

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第199回) 議事録

1. 日時 令和2年3月19日（木） 13:58～16:17

2. 場所 食品安全委員会中会議室（赤坂パークビル22階）

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

・ JPBL004株を利用して生産されたホスホリパーゼ

・ JPBL005株を利用して生産されたホスホリパーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、安達専門委員、岡田専門委員、小関専門委員、
小野専門委員、児玉専門委員、手島専門委員、山川専門委員

(食品安全委員会)

佐藤委員長、川西委員

(事務局)

小平事務局次長、箴島評価第二課長、蛭田評価情報分析官、
飯塚課長補佐、森山評価専門官、山口係長、松井技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

①JPBL004株を利用して生産されたホスホリパーゼ

②JPBL005株を利用して生産されたホスホリパーゼ

6. 議事内容

○中島座長 皆さん、おそろいようですので、ただいまから第199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。

この季節ですので、御欠席の先生が多くて、本日、所用により飯島専門委員、橘田専門委員、近藤専門委員、樋口専門委員、吉川専門委員が御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるJPBL004株を利用して生産されたホスホリパーゼ、JPBL005株を利用して生産されたホスホリパーゼの安全性についての審議です。

では、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します。

○飯塚課長補佐 それでは、議事次第に基づきまして、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、座席表、専門委員名簿、「食品健康影響評価に関する資料」、及び机上配付資料となっております。

なお、これら以外の参考資料については、ファイルに綴じまして専門委員の皆様の机の上に置かせていただいております。本ファイルについては、調査会終了後、回収させていただきます、次回また配付いたします。

不足等ございましたら、事務局までお知らせください。

また、本日は、新規品目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。

○中島座長 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、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。

○飯塚課長補佐 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いただ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（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。

○中島座長 御提出いただいております確認書について、相違等はございませんでしょうか。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、新規品目であるJPBL004株を利用して生産されたホスホリパーゼについて、審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうからお願いいたします。

○山口係長 申請書の説明に入ります前に、審議の進め方について御説明いたします。冒頭で御紹介いたしましたが、本日は申請者のノボザイムズ ジャパン株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書の御審議をいただいた後に、申請者に対する質問事項等があれば整理していただきたいと思います。その後に説明者に入室していただき、質疑応答を行います。質疑応答終了後、説明者には退室していただき、審議を再開していただくこととしております。

では、まず1品目め、JPBL004株を利用して生産されたホスホリパーゼ、青色の紙フア

イルの御準備をお願いいたします。

まず、こちらの2ページをお願いいたします。第1-1- (1) といたしまして、名称はホスホリパーゼ、反応特異性はリン脂質のエステル結合を加水分解するものです。

(2) 製造方法ですが、基原が動物の場合は、臓器から抽出して製造されます。また、微生物の場合は、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、既存のホスホリパーゼは、A1、A2、B、C、Dの5つに分類されていて、種類に応じて複数の用途に使用されます。今回の申請品目は、ホスホリパーゼCでございまして、その記載は3ページの8行目からでございますが、植物油の精製に使用されます。ホスホリパーゼCによりリン脂質のリン酸ジエステル結合を加水分解することで、脂質からホスホリルコリンやホスホリルエタノールアミンといった水溶性のリン酸化合物を切り離し、リン酸化合物を水溶性の不純物として油分から分離することができ、また、リン酸化合物の遊離によりジアシルグリセロールが生成することから、精製油の収率が向上するという利点がございます。

より具体的には、既存のホスホリパーゼCは、植物油精製の一工程、脱ガム工程に使用されます。脱ガム工程は植物油中の不純物であるリン脂質等を水和させ、遠心分離で油分から除去する工程であり、粗油に少量の水を加えて加温し、極性脂質を水和除去するのが一般的ということです。しかし、リン脂質の残存量が多く、後工程としてアルカリ精製が必要であり、既存のホスホリパーゼCを脱ガム工程に添加することにより、リン脂質が水和性の高いリン酸化合物と非極性のジアシルグリセロールに変換され、不純物の水和除去の効率を高めることができます。

続いて、4ページをお願いいたします。(4) 摂取量でございます。本申請品目であるlipPsp2が全ての植物性油脂の製造に用いられ、かつ100%残存すると仮定して、我が国におけるヒト体重1kg当たり一日最大摂取量の計算を行った結果、0.25 μ g TOS/日/kg体重と算出されております。

続いて、1-2、宿主等の項目です。

(1) ですが、宿主は*Bacillus licheniformis* Ca63株でございます。

(2) 挿入DNAの供与体の由来ですが、こちらは隣のページの表1に記載されているとおりです。表1を見ていただきますと、まずlipPsp2.s遺伝子は、*Pseudomonas* sp. 62186株由来、prsA遺伝子は、*Bacillus licheniformis* Ca63株由来でございます。これは細胞膜タンパク質であるPrsAタンパク質をコードし、菌体外分泌タンパク質の分泌量を高める働きがございます。JPBL004株においては、●●●の相同組換えによる欠失のために使用されましたが、異種遺伝子を含まないため、セルフクロニングに該当いたします。

そのほか、プロモーター、ターミネーターについては記載のとおりです。

次のページをお願いいたします。6ページ、(3) ですが、こちらは図2に示しておりますとおり、●●●の遺伝子を欠失させまして、●●●の遺伝子座にマーカー遺伝子を挿入

して、●●●の遺伝子座に遺伝子発現カセットが挿入されまして、その結果、●●●の遺伝子が欠失しております。●●●の遺伝子座に対しましては、遺伝子挿入が行われなかったため、マーカー遺伝子を欠失導入用ベクターを用いて欠失させております。また、●●●の遺伝子座に対しまして、*prsA*遺伝子発現カセットを挿入しております。

続いて、少し飛びまして、14ページをお願いいたします。1-3でございますけれども、*B. licheniformis*は自然界に広く分布しており、動物や人間の食べ物の中にも存在しており、同種は長年にわたって食品や食品用酵素の製造に安全に使われてきた経験がございます。

1-4、宿主の構成成分等ですが、*B. licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質等を生産するという報告はございません。また、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ーレベル2や3には分類されておらず、リスク群分類の1に分類されるということでございます。

1-5、こちらが組換え添加物の性質等でございますけれども、(1)有効成分は、ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼC、反応特異性は、イノシトールリン脂質のsn-3位のリン酸ジエステル結合を加水分解し、1,2-ジアシルグリセロールとイノシトールリン酸を生ずるものでございます。

(2)製造方法ですが、こちらはお隣の15ページ、図6に示しているとおりでございます。培養液はろ過等の複数の工程を経て製品化されますが、生産菌は、除菌ろ過により生産物から分離除去されます。

続いて、(3)用途及び使用形態ですが、これは既存のものと変わりはありません。

(4)有効成分との比較ですが、既存のホスホリパーゼには、*Pseudomonas* sp.由来のものはございません。

次のページをお願いいたします。1-6・(1)従来の添加物との相違点ですが、まず、販売実績でございますが、海外のみで1年、既存のものは日本を含めて世界各国で20年以上ということです。

また、そのほかに性質として、至適pHや温度についても記載されております。

(2)組換え体と宿主の相違点ですが、JPBL004株では、*lipPsp2.s*遺伝子が●●●コピー、*prsA*遺伝子が●●●コピーとなっております。

続いて、18ページをお願いいたします。第2の宿主に関する事項ですが、2-1ですけれども、分類学上の位置づけについて記載しており、これまでノボザイムズ社において生産菌として使用されてきた実績があるということでございます。

2-2から2-4については記載のとおりです。

2-5ですけれども、*B. licheniformis*の近縁種は、*Bacillus subtilis*及び*Bacillus pumilus*で、これらは*B. licheniformis*と同様、非病原性かつ非毒素産生性とみなされており、毒性的物質を産生することが知られている*Bacillus cereus*等とは明確に区別されるとしております。

続いて、第3の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、

*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドであるpE194が用いられております。

3-2については記載のとおりです。

続いて、21ページをお願いいたします。第4の項目です。まず1- (2) 安全性に関する事項ですけれども、*Pseudomonas* sp. 62186株ですが、*Pseudomonas*属には日和見感染菌も含まれますが、*Pseudomonas* sp. 62186株における健康なヒトへの寄生性または感染性について報告はございません。

