルゲンと同じ食物に由来するタンパク質であってもアレルギー誘発性の知見がないタンパク質は人工胃液処理に対して極めて消化性が高いことが知られており、たしか、この参考文献にはそう書いてあると思うのですけれども、アレルゲン性というものはこの人工胃液処理に関する、これだけで決まるものではございませんし、この記述だけが独り歩きされてしまいますと、それはまた困りますので、特に参考文献20の記述を書く必要があるのかということでございます。もう少し慎重に扱っていただいて、ここではただ単に人工胃液処理に関する易消化性について御報告いただければとよいかなと思うのです。

○中島座長

28ページでは、アレルギー誘発性の知見がないタンパク質は人工胃液でよく溶けるといふ論文が、参考文献が引用されているのですけれども、人工胃液だけで決まるわけでもないし、この論文、それから、この記述が独り歩きされても困りますので、ここでは人工胃液処理に関する易消化性について淡々と報告していただければと思います。余計なことを書くなとまでは申しませんが、これだけで判定しているわけではございませんので、よろしく願いできればと。

よろしいですか。

○高橋氏 おっしゃるとおりと思います。修正させていただきます。

○中島座長 それから、49ページで、これは純度で、では、これは橋田先生ですね。●●●以上という。

○橋田専門委員 はい。かなり個人的な疑問なのですけれども、49ページの純度の記載で「amgPOPE001以外のタンパク質は認められず」とかなり高純度であることが既に示されているにもかかわらず、あえて●●●以上であったという数値を持ってきたところがちょっと疑問であったので、質問させていただきたい。

社内文書のほうを拝見しますと、特にデンストメーターで測ったということも見出せませんし、こちらのほうの「●●●以上」に、むしろ直感的には●●●でも通るのかなと思うぐらいなのですけれども、あえて「●●●以上」としたところについて根拠を教えてくださいました。

○高橋氏 おっしゃるとおりです。社内文書のほう、消化性の試験のほうでもお示ししているように、●●●なので、確かにおっしゃるとおり、●●●ようには見えるとは思いますが、この「●●●以上」という記述は基本的にこの酵素製品自体、微生物由来

ということですので、●●●というのはなかなか書けないというふうに社内で検討しまして、どうしても●●●を考慮しまして、また、●●●のではないかという話し合いを社内ですまして、そういう形で「●●●以上」という記載にさせてもらっています。

高純度であることは間違いないのですが、どこまで純度という意味で担保できるかといいますと、なかなか●●●という議論がなかなか科学的に難しいところがありまして、ちょっと●●●での記載ということで「●●●以上」と書かせていただいております。

○中島座長 橋田先生、よろしいですか。

○橋田専門委員 はい。ありがとうございます。

○中島座長 ありがとうございます。

先生方、この003株について、何か思いついたことでも御意見等ございますでしょうか。

それでは、007株のほうに移りたいと思います。

2ページのインスタントコーヒーのところで、橋田先生、お願いします。

○橋田専門委員 すみません。インスタントコーヒーの製造についてよく分からないので、教えていただきたいのですが、2ページの最後の文章に「なお、上記のインスタントコーヒー製造では、添加された酵素は加熱処理によって失活する」という記載がございます。その上のほうを見ますと「したがって、マンナナーゼをコーヒーの抽出工程で用いてマンナンを分解することは」という記載がありまして、抽出工程においては酵素は失活していないことが示されております。

ただ、ここでよく分からないのですけれども、抽出したコーヒーをフリーズドライする前の段階で加熱する工程があるのでしょうか。どこで失活させる工程があるのでしょうかということを確認させていただければと思います。

○井上氏 加熱して失活させる工程を挟んでもらうことになっております。

○高橋氏 今の御質問は、いわゆるインスタントコーヒーの抽出の段階でそういう加熱処理があるのかという御質問だと思います。

○井上氏 抽出ですか。

○高橋氏 はい。フリーズドライのときは、加熱というよりはまさにフリーズドライなので、凍らせてドライ化するという方法だと思うのですけれども、その前の抽出する段階でということだと思うのですが、ただ、そこは加熱処理という、抽出する段階でいわゆる熱を加えているのはあると思うのですが、それはあくまでも酵素を失活するための熱処理ではなくて、コーヒーの抽出物を抽出するための熱処理になりますので、この段階で、もちろん、これはお客様のほうの工程になるので、詳細はちょっと分からないのですけれども、酵素を使いまして、その酵素を使った工程でやって、失活しているかどうかは最終工程のほうで確認することになっておりますので、もし熱工程で既に失活していたら加熱処理をわざわざしなくてもよいということにはなる。

