

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## (第206回) 議事録

1. 日時 令和2年12月18日(金) 14:00~17:23
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
    - ・BML780 MDT06-221株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ
    - ・MAM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ
    - ・DSM32805株を利用して生産されたキモシン
  - (2) その他
4. 出席者  
(専門委員)  
中島座長、飯島専門委員、岡田専門委員、小関専門委員、小野専門委員、  
児玉専門委員、手島専門委員、山川専門委員、吉川専門委員  
(食品安全委員会)  
佐藤委員長、川西委員  
(事務局)  
小川事務局長、鋤柄事務局次長、石岡評価第二課長、蛭田評価情報分析官、  
松原課長補佐、山口係長、松井技術参与
5. 配布資料  
資料 食品健康影響評価に関する資料
  - ①BML780 MDT06-221株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ
  - ②MAM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ
  - ③DSM32805株を利用して生産されたキモシン
6. 議事内容  
○○○ それでは、定刻となりましたので、ただいまから第206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。

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」に基づいて、ウェブ会議システムを利用して行います。

本日、所用により、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるBML780 MDT06-221株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ、MAM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ、DSM32805株を利用して生産されたキモシン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。事務局のほうからお願いいたします。

〇〇〇 それでは、議事次第に基づき、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」となっております。

また、本日は新規品目の申請者であるダニスコジャパン株式会社、DSM株式会社、クリスチャンハンセンジャパン株式会社の方をそれぞれ呼びしております。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。

以上でございます。

〇〇〇 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」に基づいて、必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について報告をお願いいたします。

〇〇〇 本日の議事に関する専門委員の調査審議等への参加に関する事項について御報告いたします。

本日の議事に関しましては、専門委員の先生方から頂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の(1)に規定する、調査審議等に参加しないこととなる事由に該当する専門委員はいらっしゃいませんでした。

以上でございます。

〇〇〇 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きまして、その後、相違等ございませんでしょうか。

本日の会議、この前、せっかく対面でできたと思ったらまたウェブに戻ってしまいましたけれども、この辺、事務局のほうから説明があるそうですので、よろしく願いいたします。

〇〇〇 本日はウェブ会議形式で行いますので、注意事項をお伝えいたします。

1点目、常時の内容となりますが、発言者の音質向上のため、発言しないときはマイクをオフにさせていただくようお願いいたします。

2点目、発言時の内容ですが、御発言いただく際は、ウェブ会議画面の挙手ボタンを押してください。もしくは挙手の札を挙げてください。座長よりお呼びいたしますので、マイクをオンにしてお名前を発言した上で御発言をお願いいたします。発言の最後には「以上です。」と御発言いただき、マイクをオフにしてください。

また、挙手ボタンが使用できない場合や座長より指名がない場合は、マイクをオンにして呼びかけていただければと思います。

3点目、音声接続不良時の内容となりますが、通信環境に問題がある場合はカメラをオフにすることや、再入室をすることにより改善がする場合がございます。マイクが使えない場合はウェブ会議システムのメッセージ機能、チャットを使ってお知らせいただければと思います。また、万が一、全く入室できなくなった場合は、お手数ですが事務局までお電話いただくよう、お願いいたします。

4点目、議事中、議事決定事項に関する意思確認をいただくことがございます。その際は、事前にお送りさせていただきました意思表示カードを御掲示いただくようお願いいたします。

以上がウェブ会議における注意事項となります。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、早速、審議を始めたいと思います。

新規品目であるBML780 MDT06-221株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼについて審議を行いたいと思います。

皆さん、お気づきと思いますが、この次に出てくるものも $\alpha$ -アミラーゼでして、内容、かなり似通っておりますので、中身などがほとんど一緒だったりもしますので混乱される方はあるかもしれませんが、宿主等違いますので、また、そもそも会社が違いますので、その辺、心に置いていただければと思います。

それでは、事務局のほうから説明をお願いいたします。

〇〇〇 申請書の説明に入ります前に、審議の進め方について御説明いたします。

冒頭で御紹介いたしました、本日は申請者のダニスコジャパン株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書の御審議をいただいた後に、申請者に対する質問事項等があ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、まず1品目めについて御説明いたします。黄色のファイルの御用意をお願いいたします。

まず、6ページをお願いいたします。

第1の1といたしまして（1）名称は $\alpha$ -アミラーゼ、基原は *Geobacillus stearothermophilus*でございます。

「（2）製造方法」ですが、こちらは図1にありますとおり、培養、ろ過、製剤化等の工

程を経て製造されます。

隣のページに行きまして「(3) 用途及び使用形態」ですが、 $\alpha$ -アミラーゼはデンプンの $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解して低分子化する酵素で、多くの用途がございますが、本申請の $\alpha$ -アミラーゼはパンの製造用途を想定しております。

焼成後のパンは、時間がたつと、新鮮な焼き立ての香りが失われたり、パンの内部のクラムが硬くなったり、ぱさぱさするなど、デンプンの再結晶によると考えられている老化が発生いたします。このパンの老化を抑制し、より長く品質を保持することでパンの賞味期限の延長が可能になり、このために、マルトースを多く生成する $\alpha$ -アミラーゼが老化抑制の目的で使用されております。

次のページをお願いいたします。

「(4) 摂取量」ですが、パン類の平均値を用いまして最大摂取量の計算を行いました結果、0.003mg TOS/kg体重/日と算出しております。

続いて、2、宿主の項目ですが、(1)、まず宿主は*Bacillus*属の*Licheniformis*BRA7株で、*Bacillus licheniformis*は広く自然界に認められまして、また、土壌中に多く見られ、乾燥食品等にも存在しております。

(2) 供与体の種名ですが、 $\alpha$ -アミラーゼをコードする供与体は*G.stearothermophilus* C599株でございます。

その他の供与体については、いずれも宿主の*B.licheniformis* BRA7株でございます。

続いて、(3) 挿入DNAの性質等でございますが、こちらは表1に記載しておりますとおり、*AmylaseNCC*遺伝子発現カセットを含む挿入DNA断片の構成等の情報を記載しております。

*AmylaseNCC*遺伝子発現カセットを含むDNA断片を宿主染色体上の欠失された*catH*座へ相同組換えで導入し、MAAを生産する生産菌株を得ております。この相同組換えでは、最初に*AmylaseNCC*遺伝子導入用ベクター全体が*catH*座に導入されまして、この段階では導入されたベクター配列にプラスミドpUB110由来のネオマイシン耐性遺伝子が含まれております。

次に、この株を、ネオマイシンを含まずクロラムフェニコールのみを含む培地で培養することで、*neo*遺伝子を含むDNA配列を相同組換えでループアウトさせて除去された菌株を選択し、その後の改変工程に使用しております。

少し飛んで10ページ、下に行きまして、こちらのMAAの開発では、耐熱性が向上した $\alpha$ -アミラーゼを開発するために、先ほど御説明しました供与体を用いて、*B.licheniformis* 菌株における $\alpha$ -アミラーゼ生産のためコドンの最適化を行っております。

*AmylaseNCC*遺伝子発現カセットと組み合わせて導入した*catH*遺伝子発現カセットによって生産されるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼでは、宿主*B.licheniformis* BRA7株が発現するクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼからのアミノ酸配列の変更はございません。

また、表2にありますとおり、複数の遺伝子も欠失させております。

続いて、次のページ、1の3の項目でございます。

*B.licheniformis*は、酵素の生産に安全に用いられてきており、安全性は確立されているとしております。また、食品安全委員会でも過去に審議を行った申請書に記載の各品目の宿主としても用いられてきた実績がございます。

続いて、1の4、隣のページについては記載のとおりです。

続いて、1の5、こちらは組換え添加物の性質等の項目です。

(1) は記載のとおりです。

「(2) 製造方法」でございますが、MAAを含む酵素製剤の製造工程は従来の $\alpha$ -アミラーゼの製造工程と同様でございます。

14ページに行きまして、第2パラグラフになりますけれども、これらの製造工程は、食品の適正性製造規範に従い、HACCPにより衛生管理され、また、ISO9001により品質管理されており、OECDによるGILSPの基準に従っているということでございます。

(3) 用途でございますが、こちらは既存の $\alpha$ -アミラーゼと同様でございます。パンの製造工程でパン生地が60度近辺に達すると、デンプンの糊化が起りましてMAAが作用します。しかし、その後、さらに温度が上昇するにつれて、MAAは熱失活いたします。

(4) 有効成分の比較でございますが、有効成分は従来のマルトース生成効率がよい $\alpha$ -アミラーゼと同じ野生型の*G.stearothermophilus*菌株の遺伝子にコードされたMAAでございます。また、*AmylaseNCC*遺伝子では、従来のマルトース生成効率がよい $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子配列に対しまして、染色体へ組み込んで発現させる*B.licheniformis*菌株からの発現効率を高めるためにコドンの最適化を行っておりますが、アミノ酸配列に影響する改変は行っておりません。

続いて、1の6の項目です。

まず(1) ですが、MAAはコードしている遺伝子配列が*amyM*遺伝子を再現しているものなので、熱耐性を含めた酵素特性は、従来の $\alpha$ -アミラーゼTS-25 (Novamyl) と変わらないということでございます。こちらは2001年に官報掲載されたものでございまして、既に安全性審査の手続は経たものでございます。

続いて、16ページ、(2) 組換え体と宿主の相違点ですが、生産菌株は宿主と比較しましてMAAの産生能を獲得し、*B.licheniformis* BRA7株由来の複数の遺伝子を欠失しております。

続いて、第2の項目です。

まず2の1は記載のとおりでございます。

2の2でございますが、こちらには過去の評価例とともにバイオセーフティーレベル1に分類される旨の記載がございます。

続いて、2の3から2の5については記載のとおりです。

18ページ下からが「第3 ベクターに関する事項」ですが、*AmylaseNCC*遺伝子導入用ベクターの基となったpICatH、こちらは22ページにあるものでございますが、これは過去の審議品目においても用いられたものであり、既に評価した実績もございます。

続いて、23ページについては、性質に関する事項については記載のとおりです。

続いて、24ページをお願いいたします。

下から第4の項目でございまして、挿入DNA等に関する事項でございます。

まず25ページの「(2) 安全性に関する事項」でございます。挿入DNAの供与体は*G.stearothermophilus* C599株で、この菌株から得られた $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を*B.subtilis*菌株に導入して発現した $\alpha$ -アミラーゼは、1990年にJECFAにて「ADIを特定しない」との結論が出されております。

また、*G.stearothermophilus*は日本において経済産業省から、株の違いを問わないGILSP遺伝子組換え微生物として告示されております。

続いて、26ページをお願いいたします。2の(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。

まず、*AmylaseNCC*遺伝子発現カセットの作製が27ページからございまして、*G.stearothermophilus* C599株に由来する $\alpha$ -アミラーゼの遺伝子の配列が公開されており、*B.licheniformis*菌株を用いて効率よく $\alpha$ -アミラーゼを発現させるためにコドンを最適化し、*AmylaseNCC*遺伝子とし、*LAT*プロモーター及び*LAT*分泌シグナルペプチド配列をコードするDNA断片と●●●で接続しております。

続いて、28ページからが(2)ですが、こちらは記載のとおりです。

続いて、隣のページ「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」でございます。

30ページに行きまして図8にMAAのアミノ酸配列というのが示されてございまして、TS-25との相同性を確認したところ、100%という結果でございました。

続いて、32ページからが「挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性について」ということでございますが、*G.stearothermophilus*に関しては、日本における食品産業での使用経験があることも含めまして、アレルギー誘発性の特段の懸念はないと考えられるとしており、TS-25のアレルギー性の懸念が低いことは、ヒトを使った試験で確認されて文献に報告されているというものでございます。

続いて、4の3、4の4、4の5については記載のとおりでございます。

少し飛びまして36ページの(3)意図する挿入領域でございますが、こちらは38ページの表3にも示しておりますが、こちらが挿入された領域ということでアミラーゼの遺伝子配列と*catH*遺伝子の配列についての記載がございます。アミラーゼ以外については宿主自身のものでございます。

隣のページに行きまして、(4)は記載のとおりです。

続いて、4の6、宿主への導入方法でございます。

遺伝子導入用ベクターをプロトプラスト形質転換法により導入し、目的の*AmylaseNCC*

遺伝子発現カセット及び*catH*遺伝子発現カセットを連結したDNA断片を染色体にある欠失後の*catH*座の5'フランキング領域に相同組換えで組み込んでおります。

続いて、少し飛びまして42ページからが4の7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する項目です。

生産菌株の構築工程に関連するマーカー遺伝子は、既に過去に評価済みの生産菌株でも用いられているものでございます。なお、欠失用ベクターの作製に用いたカナマイシン耐性遺伝子は宿主改変の各段階でループアウトして脱落しているため、最終的には生産菌株には残っておりません。

続きまして、「第5 組換え体に関する事項」です。

5の1ですが、*AmylaseNCC*遺伝子が相同組換えによって導入されていること、及び宿主*B.licheniformis* BRA7株が有する複数遺伝子が欠失している点が異なる点でございます。最終的に生産菌株を得るまでの工程で選択培地のクロラムフェニコール濃度を段階的に高くしており、この際に*AmylaseNCC*遺伝子発現カセットが増幅されまして、染色体上には●●●の遺伝子発現カセットのDNA断片が組み込まれていることが確認されております。

この生産菌株の構築工程で用いたベクターには、ネオマイシン耐性遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子が含まれておりますが、生産菌株がネオマイシンまたはカナマイシンを含んだ培地では増殖できなかったことから、ベクターに由来する遺伝子が組み込まれていないと考えられるということで、ネオマイシン耐性遺伝子については43ページの図にも記載されておりますが、PCR法で増幅断片が認められないという結果も出ております。

続きまして、2の(1)、44ページでございます。

シーケンスの解析結果について記載されておりますが、DNA配列を解析したところ、●●●が45ページの図13の少し下辺りに記載されておりますが、●●●ということでした。次に、46ページをお願いいたします。

(2) ORFの有無についての項目です。*catH*遺伝子座と接合領域を含む近傍DNA配列に対しまして、終止コドンから終止コドンで終結する6つの読み枠で30アミノ酸以上に相当するものを検出してDNA挿入前の染色体配列と一致しなかった34個のORFを相同性検索の対象としております。

