

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## (第222回) 議事録

1. 日時 令和4年2月17日(木) 14:00~15:59

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) 遺伝子組換え食品等に係る食品健康影響評価について

- ・ *Komagataella phaffii* BSY0007株を利用して生産されたフィターゼ
- ・ JPBL012株を利用して生産されたプロテアーゼ

(2) その他

### 4. 出席者

(専門委員)

中島座長、岡田専門委員、小関専門委員、小野道之専門委員、近藤専門委員、  
藤原専門委員、山川専門委員

(専門参考人)

児玉専門参考人、手島専門参考人

(食品安全委員会)

協委員

(事務局)

鋤柄事務局長、中事務局次長、石岡評価第二課長、井上評価情報分析官、  
松原課長補佐、奥藤評価専門官、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 *Komagataella phaffii* BSY0007株を利用して生産されたフィターゼ
- ② JPBL012株を利用して生産されたプロテアーゼ

### 6. 議事内容

〇〇〇 定刻になりましたので、ただいまから第222回「遺伝子組換え食品等専門調査会」

を開催いたします。

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

こういう時期ですので、皆さんお忙しくて、本日、所用により、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇は御欠席です。

専門参考人として、〇〇〇、及び〇〇〇に御出席いただいております。

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」に基づきまして、Web会議システムを利用して行っております。

本日の議題ですが、新規品目であります「*Komagataella phaffii* BSY0007株を利用して生産されたフィターゼ」、「JPBL012株を利用して生産されたプロテアーゼ」の安全性に関する審議でございます。

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、「*Komagataella phaffii* BSY0007株を利用して生産されたフィターゼ」の申請者であるHuvepharma Japan株式会社及び株式会社アルビスの方、「JPBL012株を利用して生産されたプロテアーゼ」の申請者であるノボザイムズジャパン株式会社の方をお呼びしております。申請品目の審議の際に、質疑応答に対応していただくことを予定しております。

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、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づきまして、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。

それでは、審議に入ります前に、Web会議における注意事項がありますので、事務局より例によって説明をお願いいたします。

〇〇〇 本日はWeb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してくださいよう

お願いいたします。

2点目、発言の際には赤い挙手のカードを提示ください。またはWeb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し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。

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することにより改善する場合がございます。

マイクが使えない場合はWeb会議システムのメッセージ機能によりお知らせください。

万が一、全く入室ができなくなった場合には、事務局までお電話をお願いいたします。

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Web会議における注意事項となります。どうぞ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、早速ですが、新規品目であります「*Komagataella phaffii* BSY0007株を利用して生産されたフィターゼ」について審議を行いたいと思います。

では、事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、説明をさせていただきます。

「組換えDNA技術応用飼料添加物の安全性に関する確認資料」と記載されました緑色の紙ファイルを御用意ください。

「*Komagataella phaffii* BSY0007株を利用して生産されたフィターゼ」の申請資料になります。

まず、1ページ目を御覧ください。

従来の添加物に関する事項です。従来の添加物は、表1に記載されている5種類の遺伝子組換え体から生産されたフィターゼとしております。

第1の1(1)名称はフィターゼで、有効成分である。6-フィターゼはフィチン酸のリン酸エステル結合を加水分解します。基原も *Aspergillus niger* から *Komagataella pastoris* まで5種類が記載されてございます。

(2) 製造方法は、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令により、成分規格が設定されている6-フィターゼの製造方法の基準が表1にまとめられております。

3ページ目を御覧ください。

(3) 用途及び使用形態は、植物性飼料原料に含まれるフィチン態リンの単胃動物における利用性を改善する目的で飼料に添加されます。

続きまして、2、宿主及び導入DNAです。

(1) 宿主は *Komagataella phaffii* BG10株です。

(2) 供与体についてです。まず、本申請フィターゼであるA2Pフィターゼを発現する遺伝子は、豚結腸内容物から単離した *E.coli* B株由来の改変遺伝子です。

また、4ページ目の下から表3としてそのほかの遺伝子及びその供与体がまとめられておりますが、5ページ目の表3の下から3段目、選択マーカー遺伝子として宿主にゼオシン耐性を付与する遺伝子が導入されており、その供与体は *Streptoalloteichus hindustanus* でございます。そのほかにも、プロモーターやターミネーター、そして、シグナル配列について、その性質も併せて表3に記載されてございます。

続きまして、5ページ目を御覧ください。

3、利用経験や食経験に関する事項です。

*K. phaffii*は、米国において、プロイラー用のタンパク質原料として、10%を超えない配合量での使用が認められております。また、*K. phaffii*を用いて生産されたA2PフィターゼはEUにおいて承認されております。

4、宿主の構成成分についてです。宿主である、BG10株は分子生物学の研究分野で広く利用されている市販株で、全ゲノム配列が明らかになっており、バイオセーフティレベルは1に該当します。

6ページ目を御覧ください。

5として、本遺伝子組換え添加物について記載されています。

(1) 有効成分は6フィターゼ、基原は *K. phaffii* BSY0007株です。

(2) 製造方法は、製造用原体の培養工程、ろ過工程、そして、製剤の製造方法が分けて図2として記載されております。

続きまして、8ページ目の(3)用途及び使用方法です。既存のフィターゼと同様ですが、対象動物は豚、鶏、ウズラ、養殖水産動物を予定していると記載されています。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較です。上の3行目の後半から記載されておりますが、A2Pフィターゼが最大活性を示す至適pHは●●●であり、下の表4に示す既存のフィターゼに比べて、範囲が対象動物におけるフィターゼの作用部位のpH域により近く、かつ、至適pHの範囲も広いことから、対象動物の消化管においてフィターゼ機能が損なわれにくくなっています。また、一部既存フィターゼに比べて耐熱性が高く、高温条件下で製造されるペレット飼料中での安定性が高くなっております。

続きまして9ページ、6、相違点です。従来添加物として *K.pastoris* GS115株を基原としたAppA2フィターゼを比較対象としており、両者はアミノ酸数及び分子量が同一で、構成するアミノ酸のうち、17アミノ酸が異なるのみであるとしております。

(2) 組換え体と宿主との相違点は、フィターゼ生産能及びゼオシン存在下における増殖能を獲得している点でございます。

続きまして、10ページ目を御覧ください。

第2、宿主に関する事項です。

1は分類学上の位置づけについて記載をしております。下から5行目から、2、病原性及び有害生理活性物質等の生産に関してです。*K.phaffii*の野生株やBG10株が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、バイオセーフティレベル1に相当するとみなされています。

11ページの3、4、5については記載のとおりです。

中段から第3、ベクターに関する事項の記載がありますが、2、性質に関する事項に修正が入っております。

机上配付資料1としてお配りしている資料の11ページと書かれたところを御覧ください。

人工合成した各領域の二重鎖DNAフラグメントを用いてギブソン・アセンブリ法で構築しております。pUCプラスミドの複製開始点を含み、大腸菌での複製が可能であるとしております。

要旨に戻っていただきまして、11ページの下から7行目を御覧ください。

第4、挿入DNA等に関する事項です。

まず、挿入DNAの供与体に関する事項です。

(1)、A2Pフィターゼを発現するA2P遺伝子は、豚の結腸内容物から単離した*E.coli* B株由来の遺伝子に人工的に変異を導入して得られたものです。

12ページから(2)安全性に関する事項が記載されております。

挿入遺伝子の供与体である*E.coli* B株には、下痢原性大腸菌の分類判定の指標とされる耐熱性エンテロトキシン、易熱性エンテロトキシン、Vero毒素、凝集付着性繊毛、細胞毒性壊死因子に関与する遺伝子は含まれておりません。