ただ、抽出とかの熱処理の中で、もし酵素活性が残っているような状態がありましたら、それは最終製品化する前に加熱処理をしなければいけないということで、それはお客

様のほうで処理をもう一度しなければいけなくなることとなります。基本的にはお客様のほうで失活工程を入れる、失活させるのを前提にして商品開発をしていると思いますので、そのような処理になると思いますが、もしかしたら、おっしゃったような抽出過程の熱処理で既に失活していることも考えられます。

○中島座長 その場合、ユーザーさんのほうにそういった情報はきちんと伝わっているのでしょうか。酵素が残存していて、これは最終製品に残らないように、それなりの熱処理をしなければならないという点は確認してあるのでしょうか。

○高橋氏 もちろん、我々のほうでアプリケーションの方法ですとか、至適pH、あと、失活する温度というものは、用途といいますか、アプリケーションのデータを送るときにお客様に渡しておりますし、もし失活していない場合だと商品のラベルのほうに表示しなければいけなくなりますので、基本的に酵素が活性を持って商品になる場合はラベルに表示される必要があるので、そういうことはないように、基本的に失活しているのを確認するのはお客様のほうでは必ずやられているかとは思いますが。

○中島座長 橋田先生、今の説明でよろしいですか。

○橋田専門委員 まず、抽出工程で失活するかどうかということについては、熱安定性のデータを見ると確かに75℃、70℃以上ではかなり不安定になるかと思うのですが、30分以上の加熱を加えての結果なので、抽出工程だけで失活するかどうかはちょっと分からないということが一点挙げられます。

確実にメーカーさんのほうで失活工程を加えるということなのですが、私も素人なのでよく分かりませんが、スプレードライではなくてフリーズドライを使ってコーヒーを作る一つのメリットとして、コーヒーの香りをより良く保存すること。そういうところがあるかと思うのですが、あえてそこで加熱処理をさせてまでここを失活させることになるということではよろしいでしょうか。

○高橋氏 ちょっと今、思い出してあれなのですが、一応、フリーズドライをやるときには、おっしゃったように、そこまで高温で加熱、すごい熱を加えることは恐らく基本的にはないとは思いますが。

○中島座長 要するに表示の都合上、最終製品に酵素活性が残ってはいけないうけなので、ですから、その責任がどちらに発生するののかというポイントなのですが、ノボザイムズさんのほうでこれを出すときには、出荷の時点では酵素活性は残っているからユーザーさんのほうで確実に失活させてくださいという、私が先ほど申し上げた通知というのはそういう意味なのですが、その辺は徹底しておるのでしょうかということなのです。

○高橋氏 基本的に失活していなければいけないという、法律・法規上の問題にはなると思うのですが、酵素は失活していなければいけないということは法律・法規上は多分ないと思うのです。実際、それが失活しているかしていないかというのはもちろん、最終製品の責任はお客様のほうにありまして、弊社の場合、これを食品添加物製剤としてお客様に売って、それを使ってお客様のほうで最終製品を作りますので、最終製品の責任

はお客様のほうにありまして、ラベルにどう表示するかというところでお客様の判断になるというところはあります。

それで基本的には、一般的にはお客様のほうで酵素の活性が残ったまま商品を製品化することは、意図的に酵素を、例えばおまんじゅうの軟らかさを保つために酵素を入れて、目的をして活性があるものを入れる以外は、基本的には残らないような失活工程をお客様のほうで設けていると我々は理解しておりますし、弊社のほうからは酵素の活性が残っていた場合はこういう表現は必要ですよという情報提供もさせていただいております。

○中島座長 ノボザイムズさんのほうから、この酵素の熱安定性等に関する情報を提供しないとユーザーのほうも対応は難しくなると思うのですが、その辺もきっちりやっておるのでしょうかということで、その辺をお聞きしておるのです。