なお、*Pseudomonas*属は既存添加物であるリパーゼの基原生物であることから、食品用酵素の生産菌として長年用いられてきた実績があるとしております。

B. licheniformis Ca63株については、記載のとおりです。

その後、3つ目以降はプロモーターやターミネーター、その他のものについての供与体について記載されておりますが、こちらは記載のとおりでございます。

続いて、22ページをお願いいたします。2- (1) といたしまして、挿入遺伝子のクローニング、合成方法ですけれども、*lipPsp2.s*遺伝子は、*Pseudomonas* sp. 62186株が有するイノシトールリン酸ホスホリパーゼC遺伝子の遺伝子配列を基に合成しております。合成に当たっては、最適化のため、●●●が挿入されました。また、Ca63株及び*B. amyloliquefaciens* DSM 7株の α -アミラーゼの配列を組み合わせ合成したシグナル配列が付加されております。

(2) については記載のとおりです。

続いて、(3) 挿入遺伝子の機能ですけれども、ホスホリパーゼは、リン脂質分解酵素の総称でございますが、作用部位によって、A1、A2、B、C、Dの5つに分類されております。*lipPsp2.s*遺伝子からコードされるlipPsp2は、イノシトールリン酸ホスホリパーゼCに分類される酵素で、イノシトールリン脂質のグリセロール骨格3位のリン酸ジエステル結合を加水分解し、1,2-ジアシルグリセロールとイノシトールリン酸を生ずる反応を触媒する酵素でございます。

続いて、24ページをお願いいたします。まず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ですけれども、*Pseudomonas* sp. 62186株について、アレルギー誘発性を示唆する報告はございません。また、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、ヒットする文献は得られませんでした。

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、遺伝子産物であるlipPsp2を有効成分とする酵素製品について、アレルギー誘発性を示唆する報告はございません。また、こちらも文献検索を行っておりますが、ヒットする文献は得られなかったということです。

続いて、物理化学的処理に対する感受性でございます。まず、人工胃液ですが、SDS-PAGE、ウェスタンブロット分析で分析した結果、lipPsp2は30秒以内に消化されることが示されたということでございます。

続いて、隣のページの人工腸液ですが、こちらもSDS-PAGE、ウェスタンブロットで分

析した結果、6時間の処理ではほとんど消化されないことが示されたということです。

続きまして、26ページ、加熱処理に対する感受性です。pH7.0、30分の条件で調べた結果、60℃付近で完全に失活することが示されたとしております。lipPsp2製品の使用が想定される植物油精製における脱ガム工程では、酵素処理後には70～80℃における酵素の熱失活工程が設けられており、また、lipPsp2は洗浄水に移行し、精製油からは分離除去されます。

その下、既知のアレルゲンとの構造相同性ですけれども、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。①として、80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索、②として、連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索という2つの条件で検索を行った結果、既知のアレルゲンは検出されなかったということです。

続いて、4-3、4-4、4-5-（1）については、記載のとおりでございます。

少し飛びまして、30ページをお願いいたします。目的外のORFの有無についてでございますが、遺伝子導入用ベクターpJPV017について、相同組換えにより宿主に導入される領域は明らかであり、生産菌株の挿入遺伝子座のシーケンス解析により確認されております。そのため、全配列を対象としたORF解析は実施していないということです。宿主ゲノムとの境界部位を含む遺伝子導入座位のORF解析については、後ほど第5の項目で説明いたします。

続いて、（3）（4）については、記載のとおりです。

続いて、第4-6、導入方法です。まず、記載の●●●の遺伝子座に対しまして、マーカー遺伝子発現カセットを挿入し、次に、*lipPsp2.s*遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターpJPV017を菌体内に導入し、lipPsp2の産生量が高い形質転換体を選択したところ、申請書に記載の●●●の遺伝子座に遺伝子発現カセットが挿入されておりました。発現カセットの入らなかった●●●遺伝子座のマーカー遺伝子を除去するために、欠失導入用ベクターを菌体内に導入すると、これらの遺伝子座のマーカー遺伝子が除去されております。なお、異種遺伝子がこれらの遺伝子座に残存するため、●●●遺伝子座と同様の安全性の確認を行っております。

ここで、机上配付資料を御覧ください。まず机上配付資料1なのですが、申請書の33ページに該当しまして、調査会の前に児玉先生から御指摘を受けまして、社内文書と申請書の記載に齟齬があるのではないかとということで申請者に確認を取りましたところ、社内文書のほうが正しくて申請書が間違っていたということでした。そのため、下線部の箇所を修正してもらい、今回配付しております。

それでは、ファイルに戻っていただきまして、34ページ、4-7でございますけれども、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、遺伝子導入用ベクター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ておられません。

続いて、第5の組換え体に関する事項でございます。5-1は記載のとおりです。

2- (1) シークエンス解析について記載されております。挿入領域の塩基配列はシークエンス解析により確かめられ、その結果、●●●の遺伝子座に遺伝子発現カセットが合計で●●●コピー挿入されていることが明らかになっております。また、●●●遺伝子座のマーカー遺伝子が削除されていることも示されております。さらに、これらの挿入領域に抗生物質耐性遺伝子が存在しないことも明らかになっております。

同じページの35行目から36行目にありますとおり、各サンプルについて50程度の冗長度を担保するため、約200～400万のリードが生成され、実際の冗長度は43ということでございました。

続いて、39ページをお願いいたします。5-2- (2) 遺伝子導入におけるORFの有無についての記載ですけれども、6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンに挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFとして定義して検索を行った結果、●●●の遺伝子座において、●●●ORFが検出されております。これらのORFのアレルギ－誘発性及び毒性の可能性を調べるために、既知のアレルゲン、毒性タンパク質との相同性検索を行っております。

まず、40ページの上からが、既知のアレルゲンとの相同性検索の結果です。①及び②の2つの条件で検索を行った結果、アレルゲンは検出されないという結果でございました。

続いて、その下、毒性タンパク質との相同性検索でございます。E-value<0.02を指標にして行った結果、重複したものをまとめますと、41ページの16行目からあるとおり、2つのORFがデータベース上のタンパク質の相同性を示す結果となりました。まとめた結果が表10にあるとおりでして、ORFの1では3つ、ORFの2では1つのタンパク質と相同性を示しております。

その下から、それぞれのタンパク質の考察になっておりますが、いずれの考察の結果としましても、このタンパク質が毒性を有することは考えがたいと結論づけております。

42ページの30行目から、これらの結論になりますけれども、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、製品中にアレルギ－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して、全て長年安全に使用されてきた実績がある旨が記載されております。

続いて、44ページ、第7の項目です。7-1、諸外国における状況ですけれども、lipPsp2を有効成分とする酵素製品は米国などで2018年に販売が開始され、既存のホスホリパーゼと同様、植物油精製における脱ガム工程に使用されているということでございます。その下に具体的にデンマーク、米国の状況について記載されております。

続いて7-2、組換え体の残存でございますけれども、ドットプロット解析によりまして、lipPsp2にはJPBL004株由来のDNAが残存していないことが確認されております。

続いて、46ページ、7-3、非有効成分についての記載ですけれども、試験バッチの分析と我が国の食品添加物等の規格基準の比較を行っておりまして、いずれも基準値を満たす

という結果になっております。

7-4ですけれども、6行目から7行目にありますとおり、SDS-PAGE分離に引き続くCBB染色及びウェスタンブロットによる分析においてlipPsp2は●●●%程度の純度で検出されたということでございます。

7-5については記載のとおりです。

第8ですけれども、第2から第7までの事項により、安全性の知見が得られているとしております。

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います。ベクターに関する事項ぐらいいまで、20ページぐらいいまで、あるいは挿入DNA、遺伝子産物、発現ベクターに関するところまでを含めて34ページぐらいいまでで、まず、前半でございますでしょうか。

私から質問させていただいたものがございまして、この株は由来が*Pseudomonas* sp. 62186株となっております、実は微生物の場合は普通にスクリーニングすると好気性の菌がいっぱい取れてくるわけで、グラム陰性の好気性の菌だと*Pseudomonas*が分類の捨て場で、グラム陽性の桿菌で好気性だと*Bacillus*が捨て場、酵母だと胞子を作らない*Candida*が捨て場になっておりまして、要するに、非常に範囲が広いと。最近はその辺が見直されていて、*Pseudomonas*も*Alcaligenes*などいろいろ分かれておりますし、*Bacillus*も*Geobacillus*など随分分かれる方向にあり、そういう状況なのです。

ですから、*Pseudomonas* sp. 62186株、これは今分類しても*Pseudomonas*になるのかなど。実はそもそもそこから問題だったりもするので質問させていただいたのですが、この株は取れたところの由来の論文は送っていただきまして、海藻由来ですと。それ自体はさほど問題にはならないかと思うのだけれども、そのような答えが返ってきておりまして、少なくとも何が言いたいかというと、*Pseudomonas*属はいろいろな基原生物などで使われているから安全というのは、*Pseudomonas*と*Bacillus*と*Candida*については、それはあまり当てにならないということを指摘しておきたいと思います。

