

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第210回) 議事録

1. 日時 令和3年4月23日(金) 13:59~16:33
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
 - ・ JPAo003株を利用して生産されたリパーゼ
 - ・ JPAN006株を利用して生産されたリパーゼ
 - ・ 除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3
 - (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、
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、
山川専門委員、吉川専門委員
(食品安全委員会)
佐藤委員長
(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、松田技術参与
5. 配布資料
資料 食品健康影響評価に関する資料
 - ① JPAo003株を利用して生産されたリパーゼ
 - ② JPAN006株を利用して生産されたリパーゼ
 - ③ 除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3

6. 議事内容

○中島座長 まだ定刻には少々ございますが、全員おそろいのようなので早速始めたいと思います。ただいまから第210回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催いたします。

本調査会は、議事次第にありますように「食品安全委員会の公開について」に基づいて非公開で行います。

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。

本日は、所用により、安達専門委員は御欠席です。

本日の議題ですが、継続品目であるJPAo003株を利用して生産されたリパーゼ、それから、新規品目であるJPAN006株を利用して生産されたリパーゼと除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3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。事務局のほうからお願いいたします。

○松原課長補佐 それでは、議事次第に基づき、配付資料の確認をさせていただきます。

配付資料は、議事次第、専門委員名簿、資料1令和3年度食品安全委員会運営計画、資料2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、JPAo003株を利用して生産されたリパーゼの申請者であるノボザイムズジャパン株式会社、除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3の申請者であるBASF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、質疑応答等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。

○中島座長 ありがとうございます。

4月初めの調査会ですので、恒例ですが、事務局から今年度の運営計画について説明があると伺っております。

では、説明をお願いいたします。

○蛭田評価情報分析官 ただいま座長からお話ございましたが、今年度初めての専門調査会ということでございますので、資料1に基づきまして、令和3年度食品安全委員会運営計画について御説明をさせていただきます。

本日、時間が限られておりますので、食品健康影響評価に関する部分について要点のみ簡潔に御説明させていただければと思います。

1枚めくっていただきますと、目次がございます。目次で全体の構成を御説明いたしますと、第1が委員会の運営の重点事項、第2が委員会の運営全般ということで全般的な内容を記載しております、第3以降で個別の内容を記載するという構成になっております。

1ページの上のほうでございますが、審議の経緯を示しております。

2ページを御覧ください。

「第1 令和3年度における委員会の運営の重点事項」でございまして、(2)重点事項でございます。①～④の4点を掲げております。①でございますが、食品健康影響評価の着実な実施。3ページに移っていただいて、上のほうでございますが、②としてリスクコ

コミュニケーションの戦略的な実施。③研究・調査事業の活用。④海外への情報発信、国際会議等への参画及び関係機関との連携強化でございます。

①の食品健康影響評価につきましては、特に重点的に取り組む事項ということでa～cの3点を記しているところでございます。

3ページの真ん中あたりでございますが、「第2 委員会の運営全般」というところを御覧ください。(3)といたしまして、食品健康影響評価に関する専門調査会の開催とございます。食品健康影響評価を的確に実施するため、専門調査会を開催するとしていただいております。先生方には、お忙しいこととは思いますが、引き続きよろしくお願いいたします。

4ページを御覧ください。

真ん中あたりに「第3 食品健康影響評価の実施」というところがございます。「1 リスク管理機関から食品健康影響評価を要請された案件の着実な実施」の(1)リスク管理機関から食品健康影響評価を要請された案件についてでございますが、早期に評価を終了するよう、計画的・効率的な調査審議を行うとしております。

また、(2)でございます。企業からの申請に基づきリスク管理機関から要請を受けて行う食品健康影響評価につきましては、標準処理期間内に評価結果を通知できるよう、計画的な調査審議を行うとしております。

次の5ページ以降でございますが、最初の重点事項で取り上げた事項など、より詳細に記載しております。後ほど御覧いただければと思います。

簡単ではございますが、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。

ただいまの説明につきまして、御質問等ございますでしょうか。

よろしいですね。

それでは、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づいて、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。

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

よろしいですね。ありがとうございます。

この状況ですと、当分対面の調査会というの見込めない状況なのですが、ウェブ会議における注意事項があると伺っておりますので、事務局からよろしくお願いいたします。

○松原課長補佐 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、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きようお願いいたします。

2点目、発言の際は赤い挙手カードを御提示ください。または、ウェブ会議画面の挙手ボタンを押してください。

座長より呼びいたしますので、マイクをオンにしてお名前を発言いただいた上で御発言をお願いいたします。

座長より指名がない場合は、直接マイクから呼びかけてください。

また、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。

3点目、音声接続不良時、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する場合もございます。

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、チャットによりお知らせください。

万が一、全く入室できなくなった場合は、事務局までお電話いただきますようお願いいたします。

4点目、議事中、意思確認をお願いすることがございますが、事前にお送りさせていただきました青い同意カードを挙げていただく、もしくは手で丸をつくるなど、意思が伝わる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。どうぞよろしくようお願いいたします。

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、早速審議に行きたいと思えます。

JPAo003株を利用して生産されたリパーゼについて、継続ですが、審議を行いたいと思えます。令和元年の6月の専門調査会で審議を行っております。

では、事務局のほうから説明をお願いいたします。

○山口係長 それでは、御説明させていただきます。

本件については、一昨年6月の専門調査会で御審議いただいた際に、申請者に対し先生方から幾つか御質問や指摘をいただいたところですが、今般、その内容を踏まえまして、申請資料の修正がなされておりますので、当該部分を御説明いたします。

それでは、ファイルの御準備をお願いいたします。

まず1ページ目をお願いいたします。

指摘事項1でございますが、lipFO全長のアミノ酸数から推定される分子量とSDS-PAGE分析にて認められたバンドの分子量には乖離があり、この理由をプロセッシング等により切断される領域を考慮して説明するとともに、申請対象のアミノ酸配列を明確にすることという内容でございます。

回答内容としましては、lipFOは分泌シグナル配列を除きますと●●●アミノ酸残基で構成されており、推定される分子量は●●● kDaで、SDS-PAGE分析及び質量分析を用

いて分子量を測定したところ、●●● kDaという結果でございます。この差が認められた理由としましては、C末端のプロセッシングが考えられたため、lipFOのC末端アミノ酸配列について詳しく考察・分析を行っております。

lipFOのC末端を確認するために、lipFOのアミノ酸配列中に存在する●●●システインに放射性標識をつけ、アスパラギン酸及びシステインのアミノ基側の結合を特異的に切断する酵素でlipFOを分解し、続いてペプチドの精製を経て配列を解析した結果、●●●番目のセリンを含むペプチドには、●●●番目以降のアミノ酸残基は認められず、●●●番目のセリンがlipFOのC末端である可能性が非常に高いと結論されております。

以上の考察等から、JPAo003株で発現しているC末端のプロセッシングのために、●●●番目のセリンまでのアミノ酸配列を有し、全長で●●●アミノ酸残基であると結論しており、また、試験バッチを供試して行ったSDS-PAGE分析結果では、lipFOを示すバンドが分子量●●●kDa程度で認められ、この結論と一致した結果となっております。

続きまして、指摘事項2でございます。こちらは4ページをお願いいたします。

SDS-PAGE分析とウェスタンブロット分析は、認められたそれぞれのバンドが対応しないことから、消化性試験の結論を導くデータとして不相当であると考えられる。については、作製した抗体の特異性も踏まえた上で試験設計を再構築し、lipFOの消化性を考察することという内容でございます。

回答としては、本試験では賦形剤等で製剤化されたlipFO製品サンプルを供試しており、ウェスタンブロット分析で用いられた抗体は試験バッチに対して作製されたポリクローナル抗体であったということです。追加試験として試験バッチを供試した消化性試験を行い、その結果、試験バッチを供試した試験においても同様のバンドパターンが確認されました。

追加試験の結果を基にさらに詳しく調査しましたところ、ウェスタンブロット分析において●●● kDa付近で検出されるバンドは宿主である*Aspergillus oryzae*●●●であり、それよりも高い分子量の領域で認められたバンドはグルコシル化した●●●である可能性が高いということでございます。この●●●はlipFOとの機能、配列が構造的に類似しており、加えて、複数のエピトープに反応するポリクローナル抗体の特性のため、当該抗体がこれら●●●由来のタンパク質に強く反応してしまっていると考えられました。

また、●●● kDa以上で検出されているバンドがSDS-PAGE分析では検出されていない理由として、SDS-PAGE分析とウェスタンブロット分析の検出限界の差異が理由として考えられたということでございます。今回追加提出された消化性試験では、ウェスタンブロット分析で認められた●●● kDa以上のバンドを含め、全てのバンドは人工胃液により反応開始30秒以内には消化されることが確認されました。

また、前回提出していた製品を用いた消化性試験では、20 kDa付近で消化断片と見られるバンドが検出されておりましたが、今回新たに試験バッチを供試して行った試験では、これらの消化断片は認められませんでした。この結果は、試験バッチと製品での差異等から生じた可能性があるということでございます。

以上のことから、lipFOは人工胃液に感受性を示し、人工胃液によって完全に分解されると結論しております。

最後に、指摘事項3でございます。9ページをお願いします。

lipFO製品には賦形剤として小麦粉を含むことから、本酵素の純度が算出できなかったとしておりますが、試験バッチを用いてSDS-PAGE分析を行うなどの再分析を行い、純度を考察することという内容です。

回答としては、指摘事項2の回答の中にもあるとおり、lipFO製品の試験バッチ等を用いて行ったSDS-PAGE分析では、製品中のlipFOの純度も計算しており、タンパク質の●●●を占めていることが明らかになったということでございます。

回答書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。

本件はもう2年近く前ですので、新しい委員の先生もいらっしゃると思いますので少しだけ説明しておきますと、これは製パンの工程で配合されるリパーゼで、乳化剤として用いるそうです。宿主は*Aspergillus oryzae*、いわゆる麹菌でIFO4177株。遺伝子は*Fusarium oxysporum*というカビのリパーゼ遺伝子lipFOの遺伝子で●●●アミノ酸をコードしております。もう一個、マーカーとして*Aspergillus nidulans*という近縁のカビ由来のamdS遺伝子を入れております。

それでは、継続ですので、指摘事項についての回答ですが、指摘事項1、遺伝子組換え添加物と従来の添加物との相違点ということで、要は全長のアミノ酸の数とSDS-PAGEのバンド分子量が食い違っているじゃないかということです。試験については、いろいろとデータを放射標識までして実験をやり直してデータが追加されております。

この点について指摘したのは児玉先生、手島先生、私ですが、児玉先生、この回答でいかがでしょうか。

○児玉専門委員 追試していただいてある程度C末端側も決めておられますので、これでもよろしいかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