○高橋氏 それは間違いなく、アプリケーションの段階でどこまで活性があって、どこら辺のときに失活するのかというのはお客様のほうの工程にも関わる情報ですので、ノボザイムズのほうからそういう情報は確実に提供させていただいております。

○中島座長 そういうことのように、ノボザイムズさんのほうからこれを出すときにはその酵素が生きていなければ商品にならないわけなので、メーカーさんとしての責任としては私はその辺のかなと思うのですが、先生方、いかがでしょうか。

橋田先生、いいですか。

○橋田専門委員 はい。安全性に関しましても、次の摂取量のところで、全部残ったとしてこれぐらいという摂取量も書いてあっての上の資料なので、その点については問題ないのだと思います。

ただ、指摘させていただいたところの記載が全て失活してしまう、自動的に失活してしまうかのような記載に思えたので、書き方にもしかしたら工夫が必要かもしれないと思います。ただ、御説明につきましては納得しましたし、こちらの点につきましてはメーカーさんにも責任が生じるということで了解いたしました。

○中島座長 そういうことで一応、この文章をもう一度見直していただいて、誤解のないように書き直せるものならよろしく願いできればと思います。

○高橋氏 はい。かしこまりました。

○中島座長 それから、終わりのほう、47ページ、この菌株の安全性、毒を作らないかの話なのですが、川西先生のほうから聞いていただけますか。

○川西委員 これは*A. niger*ということで、マイコトキシンの懸念ということが一般にはある。それで、この資料で12ページあるいは17ページですか、宿主であるBO-1株ではマイコトキシンを産生しないことは確認されていると書いてある上で、この資料でちょうど48ページで、試験バッチではオクラトキシンAとフモニシンB<sub>2</sub>は、念のためなのか、よく分からないのですけれども、一応、これは見ているわけですね。

それで13ページを見ると、この試験バッチというものは毒性試験に使うバッチですが、かなり詳細な分析をしていて、私、感心しているのですが、このバッチというのは、この

製品に関してはちょうど工程でいくと恐らく●●●からだと思うのですが、●●●を経たものを濃縮して試験バッチにしているわけです。ですから、これは1回だけ、念のためにやっているというようにみてとれます。そもそもが社内文書3で産生していないことを確認されていると書いておきながら、ここで、私はその確認をすることはいいことだと思っています。ただ、どういう頻度で確認しているのか、あるいはもし繰り返していないなら、どんな考え方で繰り返さないのか、教えていただけたらと思いました。

○高橋氏 おっしゃるとおり、フモニシンとかオクラトキシシンという毒性物質は必ず*A. niger*由来の酵素製品を作るときには必ず懸念として残っているものですので、こちらはいわゆるインターナショナル、JECFAとかでもそうですけれども、そういう産物を調べるようにという形でスペシフィケーション、いわゆる規格上調べるようになっておりまして、これの試験バッチで調べるにはもちろん、●●●試験バッチというものはキャラクタライゼーションという形で全部詳しく調べる中でこれが入ってきているのです。

これは恐らく、どの程度の頻度かはちょっと分からないのですが、毎バッチやっているわけではなくて、もちろん、その遺伝子は潰しているというのは一応、論理的には潰して、実際のシーケンスを見ても基本的には潰れているのですが、やはり本当の完全の確認は、それが出ているのか出ていないのかというのは必ずやらなければいけないということでやっておりまして、試験バッチでやっているのは間違いないのですが、その後、どの程度、毎バッチでやっているのか、それとも、ある程度の期間、モニタリングであったりとかやっているのかというのは一応、一回確認させていただいて回答させていただきたいと思います。

○川西委員 それは1回だけ、念のためやっているわけではないということですね。

○高橋氏 はい。

○川西委員 どのくらい注意していればいいのかというのはちょっと教えていただければと思います。

ありがとうございます。

○中島座長 では、ほかに先生方、本件に関して、または003株に遡ってでも結構ですが、御質問はございますでしょうか。よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

お疲れさまでした。これで終了です。

○中島座長 議論を再開いたします。

それでは、JPAN003株を利用して生産されたグルコアミラーゼの件について、御意見等がございますでしょうか。

修正いただく点はございますが、安全性について特段の疑問のあるような点はなかったように思うのですが、この株についてはオーケーと判定してよろしいでしょうか。これは重要なので、意思表示をお願いいたします。