ただ、それとこれとは別で、だからといってこの株が問題だとは私は考えておりませんが、この辺について何かございますでしょうか。

ほかの先生方、ございますでしょうか。どうぞ。

○小野専門委員 本質的に間違っているとか、そういうわけではないのですけれども、6ページ、7ページのところを見てもらいますと、6ページの図2のところにDNA挿入時に欠失した遺伝子が、●●●伝子と書いてあるのですけれども、実際は当初は違う遺伝子座をターゲットとしていて、組換えのときに不都合が起こって、別の遺伝子が欠失した結果、これらの遺伝子が欠失しているということなので、その辺の表記がもうちょっと分かりやすいほうがいいかと思いましたので、そのように企業側に言っていただければと思います。

○中島座長 一遍ぐらい呼ぼうと思いますので、その辺を指摘していただければと。*Bacillus*のこの株、遺伝子をいじるのはそんなにやりやすい株ではないので、●●●標的があつて、実際に入つたのは●●●コピー、だけれども、欠失した遺伝子は●●●ということなのですが、それを読み取るにはこの文章を結構一生懸命読まないといけなくて、あまり親切とは言い難い。実は私もそう思いますので、その辺をつついてあげていただければと。これでいいのだと思われると、次からもこういう申請書が出てくると我々もいらつときますので、指摘してやっていただければと思います。

○小野専門委員 はい。

○中島座長 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。

ほかにございますでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 事前に質問させていただいて、回答を寄せてもらっているのですけれども、ホスホリパーゼも今回Cということで、基原が*Pseudomonas*ということで、それについて、それだけしか書かれていないので、反応特異性とか本当にホスホリパーゼはほかのものと比べてどうなのというのを事前に聞いたのですけれども、聞いた理由は、2ページにある従来品の基原のところにホスホリパーゼというのがある、そこに動物の腓臓とか、植物から取りましたとか、もしくは細菌から取ったものが当たりますと書いてあるのですけれども、細菌のところを見ると、*Bacillus*に限ると書いてあるわけです。今回は2つ出てきていて非常に分かりやすいのですけれども、片方のものは毒性タンパク質と一部類似性が出てしまったと書いてあるわけで、そうすると、ここで*Bacillus*に限ると書いてあるのは、*Bacillus*はそういうタンパク質を作らないよということを言っているとも取れるわけです。

だから、*Pseudomonas*はここに書いていないので、そこから取ったホスホリパーゼはここに対応するから、それでもういいのだというロジックでどうも回答が来ているような気がするのですけれども、ここに*Pseudomonas*を含むと書いてあれば僕も別に文句は言えないのですが、書いていないので、それは新規のタンパク質でしょうと僕は読み取ったわけです。新規のタンパク質ですよ。だから、それが本当にホスホリパーゼの中でどういうところに位置づけされてというのは、示してほしい。今回は片方のホスホリパーゼに毒性タンパク質が出てきてしまいましたよというのは出てきているわけなので、このくらいの類似性で、例えば*Bacillus*のホスホリパーゼとこのぐらい似ていて、ですから、ホスホリパーゼCですよというぐらいのことは言ってほしい。

この回答だと、端的に言ってしまうと、別にどの細菌から取ってきてもホスホリパーゼならばそれでいいでしょうという答えなのです。それはおかしいでしょうと。*Clostridium*から取ったら毒性タンパク質は当たってしまうわけですから、*Clostridium*から取らないよという話かもしれませんが、それはロジックとして僕はちょっと問題ではないかと思うので、収載されている菌種から取ったのであれば僕は別にいいと思っているのですけれども、収載されていない菌種から取ってきた場合は、それはホスホリパー

ぜのCでこういう位置づけですよというのは示してほしいと思うのですけれども、どうでしょうか、座長。

○中島座長 私も実は少々そう思います。既存品があるのになぜこれを使ったのかというところもポイントなので、既存品は多分動物のものでこれはバクテリアのだから、そういうものでないと、生産量等々にも問題もあったのだらうと思うのですが、生産量については別に我々が見るべき安全性に直接関係しないからいいのだけれども、基本的な性質とか、酵素活性とか、3次元構造まで要求するわけではないけれども、そういった基本的な情報は寄せていただかないと我々も判断できません。

確かにこの机上配付資料を見せていただくと、会社はもうちょっと情報を持っているのだと思うのだけれども、あまりちゃんと返してくれているようには私には見えないので、それで直ちに駄目かどうかというのはまた別なのだけれども、それについて指摘は厳しくしておきたいと私も思うのですけれども、川西先生あたり、この辺はいかがお考えですか。

○川西委員 私は前から思っていたことですので。それは指摘したほうがいいと思うのですけれども、この製品については社内文書の18の**Characterization**●●●書いてある。また、●●●に関しては書いてあるので、今までの他のものよりはいいかと思っはいるのです。

だけれども、児玉先生がおっしゃっていただいたのに意を強くして、ホスホリパーゼの場合はとにかく食品添加物公定書の成分規格が広いストライクゾーンなのですが、組換え製品の場合は特定の遺伝子を取り出して、発現させているのだから、そこはきちんと確認しておいていただくという姿勢でいくべきではないかと。

これからは天然の物に対して改変などをしたものも出てくるのではないかということは大いに予測されるので、その辺のものの**Characterize**、これは厚労省側がすべき対応という見方もあるかもしれないし、安全性の評価かどうかというのはいろいろな議論があるのですけれども、私はもともとこういうものの品質は安全性確保のためという意味もあると思っていますから、もうちょっと**Characterization**をはっきりさせていただく。児玉先生がおっしゃったようなところまで行っていれば、それはぜひともこれから安全性評価でもそのような点は確認したほうがいいのではないかと思います。

○中島座長 そういった点、申請者をお呼びすることになると思いますので、そこで議論をして、きっちり伝えていただくようにしたいと思います。

ほかにございますでしょうか。

では、最後まで含めて、第8の組換え体に関することまででございますでしょうか。

どうぞ。

○川西委員 先ほど言及させていただいた社内文書の18を見ていて、これは私が今までここ1年半ぐらいで見たものの中では一番ちゃんとしているなと思ったのですけれども、ただし、1つ質問があって、この文書は全体が18ページありますが、12ページに●●●が書いてあります。これはどういうことだということで、いろいろな答えが想定されるのだけ

れども、一応、●●●と。そこは確認しておきたいと思います。

○中島座長 それは直接聞いていただけるのがよろしいかと思いますので、よろしくお願いいたします。

ほかにアレルゲンと安全性等々、手島先生、いかがでしょうか。

○手島専門委員 24ページの人工胃液のところなのですけれども、細かいところではあるのですが、●●●ですけれども、●●●がありまして、恐らく●●●だ思うのですけれども、これについて説明をしておいていただければと思いました。人工腸液では分解しないということなので、人工胃液でちゃんと消化されているということで、●●●。

○中島座長 直ちに問題になるほどの量かとは思いますが、お聞きいただければと思います。

○手島専門委員 説明だけ入れておいていただければ。

○中島座長 安達先生、岡田先生、いかがですか。

○安達専門委員 私からは特にございません。

○岡田専門委員 先ほど座長がおっしゃったことと重複するところがあるのですけれども、*Pseudomonas* sp. というきちんと同定していないものではあるのですが。

○中島座長 特許法の定めですと、属名までは決めないと特許が取れないのです。だけれども、種名まで決めることは求められていなくて、そのうちの例えばX何とか株とか、株が特定できればこれで特許は成立しますので、だから、多くの場合、企業の方たちは有用な株が取れたときに、それ以上に余計な情報をライバルに与えないためというものもあるのかと思うのですけれども、属名までであるとSpeciesにしておいて、種名はいつまでたっても決めないというのは実はよくあることです。

それ自体が特にいけないということではないのだけれども、そうすると、当然今みたいな問題が発生するのね。これが種名まで決まっていれば、今度は属が分かれたときに、この株は何属から何属になったというのは同時に決まるので、私の先ほどのような質問は発生しないのだけれども、属名しか決めていないでそのまま特許はこれでオーケーだからと言っていくと、私に今のような言いがかりをつけられることになるということなのです。その辺をこの申請者の方に味わっていただこうかなと思っているわけです。

○岡田専門委員 *Pseudomonas*は皆さん御存じのように幾つか病原体も含まれておりますし、緑膿菌などではホスホリパーゼも病原因子になっておりますので、ほかにも幾つかの菌でホスホリパーゼというのは細胞内核酸などに関わる重要な病原因子になっておりますので、多分そういう菌ではないと思うのですけれども。