まずアレルゲンとの相同性検索ですが、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の数を評価したところ、ORF29と命名した配列に対しましてTAKAアミラーゼなど6つのアレルゲンがヒットする結果となりました。ヒットしたアレルゲンはいずれもWHO/IUIS Allergen Nomenclatureで登録がないか、または食品アレルゲンとしての登録がないアレルゲンであり、相同性の最も高かったTAKAアミラーゼについては、作業者の保護器具着用や換気等の設備を整備するなど、製パン業界などで作業者への安全な使用への配慮の下で使用されております。これらのアレルゲンはいずれも第1-1- (1) で挙げた従来の添加物のα-アミラーゼでも同様にヒットすると考えられまして、アレルギー誘発性の懸念は従来の添加物を上回るものではないと考えられるとしております。

49ページの上に行きまして「連続する8アミノ酸配列が既知アレルゲンと一致する配列の数」を評価したところ、こちらを該当するアレルゲンは見いだされなかったということです。

続いて、毒性タンパク質の相同性検索でございます。

E-value=0.1を指標にして検索を行った結果、ORF106と命名した配列に対して毒性タンパク質が1つヒットしたものの、安全性に懸念はないと考えたということでございます。

続いて、第6の項目です。

製造原料等は、従来の酵素と同様に使用されてきた実績がある旨が記載されております。

続いて、50ページ、第7の項目ですが、まず7の1、諸外国における認可の状況は、記載のとおりです。

続いて、隣のページ、2、組換え体の残存の項目ですけれども、MAAの酵素原体3バッチについてJECFAの食品用酵素剤の一般規格に対する確認試験を行い、生産菌が検出されないことを確認しております。

また、酵素原体中の組換えDNAの残存についてPCRで評価した結果、MAA酵素製剤には生産菌に由来する組換えDNA断片は残存しないと考えられるとしております。

続いて、53ページ、7の3、非有効成分の項目ですが、MAAを有効成分として含む酵素製剤は、JECFAの食品用酵素の一般規格に準拠している旨等の記載がございました。

続いて、7の4でございますが、56ページに図がございまして、SDS分析チャートをデンストメトリーで解析した結果、生産工程で精製されたMAAの純度は●●●ということでございます。

第7の5、第8については記載のとおりでございます。

申請書の説明は以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、この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。最初から24ページまででございます。

今日の申請は少々特異な点は、ほぼ同じものが2つ来ているところで、宿主は違うのですが、中に入れているものは全く同じですというように比べてしまうと要らないことに気がついてしまうのですが、例えばこちらではアミラーゼのECナンバー、エンザイムカタログナンバー、EC3.2.1.133になっておりまして、次のMAM株ですと3.2.1.1になっています。

3.2.1.1というのは普通のアミラーゼで、133、こちらのダニスコのほうの申請ですと、これはグルカン-1,4- $\alpha$ -マルトヒドロラーゼで、グルカンからマルトースを切り出すというところで少々細かくなっていて、問題ないといえば問題ないのですが、この辺のところは何か御意見等ございますでしょうか。よろしいですか。

比べてしまうから余計なことに気がつくものの一つが推定摂取量なのですが、こちらでは製パンのみ、それから、次のMAM株につきまして、製パンの部分はパン全部の小麦粉、



これは菓子パンとその他の小麦も含まれておりまして、これは推定摂取量が別々になっています。目的からしてパンにのみ使うということであれば、これで問題はないのではないかと私は思うのですけれども、この点についても御意見、どなたかございますでしょうか。

先生方、よろしいでしょうか。

これは、宿主は*B.licheniformis*、これまで特に最初のBRA7株、これも既に評価済みでして、この辺については何とか出されております。申請書そのものは50数ページありますが、内容については型どおりのところが多いので一遍に全部でよろしいかなと思いますが、どこでもお気づきになった点がございましたら御質問、御意見等をお願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 43ページとか46ページに次世代シークエンスの話が出てくるのですけれども、植物のほうだと、どの世代で次世代シークエンスをやったかとか事細かに結構書いてあるのですが、微生物のほうはこれまであまりどういうところの細胞を次世代シークエンスにかけたかというのはほとんど気にしていなかったといえれば気にしていなかったのですが、もう一個のほうは●●●、そうすると、どこの菌をシークエンスしてどこに●●●と確認したとか、そういうところが気になってしまうわけですね。

結局、最初は入っていなかったのだけれども、後から入ってきましたということになるのか、最初から作った段階で入っていますよということなのか、そういう情報は少し簡単でいいので、どういう細胞、バクテリアなのでどういうところの細胞、どの段階と申しますか、生産をかなり繰り返した後なのか、本当に作った直後なのか、もしくは保存菌株をつくっていると思うので、ストックしている菌そのものの次世代シークエンスなのか、どういう状態の細胞をシークエンスにかけたかというちょっと情報は今後入れてもらうようにしたほうが、やはりバクテリアの場合でもよろしいかなというように思ったのですけれども、どうでしょうか。

〇〇〇 まさしくごもっともだと思います。

申請者をお呼びしておりますので、その場で答えが得られるかどうかは分かりませんが聞いてみてもいいかなと思いますけれども、今後のルールとしても、どの段階でシークエンスをかけたのかという情報はやはり入れていただきたいので、私も御指摘どおりだと思います。ありがとうございます。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 私は分からないので委員の先生方、これは当たり前なのでいいということであれば、それはそれでいいと思うのですけれども、ここで実際に発現させたと言っているアミラーゼは以前にノボのものと一緒にという前提で、タンパクの分析はしていないのだが、これは例えばちょっと調べがつかなかったのですが、 $\alpha$ -アミラーゼの中にSS結合とか翻訳後修飾等があったときに、こういうように宿主が違ったりしても同じものができているという前提で議論をしても大丈夫なのかどうかということを確認させていただきたいと思います。

ここの先生方の専門性から考えて、いやいや、これはバクテリア、こういう菌で発現させている以上は、もともと設計図どおりに行っていれば大丈夫だよということであれば別にそれはいいのですけれども、というのは、これは普通にやる安定性なんかは同じものという前提で評価しているの、今回、新たにここでデータは出てきていないわけですが、その辺り、同じということで議論してもいいのですかねというのをお尋ねしたいのです。

〇〇〇 ごもったもな御意見と思いますが、先生方、どなたか。では、この辺はよろしければ私が。真核生物ですと糖鎖修飾とかいろいろな修飾があるのですが、バクテリアですのでそういう修飾というのはほとんど知られておらないので、同じ*Bacillus*、特に非常に近縁の*Bacillus*ですので、アミノ酸の配列が変わっていなければ、その後、同じところで同じものができているということを確認しておりますので、この場合は問題ないかと。

〇〇〇 物で確認していますか。

〇〇〇 物ではなくてアミノ酸の配列で確認しているけれども、この場合、アミノ酸の配列で確認してあって、つまり、違うところが切れているとかそういったことはないということを見ていけばバクテリアの場合は。

〇〇〇 アミノ酸で。

〇〇〇 アミノ酸配列は一緒でしょう。

〇〇〇 配列はベクターで確認しているだけではないですか。

〇〇〇 あとは、セカンドプロセッシングとかそういうのはそんなに問題にはならないので。

〇〇〇 SS結合はどうですか。

〇〇〇 SSはどのなのだろう。SSは活性が同じだったらまず同じと考えていいと思います。

〇〇〇 活性は比較していません。

〇〇〇 でも、それでも活性があるなら、バクテリアの場合は細胞の中がすごく還元的で外へ出てくると酸化できるのは、そこで一気にSSがかかりますので、それで間違っていればいきなりこの活性はないのが普通なので、同じように使えているということであれば、この場合はあまり問題ないと思います。真核生物だったらその辺もちょっと考える余地はあるのですけれども、ここはバクテリアなのであまりそういう話は聞いたことがないですね。

私は大体そのくらいに考えているのですけれども、先生方、御異論、御意見いらっしゃる方、どなたかありますか。

〇〇〇 ですね。どうぞ。

〇〇〇 座長がおっしゃったように、今回はもともと*Bacillus*に分類されていたもので最近、*Geobacillus*になったものをさらに*Bacillus*に入れているので非常に近縁の種間でやっていますので、配列上、大きな何かトリッキーなことをやっていなければ大体普通は同じものがつくられてくると思って、コドンも一応合わせてあると思いますのでよろしいかと思うのですけれども、一応こちらの申請書のほうはSDS-PAGEがついているので、バンド

が1本で、分子量はややちょっとずれているかなという気もしなくもないのですが、変なプロセッシングもされていないだろうというように判断できるということで、こちらの申請書のほうはいいかなと思うのですが、もう一個のほうはそういうデータがついていないので、それはちょっとどうかなと思っているところです。

〇〇〇 ありがとうございます。

実は次の申請書のほうは私も少々言いたいことがございまして。

どうぞ。

〇〇〇 今のお話は、もう専門の先生たちが太鼓判ですから、それ以上はと思えますけれども、もう一つ、29ページのところでのこと、これは結局、もともとの宿主にあるアミラーゼは欠損させるということだと理解していますが、29ページで最後のところで、「それぞれの生産能を欠失している」、それから、そのさらに後で「生産されず」というように書いてあるのですが、これはそれぞれの言ってみたらできてくるプロダクト側で確認しているというデータはちょっと見えないのですけれどもね。これもこういうようにつくられていれば、これは特段にそれをデータで示せと言わなくてもいいですか。

〇〇〇 バクテリアなので、ここも私がと思いますが、これらのまず欠失させる遺伝子は *Bacillus* 属を宿主にするときには、この辺の遺伝子を欠失させるのはほぼ常識的で、私がやるのでもやると思えます。アミラーゼを大量につくりますので、そこに余計なエネルギーを割かれないようにするためのアミラーゼを潰すとかです。

実はプロテアーゼはこれ以外にも幾つもあるので、この書き方は本当に問題がないかと思えば、そうでもないとも言えるのですけれども、少なくとも対応するプロテアーゼは生産されなくなって、これは割とメインなプロテアーゼの遺伝子を潰していますので、この書き方そのものはさほど問題はないかなというのが私の印象です。

先生方、どなたか付け加えること等ございますでしょうか。

それでは、もう一つ、従来の  $\alpha$ -アミラーゼとアミノ酸配列が同一であるということで、今回の件については人工胃液、人工腸液等の試験を行っておりませんが、この点についてはいかがでしょうか。

〇〇〇あたり、何かどうですか。

〇〇〇 従来から配列が同じということで、タンパク発現も似ているということもありましたので、特に分解性試験をしていないということはよろしいかというように思います。

〇〇〇 ありがとうございます。多分先生はそうおっしゃるかなと思いましたが、ありがとうございます。

〇〇〇 タンパクの発現は最後の電気泳動以外は見えないけれども、いいですか。

〇〇〇 そうですね。そこで純度とか調べているということで、それで物が発現されると確認できればよろしいかというように思いました。

〇〇〇 活性を見ているし、●●●この手の物にしてはそこそこの純度を確保しておくようかなと私は思っていますので、そんなに問題はないかなと思うのですが。

先生方、ほかにどうぞ。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 すみません、もう一つのほうを並べて見てしまっているとよく分かるので、やはり今、〇〇〇がおっしゃられるとおりで、もう問題はないということですが、記載のする部分、例えば次のDSMの申請ですと安全性に関する事項のところ、文章で物理化学的性質については2行で既存品と同等と書いてくれているので、そこはやはり記載だけは追記してもらっておいたほうが整合性は取れるような気がするのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇 私もごもっともと思うのですが、先生方、いかがでしょうか。

〇〇〇 そのように思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

その辺の追記はしてもらうように要求しようかと思えます。安全性そのものにはさほど問題ないかとも思うのです。

申請者は来ておるのですが、ネットに入ってくるのか。この場に来ている。申請者は待機しているのだそうで、お呼びしますか。先ほどの〇〇〇の御質問でシーケンスした世代くらいは聞いてもと思えますし、また、エンザイムカタログナンバーの話くらいは、せっかく来るなら何か聞こうかと思えます。では、安全性に直接多く問題になるようなことはあまりないかなとは思っているのですが、せっかく申請者が来ておりますので、そのくらい聞いてみたいかなと思えます。

あと先生方、その場で何かお気づきの点等ございましたら質問していただければと思います。申請者をお呼びしてください。

(ダニスコジャパン株式会社関係者入室)

〇〇〇 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。

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。

〇〇〇 ダニスコジャパンの〇〇〇と申します。

〇〇〇 さほど大きな問題ではないのですが、今回の $\alpha$ -アミラーゼ、エンザイムカタログナンバーが3.2.1.133となっております、別に $\alpha$ -アミラーゼならば3.2.1.1でもいいのですが、133と詳しくなっているところ、何か理由はございますか。

〇〇〇 これは $\alpha$ -アミラーゼという枠組みの中ではそのとおりなのですが、選択的といえますか、多く生産されるデンプンの分解物が二糖、麦芽糖のこちらで $\alpha$ 型ができるということで、その場合は、より $\alpha$ -アミラーゼの中で下位の分類の133のほうに今回記載してございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

今回の最大摂取量の計算のところ、製パンのみになっておりますが、これは使用目的としてはほかに小麦粉に添加するいろいろな可能性もあるのですが、製パンのみを想定されているということよろしいですか。

〇〇〇 製パンのみでございます。ほかの用途ですと海外で既に先行して売っているのですけれども、商売としてあまり買ってくれるお客様がいらっしゃらないということでした。日本でも同様に考えております。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、次世代シーケンサーの話は〇〇〇のほうから直接していただけますか。私からでもいいのですけれども、〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 今まで添加物の酵素の遺伝子に関して次世代シーケンスをやるのが最近多いのですけれども、あまりこれまで情報を求めてこなかったところはあるのですが、どういったバクテリア、要するにつくった直後なのか、随分培養した後なのか、それとも、会社のほうで保存菌株というのを必ずつくると思うのですが、そういう保存菌株に相当するものを次世代シーケンスにかけたのか、バクテリア、どういう状態のものをかけたかというのを今後ちょっと記載してほしいなと思ってまして、簡単でもいいのですが、今日、お分かりにならないかもしれませんが、そこら辺を確認していただきたいなと思っております。