○中島座長 ありがとうございます。それでは、お認めいただいたものとさせていただきます。

たいと思います。

次に、JPAN007株を利用して生産されたヘミセルラーゼで、これも後ほど調べていただきたいことなどを書きましたが、安全性については別に懸念のあるような重大な点はなかったらと思いますし、また欧米でも販売が始まる。そういった状況のようでございます。御意見等がございますでしょうか。

この株についても、安全上の特段の懸念はないと判定してよろしいでしょうか。

○中島座長 ありがとうございます。それでは、これもオーケーということで手続を進めさせていただきます。

それでは、事務局のほうから評価書案の説明をお願いいたします。

○森山評価専門官 評価書案の説明をさせていただきます。評価書案が束ねてある資料の17ページからがグルコアミラーゼになっております。

22ページをお開きください。Ⅰ.評価対象添加物の概要としまして、今回のものはJPAN003株を利用して生産されたグルコアミラーゼとなります。本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1株を宿主とし、*Penicillium oxalicum* LCT23株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製したJPAN003株を利用して生産されたグルコアミラーゼである。本添加物は、アミロースやアミロペクチン等の多糖類の $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して $\beta$ -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用される。

次に、63行目からのⅡ.食品健康影響評価となります。

従来の添加物の性質及び用途等に関する資料につきましては、67行目から記載のとおりです。

75行目の(2)製造方法につきましては、グルコアミラーゼは培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造され、生産菌は除菌ろ過により除去されます。

(3)用途及び使用形態につきましては、グルコアミラーゼはデンプン糖の製造において、デンプンの液化後に生成したデキストリンを糖化してグルコースにまで分解することにより、糖化効率を向上させることを目的として使用されております。

(4)摂取量ですが、グルコアミラーゼが全てのデンプン糖製造に使用され、100%最終製品中に残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は0.029mg TOS/kg 体重/日であると記載しております。

次に、23ページの91行目からになります。宿主及び導入DNAに関しまして記載があります。91行目の(1)宿主は、*A. niger* BO-1株である。*A. niger* BO-1株は自然界から分離された*A. niger* C40-1株に突然変異誘導を行い、グルコアミラーゼの生産性を向上し、夾雑酵素である $\alpha$ -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能を欠失した株である。

(2)DNA供与体に関しましては、グルコアミラーゼ(*amgPOPE001*)遺伝子の供与体は*P. oxalicum* LCT23株である。選抜マーカーである*pyrG*遺伝子の供与体は*A. nidulans* NRRL1092株であるとしております。

(3)挿入DNAの性質及び導入方法に関しましてですが、*amgPOPE001*遺伝子は*P. oxalicum* LCT23株の野生型グルコアミラーゼのアミノ酸配列の1アミノ酸が置換したグルコアミラーゼをコードする。*pyrG*遺伝子はオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、選抜マーカーに用いたと記載しております。

*amgPOPE001*遺伝子及び*pyrG*遺伝子を含む発現カセットを、インテグラーゼにより宿主ゲノムの複数の遺伝子座に導入した。

なお、この生産菌の作製にあたり、あらかじめ複数遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させているが、このうちセルフクローニングに該当しない一部の遺伝子座ではORF検索を行い、安全性を検討したとして、第5のところを参照しております。

次の3.と4.につきましては省略させていただきます。

5.で、今回の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が、(1)製品名につきましてはここに記載のとおりです。

次の24ページの134行目からになります。が、(2)製造方法、(3)用途、(4)有効成分の性質につきまして、それぞれ書かれておりますが、いずれも「従来のグルコアミラーゼと同様に」という書き方で記載させていただいております。

149行目からになります。が、6.(1)遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点につきましては、今回の*amgPOPE001*と従来のグルコアミラーゼの相違点はアミノ酸残基数、基原及び至適温度が異なる点である。

(2)組換え体と宿主に関しましては、その相違点はJPAN003株には*amgPOPE001*遺伝子が複数コピー導入され、グルコアミラーゼの高産生性を獲得している点、*pyrG*遺伝子を導入している点及びグルコアミラーゼの生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点であると記載しております。