手島先生、いかがでしょうか。

○手島専門委員 私のほうもこの内容でも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、これだけやってくれて、疑問の点がおおむね結論はきっちり出ておりますので、よろしいかと思えます。もっと言うなら、最初からこれぐらい調べてから申請書を出して欲しいと思わないわけでもないのですが、ほかの先生方、この点についてよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、指摘事項2、今度は物理化学的処理に関する感受性に関する試験で、これもSDS-PAGEの分析とウェスタンブロットの分析が見た目それぞれのバンドと対応しない。

この頃、この会社からのデータは、SDS-PAGEのデータでちょっとおかしいなというのが多くなってきたと言われていた時期だと思いますが、そのように記憶しております。

消化性試験の結論を導くデータとしてはこれでは納得がいかないということで、これは抗体にも問題があるのではないかとこちらから指摘しております。

それについて、抗体の非特異性等についても言及した回答が来ておりますが、これは御指摘は児玉先生です。この回答でよろしいでしょうか。

○児玉専門委員 これを指摘したのは私だけでしたか。

もう一度再試をしていただいても同じ結果だったということで、要するに、肝心要の抗原と認識されるタンパク質が、むしろ試験バッチでしたか。抗原として使った、そこに含まれている微量なほかのタンパク質のほうに反応性が高いという結果になっていまして、たしか2年前、私、消化性テストはSDS-PAGEの染色パターンで分解されているのは一応見えているし、添加物でもあるので、ウェスタンの結果はあまり重視しないというか、なくてもいいのではないかというような意見を言った記憶もありますけれども、しようがないのかなど。

要するに、グリコシル化したものが抗原としてのエピトープ性が高くて、つくった抗体がそちらのほうに反応してしまっていますという結果なので、これ以上抗体をつくり直せとも言いにくいでしょうし、仕方がないのかなと思うしかないのかなと思っています。

これは皆様の御意見を伺って判断していただければと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

手元にある事務局メモには主な指摘者は児玉先生とありましたが、私などもこれは言ったような記憶がございます。

少なくとも試験バッチでウェスタンをやリ直すぐらいのことはやっております、結局抗体と反応する高分子のバンドとかそういうものが出てきてしまう。要するに、それほどいい抗体ではない。ポリクローナルでとか言い訳をしておりますが、非特異的バンドの出るような抗体を使っていたということは認めておるということで、これは、抗体からきれいなものをつくり直して実験しろと要求するか、それとも、やれるだけのことはやっているので、少なくとも食べて安全かどうか判断するには、これはこれくらいでいいと判断するかということかなと思います。

私は、児玉先生と大体同じぐらいのスタンスでよろしいかなとも思うのですが、橘田先生あたり、いかがですか。

○橘田専門委員 消化性につきましては、CBB染色の結果から明らかに消化が胃液のほうでされているということなので、特段の問題はないと思います。ただ、やり直したウェスタンについても見られることなのですけれども、同じマーカーを使ってウェスタンとCBB染色を行っているように見受けられますが、CBBで出てくるバンドは●●●のマーカーより上のところに見られます。ただ、会社側でlipFOと言っているものについては、●●●のバンドのところとほぼ同じところに出てくるものなので、そもそも非特異も拾っている

のですけれども、このタンパク自体拾えていないのではないかなという気がするのです。従いまして、このウェスタンのデータがあることがむしろ消化性の試験の在り方を分からなくさせてしまう可能性もあるのではないかということのを少々危惧いたします。

ただ、安全性に関しましては、CBBの結果から胃液にてきちんと消化されているというところが見られますので、問題はないと感じております。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

むしろ、このウェスタンの結果は野暮ではないかというぐらいの御見解だろうと思いますが、手島先生、いかがですか。

○手島専門委員 やはり児玉先生や橘田先生と同様なのですけれども、SDSのCoomassie Brilliant Blueの結果は非常にクリアなのですが、抗体があることによって分かりにくくしているということはあるのですけれども、できるだけことはやったということで、抗体の精製がちょっと不透明というのはあるのですが、仕方がないかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

では、もう一方、近藤先生あたり、いかがですか。

○近藤専門委員 近藤です。

CBBの染色できちんと消化されているということがクリアに分かるので、これはそれで目的は達せられているかなということで、むしろウェスタンはないほうがいいかなと思いました。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

何となく皆さんお感じになることはおおむね一致しているような気がするのですが、吉川先生、どうぞ。

○吉川専門委員 SDS-PAGEのデータがきれいに出ているのに、ウェスタンが全く出ていない。これはもともと抗体としてこのlipFOの抗体もできていない。ほとんど見えないものが出てくる。内在性のホスホリパーゼの抗体はあるのだけれども、本来対象としたlipFOの抗体ができていないものを使ってウェスタンをやっているとしか判断できないところがあります。ですから、ウェスタンのデータがこの試験の補助的なものなのか必須なものなのかというところで、これがあるとこういうデータでも認めるのかというような問題があるのかなと感じました。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

このデータをもって、これで我々が審査をしたという結果が残るのはむしろ野暮という状況ですので、ウェスタンのデータを削れと要求できますよね。私も実はこれをお諮りしようと思っていたのですけれども、このウェスタンのデータを削れと要求するか、これを削った上で、でも、SDSで我々としては安全性については審議できたとしたいと実は思う

のですが、いかがでしょうか。

吉川先生、大体そんなのでいいよね。

山川先生、お願いします。

○山川専門委員 むしろそのまま載せてしまうと、ウェスタンがこれでいいというような誤った判断をする人がいると思うので、削ったほうがいいと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

これは削れと要求したいと思いますが、その上で審議したと記録としては残したいと思うのですが、それでよろしいでしょうか。御異論のある先生だけ挙手いただければ。

よろしいですね。では、事務局、これは削れと。その上で最終審査の手続を進めるようにお願いいたします。

それでは、この件についてはそれでよろしいでしょうか。ほかの先生方で指摘事項2についてどなたかございますか。よろしいですね。

では、指摘事項3に入ります。これは製品中のタンパク質の精製方法、その結果に関する事項で、賦形剤として小麦粉を含むことから、本酵素の純度の算出ができていなかったとしているのだけれども、そのぐらいちやんと試験バッチを用いてSDS-PAGEぐらいやりなさいよという指摘でした。

これはたしか手島先生だったと思うのですが、素直にやってきて、それで●●●。あまり高くないような気もするのですが、一応要求には応えて返事が来ております。

手島先生、いかがでしょうか。

○手島専門委員 要求したことに応えているということで、よろしいかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

あまり高くはありませんが、取りあえず要求事項に対して答えは出てきております。

先生方、いかがでしょうか。この点、よろしいでしょうか。宿主が麴菌ですので、ほかの夾雑タンパク等があっても、それが問題になるようなことはないと思いますので、私もよろしいかなと思います。

先生方、この点につきましてでございますでしょうか。

特に指摘事項はこの3つなのですが、この申請全体につきまして御意見等ございますでしょうか。

それでは、多少物を言いつけてウェスタンのデータは削ることを要求いたしますが、これについては食べても特に危険はないと判断したいと思いますが、よろしいでしょうか。これは御意思の表明を明確にお願いいたします。

(委員首肯)

○中島座長 ありがとうございます。皆さん全員オーケーということですので、本件につきましては特に安全性に懸念はないということで、評価書案の審議に行きたいと思えます。

お願いいたします。

○山口係長 それでは、評価書案のほうについて御説明させていただきます。

評価書案は資料2に束ねてございます。これの2ページ目からが本リパーゼになりまして、まず7ページをお願いいたします。

I としまして概要でございますが、*Aspergillus oryzae* IFO4177株を宿主としまして、*Fusarium oxysporum* DSM2672株由来のリパーゼ遺伝子を導入することで作製したJPAo003株を利用して生産されたリパーゼでございます。本添加物は、トリアシルグリセロールのエステル結合を加水分解して脂肪酸を遊離させる酵素であり、製パン工程に使用されるものでございます。

続いて、II以降で食品健康影響評価に関しまして個別の項目を記載しております。

まず第1の1の(1)ですが、名称はリパーゼ、基原は*Thermomyces Inuginosus* CBS 586.94株、有効成分はリパーゼでございます。

(2) 製造方法ですが、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造されます。生産菌はろ過により除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、パンの製造工程において乳化剤の代替として直接パン生地に添加され、パン生地強度及び弾性の付加を目的として使用されます。

(4) 摂取量ですが、全てのパン類に含まれると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.0004mg TOS/kg 体重/日でございます。

続いて、2の(1) 宿主の種名ですが、宿主は*A.oryzae* IFO4177株でございます。

(2) DNA供与体の種名ですが、リパーゼ遺伝子の供与体は*F.oxysporum* DSM2672株、*amdS*遺伝子の供与体は*A.nidulans* Glasgow野生株でございます。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、*lipFO*遺伝子はリパーゼをコードし、また、*amdS*遺伝子はアセトアミダーゼをコードし、こちらを選択マーカーに用いております。

A.oryzae IFO4177株の α -アミラーゼをコードする*amyC*遺伝子を含む●●●種類の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、*lipFO/amdS*遺伝子発現カセットをプロトプラスト法により宿主のゲノムDNAに導入しております。さらに、 γ 線照射による*cpa*遺伝子クラスター及び*aff*遺伝子クラスターの欠失により、シクロピアゾン酸及びアフラトキシン生産能が欠失しております。

3.食経験ですが、*A.oryzae*は長期にわたり食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験があり、国内では麴菌としてみそ、しょうゆ、醸造酒などの発酵食品製造に広く利用されております。

4.構成成分ですが、*A.oryzae* IFO4177株では、マイコトキシンであるシクロピアゾン酸及び抗菌性物質であるコウジ酸の産生が極めて低値であることが確認され、また、マイコトキシンである β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンは検出限界未満であることが確認されております。

5.組換え添加物の性質ですが、(1)、(2)は記載のとおりでございます。

用途及び使用形態ですが、一般的なりパーゼの基質であるトリアシルグリセロール以外

にリン脂質及びガラクト脂質のエステル結合を加水分解し、乳化剤の代替として製パン工程で使用されます。

(4) 有効成分の従来の添加物との比較でございます。NOVOZYM677はトリアシルグリセロールの1及び3位のエステル結合を加水分解し、lipFOは従来の活性に加えてガラクト脂質及びリン脂質の1位のエステル結合も加水分解することができます。

続いて、6の(1) 添加物の相違点でございますが、アミノ酸残基数、至適温度、反応特性が異なる点でございます。

組換え体と宿主との相違点は、JPAo003株と宿主の相違点は、JPAo003株にはlipFO遺伝子が複数コピー導入されてlipFOの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amyC遺伝子を含む内在性遺伝子を欠失している点でございます。