〇〇〇 御指摘ありがとうございます。これは先生おっしゃるとおり、今、答えを持ち合わせておりませんので確認をさせていただきたいと思います。それから、以降の申請ではその点をなるべく記載できるように情報を取っていきたいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほか、先生方、ございますでしょうか。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 すみません、安全性上は多分ほとんど問題ないとは思っているのですけれども、49ページの毒性タンパク質との相同性が一部見られましたというところなのですが、ORF106というのは●●●、これは使われているような遺伝子なので問題はないと思っておりますが、相同性が見つかった相手が●●●というやつなので、ここをもう少し詳しく記載してほしい。要するに、こういう仕組みで働く毒性タンパク質なのかどうかはちょっと分かりませんが、毒性タンパク質として知られているのだったら、こういうメカニズムで毒性タンパク質として働くことは知られていて、今回の部分はそのメカニズムに照らし合わせて大丈夫でしょうみたいな形に書いていただくとありがたいなというように思います。

〇〇〇 承りました。どうもありがとうございます。確認をさせていただきたいと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほかにございませんか。

〇〇〇、よろしいですか。ごめんなさいね。

〇〇〇 大したことではないのですけれども、当たり前のことだからということで記載されていないと思うのですが、ここでできるアミラーゼ自身は既存に使われているものと

じなので消化性及び物理化学的性質については変わらないということですので省略されてしまったと思うのですが、非常に申し訳ないのですが、数行で構いませんので、既に使われているものと同じであるから、その安全性の上で加熱処理及び物理化学的性質の消化性については変化がないと考えられるということをごちゃと付け加えてください。お願いします。

〇〇〇 明示して書くようにという御指示でございますね。承りました。ありがとうございます。

〇〇〇 そういうことです。

〇〇〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 コロナ禍でせっかく来ていただいているので、あくまで参考までにお尋ねしたいのですけれども、こういう製品に関して、御社の場合はもう世界的にもトップを行っている、トップに近いところにいる会社の場合、例えばこういうケースに発現している $\alpha$ -アミラーゼに関して、もう少しキャラクタライズしているというようなこととか、それから、ここで例えば欠失されたもので活性が実際にあるのかについては、この書きぶりだとチェックしていないというような、実際のデータはお持ちでないような書き方になっているのだが、その辺はこういうことでしょうかね。ちょっと参考までです。すべきということで聞いているわけではありません。

〇〇〇 実際のもの、何ができているかというのは、まずは少なくとも分子量の大きさを見ておりますことと、それから、実際に組み込んだ後の遺伝子をシーケンシングしまして、それでアミノ酸の配列をたしか申請書にお書きしたというところはあるのですけれども、もう少しそこを分かりやすいように書くというところはこれからの課題。

すみません、私もそのところは実は日本にR&Dもないことがあってなかなか見たことがないので、お答えが今、できなくて申し訳ないです。

〇〇〇 個人的な興味もあって申し訳ないのですけれども、今どきのトップ企業はどの程度のことをやっているかなということを知っておきたいと思うので、これはあくまで参考です。要求しているわけではありません。

〇〇〇 機会がありましたら、また先生方にもお伝えする機会。それから、欠失型のほうは、これはいわゆるセルフクロニングというタイプのところで、以前のケースからの類似のケースですので記載が残っているのですけれども、今の枠組みでいいますと、自分たちで、自社で認証できる程度のもので、そこは必ず欠失されているような遺伝子になっているというように理解しております。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほか、先生方、よろしいですか。お疲れさまでした。

〇〇〇 どうもありがとうございました。

(ダニスコジャパン株式会社関係者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻りたいと思います。

ただいまのこの回答を踏まえまして御意見、コメント等ございますでしょうか。

記述のところでは少し直していただくところはあると思いますが、安全上は特に御指摘等はなかったと思いますが、先生方、よろしいですか。これだけは、札がありましたら意思を確認したいと思いますので、よろしくお願いいたします。

(同意する委員あり)

〇〇〇 ありがとうございます。

では、本件につきましては、安全上問題がないということですので、評価書案の審議に入りたいと思います。お願いします。

〇〇〇 それでは、評価書案のほうについて御説明いたします。

評価書案を1つのファイルに束ねましてお送りさせていただいております。下のほうにページ数を打っておりますので、そちらを御参照いただきたいのですが、まず本品目の評価書案、7ページをお願いいたします。

7ページのまずI、概要でございます。

本添加物は、*Bacillus licheniformis* BRA7株を宿主としまして、*G.stearothermophilus* C599株由来の改変 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を導入して作製されたBML780 MDT06-221株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼでございます。本添加物は、デンプンの $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素でございます。パンの製造における品質維持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)ですが、名称は $\alpha$ -アミラーゼ、基原は*Geobacillus stearothermophilus*、有効成分は $\alpha$ -アミラーゼでございます。

「(2) 製造方法」ですが、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造されます。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」です。

$\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解して低分子化する酵素で、パンの製造における品質維持を目的として使用されます。

続いて「(4) 摂取量」ですが、 $\alpha$ -アミラーゼが菓子パンを除くパン類の製造工程に使用され、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0.003mg TOS/kg体重/日でございます。

続いて、2の(1) 宿主ですが、*B.licheniformis* BRA7株でございます。

続いて、(2) 供与体の種名ですが、 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の供与体は、*G.stearothermophilus* C599株でございます。

(3) 挿入DNAの性質です。

*Amylase*NCC遺伝子は、*G.stearothermophilus*由来の野生型 $\alpha$ -アミラーゼをコードします。

*catH*遺伝子はクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードし、選抜マーカーに用いております。

*AmylaseNCC*遺伝子発現カセット及び*catH*遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクターをプロトプラスト法で導入し、あらかじめ欠失させた宿主ゲノムの*catH*遺伝子座に相同組換えにより遺伝子導入用ベクターの目的とする領域を挿入しております。

続いて、3、食経験等ですが、*B.licheniformis*は長期にわたり食品用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がございます。

続いて、4、宿主の構成成分ですが、*B.licheniformis*は、ヒト、動物及び植物に対して非病原性であり、有害生理活性物質を生産するという報告はございません。

続いて、5、組換え添加物の性質ですが、(1) 製品名は未定、以下「MAA」としております。有効成分は $\alpha$ -アミラーゼ。

続いて、(2) から (4) は記載のとおりでございます。

続いて、6の (1) MAAと従来の $\alpha$ -アミラーゼとの相違点はございません。

生産菌株と宿主との相違点ですが、生産菌株には*AmylaseNCC*遺伝子が複数コピー導入され、MAA生産能を獲得している点並びに $\alpha$ -アミラーゼ生産能、孢子形成能、アルカリプロテアーゼ生産能及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ生産能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。

続いて「第2 宿主に関する事項」は記載のとおりでございます。

10ページ「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作製にはpICatHが用いられまして、pICatHの構築には*Escherichia coli*由来のプラスミドpBR322が用いられております。

2の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の (1) は記載のとおりです。

(2) 安全性ですが、*G.stearothermophilus*は我が国においてGILSP遺伝子組換え微生物とされております。また、旧分類である*B.stearothermophilus*は第9版食品添加物公定書に $\alpha$ -アミラーゼの生産菌として掲載されております。

続いて、2の (1) クローニングに関する事項ですが、*AmylaseNCC*遺伝子は*G.stearothermophilus* C599株由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の公開されている塩基配列に基づきコドンの最適化を行い、合成した遺伝子でございます。また、宿主由来 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の分泌シグナル配列が付加されております。

(2) は記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能ですが、*AmylaseNCC*遺伝子がコードするMAAは、デンプンの $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素でございます。また、安全性審査が終了してい



る $\alpha$ -アミラーゼTS-25とアミノ酸配列が同一でございます。

*G.stearothermophilus*は、既存添加物 $\alpha$ -アミラーゼの生産菌として記載され使用経験があること、TS-25にアレルギー誘発性の知見はないとする報告からMAA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記載しております。

続いて、3、4、5については記載のとおりです。

12ページの下からが導入方法になります。相同組換えによりましてpICatH-LAT-AmylaseNCCの目的する領域を宿主ゲノムの欠失された*catH*遺伝子座に挿入した形質転換体を選抜後、クロラムフェニコール選択圧を上昇させ、*AmylaseNCC*遺伝子発現カセットを増幅させた株をこちらにも生産菌株としております。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子についてですが、遺伝子導入用ベクターはネオマイシン耐性遺伝子を持ち、宿主に導入されますが、ループアウトにより脱落しているため、生産菌には残存しません。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は、本来宿主に存在する遺伝子を欠失させた後に再導入したものでございます。したがって、新たな抗生物質耐性マーカー遺伝子は導入されていません。

続いて、第5の項目です。

まず1については記載のとおりでございます。

続いて、2の(1) *AmylaseNCC*遺伝子発現カセット及び*catH*遺伝子発現カセットの導入位置を確認するためにシーケンス解析を行った結果、1か所に複数コピー挿入されたことが確認されました。

(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、ORFが合計で34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アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとしてTAKAアミラーゼを含む6つのアレルゲンが検出されました。これらのアレルゲンは従来の $\alpha$ -アミラーゼでも同様に検出されたことから、アレルギー誘発性の懸念は従来の添加物と同等であると考えられたとしております。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。

さらに、毒性タンパク質との相同性については、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められなかったと記載しております。

続いて、第6は記載のとおりです。

第7、まず1、諸外国における状況ですが、デンマーク、フランス、カナダにおいて承認されております。

続いて、2、組換え体の残存ですが、MAAに生産菌が検出されないことが培養を用いた手法により確認されております。また、PCR法により、MAA製剤からは生産菌に由来するDNA断片は検出されないことが確認されました。

3、4、5、そして、第8については記載のとおりです。

評価書案の説明は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

ただいまの評価書案につきまして、御意見、コメント等を承りたいと思います。お気づきの点などございますでしょうか。

〇〇〇ですね。どうぞ。

〇〇〇 306行目からの「遺伝子導入に関する事項」の次に「制限酵素による切断地図に関する事項」というところなのですけれども、これは実は増幅が起きていて●●●だか入っていて、次、制限酵素地図もつくっていないし、サザンはやっていないのですよ。この項目は元をたどると評価基準、ガイドラインのほうに制限酵素による切断地図に関する事項というのがあって、導入した遺伝子断片について、断片の数、サイズをサザンブロットング解析パターンが明らかにされていることと書いてあって、それに準拠してここに書いてあるので、制限酵素地図は明らかになっているとなっているのですけれども、実際には明らかになっていないのです。

今、もうサザン、面倒くさいので、古いのでなければもうやらないですね。やはり今風にしないと、ガイドラインをいじるのは相当面倒くさいと思うのですけれども、ガイドラインをいじらないのであれば少なくとも例えば次世代シーケンサーに挿入遺伝子が確認されているぐらいで収めておくとか。制限酵素地図は明らかになっているとやってもいいことを書くのはちょっとまずいのではないかという話で、今どきに合っていないなというように思いながら見ていたのですけれども、そこら辺、考えたほうがいいのではないかなと思った次第です。

〇〇〇 言われてみればごもっともですね。その辺、事務局で検討していただけますか。今回ののは、これはこれだと思うのだけれども、確かに言われたように全くもってごもっともだと思いますので、そういうことでよろしいですか。

ほか、先生方、どうぞ。後から細かい字句等お気づきになりましたことがありましたら、事務局まで伝えていただければと思います。それでは、よろしいですね。

それでは、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、進めていきたいと思えます。ありがとうございます。

では、早速、次に行きたいと思えます。

新規品目であるMAM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼについてです。

それでは、事務局のほうからまた続けてお願いいたします。

〇〇〇 それでは、御説明させていただきます。

こちらの品目も先ほどと同様に申請者の方をお呼びしております。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えます。その後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、申請書MAM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼのほうについての申請資

料を御用意ください。

ページ数はまず3ページをお願いいたします。

第1の1の(1)、名称は $\alpha$ -アミラーゼ、基原は*Bacillus stearothermophilus*でございます。

「(2) 製造方法」ですが、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造されます。

「(3) 用途及び使用形態」ですが、 $\alpha$ -アミラーゼはデンプンの $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素でございます。パンの老化防止のためにパン生地添加到したりデンプンからマルトースやハイマルトースシロップ等のデンプン糖を製造するために用いられます。

「(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が製造されることを仮定して算出した結果、推定最大摂取量ですが、次の4ページの表1に整理されておりますとおり、0.0076mg TOS/kg体重/日と算出しております。

続いて、2、宿主の項目ですけれども、(1) 宿主は*B.subtilis* DS18174株でございます。野生株の168株を変異原処理及び遺伝子組換えすることにより孢子形成能及び $\alpha$ -アミラーゼを不活化並びにプロテアーゼを欠失することにより構築されております。

(2) 挿入DNAの供与体の由来ですが、挿入DNAは*amyM*遺伝子でございます。供与体は*Geobacillus stearothermophilus* ●●●でございます。

続いて、4ページの下です。*amyM*遺伝子でございますが、 $\alpha$ -アミラーゼタンパク質をコードいたします。*amyM*遺伝子発現カセットを持つプラスミドpGGB21MAN1が相同組換えにより宿主ゲノムに挿入されております。その際、分子内相同組換えによりベクター及び内在性遺伝子●●●は除かれております。また、抗生物質耐性マーカー遺伝子は生産菌MAM株には残存しておりません。

続いて、1の3でございます。

*B.subtilis*は、食品や食品添加物での適用の分野では最も知られた微生物の一つで、リボフラビン、 $\alpha$ -アミラーゼなどの食品添加物の基原として既存添加物名簿収載品目リストに収載され、広く利用されており、豊富な使用経験がございます。

1の4は記載のとおりです。

続いて1の5、組換え添加物の性質でございます。

(1) は記載のとおりです。

(2) ですが、従来の食品酵素の製造方法と同様でございます。

(3) についても用途及び使用形態は従来の添加物と変わりはありません。

(4) 有効成分の比較ですが、既存添加物の生産菌から得られた $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を改変せずに発現させたものであるため、従来品の有効成分と同一でございます。