以上から、比較対象となり得る従来の添加物があると判断し、以降の評価を行っております。

162行目から第2.宿主に関する事項としまして、宿主は*A. niger* BO-1株である。

次に、2.病原性につきましては記載のとおりです。

25ページから寄生性、病原性等の記載がありますが、こちらにつきましても、従前と同じ書きぶりですので、省略させていただきます。

第3.ベクターに関する事項ですが、1.で、遺伝子導入用ベクターのpJPV016の作製には*E.coli*由来のプラスミドpBluescript SK-が用いられたとして記載しております。

2.性質に関する事項につきましては、記載のとおりとなっております。

26ページ、225行目からになります。が、挿入DNAの供与体に関する名称、由来及び分類に関する事項としまして、今回の*amgPOPE001*遺伝子の供与体は*P. oxalicum* LCT23株、*pyrG*遺伝子の供与体は*Aspergillus nidulans* NRRL1092株である。

(2)安全性に関しましては、*P. oxalicum*に関しては農業やバイオ技術等の分野で広く利

用されている。*A. nidulans*は食経験は知られていないが、*pyrG*遺伝子は選抜マーカーとして長年使用されてきた実績を有する。ともに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に相当すると記載しております。

2.で、挿入DNAまたは遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項としまして(1)クローニングもしくは合成方法に関する事項ですが、*amgPOPE001*遺伝子は*P. oxalicum* LCT23株のゲノムDNAを鋳型とし、野生型のグルコアミラーゼ遺伝子の分泌シグナルを含む配列をPCR法で増幅し、1か所のアミノ酸が置換するように変異を導入して得られた。

*pyrG*遺伝子は*A. nidulans*のNRRL1092株のゲノムDNAを鋳型として、PCRにより得られたと記載しております。

(2)は記載のとおりです。

27ページになりますが、250行目からになります。(3)挿入遺伝子の機能に関する事項として、①*amgPOPE001*遺伝子について記載しております。

a.になりますが、アレルギー誘発性に関する知見として、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.遺伝子産物につきましても、*amgPOPE001*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。また、供与体である*P. oxalicum* LCT23株のグルコアミラーゼ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認められておりません。

264行目、c.になりますが、物理化学的処理に対する感受性に関する知見としまして(a)人工胃液に対する感受性は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0.5分以内にバンドが消失したため、分解されることが示された。(b)人工腸液につきましてもSDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後6時間においても完全には消化されないが徐々に消化されることが示されたと記載しております。(c)加熱処理に対する感受性ですが、*amgPOPE001*の加熱処理に対する感受性について確認した結果、約80℃・30分で失活することが確認されたと記載しております。

次にd.ですが、アレルゲンとの構造相同性に関する知見につきましても、アレルゲンデータベースを用いて検索を行った結果、Sch c 1が検出された。

次の28ページからになりますが、*S. commune*は一般的に観察される真正担子菌であり、アレルギー性気管支肺真菌症等の特定のアレルギー疾患を引き起こすとの報告があり、アレルゲンとしてグルコアミラーゼが同定されている。Sch c 1と*amgPOPE001*の構造相同性を調査したところ、●●●の相同性を有することが示された。また、人工胃液処理に対する感受性が高いことから、*amgPOPE001*のアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

なお、グルコース製造過程のカラム精製工程において除去されるため、*amgPOPE001*が摂取される可能性は低いと記載しております。

*pyrG*遺伝子につきましては記載のとおりです。

以上から、*amgPOPE001*及び*pyrG*が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記載しております。

3.の(1)(2)(3)について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につきましても記載のとおりとさせていただきます。

5.構築された発現ベクターに関する事項となりますが、こちらにおきましても記載のとおりで、説明は省かせていただきます。

29ページ、349行目からになります。6.DNAの宿主への導入方法に関する事項とし、あらかじめインテグラーゼ認識配列を導入した宿主に遺伝子導入用ベクター *pJPV016*を導入し、ベクター上の●●●遺伝子が発現するインテグラーゼの作用により、ベクター上のインテグラーゼ認識配列間にある *amgPOPE001/pyrG*遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した。この際、*pyrG*遺伝子による選抜を行った後に、●●●を指標として形質転換体を選択したと記載しております。