以上から、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断しております。

続いて、第2.宿主に関する事項について、まず1については記載のとおりです。

2.病原性ですが、*A.oryzae*は一般的に非病原性であり、国立感染症研究所病原体等安全管理規程のBSL1に相当します。また、*A.oryzae* IFO4177株は、シクロピアゾン酸及びコウジ酸については極めて低値であります。その産生が確認され、また、β-ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンは検出限界未満であることが確認されております。

*A.oryzae*由来の酵素であるアルカリ性セリンプロテアーゼ及びTAKAアミラーゼは、アレルゲンデータベースに収載されており、いずれも呼吸器系感作が報告されておりますが、これは特定職種での高頻度ばく露が起因と考えられます。*A.oryzae* IFO4177株は食品添加物の生産菌として長年使用され、安全性に問題を生じる事例は報告されておらず、アレルギーを誘発する可能性は低いと考えられます。

続いて、3~5については記載のとおりでございます。

第3.ベクターに関する事項ですが、遺伝子導入用ベクターpJPV012の作製には、*Escherichia coli*由来のプラスミドpUC19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の(1) は記載のとおりです。

(2) 安全性ですが、*F.oxysporum*は土壌中などに普遍的に生育しており、植物病原菌として知られておりますが、病原性が見られるのは本菌種の分化型であり、かつ限られた宿主植物種に対して病原性を示します。*A.nidulans*の食経験は特に知られておりませんが、amdS遺伝子は選択マーカーとして長年利用されてきた実績を有し、いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規程のBSL1に相当します。

2の(1)、(2) は記載のとおりです。

続いて、(3) 挿入遺伝子の機能になります。

まず①でございます。lipFOはトリアシルグリセロールの1及び3位のエステル結合並び

にガラクト脂質及びリン脂質の1位にあるエステル結合を加水分解する酵素でございます。

挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、*F.oxysporum*のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、それを示唆する報告はございませんでした。

続いて、bに関する治験ですが、lipFO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ございません。

c.物理化学的処理でございます。人工胃液に対する感受性でございますが、ここは一部取消し線を引かせていただきましたが、こちらは事前に児玉先生から御意見をいただいたために、その部分を反映して修正させていただきました。

まず(a)ですけれども、lipFOの人工胃液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE分析及びウェスタンプロット分析を行った。その結果、試験開始後30秒以内に完全長鎖のバンドは消失したとしております。

(b)人工腸液ですが、SDS-PAGE及びウェスタンプロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後6時間においても分解されないことが示されております。

(c)加熱処理でございますが、80℃30分にて失活することが示されております。

d.既知のアレルゲンとの構造相同性です。lipFOと既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン、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。

続いて、②でございますが、こちらは記載のとおりでございます。

以上のことから、総合的に判断し、lipFO及びアセトアミダーゼ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しております。

続きまして、3、4、5の(1)、(2)については記載のとおりでございます。

少し飛びまして、(3)になりますが、遺伝子導入用ベクターpJPV012の意図する領域は、*lipFO/amdS*遺伝子発現カセットでございます。

(4)については記載のとおりでございます。

6.DNAの導入方法ですが、遺伝子発現カセットを宿主ゲノムへプロトプラスト法を用いて導入しております。

7.抗生物質耐性マーカー遺伝子に関してですが、遺伝子導入用ベクターpJPV012はアンピシリン耐性を有しますが、宿主ゲノムに導入されていないことをサザンプロット分析により確認しております。

続きまして、第5の項目です。

1は記載のとおりでございます。

2の(1)ですが、JPAo003株の染色体上での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か所に複数コピーがタンデムに挿入されていることが確認され、さらに定量PCR法を用いた解析により、複数コピーの遺伝子発現カセッ

トが導入されていることが確認されております。

続いて、(2) ORFの有無の項目ですが、挿入DNAの5'近傍配列を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行い、また、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにおいて、異種遺伝子断片の残存した*amyC*遺伝子座で同様にORF検索を行いました。その結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計478個検出されております。

これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン、及び連続した8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンはございませんでした。

続いて、既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、E-value<0.02を指標として検索を行った結果、6個のORFが3個のタンパク質と相同性を示しましたが、いずれも毒性を有する可能性は低いと考えられるとしております。

第6.製造原料等に関する事項については記載のとおりです。

第7の1ですが、フランス、カナダにおいて食品添加物のポジティブリストに掲載されております。

続いて、第7の2、ドットプロット分析によりDNAの残存がないことを確認しております
3、4、5及び第8については記載のとおりでございます。

評価書案の説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして、御意見、コメント等承りたいと思います。

なお、申請書のほうからウェスタンに関することは削っていただくわけですので、それに対応して、評価書案のほうも必要なところを削って対応したいと思います。それにつきましては、事務局のほうで案をつくっていただき、私のほうで確認したいと思います。

ほかにお気づきの点等ございますでしょうか。よろしいですか。

それでは、修正につきまして、後ほど確認して食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続を進めていきたいと思っております。ありがとうございます。

では、どんどんいきたいと思っております。次は新規品目JPAN006株を利用して生産されたりパーゼの審議を行いたいと思っております。

事務局のほうから説明をお願いいたします。

○山口係長 それでは、説明させていただきます。

まず申請資料の2ページをお願いいたします。

第1の項目です。1-1- (1) としまして、名称はリパーゼ、基原は*Candida cylindracea*、反応特異性はトリアシルグリセロールの1及び3の位置のエステル結合を加水分解するものでございます。

(2) 製造方法ですが、生産菌株の培養液から抽出、除菌及び精製などの工程を経て製

造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、既存のリパーゼの代表的な用途は油脂加工で、リパーゼの反応は本来加水分解反応でございますが、可逆的であるため、これを利用してトリアシルグリセロール中の脂肪酸を別の脂肪酸に交換するエステル交換を行うことができ、これにより、脂肪酸の結合位置や種類を変えることで、安価な油脂から付加価値の高い油脂を製造することが可能となります。

(4) 摂取量です。lipCABが全ての油脂類の製造に用いられ、かつ100%残存すると仮定してヒト体重1kgあたり一日最大摂取量の計算を行った結果、123 μ g TOS/日/kgと算出しております。

続いて、1-2でございます。(1) 宿主は*A.niger* BO-1株でして、自然界からグルコアミラーゼ生産菌として分離された*A.niger* C40-1株の突然変異であり、グルコアミラーゼ生産性が向上し、夾雑酵素である α -1,6トランスグルコシダーゼ生産能を欠失しております。

(2) 挿入DNAの供与体の由来ですが、こちらは次の4ページの表1に記載されておりでございます。表1の上のほうになりますが、lipCAB遺伝子は*Candida antarctica* DSM3855株由来、amdS遺伝子は*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株由来、また、pyrG遺伝子は*A.nidulans* NRRL1092株由来でございます。そのほか、プロモーター、ターミネーター等についても性質と併せて記載しております。

(3) 挿入DNAの性質でございます。こちらは図1に示しておりますとおり、宿主ゲノムに対してまず複数遺伝子を欠失させまして、その後●●●の遺伝子座に対してlipCAB/amdS遺伝子発現カセットを挿入しております。

7ページの下、(1) DNAの挿入方法をお願いいたします。●●●の遺伝子座に対しまして、●●●遺伝子発現カセットを挿入後、遺伝子導入用ベクターに組み込まれた●●●遺伝子がコードする●●●インテグラーゼの発現により、lipCAB/amdS遺伝子発現カセットを宿主の染色体に導入しております。

少し飛びまして、10ページをお願いいたします。

(2) DNAの欠失方法でございます。欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより、BO-1株の複数遺伝子クラスターを欠失しております。なお、一部の遺伝子座においてはDNA欠失操作において異種遺伝子断片の挿入を伴い、当該断片の一部が生産菌株においても染色体上に残存するため、安全性に関する解析を行っております。

次のページに行きまして、1-3は記載のとおりでございます。

1-4、宿主の構成成分等でございますが、*A.niger*は自然界に広く存在しており、ほかの糸状菌と比べて特にアレルギー性や病原性で問題となるような菌種ではないとされております。*A.niger*のマイコトキシン産生能については、アフラトキシン類産生能を有していないことは明らかにされておりますが、オクラトキシンAを産生するという報告やフモニシンの合成遺伝子クラスターが発見されております。

このように、*A.niger*はオクラトキシンA及びフモニシンを産生する可能性があります。

BO-1株が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おります。

続いて、第1-5の項目です。

(1)、(2)は記載のとおりでございます。

12ページに行きまして、(3)用途及び使用形態ですが、これは既存のものと変わらず油脂加工に用いられます。

(4)有効成分等の比較ですけれども、lipCABは既存のリパーゼと同様に、脂質のエステル結合を加水分解する酵素でございます。

13ページをお願いいたします。

まず(1)の項目です。従来の添加物との相違点ということでございますが、本品目の販売実績は海外で14年以上ございまして、既存のものは日本を含め世界各国で20年以上あるということでございます。そのほか、アミノ酸残基数、分子量、至適pH、温度等は記載のとおりでございます。

次のページをお願いします。

(2)組換え体と宿主との相違点ですが、JPAN006株ではlipCAB遺伝子、そして、amdS遺伝子が挿入されております。

続いて、第2の項目です。

2-1、宿主は記載のとおりでございます。

16ページに行きまして、2-2をお願いいたします。病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項でございます。病原性ですが、*A.niger*は自然界に広く存在しており、ほかの糸状菌と比べて特に病原性で問題となる菌種ではないとされております。また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程のバイオセーフティレベル2及び3には分類されておらず、リスク群1に分類されます。

有害生理活性物質については、*A.niger*はオクラトキシンA及びフモニシンを産生する可能性が示されておりますが、分析により、BO-1株がこれらのマイコトキシンを産生しないことは確認しております。アレルギー性については、*A.niger*はほかの糸状菌と比べて適切な条件下において使用される限り、特にアレルギー性で問題となる菌種ではないとされております。

*A.niger*由来の酵素として、3つがアレルゲンとしてデータベースに登録されております。各々の記載については申請書に記載のとおりでございますが、適切な環境で扱われている限り、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るということでございます。

2-3から2-5については記載のとおりです。

第3 ベクターに関する事項ですが、遺伝子導入用ベクターの構築にはpBluescript SK-が用いられておりまして、これはpUC19プラスミド由来のプラスミドベクターでございます。

3-2、性質については記載のとおりです。

続いて、第4の項目、20ページをお願いいたします。

1- (2) 安全性に関する事項でございますが、まず *C. antarctica* は南極に位置するバンダ湖の湖底堆積物から分離された不完全酵母で、産業用リパーゼの生産菌として長年広く用いられてきました。なお、*Candida* 属は既存のリパーゼの基原生物でございます。