また、マーカー遺伝子等の3つの供与体についても分子生物学の分野で広く利用されており、バイオセーフティレベル1に相当するとしております。

続きまして、2の(1)挿入遺伝子の合成方法等です。導入用ベクターは人工合成した各領域の二重鎖DNAフラグメントを用いて、ギブソン・アセンブリ法により構築しております。ギブソン・アセンブリ法で得られた混合液はコンピテントセルに形質転換し、ゼオシン含有培地で選抜をしております。

(2)切斷地図は13ページの図4のとおりです。

13ページの後半から(3)挿入遺伝子の機能に関する事項です。

まず、14ページの①ギ酸デヒドロゲナーゼプロモーター領域は、●●●です。

②α因子シグナルペプチドコーティング領域は、●●●です。

15ページに行ってくださいまして、③転写終結末端、④、⑤プロモーター領域については記載のとおりでございます。

16ページに行ってくださいまして、⑥ZeoR遺伝子は●●●です。

⑦、⑧は記載のとおりでございます。

この①から⑧について、遺伝子産物の有害タンパク質及び既知のアレルゲンとの構造相同性について確認をしております。全てについてタンパク質は有害作用を持たないと判

断され、80アミノ酸で35%かつ連続する8アミノ酸以上が一致するアレルゲンは確認されなかったとしております。

続きまして17ページの3、4、18ページの5については記載のとおりでございます。

6、DNAへの宿主への導入方法です。

こちらについては、申請者から事前に要旨の修正が入っております。

机上配付資料1を御準備ください。

こちらの18ページと書かれたページの下から6行目からの記載になります。制限酵素で直線化した導入用ベクターを電気穿孔法で導入し、ゼオシン含有培地で選抜をしております。全ゲノムシーケンス解析により、挿入位置を明らかにしており、BSY0007株では染色体の再構成が生じております。

19ページに行っていただきまして、●●●が生じており、●●●が生じた境界領域に●●●コピーの発現カセットが挿入されたことを確認しております。そのほか、●●●ことも確認をしております。また、BSY0007株を培養した後に得られたコロニーを対象にフィターゼ活性を調査してございまして、全てのコロニーから均一なフィターゼ活性が得られたことから、導入遺伝子が安定して保持されているということと判断されたとしております。

あわせて、図5及びその説明も修正をされております。

要旨に戻っていただきまして、19ページ目の7については記載のとおりでございます。

続きまして20ページ目、第5、組換え体に関する事項です。

1、宿主との差異は、BSY0007株はA2Pフィターゼの生産能が付与されている点とゼオシン存在下における増殖能が付与されている点としております。

2、遺伝子の導入に関する事項ですが、(1)全ゲノムシーケンス解析により挿入位置を明らかにしており、●●●コピーの発現カセットの挿入を確認しております。

(2) ORFの有無等に関する事項です。BSY0007株の挿入部位から、前後1,000bpの塩基配列と挿入遺伝子の塩基配列について解析をした結果、●●●です。

また、BSY0007株のORFの検索を行ったところ、30アミノ酸以上のORFが●●●同定され、これらについて、*E-value*を10未満としてデータ検索を行った結果、有害作用を持たないと判断されました。また、80アミノ酸で35%以上の相同性を持ち、かつ連続する8アミノ酸が一致する既知のアレルゲンは確認されておられません。

続きまして、22ページの第6、製造原料等に関する事項ですが、製造原料等はいずれも試薬あるいは食品／飼料グレードのもので、これまで安全に使用されてきた実績があるとしております。

第7、遺伝子組換え飼料添加物に関する事項です。

1、諸外国における認可ですが、23ページの表9に示すとおり、A2PフィターゼはEU、オーストラリア、ニュージーランド等で承認、販売されております。

続きまして、2、組換え体の残存に関する事項です。A2Pフィターゼ製造原体中にBSY0007株由来のDNAが残存していないことをPCR法により確認しております。

24ページ目、3、非有効成分についてです。

25ページの表10-1にA2Pフィターゼ製造用原体の重金属及びサルモネラ、表10-2に各製剤の重金属、カビ毒、ダイオキシン類を分析した結果を示しており、いずれも我が国の配合飼料の管理基準及びEUの保管飼料の上限基準を満たしています。また、ラットを用いた毒性試験を実施しており、ラットに対して毒性作用を示唆する影響はありませんでした。

続きまして、26ページ目を御覧ください。

4、精製方法及びその効果に関する事項ですが、要旨では、27ページの図9を示し、最終生産培養液及び精製後の製造原体について、SDS-PAGEのCBB染色画像を用いた濃度解析による確認の結果、純度は●●●%以上であったとされていますが、図9ではピークが2つ確認できるため、それらについても説明するように修正を求めました。

その結果、机上配付資料1の27ページ、28ページと書かれたところになるのですけれども、28ページからになります。糖鎖修飾あり、糖鎖修飾なしの2つのピークが確認され、●●●と修正しております。

また、*Endo H*処理により、糖鎖を分解すれば単一ピークになることから、製造用原体中のA2Pフィターゼが高い純度であることが示唆されたという追記をしております。

要旨の27ページにお戻りいただきまして、5については記載のとおりでございます。

28ページの第8として、(1) 組換え体由来の新たな有害物質が生産され、肉、乳、卵等に移行する可能性につきましては、そもそも新たな有害物質が生産される可能性はないとしております。

(2) 遺伝子組換えに由来する成分が畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性は、一般的に、挿入された遺伝子や挿入遺伝子によって生産されるタンパク質が畜産物に移行するという報告がないことから、A2Pフィターゼが移行して有害物質に変換・蓄積される可能性はないとしております。

(3) 遺伝子組換えに起因する成分が家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質を生産する可能性については、フィターゼの給与により、鶏、豚、養殖水産動物の代謝系に作用するという報告がないことから、新たな有害物質を生産する可能性はないとしてございます。

説明は以上になります。

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、先生方から御意見をいただきたいと思っております。大部ではございませんので、どこからでも。

これは宿主が*K. phaffii*というちょっと聞きなれない菌なのですが、これは要するに昔の*Pichia pastoris*、高分泌酵母でございまして、これが*K.pastoris*に名前が変わって、それから*K. phaffii*に変わっているという経緯がございます。

8ページの既指定の6-フィターゼのものが5つありまして、一番下の*K.pastoris*でAppA2、これが基本的に今回のものとおおむね同じものでして、ここに出てくるA2Pフィターゼについて、17個アミノ酸の変異が入ったものが今回の申請のものということになります。

この点については、これが9ページにありまして、既存のものと従来のもの、これは至適pHとかはあまり変わっていないように見えるのですが、それでも高温で酸性領域に至適がむしろ来ていて、それから高温耐性で、この辺が今回の申請のものでございます。

これを見ていて気がついた点がありまして、これは先ほど事務局から説明もございましたけれども、一つは、これは染色体に組み込むところで大規模な染色体の改変が起こっておりまして、●●●の一部がごそっと入れ替わっております。それから、●●●がある点が指摘されております。

それから、27ページに挙げましたバンドが2本見えるじゃないかということについて、これもあらかじめ問い合わせた結果、回答が来ておりまして2本ともフィターゼである。この違いは糖鎖によるもので、これを証明するデータも御説明いただいております。

こういったところなのですが、本品は食品ではなく飼料でございますので、アレルゲンとかはさほど問題にはならなくて、蓄積、移行する可能性のある毒性物といったもの、急性毒性、反復毒性があるようなものが対象となります。

先生方、何かございますでしょうか。

〇〇〇、何か付け加えること等はございますでしょうか。

〇〇〇 〇〇〇です。

事前にある程度指摘して修正されておりますので、特にはないですけれども、22ページの製造用原体というところにその他でメタノールというものが出てくるのですけれども、たしか培養中にメタノールを入れて、培養期間中にメタノールは全部使われますという説明を私自身は飼料の委員会で受けた記憶があるのですけれども、その点については、今日おいでになっているのだったら一応確認してもいいかなと思いました。