次に、355行目になります。7.抗生物質耐性マーカー遺伝子につきましては、ベクターはアンピシリン耐性遺伝子を持つが、シーケンス解析により導入されていないことが確認されている旨、記載しております。

次に、第5.組換え体に関する事項になります。1.宿主との差異につきましては、目的の *amgPOPE001/pyrG*遺伝子発現カセットが導入され、グルコアミラーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失させている点で宿主と異なる。

30ページになります。2.(1)につきましては記載のとおりとさせていただきます。

(2)オープンリーディングフレームにつきましては、それぞれORF検索を行った結果、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が合わせて982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、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行ったところ、Sch c 1が検出されたが、第4-2-(3)の記載のとおり、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられたと記載させていただいております。

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、MvirDBデータベースを用いて検索を行ったところ、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、いずれも毒性を有するとは考え難いタンパク質であったと記載させていただいております。

第6.の1.と2.については記載のとおりです。

次に、31ページの第7.になります。1.諸外国におきましては、フランス及びカナダにおいて、食品用加工助剤及び食品用酵素のポジティブリストに記載されております。

また、2.組換え体の残存につきましては、ドットプロット分析により、組換えDNAが残存しないことが確認された。

次に、3.になります。製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項としましては、食品衛生法の規格基準を満たしている旨、記載させていただいております。

4.精製方法及びその効果に関する事項になります。amgPOPE001製剤は生産菌の培養物を複数のろ過等の精製工程を経ることで得られる。これらの工程において安全性に問題のある物質が混入することはないと考えられる旨、記載させていただいております。

5.は省略させていただきます。

以上で、第8.のほうで、第2.から第7.までの事項により安全性の知見は得られている旨、記載させていただいております。

これは、このままへミセルラーゼまで行ったほうがいいですか。

○中島座長 一応、1個ずつ行きましょう。

○森山評価専門官 分かりました。

○中島座長 それでは、ただいまのこの003株の評価書案につきまして、御意見、御指摘等はございますでしょうか。

細かい字句等、後ほどお気づきがありましたら、事務局までお伝えいただければと思います。

どうぞ。

○川西委員 一つは、この文献リストですが、括弧の中が、これと後が統一がとれていないということと、間違いが結構あります。これは全部、もう一回、どういう言葉を使うかということを含めて全部確認したほうがいいと思います。

あと、実はちょっと、この後のほうがいいかもしれないのですけれども、評価書をこういうふう書き換えたほうがいいのではないかなと思っています。遺伝子組換え酵素添加物の多くに関することなのですが、この31ページの第7.の3.から5.の内容に関してちょっと御相談したいことがあるのですが、これは今、申し上げたほうがいいのか、後のほうがいいのか。どっちだろうか。

今でもいいですか。

○川西委員 ありがとうございます。

それで、この辺り、なかなか旧来の調査会では、例えばマイコトキシンの発現の可能性等についてなどは議論している、考察はしているのですけれども、それから、アレルゲンができる可能性があるとかということももちろんやっています。一方で、いわゆる不純物等々に関してはどうかといえば、その辺りのことに関しては、この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が第7の部分に書いてあります。

この基準では、3、4、5は「従来の添加物に比べ有意に増加していない」とか、「従来の添加物には存在しない非有効成分を含有しないこと」となっていて、それ以外の場合においては「非有効成分について安全性に問題がないと判断できる合理的な理由があること」となっています。4番目に関しても「製造工程において混入する可能性のある有害物質の種類及び量を予測することができ」という言葉が入っていたり、それから、5番目は「有

害性が示唆される常成分にあつては、その濃度の変動について、従来の添加物と同等であること。仮に変動があつても、安全性の上から問題がないと判断できる合理的な理由があること」という書き方になっていますが、実は今、もう少し踏み込んで評価していかないといけないかもしれないなと私は前から思っています。

○中島座長 重要なポイントを含んでいると思いますので、今日結論を出してどうこうというわけにもいかないと思いますし、では、このままでいいのかという話でもないように思いますので、また後ほど御相談させていただくということで止めたいと思います。それでは、評価書案の続きで、最後までとりあえず行きましたか。

