

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第223回) 議事録

1. 日時 令和4年3月23日(水) 14:00~16:33

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) 遺伝子組換え食品等に係る食品健康影響評価について

・線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジキオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズGMB151(食品・飼料)

・*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、安達専門委員、小関専門委員、小野道之専門委員、小野竜一専門委員、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

(食品安全委員会)

川西委員、脇委員

(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線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジキオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズGMB151(食品)

②線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジキオキシゲナーゼ阻害型除草剤

耐性ダイズGMB151（飼料）

③ *Bacillus subtilis* NTI05（pHYT2Aopt）株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第223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。

本日、所用により、〇〇〇、〇〇〇は御欠席です。

また、専門参考人として、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おります。

本日の議題ですが、継続品目であります「線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジキオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズGMB151（食品及び飼料）」、及び新規品目であります「*Bacillus subtilis* NTI05（pHYT2Aopt）株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」の安全性についての審議でございます。

それでは、お手元の資料を確認いたしたいと思えます。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、「線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジキオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズGMB151」の申請者であるBASFジャパン株式会社の方、「*Bacillus subtilis* NTI05（pHYT2Aopt）株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」の申請者である日本食品化工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。

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。

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ございますので、事務局から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、発言の際は赤い挙手のカードを御提示ください。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もございます。

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、全く入室できなくなった場合は、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。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き、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、早速審議に入りたいと思います。継続品目でございます「線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジキオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズGMB151」について審議を行いたいと思います。

本品目は令和3年1月の専門調査会において審議を行ったものです。

では、事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 説明をさせていただきます。灰色の紙ファイル線虫抵抗性及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジキオキシゲナーゼ、以降の説明ではHPPDと言います。HPPD阻害型除草剤耐性ダイズGMB151の食品としての資料を御準備ください。

資料は28ページ目までが回答書、その後ろに修正要旨が続くという構成になっております。

本品目につきましては、昨年1月の専門調査会において審議した際に指摘事項等をいただいたものでございます。

今般、申請者から回答がありましたので、該当部分について御説明させていただきます。

まず、申請品目について簡単に御説明いたします。

要旨の1ページ目を御覧ください。

申請品目は、第1の1(1)に記載されております、ダイズの商業品種であるThorneを宿主として(2)の*Bacillus thuringiensis* ●●●由来の*cry14Ab-1.b*遺伝子及び*Pseudomonas fluorescens* A32株由来の改変*hppdPf-4Pa*遺伝子を導入して作出されています。

(3)、2ページ目からの記載になりますが、Cry14Ab-1タンパク質及び改変HPPDであるHPPD-4を発現することで、線虫及びHPPD阻害型除草剤に対する影響を受けずに生育することができるようにした品種でございます。

このCry14Ab-1タンパク質が、本専門調査会において初めて審議を行う新規のCryタンパク質であるということで、その詳細を確認する指摘事項を出していたものでございます。

それでは、指摘事項の順に沿って説明をさせていただきます。

回答書の1ページ目を御覧ください。

指摘事項の1になります。前回の調査会で説明した*cry14Ab-1.b*遺伝子の機能の内容に加えて、ここに挙げております①～⑤の内容の観点から、補完データの提出及び最新の情報による考察を求めています。

まず、①Cry14Ab-1タンパク質のドメイン構造及び3次元構造についての解析調査になります。

回答の2行目、Cry14Ab-1タンパク質はCryタンパク質ファミリーが保持する3つの δ -トキシシン・ドメインを有しています。

また、回答の5行目からですが、2ページに示しております系統樹において、線虫に対して活性を持つCry5及びCry21タンパク質と同じ枝に分類されます。また、3ページの図2に示しております線虫抵抗性Cryタンパク質の系統樹の分子においては、Cry14Aa1タンパク質と隣り合っており、アミノ酸配列レベルの同一性も高いものとなっております。

また、1ページ目の一番下の行に記載されておりますが、これまでにCry14Ab-1タンパク質の立体構造は決定されていません。

続きまして、3ページ目です。②そのほかのCryタンパク質とのアミノ酸配列の相同性、構造及び作用機作の類似性です。

まず、アミノ酸配列における類似性です。

表1を御覧ください。

4ページになりますが、表1の下から5段目、線虫抵抗性を示すCry14Aa1タンパク質と同一性、相同性ともに最も高くなっています。また、Cry14Aa1タンパク質以外では、これも線虫抵抗性を示すCry21Ba1タンパク質と最も高い類似度を示しております。

続きまして、表1の下から立体構造における類似性です。2行目からの記載ですが、完全長の立体構造が決定されているCry1Acタンパク質が5ページの図3に記載されていますが、N末端コアにはドメインI～IIIが、C末端コアにはドメインIV～VIIが含まれています。

図3の立体構造の下になりますが、これは今回のCry14Ab-1と立体構造が明らかになっているCry1Acとのアミノ酸配列のアライメントです。こちらのアライメントによりますと、

Cry14Ab-1タンパク質でも7つのドメインが保存されていることが示唆されているとしております。

一番下の表2ですが、標的生物の腸内での活性を持つN末端コアの3つのドメインのアミノ酸配列の同一性はCry14Aa1タンパク質で最も高い83.2%で、これも線虫抵抗性を持つCryタンパク質と比較的高い類似性を示しているとしています。

また、Cry14Ab-1タンパク質の立体構造は決定されていませんが、同じ線虫抵抗性を持つCry5Baタンパク質のドメインI～IIIについては、6ページの図4のとおり、結晶化構造が決定されております。

続きまして、図4の下から作用機作の類似性です。

こちらは申請者から修正が入っておりますので、机上配布資料の1-1を御準備ください。2枚目のページ番号が6と記載されたページからになります。

3行目の後半からの記載ですが、腸内プロテアーゼはCryタンパク質のアミノ酸モチーフに続くトリプシン切断部位、またはキモトリプシン切断部位を認識して切断することが報告されています。

このようなプロテアーゼが可溶化するトリプシン切断部位またはキモトリプシン切断部位がCry14Ab-1タンパク質のアミノ酸配列上には見られないという点が害虫抵抗性Cryタンパク質とは異なっていると考察されているとしています。

しかし、先ほど御説明したように、Cry14Ab-1タンパク質は、他のCryタンパク質と共通のドメイン構造を保持していることから、殺線虫活性を持つ δ -エンドトキシンに可溶化されることが示唆されるとしております。

また、●●●、Cry14Ab-1タンパク質が線虫の*C.elegans*や*H.glycines*の中腸上皮に結合して損傷を与えることを示したことから、Cry14Ab-1タンパク質は害虫抵抗性を示すCryタンパク質が感受性昆虫の中腸上皮の特異的レセプターに結合する作用機作と同様の作用機作を持つことが示唆されたとしております。

続きまして、回答書に戻っていただきまして、6ページになります。③標的とする線虫の種類及び殺虫スペクトラムの範囲です。

Cry14Ab-1タンパク質は、特定のクキセンチュウ目に属するダイズ寄生性線虫に対して抵抗性を付与します。

8ページの表3を御覧ください。

この5種類の線虫で接種試験を行いました。増殖抑制効果を示したのは、ダイズシストセンチュウとネグサレセンチュウだけで、クキセンチュウ目に属する線虫の中でもCry14Ab-1タンパク質への感受性が異なることを確認したとしております。

続いて、7ページの7行目から害虫、病原菌または標的としない自由生活性線虫に対する影響です。

9ページの表4に挙げられた20種類の害虫等に給餌または接種試験を行った結果、表4の下から7つ目の*C.elegans*という線虫に対してのみ生育阻害を示しました。その理由が7ペ

ージの22行目から記載されておりまして、*C.elegans*に対する生育阻害効果は、研究室内の人工的な環境において過剰投与したためと考えられ、自然環境下では同等のCry14Ab-1タンパク質を摂食する可能性は低いと考えられるとしております。

また、土壌中の自由生活線虫に対しては活性を示さないことを確認したとしております。続いて、非標的生物に対する影響です。

9ページの表5を御覧ください。

ここに記載された6種類を試験対象とした結果、全てで殺虫性を示しませんでした。

7ページに戻っていただきまして、下から2行目ですが、以上のことより、Cry14Ab-1タンパク質は特定のクキセンチュウ目に属するダイズ寄生性線虫であるダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類及び自由生活性線虫の*C.elegans*に対して活性を示すことを確認し、非標的生物、農業的に重要な病害虫、菌に対しては活性を示さないことを確認したとしております。

続きまして10ページ目、④線虫の中腸上皮におけるCry14Ab-1タンパク質と結合するレセプターに関する文献検索です。Cry14Ab-1タンパク質が結合するレセプターに関する文献はなく、ほかの線虫抵抗性Cryタンパク質であるCry21Aa3とCry5Bについて記載しております。Cry14Ab-1タンパク質とのアミノ酸配列全長の同一性は、Cry21Aa3で37.4%、Cry5Ba1で34.1%であり、作用機作については、線虫の中腸上皮に結合し、損傷を与えるという類似性が示されています。

まず、Cry21Aa3タンパク質ですが、*abt-4*遺伝子がコードするABCトランスポーターと推定されるABP-4タンパク質が潜在的なレセプターであるとしております。ABCトランスポーターは、ATPの加水分解によって得られるエネルギーを駆動力として様々な物質を能動輸送し、恒常性の制御等の様々な生理機能に関与しております。

次にCry5Bタンパク質ですが、線虫特異的カドヘリンレセプターCDH-8がCry5Bタンパク質のレセプターであることが示されています。CDH-8タンパク質の機能は明らかではありませんが、細胞接着または形態形成に関与すると推測されています。また、昆虫抵抗性のCryタンパク質の作用機作においては、オリゴマー化したCryタンパク質がカドヘリンレセプターに結合し、細胞膜に小孔の形成を誘導することが確認されており、CDH-8も*C.elegans*において同様の機能を保持していることが確認されたとしております。