○中島座長 *Pseudomonas*だから基原として安全でと、それは納得がいかないでしょう。

○岡田専門委員 そうですね。あと、そういうものでBSL2病原体ではないということを示してもらいたいなと思っております。

○中島座長 私も同感です。ほかにございますでしょうか。どうぞ。

○川西委員 ちょっと趣味的なことになってしまうかもしれないのですけれども、先ほど

の社内文書18を見ていて、●●●ですけれども、その辺り、どうしなくてはならないという質問ではなくて、どうしているのかということで質問だけさせていただければと思います。

○中島座長　そういうために申請者をお呼びしていると思いますので、申請者がいないと質問事項だけ文書で送ることになるので、今みたいなことが議論できないと思いますので、聞いていただければと思います。

ほかにございますでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員　これは安全性と関係がなくて非常に細かい話ですけれども、修正だけしてもらえればいいかと思うのですが、22ページで、*Lactococcal bacteriophage*のところインテグラーゼのことが書いてあるのですけれども、これは多分趣旨からいうと、表1に対応するのではないかと思うのです。挿入DNAの供与体に対応するのではないかと思うのですが、その趣旨からいうと最後に残るのはattRなので、インテグラーゼ云々ではなくて、attR配列のことを書いたほうが趣旨に合う。

同様に、28ページに第4-3- (3) で、その他の挿入遺伝子の発現制御に関わる云々のところに、*cryIIIA*と*amyL*があるのですけれども、評価書にはこの部分にattRが入っていて、評価書のほうがいいなと思っていて、申請書のほうにもここにattRがちらっと載っていたほうがいいなと。非常に細かいただの修正なので、修正だけ入れておいてもらえればよろしいかと思います。

○中島座長　これは組換えるとattRに形が変わるというタイプのものなので、最終的に残っているものが表記されるべきだと私も思います。

ほかにございますでしょうか。

それでは、ここで申請者をお呼びするところなのですが、本日、次のものがJPBL005株、これは申請者は同じ、宿主は同じ、酵素も同じくホスホリパーゼC、ベクターも同じ、組み込み方法も大体同じで、同じようなところに入っている。違うのは基原の微生物、事実上、要するに、基原だけという状況ですので、まとめて審議して、御説明いただいて議論して、申請者には一度だけ来ていただくことにしたいと思いますのですが、よろしいでしょうか。

では、引き続き、JPBL005株について説明をお願いいたします。

○山口係長　それでは、緑色のファイルのほうを御用意ください。先ほどの004株と共通する項目も多いので、違う点を中心に説明させていただきます。

まず、2ページをお願いいたします。1- (1) 名称はホスホリパーゼ、反応特異性はリン脂質のエステル結合を加水分解するものです。

(2) (3) は先ほどと同様でございます。

続いて、(4) 摂取量でございますけれども、lipBt1が全ての植物性油脂の製造に用いられ、かつ100%残存すると仮定した場合、ヒト体重1kg当たり一日最大摂取量の計算を行った結果、2.1 μ g/日/kg体重と算出されております。

続いて、1-2ですけれども、(1) は先ほどと同様、*Bacillus licheniformis* Ca63株でご

ざいます。

(2) 挿入遺伝子の供与体ですが、こちらは表1にありますとおり、一番上の行になりますけれども、*lipBt1.s*遺伝子の供与体は、*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525株ということで、そのほかについては先ほどの品目と同様でございます。

続いて、6ページをお願いいたします。(3) 挿入DNAの性質でございますが、こちら、図2に示しておりますとおり、宿主に対しまして●●●遺伝子を欠失、そして、*lipBt1.s*遺伝子発現カセットを挿入しており、その際に●●●遺伝子が欠失しております。

続いて、少し飛びまして、13ページをお願いいたします。組換え添加物の性質等ですけれども、有効成分はホスホリパーゼC、反応特異性はリン脂質のsn-3位のリン酸ジエステル結合を加水分解し、1,2-ジアシルグリセロールとリン酸化合物を生ずるものです。

(2) は記載のとおりです。

14ページ、(3) 用途及び使用形態は既存のものと変わりはありません。

(4) 有効成分との比較ですけれども、*Bacillus*属は既存のホスホリパーゼの基原として認められていることに加えて、*lipBt1*は既存のホスホリパーゼと同様に食品中のリン脂質を加水分解する酵素でございます。

15ページ、16ページについては記載のとおりです。

17ページが宿主の項目です。

18ページ、第3のベクターに関する事項は、先ほど同様なので割愛いたします。

20ページ、第4の項目でございます。1-(2) 安全性に関する事項でございますが、記載されている供与体は先ほどと同様なので、説明は割愛いたします。

2-(1) 挿入遺伝子の合成方法に関する事項です。*lipBt1.s*遺伝子は*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525株が有するホスホリパーゼC遺伝子の遺伝子配列を基に合成しております。合成に当たっては最適化のため、●●●置換されております。また、分泌シグナルをコードする遺伝子配列である*Bacillus clausii*の*aprH*遺伝子の配列が付加されております。

(2) について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説明ですけれども、23ページをお願いいたします。1) 2) については、先ほどと同様に文献検索等を行っておりまして、結果については記載のとおりです。物理化学的処理に対する感受性試験でございますが、まず、人工胃液はSDS-PAGE、ウェスタンブロットで分析した結果、試験開始後2分以内に完全に消化されることが示されております。

続いて、人工腸液ですけれども、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットで分析した結果、*lipBt1*は6時間の処理中に徐々に消化されるものの、完全には消化されないことが示されております。

隣、加熱処理に対する感受性ですけれども、pH7.0、30分の条件で調べた結果、60℃までは約100%の活性を維持しますが、70℃以上で急速に安定性を失い、80℃以上ではほと

んど活性を維持しないということです。lipBt1製品の使用が想定される植物油精製における脱ガム工程では、酵素処理後には70～80℃における酵素の熱失活工程が設けられており、またlipBt1は洗浄水に移行し、精製油から分離除去されます。

4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンの構造相同性ですけれども、①、②の2つの条件で相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンは検出されなかったということです。

続きまして、4-3、4-4、4-5- (1) までは記載のとおりでございます。

29ページをお願いいたします。4-5- (2) 目的外のORFの有無についてですが、遺伝子導入用ベクター、pJPV019において、相同組換えにより宿主に導入される領域は明らかであり、これはJPBL005株の記載の●●●遺伝子座のシーケンス解析により確認されております。

(3) (4) は記載のとおりでございます。

続いて、第4-6、こちらも先ほどと説明は同様なので割愛いたしますが、修正点としまして、机上配付資料2を御覧ください。こちらも同様なのですが、社内文書と申請資料の記載に齟齬があるという指摘を児玉先生から御指摘いただいたために、申請者に確認を求めたところ、机上配付資料2のような修正が出てまいりました。

では、ファイルに戻りまして、4-7については、こちらは記載のとおりです。

34ページをお願いいたします。5-1は記載のとおりです。

2- (1) でございますが、挿入領域の塩基配列についてシーケンス解析を行っており、その結果の記載がされております。●●●遺伝子座に遺伝子発現カセットが合計で●●●コピー挿入されていることが明らかになり、また、●●●遺伝子座のマーカー遺伝子が削除されていることも示されております。さらに、これらの挿入領域には抗生物質耐性遺伝子は存在しないということも明らかになっております。

35行目から36行目にありますとおり、冗長度は50ということでした。

少し飛びまして、38ページをお願いいたします。5-2- (2) では、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。6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンに挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義して検索を行った結果、●●●遺伝子座において●●●ORFが検出される結果となりました。

これらの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して、まず、アレルゲンのほうですが、①、②の条件でヒットするものはなかったということです。

毒性タンパク質のほうですけれども、40ページをお願いいたします。11行目からになりますけれども、重複をまとめると2つございました。それらと相同性を示すタンパク質というものが表10にまとめられておりますが、左から3つ目の列の#6、7というところでは、相同性が90%以上認められる結果となっております。

続いて、42ページをお願いいたします。非常に相同性が高かったホスホリパーゼCについて、申請者のほうが詳細に考察をしてきておりまして、42ページの部分の差し替えに相

当するのですけれども、机上配付資料4を御覧ください。こちらも児玉先生から御指摘を受けたので、もう少し詳細に申請者に追記していただいたところです。このホスホリパーゼCですけれども、ガス壊疽の原因菌である病原性細菌 *Clostridium perfringens* の α -toxin を構成する酵素であることが知られており、これと構造相同性を示したものと考えられるということです。