続いて、*A. nidulans* の食経験は特に知られておりません。アセトアミダーゼをコードする *amdS* 遺伝子は選択マーカー遺伝子として長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられております。

いずれも国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のバイオセーフティレベル2及び3には分類されておらず、リスク群の1に相当いたします。

続いて、4-2- (1) といたしまして、挿入遺伝子の合成方法です。*lipCAB* 遺伝子は *C. antarctica* DSM3855株のゲノムDNAを鋳型として用い、*lipCAB* をコードする *lipCAB* 遺伝子をPCRで増幅し、遺伝子断片を得ております。

(2) は記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項でございます。*lipCAB* 遺伝子はリパーゼ活性を有する *lipCAB* をコードし、トリアシルグリセロールの1及び3の位置のエステル結合を加水分解します。●●●。

隣のページに行きまして、1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見、2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見でございますが、PubMedによる文献検索の結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はないということでございます。

続いて、物理化学的処理に対する感受性ということで、まず人工胃液ですが、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析で分析した結果、*lipCAB* は反応開始後10分以内に消化されることが明らかとなっております。

次のページに行きまして、人工腸液です。こちらもSDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した結果、*lipCAB* は6時間の処理では完全に消化されないことが示されております。

加熱処理に対する感受性です。pH6、30分の条件で調べました結果、*lipCAB* は60℃付近で活性が50%に減少し、95℃以上では完全に失活することが明らかとなりました。*lipCAB* 製品が使用される油脂加工では、酵素処理後に酵素の熱失活工程が設けられることが想定されるため、*lipCAB* は油脂加工に用いられた後に失活すると考えられるということでございます。

続いて、4) 既知のアレルゲンとの構造相同性でございます。

まず①の条件、80アミノ酸残基で35%一致するアレルゲンの検索ですが、相同性検索の結果、既知のアレルゲンは検出されませんでした。②の条件で検索したところ、コムギに存在するアレルゲン (Tri tu 14) の連続した8アミノ酸配列と一致しました。これは *lipCAB* をコードする *lipCAB* 遺伝子の部分配列でございますが、本来の *lipCAB* 遺伝子のORFとは逆方向の読み枠で検出された48アミノ酸上のORFで、*lipCAB* 遺伝子からコードされるタンパク質のアミノ酸配列は80アミノ酸残基で35%以上の条件では、全ての読み枠で既知の

アレルゲンとは相同性を示さず、また、Tri tu 14のエピトープは同定されておらず、Tri tu 14と一致した8アミノ酸配列を食物アレルギーに関する安全性研究のためのアレルゲンデータベースで登録されているエピトープと検索したところ、一致は認められなかったということです。

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

*amdS*遺伝子、*pyrG*遺伝子については記載のとおりでございます。

続きまして、4-3、4-4、4-5の(1)までは記載のとおりですので、説明は割愛させていただきます。

32ページをお願いいたします。

4-5-(2)でございます。目的外のORFの有無について、構築された発現ベクターpJPV027は、*lipCAB/amdS*遺伝子発現カセットのみを宿主ゲノムに挿入するための遺伝子導入用ベクターであり、遺伝子挿入により宿主に導入される領域は明らかであり、●●●遺伝子座のシーケンス解析により確認されております。したがって、全配列を対象としたORFの解析は実施しておりません。

(3)、(4)は記載のとおりです。

4-6、DNAの宿主への導入方法です。DNA挿入は遺伝子導入用ベクターpJPV027を用いており、pJPV027に組み込まれた●●●遺伝子がコードする●●●インテグラーゼの発現により遺伝子発現カセットを●●●の遺伝子座に挿入しております。

4-7については記載のとおりでございます。

隣のページに行きまして、第5の項目です。

5-1は記載のとおりでございます。

2-(1)ですが、挿入領域の塩基配列はシーケンス解析により確認され、制限酵素切断部位も明らかになっております。当該シーケンス解析より*lipCAB/amdS*遺伝子発現カセットは設計どおり目的の挿入領域のみに挿入されていることが確認され、コピー数は●●●であることが示されました。平均冗長度は40以上であったということでございます。

少し飛びまして、38ページをお願いいたします。

(2) 遺伝子導入におけるORFの有無について記載しております。遺伝子導入の結果として、挿入DNAが組み込まれた●●●遺伝子座、そして、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失した遺伝子の中で、異種遺伝子断片が染色体上に残存した●●●遺伝子座に対してORFの検索を行いました。これらの結果、検出されたORFのアレルギー誘発性及び毒性の可能性を調べるために相同性検索を行っております。

まず、39ページに行きまして、①の検索条件の結果ですが、1つのORF●●●が既知のアレルゲンと相同性を示しましたが、相同性を示した既知のアレルゲンは食物アレルゲンとしては登録されておらず、吸入をばく露経路とする呼吸器感作性のアレルゲンである。また、これらのORFと既知のアレルゲンとの間に連続した8アミノ酸の一致はございませ

んでした。

加えまして、●●●は1塩基を除いてほぼ全てが宿主の染色体の塩基配列から得られたORFであり、遺伝子導入より新たに生じたものではないということでございます。

以上のことから、このORFの食物アレルギー感作性についての懸念は低いと考えられるとしております。

次の40ページをお願いいたします。

②の条件で検索を行ったところ、コムギに存在するアレルゲンの連続する8アミノ酸配列の1つと一致しましたが、説明は先ほどと同様でございますので、割愛させていただきます。

最後に、毒性タンパク質との相同性検索でございますが、重複を整理しますと、42ページの表12にありますとおり、ORF1、2、3と3つにまとめております。いずれについても毒性については報告がないため、このタンパク質と同じ機能を持ったとしても毒性を有することは考え難い。

これらのまとめとしまして、42ページの一番下になりますが、以上の検索及び考察から、遺伝子導入によって新たに生じたORFが発現したとしても、本酵素製品中にアレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられるということです。

続いて、第6です。製造原料等に関する事項でございますが、長年安全に使用された実績がある旨が記載されております。

44ページ、第7の項目ですが、まず7-1でございます。lipCAB製品は2005年頃に販売が開始され、従来のリパーゼと同様に欧州を中心とする加工助剤として使用されております。

7-2ですが、lipCAB製品中に組換え体由来のDNAの残存がないことをドットプロット解析により確認しております。

46ページですが、7-3、試験バッチの分析と我が国の食品添加物等の規格基準に定める規格値をそれぞれ記載してございまして、いずれも満たす結果となっております。オクラトキシンA、フモニシンB₂についても記載の結果となっております。

7-4でございますが、lipCAB製品のSDS-PAGEによる純度を確認した結果、●●●であったということでございます。

7-5及び第8は記載のとおりです。

申請書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、申請書につきまして先生方から御意見をいただきたいと思っております。

今回のリパーゼは、従来品は*Candida cylindracea*でつくっておったものが、今回は南極から取れた*Candida antarctica*から取れた遺伝子を使いたいということで、これは*Aspergillus niger*というカビで生産しております。南極で取れた菌だから生育が遅かったのだろうと思えますけれども、その辺の記載までがあったわけではございません。目的は油脂加工ということです。

そこそこの長さの申請書ですが、ポイントは限られていると思いますので、全般どこからでも御質問等ございましたらお願いいたしたいと思います。

この宿主の毒性について、*A. niger*ですからフモニシンとオクラトキシンが通常心配されるわけで、これについてはないことを調べていて、*Aspergillus*属ですから普通アフラトキシンも気になるころではあるのですが、*niger*の仲間であればアフラトキシンをつくるものはいないということで、いわゆるカビ毒の心配はないとしております。

私はこれでいいかなと思うのですけれども、小野先生あたり、いかがですか。これはこのくらいでよろしいでしょうか。

○小野専門委員 これでもよろしいかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

では、ほか、どこでも御質問、御指摘等ございましたらお願いいたします。

樋口先生、どうぞ。

○樋口専門委員 樋口です。

大したことではないのですけれども、24ページの図9のSDS-PAGE、CCB染色の図で、lipCABの矢印の位置が大分ずれているような感じがしますが、図8のほうはちゃんとこれなのだろうなという位置に矢印が来ているのですけれども、図9のAのほうはlipCABの矢印が何もバンドがないところに来ているようなので、これは直していただければい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。

そう言われてみますと、横から見て合っていないのではないとおっしゃりたいわけですよ。私もそう思います。

先生方、この点はいかがでしょう。左のレーンにあるlipCABと右端についている矢印は、そもそも離れているから分かりにくいのですが、これがずれておるのではないかと思いますよ。マーカーに対しての位置関係はこれでよろしいでしょうか。マーカーは何のマーカーなんだろう。

これは矢印の位置関係をきちんと確認し直してくれということでもよろしいですか。もしくは、その上でこれだということであれば、それはそれでいいとも思いますので、実際のバンドの位置のマーカーのlipCABの位置がかなり離れているので分かりにくくなっているんで、これについてこちらから指摘して、それで彼らが本当にこれでいいということであればそれでもいいかなと思うのですが、樋口先生、確認を求めるということでよろしいですか。

○樋口専門委員 確認で大丈夫だと思います。図8のAのほうは大体合っているんで、単に図のずれなのではないかと思うのです。

○中島座長 この点、確認を求めたいと思います。

先生方、この件につきましてはこの対応でよろしいでしょうか。ありがとうございます。

ほかに御指摘等ございませんでしょうか。

人工胃液では10分で分解で、そんなに分解していいわけではないけれども、一応分解はされる。人工腸液については6時間でも残存があるということで、分解性はあまりよくないように思えるのですが、これは大きな問題になり得ますでしょうか。

手島先生、御見解を。

○手島専門委員 確かに人工胃液で分解は遅いのですが、食品添加物であるということと、ほかの相同性等で特に問題は出ていないので、よろしいかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。橘田先生。

○橘田専門委員 同様に思えます。特に、10分以内に完全に消化されることが明らかになったとありますけれども、図を見る限りにおきましては、30秒のところで大抵が消化されているように見えますので、特段大きな問題になるようなことはないと考えます。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

では、あまり分解性はよくないようではあるけれども、だからといって特に安全上にどうこうというほどの問題ではないということではよろしいでしょうか。

それでは、先生方、ほかにございますでしょうか。

オープンリーディングフレームの解析については、アレルゲンで1ヒットしたのもありますが、吸入アレルゲンでも遺伝子導入のためではないと。●●●の遺伝子の染色体用にあつたという説明がございます。この点につきましてはいかがでしょうか。