続いて、1の6、従来の添加物の相違点ですが、まず(1)の比較は表2にまとめられておりますとおりでございます。

続いて、(2) 組換え体と宿主との相違点ですが、MAM株と宿主との相違点は、MAM

株には *amyM* 遺伝子が挿入され、 $\alpha$ -アミラーゼ産生性を獲得している点及び孢子形成能を欠失している点でございます。

続いて、第2の項目です。

1は記載のとおりでございます。

続いて、2ですが、*B.subtilis*に有害生理活性物質を産生するという報告はございません。

続いて、2の3から2の5については記載のとおりでございます。

続いて、8ページ「第3 ベクターに関する事項」です。

*amyM* 遺伝子の挿入に用いましたプラスミド pGGB12MAM1 ございまして、その基となったベクターは *Staphylococcus aureus* 由来の pE194、pUB110 及び *Bifidobacterium longum* 由来の pMB1 由来の複製開始配列でございます。

続いて、3の2は記載のとおりです。

続いて、9ページ下から第4の項目でございます。

10ページの上から (2) 安全性の項目でございますが、*G. stearothermophilus* は中等度高熱菌の一種ございまして、ヒトに対する病原性及び毒素生産性は知られておりません。ATCC ではバイオセーフティーレベル1に分類されております。

続いて、2の (1) 挿入遺伝子のクローニング合成方法です。

$\alpha$ -アミラーゼ遺伝子は、*G. stearothermophilus* ●●● 由来のゲノムDNAを鋳型として、文献を基に作製したプライマーを用いたPCRによりクローニングしております。

(2) は記載のとおりです。

続いて、(3) 挿入遺伝子の機能です。

$\alpha$ -アミラーゼ遺伝子がコードする  $\alpha$ -アミラーゼは、グルコース重合体の  $\alpha$ -1,4結合を加水分解し、主にマルトースを生成させる酵素でございます。

その下、アミノ酸配列ですが、●●●シグナル配列がついておりまして、これも含めた配列は11ページの図4に記載されているとおりでございます。

続いて「②遺伝子産物及び供与体のアレルギー誘発性に関する知見」ですが、PubMed で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ということです。

「③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」ですが、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アミノ酸配列に対して35%以上の相同性を示す既知アレルゲンとして、*Aspergillus oryzae* の TAKA アミラーゼなどが検出されております。本品目は既存添加物である *G. stearothermophilus* 由来  $\alpha$ -アミラーゼは、本品と同一の配列ございまして、既知アレルゲンとの相同性についても同様であると考えられ、アレルギーの報告はございません。したがって、本品のアレルギー誘発性は既存添加物と同様に低いと考えられるということでございます。

続いて「④物理化学的」という項目でございます。

「(a) 人工胃液及び腸液に対する感受性」ですが、本品は既存添加物である *G. stearothermophilus* 由来  $\alpha$ -アミラーゼとアミノ酸配列が同一であることから、消化性につ

いては既存品と同等と考えられるということでございます。

「(b) 加熱に対する感受性」ですが、本品の熱安定性を調べるために、本添加物を●●●加熱し残存活性を調べた結果、●●●以上の加熱で失活することが確認されました。続きまして、3、4、5については記載のとおりでございます。

13ページの下から(3)意図する挿入領域ですけれども、標的遺伝子座として●●●遺伝子座の5'領域及び3'領域の相同配列で挟まれた*amyM*遺伝子発現カセットでございます。

(4)は記載のとおりです。

続きまして、4の6、導入方法でございます。

14ページになります。

(a)のほうですけれども、DS18174株にプラスミドpGGB12MAM1を導入して形質転換しました。本プラスミドは相同組換えにより宿主ゲノムの標的遺伝子座に挿入され、●●●を選択マーカーとして一次形質転換株を選択しております。この中から分子内相同組換えによる●●●遺伝子を含むベクター部分が除去され、●●●を選択マーカーにして●●●自然脱落株というのを得ております。

(b)の説明は割愛させていただきまして、その下のパラグラフなのですけれども、ゲノムシーケンス及びサザンブロット法によりpGGB12MAM1のベクター部分及びpGGB35がMAM株から除かれていることを確認しております。

続いて、7、抗生物質耐性マーカーの項目ですけれども、プラスミドpGGB12MAM1及びpGGB35はブレオマイシン及びネオマイシン耐性遺伝子を持っていますが、生産菌株には残存しておりません。

続いて、第5の項目です。

まず1、宿主との差異ですけれども、生産菌株は*amyM*遺伝子発現カセットが挿入され、孢子形成能関与遺伝子が欠失している点で異なります。

2の(1)、MAM株のゲノムシーケンスの結果から、*amyM*遺伝子は標的遺伝子座に●●●挿入されていること、また、*amyM*遺伝子内で●●●ことが確認されております。

隣のページに行きまして2の(2)として遺伝子導入におけるORFの有無についてです。

ORFの検索を行った結果ですが、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71個検出されております。

アレルゲンとの相同性検索ですが、既知のアレルゲンとしまして連続する80アミノ酸配列に対して、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はネッタイシマカのアレルゲンタンパク質であるAeda4.0101及び*Aspergillus oryzae*のTAKAアマラーゼと相同性を示しましたが、いずれも食品アレルゲンではなく、*amy*遺伝子のコードする $\alpha$ -アマラーゼでも同程度の相同性であることから、本ORFのアレルギー誘発性が高いとは考えられないとしております。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検出されませんでした。したがって、本品のアレルギー誘発性は既存添加物と同様に低いと考えられるということでございます。

続いて、毒性タンパク質との相同性検索ですが、E-value<0.01を指標に検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められなかったということでございます。

続いて、第6ですが、製造原料等の項目です。

製造原料等は長期間安全に使用されてきた実績があるという旨が記載されております。

続いて、第7でございます。

7の1では、諸外国における認可の状況について記載されております。

続いて「2 組換え体の残存に関する事項」ですが、本品を有効成分とする酵素原体における組換えDNAの残存をPCRにより確認したところ、検出限界以下であり、組換えDNAは検出されなかったということでございます。

続いて、7の3、非有効成分の項目ですが、*B.subtilis*に有害生理活性物質を産生するという報告はなく、本品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値を定めている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いるという記載がございます。

続いて、第4、第5については記載のとおりでございます。

申請書の説明は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして先生方から御意見いただきたいと思っております。あまり大部ではありませんので、どこからでもお気づきになった点、御指摘いただければと思っております。今度のは先ほどのと導入されている遺伝子が同じで、宿主がこちらは*B. subtilis*、168株といたら大腸菌でK12にも相当する遺伝子組換えのもともとの株でして、そこから次にDS18174株、ここまでは既に申請評価済みですので、これに対して今回、*amyM*を導入して、●●●の変異を導入してMAM株が合成されておりますので、エンザイムカタログの問題、それから、推定摂取量については先ほどと同じような問題がございます。先生方、どこでも結構です。

この株についても人工胃液、人工腸液の検査をやっておらないのですが、導入されている遺伝子についてアミノ酸配列は変わっていないということで、〇〇〇、それでよろしいですか。

〇〇〇 先ほどと同様にこちらも大丈夫だと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇ですか。どうぞ。

〇〇〇 こちらのほうが次世代シーケンスで、*amyM*遺伝子内で申請書のほうの14ページ一番下を書いてありますけれども、●●●ということで、これは先ほどの問題につながるのですが、どの細胞をシーケンスしたのかというところを少しお聞きしたいのと、できれば今後、書いていただきたいというのが一つ。

生産菌だと思えるのですが、そこをちょっとお聞きしたいということと、同じ14ページのところにサザンをやっているようなデータがたしか出てくるのですが、その元デー

タを拝見したのですが、プローブとか何の制限酵素で切って、推定、このぐらいの長さで出るよとか、どこの位置にプローブをつくっているかとか、全く情報がないというか、私には見えなかったもので、そこら辺ははっきり書いてほしいということ。

あと、こちらのほうで私、探したのですけれども、**SDS-PAGE**がついていないように思うのですが、どこかにあるのですか。そこら辺は事務局にもお伺いしたい。

〇〇〇 まず申請者はお呼び、後で同じく聞いてみようと思うのですが、今、事務局のほうでこの**SDS-PAGE**、探しているのです、ちょっとだけお待ちください。

〇〇〇 事務局です。

**SDS-PAGE**のほうについては、添付資料のほうには今回どこにもないと。事務局のほうでも確認しましたが、ないということでございます。

それから、〇〇〇のおっしゃるサザンの結果というのは、添付資料17のことということによろしいでしょうか。

〇〇〇 そうです。17です。

〇〇〇 17は御指摘のとおり、これだけなので、これ以外の情報は一切ないというところなので、申請者も今回呼んでおりますので、コメントとかいただければと思っております。

〇〇〇 了解しました。

〇〇〇 〇〇〇ね。〇〇〇、ミュートになっている。

〇〇〇 すみません、聞こえますか。

〇〇〇 聞こえます。

〇〇〇 すみません、サザンのところですが、プローブの位置は一応 *amyM* 遺伝子をプローブとしたというように書いてあって、具体的にどこからどこまでというような情報はないのですが、軽く記載はあるようですということなのです。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。よく見てくださったので。サザンのデータで納得させようと思ったらどこからどこがどうプローブなのか、実は我々、その辺は根掘り葉掘り確認するルールなので、サザンのデータが載っているのだったらちゃんとプローブのデータもきっちり書いてもらわないと、*amyM* だけだと不十分だなというのがこれまでの慣例なのです。御指摘ありがとうございました。

〇〇〇 了解しました。ありがとうございます。

〇〇〇 〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 16ページで「諸外国における認可、食用等に関する事項」のここの説明の2行目で、「なお、欧州では、EFSAにおいて、この食品酵素としての安全性審査が終了し、その安全性に問題はないと結論づけられた」と書いてあるのですけれども、これはEFSAの報告の結論はペンディングです。

欧州は大体、私もいろいろ知っているわけではないのですけれども、このEFSAジャーナルのレポートを見ると、毒性試験として、最低、変異原性試験と反復投与毒性試験を評

働いているようですが、ペンディングになったのは変異原性試験で、これは微妙なところなのです。だけれども、それに関してひょっとして混入しているトリプトファンが原因ではないかということをもEFSAが言っているのに、だけれども、もう一回実験をやり直せという要求をしたのだが、答えが返ってこない。それで遺伝毒性に関しては結論を下さないと書いてあるのですよ。これは少なくとも添付資料34から見ると、結論は出ていないですね。これは事実関係を確認して、どうしているかということにはちょっと確認してからでないと。少なくともこれは何かその後経過があって安全性に結論はないとEFSAが判断したということが確認できなければまずいですね。

〇〇〇 これは担当者を呼ぼうと思うので、きっちり問いただしてあげてください。今、ペンディングになっているところで私も文書で確認いたしましたので。

ほかに。では、早くお呼びしようと思いますので、何かその場でお気づきになったことがあればまた御指摘いただければと思います。申請者を呼んでください。

(DSM株式会社関係者入室)

〇〇〇 お忙しいところをお越しいただきまして、ありがとうございます。

自己紹介をお願いいたします。お名前と会社名だけで結構です。

〇〇〇 DSMの〇〇〇でございます。

〇〇〇 DSMの〇〇〇と申します。よろしく申し上げます。

〇〇〇 ありがとうございます。

今回の株、対象のアミラーゼ、エンザイムカタログナンバー3.2.1.1、1.1は $\alpha$ -アミラーゼなのでいいといえはいいのですが、 $\alpha$ -アミラーゼにもいろいろございまして、もう少し細かい分類等々もあるのですが、そこはこれで十分とお考えですか。

〇〇〇 今の御質問は、分類は今、記載のもので十分と考えているかということでしょうか。

〇〇〇 そういうこと。 $\alpha$ -アミラーゼはもう少し細かい分類もあって、68とか133とかいろいろ細かく分類する面もあるのだけれども、御社ではこれで十分とお考えになっているということですか。

〇〇〇 実はEFSAのほうでは133で分類されておりますが、日本で同じ既存品は3.2.1.1と記載されていたので同様に記載しております。

〇〇〇 ありがとうございます。

推定摂取量の計算のところ、これは製パン目的とは書いてあったのだけれども、推定摂取量のところでは製パンに限らず小麦全部書いてあるのだけれども、これは製パン目的以外にも使う可能性とかそういう意図があるということなのではないでしょうか。菓子パンと、それから、その他の小麦と書いてあるのだけれどもね。

〇〇〇 基本的には製パンのみなのですが、そのパンの分類上、どこに分類されるかというところがまた微妙なものもあるのかなと思ひまして多めに算出させていただいております。



〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、ゲノムシーケンスの問題、これは〇〇〇のほうから質問していただけますか。

〇〇〇 〇〇〇です。

申請書のほうの14ページのところに、一番最後の行に●●●というように、次世代シーケンスをやって●●●というようになっていまして、元の資料を当たったのですけれども、それが●●●だというのは細かくは書いていなくて、ここに●●●みたいな形になっていたのですが、できればもう少しそれを詳しく例えば●●●とか、ちょっとあるのかもしれないませんが、それは書いてほしいのと、それと、どの細胞ですね。要するにつくった直後の細胞なのか、何代か培養した後の細胞をシーケンスしたのか。多分どこの会社さんでも保存菌株というのは必ずつくって、それを大事に持ちながら生産していくと思うのですけれども、そういう保存菌株をシーケンスしたのか、どういう段階の細胞をシーケンスしていて生産菌との兼ね合いからどう思うように考えたらいいかというのがちょっと分かるように記載してほしいと思います。

以上です。

〇〇〇 まず、どの細胞をシーケンスに用いたのかはちょっと確認します。

●●●というのは添付資料12のほうに一応記載しておりまして、上から7行目ぐらいのところなのですけれども、カラーで、色で分けているので、もしかするとお持ちのやつが白黒かもしれないのですが、●●●ことの記載がないということでしたね。そちらについては追記でさせていただきたいと思います。よろしいでしょうか。

〇〇〇 その結果が●●●かどうかとか、そういうところを添付資料ではなくて概要のところ記載してくれないと、こちらとしても本当にこれは安全なのかどうかと確認するのにえらい手間なので。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 なので、そういう情報はぜひ少し分かりやすく入れていただけると助かります。それから、純度等のデータは、これはSDS-PAGE等はやっているのか。データはなかったのだけれどもね。

〇〇〇 やっております。

〇〇〇 それで純度等を確認しているのかな。

〇〇〇 私どもは純度については、SDS-PAGEから純度を算出するということは行っておりません。

〇〇〇 何でもいいのだけれども、SDS-PAGEをやっているのだったらそのデータを載せてほしい。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 それから、純度はこういう方法で調べて何%であったとか、それも概要のところに分かりやすく載せていただかないとこちらでも審査が難しくなるので。