〇〇〇 ありがとうございます。直接聞くのがよろしいかなと思います。

私も●●●がどういったもので、どのような欠失であったのかを聞いてみようと思えます。●●●ですので、だからといってどういうことが起こるといってわけではありませんが、●●●という説明はいただきたいなと考えております。

先生方、ほかにございますでしょうか。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 これは添加物ですけれども、資料の中で鶏や豚のほかに魚類といいますか海産物があったのですが、これは特定のものとは別に何かしているのでしょうか。聞いてみていいですか。

〇〇〇 魚類でこんなものをどうやって使うのか、確かに気になります。直接先生から聞いていただけますか。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 飼料ということもございますし、また、海外で販売の実績もございますので、さほど問題ないかなと思います。

〇〇〇あたり、せっかくですから、私はあまり問題があるように見えなかったのですが、



先生はいかがですか。

〇〇〇 私も特に問題はないと思うのですけれども、気になったのは、先ほどの〇〇〇の御指摘で、28ページの最後の2行目に養殖水産動物の代謝系という言葉がいきなり出てくるので、これは何か根拠があるのかというところだけでした。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、早速申請者をお呼びしたいと思います。その場で何か思いつかれたことなどがございましたら、その場でお聞きいただければと思います。

では、申請者をお呼びください。準備ができるまで少しだけ休憩になります。

(休 憩)

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。

自己紹介をお願いいたします。お名前と会社名だけで結構です。

〇〇〇 アルビスの〇〇〇といたします。よろしくお願いします。

〇〇〇 株式会社アルビスの〇〇〇と申します。よろしくお願いします。

〇〇〇 株式会社アルビスの〇〇〇です。よろしくお願いします。

〇〇〇 Huvepharma Japan株式会社の〇〇〇と、私、〇〇〇が参加してさせていただいております。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 よろしく申し上げます。

〇〇〇 では早速、単純な遺伝子の導入の割には結構大きな染色体の改変が起こっているようなのですが、●●●はよく分かりました。

●●●という御報告なのですが、具体的に●●●があったのか。それによって宿主の性質等に影響は出得るものなのかどうか、分かっている限り御説明いただければと思います。

〇〇〇 ●●●のものは、資料の19ページの図5に書いてあるとおりなのですが、実際にこれがどのようになったかというのはよく分かっていないと思うのですけれども、全ゲノム解析をしてこういう形だったということになります。

〇〇〇 だからといって、すぐ安全性どうこうではないかとは思いますが、全ゲノム解析をやっているのであれば、ここの●●●に関するもう少し詳しい情報は握っておられるはずだと思いますので、後ほどでいいのでこれは御報告いただけますか。

〇〇〇 分かりました。では、後ほど報告させていただきます。

〇〇〇 ありがとうございます。

では、〇〇〇、培地のメタノールの件についてお願いします。

〇〇〇 申請書の22ページの表8に製造用原料というのが出てまいりまして、そこにその他でメタノールというのがあるのですけれども、これはメタノール資化菌なので、メタノールを培地に添加しているのだと理解しましたが、このメタノールは最終の製品とか最終産物、もしくは培養が終わった時点とかでなくなっているのか、精製の途中で全部抜けて

いるのか、そこら辺はどのように。

〇〇〇 これはこの報告書に入れていないのですが、最終的に全て資化されていまして、残っていないということを確認してあります。

〇〇〇 それであれば問題はないかと思えますので、了解しました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、使い道の件について御質問をお願いいたします。

〇〇〇 お伺いいたします。

飼料添加物として魚類にも使うようなことが書いてあったのですけれども、どういった魚などを考えていらっしゃるのでしょうか。といいますのは、丸ごと全部食べてしまうような魚を考えているのか、筋肉だけ食べるような魚を考えていらっしゃるのか。

〇〇〇 この資料を作ったときには養殖水産動物もターゲットにしていたのですが、このフィターゼについては養殖水産動物についての安全性などをまだ評価しておりませんので、この部分は後ほど削除させていただければと思います。対象動物は豚と家禽という形になります。

〇〇〇 分かりました。ありがとうございます。

というのは、畜産物のと書いてあって、魚類のことは書いてなかったのでお聞きした次第でした。

以上です。

〇〇〇 申し訳ございませんでした。

〇〇〇 ありがとうございます。

せっかく申請者はお見えになっています。ほかにお聞きしたいことなど、どなたかございますでしょうか。よろしいでしょうか。

お疲れさまでした。ありがとうございました。以上です。御退室いただければと思います。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、議論を再開したいと思います。

まあまあ答えは得られまして、欠失の件ですが、後から報告していただけるということですし、この菌体そのものもアメリカではブロイラーの餌に使われているくらいで、●●●ということであれば、●●●特に安全性に懸念はないのではないかと私は思います。

ほか、先生方、この件、何か御意見、御疑問の点等はございますでしょうか。

〇〇〇、どうぞ。お願いします。

〇〇〇 私の聞いたところで、海産物といいますか、魚介類は今考えていないから削除しますということだったので、この場はいいのですが、今回のにも畜産物の肉にはと書いてあるのですが、魚類が出てきたときに、魚の肉には移行しないのかというのが評価の仕方に沿っていくとよく分からないところがあったので、これからちゃんと考えたほうがいい

のではないかなと思って申し上げます。今では畜産物の肉には行かないと書いてあったので、では、魚類の肉には行くのだろうかということになるのですが、タンパク質は移行しないというのは畜肉では分かっています。でも、魚類は行かないのか分かっているのだろうかということが分からなくて不安なのです。

それで、魚などでも、例えば赤身の魚というのはキサントニンでもカルチノイドでもそういうものが移っていった色がつきます。それは低分子だから、高分子なら行かないということが分かっているのだったらいいのですが、でも、それは筋肉の話で、魚の場合、丸のまま食べるのがあります。フナでも何でも養殖しているもので、かつ、内臓まで全部食べてしまうもの。そういうところはどういうふうに安全を確認してあったのだろうか。鰻などだって肝吸いだとか肝焼きと言って、胃でも肝臓でも食べますね。そういうところにどれだけ蓄積されているかというのはちゃんと調べてあるのだろうかということがやはり気になります。出荷するときは前日から普通餌はやらないようにしていますので、胃の中には残っていないとは思いますが、一応食の安全だったら確認ができるような表現にしたほうがいいのではないかと思います。

この評価の仕方というのは、たしか5~6年前に肉に移行しないと何か何とか、こういうところを見ればいいというのを決めたと思うのですけれども、魚類などもこれから出てくると思いますので、こういう海産物の場合、イカ、タコ、エビまで含んでどういう書きぶりにしたらいいかというのを考えておいたほうがいいかなと思いました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

おっしゃるとおり、動物の場合と魚類の場合と可食部位が異なりますので、当然移行の可能性も変わってくるわけですから、今回は削除ということで、その条件が守られる限りはいいかと思うのですけれども、同じものでも対象と使い道が変わってくれば当然評価の仕方は変わってくるわけで、これは事務局ではどういう扱いになっていましたか。

〇〇〇 魚介についてはこの中に書かれていないので、あくまでも畜肉について書かれております。

〇〇〇 みたいです。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 平成16年5月6日食品安全委員会決定として「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全評価の考え方」というものが出ていますので、検索すると出てきますから、そこには今のような魚介類のことは詳しく書いてなかったもので、前回評価したものにも魚の資料が出てきたので、今後考えておいたほうがいいかと思います。

今回の●●●と書いてありましたが、●●●を見ると、日本と同じ食べ方をしているのは●●●ぐらいしかないのです。あとのヨーロッパの国などは、みんな養殖しても食べるのは筋肉のところなので、全部丸々食べるなんていうのは●●●と日本ぐらいだと思いますので、ただ、●●●はオーケーになっていますけれども、日本はどういうふ