私はこれで特に問題ではないのではないかとも思うのですが、ここも橘田先生、御意見をいただけますか。

○橘田専門委員 特段問題とは考えておりません。説明で納得できるかなと考えております。

○中島座長 ありがとうございます。岡田先生。

○岡田専門委員 遺伝子組換えによるものでないわけですし、問題ないのではないかと考えております。

○中島座長 ありがとうございます。私もこれ自体はそんなに問題ではないかなとも思います。

先生方、ほかにございますでしょうか。

そもそももう10年以上欧米で普通に流通しておることなので、その間事故とかそういう報告もないようですので、あまり問題はないかなと思えます。

安全上の問題はないと結論したいと思うのですが、先生方、よろしいでしょうか。御意思を確認したいので、御面倒ですがお願いいたします。

(委員首肯)

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、この件につきましても特に安全上の問題はないということですので、評価書

案の審議に行きたいと思えます。

事務局のほうからお願いいたします。

○山口係長 それでは、御説明させていただきます。

評価書案の束の19ページからが本リパーゼになりまして、24ページをお願いいたします。

まず I の概要でございますが、*Aspergillus niger* BO-1株を宿主とし、*Candida antarctica* DSM3855株由来のリパーゼ遺伝子を導入することで作製したJPAN006株を利用して生産されたリパーゼでございます。本添加物は、油脂の主成分であるトリアシルグリセロールのエステル結合を加水分解する酵素であり、トリアシルグリセロールの脂肪酸に作用し、エステル交換反応を行うなど、油脂加工に使用されているものでございます。

続いて、IIでございます。

1の1の(1) 名称はリパーゼ、基原は*Candida cylindracea*、有効成分はリパーゼでございます。

続いて、(2) 製造方法ですが、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造されます。生産菌はろ過により除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、油脂の主成分であるトリアシルグリセロールのエステル結合を加水分解する酵素の総称であり、この加水分解反応は可逆的であることから、トリアシルグリセロールの脂肪酸とほかの脂肪酸との間で脂肪酸基を交換するエステル交換反応により油脂の改質が可能となります。既存の添加物であるリパーゼは、油脂加工において生産性及び品質の向上を目的に加工助剤として使用されております。

(4) 摂取量ですが、全ての油脂類の製造に使用され、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123μg TOS/kg体重/日でございます。

2の(1) 宿主の種名ですが、*A.niger* BO-1株でございます。

(2) DNA供与体の種名ですが、リパーゼ遺伝子の供与体は*C.antarctica* DSM3855株、*amdS*遺伝子の供与体は*A.nidulans* Glasgow野生株、*pyrG*遺伝子の供与体は*A.nidulans* NRRL1092株でございます。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、*lipCAB*遺伝子は*C.antarctica* DSM3855株の野生型リパーゼと同一のアミノ酸配列を持つリパーゼをコードし、また、*amdS*遺伝子はアセトアミダーゼをコードし、こちらは選択マーカーに用いております。*lipCAB*遺伝子及び*amdS*遺伝子を含む遺伝子発現カセットをインテグラーゼにより宿主ゲノムの複数遺伝子座に導入し、生産菌の作成においてあらかじめ*pyrG*遺伝子を含む欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより複数遺伝子を欠失させております。

3.食経験の項目ですが、*A.niger*は食品や食品用酵素の製造において長年安全に利用されております。

4.宿主の構成成分ですが、*A.niger*はオクラトキシンA及びフモニシンを産生する可能性があります。が、*A.niger* BO-1株からオクラトキシンA及びフモニシンが産生されないことが確認されております。

5.組換え添加物の性質等ですが、(1)、(2)は記載のとおりです。

(3)用途及び使用形態ですが、lipCABは従来の添加物と同様に、油脂加工において生産性及び品質の向上を目的に加工助剤として使用されます。

(4)有効成分の比較ですが、lipCABは従来の添加物と同様にトリアシルグリセロールの1及び3位のエステル結合を加水分解します。

6の(1)添加物の相違点ですが、アミノ酸残基数、至適温度及び至適pHが異なります。

(2)組換え体と宿主との相違点ですが、JPAN006株にはlipCAB遺伝子が複数コピー導入され、リパーゼの高生産性を獲得している点、amdS及びpyrG遺伝子を導入している点、並びにリパーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失している点でございます。

続いて、第2.宿主に関する事項ですが、1は記載のとおりです。

2.病原性についてですが、A.nigerは病原性で問題となる菌種ではないとされており、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるBSL1に相当します。

有害生理活性物質として、マイコトキシンの一種であるオクラトキシンA及びフモニシンを産生する可能性が示唆されており、これらの産生性について分析した結果、A.niger BO-1株はマイコトキシンを産生しないことが確認されております。

アレルギー誘発性については、適切な管理条件下で使用される限り、特に問題となる菌種ではないとされております。A.niger由来の酵素であるβ-キシロシダーゼ、セリンプロテアーゼ及び3-フィターゼBがアレルギーデータベースに登録されておりまして、これらを産業用酵素として使用された際に吸入性アレルギーとして報告されていることから、A.niger由来の酵素によるアレルギーは特定職種における高頻度のばく露に起因すると考えられます。一方、A.nigerは国内では焼酎などの製造において安全に使用されてきた経験がありますが、これらの酵素を原因とするアレルギーとA.nigerによるアレルギー誘発性との関連を否定できないことから、リスク低減のため、本菌を扱うときは、ほかの糸状菌と同様、孢子が飛散しないように十分に気をつける必要がある。

以上のことから、適切な環境で扱われる限り、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるとしております。

3~5については記載のとおりでございます。

続いて、第3.ベクターに関する事項です。

遺伝子導入用ベクターpJPV027の作製には、Escherichia coli由来のプラスミドpBluescript SK-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の(1)は記載のとおりです。

(2)安全性でございますが、A.nidulansの食経験は認められておりませんが、amdS及びpyrG遺伝子は選択マーカーとして長年利用されてきた実績を有します。C.antarctica、A.nidulansはいずれもBSL1に相当いたします。

2の(1)、(2)は記載のとおりでございます。

(3)です。①*lipCAB*遺伝子ですが、トリアシルグリセロールの1及び3位の加水分解をします。

a.挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、*C.antarctica*のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はございませんでした。

bについてですが、*lipCAB*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ございません。

c.物理化学的処理でございます。人工胃液ですが、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10分以内にバンドが消失いたしました。

(b)人工腸液ですが、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後6時間においても分解されないことが示されております。

(c)加熱処理ですが、95℃30分にて失活することが示されております。

d.既知のアレルゲンとの構造相同性です。アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは検出されませんでした。連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして、コムギ由来のアレルゲンが認められました。こちらの詳細は5-2-(2)に記載しております。

②*amdS*遺伝子、③*pyrG*遺伝子については記載のとおりでございます。

以上のことから、*lipCAB*、アセトアミダーゼ及びオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼがアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられるとしております。

続きまして、3、4、5の(1)、(2)は記載のとおりでございます。

(3)でございますが、意図する挿入領域は遺伝子導入用ベクターpJPV027のFRT-F配列からFRT-F3配列までの遺伝子発現カセットを含む領域でございます。

(4)については記載のとおりでございます。

6.DNAの導入方法でございます。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pJPV027を導入し、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*lipCAB/amdS*遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入しました。この際、*amdS*遺伝子による選抜を行った後、リパーゼ活性を指標として形質転換体を選択しております。

7については記載のとおりでございます。

続いて、第5の事項です。

1は記載のとおりでございます。

2の(1)、JPAN006株の染色体上への*lipCAB/amdS*遺伝子発現カセットの導入位置を確認するため、シーケンス解析を行った結果、設計どおり各遺伝子座に全長の発現カセットが挿入されたことが確認されております。

(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、3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行い、また、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えについて、異種遺伝子断片の残存した遺伝子座で同様にORF検索を行いました。その結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計で1,060個検出されております。

これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンが1つ検出されましたが、吸入をばく露経路とする呼吸器誘発性アレルゲンなり食物アレルゲンとして登録されていないこと、及び1塩基を除いてほぼ全てが宿主の染色体の塩基配列から得られたORFであることから、食物アレルギー誘発性の懸念は小さいと考えられました。

なお、連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンとして、コムギ由来のアレルゲンが検出されましたが、*lipCAB*遺伝子の部分配列で逆方向の読み枠で検出された配列であり、アレルゲンエピトープとは認められなかったことから、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられました。

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、データベースを用いてE-value<0.02を指標として検索を行った結果、12個のORFが相同性を示しましたが、いずれも毒性を有する可能性は低いと考えられております。

第6.製造原料等に関する事項については記載のとおりでございます。

7の1、*lipCAB*製品は、2005年頃から欧州を中心に販売されております。デンマークにおいて、食品用加工助剤として承認されているほか、フランスではポジティブリストに掲載されております。米国においてはGRASとして認証されております。

第7の2ですが、ドットプロット分析により*lipCAB*製剤中には組換えDNAの残存がないことが確認されております。

3、4、5及び第8については記載のとおりでございます。

評価書案の説明は以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして御意見、コメントを承りたいと思います。細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所をお伝えいただければと思います。

ございますでしょうか。よろしいでしょうか。もし後でお気づきの点があれば御連絡いただければと思います。

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を進めていきたいと思っております。

では、本日3件目、新規品目であります除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3のうち、食品についての審議を行いたいと思っております。

では、事務局のほうから説明をお願いいたします。

○松原課長補佐 説明させていただきます。除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3の安全性評価の要旨の資料をお願いいたします。

1ページ目、真ん中の(1)でございます。本品目はカラシナでございます。カラシナは食品安全委員会で評価するのは初めてとなります。本品目は、既に安全性評価がされているグルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネRF3と非組換えカラシナを掛け合わせたものでございます。

セイヨウナタネRF3につきましては、2001年に厚生労働省において安全性評価が行われております。掛け合わされた後は、非組換えのカラシナと戻し交配を行い、新製品が作出されているといったものでございます。後代交配種ということでございますが、セイヨウナタネとカラシナとの異なる種間での掛け合わせということございまして、当面の間、安全性の確認を必要とすると言われていたことから、今回、審議となります。

次に(2)導入される遺伝子と供与体につきまして、2つの遺伝子が導入されております。1つ目、改変*bar*遺伝子でございます。こちらは放線菌*Streptomyces hygroscopicus*に由来する遺伝子を改変したものであり、PATタンパク質を生産してグルホシネート耐性を獲得するものでございます。2つ目が*barstar*遺伝子でございます。こちらは土壌細菌*Bacillus amyloliquefaciens*に由来する遺伝子ございまして、発現したBARSTARタンパク質は植物に不稔性を与えるBARNASEタンパク質の機能を阻害することで稔性を回復させるといったものでございます。BARNASEタンパク質を生産する雄性不稔系統と掛け合わせることで、効率的にF1種を得ることができるという利点がございます。