〇〇〇 純度について、微生物から抽出するものなので、培地成分であるとか菌体の細胞自体のタンパク質であるとか、そういったものも混在しているものですので、そちらの中からその物だけを分けて精製しているわけではないというか、そのタグとかで釣ってきているわけではないので、その物だけの純度を測るということはちょっと困難であるということをお説明させていただいているのですけれども、ただ、安全性に関しては、もちろん御存じのとおり生産菌はもう安全性は分かっているものですし、入れている遺伝子も既存品と同じものですので、不純物が入っていたとしても、それは安全性には問題ないと考えております。

〇〇〇 純度をどうやって測ったのか。

〇〇〇 純度という意味では測っておりません。ただ、いつも活性値でクオリティーはコントロールしています。

〇〇〇 SDS-PAGEをやってくれて、それでやっているのだったらそのデータを載せてくれば、こちらからもおおむねこの純度が99%なのか、95%なのか、5%なのかという。

〇〇〇 そういうざっくりした感じでというか。

〇〇〇 そういうデータを載せてくれないと、95%がそういうレベルであれば細かい不純物はいいだろうということにもなりますし、目的のものよりも不純物のほうがずっと多いというレベルだとどういったものが含まれているのかとか、その辺もチェックさせていただかないとこちらとしても安全性が確認できないので、だから、SDS-PAGEをやっているのだったらデータを載せていただけるとこちらも見やすかったのかなと思うのです。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 ほかの件、ごめんなさい、次に〇〇〇のほうからEFSAの件に続いていただきます。少しだけお待ちいただけますか。

〇〇〇 この概要の16ページの「第7 遺伝子組換え添加物に関する事項」の1で「諸外国における認可、食用等に関する事項」で、その以下の説明の2行目から「なお、欧州では、欧州食品安全機関において、2018年1月に食品酵素としての安全性審査が終了し、その安全性に問題はないと結論づけられた（添付資料34）」と書いてあるのですけれども、添付資料34を読むとペンディング、genotoxicityが追加データを要求したが出てこない。これはどうなっているのでしょうか。

〇〇〇 御指摘のとおり、記載に間違いがございました。大変申し訳ございません。本社のほうに確認しましたところ、EFSAでは、今、最初提出した資料で2018年に一度評価は終了していて、今、御説明いただいたように、評価書にあるように一部のデータが不十分であるので決定的な結論は出されていないというのが現状でございます。

今、genotoxicityに不備があったということですが、Amesの試験だったのですが、こちらが製品中に残存しているアミノ酸によって疑陽性が示されたことによってEFSAでは不十分とされております。ただ、遺伝子組換えや製造方法、あとは組成とかコンポジションであったりだとか、あとは暴露やアレルギー性については安全性に問題ないと結論づ

けられております。

〇〇〇 読み間違えています。

〇〇〇 読み間違えておりますか。

〇〇〇 EFSAはcouldと書いてあるので、「トリプトファンが原因ではありうる」と言っているのですよ。もしそうならば、そうだということは御社がちゃんとデータとして示さないと、食品安全委員会は普通、よほどでないでないと遺伝毒性試験は必要としないのですよね。それで助け船を出すと、このレベルはなかなかちょうど陽性か陰性かいろいろエキスパートジャッジが入る領域だと私は思うのだけれども、でも、こういうように出ている以上は、それから、EFSAでペンディングになっている以上、では、これを削除したらいいですよという具合にはいかないと思うの。やはり御社の考え方、EFSAがトリプトファンですと言ったわけではないですよ。

〇〇〇 もちろんそうですね。

〇〇〇 だから、それはトリプトファンだったということを御社が言ってもらわないと。よろしく。

〇〇〇 このAmes試験の再試験は行っておまして、では、そちらの結果をこちらに書かせていただくようにします。こちらでいいのかちょっとよく分からないですけども、その書く場所は事務局の方と御相談して、そのような指摘を受けてそれについて調べているが、問題ないことを確認しているという旨を書かせていただきます。

〇〇〇 とすると、この書き方もちょっと変えないとならないと思うので、よろしく。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 それでは、〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 すみません、先ほどの純度のお話のところちょっと分からなかったのですけれども、要は不純物だというお話だったのですが、恐らく精製はされているのですね。

〇〇〇 ●●●で精製しております。

〇〇〇 その最後の精製品についてのSDS-PAGEを多分必要かと思っているのですけれども、そちらのほうにコンタミが多いということなのですか。

〇〇〇 コンタミが多いというか、やっではおります。

〇〇〇 純度が求められないというお話なのですが。

〇〇〇 そこから純度を求めること自体はやっておりません。数字として求めること自体はやっておりませんが、SDS-PAGE自体はやっております。

〇〇〇 最終精製品のということですよ。

〇〇〇 そうですね。製剤ではなく発酵が終わって精製が終わっているものですね。

〇〇〇 そうですか。多分、その純度は一番最後の製品のことをいつもSDS-PAGEで出しているのです、そちらのほうのSDS-PAGEの図が必要なのではないかなと思うのですが。

〇〇〇 そちらのいろいろ物質、入っていますけれども、よろしいのでしょうか。

〇〇〇 それはそうですね。

〇〇〇 安定剤が入っているので、安定剤を入れておかないとね。だから、最初の純度と言ってもタンパクとしての純度でよくて、なので、できれば安定剤を入れる前の段階。

〇〇〇 最後のところですね。直前ですよ。

〇〇〇 最後、安定剤を当然入れないと製品にならないので、そこの純度という、それはまた別の話になりますので、元の菌体とか培養液由来の要は不明なものについての純度、これはお願いしたいなと考えているので、それでよろしいですよ。それでよろしいですか。

〇〇〇 私が言っていることですね。そうです。

〇〇〇 〇〇〇、よろしいですか。

〇〇〇 分かりました。そういうこと。

〇〇〇 では、〇〇〇、たしか発言されてましたよね。

〇〇〇 14ページの中段のところにサザンプロット法でバックボーンとか導入遺伝子を確認したみたいなの記述があって、これは添付資料の17だと思うのですが、17のほうに多分●●●みたいなことが書いてあるのですが、こういうときは下に図があって、どこにプローブが配置されていて、例えば●●●とか、そういうように書いていただかないと、どこにプローブが配置して、どこを見ているのかというのが直感的に分からない図になっているので、そこをもう少し親切に書いてほしい。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 少なくとも●●●というのは私には読み切れなかったの。

〇〇〇 図解をお願いしたいということで、今回は次世代シーケンサーのデータの補足があるからいいのだけれども、本来はサザンハイブリダイゼーションだけで確認する場合には、このプローブは導入された遺伝子の全ての領域をカバーする複数のプローブで、サザンで確認するという、それがルールなのね。ただ、今回は次世代シーケンサーのこのデータの補強がありますので、そのサザンなら先ほど〇〇〇から指摘があったように、どの領域のどこをプローブにしたのか、その図解だけきっちりしていただければ結構です。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 先生方、ほかに。〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 ありがとうございます。

すみません、生産菌の失活に。聞こえますか。

〇〇〇 聞こえていますよ。どうぞ。

〇〇〇 すみません、生産菌の失活に●●●を使っているんですけども、最終製品への残存はないのでしょうか。確認をされているのでしょうか。

〇〇〇 最終製品とおっしゃっているのは、食品の最終製品。添加物。

〇〇〇 製品のです。

〇〇〇 添加。

〇〇〇 添加物の。

〇〇〇 こちらはちょっと確認しないと分からないのですけれども、ただ、酵素自体は食品の製造に小麦1kgに数mg、数十mg程度添加するものなので、●●●食品中には入らないというように考えております。

〇〇〇 それならそれで、どれだけの●●●を使ってどういように精製して、それで最終の下流の製品に●●●が残っていないなら残っていない、それから、残っている可能性があるのだったらマックスでこのくらい残る可能性があって、●●●、そこをきちんと論証していただかないと我々、安全性を確認できないのだけれどもね。

〇〇〇、こういうことでよろしいですね。

〇〇〇 はい。ありがとうございます。

〇〇〇 先生方、ほかに。ここで全部、問題を全て洗い出したいと思いますので、後から五月雨式というのは避けたいと思いますので。

お願いします。

〇〇〇 すみません、次世代シークエンスのデータのところなのですけれども、ちょっと説明が不足しているかなという部分がありまして、私が見た限りでは次世代シークエンス、ショートリードなのか、ロングリードなのかとか、何ベース読んでいるのか。それとカバレッジはどのぐらいなのかというのが通常書いてあるのですけれども、そういうのがすぐには見づらいというところがありますので、そういったところもきちんと見やすいようにまとめていただけますでしょうか。

以上です。

〇〇〇 ちなみに、14ページの下の部分に書いたのですけれども、これは申請書の本文のほうに記載したほうがよいという理解でよろしいでしょうか。

〇〇〇 そういうようにお願いします。

〇〇〇 それとも、この資料自体。

〇〇〇 概要のほうにbpと平均リード長を書いていただけると我々もどのくらい信頼できる次世代データなのかと評価できるので、そうお願いできれば。

〇〇〇 概要の14ページの下のところに記載しています。それを本文のほうに入れればよいという理解でよろしいですか。

〇〇〇 その概要を見ただけでそれが把握できるように書いていただけるとありがたいです。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 繰り返します。bpと平均リード長くらいをお願いしたいと思います。

〇〇〇、これでいいですか。

〇〇〇 了解です。

〇〇〇 ほかに。

〇〇〇 質問をよろしいでしょうか。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 先ほどの●●●のことなのですからけれども、こちら、弊社のほかの製品でも少なくとも組換え微生物由来の酵素にはよく使うものでして、恐らく非組換えの酵素でもよく使われる成分、物になるのですが、こちらは酵素ですので公定書に規格がございまして、こちらで規格が定まっています、製造基準は設けられていないのですが、その中の範囲で弊社のこちらの製品も製造するということになりますが、今回、この遺伝子組換えの専門調査会での●●●の安全性への影響が懸念されるというのは、どのように理解したらよろしいでしょうか。

〇〇〇 つまり、従来の製造基準に従って製造していて、これまでも使用実績もあって、それで事故なく健康被害等の報告もなく無事に使っている。今回のこの酵素についても同様の製造基準に従って使っているというように書いてもらえれば、そうかと思える。●●●この精製工程から考えて、多分最終のやつにほとんど残っていないとは思いのだけれども、でも、これを見ただけでは我々はそこを判断できないので、その辺が分かるように書いていただかないとこちらは評価できないので、これでよろしいですか。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 〇〇〇ですか。お待たせしました。

〇〇〇 これは記載整備上の話なのですからけれども、従来添加物に関して、これは既に遺伝子組換え添加物として承認されているものが従来添加物になっていると思うのですが、そこら辺の記載がほとんどなくて、もういきなり従来添加物と書いてあって、これは何年にどういう商品で承認されていて、それが従来添加物で、それと比較してきちんとアミノ酸配列で100%一致しますとか、そういうことをきちっと記載整備していただきたいと思います。

以上です。

〇〇〇 その評価がいつ出されたとかというのは記載させていただきます。アミノ酸配列が一致していることについては概要書の6ページに一応記載はしているのですけれども、これ以外にどこか。

〇〇〇 従来のもので何年に認可されたか、それを記載してくれて、するとアミノ酸配列は同じですと、こういうように書いてくれればそうかこちらも分かるので、そういうようによろしくをお願いします。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 先生方、ほかに。よろしいでしょうか。

では、お疲れさまでした。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

(DSM株式会社関係者退室)

〇〇〇 それでは、この審議に戻りたいと思います。

深刻なのはないけれども、これだけ宿題が出て、ここでオーケーというわけにもいかな

いとは思いますが、どうでしょうか。取りあえず申請者にはまた書き直していただいて、見たいと思うのですが、先生方、それでよろしいですか。今回で片をつけてしまったほうがいいとお考えですか。いいですね。ということで、この件はペンディングで出し直していただくというように判定したいと思います。ありがとうございました。

それでは、先生方から提出されてきました意見、確認事項等を指摘事項案として取りまとめまして、関係する先生方と、それから、私のほうで確認した上で厚生労働省を通じて申請者に対して指摘したいと思います。一生懸命、メモも取っておりましたので我々の言いたいことは伝わったのかと思いますが、改めてまた指摘事項として提出して手続を進めたいと思います。ありがとうございました。

それでは、本日3件目になりますが、ちゃっちゃと行きたいと思います。

DSM32805株を利用して生産されたキモシン、新規品目です。これ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。

〇〇〇 説明させていただきます。

DSM32805株を利用して生産されたキモシンの概要書をお開き願います。

まず、このキモシンなのですがということで、5ページ、6ページを御覧いただくとおり、添加物のキモシンについては、もともとは反すう動物の第四の胃袋から採取されているものですが、申請者はその遺伝子をバクテリアに組み込み、製品化したものということでございます。

6ページの表を見ていただければと思いますが、申請者は既にカイマックス、カイマックスMで評価を受けていますが、それぞれの遺伝子の由来は仔牛、ラクダとなっております。今回、そのラクダのキモシンのアミノ酸配列を改変したもので申請したというものでございます。

それでは、進めていきたいと思います。7ページ、第1、比較対象の添加物についてでございます。

1-1、比較対象の添加物の名称はキモシン、基原は反すう動物の第四の胃としております。有効成分、ここでは仔牛由来のキモシンでございます。

8ページに参りまして摂取量でございます。

キモシンを添加して作られるチーズについて、チーズの製造方法、様々ございますので摂取量を正確に測ることは難しいため、熟成を行わないフレッシュチーズで換算をしております。一日の最大摂取量は $0.043 \mu\text{g}/\text{日}$ 、体重当たりに直すと $0.0008 \mu\text{g}/\text{日}/\text{kg}$ となるといったところでございます。

1-2、宿主及び導入DNAについて、宿主につきましては*Aspergillus niger* NRRL3112株となっております。こちらは*Aspergillus*の*awamori*の株として米国農務省から入手したものであるということですが、次のページ、この菌は、分類が一旦、*Aspergillus luchuensis*に変更されました。