うにするかをしっかりしておきたいと思いました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

これは飼料として用いる飼料対象としてというのを、食品安全委員会として安全性を確認したという内容には使い道の飼料の範囲というのもちろんと明記されるのですか。つまり、それ以外のものに使ったら違反だと摘発できるの。

〇〇〇 ありがとうございます。

後ほど評価書案を御説明するときに併せて御説明をするつもりだったのですけれども、評価書の中にも、今は要旨に合わせまして、このまま審査が進めばということだったので、**「鶏、豚及び養殖水産動物の代謝系に作用するという報告はないことから」**という記載をさせていただいておりました。

ただ、今、〇〇〇から御指摘いただいたような内容について、本当に精査ができていのかどうかというところは少し疑問が残ります。申請者も今回の申請からは養殖水産動物を削除するということですので、評価書は鶏、豚の代謝系にという形で養殖水産動物がない形で記載することになると思います。

〇〇〇 そこは重要だと思いますので、評価書では魚は除いて記載していただければと思います。

〇〇〇、取りあえずのところはこれでよろしいでしょうか。

〇〇〇 今回はこれで大丈夫です。

〇〇〇 先生方、ほかにございますでしょうか。

それでは、畜肉に限ればということで、本品に関しては安全性については問題ないと判定してよろしいでしょうか。先生方、意思表示をお願いいたします。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、この件につきましては安全性に特に懸念はないと判定させていただきます。

評価書案の審議に入りたいと思います。よろしくお願ひします。

〇〇〇 評価書案について説明をさせていただきます。右上に資料と書かれた食品健康影響評価に関する資料の2ページ目からが本フィターゼの評価書案になります。

まず、5ページ目を御覧ください。

I. 評価対象飼料添加物の概要です。65行目から、本飼料添加物は*K.phaffii* BG10株を宿主として、*E.coli* B株由来の改変フィターゼ遺伝子を導入して作成したBSY0007株を利用して生産された6-フィターゼです。比較対象とした従来の飼料添加物は*K.pastoris*を宿主として、*E.coli* B株由来のフィターゼ遺伝子を挿入する等の組換え体を利用して生産された6-フィターゼであり、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令で成分規格が設定されています。

72行目からプロモーター、ターミネーター、分泌シグナルについての記載をしておりま

す。

75行目最後からになります。導入遺伝子は宿主ゲノムの1か所に組み込まれ、ゼオン耐性により選抜されます。

78行目からⅡ. 健康食品健康影響評価です。

1の(1) 宿主であります*K.phaffi*は、ブロイラー用のタンパク質原料タンパク質原料として、米国において飼料中で10%を超えない配合量での使用が認められています。また、*K.phaffi*が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル1に相当します。

(2) A2P遺伝子の供与体である*E.coli* B株は、病原性や有害物質の生産がないことが報告されています。A2P遺伝子は*E.coli* B株由来のフィターゼ遺伝子の塩基配列に人工的に変異を導入して合成されています。

(3) A2Pフィターゼ製造用原体には生産菌由来の導入遺伝子は含まれていないことを確認しています。A2Pフィターゼは飼料添加物として欧州等で既に使用されており、安全性の問題はこれまでに報告されておられません。

続きまして、90行目から2です。91行目、BSY0007株は、遺伝子導入部位の制限酵素による切断地図が明らかになっていること、並びに挿入DNA及び接合領域における相同性検索の結果から、新たな有害物質が生産される可能性は考えられません。また、一般的に挿入された遺伝子または挿入遺伝子によって生産されるタンパク質が肉、乳、卵等の畜産物中に移行することは報告されておらず、本飼料添加物が肉、乳、卵等の畜産物に移行し、有害物質に変換・蓄積されることは想定されません。なお、ここからにつきましては少し修正を加えさせていただきます。現在、水産動物も書いておりますが、「フィターゼの給与により鶏及び豚の代謝系に作用するという報告はないことから、家畜の代謝系に作用し新たな有害物質が生産される可能性は考えられない」という形にしたいと思います。

以上のことから、本飼料添加物については、「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」に基づき評価した結果、改めて「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」に準じて評価する必要はなく、当該飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全上の問題はないと判断しましたということで記載したいと思っております。

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。

それでは、養殖水産動物に関するところは削除するというので、ただいまの評価書案につきまして御質問、御指摘等がございますでしょうか。よろしいでしょうか。

〇〇〇。

〇〇〇 1点よろしいでしょうか。

今までの評価書との間での整合性の問題等もあると思うのですが、今までは動物種を限った書き方はしていませんか。というのは、まず基本的なところで、これは〇〇〇

にもお伺いしたいところなのですけれども、飼料というのは特定の家畜に一対一対応的な評価をされているのか。すなわち、さっき〇〇〇がおっしゃられたところで、まさしくそのとおりだと思うのですけれども、飼料と言ったらどんなものに食べさせてもいいという形で農水省の飼料の部会では考えて評価されているのか。それとも、これは鶏用、豚用ということで、魚ではなくて、これは羊に使ってははいけませんよということだってあり得ますよね。そういうように、対応する動物種を規定しているのかということが一つポイントになると思うのです。というのは、それがこちらにもひっかかってきて、先ほどの評価書の中に入ってきた鶏、豚とすると、では、羊は知らない、評価していないということを手首すると言ってしまうことになるので、今までそこところはそんなに詰めて話した記憶が私はないのですけれども、気をつけないとならないのではないかと思います。最初にまず〇〇〇から餌とはという定義を教えてくださいませんか。

〇〇〇 なかなか痛いところを突いてこられましたけれども、●●●という形で認めているというのが実情です。

さっき〇〇〇に言われてはつとしたのですけれども、確かに魚は丸ごと食うケースがあるなというのは今思ひまして、それは、多分MMEの概念では入っていないなど。Meet, milk, eggなので、基本的には食する部位は筋肉、卵、牛乳という形で評価してきたので、胃袋に入ったままのものを丸ごと食う魚の場合は、MMEの概念からいうと、そう言われれば入っていないなどさっき指摘されて思っています。確かに〇〇〇のおっしゃるとおり、大体出荷するものは1日前とか2日前から絶食をかけますので、基本的には残らないのですけれども、ただそうはいえ、言われてそういえばはつとしたというところは確かにありまして、そうすると、●●●。

仮に胃袋にそのまま丸ごとタンパクが残った場合を食べてしまった場合は、やはりアレルギーというのは関係するかなとさっき思った次第で、そうすると、MMEのときには、魚を対象にする場合だったらアレルギーはやはり見ないといけないのかなとぼんやり思っていたところでした。

答えになっているのだから、なっていないのだからよく分からない回答でしたけれども、すみません。以上です。

〇〇〇 〇〇〇、確認させていただきたいのですけれども、ある意味でいくと、この委員会というのは、まず農水省の飼料のほうに先に通っていて、いいよねということがあった上でここに来ているというのが私のイメージなのです。そうしたときに、〇〇〇の委員会のほうが対象動物をある意味明確にしていけないということがあるということは、こちらとしても頭に入れておいたほうがいいのかということが第1点。

魚の餌はそちらの委員会ではかかるのか、かからないのか。ここを明確にしておいていただくほうが今後捌き方が明確になると思うのですけれども、いかがでしょうか。

〇〇〇 まず、対象動物は申請者から上がってきたものについて検討するという形になっています。魚の餌は当然上がってきます。魚の専門家もいらっしゃいますので、そこで魚

の餌という観点で議論はされます。ですので、●●●という形で出てきますので、特定の狂牛病関係のもの以外では範囲は基本的には指定されない形になっているかと思います。○○○でも、やはりそういう意味でいくと、動物の餌の○○○の委員会のほうの結果を受けた格好でこちらがやる。例えば魚の餌だったらやはり魚の餌ということでまずそちらに行くはずなので、それを受けてこちらが評価を次に考える、確かにMMEの概念を含んだ形の今の考え方になっているのは事実であるので、そういう意味でいくと、そこは気をつけなくてはいけないなと思うのですけれども、少なくとも今回の評価書において家禽類を鶏、豚というようにこちらの評価書の上で断定して書いてしまうというのは、今までと整合性が取れないし、ちょっとややこしいことになりそうな気がするので、そこはさらっと今までとおりではいかがでしょうか。