続きまして、2ページ目に参ります。(3)導入方法でございます。導入されるDNAにつきましては、セイヨウナタネRF3の開発のときにアグロバクテリウム法により導入されております。先ほどの説明のとおり、既に安全性評価済みのものでございます。また、改変*bar*遺伝子と*barstar*遺伝子につきましては、真ん中の表の作物にも入れられているといったものでございます。

続きまして、2.宿主についてでございます。カラシナにつきましては、食経験として野菜、マスタード、食用油としての経験があります。また、亜種として1~4のとおり知られているといったところでございます。

3ページ目に参りまして、真ん中のあたり、3の(2)宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質についてでございます。毒性物質・栄養阻害物質につきましては、エルシン酸、グルコシノレート、フィチン酸、シナピン、タンニン等が知られております。これらの含有量については、要旨後ほどに分析結果がございます。

4.宿主と組換え体との利用方法等の相違でございます。こちらにつきましては、収穫時期、摂取量、4ページ目に参りまして、加工方法等につきまして、油糧用カラシナと違いはないといったところでございます。

ページが飛びまして、15ページ目に参ります。表のとおり、今回の育種過程につきましてはこのようになっております。セイヨウナタネRF3とカラシナを掛け合わせた後、何代

も●●●掛け合わせるということで、作出されています。

次の16ページをお願いいたします。第6の1、遺伝子導入に関する事項でございます。セイヨウナタネRF3とカラシナRF3において、挿入DNAとその近傍配列につきましてシーケンス解析を行っております。その結果、完全に一致しているといったところが確認されております。

続きまして、24ページをお願いいたします。(2) オープンリーディングフレームの検索でございます。ORFの検索につきましては、セイヨウナタネRF3で行っており、今回のカラシナRF3では行っていないといったところでございます。終止コドン間でのORFの検索を行ってございまして、80アミノ酸35%以上の相同性、または連続する8アミノ酸で一致する既知のアレルゲンの配列と一致するといったものは認められておりません。また、毒性タンパク質と生物学的に関係のある相同性も認められていないといったところでございます。

カラシナRF3については、セイヨウナタネRF3とカラシナの戻し交雑育種によってつくられているといったことから、カラシナRF3で新たに形成されるORFはないものと、申請者は考察しております。

続きまして、隣の25ページをお願いいたします。組換え体における発現部位、時期、量についてでございます。表6.2のとおり、改変PATタンパク質及びBARSTARタンパク質、どちらも検出されているといったところでございますが、その下、3.遺伝子産物の摂取量についてでございますが、タンパク質の摂取量について、油糧用として摂取されるため、加工工程においてこのタンパク質が除去・分解され、最新の検出技術で検出できないといったところから、摂取量には影響はないと考えられているところでございます。

続きまして、26ページ目をお願いいたします。4の(1)と(2)でございます。供与体改変PATタンパク質及びBARSTARタンパク質でございますが、アレルギーの誘発性について報告はないことを確認しております。

続きまして、4の(3)物理化学的処理に関する事項でございます。こちらの物理化学的処理に関する感受性については、セイヨウナタネRF3で確認しているといったところでございます。

続きまして、4の(4)タンパク質とアレルゲンの相同性についてでございます。こちらも35%以上の相同性示す既知のアレルゲンは確認できていないということ、連続する8アミノ酸以上での一致も確認できていないといったところでございます。

27ページに参りまして、5.タンパク質の安定性についてでございます。こちらについては、29ページの図6.5を御覧いただければと思います。カラシナRF3につきまして5世代間で確認をしており、全て維持されているといったところが確認されているところでございます。

続きまして、30ページをお願いいたします。代謝経路への影響についてでございます。まず、改変PATタンパク質についてでございます。こちらはグルホシネートを代謝すると

いったもので、ほかのアミノ酸には影響しないといったところから、代謝系には影響を与えないと考えているところでございます。

また、BARSTARタンパク質でございます。こちらは植物中のリボヌクレアーゼを阻害するといった報告がないということ、動物のリボヌクレアーゼとは結合しないといった報告があるところから、こちらでも代謝系への影響は低いということが考察されております。

続きまして、31ページ目をお願いいたします。宿主との差異に関する事項ということで、栄養成分及び有害成分への差異といったところでございます。こちらはそれぞれカラシナRF3と従来の非組換えのカラシナの種子を用いて、一般成分組成、アミノ酸組成、脂肪酸組成、主要無機塩組成と有害生理活性物質の組成を比べております。こちらはいずれも従来のカラシナと同程度であるといったところが示されているところでございます。詳細については、34ページ以降それぞれの表のとおりです。

続きまして、40ページをお願いいたします。8.諸外国における認可ということで、米国、カナダ、オーストラリアにおいては、形質の異なる種に導入しても従来の交配育種技術を用いる限り規制の対象としていないといったところから、新たに申請を必要としていないと判断されているところでございます。

9.栽培方法、10.種子の製法、管理方法については従来の方法と相違ないということ、また、管理方法につきましては、リアルタイムPCRによって識別できるような方法を確立しているといったところでございます。

カラシナRF3につきましては以上でございます。よろしくをお願いいたします。

○中島座長 ありがとうございます。

新規のこの作物についてはあっさり終わったなと思いかと思いますが、いろいろ特殊事情がございまして、事務局のほうからも説明がありましたけれども、確認させていただきますと、この組換え体はそもそもセイヨウナタネでつくられておりまして、これの審査は2001年に終わっています。2001年というのは、実は食品安全委員会の発足前でございまして、厚生労働省で直接安全性審査を行っていた時代のものです。

今回これはカラシナとしてありまして、15ページを見ていただければと思うのですが、元がセイヨウナタネだったものをカラシナと何回も何回も掛け合わせをいたしまして、●●●、それでカラシナとして固定を行っておる。これも言ってみれば後代交配種と変わらないのですが、またそういう理由でアメリカなどでは審査の必要はないということなのですが、日本ではナタネだったものがカラシナに変わっているわけだから、そういう場合は一応審査するというルールに基づいて、ここの審査に上がっております。

元のセイヨウナタネのときは油を取るという目的でありまして、今回はカラシナ、*B.juncea*で、これの使用目的を見ますと、油糧用のものと。それから、種子はマスタードの原料にもなります。種類が変われば利用方法も変わり得るとか、そういった理由もあって再審査をするというルールになっているのだと思いますけれども、この点について、まさかこれはマスタードには使わないよねと申請者に確認を取りました。そうしたら、油に

のみ利用するというお答えが返ってきております。それから、これだけ長い間植え継ぎ植え継ぎしている間に中の遺伝子の組成等は変わっていないということはサザンハイブリダイゼーションで確認しておると。そういう事情です。

なので、審査のポイントというのは実は非常に限られると思うのですが、小関先生、この辺の事情、ぜひ昔の話など覚えておられることなどございましたら、ぜひお願いしたいです。

○小関専門委員 小関です。了解しました。

まさしく先生のおっしゃったとおりで、厚生労働省時代に一番の問題になったことは、結局亜種を超えるということと、加工方法、可食部が変わることの2点について、どちらかが変わるのであれば新規品目としてやりましょうねという考え方になっていました。

これは何でそういうことになったかという、厚生省時代からアブラナの仲間とはとにかく種間で雑種をつくってしまうということがあって、一歩間違えると様々なアブラナ科の植物に掛け合わせをすることが可能になっているので、それがむやみやたらに広がると大変なことになる。というのは、食文化が違って、もちろん洋がらしは日本だけではなくて、むしろ欧米の方々のほうがいっぱい食べるかもしれませんけれども、葉っぱまでそのまま食べるということはないし、場合によってはおひたしにして食べるということはカナダ、アメリカの人たちは全然想定していなかったのです。分からなかったのです。というような食文化の違いがあるので、まずとにかく慎重に事例を積み重ねていく必要があるだろうということで、厚生労働省時代に申合せをつくったものが、食品安全委員会に移ってもつながってきたという経緯があります。

そこがあるので、今回の場合には亜種を超えるという1点、そして、可食部と加工方法について、これは今、座長の先生がおっしゃられましたように確認を取って、油以外には使いませんという回答は得られているところなのですけれども、ただ、当時から一つの懸念としてあったものは、油用のナタネが日本に種でタンカーに積まれてきて、それで日本の国内でも散ることがあると。実際にある港のところで生えていたものを調べてみたら、組換え体でしたということ報告した方もいらっしゃるというのは事実なのです。要するに、非常に慎重にやってきたということがあった。

特にこれまでの考え方でいったときに、ナタネをやったときからそうだったのですけれども、例えばこれの葉っぱをおひたしにして食べたとしても、食品の安全性の上では問題ないということを担保して、そこまで見て判断していく。すなわち、食品、製品として評価をするのではなくて、植物のままで全体での安全性評価をするというスタンスはずっとつながってきたと思うので、これについて例えばここでいいですねと言って、パブコメを出したら、いや、それは日本だったら生というか葉っぱで食べるとかがあるから、まずいのではないかと言われたとしても、それは一番最初るときからきちんと植物体の全部を加工して食べても大丈夫ですということが担保されたものであるということは、食品としての安全性の上では懸念がないと、きちんとそこは言えるのではないかと思います。

ですから、今回油であることとともに、ある意味変な言い方ですけれども、最大限のセイヨウナタネとしてのデータは取られていらっしゃるということはあるので、そういう意味では、セイヨウナタネでがちがちのフルスペックでやってあるので、今回の場合には加工部位は変わっていない。問題点にされるのは亜種以上である。でも、非組換え体のものと既存の食品で比較したときにどうですかといったら、それは大丈夫です。特に油であったら可食部は変わらない形なので問題ないということで、変な言い方ですけれども、簡易版といったらなんですが、これでもよく書かれているのではないかなと私は思うので、今回のケースの場合にはすぐ評価書に行っても大丈夫かなと私は思っています。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。勉強になりました。いろいろあったようですね。

植物の専門の先生方、御意見をいただきたいと思うので、山川先生、こういうパターンはいかがでしょうか。

○山川専門委員 今、小関先生がおっしゃったのが本当の経過でありまして、ただ、これは食べるところがとにかく油だけだというので、食べる部分は大丈夫だと思います。これを読んで、私は昔の経験があったから非常に分かりやすかったです。そういう意味で、食べる部分は安全だと思います。

ただ、アブラナというのは自家不和合というのですか、和合が違うものになりますので、これは今、食品のほうではないのですが、栽培のほうでいえば、その花粉が移っていくのではないかなというのがあるかもしれませんが、食品としてこれだけ考えれば大丈夫だということがはっきりしています。そういう意味で、この部分は、小関先生が直ちに評価書に行ってもいいとおっしゃっていましたが、そのとおりだと思います。

あと、油以外に使いませんよねと確認したと言ってくれるけれども、この本文を読んでもマスタードと何とか、使い方というのがちゃんと書いてあったので、大丈夫だと思いました。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