また、11ページの一番上から記載されていますが、非脊椎動物に特異的な特定のスフィンゴ糖脂質がCry5Bタンパク質と結合したことから、Cry5Bタンパク質の主要なレセプターであるとの報告があります。このスフィンゴ糖脂質は細胞内・細胞間の情報伝達、接着、増殖等を制御していると考えられています。その糖脂質の炭水化物鎖を合成するグリコシラーゼをコードする遺伝子の突然変異を持つ*C.elegans*がCry5Bに対して耐性を示すことが確認されたことから、糖脂質生合成経路がCry5Bタンパク質の作用機作に関与する可能性が示唆されたとしております。

また、同様のスフィンゴ糖脂質は昆虫の中腸でも生成されており、タバコスズメガの中

腸から抽出したスフィンゴ糖脂質にはCry1Aaタンパク質、Cry1Abタンパク質、Cry1Acタンパク質が特異的に結合することが示されているとしております。

これらのことから、Cry14Ab-1タンパク質が結合するレセプターについての報告はありませんが、論文での報告があるCryタンパク質のレセプターと類似のレセプターを持つことが推測されるとしております。

続きまして、⑤その他のCryタンパク質との相互作用です。③の説明のとおり、Cry14Ab-1タンパク質を農業上問題となる害虫、病原菌に対して行った定性的なバイオアッセイの結果、*C.elegans*に対して生育を阻害しましたが、チョウ目を含むほかの害虫及び菌類には活性を示しませんでした。したがって、Cry14Ab-1タンパク質のスペクトラムは、申請者のCry14Ab-1タンパク質及びCry2Aeタンパク質を含む評価済みのCryタンパク質の持つスペクトラムとは重複しないと考えられるとしております。

また、これまでの知見を基に、当該タンパク質が評価済みの害虫抵抗性Cryタンパク質とのタンパク質相互作用を起こす可能性は低く、当該タンパク質が評価済みCryタンパク質と共通の生物を標的とする、または共通の基質と作用するという報告はないとしております。

続きまして、回答書の20ページ目を御覧ください。

ここからが指摘事項2の物理化学的処理に対する感受性に関する指摘です。

まず①です。

21ページ目の図6.4を御覧ください。

人工腸液のSDS-PAGE分析において、Cry14Ab-1タンパク質のバンドとされる110kDa付近にパンクレアチンを添加していないレーン3と4では太い1本のバンドが確認でき、パンクレアチンを添加しているレーン5～14では3本のバンドが確認できるため、再考察をすように求めています。

申請者からの回答は、まずCry14Ab-1タンパク質のバンドが116.3kDaから200kDaに1本検出されているものであり、これはパンクレアチン無添加の状態では時間の経過による分解は起こらないとしております。

一方、パンクレアチンを添加すると、レーン5～12のようにCry14Ab-1タンパク質の分子量と同じ位置に3つのバンドが見えるようになります。この3つのバンドは人工腸液のみのコントロールであるレーン13、14においても検出されております。

このように、Cry14Ab-1タンパク質のバンドと人工腸液のみでも検出するバンドの位置が重複しており、識別できなかつたとしており、SDS-PAGE分析において明確な分解を確認することはできなかつたという結論にしています。要旨もそのように修正されております。

次に、20ページの指摘事項2の②を御覧ください。

前回調査会の資料では、人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理の項目で、「人工腸液中で反応させたHPPD-4タンパク質のバンドは、陽性対照よりは強度が弱いものの、全

での処理時間において確認された」という記載がある一方で、「HPPD-4タンパク質のバンドはパンクレアチンのバンドと同じ分子量に位置していたため、HPPD-4タンパク質が消化されたかを確認することはできなかった」という記載がありました。この2つの記載内容が矛盾しているため、修正を求めています。

回答は回答書の22ページ目からになります。

要旨の44ページの図6.8のSDS-PAGE分析も併せて御覧いただきたいのですが、このSDS分析では、HPPD-4タンパク質はレーン3のように36.5～55.4kDaの間に1つのバンドとして検出されています。パンクレアチン無添加条件下では、60分後でもレーン4のとおりバンドは確認できます。レーン5～12がパンクレアチンを添加したのものになりますが、これらでもHPPD-4タンパク質の分子量と同じ位置にバンドが検出されています。このバンドはレーン13や14の人工腸液のみのコントロールでも検出をされており、レーン5～12ではHPPD-4タンパク質とパンクレアチンのバンドが重複して識別できなかったとしております。要旨もそのように修正されております。

続きまして、回答書の23ページ目を御覧ください。

ここからが修正事項になります。

まず、23ページ目、修正事項1です。導入用プラスミドの構成要素、位置、由来及び機能の表において、前回調査会資料では、ベクター上の位置が7400から7405の合成ポリリンカー配列が記載されておりませんでしたので、T-DNA領域内の遺伝子発現カセット中に位置する場合であっても、そのほかの項に記載している理由を説明の上、必要に応じて修正をすることを求めています、表に追加されております。

続きまして、回答書の25ページ目、修正事項2を御覧ください。

前回の調査会資料の育種過程の図について確認、修正を求めています。その結果、25ページ目にありますように、正しい育種過程に修正して提出されてきております。

続きまして、回答書の26ページ目、修正事項3を御覧ください。

前回調査会資料のアミノ酸組成表のバリンの商業品種の許容区間の値を正しく修正するように求めています。そちらに対しまして、正しく修正した内容が記載をさせていただきます。

続きまして、修正事項4です。こちら前回調査会資料の脂肪酸組成の表を適切に修正するように求めているものでございます。項目の名称を正しく修正して、今回提出をしてきてございます。

最後に、机上配布資料1-2を御準備ください。

こちらの63とページ数が入ったページを御覧ください。

「8. 諸外国における認可、食用等に関する事項」ですが、昨年1月の審議の際には、米国、カナダについては申請を行っているという状態でしたが、その後、承認が得られたため、修正をしております。また、EUにおいても、2018年にEFSAに食品及び飼料として安全性審査の申請を行っていたということが分かりましたので、その旨を追記してござい

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、申請資料の修正箇所につきまして、先生方から御意見をいただきたいと思えます。

昨年の1月の時点でまだ委員になっておられなかった先生がおりますので、多少説明させていただきますと、*Bacillus thuringiensis*がつくるCryタンパク質は昆虫やいろいろな生物の中腸に結合して特異的な生物を殺すもので、今のところ大体1ダースくらい知られているのですけれども、このうちよく使われるのがCry1、2、3の3つで、Cry1とCry2はチョウ目の害虫に特異的ですので、特にトウモロコシの最強の敵であるアワノメイガに対して効果があるということで、かなり初期の頃から遺伝子組換えのトウモロコシに使われております。Cry3はと言いますと、これはコウチュウ目に特異的に効きますので、根っこを切るコーンボウラなどといったものに対する耐性ということで、1、2、3につきましては今までいっぱいあちこちで出てきまして、さんざん審議したものです。

今回出てきたものは、線虫に対して特異的に効果があると言われるCry14Abについてですので、これが従来のCry1、2、3と同じように議論してよいのかどうかという点を考えまして、それに関する指摘事項で、挿入遺伝子の機能に関する事項でタンパク質について知られていることなど、我々が判断できるようにもっと情報を頂戴よと要求したわけでございます。

大体このくらいなのだけれども、〇〇〇、何か付け加えることはありますか。何か覚えていることはございますか。

〇〇〇 いえ、これで十分というか、線虫抵抗性ということで新しいというか、今までにないかなという感じだったと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

ということで、3次元構造、アミノ酸配列の相同性など、特に重要なのは標的のスペクトラムでして、線虫以外のもので効いたり、あっと驚くものに効いて、その結果、ヒトに健康被害などが及んではいけないので、その辺のデータを要求したのですけれども、見事にいっぱいデータが出てきて、線虫の中でもこの仲間には効かないということで、自由線虫には効かないということでした。だけれども、*C.elegans*は自由線虫ですけれども、あれには効いているということですが、それはこの実験条件の違いという説明がなされていたように思います。

この指摘事項1について、これは〇〇〇と私とで、私のほうもかなり膨大な答えが返ってきたので、せっかくだからお付き合いして一生懸命読ませていただきましたけれども、これだけデータをよこして回答してもらえればいいかなと私は思ったのですが、〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 今回のCry14は新しいBtなので、以前からこの調査会でも新しいタイプのBtについては少し慎重にやりましょうねというコンセンサスがあったので、もう少しデータを追加してくださいということでお願いしたわけですが、構造もきっちりディスカッションされていますし、レセプターはまだ決まっていなようですけれども、標的の生物の種類とかもかなりできる範囲で調べられている。あと、同じ線虫を標的とするほかのBtタンパク質についての情報も一気にかなり整備されて記載されていますので、私としてはこれで十分かと思っております。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

新しいタンパクでもありますので、皆さん、特に植物の先生方の御意見をお聞きしたいかなと思います。

〇〇〇、このぐらいの回答でよろしいでしょうか。

〇〇〇 このぐらいきちんとと言ったら失礼ですけれども、詳細に書いてくだされば、これは皆さん納得されるのではないかなと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 これまで分かっていることとそれをどう考えるかということがしっかり書いてあるのでいいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 私としても勉強させていただきました。これで大丈夫かなと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 私もよく答えてもらっていると思います。これでいいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

おおむね植物の先生方はオーケーのようですが、先生方、ほかにこの指摘事項1に関して御質問、御異議等はございますでしょうか。

では、これはよろしいでしょうか。ありがとうございます。

指摘事項2は、物理化学処理のところで、人工胃液、人工腸液の説明とこのデータは、これで何だか言うことはおかしくないかと私もちらっと思ったのですが、この点について御質問された〇〇〇と〇〇〇、〇〇〇はいらっしゃいませんが、〇〇〇、結論としては人工腸液では効いていないっぽいという結論で修正してきておりますが、これでいかがでしょうか。