では、003株のほうはよろしいですね。ヘミセルラーゼのほうに入りたいと思いますが、よろしいでしょうか。とりあえず、この評価書案を認めるということで。

手島先生、どうぞ。

○手島専門委員 003株のほうなのですけれども、273行目なのですが、人工腸液に対する感受性の表現のところで、最後に徐々に消化されると書かれているのですけれども、30分ぐらい徐々に消化されるものの、6時間以内では完全には消化されないということで、少し順序を変えたほうがいいのではないかと思います。

○中島座長 手島先生、人工腸液で273行目で、先生の声がところどころ切れてしまうので、273行目の「消化される」のところでいいですね。

○手島専門委員 はい。

○中島座長 先生、どのように直されたらよろしいとお考えですか。

○手島専門委員 分析を行った結果、30分後から徐々に消化されるものの、6時間以内では完全には消化されないことが明らかとなったということで、徐々に消化されるというのを前に持っていったほうがよろしいかと思いました。

聞こえますでしょうか。

○中島座長 30分ぐらいから分解は始まっているけれども、6時間たっても分解し切れないという書き方のほうがいいと。

○手島専門委員 はい。

○中島座長 言われてみればおっしゃるとおりかと私は思いますが、先生方、よろしいですね。

では、そういうふうに修正をお願いいたします。

ほかにございますでしょうか。

○手島専門委員 それから、この291行目なのですけれども、相同性が見られたと。その後で「また人工胃液処理に対する感受性が高いことから」ということなのですが、ここの「また」からの文章は総合的に判断してということになると思いますので、ちょっと行を変えて、併せてamgPOPE001のアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるということで、総合的な形の表現にしたほうがよろしいのではないかと思います。

○中島座長 先生のお声が時々聞こえなくなってしまうのですけれども。

○手島専門委員 291行目なのですけれども、相同性の表現の後に「また人工胃液処理に対する感受性が高いことから」という文章が入るのですが、これはアレルギー誘発性の可能性が低いということの総合的な判断の結果だと思うので、行を変えて、総合的に判断してamgPOPE001のアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるという表現にされたほうがいいのではないかと思います。

○中島座長 要するに、人工胃液で溶けやすいから、即、アレルギー誘発ではないと判断されるような、そういうふうにとられかねない今の書き方はやめてくれということによるのでいいですね。

○手島専門委員 はい。アレルギー誘発性が総合的に判断して低いという意味のところ、熱に対する不安定性とかを含めてになりますので、以上、今までのことを、相同性が見られることはあるのですけれども、ほかのこと、**weight of evidence**といいますか、ほかの項目も考慮して、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるという表現でされたほうがよいかと思いました。

○中島座長 もっともかと思えます。事務局、よろしいですか。

そういうふうに訂正していただくことにいたします。

ほかは先生方、よろしいでしょうか。

それでは、003株のほうの評価書は以上ということで、では、007株のほうをよろしくお願ひします。

○森山評価専門官 JPAN007株のほうを説明させていただきます。

○中島座長 あちこち、共通するところは飛ばしていいかと思えますので。

○森山評価専門官 はい。飛ばします。

評価書案の39ページにI.評価対象添加物の概要としまして記載させていただいております。本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1株を宿主とし、*Talaromyces leycettanus* CBS398.68株由来のヘミセルラーゼ遺伝子を導入して作製したJPAN007株を利用して生産されたヘミセルラーゼ(マンナーゼ)である。本添加物は、マンナン $1,4\text{-}\beta\text{-D}$ -マンノシド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、インスタントコーヒー製造における生産性及び品質の向上を目的として使用される。

61行目からのII.食品健康影響評価に関しましては、1.(1)は記載のとおりです。

(2)マンナーゼの製造方法についても記載のとおりです。

(3)用途としましては、インスタントコーヒー製造において、コーヒー豆からの抽出率向上及びフリーズドライ時のゲル形成抑制を目的として使用される旨、記載させていただいております。

(4)は記載のとおりです。

2.宿主及び導入DNAにつきましては、先ほどと重複しますし、DNA供与体の違いと選抜マーカーのところの違いだけですので、説明は割愛させていただきます。

飛びまして、40ページの120行目の5.遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資

料ですが(1)製品名及び有効成分として、今回の製品名manATL、有効成分はマンナナーゼと記載させていただいております。

(2)(3)(4)ですが、これも先ほどと同じで「従来のマンナナーゼと同様に」という形で記載させていただいております。

41ページの141行目、6.(1)遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点はアミノ酸残基数、基原及び至適温度が異なる点となっております。