マスタードに本当に使わないでねと、実はこちらから念を入れて確認を取りまして、それで使わないという答えが返ってきております。

児玉先生、御見解を。

○児玉専門委員 経緯については小関先生が御説明されたとおりでして、後代交配種の確認が必要というか、審査が必要なものの亜種以上の交配であることというものにひっかかって今回出てきているわけですが、今回、あの規定ができて一番の理由は、小関先生の説明にあったように、このアブラナ科近縁の間での交雑ができてしまって、日本では食べる部位が西洋とは違っていろいろな部位を食べる可能性が高いということがあって、亜種以上の交配のときには審査するみたいな規定になっているのですが、それに沿ってアブラナ近縁のもので出てきた初めての例になるのではないかなと思います。

ただ、後代交配種のこの規定は、実は世界的に見るとほとんど日本でしかやっていない規定でして、諸外国では通常の育種の方法で作られているものなので、いわゆる審査の対象にならないという状態になっているものになっています。

今回、一番懸念だったアブラナ近縁のもので出てきたので、この形で出てきたのはしようがないというか、これでメーカーとしてはつくるだけちゃんとつくりましたという形になっていますので、安全性審査上はこれでいいのですけれども、今、遺伝子組換え、GM同士の掛け合わせでカテゴリーを3つに分けて、①×①は届出で済んでいて、①×②が数年前に簡易にかなりシンプリファイした経緯になっています。

それを考えると、通常の後代交配で使用目的が同じで、メーカーからすると、通常の育種でつくっているものと実質的に変わらないのですけれども、そういうものに対して求めている審査内容にしては、①×②の審査内容と比べても、ちょっと過剰ではないかなと思っています。もっと簡略した形で、届出ではないのですけれども、我々が確認できる最低限のスペックにしてあげたほうがいいのではないかなど。つまり、国際的に見ても、それから、国内の審査状況を見ても、これは1例目なのではしようがないのですけれども、ちょっと過剰な形になっていないかなど。もっと簡略化してもいいのではないかなど感じました。

ちなみに、●●●ということにしまして、実際にいうと、●●●という形になっています。ですから、通常の後代交配はそのままで流通できてしまいますので、農水省のほうから今回こちらのほうにMME、Meat Milk Eggの確認は来ていないという形になっているというのも申し添えます。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

ただいまの御説明でいろいろこの事情も明らかになったと思います。

では、まず安全性について、本件について御質問、御意見等ございますでしょうか。

事務局のほうから今言えることは何かございますか。

○蛭田評価情報分析官 事務局です。

ご指摘の掛け合わせの考え方につきましては、今後、予定されている安全性評価指針の見直しのなかで、その取扱について御相談をさせていただきたいと思っております。

○中島座長 本件についての安全性審査をまず先に終了しておきたいと思います。

本件につきまして、先生方、何か御懸念、御質問等ございますでしょうか。飯島先生。

○飯島専門委員 最後、成分組成のところと比較をしているのですけれども、結構有意差が出ているが、参照品種の許容区間内であったことから、従来品種の変動の範囲内であると判断されたということで全て結論づけられているのですけれども、そのところの参考文献か何かが必要なのではないかなど思いました。そんなに数値が違わないのは分かるのですけれども、全て結論が、有意差がいろいろな成分であるとかないとか、結構あるもの

が多いのですが、そこが許容区間内というのが参考とする文献が何かあるのかなと。そこを加える必要があるかなと思いました。

あと、すごく小さいことなのですけれども、表6.6の脂肪酸なのですけれども、上から6行目のヘプタデセン酸はヘプタデセン酸だと思いますので、これは多分タイプミスだと思います。

以上です。

○中島座長 デヘン酸ですか。

○飯島専門委員 36ページの表6.6で、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ヘプタデカン酸の次がヘプタデセン酸となっているのは、「ダ」ではなくて「タ」だと思います。

○中島座長 そういうことですね。

○飯島専門委員 あと、先ほど言った参照品種の許容区間内という言葉がちょっとひっかかるかなと思いました。

○中島座長 植物ですので、栽培条件によっていろいろ触れるので、こういう表現の仕方とかこういう報告の仕方は今までよくあった話なのですが、こういう場合の参考文献というものはあり得るものなののでしょうか。この辺も植物の先生、どなたか。

○小関専門委員 小関ですけれども、よろしいでしょうか。

多くの場合にはILSIのデータベースというものがあるのです。それを引用してきた人が多いのですが、今回はそう書いていないので、そこはどういう文献というかデータベースから引いているのかということ、多くの人たちはILSIを使っているのだけれども、どうですかと聞いていただいて、書き加えてもらえればそれで済むと思います。

以上です。

○中島座長 分かりますか。

○山口係長 事務局です。

ただいまの飯島先生の御質問なのですけれども、申請資料の31ページを御覧いただけますでしょうか。

これの第2パラグラフの一番最後の4行程度、「また」で始まる場所なのですが、また、同時に7系統の参照品種（カノーラ品種3品種、マスタード品種4種）を栽培し、栄養成分及び有害物質の測定を行い、参照品種の変動範囲を決定した（添付資料10）とありますので、この添付資料10の結果を基に今回申請者のほうは変動の範囲を決めてきております。

以上です。

○飯島専門委員 分かりました。私のほうでちゃんと見ていなかったもので、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、ほかにございますでしょうか。

それでは、ひとまず本件については安全性の懸念なしと判定してよろしいでしょうか。

御意思を確認したいと思しますので、よろしくお願いたします。

(委員首肯)

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、安全性についての懸念はない、問題はないということで、評価書案の審議に入りたいと思います。

では、お願いたします。

○松原課長補佐 評価書案の審議に入りたいと思います。

資料2の38ページ目からが今回のカラシナの評価書案でございます。

それでは、43ページから説明させていただきます。お願いたします。

「Ⅰ. 評価対象食品の概要」でございます。

名称は除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3でございます。除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性カラシナRF3（以下、「カラシナRF3」という）は、除草剤グルホシネート耐性及び稔性回復性セイヨウナタネRF3とカラシナを従来からの手法で掛け合わせて作出したものである。なお、セイヨウナタネRF3については、厚生労働省において既に安全性評価が終了しており、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断されております。

セイヨウナタネRF3につきましては、*Streptomyces hygroscopicus*由来の改変ホスフィンオスリシン・アセチル基転移酵素遺伝子を導入して作出されており、改変PATタンパク質を発現することで、除草剤グルホシネートを散布してもその影響を受けずに育成できるものとされております。また、*Bacillus amyloliquefaciens*由来の*barstar*遺伝子も導入されており、BARSTARタンパク質を発現することで雄性不稔形質を付与するリボヌクレアーゼであるBARNASEタンパク質を阻害するというものでございます。

セイヨウナタネとカラシナは同じアブラナ属に属するが、別の種に分類されるため、カラシナRF3については「遺伝子組換え植物の掛け合わせについての安全性評価の考え方」における亜種レベル以上の交配であることから、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき評価を行ったとしております。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」でございます。

第1.安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との層に関する事項でございます。

1.宿主及び導入DNAに関する事項でございます。

(1) 宿主の種名及び由来でございます。宿主はアブラナ科アブラナ属に属するカラシナ (*Brassica juncea*) でございます。

(2) DNA供与体の種名及び由来でございます。改変*bar*遺伝子の供与体は*S.hygroscopicus*、*barstar*遺伝子の供与体は*B.amyloliquefaciens*でございます。

(3) 導入DNAの性質及び導入方法でございます。改変*bar*遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する改変PATタンパク質をコードしております。*barstar*遺伝子は

BARSTARタンパク質をコードし、雄性不稔形質を付与するリボヌクレアーゼであるBARNASEタンパク質を阻害する。これらの遺伝子はセイヨウナタネRF3に由来し、カラシナを従来からの育種法により交配して導入されたものでございます。

2.宿主の食経験に関する事項でございます。

カラシナは4つの亜種に分類され、野菜、香辛料、食用油としての食経験がある。亜種*juncea*には油糧用カラシナと香辛料用のカラシナが含まれております。

低エルカ酸及び低グルコシノレートのカノーラ品種としてセイヨウナタネ、アブラナお呼びカラシナの3品種由来の油、種子及び植物体が登録されております。

カラシナRF3の遺伝的背景は、油糧用カノーラ品種を有する系統10CJ28-094でございます。

3.宿主由来の食品の構成成分等に関する事項でございます。

宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要でございます。カラシナ（マスタード品種とカノーラ品種を含む）の種子中の主要栄養組成につきましては、こちらの記載のとおりとしております。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要でございます。カラシナの種子中のエルカ酸及び総グルコシノレートの含有量は、それぞれ記載のとおりとしていたるところでございます。

4.宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項でございます。

(1) 収穫時期と貯蔵方法、(2) 摂取（可食）部位、(3) 摂取量につきましては、従来の油糧用カラシナと変わらないとしております。

次のページに参りまして、(4) 調理及び加工方法につきましても、従来の油糧用カラシナと変わらないとしております。

5.宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項でございます。宿主と従来品種以外に、必要に応じて、セイヨウナタネRF3を比較対象として用いております。

6.安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項でございます。カラシナRF3につきましては、改変*bar*遺伝子の導入によって改変PATタンパク質を発現すること、*barstar*遺伝子の導入によってBARSTARタンパク質を発現することが宿主との相違点となっております。

以上により、カラシナRF3の安全性評価においては、既存のカラシナ等との比較が可能であると判断いたしました。

第2.組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項でございます。

カラシナRF3は、改変PATタンパク質を発現することによって、除草剤グルホシネートを散布しても、その影響を受けずに生育することができる。また、カラシナRF3はBARSTARタンパク質の発現により、BARNASEタンパク質を発現する雄性不稔系統と交配することで稔性を回復させ、確実にF1種子を得ることができる。カラシナは、セイヨウ

ナタネに比べ脱粒性の低さ並びに高温及び乾燥適応性により、カラシナRF3の栽培地域の拡大が見込まれるということでございます。

第3.宿主に関する事項でございます。

分類学上につきましては、宿主はカノーラ品種のカラシナでございます。

2.遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項については、カラシナはアブラナとクロガラシの交雑に由来すると考えられております。カノーラ品種のカラシナはカノーラ品種として開発されていたセイヨウナタネ及びアブラナを利用して開発されております。

3.有害生理活性物質の生産に関する事項でございます。カラシナに含まれる有害生理活性物質として、エルカ酸、グルコシノレート、フィチン酸、シナピン及びタンニンがございます。エルカ酸は、ラットの給餌実験において心臓病片を引き起こすことが報告されており、コーデックス委員会では、全脂肪酸中のエルカ酸含量は2%未満と規定されているところでございます。