〇〇〇 安達でございます。

SDS-PAGEだけではパンクレアチン由来のバンドと重なってしまっていて確認はできなか

った。分解の状況についてはウェスタンのほうで見てくださいというような形できちんと説明がされていると思いますので、私はこれでよいのではないかと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

Cryタンパク質は、一般に人工胃液では溶けるけれども人口腸液は全然効かないものなのですが、これも効いていないようですけれども、〇〇〇、それで安全性についての御懸念等はございますでしょうか。

〇〇〇 人工胃液のほうで完全に分解されていますので、安全性に対する懸念は低いものと考えられると思います。

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 問題ないと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、この辺はいかがですか。

〇〇〇 〇〇〇です。

今の記述で問題ないと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

では、せっくなので〇〇〇、この辺は。

〇〇〇 私も今の記述で問題ないと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

私もこれで大体いいかなと思うのですけれども、先生方、この点につきまして御懸念、御意見等はございますでしょうか。

よろしいですね。ありがとうございます。

修正事項は1、2、3、4とございまして、これは実は全部〇〇〇なのですが、〇〇〇はここにはいらっしゃいませんので、これは修正ということなので、これを私と事務局のほうで精査させていただきまして、修正事項1は16ページの挿入用のプラスミドで合成ポリリンカーのところをちゃんと書いてねというところ。修正事項2は育種の工程のところ。それから、修正事項3はアミノ酸の組成表のところ。修正事項4も脂肪酸の組成のところ、細かいところと言えば細かいところなのですが、その点については確認をさせていただきましたが、先生方、この点につきましていかがでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、修正事項、指摘事項についてはクリアということのようですが、本案件全体として安全性に関して御懸念、御意見等はございますでしょうか。

膨大な資料を用意して誠実に対応していただいていると思いますし、また、既に承認が下りている国もあったということもありますので、本件については安全性には問題ないと判定したいと思いますが、よろしいでしょうか。先生方、御意思を確認したいと思います。

(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、皆様同意ということなので、本件については安全性については問題ないと判定したいと思います。

それでは、評価書案の審議でいきたいと思います。

お願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

評価書案について御説明させていただきます。

右上に資料と書かれた評価書を束ねた冊子がございますので、お手元に御準備ください。

2ページ目からが本品の評価書案になります。

まず7ページ目をお開きください。

「Ⅰ. 評価対象食品の概要」でございます。線虫抵抗性及びHPPD阻害型除草剤耐性ダイズGMB151は、*Bacillus thuringiensis* ●●●に由来する*cry14Ab-1.b*遺伝子及び*Pseudomonas fluorescens* A32株に由来する改変4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子を導入して作出されており、Cry14Ab-1タンパク質及びHPPD-4を発現することで、線虫及びHPPD阻害型除草剤に対する影響を受けずに生育することができるとされています。

続いて、「Ⅱ. 食品健康影響評価」でございます。

1の1の(1) 宿主はマメ科*Glycine*属に属するダイズのThorneでございます。

(2) DNA供与体の由来は、*cry14Ab-1.b*遺伝子の供与体が*Bacillus thuringiensis* ●●●であり、*hppdPf-4Pa*遺伝子の供与体は*P. fluorescens* A32株です。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法でございます。Cry14Ab-1タンパク質は線虫に対して抵抗性を付与します。*hppdPf-4Pa*遺伝子がコードするHPPD-4は、HPPD阻害型除草剤耐性を付与します。両遺伝子を含むT-DNA領域は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入されました。

2から5については記載のとおりでございます。

8ページ、136行目からになりますが、6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点は、Cry14Ab-1タンパク質を発現すること及びHPPD-4タンパク質を発現することで、線虫抵抗性とHPPD阻害型除草剤耐性が付与されている点です。

以上から、ダイズGMB151の安全性評価においては、既存のダイズと比較が可能であると判断しております。

第2、第3と10ページ目の第4については記載のとおりでございます。

10ページの210行目から「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」です。

1の(1) は記載のとおりでございます。

(2) 安全性に関する事項ですが、*B. thuringiensis*は生物農薬として長期にわたり安全

に利用されています。

11ページに行きまして、*P.fluorescen*は自然界に広く存在し、魚類及び無脊椎動物などに感染しますが、至適生育温度は25～30℃であり、ヒトの体内では日和見病原体を越える病原性を持ちません。また、米国において生物農薬として安全に使用されています。

続いて、2の(1)クローニング等の事項でございます。*cry14Ab-1.b*遺伝子は*B.thuringiensis* ●●●からクローニングされています。*hppdPf-4Pa*遺伝子は*P.fluorescen* A32株由来の*hppb*遺伝子がコードするHPPDタンパク質のC末端にある335、336、339、340番目のアミノ酸がそれぞれグルタミン酸からプロリン、グリシンからトリプトファン、リジンからアラニン、アラニンからグルタミンに置換されるように改変されています。これにより、HPPD阻害型除草剤との結合親和性が下がり、HPPD阻害型除草剤の存在下でも4-HPPからHGAへの反応が触媒されることにより、HPPD阻害型除草剤耐性を示します。

(2)は記載のとおりでございます。

(3)挿入遺伝子の機能に関する事項です。*Cry14Ab-1*タンパク質は、本専門調査会において今回初めて審議を行いましたので、丁寧に記載をさせていただきます。説明も少し長くなってしまいますが、説明をさせていただきます。

243行目からです。*cry14Ab-1.b*遺伝子がコードする*Cry14Ab-1*タンパク質は、標的とするダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に殺線虫活性を示します。*Cry14Ab-1*タンパク質の全長アミノ酸配列に基づき、他の線虫抵抗性*Cry*タンパク質及び代表的なチョウ目、コウチュウ目、ハエ目抵抗性*Cry*タンパク質に対して構造的類似性を検討した結果、線虫抵抗性を示す*Cry21*タンパク質と最も類似しました。また、*Cry14Ab-1*タンパク質の立体構造は決定されていませんが、*Cry14Ab-1*タンパク質は*Cry*タンパク質間で保存されている δ トキシン活性を示すために必要なN末端コアの3つのドメイン構造を有しています。

これまでに遺伝子組換え作物に利用されてきた害虫抵抗性を示す*Cry*タンパク質の作用機序と類似しているかどうかについて検討を行った結果、*Cry14Ab-1*タンパク質も同様に、標的線虫に摂取されると消化管内のプロテアーゼにより可溶化して δ エンドトキシンとなり、これが中腸に作用し、上皮細胞膜に小孔形成して殺虫活性を示すことが示唆されました。

線虫抵抗性*Cry*タンパク質である*Cry21Aa3*及び*Cry5Ba*タンパク質の受容体について、*C.elegans*を用いた試験結果から、ABP-4遺伝子がコードするタンパク質、線虫特異的カドヘリン受容体CDH-8等が受容体とされています。*Cry14Ab-1*タンパク質が結合するレセプターは同定されていませんが、*Cry14Ab-1*タンパク質が線虫の中腸上皮に結合し損傷を与えることが確認されていることから、*Cry21Aa3*タンパク質及び*Cry5Ba*タンパク質と同様のレセプターを持つのではないかと推測されました。

ダイズに被害をもたらすクキセンチュウ目の5つの植物寄生性線虫のうち、*Cry14Ab-1*

タンパク質はネコブセンチュウ、ナミラセンセンチュウ類及びニセフクロセンチュウには効果を示さなかったことから、クキセンチュウ目に属する線虫において、Cry14Ab-1タンパク質への感受性が異なることを確認しました。

害虫や病原菌に対してCry14Ab-1タンパク質の定性的なバイオアッセイを実施した結果、*C.elegans*に対して生育を阻害しましたが、チョウ目を含む他の害虫や菌類には活性を示しませんでした。したがって、Cry14Ab-1タンパク質のスペクトラムは他のCryタンパク質の持つスペクトラムとは重複しないと考えられました。

また、Cry14Ab-1タンパク質にばく露される可能性が考えられるミツバチ、ミジンコなどの非標的生物に対して、混餌投与による生物検定を行った結果、全ての非標的生物に対してCry14Ab-1タンパク質は殺虫活性を示さないことが示されました。マウスへのCry14Ab-1タンパク質並びにラット及びニワトリへのダイズGMB151油かすの給餌投与による毒性試験の結果では、投与に関連した影響は確認されず、Cry14Ab-1タンパク質は線虫以外の非標的生物に摂取されても安全であると考えられました。

Cry14Ab-1タンパク質の既知の毒性タンパク質と構造相同性を調べるために、データベースを用いてE-valueが0.1及び10未満を指標として検索を行った結果、既知の毒性タンパク質との相同性は認められませんでした。

続きまして、292行目から、HPPDタンパク質に関しては記載のとおりでございます。

13ページの299行目からですが、*hppdPf-4Pa*遺伝子がコードするHPPD-4タンパク質は、HPPDタンパク質のアミノ酸配列の4か所を部位特異的に置換することにより、DKNと結合親和性を低下させた結果、HPPD-4タンパク質はDKNによる阻害活性を受けずに正常な代謝が行えるため、イソキサフルトールを散布しても生育が可能です。

HPPD-4タンパク質の既知の毒性タンパク質との構造相同性を調べるために、データベースを用いてE-valueが0.1及び10未満を指標とした検索を行った結果、既知の毒性タンパク質との相同性は認められませんでした。

309行目の(4)から14ページの3、4、5、15ページの6については記載のとおりでございます。

15ページの369行目から「第6. 組換え体に関する事項」です。

1の(1)コピー数及び挿入近傍配列です。GMB151のゲノムに挿入されたT-DNA領域のコピー数を確認するためにシーケンス解析を行った結果、T-DNA領域5'末端及びプロモーター配列の一部を含むゲノムとの2つの接合領域が特定され、T-DNA領域が1コピー挿入されていることが確認されました。

376行目後半からですが、「また、T-DNAの3'側」となっていますが、3'末端が正しいので修正をさせていただきます。T-DNAの3'末端に挿入されたDNA断片39bpのうち、21bpが導入用プラスミドの外骨格領域由来の配列であったことを除き、導入用プラスミド、ここは「ド」が欠落しておりますので修正をしておきます。導入用プラスミド外骨格領域がゲノム中に存在しないことが確認されました。