α -toxin は370アミノ酸から成る亜鉛結合型の金属酵素で、宿主細胞膜に結合いたします。 α -toxin の立体構造の解析の結果、ホスホリパーゼC活性を有するNドメイン、細胞膜結合能を有するCドメイン及びNドメインとCドメインを結合するループドメインから構成されることが明らかになっております。主要な作用としましては、細胞膜上のホスファチジルコリン並びにスフィンゴミエリンを直接加水分解する作用及び細胞膜上のGi型GTP結合タンパクを活性化することによって宿主細胞内のリン脂質並びにスフィンゴミエリン分解経路が活性化される作用の2つがあり、いずれも細胞膜の破壊による細胞死を引き起こします。

しかし、全てのホスホリパーゼCが毒性を有しているわけではなく、細胞膜結合能を持つCドメインが毒性の発現に必要であることが明らかになっているということでございます。

その後、下線部がファイルに書いてあるものからの追記箇所になります。Cドメインは、8本のストランドから成る逆並行の β サンドイッチ構造を有し、カルシウムイオンと特異的に結合する。カルシウムイオンによって活性化された α -toxin は、Cドメインが細胞膜の脂質二重層に結合し、Nドメインが細胞膜を構成するリン脂質に作用することで細胞膜を破壊し、毒性を示す。Cドメインは詳しく研究されており、カルシウムイオン及び細胞膜と結合するCドメイン中のアミノ酸残基も同定されていて、Cドメインは α -toxin が毒性を発現する上で重要な役割を果たしていると考えられる。一方で、Cドメインを有しない、Nドメインのみを有するホスホリパーゼCは、毒性を示さないと考えられるということでございます。具体的な知見として、病原性細菌である *B. cereus* のホスホリパーゼCは、 α -toxin のNドメインに相当する構造は有するものの、Cドメインに相当する構造は有しないことが明らかになっている。

したがって、ORF1の安全性を考察するために、毒性を持つ細菌のホスホリパーゼCでは最も詳しく研究されている *C. perfringens* の α -toxin とORF1のアミノ酸配列を比較し、ORF1が細胞膜結合ドメインであるCドメインに相当する構造を有するかを確認した結果、そのような配列は有していないことが明らかになったということです。また、ORF1は毒性を示さない *Bacillus cereus* のホスホリパーゼCとほぼ全長の286アミノ酸で90.6%と非常に高い相同性を示しております。これらのことから、ORF1からタンパク質またはlipBt1が細胞膜結合能を持つ可能性は低く、 α -toxin のような毒性を示すことはないと考えられるということでございます。

続いて、少し飛びまして、45ページをお願いいたします。第6の項目ですが、こちらは

記載のとおりです。

46ページ、第7のまず1、諸外国における認可状況ですけれども、2018年に米国などで販売が開始されたということで、デンマークや米国の状況について記載されております。

7-2、組換え体の残存ですけれども、ドットプロット解析によりまして、JPBL005株由来のDNAが残存しないことが確認されております。

48ページ、7-3ですけれども、こちらはいずれも食品添加物等の我が国の規格基準を満たす結果となっております。

続いて、7-4でございますけれども、こちらは机上配付資料3を御覧ください。一部修正しておりまして、こちらも児玉先生のほうから事前に御指摘いただいたので、純度の部分について確認してもらったところ、●●●%というように修正されて出てまいりました。

7-5と第8については記載のとおりです。

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います。33ページの宿主ベクター、発現ベクター、遺伝子産物、挿入DNAぐらいのところまででございますでしょうか。

こういうように同じ酵素が2つ続いて出てくるとなぜか気がつくのですけれども、摂取量については、どちらも用途は同じで油の脱ガム化で、摂取量はJPBL004株のほうは0.25 μ g TOS/日/kgで、005株のほうはTOSではなくて摂取量2.1 μ g/日/kgで、何で同じように算出してくれなかったのかなと思うし、TOSのものとこんなに差はつくものだったかなと。その辺だと思うのですが、実はTOSとは何だっけと、分かったような分かっていないようなでもあるのですけれども、この際、勉強したいので、事務局で詳しい方がいらっしゃったら教えていただけるとありがたいのですが。

○山口係長 酵素の場合はいつもTOS換算として、Total Organic Solidsの略で、たしか水分やミネラル分といったものを除いた値になっております。一応、ここの値が違うところなのですけれども、iPadのファイルの1_01というものも御参照いただきたいのですが、恐らく緑のほうはTOSという言葉が抜けているだけだと思われますので、こちらに修正させてもらおうと思います。

値が違うのは、●●●、ホスホリパーゼが1_01の●●●と聞いております。

○中島座長 ●●●とこちらも聞いておりますので、ならいいかなと思うのだけれども、そうすると、こういう違う書き方をするのは意味があるのかなとか、その辺のところですね。だから、●●●ということなのですね。

○森山評価専門官 多分、記入漏れというのが正しいかと思うのですけれども、計算はTOSで計算しているのですが、005のほうは4ページの19行目ぐらいから製品の5%で0.05g TOSの計算ではしているのですけれども、最終的な最大摂取量の2.1 μ gのところはTOSというのが抜けていたので、本当はここに記載させないといけない話だったのかなとは思

ます。

○中島座長 そうなのかなと思うのだけれども、そもそも酵素だったらTOSと単なる摂取量とそんなに差がつくはずはないので、そんなにめっちゃめっちゃに純度が低いわけではないので、そこが疑問だなと思ったわけです。ですから、これはまともにいったら、そうしたら、実際にこのオーガニックな成分が10分の1ぐらいしかないとか、そういうことになってしまうので、そういうわけではないのだよねということを申請者にも確認を取りたいなということです。

どうぞ。

○川西委員 このTOSというのが、今、確認してみますと、総有機固形分という用語で日本語だと言うらしくて、先ほど事務局が説明したように、100から灰分のパーセントと、水分のパーセントと、さらに賦形剤その他の製剤成分を引く。だから、製剤によっては結構いろいろ入っているケースはあるかなと思いました。

○中島座長 つまり、水も抜くのかな。どうなのでしょう。その辺が実はよく知らなくて、重要なのは、実際にそのオーガニックなタンパクの成分なので、だから一般にTOSが使われているのだと思うのですけれども、そこそこの純度のあるものであれば、そもそもTOSと通常の摂取量とそんなに差がつくはずがないので、だから不思議に思ったのです。この辺については確認してみたいと思います。

ほかにございますでしょうか。

では、最後まで含めて、今度はこの株については、毒性のある *Clostridium* のガス壊疽菌のホスホリパーゼと相同性があったということで、かなり気を使って一生懸命調べてきていただいている、その上、さらに児玉先生の指摘で、もう一踏ん張り気合を入れて情報を寄せていただいているという感じで、この場合、ドメインが違うということが明確になっているので、まあいいかという気はするのですけれども、その辺、先生方の御意見をいただければと思います。

安達先生、岡田先生、この辺についていかがでございましょうか。

○安達専門委員 私としましては、こちらの申請者がまとめたほうの資料で、Cドメインは有していないということで毒性を示さないと考えられているという主張は、そのまま認めてもいいのではないかと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

岡田先生はいかがでしょう。

○岡田専門委員 机上配付資料4のほうで、ガス壊疽菌との比較を詳しく述べられているのですけれども、表10で単純に見ますと、炭疽菌のほうが高い相同性を示しているようではあるのですが、炭疽菌もCドメインとNドメインのところの構造が同じようなことなのか、あまり言うところがないところはあるのですけれども、見ますと、炭疽のところは93.4%と書いてあるのですが、こちらについてもうちょっと調べたほうがよくないのかなと。

○中島座長 それでさらに申請者から資料が出てきているのですけれども、これでおおむ

ね御納得いただけるのか、それともこれではまだ不足とお考えになるのか、その辺の御意見をお聞きしたいと思うのですが。

○岡田専門委員 炭疽のほうはどうかというのがこちらに書かれていないのだと思うのです。この配付資料4のほうも。より相同性の高い炭疽のことももうちょっと書かれているといいのではないかと思います。

○中島座長 炭疽菌の情報ということでしょうか。

○岡田専門委員 この表10を見ますと、ORF1のホスホリパーゼCの相同性が一番アミノ酸長で高いのが93.4%の炭疽ではないかと思うのです。

○児玉専門委員 これは多分、参考文献22というものが根拠になっておりまして、参考文献22で書いてあるのは、*Cereus*菌は無毒と書いてあって、炭疽菌については触れられていないので、彼らにしてみると書きようがないのですね。ですから、無毒と言われている*Cereus*菌でこういう構造になっていて、それとこれを比べてこうですから、こうですというロジックでやっているの、炭疽菌のほうは確かに高いのですけれども、アミノ酸長は286で全く一緒なので、数個アミノ酸がより合致したという形で考えれば、危険性ということではそんなに判断が変わるものではないかなと思います。ただ、*Cereus*菌と比べている理由は、根拠としている論文がそういう記述になっているということだと思います。