以上です。

○○○ ありがとうございます。ややこしい問題はありそうですね。

○○○、お願いします。

○○○ 鶏と書いた場合に、例えば砂肝は胃の一部だと思うのです。なので、魚以外にもそういった部分も考慮する必要が生じてしまうのかなと思いました。

以上です。

○○○ 一筋縄ではいかない議論があるようですね。

○○○、お願いします。

○○○ 私もそれは気になって、いわゆる焼き鳥で食べているようなハツやタンなどいろいろなものはみんなそうなのです。ですから、内臓がみんなそれに入ってくるはずなのです。

だから、畜肉の場合、肉には移行しないという肉というのは内臓を含んでいるのかどうかというのが、今まで肉に移行していないことが確認されていると言ったけれども、さっきちょっと申し上げましたが、魚は水をきれいにするために、出荷する前に1~2日は給餌を切るわけです。だから、中には残っていないかもしれないと考えると、畜肉のものでも最後は餌をやらないで出荷しますから、中はきれいになっているので、でも、内臓は食べる。

そうすると、内臓でも肝臓だとかああいうところはかなり蓄積しますので、筋肉とは違うなという気はいたします。だから、そういう意味で、今、○○○がおっしゃったように、砂肝は筋肉だからまだいいのですけれども、鰻の場合は肝臓などを食べるときには取ってしまいますが、蓄積するような内臓も結構食べているということは考えられます。

以上です。

○○○ 割と正面から議論すると、当委員会だけでは済まなくて、農水省を巻き込んで安全性確保のための議論をしていく必要がありますね。

今回の議論の件については農水省の飼料の関係の方に必要な情報を伝えていただけますか。では、事務局から必要な情報は伝えていただくということで、本申請についてはこれ

でよろしいでしょうか。

ありがとうございました。

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。この件についてはまたいずれしかるべく議論をしていくことになるかと思っておりますが、どういう形にしていったらいいのか、今、見当が付きませんので、後日の宿題にさせていただきます。

それでは、JPBL012株を利用して生産されたプロテアーゼ、これも新規の品目ですが、審議を行いたいと思っております。

新規の品目ではありますが、よろしくお願ひいたします。

〇〇〇 それでは、御説明させていただきます。

ノボザイムズジャパン株式会社から提出されましたプロテアーゼについてです。

それでは、申請資料の2ページをお願いいたします。

まず、従来の添加物でございますが、第1-1- (1) としまして、名称はプロテアーゼ。反応特異性はタンパク質を分解するものでございます。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、*aprL*などのサチライシンはダイズ及び魚類由来のタンパク質の可溶化のために用いられております。加工食品の場合、風味を補うためにアミノ酸を含む調味料、またはタンパク質、加水分解物が製造に使用されており、一般的にタンパク質、加水分解物はタンパク質を酸または酵素による加水分解物を通じて生産されます。ダイズ、コムギなどの植物性タンパク質から生産されるタンパク質加水分解物はアミノ酸液と呼ばれております。

次のページに行きまして、(4) 摂取量でございます。製造の際に*aprL*が用いられる可能性がある食品として、その他の調味料が該当すると考えられ、それを基に算出した結果、我が国における体重1kg当たりの最大摂取量は1.12mg TOS/kg体重/日でございます。

続いて第1-2、宿主等の項目ですが、宿主は*B.licheniformis* Ca63株でございます。

(2) 挿入DNA供与体の由来ですが、こちらは次の4ページ、表1に記載されているとおりです。*aprL*遺伝子は*B.licheniformis* Ca63株由来で、そのほかにプロモーターやターミネーター等についても記載をしております。

次の5ページをお願いいたします。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法です。こちらは図1に示しておりますとおり、●●●●遺伝子座にマーカー遺伝子を挿入した後に●●●●遺伝子座に対して*aprL*遺伝子発現カセットを挿入しております。さらに、●●●●遺伝子の1塩基置換が行われました。

このことについてですが、6ページ一番下のパラグラフを御覧ください。

●●●●遺伝子はRNAポリメラーゼβサブユニットをコードする遺伝子であり、この1塩基置換により●●●●に置換しております。その結果、JPBL012株では抗生物質であるリファンピシンに対する耐性が付与され、*aprL*への産生能等が向上しております。



続いて、7ページの上ですが、●●●遺伝子の突然変異によって付与されるリファンピシン耐性は、リファンピシン自体を不活性化するという作用機作ではなく、リファンピシンのRNAポリメラーゼβサブユニットへの結合を阻害するというものでございます。この1塩基置換は自然界の微生物も突然変異で有していて、この突然変異によってリファンピシン耐性を獲得することも一般的に知られております。

少し飛びまして、13ページをお願いいたします。

1-6- (1) ですが、表4において本添加物と従来のaprL製品の比較をしております。酵素としてアミノ酸配列や残基数は同じもので、至適pH、温度についても記載のとおりでございます。販売実績としては20年以上あるものでございます。

(2) では組換え体と宿主の相違点について記載しておりますが、ここで机上配付資料2を御覧ください。

机上配付資料2は2ページありまして、下のほうにページがあるのですが、13ページのほうを御覧ください。

まず1-6の (1) ですが、こちらは黄色の部分について修正をしてもらいました。1-6- (1) は添加物の相違点なので、生産菌が異なるということではなく、有効成分についてアミノ酸配列が同じだという旨に修正してもらっております。

続いて、13ページの1-6- (2) の一番下の黄色のハイライト部分なのですが、もともとaprL遺伝子は内在性のものということで、Ca63株自身も有しております。これに対しまして、●●●遺伝子座に遺伝子発現カセットを挿入しているにもかかわらず、●●●であったということについて申請者に問い合わせたところ、黄色のアスタリスクが書いてある部分が追記されてきました。こちらはほかの添付資料等では全然記載のない内容になるので、●●●遺伝子は、●●●であるという文言を追加してきております。

それでは、ファイルのほうにお戻りください。

第2及び第3は記載のとおりでございます。

少し飛びまして、19ページをお願いいたします。

4-2- (3) 挿入遺伝子の機能についてです。aprL遺伝子がコードするaprLはサチライシンと呼ばれるセリンプロテアーゼの一種で、活性中心にセリンを有するエンドペプチダーゼでございます。タンパク質のペプチド結合をエンド型で分解し、ペプチドやアミノ酸を生成させる酵素の総称であります。

アミノ酸配列は図6に示したとおりでして、●●●です。アミノ酸配列から推定される分子量は約●●●kDaということですが、SDS-PAGE分離に引き続くCBB染色による分析では●●●kDa前後で検出されております。

次の20ページをお願いいたします。

3) まず、①人工胃腸液に対する感受性ですが、aprLは既に日本でも20年以上の販売使用実績があり、aprL製品について食物アレルギー誘発性を示唆する報告はなく、従って、aprLには十分な食経験があると考えられ、人工胃腸液での消化性試験は実施していないと

ということです。

②加熱処理に対する感受性ですが、こちらは次の図7に示してあるとおりです。aprLをpH7.0で30分処理した後、活性を測定した結果、80℃の処理で完全に失活することが明らかとなりました。

続いて、4) 既知のアレルゲンとの構造相同性についてです。aprLのアレルギー誘発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。この検索にはFARRPのversion 21を用いております、データベースとしては最新のものです。