380行目からですが、導入されたT-DNA領域のPCR分析及び塩基配列解析を行った結果、T-DNA領域の5'末端のRB及び3'末端のLBの欠失、並びにプロモーターの5'側482bpの欠失が確認された以外、導入用プラスミドのT-DNA領域の塩基配列と同一でした。

384行目からになります。GMB151の挿入DNA近傍配列と宿主ゲノムを比較した結果、3'側近傍配列の1bpの相違を除き、挿入DNAの近傍配列は宿主ダイズゲノム由来であることが確認されました。また、挿入位置において63bpの欠失、T-DNAの3'側にDNA断片39bpの挿入が確認されました。

389行目からですが、DNA挿入によってダイズの内在性遺伝子が損なわれていないかどうかを確認するために、欠失した63bpを含む5'末端近傍配列及び3'末端近傍配列についてデータベースを用いて検索を行った結果、T-DNAは、BON1関連タンパク質1の3'側非翻訳領域に挿入されていることが確認されました。BON1関連タンパク質は1は塩基配列から推定されたタンパク質であること、GMB151と非組換えダイズ間で構成成分組成に有意差がなく、表現型及び農業的形質に相違はなかったことから、DNAの挿入によって既知の内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられます。

続きまして、402行目から(2) ORFの項目でございます。GMB151の挿入DNA領域とその近傍配列の結合部分において、6つの読み枠でORF検索を行った結果、406行目からの記載ですが、終止コドンから終止コドンまでで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが115個見いだされ、これらについてアレルゲンデータベースを用いて相同性の検索を行った結果、409行目からの記載になりますけれども、連続する80アミノ酸について35%以上の相同性を有する既知のアレルギーは見いだされませんでした。さらに、連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列を検索した結果、アレルゲンCas s 5タンパク質と一致する配列が1個認められましたが、このアミノ酸配列はエピトープとして発現するために必須の開始コドンやRNAスプライシングサイトがなく、構造上発現する可能性は低いと考えられました。

同様に検出された115個のORFに対して、既知の毒性タンパク質と相同性を調べるためにデータベースを用いて検索を行った結果、既知の毒性タンパク質との相同性は見られませんでした。

続きまして、17ページの420行目から「2. 遺伝子産物の発現部位、発現時期及び発現量に関する事項」です。GMB151の葉、根、花序、根を含まない植物体及び種子についてCry14Ab-1タンパク質及びHPPD-4タンパク質の発現量をELISA法で分析しました。その結果は表2のとおりになっております。

3及び4の(1)、(2)は記載のとおりでございます。

18ページの453行目から(3)物理化学的処理に対する感受性に関する事項です。

まず、①人口胃液に対する感受性です。Cry14Ab-1タンパク質については、458行目からの記載になりますが、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析で試験開始後0.5分以内にバンドは消失しました。なお、両分析において観察されたオリゴマーのバンドは、試

験開始後0.5分以内に消失しました。

続いて、HPPD-4タンパク質については、466行目からの記載になりますが、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析で、試験開始後0.5分以内にバンドは消失しました。なお、ウェスタンブロット分析において観察されたオリゴマーのバンドは、試験開始後0.5分以内に消失しました。

続いて、②人工腸液に対する感受性です。Cry14Ab-1タンパク質については、476行目からの記載になりますが、SDS-PAGE分析ではCry14Ab-1タンパク質と同じ分子量の位置にパンクレアチンのバンドが重複して検出されたため、識別できず、消化を確認することはできませんでした。ウェスタンブロット分析では、約25、50及び75～100kDaにCry14Ab-1タンパク質の分解物が検出され、試験開始後60分までに部分的に消化されることが示されました。

HPPD-4タンパク質については、485行目からになりますが、SDS-PAGE分析ではHPPD-4タンパク質と同じ分子量の位置にパンクレアチンのバンドが重複して検出されたため、識別できず、消化を確認することはできませんでした。

19ページ目ですが、ウェスタンブロット分析では、反応開始0.5分後にHPPD-4タンパク質を示すバンドが消失しました。HPPD-4タンパク質の分解物である複数のバンドが検出されましたが、試験開始後10分以内に全て消化されることが確認されました。

492行目から③加熱処理に対する感受性です。Cry14Ab-1タンパク質については、495行目からELISA分析を行った結果、75℃以上、30分間の加熱処理により免疫反応性を失うこと及び線虫に対する成長阻害活性を消失することが確認されました。

HPPD-4タンパク質については、501行目から、ELISA分析を行った結果、75℃以上、30分間の加熱処理により免疫反応性を失うことが確認され、55℃以上、30分間の加熱処理により酵素活性を消失することが確認されました。

(4) は記載のとおりでございます。

519行目からですが、これらのことから総合的に判断し、Cry14Ab-1タンパク質及びHPPD-4タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認したとしております。

5については記載のとおりでございます。

20ページ目、529行目から6. 代謝経路への影響です。

まず、Cry14Ab-1タンパク質ですが、532行目の後半から、Cryタンパク質は殺虫以外の機能を有することは知られておらず、酵素活性を持つ報告はありません。したがって、植物の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられます。

次に、HPPD-4タンパク質についてですが、537行目の中ほどから、チロシン代謝経路において4-HPPからHGA生成を触媒する酵素です。

542行目からの記載になりますが、このHGAの上流に位置するチロシンの含量は、GMB151と非組換えダイズの間には統計学的有意差はなく、GMB151においてチロシン含量

の上昇は見られなかったことから、HPPDタンパク質を過剰発現させてもチロシンが関与する代謝経路に影響はないと考えられます。非組換えダイズ及びGMB151のHGA含量を測定した結果も定量限界値未満であり、両ダイズにおいてHGAは迅速に代謝されることが示されました。また、GMB151のHGAの下流の代謝産物であるトコフェロール含量も商業用品種の許容区間内であること、あと、エンバクの改変HPPDタンパク質を過剰発現させたダイズにおいてフマル酸量に影響を及ぼさないとの報告があることから、HPPD-4タンパク質がHGA下流の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられました。

554行目からですが、HPPD-4タンパク質の基質特異性について検討した結果、植物体内で基質となる可能性がある4種類の化合物及び4-HPPタンパク質を基質としてHPPD-4タンパク質と反応させた結果、3,4-dHPPはわずかながら反応が認められたものの、競合する基質がない*in vitro*での結果であることから、4-HPPが存在する植物体において基質として利用されることはないと考えられるとしております。したがって、4-HPP以外に基質となるものはないと考えられました。

以上のことから、HPPD-4タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられました。

7の宿主との差異、次のページの8~10については記載のとおりでございます。

第7ですが、第2から第6までにより、安全性の知見が得られているとしております。

評価書の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、評価書案につきまして御意見、コメント等をいただければと思います。細かい字句等は後ほど事務局にお伝えいただければと思いますが、いかがでしょうか。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 字句上のことかもしれないし、単に確認なのですけれども、22ページの「8. 諸外国における認可、食用等に関する事項」で、米国においてはFDAとUSDAにそれぞれとなっていて、620行目には「それが2022年3月に承認を得た」と書いてあるのですけれども、「それが」はどれですか。

〇〇〇

この申請をしたもの両方という意味でしたので、「それぞれ」と記載を修正したいと思います。

〇〇〇 そうすると、また細かなところで申し訳ないのですが、623行目の「承認を得た」も「それぞれ」と入れるということになりますね。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 以上です。

〇〇〇 では、その点は確認の上、修正をお願いいたします。

先生方、ほかによろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

実は、これはまだ飼料のほうの申請もございまして、そちらの審議が必要になります。では、飼料としての安全性についての審議に入りたいと思います。

食品のほうで既に通っておりますので、説明は簡略で結構です。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、お手元と同じ灰色のファイルなのですが、飼料の資料を御準備ください。

1ページ目を御覧ください。

品目名、本系統の特徴は食品と同じでございます。

2ページ目の3) 使用方法は従来のサイズと同じでございます。

「2. 遺伝子組換え飼料としての安全性」でございます。「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」の3により、①～③に当たるかどうかを考慮して判断してございます。

3ページ目からの記載になりますが、一般的に挿入された遺伝子もしくは当該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報告はないこと、本系統については、*cry14Ab-1.b*遺伝子産物であるCry14Ab-1タンパク質は線虫抵抗性を、*hppdPf-4Pa*遺伝子の遺伝子産物であるHPPD-4タンパク質はHPPD阻害型除草剤耐性の形質を付与するタンパク質であることから、①、②、③の可能性も考えにくく、飼料を摂取した家畜に由来する畜産物には、通常、安全上の新たな問題は生じないと考えられるということで、これらの飼料を摂取した家畜に由来する畜産物を摂取することがヒトの健康に影響を及ぼす可能性はないと考えられるとしてございます。

3. 除草剤イソキサフルトールの遺伝子組換えサイズにおける残留です。本系統にはこの除草剤が直接散布されるため、残留する可能性があります。また、我が国においては、飼料安全法に基づくサイズにおける除草剤イソキサフルトールの残留基準は設定されておりません。一方で、食品衛生法では残留基準が対象化合物をイソキサフルトールとその代謝物であるDKNとして、サイズにおいては両化合物の合計として0.05ppmに設定されております。2017年に米国の5か所で栽培されたGMB151に除草剤イソキサフルトールを散布した際のサイズ種子中における両化合物の合計の残留量は、定量下限である0.020ppm未満でした。

したがって、GMB151を飼料として利用したとしても、当該飼料を摂取した家畜等に由来する畜産物が、これを食するヒトの健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられるとしております。

4. 諸外国における認可状況ですが、2019年にFDAへ食品及び飼料としての安全性確認審査、USDAへ無規制栽培の申請を、カナダの保健省へ食品としての安全性審査の申請、CFIAへ飼料及び環境の安全性審査の申請を行っており、2020年にはオーストラリア、ニュージーランドの食品基準機関から承認を得ています。