(2)組換え体と宿主の相違点は、JPAN007株には*manATL*遺伝子が複数コピー導入され、マンナナーゼの高産生性を獲得している点、*amdS*遺伝子を導入している点及びマンナナーゼの生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点である。

以上から、比較対象となり得る従来の添加物があると判断し、以降の評価が行われております。

第2.宿主に関する事項につきましては、先ほどと同様ですので、記載のとおりです。

42ページの189行目、第3.ベクターに関する事項につきましても、先ほども同様ですので、記載のとおりとさせていただきます。

43ページ、第4.1.挿入DNAの供与体に関しまして(1)は記載のとおりです。

(2)安全性に関しましては、*T. leycettanus*は食経験は知られていないが、石炭ぼたから単離された耐熱菌であり、産業上有用な遺伝子が研究されている。

*A. nidulans*は、食経験は知られていないが、*amdS*遺伝子は選抜マーカーとして長年利用されてきた実績を有する。

どちらもバイオセーフティレベル1に相当すると記載させていただいております。

2.挿入DNAに関しまして(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につきましては、ここの記載にあるように、ゲノムDNAを鋳型とし、野生型のマンナナーゼ遺伝子の分泌シグナル及びイントロンを含む配列をPCR法で増幅して得られたと記載しております。

(2)は記載のとおりです。

(3)挿入遺伝子の機能につきましても、重複しますので、省略させていただきます。

4ページの248行目からになります。挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見につきましては、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.遺伝子産物につきましては、manATL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。また、株由来のヘミセルラーゼ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、その報告はなかったと記載させていただいております。

c.物理化学的処理に対する感受性に関しまして(a)人工胃液につきましてはSDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析ともに0.5分以内にバンドが消失したため、分解されることが示された。(b)人工腸液に関しましてはSDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、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)加熱処理に対

する感受性につきましては87℃・30分で失活することが確認されたと記載させていただいております。

272行目のd.既知のアレルゲンとの構造相同性に関しまして、アレルゲンデータベースを用いて検索を行った結果、一致するアレルゲンは検出されなかったと記載させていただいております。

279行目②*amdS*遺伝子に関しまして、児玉先生からの事前のコメントで、必ずしもアセトアミドの存在下でなくても発現するかと思いますということで、281行目の1か所を削除させていただいております。詳細は記載のとおりです。

45ページ、3.プロモーターの類いに関しましては記載のとおりとさせていただきます。

4.と5.につきましても、先ほどと基本同様なので、省略します。

続きまして、46ページ、333行目になります。6.DNAの宿主への導入方法に関する事項につきましても、先ほどと同様の内容で、使っているカセットの名称、ベクターの名称等の違い等によるものになっております。

7.抗生物質耐性マーカー遺伝子につきましては、シーケンス解析により染色体には導入されないことが確認されている旨、記載させていただいております。

第5.の1、2.(1)は省略いたします。

357行目からですが、2.(2)で、挿入DNAと宿主ゲノムとの接合部位に生じるORFの有無の確認をした結果、次の47ページからになります。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が合わせて1,061個検出されております。

これらについて、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、一致するものは認められなかった。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MvirDBデータベースを用いて検索を行った結果、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、いずれも毒性を有するとは考え難いタンパク質であったと記載させていただいております。

第6.については記載のとおりです。

第7.につきましては、先ほど御議論があったところと同じになりますので、説明は省略させていただきます。

説明は以上になります。

○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きまして、御意見、御指摘等はございますでしょうか。

細かい字句等の修正につきましては、後ほどでも結構ですので、修正箇所を事務局までお伝えいただければと思います。

それでは、この評価書案でよろしいでしょうか。

ありがとうございます。それでは、頂いた御指摘、修正等につきましては、事務局のほうで修正した後、御指摘の先生と私のほうで確認し、食品安全委員会に報告してパブリッ

クコメント等の手続をさせていただきたいと思います。

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、その他ですが、事務局のほうからございますでしょうか。

○松原課長補佐 特にございません。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、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201回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

ありがとうございました。