次のページに参りまして、グルコシノレートは含硫配糖体であり、それ自体は無害でございますが、アブラナ属植物に含まれる酵素による加水分解により生成する物質により甲状腺腫誘発作用等をもたらす可能性がある。このため、OECDのコンセンサス文書では油かす中のグルコシノレート含量を30 μ mol/g未満とすることが示されているということでございます。

フィチン酸につきましては、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛等のミネラル吸収量を減少させる。シナピンは、腸内でトリメチルアミンに代謝され、さらに排泄しやすいトリメチルアミンオキシドに代謝されるが、これを速やかに異化できない動物が知られている。タンニンは、タンパク質や炭水化物と結合して消化能力を低下させるということが知られておるといったところでございます。

4.アレルギー誘発性につきましては、ヒトが摂取するカノーラ品種のカラシナ由来の食品については油のみであり、カノーラ油がアレルギー誘発性を持つという報告はされておられません。

5.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につきましては、カラシナは病原菌、ウイルスによる各種病害が知られているが、ヒトに対して病原性を示すということとは知られておりません。

6.安全な摂取に関する事項につきましては、記載のとおりでございます。

7.近縁の植物種に関する事項でございます。アブラナ属植物につきましては、これまで安全に摂取されてきた野菜が含まれているということ、主要な油糧作物であるアブラナには、カラシナと同様にエルカ酸及びグルコシノレートが含まれることが知られております。

第4.ベクターに関する事項でございます。こちらは記載のとおりでございます。

第5.挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項でございます。カラシナRF3につきましては、セイヨウナタネRF3の戻し交配育種によって作出されており、セイヨウナタネRF3の作出時の発現ベクターに関する知見、挿入DNA及び遺伝子産物に変

化を与えられるとは考えられておりません。

第6.組換え体に関する事項でございます。

1.遺伝子導入に関する事項、コピー数及び近傍配列に関する事項でございます。カラシナRF3は、セイヨウナタネRF3の戻し交配育種により作出されているということで、セイヨウナタネRF3の遺伝子導入様式に変化を生じているとは考えられておりません。カラシナRF3と非組換えカラシナ10CJ28-094の葉を用いてサザンブロット法に解析を行い、その結果、カラシナRF3とセイヨウナタネRF3の作出に用いた導入用プラスミドのT-DNA領域のプロンプとセイヨウナタネRF3で認められたものと同様のハイブリダイズパターンが認められたということ。また、導入用プラスミドT-DNA領域外側配列では挿入されていないということが確認されております。また、カラシナRF3の導入遺伝子配列及びその近傍配列のシーケンス解析を行ったところ、セイヨウナタネRF3と一致するといったことが確認されているところでございます。

(2) オープンリーディングフレームの有無及びその転写の発現の可能性に関してでございます。カラシナRF3の挿入DNA領域と5'末端近傍配列及び3'末端近傍配列との接合部において、意図しないORFが生じていないことを確認するため、掛け合わせに用いたセイヨウナタネRF3の6つの読み枠において検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する3アミノ酸以上のORFは484個見出されております。

しかし、検出されたORFと既知のアレルゲンとの相同性の確認をしたところ、連続する80アミノ酸以上の配列について35%以上の相同性を示す配列及び連続する8アミノ酸で一致する既知のアレルゲンは検出されていないといったところでございます。また、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、データセットを用い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ております。

カラシナRF3の挿入DNA領域及び近傍配列はセイヨウナタネRF3と同一であって、カラシナRF3においてアレルゲンや毒性タンパク質が発現する可能性は低いと考えられたということでございます。

続きまして、2.遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期、発現量に関する事項でございます。カラシナRF3の植物体、根、花、種子における改変PATタンパク質及びBARSTARタンパク質の発現量をELISA法によって分析した結果は表1のとおりでございます。表1は次のページになりますが、このとおりとなっております。

続きまして、3.遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項でございますが、カラシナの植物油脂加工過程で除去及び分離されるため、植物油脂からは検出されております。したがって、一日蛋白摂取量に影響を及ぼすとは考えられていないといったところでございます。

4.遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項でございます。

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性につきましては、アレルギー誘発性を有するとの報告はないとなっております。

(2) 遺伝子産物のアレルギー誘発性についても報告はないとしております。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項につきましては、セイヨウナタネRF3の安全性評価において感受性が高いことを確認しております。

(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事項につきましては、改変PATタンパク質及びBARSTARタンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて検索した結果、一致するものはなかったとしております。

5.組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項でございますが、カラシナRF3に挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、5世代のカラシナRF3についてサザンブロット分析を行った結果、各世代で共通のバンドが見られ、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認されたとしております。

6.遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項でございます。改変PATタンパク質及びBARSTARタンパク質の代謝系への影響に関する事項につきましては、セイヨウナタネRF3及び除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネMS11において、宿主の持つ代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられており、カラシナRF3についても同様と考えられております。

7.宿主との差異に関する事項でございます。米国及びカナダのほ場で栽培されたカラシナRF3及び非組換えカラシナの種子について、一般成分組成、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類、ミネラル類及び有害生理活性物質の分析を行っております。非組換えカラシナとカラシナRF3の無処理区及び非組換えカラシナとカラシナRF3の処理区についてそれぞれ検討が行われております。

(1) 一般成分組成につきましては、記載のとおりで参照品種の許容区間内であったとしております。

(2) アミノ酸組成、次のページに参りまして、(3) 脂肪酸組成、(4) ビタミン類、(5) ミネラル類、(6) 有害生理活性物質につきましても記載のとおりとしております。

8.諸外国における認可、食用等に関する事項につきましては記載のとおりで、9.栽培方法に関する事項についても記載のとおりということです。

次のページに参りまして、10.種子の製法及び管理方法についても記載のとおりとしております。

評価書案につきましては以上でございます。

○中島座長 評価書案につきまして、御意見、コメント等ございますでしょうか。細かい字句等、お気づきの点でもございましたら、後ほどでも結構ですので、事務局にお伝えいただければと思います。よろしいでしょうか。

どうぞ。

○橘田専門委員 橘田です。恐れ入ります。

内容ではなくて書き方なのですけれども、括弧の使い方がちょっと気になる部分があった

ので御検討いただきたいと思います。括弧の中に括弧が入るところがかなりたくさんあるように見受けられます。それで、かぎ括弧と丸括弧を使い分けるということを特にしていないので、丸括弧の中に丸括弧が入っている形になっているのですけれども、ほかの評価書では社内文書に特に発行年を振っていないのですが、こちらのほうには発行年を振ってあって、そうすると、発行年のところの括弧が閉じられていないので、どこで切れるのか分からなくなってしまうところが幾つか見られましたので、そのところを統一していただければと思います。

例えばなののですけれども、44ページの3の(1)の一番最後のところです。「(参照3:添付10 社内文書(2019))」、ここで本当はもう一個括弧が欲しいかなと思うのですけれども、年号が入ってしまうと、最後の括弧は全部入れていないので、場所によってはどこで切れるのか微妙に見えるところがあります。例えば45ページの第2の2パラ目なののですけれども、「(参照5:2CFIA(2008))」で一遍閉じているのですが、ここで閉じ切っているのか閉じ切っていないのかよく分からないので、「並びに」が括弧の外にあるのか中にあるのかちょっと分からないなど。本当に書き方の問題なので、内容は全然問題ないと思っているのですけれども、そのようなことを御検討いただければと思います。

ちなみに、ほかの前2社の評価書では社内文書とかには年号を入れていないので、あえてここで入れる必要はないのかなと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

文書の体裁の上とはいえ、それなりに重要だと思しますので、事務局、ちゃんと聞いていましたか。見た感じ参照何とかとなっているところは全部要チェックだと思しますので、お願いします。

では、またその辺、後ほど私のほうでもチェックして恥ずかしくない形で外に出したいと思えます。橋田先生、ありがとうございます。

ほかはございますでしょうか。

それでは、細かいところはまた後ほど修正するとして、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続を進めていきたいと思えます。

今回のような後代交配についての議論は、今回久しぶりの例ということで今まで放っておかれた点があるので、せつかくですので少しだけ今議論しておきたいと思うのですが、まず簡略化すべきであるという点は、先生方みんな意見は一致していると思うのですけれども、先ほど児玉先生からいただいた飼料についての議論を考えますと、種が変わったときに変わり得るものという点、可食部と利用法について。それから、毒性物質の可能性は種が変わると変わり得ますので、そこをチェックすればと。あと、そこにいくまでにそれなりの植え継ぎ、掛け合わせ等を行っておりますので、そこで組み換えたDNAの形くらいをチェックできればいいのかなと私は何となく思うのですけれども、こういう点もぜひ議論すべきなど、何か御意見等ございますでしょうか。

児玉先生、いかがですか。

○児玉専門委員 基本的にはそういう感じでもよろしいかと思うのですが、カテゴリーの1になるのか、2になるのか、3になるのかでも若干変わるかなと思いますので、一義的に全部同じ評価項目でできるかどうかというのはよく考えて検討してみないと分からないところはあるのですが、要は、今、座長がおっしゃられたように、入れた遺伝子が変わっていないか、毒性というか栄養阻害物質が変わっていないか、使用目的、摂食部位の目的が変わっていないかというところを確認して、そこら辺が一部変わっていますという場合にはフルスペックになるよねということで、それはしようがないと思うのですが、今回の例みたいに、形上はフルスペックの形で出てくる必要は全くないのではないかなと思いますので、運用上になるのか、ガイドラインをいじらないといけないのか。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

では、とにかく検討を始めるということでよろしいですね。検討するのであれば、例えばこのところも検討していただきたいなど、御意見を今のうちに言っていただくとまた助かったりもするのですが、小関先生、何かないですか。

○小関専門委員 急に言われても苦しいので、私も含めてですけれども、少し皆さんで見直してみて、事務局のほうにこういうのはどうと投げてみて、また次回の委員会の最後のほうで取りまとめをお願いできればと思います。

以上です。

○中島座長 もっともかと思います。山川先生、今何かございますか。

○山川専門委員 やはり同じで、入れた遺伝子と使い方と成分ですね。毒性が変わったのではなくて、普通の成分が毒性になるということもあるので、そういう意味も含めて生理的に影響を及ぼすものが変わっていないかにしてしまえばいいなと思います。

これで一回やって、そういう問題はなかったということにもなりますので、簡略化するチャンスだと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

では、そういう方向で検討を始めていこうかと思います。この件に関して、何か今のうちに言っておきたいこと等、どなたかございますか。よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、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。

○松原課長補佐 特にございません。

○中島座長 それでは、本日の議題についてはこれで終了でございます。

以上をもちまして、第210回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

皆さん、お疲れ様でした。ありがとうございました。