しかし、今回、申請者は、この宿主について同定を行ったところ、やはりこれは *Aspergillus niger*であったということで、本申請書においては宿主の分類は *A. niger*としております。

なお、先ほど申し上げましたウシのキモシンと、あとラクダのキモシンの導入したのものについても同じ株を宿主としているといったところで、同じ宿主を使ったものの3つ目ということでございます。

9ページの(2)のDNA供与体についてでございます。供与体については表1を御覧いただければと思いますが、目的遺伝子は *camChyS* 遺伝子ということで、ラクダのキモシンからアミノ酸配列を変えたものということでございます。また、選択マーカー遺伝子としてオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードする遺伝子を組み込んでおります。こちらは、ウリジン要求性を相補するものであり、ウリジン生産性を獲得する遺伝子となっております。

また、次のページ、グルコアミラーゼ遺伝子でございますが、これは宿主の *A. niger* に由来するグルコアミラーゼの遺伝子となっております。

組み込み、導入方法については10ページの図1のとおりでございます。ウシのキモシンを導入した生産菌からウシキモシン遺伝子を欠失した後に、*camChyS* 遺伝子を導入し生産菌を作成しています。

導入カセットにつきましては12ページの図2を御覧ください。

続きまして、第1-4、宿主の構成成分に関するものということで、*A. niger* についてはオクラトキシンA及びフモニシンB2を生産する可能性があるということからですが、今回の生産菌株を分析したところ、いずれも検出下限未満であったといったことでございます。こちらは後ほど第7-3のつくりましたタンパクを見て規格の確認のところでもやっていますので、そこで改めて説明します。

1-5、製品についてのものでございますが、製品名及び有効成分は、この1-5- (1) のとおりでございます。

13ページ、製造方法については、この図3のとおりでございます。

培養後に酸により死滅させ、分離及びろ過により精製を行うといったものでございます。

14ページ、1-5- (3) 用途及び使用形態ですが、キモシンでございますので、チーズ製造に用いるといったものでございます。

1-5- (4) 有効成分の性質と従来の添加物との比較について、今回、ラクダのキモシンを改変させて作成したということで、従来のキモシンと比べて乳の凝集性が向上し、また苦味ペプチドが生成しにくいという特長がございます。

1-6で安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物との組換え体と宿主等の相違点は、今回の申請品については先ほど申し上げたキモシンの品質が良いということと、そのほかには従来のキモシンが反すう動物から得られるものであることに対して、申請品は *Aspergillus* につくらせているといったものでございます。



アミノ酸の配列につきましては、15ページの図4を御覧ください。従来のラクダのキモシンと今回のラクダのキモシンSについて、下線を付した●●●のアミノ酸が変更されています。

16ページ「第1-6- (2) 組換え体と宿主の相違点」については、宿主に対して●●●、キモシンの遺伝子が入っているといったものになっております。

続きまして、16ページの「第2 宿主に関する事項」に参ります。

宿主に関しまして、2-1、分類、位置づけにつきましては、記載のとおりでございます。*A.niger*として先ほど説明したとおりでございます。

2-2、病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項ということで、*A.niger*はバイオセーフティーレベルの1に分類されるものとしているといったところで、17ページに行きまして、オクラトキシンとフモニシンを生産する可能性があるといったことについては、先ほど説明したとおりでございます。

あと第2-3、第2-4については記載のとおり。

第2-5、類縁菌種についての病原性及び有害生理活性物質の生産については、近縁種の *Aspergillus carbonarius* がオクラトキシンを産生すること。あと *Aspergillus fumigatus* による日和見感染、気管支アレルギーというものが知られているといったところでございます。

18ページに参りまして、ベクターに関する事項でございます。

今回使用するベクターはpCCEx3-CMSというものでございますが、こちらは大腸菌由来のプラスミドであるpBluescript II SK (+) が用いられております。こちらのベクターマップにつきましては、19ページの図のとおりというものでございます。

こちらにつきまして19ページ、第3-2- (4) 、第3-2- (5) ということで、既知の有害な塩基配列は知られていない、薬剤耐性については、このベクターについてはアンピシリン耐性遺伝子が含まれているといったところです。また、伝達性に関する事項としては、伝達を可能とする塩基配列は含まれていないというものでございます。

20ページに参りまして、第3-2- (6) 宿主依存性についてということで、こちらは大腸菌由来のプラスミドということで、その複製開始配列は大腸菌のほうで機能されているところでございます。

第4に参りまして「挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターに関する事項」でございます。

4-1、DNAの供与体に関する事項については、キモシンの遺伝子については先ほど申し上げたラクダから取り、それを改変したものとなっております。また、マーカー遺伝子については *Neurospora crassa* というアカパンカビから取ってきた遺伝子となっております。あと *glaA* については *A.niger* のものとなっております。それぞれ安全性としては知られているといったものとなっております。

21ページの第4-2、それぞれの遺伝子の合成方法につきまして、第4-2- (1) 挿入遺伝子

及びクローニングもしくは合成方法に関する事項ということで、先ほどの3つの遺伝子をいずれも供与体の遺伝子配列を基に合成したといったものとなっております。

続きまして、挿入遺伝子の機能に関する事項に参りたいと思います。

22ページ、まず4-2-(3) *camChyS*遺伝子のa、遺伝子の供与体アレルギーの誘発性に関する知見ということで、供与体のヒトコブラクダは食料源として安全に利用した食経験を持つということで、アレルギーの誘発性を示唆するといったような報告は出ていないといったところ。また、その遺伝子の産物についてもアレルギー誘発性を示す報告はなく、また、文献を確認したところ、その報告もなかったといったところでございます。

また、キモシンの遺伝子の物理化学処理に関する感受性に関する知見ということで、まず人工胃液に関する感受性でございます。その結果につきましては23ページの図6を御覧いただければと思います。今回申請してきたものにつきましては、右側の(b)のほうになります。(a)がアミノ酸を改変する前のラクダのキモシンのものがございます。この2つを比較しているといったものがございます。いずれも人工胃液において約6時間でほぼ分解されるといったところが分かったといったところでございます。

また、同じく人工腸液に関する感受性ということで、こちらは24ページを御覧いただければと思います。9番目のレーンでございますが、こちら6時間の処理でほぼ消失されたということを確認しているといったところでございます。

続きまして、加熱処理に関する感受性ということで、それにつきましては25ページの図8を御覧いただければと思いますが、60℃でほぼ消失をしているといったところでございます。

続きまして、dの遺伝子の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ことで、既知のアレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行っております。まず80アミノ酸以上で35%以上の相同性を示すアレルゲンにつきましては、26ページの表3のとおり、7つ確認されております。こちらにつきましてはナンバー1からナンバー2、ナンバー3、ナンバー4で4つあるということで、ナンバー1とナンバー3とナンバー4については吸入性のアレルゲンで、こちらは高頻度に暴露されることによって起因されるものではないかということで、ナンバー2につきましては蚊に刺されることに起因するものということで、どちらも製造において適切な環境で行われているといった限りにおいてはほぼ問題ないのではないかと考えているといったところでございます。

26ページの②、連続する8アミノ酸が一致するアレルゲンについても検索を行っております。こちらは先ほど上の表3のナンバー1からナンバー3までがヒットしております。なので、アレルギー誘発性の可能性については低いと考えられるといったことでございます。

そのほか、導入される *pyr4* 遺伝子及び *glaA* 遺伝子につきましてはアレルギー性及び毒性を示すといった報告は出ていないといったことでございます。

続きまして、27ページに参りまして、4-3、挿入遺伝子及び耐性マーカーの遺伝子発現に関わる領域のものでございます。

(1) と (2) 、プロモーター、ターミネーターにつきましては、今回導入するものについては、*glaA*のプロモーター、ターミネーターと*pyr4*のプロモーター、ターミネーターが入っているといったところでございます。どちらも供与体を先ほど説明した *niger* と *Neurospora crassa* に由来するものといったものでございます。

(3) その他の発現制御に関わる遺伝子については組み込まれてはおりません。

第4-4、ベクターの挿入DNAの組み込みに関する事項でございます。

導入するベクターはラクダのキモシンSのアミノ酸置換をする前のラクダキモシン生産菌を作製するとき用いたベクターを基につくっております。ベクターを制限酵素で処理してラクダキモシンの遺伝子とラクダキモシンSの遺伝子を入れ替えているといったようなものとなっております。こちらのベクターマップにつきましては28ページの図9のとおりとなっております。

こちらのベクターについて、目的以外のタンパク質が発現するかどうかについてORF検索を行っております。それにつきましては29ページからになっておりますが、ORFを検索したところ、186個のORFが検出されております。今回、さらにそこから相同性を示すものを確認するために、前回認可を取ったラクダのキモシンの生産菌のときのベクターと比較をしているといったところで、そこと違っているものをアミノ酸、アレルゲンを示すかどうかといったところで検索をしております。なので、異なる部分のORFが今回17個ございました。それで検索をしたところ、1つのORFから相同性が確認されたものがございましたといったところで、それが30ページの表5になります。

その結果、80アミノ酸で35%以上の相同性を示すものについてはこのとおりということで、これにつきましてナンバー1からナンバー4までは26ページの表3と同じものとなっております。また、ナンバー5につきましてはグルコアミラーゼと相同性を有するものとなっておりますといったところでございます。

また、連続する8アミノ酸が一致するアレルゲンの検索については、こちらのナンバー1からナンバー3と同じものということで、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられているといったところでございます。

31ページの2) の毒性タンパク質の相同性検索についても同じORFを使って行っているといったところで、その結果につきましては31ページの表6のナンバー1からナンバー7まででございます。こちらにつきましては、いずれも酵素となっており、それは特に毒性タンパク質として知られているといったものではないということから、毒性タンパクが含まれる可能性は低いと考えられているといったところでございます。

32ページの第4-5- (3) 宿主に対して用いる導入方法において意図する挿入領域がベクター上、明らかであることについては、制限酵素を用いて消化して得られたカセットであって、それはベクター上で明らかになっているといったものであるということです。

4-5- (4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないように純化されていることということについては、標準的なDNA純化法を用いて純化をしているといっ

たところでございます。

4-6、DNAの宿主の導入方法に関する事項でございます。

導入方法につきましては、次の33ページの図10を御覧いただければと思います。ベクターを制限酵素で、2か所で切って、それを導入していくといったところでございます。

4-7、抗生物質耐性マーカーの安全性に関する事項ということで、今回、マーカーとして抗生物質耐性マーカー遺伝子は使っていないところでございます。

34ページ「第5 組換え体に関する事項」でございます。

5-1、宿主との差異につきまして、遺伝子発現カセットの導入が行われているということであって、有害生理活性物質に関するものがないということは第4のところの説明したとおりでございます。

第5-2、遺伝子導入に関する事項についてということで、DSM32805株の*glaA*遺伝子座における挿入の仕方ということは図11のとおりでございます。ゲノム解析によりフランキング領域に新たなORFが生じていないことは確認しております。

また、挿入カセットの数は●●●を推定しております。それにつきましては、34ページの後段、次世代シーケンスによるゲノム解析から次のページにかけての記載のとおりでございます。

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可能性についてですが、挿入したことによって新たなORFは生じておりませんということです。

36ページ、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ということで、6-1、添加物の製造原料または製造器材の使用実績があるということについては食品製造に一般的に使用されているものであるといったところ、あと製造設備はISO22000、ISO9001の認証が取られているところであるといったものです。また、既に認可を取れているウシキモシンとラクダキモシンの生産にも使われているといったようなところがございます。

6-2について安全性に関する知見については6-1で言ったとおりといったところで、安全性に懸念のある物質が混入されることは考えにくいというところがございます。

続きまして「第7 遺伝子組換え食品添加物に関する事項」ということで、今回の製品はカイマックスSupremeというものですが、従来の添加物同様にチーズの製造に用いられるというものでございます。

主な認可状況につきましては、その下に書いているとおり、米国、デンマーク、フランスで認可が取られているといったものでございます。

37ページに参りまして7-2、組換え体の残存に関する事項ということで、組換え体が残存しないことはPCR法によって確認しております。その確認の結果につきましては39ページの図13のとおりでございます。酵素のサンプルは11番から13番のレーンでございまして、組換え体は残存していないといったところがございます。DNAは検出されていないといったところがございます。

7-3、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項につきましては、規格基準を満た

していることと40ページの表7のとおりですが、あとはオクラトキシシ、フモニシシについても検出されていないということで、それぞれのバッチで確認しているといったところでございます。

7-4、精製方法及びその効果につきましては、その結果が41ページの図14のとおりでございます。こちら、つくられたキモシシについては糖鎖がつくことで2つのバンドが2つに分かれて出るのですけれども、それぞれ43kDaと39kDaのところに出ているといったところでございます。こちらの純度は●●●であったとされております。

第7-5、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動については、今まで説明してきたとおりといったところで、規格基準も満たしているといったところから従来の生産物の構成や成分の変動の範囲は従来の添加物の場合と同様であるといったところから、有害性が示唆される部分の常成分の変動はないと考えられるといったところでございます。

キモシシについては以上でございます。よろしく願いいたします。

○○○ ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして先生方から御意見いただきたいと思ひます。

これもそれほど大部ではないので、どこからでもと思ひますが、では、お気づきの点がありましたらよろしく願いいたします。

申請書の最初のほうに出てくるこの宿主が*A.niger*なのか、それとも*luchuensis*なのか。これはもともと*Aspergillus awamori*から琉球に由来ということで*luchuensis*になっているのだけれども、今回は参考文献、私も見てみまして*Aspergillus*の場合はなかなか分からないときにはチューブリンもしくはカルモジュリンのアミノ酸の配列で分類し直すというのはよくある方法で、それによると、この株は*A.niger*型であるという記載のある、そういう査読のある論文がありますのでいいかなと思ひのだが、この辺は実は分類が少々変わることもあるところなので将来的にひっくり返ることもあるかなと思ひ、それから、この写真とか見てみると*luchuensis*に特有のメトレがあるようにも見えるので、先々ひっくり返る可能性はまだあるのではないかなと思ひないでもないのですが、今回は査読つきの論文でこの根拠があつて*A.niger*であると同定しているので、私はいいかなど、今回のところはよろしいのではないかなと思ひます。