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、申請書について先生方から御意見をいただきたいと思います。どなたかございますでしょうか。

先ほど人間が食べても安全とこの判定したことでもございますし、また、この除草剤のダイズにおける残留についても考察されておりますので、私はこれで問題ないかなと思うのですけれども、〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 記載の整備だけなのですけれども、申請書の1ページ目の*cry14Ab-1.b*遺伝子の機能というところの8行目から始まる文章なのですが、食品のほうのこの部分は修正してもらっているのですけれども、同じように、これは「この特異的受容体は」と言っても、実はCry14の受容体は同定されていないので、Cryタンパク質の一般論みたいな形で、食品のほうで修正されているように、こちらも同じように修正していただけたらありがたいなと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。もっともだと思いますので、そのように修正を依頼したいと思います。

ほかにございますでしょうか。

では、記述の修正は要求するというので、飼料としては安全上問題ないと判定したいと思いますが、よろしいでしょうか。先生方、御意思を確認したいと思います。御意思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、評価書案の審議に入りたいと思います。

簡略で結構かと思います。よろしくお願いします。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案の説明をさせていただきます。

資料の27ページ目からが本品の評価書案になります。

30ページを御覧ください。

「Ⅰ. 評価対象飼料の概要」については記載のとおりでございます。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」につきましては、1及び2につきましては記載のとおりでございます。

1及び2を考慮したところ、ダイズGMB151に新たな有害物質が生成されることはないため、肉、乳、卵等の畜産物中に新たな有害物質が移行することは考えられないとしております。また、遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や、家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成される可能性は考えられないとしてございます。

以上のことから、改めて遺伝子組換え食品の安全性評価を行う必要はなく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物については、人の健康を損なうおそれはないとしたいと考えております。

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、ただいまの評価書につきまして、先生方、御意見とお気づきになった点等がございますでしょうか。よろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、食品安全委員会に報告し、しかるべく手続をしたいと思っております。

それでは、次の新規品目であります「*Bacillus subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」について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。

〇〇〇 それでは御説明させていただきます。

水色のファイルを御用意ください。

まず、1ページをお願いいたします。

第1の1の(1)といたしまして、従来の添加物ですが、名称はアルカリCDアミラーゼ(CDA)、基原は*Paenibacillus campinasensis*でございます。

(2) 製造方法ですが、●●●液体培地で培養することにより得られる培養液から●●●の工程を経て製造されます。当該菌株は精製工程で分離・除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼは、アミロースなどの α -1,4-グルカンに作用し、環状 α -1,4-グルカンであるシクロデキストリンを生成する酵素でございます。CGTaseを有効成分とするCDAは、当該酵素の特性を利用し、主にデンプンに作用させ、シクロデキストリンの製造に用いられます。

続いて、2ページをお願いいたします。

(4) 摂取量でございます。平成29年から平成30年の1年間に日本国内で流通したCGTaseの全量が食品用途に向けたシクロデキストリン製品の製造に使用され、当該製品にCGTaseが全量残存した際の一最大摂取量を推計すると、2.03mg/日/人と見積もられるとしております。

続いて、1の2でございます。

(1) 宿主は*Bacillus*属の*subtilis* Marburg168株を基原とする*B.subtilis* ISW1214株でございます。

生産菌株の工程ですが、(A) から (D) のとおり記載されております。

まず(A)でございますが、Aでは芽胞形成能が確立した株の取得を目的に、ISW1214株のゲノムDNA上の芽胞形成関連遺伝子を直鎖DNA断片による二重交差相同組換えにより、*cat*に置換し、*B.subtilis* ISK01株を得ております。

続いて (B)、3ページですが、ISW1214株に対して抗生物質無添加条件における発現プラスミド脱落防止を目的に、*trpS*を挿入した発現プラスミドで*trpS*を補完する発現系の構築を試みております。*trpS*欠失用プラスミドを一重交差相同組換えによりゲノム内に導入し、*B.subtilis* TKC01株を得た後に*trpS*補完用プラスミドであるpDATSKを導入して、TKC01 (pDATSK) 株を得ております。ゲノム内相同組換えによってゲノム上の*trpS*欠失用プラスミド断片が抜け落ちた後に、先ほど●●●を行うことで、目的の遺伝子型を有する*B.subtilis* NTI01 (pDATSK) 株を得ております。

続いて (C) ですが、5ページでございます。先ほどのB項で得た株は目的の遺伝子型を有するものの、ほかの酵素の発現プラスミドをpDATSK株と入れ替える形で導入し、生産培養を行うと、組換え酵素の生産量が低かった。この原因は、NTI01 (pDATSK) 株の作成時に、寒天培地での継代培養や冷蔵保存を繰り返し行ったためだと推測され、そこで、生産性の向上を企図して、寒天培地の継代培養や冷蔵保存の期間を可能な限り削減した条件でNTI01 (pDATSK) 株と同様の遺伝子型を有する株を作成することとした。すなわち、●●●を実施することで、継代培養回数や冷蔵保存の期間を大幅に削減し、NTI01と同じ遺伝子型を有した*B.subtilis* NTI04 (pDATSK) 株を取得し、続いて、NTI04 (pDATSK) 株が保持するプラスミド pDATSK を *P. campinasensis* の発現プラスミドである pHYT2Aopt に入れ替えたものを NTI04 (pHYT2Aopt) 株としております。

最後に (D) ですが、酵素生産性のさらなる安定化を企図しまして、先ほどの●●●の形質転換を行い、本申請における*B.subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を作成しております。

続いて、7ページをお願いいたします。

(2) 挿入DNAの供与体の由来でございますが、CGTaseの遺伝子の供与体は*P. campinasensis*、*trpS*の共有体は*B.subtilis* ISW1214株、プロモーター配列及びシグナル配列の供与体は*Bacillus sp.* JAMB750株、ターミネーター配列の供与体は*Thalassomonas sp.* JAMB-A33株、*cat*の供与体は*Staphylococcus aureus*でございます。

続いて、(3) でございます。*pccgt*はCGTase、*trpS*はトリプトファンtRNA合成酵素を生産いたします。プロモーター配列、シグナル配列、ターミネーター配列については記載のとおりでございます。これらのDNAを挿入しました発現プラスミドpHYT2Aoptをプロトプラスト法で導入し、pDATSK株を脱落させることで*B.subtilis* NTI04 (pDATSK) 株が調製されます。

少し飛びまして、*cat*でございますが、こちら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生産いたします。二重交差相同組換えにより、*B.subtilis* ISW1214株のゲノムDNA上の*spoIIAC*を置換する形で導入されております。

1の3、1の4は記載のとおりでございます。

続いて1の5、組換え添加物の性質等ですが、(1) 製品名はT2アルカリCDアミラーゼ (T2-CDA)。

(2) 製造方法は記載のとおりでございます。

8ページをお願いいたします。

(3) 用途及び使用形態ですが、従来の添加物と同様でございます。

(4) 有効成分の比較ですが、T2-CDAの有効成分はシクロデキストリングカノトランスフェラーゼ (PcCGT) であり、従来の添加物の有効成分と同様に、デンプンの加水分解、環状化反応により、シクロデキストリンを生成させる酵素として、シクロデキストリンの製造に用いられます。

第1の6. 従来の添加物との相違点でございますが、(1) T2-CDAの有効成分PcCGTは、従来の添加物 (CDA) の有効成分と、●●●が異なりますが、これ以外のアミノ酸配列は同一であり、従来の添加物と同様の反応特異性を持ちます。

隣の9ページに行きまして、組換え体と宿主の相違点ですが、組換え体*B.subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株は、PcCGT産生能、テトラサイクリン耐性、クロラムフェニコール耐性を有しており、これらが宿主との相違点でございます。

続いて、第2、宿主に関しては記載のとおりでございます。

10ページをお願いいたします。

第3、ベクターに関する事項ですが、PcCGTの発現プラスミドpHYT2Aoptの構築には、pHY300PLKプラスミド由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの発現プラスミドpHYT2Gを使用しております。pHY300PLKプラスミドは、pACYC177プラスミド及びpAM α 1プラスミドを使用して構築されたプラスミドでございます。

3の2は記載のとおりです。

続いて12ページ、第4の項目をお願いします。

1の(2) 安全性に関する事項ですが、*P. campinasensis*、*B.subtilis* ISW1214株、*Bacillus* sp.JAMB750株及び*Thalassomonas* sp.JAMB-A-33株は、病原性や毒素産生能などのヒトに対する有害性は知られておりません。また、国立感染症研究所「病原体等安全管理規程」におけるバイオセーフティレベル1に該当いたします。加えまして、*P. campinasensis*に関しましては、本申請にて比較対象となる既存の添加物のCDAの生産菌として使用実績がございます。

続いて、2の(1) でございますが、シグナル配列及びB.subtilis用にコドンを最適化した遺伝子として合成し、PcCGTの発現プラスミドpHYT2Gのシグナル配列及びシクロデキストリングカノトランスフェラーゼ遺伝子cgtrvと置換することで、PcCGTの発現プラスミドpHYT2Aoptを作成しております。

trpSは宿主からPCR法によりpHYT2Gにクローニングされており、●●●、trpSの●●●の変異をPCR法により部位特異的に導入しております。

続きまして、(2) は記載のとおりです。

続いて、(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項でございます。発現プラスミドpHYT2Aopt上のtrpSは、トリプトファンtRNA合成酵素を産出することで、組換え体の*B.subtilis* NTI05のトリプトファンtRNA合成酵素遺伝子欠損を補完いたします。

発現プラスミドpHYT2Aopt状のpccgtが産出するPcCGTはデンプン加水分解物に作用し、シクロデキストリン合成反応を触媒する酵素でございます。

続いて、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すが、こちらは記載のとおりです。

続いて、3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性試験でございます。人工胃液でございますが、SDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析を行っております。15秒以内にバンドが消失したことが確認されております。