○岡田専門委員 分かりました。

○中島座長 多分、炭疽菌を飼うのは大変なので、そんなに簡単にデータが取れないのだと思うのです。物すごい設備を使わないと炭疽菌は飼えませんから、そういうことかと思っています。ですから、彼らなりに精いっぱいデータは集めてくれていると思います。

先生方、ほかによろしいでしょうか。

どうぞ。

○川西委員 これは何とも言えないなと思っている部分なのですが、こちらの酵素というのは至適の温度が割と高く、15ページで、至適温度も既存のホスホリパーゼより高かったりして、まず、この酵素を使って製造した最終製品のほうに入ってくるかということも併せて考えてみた場合に、人工胃液での感受性という点では、胃液では壊れてくれないそうだと。腸液のほうでは、微妙に残るよね、完全には分解しないよねと。次のところで、加熱処理に関する感受性というところが、結局、この工程は70～80℃における熱失活工程で、先ほど評価した製品では、これで完全に壊れてくれる。でも、こちらのほうは結構微妙で、●●●。申請者からは、この先に実際に使われるときに精製油から分離除去する工程があるからということの説明が追加されているわけですが、この辺りが、このぐらいだったらいいと考えるのか。

例えば、酸で壊れるということでのよいのかという問題で、私は昔、錠剤から薬が胃で溶出するという溶出試験で、日本人の場合は高齢者で酸性がpHが6ぐらいの人でも大勢いて、問題が生じる場合もありますよといって、ジェネリック医薬品の評価のときにそういう人たちを対象にして血中濃度をはかるべきというようなことを言っていた時代に、そういう

ことに当たっていたもので、アルカリで残ってしまうというのは、酸で壊れると言っている、それは必ずしも分解は保証はしないよねということも言えるかなと思って、全体でいって、このぐらいの感じでこのポイントはいいのだろうか。

○中島座長 ただ、害虫抵抗性のとか、ああいうものも人工腸液では全然分解されませんので、そういうものもほかのいろいろな情報を勘案してオーケーにしてきた会議もありますので、直ちに駄目ということにはならないということによろしいかなと。

○川西委員 気になるのは、熱処理のところ。

○中島座長 ですから、むしろそこは直接お聞きいただければと思います。

○川西委員 分かりました。

○中島座長 *Bacillus*を使って外来タンパクを作るときは、*Bacillus*はプロテアーゼの塊で、いろいろなプロテアーゼを作りますので、*Bacillus*の生産というのは、このプロテアーゼとの戦いになるのです。*Bacillus*は弱塩基の条件が好きなので、これの作る酵素に全部耐えないといけないので、*Bacillus*で物を作らせようと思ったら、それでこの人工腸液ごときのもので分解されるようでは、多分製品としては作れないだろうと思います。酸には弱いので、だから、人工胃液ではばらばらになるようなこのホスホリパーゼでも、実際に製品まで持っていけたのだと思うのですけれども、宿主が*Bacillus*ですから、誰がどう開発してもこうなるだろうと思います。

○川西委員 私はその点は、そういうものもあるだろうと。ただ、加熱処理に関する感受性というものがどうなのかなと思って、メーカーに聞いて。

○中島座長 お聞きになられればよかろうと思います。

○川西委員 これでストップをかけるほどのことではないのでしょうかけれども、ただ、この製品の場合は、2018年でデンマークで承認で、使用実績はありますよということが言えるのかどうかというのは。

○中島座長 それでは、申請そのものは単純ですので、おおむねこの議論は尽きたと思いますので、申請者をお呼びして議論したいと思います。その場で思いつかれたことでもお聞きになっていただければと思います。

004株については、これが*Pseudomonas*かどうか。2016年に分離された株なので、それから後は、たしか*Pseudomonas*の再分類は行われていないと思うので、現状でも大丈夫だろうとは思いますが、それから、ホスホリパーゼの書き方の問題、従来品との性質の差など、細かいことは幾つかあったと思いますので、それぞれの先生方からお聞きいただければと思います。

では、申請者を呼んでいただけますでしょうか。

○山口係長 すみません。今日、御欠席の飯島先生からコメントをいただいております、第7-2なのですけれども、004株、005株両方なのですが、ドットプロット解析の図がそれぞれ書いてあるのですが、申請書のほうは見にくい、社内文書のほうを見ればどこまでが見えるのかというのは分かりやすいのだけれども、ここはもう少し濃くできないかという

御指摘もいただいております。

○中島座長 ごもつともではありますが、これは要旨なので、社内文書のほうで裏づけが見られればいいかなと私は思います。

では、用意できるまで少し休憩にいたします。

○中島座長 お忙しいところをお越しいただきまして、ありがとうございます。

それでは、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。

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

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

○中島座長 今回、004株と005株をまとめて審議しておりますので、質問も両方飛ぶかとも思いますが、よろしくお願いいたします。

004株のほう、これはもともとが*Pseudomonas* sp. とだけで、*Pseudomonas*と申しましてもしささか広うございますので、本菌の62186株についての安全性、挿入に関する情報が少しでも分かるといいなと思ったのですけれども、寄せていただいた情報では特には、ただ、この株は海藻から取られているということですね。この論文は割と新しい論文で2016年、これは分離されたのはいつですか。細かく読んでいないのですが。

○高橋氏 正確な時期は分かりかねるのですけれども、確認しまして、またそこは御返答をさせていただきます。

○中島座長 何が言いたいかというと、大昔からすると、2016年に対して数年前くらいなのかというところがポイントで、例えば2014年、2013年、その辺であれば、それから後は*Pseudomonas*の再分類はたしかなかったと思うので、このままでもいいかなということなのですか。

○高橋氏 弊社は世界各地から土壌であったり、こういう海藻から、いろいろな菌を持っておりまして、分離してきて社内に置いていますので、もしかしたら古い菌をずっとスクリーニングして、実は単離したのはすごく古かったということもあり得ますので、そこら辺は確認して回答させていただきます。

○中島座長 古いと、この株は今でも*Pseudomonas*かどうか微妙なのですよ。*Pseudomonas*はあまりに分類の幅が広過ぎて再分類がされていて、今、*Alcaligenes*とか、いろいろなものが分かれておりますので、それに、*Pseudomonas*の中にも病原菌等もございますので、単に*Pseudomonas*がこういった菌の酵素原として使用されている点を指摘するとされるのは、それは構わないのです。いいと思うのですが、だからといって安全ということをはのめかすような記述は控えていただけないと、それだけでどこが安全なのだという事になるかと思いますが、よろしくお願いいたします。

○高橋氏 おっしゃるとおりかと思います。

○中島座長 それから、そこまでこちらが立ち入るべきではないとも思うのですが、もしも種名まで決められるのであれば、後に再分類が行われて属名等が変わっても、そこで自

動的に種名までついていきますので、この属だからどうこうという問題は発生しなくなるのですけれども、そういったことも本社に伝えていただけるとありがたく思います。

○高橋氏 本社のほうに伝えます。

○中島座長 それから、この004株と005株、どちらも同じ目的でこの油脂の精製に用いたということで、脱ガム化に使うということなのですが、使用量、摂取量の計算ですと、そうすると、004株のほうは $0.25 \mu\text{g TOS/日/kg}$ で、005株のほうはTOSではなくて $2.1 \mu\text{g/日/kg}$ になってございまして、TOSだからといって1桁も違うものかなというところが、たまたまこの申請が2つ並んでいたもので気になったのですが、この辺はいかがですか。

○高橋氏 確認させていただきますが、含有量が恐らく005のほうが多いというところで桁数が変わっている可能性が考えられます。また確認させていただきます。

○中島座長 004株のほうはTOSなので、関係ないものというか、灰分等々を除いている数字だから、でも、それにしてもこんなに違うとなると、005株のほうは9割が混ざり物なのかと。ストレートに読むとそうなるのですが。

○高橋氏 計算方法自体はどちらともTOS計算でしているはずだと思うのです。ですから、確かに桁が。

○中島座長 005株はTOSという字が抜けていたりしないですか。

○高橋氏 恐らく、そこは抜けているかと思います。

○中島座長 それだけで直ちに問題というわけではないとは思いますが、その辺、きちんと調べて御回答いただけますでしょうか。

○井上氏 1-2の下に計算式が出ております。全く一緒の計算式で、含有量は片方が0.61%で片方が5%になっております。それでこれだけ値が変わっているんで、TOSは確かに表記が抜けておりますが、そういう理由でこれだけ、1桁違うとなっております。