まず、①の条件ではaprLと部分的に相同性を示す既知のアレルゲンが検出されましたが、aprLと相同性を示しました既知のアレルゲンは、次の23ページに表6がございますが、この15、26、28を除き、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り、当該ORFと部分的な相同性を示した15、26、28のアレルゲンについても連続した8アミノ酸配列の完全一致は認められない結果となりました。

次に22ページをお願いいたします。

②の条件ですが、aprLと8アミノ酸配列で完全に一致するアレルゲンとして表6中の15、26、28を除いたアレルゲンが検出されましたが、これらの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ということでした。

以上のことから、aprLは食物アレルギー感作性についての懸念が低いものと考えられるとしております。

続きまして、第4-3から4-6については記載のとおりでございます。

少し飛びまして、32ページをお願いいたします。

抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項ですが、遺伝子導入ベクターpJPV048はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、ループアウトで脱落するため、宿主の染色体には導入されません。また、●●●遺伝子座に導入されたマーカー遺伝子発現カセットにはネオマイシン耐性遺伝子が存在しますが、遺伝子導入ベクターが挿入された後のループアウトによって脱落いたします。したがって、JPBL012株には抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在せず、このことはシーケンス解析により確認されております。

続いて第5、組換え体に関する事項です。

5-1は記載のとおりです。

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ており、その結果、●●●遺伝子座にaprL遺伝子発現カセットが●●●挿入されていることが示されております。

続いて、少し飛びまして40ページをお願いいたします。

5-2- (2) としまして、遺伝子導入におけるORFの有無について記載がされております。6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンで挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義して検索を行いました結果、各遺伝子座ではそれぞれ申請書に記載のと通りのORFが

検出されております。

これらのORFと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、41ページがアレルゲンとの相同性検索です。

1) の条件で検索を行いました結果、いずれの遺伝子座においても挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位をまたいで新たに生じるORFの中で既知のアレルゲンと一致するORFは検出されませんでした。

続いて、2) でございますが、こちらについても一致するORFは検出されなかったということです。

続いて、42ページをお願いいたします。

既知の毒性タンパク質との相同性検索ですが、*E*-valueを $10^{-5}$ として指標にして検索を行いました結果、一番下の●●●遺伝子座において●●●というものがヒットしましたが、●●●ということでした。

なお、43ページに続きまして、●●●遺伝子においてaprLをコードするORFの1つと部分的に相同性を示す毒性タンパク質が検証されましたが、これらのタンパク質はプロテアーゼの機能を有するタンパク質であり、単独での毒性が報告されているタンパク質ではございませんでした。

以上の結果から、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、aprL製品中にアレルギーを誘発性または毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられるとしております。

続きまして44ページ、第6の項目です。こちらでは製造原料等に関する事項が記載されております。製造原料等は全て長年安全に使用されてきた実績がある旨の記載がされております。

続いて45ページ、まず第7-1、外国における認可の状況でございます。まず、aprL製品は日本を含む世界各国で20年以上にわたって販売されておおり、製パンの工程で加工助剤として用いられています。

8行目からなのですが、こちらは申請者に最新の情報も含めて再度確認を取りました。修正したファイルはないのですが、まず、デンマークにおいて承認されたのが正しくは●●●ということでした。また、欧米での現在の予定についても聞いたところ、●●●ということ聞いております。

続きまして46ページ、第7-2でございますが、結論のところにありますとおり、aprL製品には生産菌株由来のDNAが残存しないことを確認しております。

7-3、非有効成分ですが、試験バッチの分析と我が国の食品添加物の規格基準に定める規格値をそれぞれ表15で記載しております。いずれの項目についても我が国の基準を満たす結果となっております。

続いて、第7-4です。5行目からになりますが、aprL製品のaprLタンパク質純度が高いこ

とが確認されているということです。こちらは社内文書6のほうに具体的な数値も併せて書かれておりまして、そちらの社内文書6を見ると約●●●%程度の数値だということが記載されております。

続いて、7-5、第8については記載のとおりでございます。

申請資料の説明は以上です。

○○○ 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をいただきたいと思えます。

今月のこの申請は新規の品目ではございますが、先月とても似たような話を聞いたような気を思い起こされた先生は多かったろうと思えます。

先月のもノボザイムズジャパンで、宿主は*Bacillus licheniformis* Ca63株で、JPBL007株を用いた $\alpha$ アミラーゼという申請でございました。

今回はプロテアーゼ、*aprL*でして、遺伝子組換えに使っている手法はほとんど同じ、●●●などのマーカーを導入しておりまして、今回●●●を使っているところが新しいのと、それから、●●●遺伝子座です。これをインテグラーゼを使って組み換えまして、●●●遺伝子座にそれぞれ*aprL*遺伝子の発現カセットを導入しています。

今回のこの*aprL*というのは宿主自身のものでして、どこが組換えなのかというと、プロモーターが強力な3種混合のP3プロモーターでして、Ca63株、宿主自身の由来と*B.amylolyquefaciens*遺伝子の由来のと、何と*B.thuringiensis*の*cryIIIa*プロモーターの継ぎ合わせで作っているもので、この点は完全に外来遺伝子ということにもなりますので、御審査ということになっております。

という形で、このような発現しているものそのものがもともとの*B.licheniformis*で作るものである。また、審査の実績もあるということで、今回、人工胃液、人工腸液のテストはやっておりません。加熱処理のデータはあります。

ということなので、サチライシンについては電気泳動したときにバンドの位置がずれるというのは以前からございまして、今回のも普通に電気泳動すると●●●kDaのところにはバンドが来るはずなのですが、●●●kDaのところにはきておりまして、これは万一のセカンドプロセッシングの可能性はないだろうねと問い合わせしてみたのですが、そういうことはないというのは確認しておるといふ返答が来ております。

それから、途中の使っている遺伝子座について、これは先ほどの事務局からの説明で机上配付資料のところで黄色いマークで御説明がございましたとおり、細かいところを修正していただいております。

また、内在性の*aprL*遺伝子が●●●あるはずだから、これは●●●になるのではないかと実にごもつともな質問を事務局は気がついてくださいます、そうしたら、●●●と今更ながら質問の回答がございまして、●●●という、どうすればそうなるのだと、実はその辺は不思議と言えれば不思議なのですが、結果的に●●●ということでのこの点は間違いないという回答が来ております。

先生方、大部な申請書ではございませんので、どこからでも結構です。御質問、御疑問の点等はございますでしょうか。

〇〇〇、今回は前回のとアミノ酸配列が変わっていないということで、人工腸液、人工胃液のテストをやっていないということなのですが、これでよろしいでしょうか。

〇〇〇 食品添加物ということでもありますので、今まで既に配列があるということでもよろしいかと思うのですけれども、あとは1点、順序的に純度が高いということが言えればと思いました。19ページとかにCBBの分析で●●●kDa付近のもので●●●%という純度が社内文書6のほうには書かれているのですが、先ほど座長もおっしゃられたのですけれども、●●●kDa付近にタンパク質が見えるということなのですが、それが●●●のですけれども、これをサチライシンと同定した根拠的なことを示してもらえればと思ったのですが、例えば社内文書6には●●●ということもあるのですが、●●●kDa前後のバンドがサチライシンだということを示してもらえれば順序的にはいいのかと思いました。

〇〇〇 ありがとうございます。

●●●というのは資料のどれにありましたか。

〇〇〇 社内文書6なのですけれども、ちょっと待ってください。

電気泳動の図としては6にしか書かれていなかったかと思えます。

〇〇〇 Figure1というものです。確かに●●●、こんなものもあってセカンドプロセッシングはというのもあったのですけれども、ここは必要であれば聞いてみる。販売実績等はあるので、プロセッシングがあってもどこが悪いというわけではないのですが、これは聞くだけ聞いてもいいかなとは思っています。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 〇〇〇、人工胃液、人工腸液の件はそのほうがよろしいですか。