この点については先生方、何か御異論、御意見等ございますでしょうか。ありがとうございます。どなたもみんな気になっていると思ひのですけれども、23ページ、24ページの人工胃液、人工腸液のこのデータが甚だ見づらくて、何で見づらいのかなと思ひますと、ペプシシ単独で打ったレーン、それから、パンクレアチシ単独で打ったレーン、これがない。それから、このキモシシ、糖鎖付加型とついていない型と2つバンドが出てきて、それ自体はいいのですけれども、これがペプシシとバンドが重なるとか何とか言っておきながらペプシシの単独のレーンがないので甚だ見づらくなっておりまして、これで人工胃液のほうは15分で薄くなって6時間で消失、人工腸液のほうは6時間で分解という結論で、比較的分解しづらいタンパクであるという結論にはなつております。これでよしとするの

か。

この点についてはカイマックスM、これの審査、まだ1年半ほど前なので御記憶に新しい方もいらっしゃるかと思えますけれども、そのときもこれに近いデータでして、実はそのときにはおおむね安全性は確認できるということでオーケーにはしておるという経緯もございます。そのとききつく言わなかったから今回こんなのが出てきたのかとも思うのですが、この点についてはいかがでしょうか。この辺で決着をつけたいと思うのです。

〇〇〇、お願いできますか。

〇〇〇 もともと対象としたキモシンとは同様であるというようには読めるのですけれども、やはり見づらいですね。いわゆるペプシンのみのバンド、コントロールになるようなバンドは挙げてほしいというのは言っているような気がするのです。

〇〇〇 それにSDS-PAGEだけではなくて、これでウエスタンがあればちゃんと分解されているとかそれも確認できるのですけれども、ここにはそれもないので、そこがちょっと確認できない。少なくとも申請者が今日いますので、そこは問いただした上で判断したいと思うのですけれども、どうでしょうか。

〇〇〇 1点、少しになるのは、例えば図6なんかですと今回のキモシンSのほうだと3万7000ぐらいのところが残っている感じがするのですけれども、その辺りもウエスタンとかやってくれていけばはっきりすると思うのですが、ちょっと残りぎみ。

〇〇〇 ちょっと議論したいと思いますので。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 せっかく〇〇〇とお話しできているのもう一つ御見解をお聞きしたいのですけれども、今回はカイマックスMに対して●●●アミノ酸を変えてカイマックスSという、そののアレルゲンをチェックするときも差異のところをチェックしているのね。なので、アミノ酸を変えたところでアレルゲンになったところはきっちりチェックしている。それから、カイマックスMのところもチェックはもちろん前回の申請のときにしているのだけれども、今回はアミノ酸が変わったところだけちゃんと見ているので、カイマックスMの本体で変わっていないところについて、その申請したときのデータベースは古くないかと気にもなるのですが、そんなに大昔ではないのでいいといえいいのかもしれないし、その辺、〇〇〇の御見解をお聞きしたいのです。

〇〇〇 正確には私、あれですけれども、前のが2年前。

〇〇〇 事務局、バージョンを確認できましたか。

〇〇〇 もし最新のバージョンでというのが。

〇〇〇 〇〇〇、前回のが出てきまして、検索したのは2017年で、そのときのバージョンは15だと。今回のアミノ酸が変わったところのチェックしているのはバージョン19のデータベースでチェックしていて。

〇〇〇 2019年1月ですね。

〇〇〇 バージョン15と19の差がありまして、〇〇〇的にそれは許せますか。

〇〇〇 それほどデータベースが変わっていなければいいのですけれども、2年ぐらいだからそれほど大きな差ではないとは思っています。

〇〇〇 微妙ですね。

〇〇〇 微妙ですね。

〇〇〇 これだけで直ちに駄目ということでもないかなとは私も思います。

〇〇〇 そう思いますね。やり直してくればそのほうが良いと思うのですが。

〇〇〇 〇〇〇あたり、どうも思いますか。

〇〇〇 先方にとってそんなに大きな御負担でないのでしたら新しいものでやり直していただいたほうがすっきりするのではないかと思うのですけれども、いかがでしょうか。

〇〇〇 これでは許せないほど古いか、かなり微妙な線だとは思っているのですけれども、〇〇〇あたり、どう思いますか。

〇〇〇 微妙ですけれども、時間があればやり直しされたほうが良いかなとは思いますが。

〇〇〇 やり直しを命じるということは、今回は承認しないというのが確定する。

〇〇〇 私、前回のときのがいなかったものですから、どの程度でというのがちょっと分からないのです。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、どう思いますか。

〇〇〇 やはりできるだけ新しいのでやってもらうというのは悪くはないのかなと思います。

以上です。

〇〇〇 事務局とで懸念したのはこのくらいなのですけれども、あと先生方、申請者もお呼びしようと思いますので、議論したいと思うことはほかにございますでしょうか。

〇〇〇 25ページ、よろしいでしょうか。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 25ページからの既知アレルゲンとの相同性のところなのですが、書き方として、ここで表3にまず80%以上の相同性ということで従来のキモシンと今回のキモシンで相同性のあったもので挙げているのですけれども、そのときにそれぞれ4種類のアレルゲンがあって、どれも吸入アレルゲンであるとか蚊に刺されることで吸入するとあるのですが、今まであまり吸入アレルゲンということを強調してこなかったのも、ここでは承認されているキモシンと同様の相同性があるからというような説明のほうが今までのに合致しているのかなと思いました。

〇〇〇 そこは私もちょっと気になったところで、吸入アレルゲンならいいのかいと、そういうわけではないと思いますので。

〇〇〇 書き方をちょっと変えて。

〇〇〇 審査済みのキモシンと同等という説明だと我々もまだ納得もいくのだけれども、そういう趣旨ですね。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 それは申請者をお呼びしようと思しますので、直接ぶつけていただければと思いますので。

ほか、ございますでしょうか。申請者をお呼びして議論するほうがいいと思しますので、先生方もその場でお気づきになられたことなどありましたら御指摘いただければと思います。申請者をお呼びしてください。

(クリスチャンハンセンジャパン株式会社関係者入室)

〇〇〇 お忙しいところをお越しいただきましてありがとうございます。

自己紹介をお願いします。お名前と会社名だけで結構です。

〇〇〇 お時間いただきましてありがとうございます。クリスチャンハンセンジャパンの〇〇〇と申します。どうぞよろしく願いいたします。

〇〇〇 コンサルタントの〇〇〇でございます。

〇〇〇 この宿主の株が*Aspergillus niger*か、それとも*awamori*か。この*awamori*からだと*luchuensis*になって、その辺については、今回、論文をつけていただいてチューブリンのほうからこれは*niger*であると。これはそうではないとする論文もあって、*awamori*とされていて、この株の系統は*luchuensis*にもなっていて、御社で引いていただいている論文も査読のついている論文なのでいいのですけれども、こちらを採用した特に理由等はあるのですか。

〇〇〇 理由といたしますか、そういう本国のR&Dの人間がそのようにやってほしいという意図がきたのでそのまま書きました。

〇〇〇 チューブリンで、配列で最後分類するというのは*Aspergillus*属ではよくあることではあるのでいいのかなと思うけれども、また変わる可能性は大きいと思いますよ。写真を見せていただくと*luchuensis*に特有なメトレの構造があるように見えるので、先々変わる可能性もあるかなと実は思いますが、今回は査読のある論文でしていただいたのは、私はいいかなと考えています。

それでは、23ページ、24ページ、人工胃液、人工腸液の検査のもの。このデータ、一見して甚だ見にくくて、何で見にくいかというと、通常はこういうのをやるときにはサンプル、未処理のサンプル、ペプシン単独のレーン、それから、パンクレアチン単独のレーンがあって、それから時間のタイムコースを追って反応はするのですけれども、ここにはペプシンの単独とかそのレーンがない。だから、どの部分がどの分子のバンドがペプシンなのかというのが、これが一目では分からない。

その上、このキモシン、これはバンドが2本あって、片方は糖鎖のついた形ということらしいのだけれども、その一部がペプシンと重なっているという説明があって、はっきり言って何が何だか分からない。それでもキモシンの抗体でウエスタンのデータでもあればそこは確認できるのだけれども、それもないのではっきり言って訳が分からないのだけれども、それは何でやってくれないのか。



〇〇〇 これはまずコントロールがない話、確かに私もそれを疑問に思いまして確認したところ、使っている量が少なく、普通によく医薬でやる公定書の基準でペプシンを投入した場合にその濃度が低くて、単独でやってもバンドが見えなかったのであえて割愛したという返答が来ました。それは私の認識と違ったのですが、通常、ペプシンを入れ過ぎているのではないかというのがデンマークのR&Dの人のコメントでした。

あとウエスタンができなかったのは、これは前回のときも同じ御返答をしているのですが、抗体が取れなかったという、それが理由になっております。

〇〇〇 そういうことなのね。私も大学の教員をやっているけれども、学生がこのデータを持ってきたら何をやっているのだと突っ返してやり直させるレベルだと思うのだが、先生方、この問題に関して御意見ございますか。

このキモシンについては本気で抗体はつくれないものなのですか。

〇〇〇 手を動かしているわけではないので何とも。これももう一回、本社というか、本国のR&Dの人に、私も一応確認したのですけれども、トライしたができなかったという返答しか来ませんでしたので、そのまま書きました。

〇〇〇 活性のある全長の形だとなかなか抗体をつくりにくいというか、そもそもそれは注射したときに悪いことが起こってという、それはあり得るのだけれども、断片化するなり何なり、そういう努力をされているのかなと実は思ったもので、商品なのだからそのくらいやっているのではないかと思ったのだが、もう一踏ん張り確認していただけるとありがたいです。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 それから、前回のカイマックスMは一年半くらい前で、それは割と記憶に新しいのですが、今回、アミノ酸を●●●変換している。アレルゲンデータベースとぶつけて調べるのにアミノ酸配列が変わっているところをチェックしていて、それについて考察もされているということは、変わっていないところは見えていない、前回見たからいいでしょうということとも思うのだけれども、前回見たときのアレルゲンのデータベースはバージョン15で、今回はバージョン19で、実は2年半の差なのだが、結構バージョンが変わっていて、その間、データベースは充実もしている。なので、そんな手抜きせず全部新しいバージョンでアレルゲンチェックは常に最新のものであるという、一応そういうルールでもあるのでしていただきなかつたなとは思いますが。

〇〇〇 そのことも一応お伝えはしているのですが、最初はこれで見えていただいて、やはりそういうコメントが来たらやることはやぶさかではないというには聞いております。

〇〇〇 そんなもの、コンピューターの前に座って1時間もやればできるのだから手抜きするなよと怒っていたと伝えてもらえるとさらにありがたいと。

〇〇〇 お伝えします。

〇〇〇 それから、25ページ、幾つかアレルゲンで、データベースでヒットしたものについて考察、何が何でもヒットしたら駄目というわけでは、それはそれなりの考察が必要で、

考察はあるのだけれども、既知アレルゲンで吸入アレルゲンでありという記述もあって、吸入アレルゲンならいいのかと、必ずしもそういうわけではなくて、この場合は高頻度の暴露ではないから大丈夫とか、それよりもカイマックスのこれについては既に安全性については審査されているもので、それに比べてアレルゲンが殊さら上昇するものではないとか、そういうように言ってもらえると。そうでないと吸入アレルゲンなら何でもいいのかとか、そういうように取られるような考察だと必ずしもこちらは受け入れ難い点もありますので、その辺、もう少し慎重なディスカッションを展開していただけるとありがたいと思います。

先生方のほうからこの際、御指摘等ありますでしょうか。

〇〇〇 よろしいでしょうか。26ページの「連続する8アミノ酸配列が一致するアレルゲンの検索」というところがあるのですけれども、ここがタンパクとして1番、2番、3番のタンパクの中に一致するのがあるという書き方なのですが、それぞれの配列が3個、3個、9個、9個、一致しているのがあるので、8残基一致した配列が15個あって、それが既存のものと同じ部分であるというような書き方にさせていただければと。よろしいでしょうか。

〇〇〇 書き方ということですね。承知いたしました。

〇〇〇 ほかに先生方。

では、〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 1点確認というか御教示いただきたいと言ったほうがいいのかもかもしれませんけれども、40ページで御社の管理の考え方としては、オクラトキシンAとフモニシンB2を規格基準値というようにやって、こうやって分析したら、それをちゃんと陰性と出ますよというように書いてあるのですが、基本的にこの規格基準値というのは結局、公定書の規格基準もないですね。これは社内の規格基準で毎ロットチェックするというのでやっておられるのだろうか。それとも、ある期間というような話なのか、あるいは何ロット、ある期間やって、またしばらくたつてみたいな話で管理しているのだろうかという辺りをちょっとお聞かせいただければと思います。

〇〇〇 これは*Aspergillus niger*ですけれども、御存じのとおり、遺伝子クラスターがありまして、フモニシンの生産性が確認されている。そういうこともありまして、この系統株、結構上流のほうなのですけれども、それについて、いわゆるそういったマイコトキシンをインデュースする寒天培地で実際そういうものをつくるかどうかの確認をしたところ、条件によってはつくることが判明して、そういうことが分かったので、もちろん、タンクで液培しているときは通常つくらないのですが、可能性があるので毎回、この系統株については確認するという社内基準を設けているというように聞いております。

〇〇〇 毎回というのは、毎ロットという意味ですか。

〇〇〇 そこは多分毎ロットではないと思います。

〇〇〇 そうでもないかもしれない。規格基準値と書かれてしまうと、どういうように、

どのぐらいの懸念で、また、どういう考え方かなというのをちょっとお聞きしたかったので、そのうち、もう少し何か情報があれば教えていただければと思います。

〇〇〇 規格基準値、一番右側のは、これは社内ではなくて一般的な特に基準がないという意味で棒線を引いていまして。

〇〇〇 分かっています。だから、これはあくまで社内規格だということですよ。けれども、社内規格でも実は出荷規格の場合もあれば製造工程、製造管理の上での規格の場合もあるし、その辺りがね。だから、製造の段階だと例えば幾つか置きにやるとか、いろいろなことを考えてやっているはずなのです。その辺の重要度の度合いというのをちょっとどうかなと思って、今日答えられなくても別にいいです。これはどうしろこうしろとは思っていません。