続いて、人工腸液でございます。14ページをお願いいたします。

0～6時間で処理したところ、●●●kDaのバンドはSDS-PAGE、ウェスタンブロットともに消失しない結果となりました。

続いて、③加熱処理でございます。シクロデキストリン含有糖化品の製造工程では、●●●、80～90℃、pH6、●●●、並びに●●●、80～90℃、pH4、●●●の処理を行うため、加熱処理によるPcCGTと抗PcCGT抗体との結合能の変化を調べるための加熱処理条件を80℃、pH4.0及び6.0としております。加熱処理前後の当該抗体との結合能についてELISAを用いて測定しましたところ、PcCGTの反応生成物である糖化品の有無に関係なく、加熱処理1時間で相対吸光度が処理前の3%以下に低下する結果となりました。

続いて、4) でございます。既知のアレルゲンとの構造相同性ですが、AllergenOnlineのデータベースを用いまして、PcCGTと既知のアレルゲンとの構造相同性を検索した結果、80アミノ酸残基ごとの既知のアレルゲンとの相同性検索において、Taka-amylase、glucoamylase、 α -amylaseとの同一性が35%より大きい80アミノ酸残基セットが認められました。ただし、PcCGTのアミノ酸配列は、●●●従来の添加物の有効成分である野生型CGTaseと同一のアミノ酸配列を有しており、ここで検出された既知アレルゲンは野生型のアミノ酸配列を用いた検索においても同様に認められることから、T2-CDAのアレルギー誘発性が従来添加物より高まることは考えにくいとしております。

連続する8アミノ酸残基以上の一致検索を行ったところ、既知アレルゲンとアミノ酸残基が一致する領域は認められませんでした。

続きまして、4の3、4の4、4の5の(1)は記載のとおりでございます。

少し飛びまして、17ページをお願いいたします。

発現プラスミドpHYT2Aopt上の90塩基以上で構成されるORF検索を行いました結果、挿入DNA領域を含むORFは合計で148個ヒットしております。これらがコードするアミノ酸配列につきまして、相同性検索及びアレルギー誘発について調査をしております。NCBIのblastpによる相同性検索を行いましたところ、26個のORFがコードする推定アミノ酸配列について相同性を有する配列が認められたものの、その中に毒性タンパク質は含まれておりませんでした。

続きまして、AllergenOnlineデータベースを用いましてアレルギー誘発性の調査を行いました結果、目的タンパク質でありますPcCGT全長をコードするORF以外について、80ア

ミノ酸残基ごとの相同性検査について、同一性が35%を超えるアミノ酸配列は認められませんでした。また、8アミノ酸残基が一致するアミノ酸配列も認められませんでした。

以上のことから、発現ベクターpHYT2Aopt上に存在する目的以外のタンパク質を発現する可能性のあるORFについて、毒性及びアレルギー誘発性を有するタンパク質が産生されることは考えにくいとしております。

続いて18ページ、(3)でございますが、意図する挿入領域は発現プラスミドの全塩基配列であり、宿主においてはプラスミドの状態では保持されます。

(4)は記載のとおりでございます。

続いて、4の6. DNAの宿主への導入方法です。発現プラスミドpHYT2Aoptの*B.subtilis* NTI04 (pDATSK) 株への導入はプロトプラスト法により行い、テトラサイクリン耐性、かつカナマイシン感受性となった形質転換体を選抜しております。次に、酵素生産性の安定化を企図しまして、●●●の形質転換を●●●により行いまして、*B.subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を取得しております。

4の7は、記載のとおりでございます。

続いて、第5、組換え体に関する事項でございます。

まず、5の2の(2)です。4行目、「また」で始まる場所ですけれども、*Paenibacillus campinasensis*由来シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの生産菌用組換え体の生産菌株では、ゲノムDNA上の*spoIIAC*が*cat*に置換されておりました。この領域はISK01株の有する当該領域と同一の配列と考えられることから、ISK01株の当該領域をシーケンズ解析して得られた塩基配列のうち、*cat*領域上流、下流についてORFの検索を行いました。その結果、*cat*上に存在するものが16個、*cat*とその周辺領域と接合部を含むものが7個の合計23個のORFが認められる結果となりました。blastpによる相同性検索では、13個のORFがコードするアミノ酸配列に相同性が認められるアミノ酸配列は存在しましたが、その中に毒性タンパク質は見いだされなかった。また、AllergenOnlineによるアレルギー誘発性調査については、既知のアレルゲンのアミノ酸配列との同一性が35%を超える領域が認められる、あるいは連続する8アミノ酸残基の一致が認められるORFは存在しないという結果になりました。

以上の結果から、*spoIIAC*の*cat*への置換により生じた23個のORFによって有害なタンパク質が生産される可能性は低いと推測されるとしております。

続いて、第6でございます。こちらは記載のとおりでございます。

続いて、第7の1でございますが、T2-CDAは、諸外国において販売、使用された実績はございません。

続いて、第7の2、組換え体の残存でございますが、T2-CDA製造では、凝集処理及び固液分離後に●●●フィルターろ過を実施することから、組換え体の残存はないと考えられる。また、T2-CDAの組換え体の残存確認試験をプレート培養法により実施したところ、T2-CDA中に組換え体は認められなかったということでございます。

第7の3、非有効成分の安全性に関する事項でございますが、組換え体*B.subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt)株の培養工程における培地の原料及び組換え体の代謝産物が考えられますが、培地用原料は従来の食品添加物の製造に用いられてきた原料である。宿主の*B.subtilis* ISW1214株が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、本株から*spoIIAC*を*cat*に置換し、*trpS*を欠失させ、発現プラスミドを導入した生産菌株が有害生理活性物質を生産するとは考え難い。

以上のことから、製造に由来する非有効性成分に安全性の問題はないと考えられるとしております。

続いて、7の4でございます。こちらの「また」で始まる第2パラグラフでございますが、T2-CDAサンプルについて活性測定及びタンパク質濃度測定を行い、PcCGTの比活性から製剤サンプル中の有効成分の純度を推定いたしました。結果は●●●%ということでございます。

7の5は記載のとおりです。

第8ですが、第2から第7までの事項により、安全性の知見が得られるとしております。

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、この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。大部ではありませんので、このどこからでも結構です。

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼという酵素は面白い酵素でして、デンブンをエンド型で切断する α アミラーゼの中には、切断するだけでなく切った端を別のグルコースのところに鎖に結合する、いわゆるトランスフェラーゼ活性を持っているものがございまして、その中で、結果として環状のシクロデキストリンにつくるものが報告されていまして、これが反応条件等の条件がございまして、こういうものは好アルカリ性の菌から見つかっています。

これは基本的に日本発の技術でして、一度環状になりますと逆反応が基質にはなりませんので、結果的に一方的にデンブンをシクロデキストリンができるという大変おいしい反応でして、これが発見されたおかげでシクロデキストリンの製造原価が100分の1に下がったという40年以上前の技術ですけれども、これのおかげで練りわさびとか、それこそラーメンの粉の調味料など、ありとあらゆるものに使われるようになってきているという経緯がございます。

この技術はそれ以降も次々から磨かれていきまして、今回も生産性などからこの酵素が狙上に上がっているということです。

事前の資料の確認のところ、私から申請者に2つほど質問をさせていただきまして、一つは申請書の書き方の問題なのだけれども、CDP、シクロデキストリンの推定摂取量は本人全体の最大最大推定摂取量になっていきますけれども、これは建前上は本申請品が日本でシェア100%を占めた場合、つまり、全て置き換わった場合という規定だったと思っております。

ので、そういうふうに直していただければということです。

ということで、記載内容を改めたい、申請要旨を修正すると返事が来ております。

それから、次の質問なのですが、これでできるシクロデキストリン、グルコースは非常に親水的だけれども、環状になると内側が全部疎水的になるので、穴の中に香料だのなんだの疎水的な分子を溜められるのですが、グルコース6個のものが α シクロデキストリンでして、これがミニマムで、7個のものが β 、8個のものが γ となっています。8個以上は難しいようで、 α と β が実用化されているのですが、本申請書の中に出来上がるものが α シクロデキストリンなのか、 β シクロデキストリンなのか、その辺の記述がありませんでしたので、製品はどのようなものができるのか質問したところ、●●●。

それから、あらかじめ申請書に目を通した〇〇〇からも業者のほうに質問をしていて、回答が返ってきております。

申請要旨の8ページで、従来添加物と同様の反応性を持つとあるけれども、従来品と本組換え添加物では反応性が同様であることを何らかの試験で確認しておるのかと。それから、酵素の生産性が向上していると簡単に記述してありますが、これを示す根拠があるのかと質問されております。

回答が返ってきておりまして、反応性の確認試験として従来添加物及び本組換え添加物について可溶性デンプン基質を用いた糖化試験を実施したと。糖化反応物中の総シクロデキストリンの生成量、それから、 α 、 β 、 γ シクロデキストリンそれぞれの存在比が同等であることを確認していると。申請要旨9ページの図7に記載のとおり、従来品と組換え添加物の有効成分は●●●同一のアミノ酸配列を示しておりますという回答が返ってきております。

〇〇〇、この回答はいかがでしょうか。

〇〇〇 私は、差し支えがなければ、どうせだから添付書類に最低そのデータを示してほしいと思っています。

〇〇〇 データを持っているのだったら添付してくればいいのにとということですよね。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 多分申請者をお呼びすることになるかと思しますので、その辺は御指摘いただければと思います。

〇〇〇 安全性に直結するというわけではないけれども、一応は比較してくれということはあるので、持っていれば。

〇〇〇 回答は返ってきていますけれどもね。

それから、申請書の14ページにある加熱式のところは。

〇〇〇 それは、よく読んでいたら書いてありますね。だから、このコメントは引っ込みます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それから、20ページ、第7の3、本組換え添加物、これは酵素ですが、日本の食品添加物

公定書の規格基準を満たしているのか。満たしているのであれば、それを示すデータはあるのかと。やっているのだろうけれども、そのデータを示していないということですよね。