〇〇〇 大丈夫だと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほかに。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 〇〇〇です。

ささいなことなのですが、書き間違いだと思うのですが、13ページの表4に、さっきさらっと読まれたのですが、本遺伝子組換え添加物と従来の製品との販売実績は「20年以上（日本を含む世界各国）」と書いてあるのですけれども、本遺伝子組換え添加物はまだ販売していないから、これは多分右側だけの間違いですよ。

〇〇〇 これはどうなのだろう。aprLそのものについては、この変異株は●●●遺伝子座に●●●入っているもので、この株そのものは正しいのだけれども、aprLは従来のaprL製品でアミノ酸配列は変わっていないものを販売しているという意味なのかなと思っていたのです。

〇〇〇 そう思ったのですけれども、この表4を見ると「遺伝子組換え添加物」というタ

イトルになっているのでまずいのではないかなと。

〇〇〇 確かにこの書き方だと、どちらかというと。

〇〇〇 違うことを言いたいのだったら、これは表の書き方は変えたほうがいい。作り方を変えたほうがいいのではないかと。

〇〇〇 私もそう思います。

これは確かに、今、先生が言われたとおりにも解釈できますので、疑問の余地のない書き方に改めていただくのが私もいいと思います。

〇〇〇 それだけでいいと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

先生方、ほかに。

●●●件とか、せっかくだから聞いてみようかとも思いますので、申請者をお呼びしようと思います。

ほか、今のうちに質問事項等、詰めておきたい点とか指摘事項等はございますでしょうか。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 またささいなことで申し訳ありません。

19ページ、さっき質疑応答でそのままずっと行ったのですが、図6のタイトルと真ん中の説明のところなのですが、図6のタイトルが「*aprL*遺伝子からコードされる*aprL*のアミノ酸配列」となっていて、中の遺伝子機能の真ん中ら辺の遺伝子機能のところは*aprL*遺伝子がコードするタンパク、*aprL*はとなっているのですが、下のタイトルの*aprL*遺伝子からコードされるタンパク質のアミノ酸配列というのは何だか変なのですが、これは何か意味があるのでしょうか。

〇〇〇 これは多分*aprL*遺伝子から推定されるとか何とかちゃんと書いていただかないといけないところですよ。

〇〇〇 ただ翻訳機か何かで書いたのをそのまま出してしまっただけで残ってしまったという感じなのかもしれません。ただ、きちんと書いていただければいいです。

〇〇〇 そう思います。

〇〇〇 では、以上です。

〇〇〇 これは事務局から申請者に指摘してちゃんと書くようにとちょっと怒っていたらと思います。

先生方、ほかに。

では、申請者をお呼びしてよろしいでしょうか。そんなに多大な疑問点というわけではないのですが、せっかく申請者が控えていただきますので、必要なことはみんな聞いておきたいと思います。

準備できるまで少しだけお待ちください。

(申請者入室)

〇〇〇 お忙しいところ、長らく待機いただきましてありがとうございます。

では、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 ノボザイムズジャパンの〇〇〇と申します。よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 ノボザイムズジャパンの〇〇〇と申します。よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 今回のこの*aprL*は既に販売実績があるということなのですが、13ページの表4の本添加物と既製品の比較のところを見ますと、この表のままで言いますと、本遺伝子組換え産物が20年以上（日本を含む世界各地）となっておりまして、日本で既に売れているのだったら今更申請する必要はないじゃんというふうにも読めるので、日本を含むということになっているということは、今回のJPBL012株ではない株で作った*aprL*は販売実績があるという意味でしょうか。

〇〇〇 表記が正しくなくて、おっしゃるとおり、従来のプロテアーゼの製品は20年以上の販売実績がありまして、本遺伝子組換え生産菌から作ったものではないです。すみません。修正させていただきます。

〇〇〇 誤解のないように修正をお願いいたします。

社内添付資料のFigure1でSDS-PAGEの絵がございまして。このバンドはすごくきれいでお手本みたいなSDS-PAGEの図なのですが、●●●ののですけれども、そういう可能性もあって、セカンドプロセッシングの可能性とかというのはないのかとお尋ねしたところでは、そういうことはなくて確認しているというお返事だったのですが、●●●のだけれども、それは何に起因しているのかとか、その辺は分かっておりますでしょうか。

〇〇〇 先ほどもお話ししたように、この製品は非組換え生産菌でも作っている成分でして、そのSDS-PAGEと一応同じなのですが、このSDS-PAGEでは●●●ということを確認しております。

〇〇〇 確認はとっておる。これは●●●ということなのですね。

〇〇〇 基本的に同じプロテアーゼで非組換え生産菌でやっているものはこのような感じでは見えていなくて、分子量的にもほぼ同じところに立っているのですけれども、このような●●●ような感じではなかったということでした。ただ、非組換え生産菌で作ったものについても質量分析で分析しまして、今回新たに作ったこの遺伝子組換え生産菌についても質量分析で確認しておりまして、●●●ということは確認しています。

〇〇〇 気のせいにしても●●●、そこは疑問と言えば疑問なので、もう一度調べて分かったら報告いただけますか。

〇〇〇 社内でまた確認しまして、回答を差し上げるようにいたします。

〇〇〇 よろしくをお願いいたします。

それから、*aprL*遺伝子は染色体中に●●●入っている。●●●いう御回答をいただいで、それはそれでいいのですけれども、●●●、実際そこがどうなっているのかというのは分かっているのでしょうか。

〇〇〇 遺伝子配列上はそこが欠失したということはシーケンス等で確認しています。実際にこれを欠失している理由は生産性を上げるためということとやっていますので、その点は、この生産菌の株、中間株は本添加物だけではなくてほかの添加物でも使われていまして、プロテアーゼが発現すると酵素が分解されてしまうので、その点、プロテアーゼ、●●●を欠失していることによって生産性が上がったことも確認されていますので、シーケンスだけではなくて実際に遺伝子が失活していることも確認しています。

〇〇〇 分かったような分からないような説明で、プロテアーゼを生産させるためにプロテアーゼを潰すと、プロテアーゼがどうなるのかよく分からなくて、要するに、●●●は自分自身で分解されるというのが懸念されて、それで潰したということですか。

〇〇〇 もともとこのプロテアーゼだけでなくほかの生産菌でも使っているところはありまして、この中間株なのですけれども、その中で、もともとこれはかなり新しい生産菌なのですが、古い酵素、ほかのプロテアーゼにはない酵素の生産性を高めるためにそもそも●●●という遺伝子がプロテアーゼを通常失活させていたということなんです。それで生産性が上がっていることを確認しているので、機能的にもプロテアーゼというのは失活しているというのは中間株等の検証でほかの生産菌でも確認されているところです。

〇〇〇 *Bacillus*で物を作るときには常にプロテアーゼとの戦いになりますので、プロテアーゼの欠失株を取るということそのものは不思議ではないのだけれども、この宿主、*B. licheniformis* Ca63株についてそういう記載は全然ございませんで、やはり野生株からこういう株を作って、その過程で何をやっているのかということは報告していただきたいなと思うのです。

〇〇〇 今回、●●●になりますので、関連しているような遺伝子でやはり記載をしていなかったというのは丁寧ではなかったと思います。今後はそういうことがないように記載をさせていただきたいと思います。

〇〇〇 この株についても、最初の野生株からこの株に至るところで、概略だけでどの遺伝子を潰したかとか、どの遺伝子が潰れているかということは、概略だけでも結構なのですが、これは御報告いただけますか。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 よろしく願いいたします。

*Bacillus*ですので、実際に使えるようにするにはいろいろやらなくてはならないというのは理解できますし、また、その過程で●●●に変異を入れてリファンピシン耐性になっているといった、この株のところで新しくやっていることについては非常に詳しく説明していただいているのですが、その前の最初に野生株のところからどういうことをやっているのかというところは必要な情報でもございますので、よろしく願いしたいと思います。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 先生方、ほかにございますでしょうか。よろしいですか。