〇〇〇 ですから、確かに表現がちょっとよろしくなかったのかもかもしれません。

〇〇〇 これは酵素をつくる時、タンク培養で液体培養なのは間違いない。

〇〇〇 それはそれで間違いありません。

〇〇〇 それだったらつくることはまずないと思います。それでもね。

〇〇〇 ただ、やはりリスクをとということではないかと。

〇〇〇 プレートで孢子とかつくらせると、その条件が二次代謝産物をつくる条件なので、それだつくる可能性、遺伝子があったらつくる可能性もあるとは思うのだけれどもね。なので、それだったら培養は液体培養で、それで孢子などが形成しない条件で培養しているというように言ってくると、少なくともカビ類の場合は二次代謝産物をつくる可能性はほとんどないと考えていいかなというように、そこは考えることができるかなと思うのです。なので、その辺、もう少しそこだけでも培養の条件のところをちょっと詳しく書いてもらえると評価しやすかったのだけれどもね。

もう一つ、この株、カルチャーコレクションから採取場所で採取したところがどこなのか。つまり、実際に*awamori*とついていたのだったら蔵から採取されたのであれば、それは実際に醸造に使われている可能性が高くて、それだとかなり安全性は高くなるのね。だから、*niger*ではなくて*awamori*から*luchuensis*だったらその辺はいいかなという感じだけれども、*niger*だったらそこは野生にもいるから、そこはきちりゼロから評価しないとこえてそうなるので、そういうことなのね。だから、*luchuensis*ではないかと言ったのは、むしろ助け船だったのだけれども、*niger*にしたいというのだったらきちり見させてもらうだけだから、それは別にいいのだけれどもね。

〇〇〇 恐らくフモニシンをつくるからというものもあるのではないかと。フモニシンの生産の可能性もあるというか、少なくとも寒天ではつくりますので、そこも*niger*というポイントの一つになるかと思います。

〇〇〇 そうなのかもしれないですね。*niger*なら*niger*で、そこはよろしいかと思いますので。その辺のところですね。

先生方、ほかにございますでしょうか。よろしいですか。〇〇〇。

〇〇〇 添付資料の11のSDS-PAGEのところなのですけれども、5ロットの結果が載っているのですが、糖鎖修飾、多分、その前のカイマックスMと変わっていないのだと思うのですが、できましたら変わっていないということも兼ねてカイマックスMも1例入れておいてもらえると、糖鎖の場所が変わっていないから分子量も一緒ですよとはっきり分かるので、それはできればお願いしたいなとちょっと思うのですというのが1点と、あと申請書のほうの34ページの次世代シーケンサーのところなのですけれども、あまり今までお願いしてこなかったのですが、どういうサンプルを次世代シーケンスにかけたかというのが分かるように記載していただきたい。

どういふサンプルかというのは、例えば培養を何代かやったサンプルなのか、それとも保存菌株に相当するものに実際シーケンスをかけたのか、つくった直後にその株ができた直後にもう次世代シーケンサーをかけましたというのか、どういふサンプルでやったのか、今まであまり求めてこなかったのですけれども、ちょっと気になるところもあるので、何か分かるような記載をいただけるとありがたいので御検討いただけたらと思います。

〇〇〇 確認いたします。

〇〇〇 では、15ページの図4のアミノ酸配列の中で、ここに糖鎖が付加されるのであれば恐らくN糖鎖でしょうから、N糖鎖付加部位、指定のマークを入れていただけるとありがたいです。

〇〇〇 前回のものにはついていたと思いますので、それを追記いたします。

〇〇〇 たしか290の辺りだと思いますけれどもね。

先生方、ほかにございますでしょうか。では、よろしいかな。お疲れさまでした。

〇〇〇 ありがとうございます。

(クリスチャンハンセンジャパン株式会社関係者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻りたいと思います。

ただいまのこの回答を踏まえまして御意見、コメント等ございますでしょうか。

指摘、細かいのが幾つかありましたけれども、いずれも前回のカイマックスMの件と、それから、今回の深刻なものではないように思うので、先方からの回答が戻ってきた時点でそこを確認させてもらうのが前提になりますが、これは基本的には安全性に懸念はそんなにはないのではないかと思うのですが、重要な決断になりますので先生方、御意見をいただきたいと思います。いかがでしょう。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 安全性には多分問題はないのではないかとはいいますので、評価書を見てもいいかとは思いますが。

〇〇〇 ありがとうございます。

では、〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 もう安全性の意味では問題ないので、評価書をやってしまいましょう。そのほうがいいと思います。

〇〇〇 〇〇〇、いかが。

〇〇〇 安全性は大丈夫だと思いますので、今のうちやっておいたほうがいいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

では、深刻な健康被害とかはなさそうに思いますので、評価書案の審査に進みたいと思いますが、先生方、よろしいでしょうか。意思表示をお願いします。この会、全会一致のルールですので、お一人でも納得されない方がいたら進めないという。

(同意する委員あり)

〇〇〇 ありがとうございます。

細かいところはともかく、安全性には懸念はなさそうだとということで評価書案の審議に入りたいと思います。よろしくをお願いします。

〇〇〇 評価書案の審議のほうに参りたいと思います。

資料、食品健康影響評価に関する資料の37ページをお開き願います。

最初に申し上げておきたいのですが、前回、キモシンMのときに宿主の分類が*A. luchuensis*とされ、本申請品も同じ宿主菌であることから、申請者は*niger*として申請していたのですけれども、案を作成するときに宿主名を*A. luchuensis*にしましたが、*A. niger*に戻します。

では、評価書案の説明をさせていただきたいと思います。

37ページ「I.評価対象添加物の概要」でございます。

品目はDSM32805株を利用して生産されたキモシン、用途はチーズ製造、申請者はクリスチャンハンセンジャパン株式会社でございます。

本添加物は*Aspergillus niger* NRRL3112株を宿主として、ヒトコブラクダ (*Camelus dromedarius*) 由来の改変プロキモシン遺伝子を導入して作製された*A.niger* DSM32805株を利用して生産されたキモシンである。本添加物は、ミルクの主なタンパク質であるカゼインの特定部位を切断して疎水的カゼインミセルを形成させ、ミルクを凝集するプロテアーゼであり、主にチーズ製造に使用されるといったものでございます。

II、健康影響評価、第1、比較対象とする添加物につきましては、記載のとおり。

製造方法、用途、摂取量についても記載のとおりとなっております。

38ページ、「宿主及び導入DNA」でございます。

宿主については先ほどのとおり、*A. niger*でございます。DNA供与体につきましては改変ラクダプロキモシン (*camChyS*) 遺伝子の供与体はヒトコブラクダであるとしております。また、選択マーカーとしてウリジン産生遺伝子の供与体は*N.crassa*となっております。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」については記載のとおり。

3番目、宿主の添加物製造への利用経験または食経験に関する事項についても記載のとおりでございます。

宿主の構成成分に関する事項ということで、こちら、*A. niger*はオクラトキシンA及びフモニシンB2を産生するという報告がある。

5番、遺伝子組換え添加物の性質及び用途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。

次、39ページに参りまして、145行目、6番、安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物の組換え体と宿主等の相違点につきまして、遺伝子組換え添加物と従来の添加物につきましては、相違点は遺伝子の供与体が異なる点、κ-カゼインの特定部位のアミノ酸結合部位を加水分解する選択性が高く、非特異的なタンパク質の分解が少ない点であるということ。

なお、Camel Chymosin Sは、安全性審査の終了した*C. dromedarius*由来のラクダキモシン、カイマックスMのアミノ酸配列に対して●●●の置換を行っているといったものでございます。

「(2) 組換え体と宿主」は記載のとおりでございます。

「第2 宿主に関する事項」については、1番、宿主は*A. niger*、2番の生産性についてはBSL1に該当するといったものでございます。

40ページに参りまして、3番、宿主及び定着性に関する事項、4番、病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項、5番、宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項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」につきましては、1番、名称及び由来については記載のとおりです。

「2.性質に関する事項」の(1) (2) (3) (4) (5) (6)についても記載のとおりでございます。

41ページ「第4.挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項」について、1番の「挿入DNAの供与体に関する事項」、名称及び由来、分類については記載のとおり、安全性に関する事項について*C. dromedarius*については、中東及び西アフリカにおいて、飲用乳、チーズ等の食料源に利用されている。*N. crassa*については、食経験は知られていないが、国衛研においてBSL1に相当するといったものでございます。

2番、挿入DNA又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項、(1) 導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いて、*camChyS*遺伝子は、ラクダ由来のラクダプロキモシン遺伝子を基に合成され、ラクダプロキモシンの塩基配列に複数のアミノ酸置換が導入されているといったものでございます。*pyr4*遺伝子については*N. crassa* 74A株由来の遺伝子を基に合成されたということでございます。

(2) 塩基数、配列、制限酵素による地図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」は、①*camChyS*遺伝子について、挿入遺伝子の供与体のアレルギー性に関する事項については、報告はありません。遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見についても報告はありません。また、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もなかったとしております。

42ページ、252行目のc、遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性に関する知見につ

いて、人工胃液、人工腸液及び加熱処理に対する感受性については記載のとおりでございます。

「d.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」については、Camel Chymosin Sの既知アレルゲンと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アミノ酸配列に対して35%の相同性の既知アレルゲンとしてペプシンA等の複数タンパク質が検出されたが、これらはCamel Chymosinにおいても検出され、同程度の相同性を示すことが確認されているとしております。また、連続する8アミノ酸についても同様の記載としてしております。

*pyr4*については、アレルギー性を示す報告はないとしております。

43ページに行きまして、3、挿入遺伝子及び抗生物質マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項ということで、(1) プロモーター、(2) ターミネーター、(3) その他の発現制御に関わる塩基配列については記載のとおりでございます。

4、ベクターの挿入DNAの組み込み方式に関する事項についても記載のとおりとしております。

「5.構築された発現ベクターに関する事項」でございます。

(1) 塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図に関する事項については記載のとおり。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列に、新たに目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないことについて、導入DNA断片領域について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までの終結する連続する30アミノ酸以上のORFを合計186個検出している。そのうち、*camChy*遺伝子と*camChyS*遺伝子に置換したことにより、新たに検出されたORFは17個であった。

17個のORFと既知のアレルゲンとの構造相同性についてアレルゲンデータベースを用いて検索した結果、連続する80アミノ酸配列で35%の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続した8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして第4-2-(3)に記載したアレルゲンが検出された。また、それに加えてスエヒロダケ、Schc1が検出されたが、宿主の*glaA*遺伝子がコードするグルコアミラーゼと相同性が認められたことから、安全性に懸念がないと考えられました。

さらに、17個のORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認のためにデータベースを用いて検索を行った結果、7個のORFがデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれのタンパク質もその機能から考えてヒトに毒性を示す可能性は低いと考えられました。

44ページに参りまして「(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上から明らかであること」について、(4)の「導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること」に対しては記載のと

おりです。

続きまして「6.DNAの宿主への導入方法に関する事項」ということ、「7.抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」については記載のとおりです。

「第5.組換え体に関する事項」ということで、「1.宿主との差異に関する事項」ということで、*A. niger*に導入されたDNA断片より、Camel Chymosin S及びグルコアミラーゼを発現し、選抜のために、ウリジン生産性を有することが宿主との差異となっております。

「2.遺伝子導入に関する事項」ということで、制限酵素による切断地図に関する事項については、記載のとおり、*glaA*遺伝子座に*camChyS*遺伝子発現カセットが複数コピーされているということです。

(2) オープンリーディングフレームの有無、その転写及び発現の可能性に関する事項については、シークエンス解析により遺伝子発現カセットの標的部位に挿入され、接合領域に新たなORFが生じていないということは確認されたということです。

45ページ「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」について「1.添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること」「2.添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること」については記載のとおりでございます。

「第7.遺伝子組換え添加物に関する事項」として「1.諸外国における認可、食用等に関する事項」については、記載のとおりです。

「2.組換え体の残存に関する事項」についてはPCR法により組換え体のDNAが検出されていないことは確認しています。

「3.製造に関する非有効成分の安全性に関する事項」について、カイマックスSupremeの製造バッチをサンプルとして分析し、食品、添加物等の規格基準値を満たしていること並びにオクラトキシンA及びフモニシンB2は検出されていないことを確認し、適切な製造管理の下で製造が行われているのであれば、安全性に懸念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。

「4.精製方法及びその効果に関する事項」ということで、酸のろ過、粗ろ過、イオン交換樹脂処理及び限外ろ過を経ることで得られているということで、適切な製造管理であれば安全性に問題のある物質が混入することは考えられないとしております。

5番、含有量の変化により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項については、従来の食品用酵素の製造に使われているものと同様であり、適切な製造管理の下で製造されるのであれば、含有量の変動により有害性が示唆される常成分が変動することはないと考えられるとしております。

46ページの第8です。「第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項」については記載のとおりとしております。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。



評価書案について、御意見、コメント、承りたいと思います。お気づきの点などございますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 13ページの第7の3でオクラトキシシンAとフモニシンB2は検出されないということ以外に規格基準で設定されているということがもう一つ我々が確認したことで重要だと思うので、例えばオクラトキシシンA及びフモニシンを含め、非有効成分の規格基準が設定され、頭に行って、カイマックスSupremeの製造バッチはこの基準を満たしていることを確認したというのはいかがですか。一例として、後でまたお示しします。

〇〇〇 ごもつともだと思います。これは細かい文章を詰めるのは後でよろしいですよ。ほか、お気づきの点などございますでしょうか。細かい字句の修正であれば後ほど修正箇所を事務局まで伝えていただければと思います。よろしいですか。

それでは、いただいた修正につきましては、また後で修正を確認させていただきまして、食品安全委員会に報告してパブリックコメントの手続には入りたいと思います。また、この件については先方からの返答を待って、それで確認をして、それまでは少し止めておいて、それから、後の手続を進めるということとやる。そこで万一、とんでもないことでも発覚したらまたということになりますが、なかろうとは思いますが、先方からの返答を待ってから動かしたいと思います。

議題（1）については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。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 それでは、本日の議題、これで終了でございます。

今年残すところ、あと2週間余りなので、少々気が早いですが、よいお年を。本当、今年はおコロナのおかげでとんでもない年だったので、来年こそいい年を迎えたいものと心から思います。先生方、よいお年をお迎えください。

時間、超過して申し訳ございませんでした。お疲れさまでした。