○中島座長 これで間違いないということが確認できればそれでよろしいので、できれば両方ともTOSにさせていただいて、そういう心配を少なくしていただけるとよりありがたいかということでございます。

先生方、それでは、児玉先生から。

○児玉専門委員 004株のほうで、事前に質問させていただいたのですが、ホスホリパーゼCであるということで書かれているのですが、今回、基原が*Pseudomonas*ということで、例えば004株の2ページにあります第1-1- (1) の名称、基原及び有効成分というところで、従来の添加物のホスホリパーゼの基原が書かれているのです。ここに載っている基原のものであれば、そのホスホリパーゼでいいですというロジックはあるのだと思うのですが、*Pseudomonas*はここに載っていないわけで、それで事前に、ほかにはっきりホスホリパーゼCと分かっているものとの類似性とか、そういう特徴について知らせてほしいということをお願いしたわけです。

端的に言えば、005株のほうは*Clostridium*のホスホリパーゼと一部相同性が出てしまっていて、そのディスカッションをやっているわけです。ですから、要するに、ここには*Bacillus*

属に限ると書いてあるわけで、*Bacillus*属のホスホリパーゼの中にはそういうものは多分ないと思われるということなのですが、それならばいいのですけれども、今回は*Pseudomonas*なので、ホスホリパーゼCとしての特徴を備えていますとか、こういうところに位置づけされますとか、ほかのホスホリパーゼCの特徴はちゃんと有していますとかと。ホスホリパーゼの中でもヘビ毒とか、ああいうものはホスホリパーゼを含みますので、単純にホスホリパーゼだから安全というわけでは全然ないわけですので、そういう基礎的なCharacterizationを少し載せてほしいということです。

○高橋氏 確かにおっしゃるとおりかと思います。弊社の考え方としましては、例えば基質であったり、反応、作用がホスホリパーゼCであれば、それはホスホリパーゼCだろうと分類しているのですけれども、可能な限り基質特異性であったり、活性測定法も弊社のほうでつくっておりますので、そういうデータを載せて、ホスホリパーゼCであるということをお示しできればと考えております。

○児玉専門委員 活性測定もそうだけれども、類似性なども、どうせアミノ酸配列は分かっているわけですから、そんなに大した手間ではないので、少し載せていただければと。

○高橋氏 はい。

○中島座長 では、小野先生。

○小野専門委員 JPBL004株、005株も同じなのですけれども、6ページ、7ページのところに、まず図2に組換えのストラテジーが載っていると思うのです。そして、隣の7ページにある表2にマーカー遺伝子をどこに挿入しているのかが書いてあるのですけれども、ここで見ると、一見するとマーカーを●●●遺伝子座に入れると書いてあって、図2を見ると、抜け落ちている遺伝子のところは●●●遺伝子になっているということがあって、よくよく後のほうを読み返してみると、どうしてこのようになっているのかという経緯は分かるのですけれども、これを一見しただけでは分からないので、ここを分かりやすく記述をしてもらえたらと思います。

○高橋氏 おっしゃるとおりかと思います。検討させていただいて、最初のほうに分かりやすいような記述、記載、図表を用意させていただきます。

○中島座長 この株の場合は少々手の込んだことをしないといけなかったもので、まず、マーカーを入れて、組換えて、最終的にどうなったのかはちゃんと分かりやすく出ているから、その点は安全性の審査はできるのですけれども、経過がなかなか分からなくて、標的が●●●あって、実際に入ったのは●●●コピーだけれども、欠失した遺伝子は●●●あってと。これがかなり頑張って読まないといけないので、その辺は順を追っていったって読んで分かるように、最終的にどうなったかが分かるように申請書を作っただけだと、ノボザイムズさんはこの先もきっと出てくると思いますので、そこをぜひよろしくお願いしたいと思います。では、手島先生。

○手島専門委員 004のほうも005のほうもそうなのですけれども、004ですと、24ページの人工胃液の消化性試験のほうなのですが、確かにlipPsp2、ホスホリパーゼCの3万3000

の分子量のところは0.5分でほとんどなくなっているのですが、●●●と思うのですけれども、こういうバンドが残るということで、少し説明を入れていただければと思いました。

○高橋氏 説明を入れさせていただきます。

○中島座長 では、川西先生、どうぞ。

○川西委員 社内文書の18は●●●で、これは私を見せていただいて、非常に参考になって、さすが御社だとは思ったのですが、他の製品でもいつもこのぐらい載せてほしいなと一つは思いました。ただ、2点質問があって、1点目は、この全部で18ページの文書の中で、12ページに●●●というような表記になっているのですけれども、これの心は一体何なのか。●●●。その辺りをちょっと。

○高橋氏 ToxbatchのCharacterization Reportでは、あまり深く考察してはいなくて、出た情報をずっと列挙している形で、本来はインターナルな社内文書でして、●●●という意味合いで、要旨のほうでは書かせていただいています。ここら辺の考察があまり社内文書の18には書いておりませんで、誤解を与えるようなことになってしまって申し訳ないのですが。

○川西委員 ●●●と言うことと理解しました。

もう一つの質問は、これはどうしたらとか、こうしたらということではなくて、この18を見ていると、●●●はご説明いただけますか。

○高橋氏 ●●●、例えば。

○川西委員 ここで、まず●●●聞かせていただきたいのですけれども。

○高橋氏 これに関しましては、●●●。

○川西委員 分かりました。勉強になります。ありがとうございました。

○中島座長 先生方、ほかによろしいでしょうか。どうぞ。

○川西委員 このホスホリパーゼの005の后者のほうで、これは特に胃液、腸液で、胃液では分解される、腸液ではちょっと残ってしまうと。それから、もう一つ加熱処理に関する感受性というデータで、これは実際に植物油の精製では70～80℃で処理する工程があるという説明。それで、この25ページの安定性のデータを見ると、●●●と。この説明では、その後の工程で精製油から分離除去されると書いてあるのですけれども、それは何らかの根拠があって説明しているのですか。

○高橋氏 基本的に精製油に関しても、最終製品である油の品質にも関わってきますので、それはお客様といろいろな工程なども加味しながら、それが残らないようにというようにやっております。基本的に活性を持った酵素が油に残るような工程では、通常お客様のほうでもやりませんし、それは弊社もかなりお客様の工程によったり、いろいろ調整はしなければいけないのですけれども、ここは最終製品の品質というところで担保されていると。弊社だけの工程ではないので何とも言えないのですけれども、基本はお客様のほうで、もともと不純物を取り除くための酵素ですので、逆に不純物が多くなるということはありませんで、お客様によっては酵素が残ることに非常に懸念を持っている方がおられますので、

そこは品質管理としてお客様と弊社のほうでやっていると考えています。

○川西委員 では、実際にはそのように管理していると。場合によっては、●●●残らないことは確認するべしというようなことを規制側が条件として示すこともあるけれども、それには及ばないぐらいにちゃんとやっている。

○高橋氏 そうですね。

○川西委員 分かりました。ありがとうございます。

○中島座長 先生方、ほかによろしいでしょうか。

お疲れさまです。ありがとうございました。

○中島座長 おおむね期待された返事は聞けたのではないかと思いますので、それでは、議論を再開したいと思います。

これで特に御懸念等はいかがでしょうか。細かい点については後ほど追加の資料等を出していただいて、関係する先生と私とで確認したいと思いますが、特段、安全性については懸念はないと思うのですが、004株、005株、両方懸念なしと判定してよろしいでしょうか。先生方、よろしいでしょうか。

(首肯する委員あり)

○中島座長 ありがとうございます。

引き続き、評価書案に行きたいと思います。両方とも一気をお願いします。

○山口係長 それでは、まず評価書の説明、004株のほうからさせていただきます。

評価書案を束ねた冊子の1ページからが、まず004株のホスホリパーゼになりまして、こちらの6ページをお願いいたします。

まず、こちらの評価書案なのですが、一部下線を引いているところがございまして、こちらは事前に児玉先生からコメントをいただきましたので、それを踏まえて修正したものでございます。

まず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、*Pseudomonas* sp. 62186株由来のホスファチジルイノシトールホスホリパーゼC遺伝子を導入することで作製したJPBL004株を利用して生産されたホスホリパーゼでございます。本添加物は、イノシトールリン脂質のリン酸ジエステル結合を特異的に加水分解する酵素であり、植物油の精製工程において不純物除去を目的として使用されます。