では、お忙しいところ、ありがとうございました。以上でございます。



(申請者退室)

〇〇〇 退室が確認されましたので、議論を再開したいと思います。

*Bacillus*だからこの前も何かやっているのかなと思ったのですが、Ca63株のところからいつもスタートしていて、それより前のところ、多分どこかで一回野生株からCa63株になるところで、Ca63株というのは以前にも審査した覚えがありますので、その辺、確認はいたしますけれども、だからといってこの株が野放しで抜けていたというわけではなはずです。でも、申請書にはどういう手順でどういう株を作ったのかというのは記載していただこうかと思ひます。

先生方、ほかに御質問、御議論の点等はございますでしょうか。

物自体は安全性について懸念はないと思うのですが、そう判定してよろしいでしょうか。御意志の表示をお願いいたします。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 ありがとうございます。それでは、安全性には特に懸念はないと判定させていただきます。

では、評価書案の審議に入りたいと思ひます。事務局のほうからお願いいたします。

〇〇〇 それでは、評価書案について御説明いたします。

評価者案の束の7ページからがプロテアーゼでございます。

まず、こちらの12ページをお願いいたします。

I、概要でございます。本添加物は*Bacillus licheniformis* Ca63株を宿主としまして、宿主由来のプロテアーゼ遺伝子を導入することで作成したJPBL012株を利用して生産されたプロテアーゼでございます。本添加物は、セリンプロテアーゼの一種であるSubtilisinであり、ダイズ及び魚類由来のタンパク質及びペプチドをエンド型で加水分解する酵素として食品加工に使用されます。

続いて、II. 食品健康影響評価です。

まず第1の1の(1)ですが、名称はプロテアーゼ (Alcalase 2.4 L FG) でございます。

(2) 製造方法ですが、培養、除菌、精製等の工程を経て製造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、本申請添加物のプロテアーゼは、Subtilisinと呼ばれるセリンプロテアーゼの一種であり、ダイズ及び魚類由来のタンパク質及びペプチドをエンド型で加水分解する酵素として使用されます。加工食品の製造に用いられるタンパク質を用いるタンパク質加水分解物を生産する際、Subtilisinなどのタンパク質分解酵素が用いられております。なお、製造過程の製造工程の加熱処理においてaprLは失活いたします。

(4) 摂取量です。全ての「その他の調味料」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1.12mg TOS/kg体重/日でございます。

続いて、2の(1) 宿主ですが、*B.licheniformis* Ca63株です。

(2) DNA供与体の種名ですが、プロテアーゼ遺伝子の供与体は*B.licheniformis* Ca63株でございます。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、*aprL*遺伝子は*B.licheniformis* Ca63株由来のプロテアーゼ (*aprL*) をコードします。*aprL*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の遺伝子座に導入し、その際、一部の標的遺伝子座において遺伝子欠失が確認されております。なお、*aprL*の生産性を高めるため、宿主のRNAポリメラーゼβユニットをコードする遺伝子の1塩基を置換し、リファンピシン耐性を付与しております。

続いて、3、4、5については記載のとおりでございます。

続いて、6の(1)ですが、こちらは以前お送りしたのものから(1)は修正させていただきました。本添加物である*aprL*と従来の*aprL*のアミノ酸配列は同一であると記載しております。

続いて、(2) JPBL012株と宿主との相違点は、JPBL012株には*aprL*遺伝子が複数コピー導入され、プロテアーゼの高生産性を獲得している点、●●●遺伝子の塩基置換によりリファンピシン耐性を獲得している点、及び複数の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、第3. ベクターに関する事項は記載のとおりです。

続いて、第4でございます。

まず、16ページ、221行目をお願いいたします。クローニングまたは合成方法に関する事項ですが、*aprL*遺伝子は*B.licheniformis* Ca63株よりPCR法により得られております。

(2) は記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。*aprL*遺伝子がコードする*aprL*は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解し、ペプチドやアミノ酸を生成させる酵素でございます。

a及びbについては記載のとおりです。

続いて、c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性ですが、まず(a) 人工胃腸液に対する感受性です。*aprL*は我が国において20年以上の使用実績があり、従来の*aprL*とアミノ酸配列が同じであることから消化性試験は実施しなかったと記載しております。

(b) 加熱処理に対する感受性ですが、*aprL*の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH7.0の各温度帯で30分処理した後の活性を測定した。その結果、80℃の処理によって完全に失活することが示されたとしております。

続いて、d. 既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見です。*aprL*と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べるため、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、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複数のアレルゲンが認められた。これらの多くは吸入をばく露経路とする呼吸器誘発性アレルゲンであり、食物アレルゲンとして3種類のアレルゲンが検出されたが、*aprL*との間に連続した8アミノ酸配列の完全一致は認められなかった。一方、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が複数検出されたが、これらは食物アレルギーとして

は登録されていないと記載しております。

以上の結果及び*B.licheniformis*由来aprLを有効成分とするプロテアーゼ食品用酵素としての使用実績から、aprLタンパク質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。

3から6については記載のとおりでございます。

続いて、18ページ一番下、7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子についてですが、遺伝子導入ベクターpJPV048はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ち、染色体に挿入されますが、宿主のゲノムからループアウトに脱落しているため、生産菌株には抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことをシーケンス解析により確認しております。

続いて、第5. 組換え体に関する事項です。

1は記載のとおりです。

2の(1)ですが、*aprL*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、設計どおり挿入されていることが確認されております。

続いて、(2) ORFの有無ですが、挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレームの有無を調べる目的で、各標的遺伝子導入座における挿入DNAの5'近傍配列領域、並びに3'近傍配列領域におけるORF検索を行いました結果、6つの読み役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451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、複数のアレルギーが認められました。これらの多くは吸入をばく露経路とする呼吸器誘発性アレルゲンであり、食物アレルゲンとして登録されている3種類のアレルゲンが検出されましたが、*aprL*との間に連続した8アミノ酸配列の完全一致は認められなかった。また、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は認められなかったとしております。

さらに、既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために相同性検査を行いました結果、データベースの既知のタンパク質と相同性を示すORFが1個検出されましたが、相同性を示した箇所は内在性遺伝子の部分領域であり、獨性を有する可能性は低いと考えられた。なお、各遺伝子において*aprL*をコードするORFと部分的に相同性を示す毒性タンパク質が検出されたが、プロテアーゼの機能を有するタンパク質であり、毒性を有する可能性は低いと考えられたとしております。

第6は記載のとおりです。

続いて第7. 諸外国における認可の状況でございます。こちら先にお送りしたのから、最新の情報を踏まえまして修正をさせていただいております。*aprL*製品は、日本を含む世界各国で20年以上にわたり販売され、食品を加工助剤として用いられている。JPBL012株を利用して生産される*aprL*製品に関しては、●●●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、●●●と記載をしております。

続いて、2ポツですが、aprL製品に組換えDNAの残存がないことをPCR解析により確認しております。

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。

それでは、評価書案について御意見、コメントを承りたいと思います。細かい字句等の修正につきましては、お気づきでしたら後ほど事務局に伝えていただければと思います。

よろしいでしょうか。

それでは、さっきの●●●の件と、それから、Ca63株の、これは多分いつ審査したかとかという記録がありますので、彼らからその辺の回答が来たところで事務局でチェックして、それから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に進めていきたいと思います。その時点でもし必要であれば御専門の先生に相談させていただくことはあるかもしれませんが、速やかに済むのではないかと思います。

それでは、議題1についてはこれで終わりたいと思います。

議題2「その他」ですが、事務局から何かございますでしょうか。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、本日の議題についてはこれで終了でございます。

以上をもちまして、第222回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

ありがとうございました。お疲れさまでした。