〇〇〇 この回答を見ると、実はなかなか微妙な話で、これは日本で初めてというか、世界で初めて申請をこの調査会に出しているの、恐らく実生産の工程は確立していないようです。これは、実際のところ初めてやるというケースがあるので、だから、実際のデータはここには出していないと答えてきています。こういうものに対して、今までこの調査会で評価してきたものは、ほとんどは欧米で既に出していて、実生産を既にやっているものなので、諸外国からの申請品は実生産での製品のデータを添付するのが定例化している。時々ないものもありますが、大体定例化しているのだけれども、厚労省マターともいえる話なのだけれども、ラボスケールデータでも示していただきたくところです。

〇〇〇 申請時点でフルスケールでやっていないというのは、確かに事情としては理解できるので、その辺は業者に直接くぎを刺していただければとは思いますが、現時点ではそこまでやってなくても安全性そのものは確認できるかなと思います。

それから、申請書の10ページ、ベクターに関する事項、これは〇〇〇の方から事前に質問していただいたもので、pHYT2Gというプラスミドが出てくるけれども、これは平成26年1月に認可されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼにおける発現ベクターであることを要旨にも記載することという御指摘でございました。

御指摘を受け、内容の追記修正をさせていただきたいということで、PcCGTの発現プラスミドの構築には平成26年1月に認可を受けた株を利用して生産されたBcCGTを使用したと記述を直すという回答が来ております。

少々説明をはしりましたけれども、〇〇〇のところにこの回答書は行っているかと思うのですが、御確認できましたでしょうか。

〇〇〇 確認できました。

既に承認済みのものが途中にある場合は、それを書いていただけると、そこまでは承認されているからいいよねという形ですと読めるので、今後もずっとそういうふうにしていってもらえたらありがたいなということで指摘させていただきました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。そういうことですよね。

これはもともとのプラスミドはたしかpHY300PLKというタカラバイオか何かから売っていたものをベースに作っているもので、そこから1段階か2段階行ったものが先ほど〇〇〇から指摘のあったもので、そこまでは既に安全性を確認しているの、ということで、この申請書の書き方から見て、彼らはまだ申請書を書くのに慣れていないかなという感じなのですが、その辺はやはり書いてもらえると助かりますよね。

事前のやり取りとしてはこんなところなのですが、先生方、お気づきの点等はございませんでしょうか。よろしく願いいたします。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 また製造工程のところでは分からなかったところなのですが、1ページと8ページに今までとこの組換え体の製造工程があるのですが、20ページに最後の組換え体がある、ない話が出ていますのですけれども、そのところで、下から2段目の表記が分からなかったのです。下から2段目に●●●とあるのですが、これは何を●●●するのか分からなかったのです。その上の固液分離、フィルターろ過で、生産菌は全部除去している。20ページに、組換え体の場合も、コロニー試験をしたらここには菌体はなかったと書いてあるのですが、ここで●●●する。この●●●というのは何を●●●のかが分からないのです。

〇〇〇 これは私も読んでみても確かに書いていないので、申請者を呼ぼうと思いますので直接質問していただけますか。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 先生方、ほかにございますでしょうか。

この酵素は人口胃液では溶けるけれども、人工腸液では溶けないというデータが出ております。これで安全性等に問題はいかがでしょうか。〇〇〇の御意見をお伺いしたいです。

〇〇〇 〇〇〇でございます。

先ほどと同じような形になるかと思っておりますけれども、人工胃液のほうで15秒以内に完全に分解されているという結果が出ておりますので、安全性に関する懸念というのは低いのではないかなと思っております。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

これと熱処理のデータとかもありますが、この辺、例えば〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 特に問題はないのではないかとおもわれます。

1点あるとすると、ベクターのシークエンスの部分をしているのですけれども、次世代のデータとかというのはどうなのかなというところなのですが、そこは皆様の意見を伺えればと思っております。

〇〇〇 *Bacillus*のよく汎用されている株ではありますので、これのプラスミドの情報等は明らかで、組換え体の情報が明らかになれば、私は次世代シークエンサーのデータは特になくとも安全性は確認できるかなと思っております。

このメーカーの彼らだと、次世代シークエンサーをかけるのも実は結構一仕事なのかもしれないなと思うのですけれども、私はこれでおおむね安全性は確認できるのではないかと考えます。

先生方、この点について御意見はございますでしょうか。

〇〇〇あたり、いかがですか。

〇〇〇 今までの経験からいくと、このレベルのものは過去にこれで問題なかったからオーケーということだったと思うので、そういう経験的なことからこれは大丈夫だと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

2人しか意見を聞いていないけれども、〇〇〇、大体こんな感じで、今までの経緯からしてもそんなところなのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇 私もそこまでシーケンスを徹底しなくても情報は十分に開示されているように思いました。

〇〇〇 ありがとうございます。

先生方、ほかに。

それでは、申請者をお呼びして議論したいと思います。その場で何かお気づきのこと等がありましたら、直接申請者に質問していただければと思います。

では、準備ができるまで少しだけ休憩にいたします。

(休 憩)

〇〇〇 お待たせいたしました。申し訳ございませんでした。

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 日本食品化工株式会社の〇〇〇と申します。よろしくお願いします。

〇〇〇 同じく日本食品化工株式会社の〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 同じく日本食品化工株式会社の〇〇〇です。

〇〇〇 事前の質問に丁寧な回答いただきまして、ありがとうございます。

本製品は●●●という御回答で、●●●ということなので、差し支えなければ、●●●のかと、それから、用途等にどんな違いがあるのかなど、少し教えていただけるとありがたいです。

〇〇〇 本件は機密情報に関わるかもしれないので、その辺りに御配慮いただいた上で、組成のほうを開示させていただいてもよろしいでしょうか。

〇〇〇 結構ですが、我々、一応守秘義務がかかっています、サインもしております。

〇〇〇 申し訳ございません。恐れ入ります。承知いたしました。

では、●●●というようなものになります。

〇〇〇 ありがとうございます。●●●は、なかなか珍しいとお聞きただけです。

特に食品用途等で大きな違い等はあるものなののでしょうか。

〇〇〇 ●●●ものになります。

〇〇〇 ありがとうございます。

20ページで、この製品の純度について、比活性から純度を計算しておられまして、真面目だなど思っただけで、電気泳動のバンドのパターンから分析して推定したのもオーケーはオーケーなので、むしろ非活性で真面目に計算していただいても十分でございます。

それでは、〇〇〇のほうから先ほどのをお願いできますか。

〇〇〇 一つは、概要の8ページの遺伝子組換え添加物と従来の添加物の記述で、2行目に従来の添加物と同様の反応特異性を持つと書いてあります。これは、今の経過を聞いてい

ると、その辺は会社としてはあまり出たくないというような話なのかもしれませんがけれども、先ほど座長がおっしゃったように我々は守秘義務を持っていて、結局、私が確認したいことは、「同様の反応特異性を持つ」ことを示すデータがどうだったのかということ。これをデータとして示していただきたいなということがまず第1点。

それから、酵素生産性が向上しているとさらっと書いてありますけれども、これの根拠をデータで示していただくと非常に分かりやすく、そこはぜひ示していただきたいなと思っています。それがあわせて1点目です。

〇〇〇 1つずつ。

ということで、本調査会も非公開で行われていますので、ここでお話しになられた企業機密が漏れるようなことはございませんので、そこはお約束できますので、できれば御回答いただけると、我々も安全が確認しやすくなるということでございます。

〇〇〇 これは今この場でということですか。後ほど生データというような形で。

〇〇〇 この場での必要ございませんで、どこかでお示しいただけるとありがたいなというだけでございます。

よろしいですね。

もう一つ、次に。

〇〇〇 いずれにしても概要にお書きになったことは極力データを確認したいので、よろしくをお願いします。

それから、2つ目に関しては、私ども、安全性確認の中で遺伝子組換え添加物に関する事項、第7というところで、この概要だと20ページあたりの「製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」とか、「精製方法でその効果に関する事項」、それから、「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関する事項」というところで、通常の場合は、品質の確認として、日本だったら食品添加物の公定書の規格適合の試験結果を出していただきたいのですけれども、事前に確認した限りでは、これは初だと。日本で初めて、世界的に見ても初めて申請しているということで、実製造工程は恐らくまだ確立していないのと思うので、実製造によるデータがないという理由は分かりました。

ただ、実際に認められたら、とにかく実製造スケールの確立に当たっては、これは厚生労働省の問題だと思うのですけれども、最低限のこととして、必ず食品添加物公定書の規格適合というのは確認してください。それはお約束していただきたい。とにかくそれはお願いします。

以上です。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 そういう手続上の問題ですので、実生産にかかったところでしかるべく手続をよろしく願いいたします。

それでは、〇〇〇、●●●の件につきまして御質問をお願いいたします。

〇〇〇 概要にあった製造工程のことについて教えていただきたかったのですが、1ペー

ジにあります図1、アルカリCDアミラーゼ製造工程という図になります。あるいは8ページにある6ですが、こちらは組換え体で作った場合の製造工程。ここで、一番下から製品になる前に●●●というものがあるのです。この●●●というのは何を●●●する●●●なのか分からなかったのを教えていただきたかったのです。

〇〇〇 これに関しては、実際に製造に使っている組換え体については、●●●なのですが、その後の工程については、●●●という意味合いになります。

〇〇〇 そうすると、8ページにあるT2-CDA製造工程というのは組換え体の場合には必要ない。ないということはないですけども。

〇〇〇 そういうわけではないです。

●●●という考え方になるのですけれども。

〇〇〇 ただ、20ページに菌はなかったと書いてありますので、なぜだろうと感じてしまったので、たとえ漏れたとしても、●●●。それで安全性は変わってくると思うのです。

〇〇〇 こちらで申し上げている組換え体の残存はないということになります。ラボ品でのものになりますので、●●●のフィルターろ過をすれば組換え体自体は止まるということで、実工程のほうはその辺をしっかり担保するような形でフィルターを管理していくということになります。

●●●も当然あるようなものを想定しています。

〇〇〇 だから、20ページの説明のところか図6か、たとえ●●●というふうに書いてあると、●●●というのは確実だというのは分かりますが、組換えは来ない。

〇〇〇 組換え体をケアするために、●●●を入れているというわけではないという状況です。

〇〇〇 内容は分かりました。ありがとうございます。

〇〇〇 恐れ入ります。

〇〇〇 では、製品の管理上の念のためといった意味合いと考えてよろしいわけですか。差し支えなければ、●●●しておるのですか。

〇〇〇 ●●●です。

〇〇〇 ありがとうございます。そうではないかなと実は思っておりました。特に健康被害を及ぼすような残留の可能性とかは心配しなくていいようなものかどうかをお聞きしたかっただけですので、それは大丈夫ですね。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 ほかの先生方、せっかく申請者が見えていますので、お聞きになりたいこと等はございますでしょうか。よろしいですか。

それでは、お疲れさまでした。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、審議を再開したいと思います。

私としては基本的に欲しい答えはいただけたかなと思っているのですが、先生方、ただ

いまの質疑と、それから、全体を通して何か御意見、御懸念等はございますでしょうか。

先ほどの軽微な修正と、それから、●●●の件についてはもう少し目的について誤解のないよう分かりやすく書いていただくということを付け加えていただければと思うのですが、○○○、それでいいですね。あの書き方は分かりにくかったですよね。

○○○ 誤解を受けるといけないなと思いました。

もう一つは、今まで使っていた●●●ですから、多分安全なのでしょうけれども、むしろ●●●かなと。それで、私は単に●●●だけだったらまずいなと思ったのですが、今のことで内容は分かりましたので、これを読んだとか知った人が誤解しないような書き方のほうが安全だと思います。

○○○ 私もそんな印象を持ちましたので、先ほどの記述のところで、●●●の目的が誤解なく、●●●目的であるといった誤解のないような記述をしていただくように要請しようかと思います。

先生方、ほかにごございますでしょうか。

○○○、どうぞ。

○○○ 私、その辺り、こういうものの製造に関してあまり知らないのですが、御存じだったら教えていただきたいのですが、万が一みたいな形で表現されていたけれども、他社の場合も同様に製造のときに●●●ものなのでしょうか。その辺りを知っておきたいのです。

○○○ 私も全部知っているわけではないのですが、酵素製剤の場合は何らかの●●●というのは多分ないと思います。●●●と思います。●●●と思うけれども、こういうふうには●●●というのは製品にならないかと思いますが、先生方、何か御存じのことがございましたら。

○○○ またメーカーの方と話す機会があったら、それとなくリサーチしてみます。ありがとうございます。

○○○ それでは、本件については人の健康上の懸念はないと判定してよろしいでしょうか。御意思の表示をお願いいたします。

(同意の意思表示あり)

○○○ ありがとうございます。

皆さん御賛同いただきましたので、本件については安全上問題がないと判定したいと思えます。

引き続き、評価書案の審議に入りたいと思います。

では、事務局のほうからお願いいたします。

○○○ それでは、評価書案について御説明いたします。

評価書の束の31ページからシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼでございます。

こちらの36ページをお願いいたします。

まず、「I. 評価対象添加物の概要」です。本添加物は、*Bacillus subtilis* ISW1214株

を宿主として、*Paenibacillus campinasensis*由来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pHYT2Aopt を導入して作成した *B.subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼでございます。

続いて、「Ⅱ．食品健康影響評価」でございます。

1の1の(1)です。名称はCDA、基原は*P. campinasensis*、有効成分はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼでございます。

(2) 製造方法ですが、CDAは*P.campinasensis*を生産菌として用い、培養、精製、製剤化等の工程を経て製造されます。生産菌は精製工程で分離、除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼでは、アミロースなどの α -1,4-グルカンに作用し、環状 α -1,4-グルカンを生成する酵素であり、主にデンプンに作用させてシクロデキストリンの製造に用いられます。

(4) 摂取量でございます。こちらは記載のとおりでございますが、先ほどの申請者からの回答を受けまして、こちらも適切に修正させていただきたいと思っております。

続きまして、37ページ96行目からになります。2の(1)といたしまして、宿主は*B.subtilis* ISW1214株です。

(2) DNA供与体の種名ですが、*pccgt*遺伝子の供与体は*P.campinasensis*、*trpS*遺伝子の供与体は*B.subtilis* ISW1214株、*cat*遺伝子の供与体は*Staphylococcus aureus*でございます。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、*pccgt*遺伝子はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼをコードし、*trpS*遺伝子はトリプトファンtRNA合成酵素をコードいたします。これらの遺伝子を含む発現プラスミドを宿主に導入しております。*cat*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、二重交差相同組換えによりゲノムに導入されております。

3及び4については記載のとおりです。

続いて、5、組換え添加物の性質ですが、(1) 製品名はT2-CDA、有効成分はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (PcCGT) でございます。

(2) から(4) は記載のとおりです。

続きまして、6の(1)、141行目からですが、PcCGTと従来の添加物のアミノ酸配列は同一でございます。

(2) 組換え体と宿主の相違点は、*B.subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株はシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ産生能、テトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性を有している点でございます。

これらのことから、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をして、評価を行っております。

第2、宿主に関しては記載のとおりです。

第3、ベクターに関する事項でございますが、まず1です。発現プラスミドpHYT2Aoptの作成には、*Escherichia coli*由来のプラスミドpACYC177と*Staphylococcus faecalis*由来のプラスミドpAM α 1から構築されたプラスミドpHY300PLK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す。

続いて、第4でございます。

1の(1)は記載のとおり、(2)安全性ですが、*P.campinasensis*株及び*B.subtilis* ISW1214株には、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られておらず、国立感染症研究所「病原体等安全管理規程」においては、バイオセーフティレベル1に該当いたします。

続いて、2の(1)挿入遺伝子のクローニング及び合成方法に関する事項でございますが、*pccgt*遺伝子は*P.campinasensis*株のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列に基づき、*B.subtilis*での発現を最適化するために塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子でございます。*trpS*遺伝子は*B.subtilis* ISW1214株の*trpS*遺伝子をクローニングした後、塩基変異を導入した遺伝子でございます。

(2)は記載のとおりです。

続いて、(3)挿入遺伝子の機能に関する知見でございますが、①、②は記載のとおりでございます。

③物理化学的処理に対する感受性でございますが、まず、a.人工胃液に対する感受性ですが、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析を行いました。SDS-PAGE分析では試験開始後5秒以内に、ウェスタンブロットでは15秒以内に消化されることが確認されました。

続いて、b.人工腸液でございますが、SDS-PAGE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時間経過しても消化されない結果となりました。

最後に、c.加熱処理に対する感受性ですが、加熱による免疫反応性の変化についてELISA法を用いて分析した結果、酵素失活の条件であるpH4.0及び6.0、80℃の加熱処理により、1時間で抗PcCGT抗体の相対結合能が加熱前の3%以下にまで低下する結果となりました。

続いて、④既知のアレルゲンとの構造相同性です。PcCGT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当性検索を行いました結果、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が検出されましたが、PcCGTのアミノ酸配列は従来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼと同一であることから、上記既知アレルゲンは従来の添加物との相同性検索においても同様に検出された。連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかったという結果でございます。

以上から、PcCGTのアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられたとしております。

3、4、5の(1)については記載のとおりでございます。

続いて、295行目からになります。 (2)の項目です。発現プラスミドpHYT2Aoptの全塩基配列について、6つの読み枠でORFの検索を行いました結果、終止コドンから終止コドンまでで終結する連続する30アミノ酸以上の目的外のORFが挿入遺伝子領域に78個見

いただきました。これらのORFについて、タンパク質データベースを用いてblastpによる相同性検索を行った結果、26個のORFに相同性が認められましたが、既知の毒性タンパク質との相同性は見られない結果となりました。また、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、80アミノ酸で35%以上の相同性を示すORF及び連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされない結果となりました。

続いて、(3)ですが、意図する挿入領域は発現プラスミドの全塩基配列で、プラスミドの状態では保持されるということです。

(4)については記載のとおりでございます。

続いて、6でございます。宿主への導入方法についてでございますが、発現プラスミドpHYT2Aoptをプロトプラスト法により中間株に導入後、テトラサイクリン耐性及びカナマイシン感受性を示す形質転換質体を選抜し、●●●を形質転換することによって、*B.subtilis* NTI05 (pHYT2Aopt) 株を得ております。

7については記載のとおりでございます。

続きまして、第5、組換え体に関する事項です。

5の2の(2)をお願いいたします。

ORFの検索でございます。宿主ゲノムに導入された*cat*領域及びその下流の接合領域について検索を行いました結果、23個検出される結果となりました。まず、毒性タンパクの相同性を検索するため、タンパク質データベースを用いて検索を行った結果、既知の毒性物質との相同性は認められない結果とありました。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、80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すORF及び連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされない結果となりました。

第6、製造原料及び製造器材については記載のとおりでございます。

続いて、44ページ375行目からが第7の項目になります。

まず、1ですが、T2-CDAは海外での販売及び実績はございません。

続いて2、T2-CDAに生産菌の残存がないことを培養法により確認をしております。

3から5については記載のとおりでございます。

第8、第2から第7までにより、安全性の知見が得られているとしております。

評価書案の説明は以上です。

○○○ ありがとうございます。

では、ただいまの評価書案につきまして御意見、コメント等を賜りたいと思っておりますが、お気づきの点等はございますでしょうか。細かい字句等の修正にお気づきでしたら、また後ほど事務局に伝えていただければと思っておりますが、これでよろしいでしょうか。

(同意の意思表示あり)

○○○ ありがとうございます。

それでは、少々修正の宿題が残りましたので、その点につきましては私と事務局と、それから、申請書につきましても関係する先生方と私と事務局とで確認をした上で、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います。

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。

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223回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。