続いて、Ⅱ．食品健康影響評価に関する事項でございます。1. (1) 名称はホスホリパーゼ、基原は動物の脾臓、糸状菌、放線菌、細菌など、有効成分はホスファチジルイノシトールホスホリパーゼCでございます。

(2) 製造方法ですが、基原が微生物の場合は、培養、ろ過、精製等の工程を経て製造されます。生産菌は、除菌ろ過により除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、植物油の精製工程における不純物除去を目的として使用されます。

(4) 摂取量、全ての植物性油脂の製造工程に使用され、最終製品中に100%残存すると

仮定した場合の最大一日摂取量は0.25 μ g TOS/kg体重/日でございます。

2. (1) 宿主は、*B. licheniformis* Ca63株です。

隣のページに行きまして、(2) DNA供与体の種名ですが、ホスホリパーゼ遺伝子の供与体は、*Pseudomonas* sp. 62186株、*prsA*遺伝子の供与体は、*B. licheniformis* Ca63株です。

(3) 性質ですけれども、*lipPsp2.s*遺伝子は、lipPsp2をコードし、*prsA*遺伝子は、宿主由来の菌体外分泌タンパク質の分泌量を高めるPrsAタンパク質をコードします。

*lipPsp2.s*遺伝子発現カセットをインテグラーゼにより、宿主ゲノムのそれぞれの標的遺伝子座に導入し、その際、一部の標的遺伝子座において遺伝子の欠失が確認されました。

なお、生産菌の作製に当たり、*aprL*遺伝子を含む複数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ております。その際、一部の標的遺伝子座において*prsA*遺伝子がゲノムに挿入されております。

3. 食経験等ですけれども、*B. licheniformis*は、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されております。

4. 宿主の構成成分等ですけれども、*B. licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティーレベル1に相当いたします。

5. 組換え添加物の性質ですけれども、製品名はlipPsp2、有効成分はホスファチジルイノシトールホスホリパーゼC、その後の(2) (3)は記載のとおりでございます。

(4) lipPsp2は、従来のホスホリパーゼCと同様に、食品油のイノシトールリン脂質のsn-3位のリン酸ジエステル結合を加水分解する酵素でございます。

続いて、6. (1) 添加物の相違点でございますが、基原並びに至適温度、pHが異なる点でございます。

(2) JPBL004株と宿主との相違点は、JPBL004株には*lipPsp2.s*遺伝子が複数コピー導入され、lipPsp2生産性を獲得している点、*prsA*遺伝子が導入されている点及びlipPsp2の生産性を高めるため複数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。

第2. 宿主に関する事項ですが、こちらは記載のとおりです。

第3. ベクターに関する事項ですけれども、遺伝子導入用ベクターpJPV017の作製には、*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドpE194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. ですけれども、1. (1) は記載のとおりです。

(2) 安全性についてですけれども、*Pseudomonas*属には日和見感染菌も含まれますが、*Pseudomonas* sp. 62186株にはヒトへの寄生性及び感染性の報告はございません。

*B. licheniformis*については、記載のとおりです。

10ページ、2. (1) クローニングに関する事項ですけれども、*lipPsp2.s*遺伝子は、*Pseudomonas* sp. 62186株由来のホスファチジルイノシトールホスホリパーゼC遺伝子の配列に基づき合成されました。野生型のアミノ酸配列と比較しまして、コドン最適化により1アミノ酸が付加されております。また、*B. licheniformis* Ca63株、*Bacillus amyloliquefaciens* DSM 7株由来の α -アミラーゼ遺伝子の配列を基に合成した分泌シグナル配列が付加されております。

(2) については記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。*lipPsp2.s*遺伝子がコードするlipPsp2は、イノシトールリン脂質のsn-3位のリン酸ジエステル結合を加水分解し、1,2-ジアシルグリセロールとイノシトールリン酸を生ずる反応を触媒する酵素でございます。

①挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、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。

②についてですけれども、こちらもlipPsp2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す報告はございません。

また、*Pseudomonas* sp. 62186株が産生するホスホリパーゼC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。

続いて、③物理化学的处理ですけれども、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った結果、両試験において試験開始後30秒以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。

続いて、人工腸液ですが、こちらもSDS-PAGE、ウェスタンブロット分析の結果、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たとしております。

続いて、加熱処理に対する感受性ですが、60℃、30分で酵素活性が消失することが示されたとしております。

続いて、④既知のアレルゲンとの構造相同性ですけれども、アレルゲンデータベースを用いまして、連続する80アミノ酸配列以上で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する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。

以上のことから総合的に判断し、lipPsp2はアレルギー誘発性を示唆する可能性は低いと考えられたとしております。

続いて、3. から5. (1) までは記載のとおりです。288行目は以前お送りしたものから修正しております。

(2)、300行目ですけれども、こちらは記載のとおり、5-2- (2) に記載してある旨を書いております。

(3) 遺伝子導入用ベクター、pJPV017上の意図する挿入領域は、*lipPsp2.s*遺伝子発現カセットの領域でございます。

(4) は記載のとおりです。

続いて、6. 導入方法でございます。宿主の各標的遺伝子座に、あらかじめマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えにより導入し、各マーカーにより選抜をしました。その後、遺伝子導入用ベクターpJPV017を導入し、インテグラーゼの作用によって*lipPsp2.s*遺伝子発現カセットを挿入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜しております。各標的遺伝子座においては、*cry3A*mRNA安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子、*int*遺伝子及びインテグラーゼ認識配列等が宿主ゲノムから脱落しました。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子についてですが、遺伝子導入用ベクターpJPV017はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主のゲノムからループアウトにより脱落しております。抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことを標的遺伝子座の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が、1. については記載のとおりです。2. (1) *lipPsp2.s*遺伝子が複数コピー、*prsA*遺伝子が挿入されていることが確認されております。

(2) ORFの有無についてでございますが、挿入DNAの5'近傍配列を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行った結果、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303個検出されております。

これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸配列以上で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アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンはございませんでした。さらに、既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、*E-value* < 0.02を指標として検索を行いました結果、2個のORFがデータベース上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とは考え難いタンパク質であったということを記載しております。

第6. については、記載のとおりです。

第7. は、まず諸外国における認可状況ですけれども、デンマークにおいて、食品用加工助剤のポジティブリストに収載されております。米国では2017年にGRASとして認証されております。

続いて、第7. の2. ですけれども、ドットプロット解析によりまして、*lipPsp2*製剤前の酵素サンプルには、組換えDNAが検出されないことが確認されております。

3. から5. 及び第8. については、記載のとおりです。

まず、004株の評価書の説明は以上でございます。

続いて、005株のほうのホスホリパーゼの評価書案について御説明いたします。

22ページをお願いいたします。先ほどと説明が重複する場所は、適宜割愛させていただきます。

まず、I. 評価対象添加物の概要です。本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63株を宿主としまして、*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525株由来のホスホリパーゼC遺伝子を導入することで作製しましたJPBL005株を利用して生産されたホスホ

リパーゼでございます。本添加物は、リン脂質のリン酸ジエステル結合を特異的に加水分解する酵素であり、植物油の精製工程において不純物除去を目的として使用されます。

続いて、Ⅱ．食品健康影響評価に関してでございます。1. (1) 名称はホスホリパーゼ、基原は動物の膵臓、糸状菌、放線菌、細菌など、有効成分はホスホリパーゼCでございます。

(2) (3) は先ほど同様です。

(4) 摂取量ですけれども、全ての植物性油脂の製造工程に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、 $2.1 \mu\text{g TOS/kg}$ 体重/日でございます。

2. でございます。(1) 宿主は先ほどと同様です。

(2) DNA供与体の種名ですけれども、ホスホリパーゼ遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525株でございます。

(3) DNAの性質、導入方法ですが、*lipBt1.s*遺伝子は、*lipBt1*をコードします。*lipBt1.s*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それぞれの標的遺伝子座に導入いたしました。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、生産菌の作製に当たり、*aprL*遺伝子を含む複数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ております。

3. 4. については、先ほど同様です。

5. 組換え添加物の性質等ですが、(1) 製品名は*lipBt1*、有効成分はホスホリパーゼCです。

(2) (3) は記載のとおりでございます。

24ページ、(4) ですけれども、従来のホスホリパーゼCと同様に、食品中のリン脂質のsn-3位のリン酸ジエステル結合を加水分解する酵素でございます。

6. の(1) 添加物の相違点ですが、基原並びに至適温度、pHが異なる点でございます。

(2) JPBL005株と宿主との相違点は、JPBL005株には、*lipBt1.s*遺伝子が複数コピー導入され、*lipBt1*生産性を獲得している点及び*lipBt1*の生産性を高めるため複数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。

第2. 宿主に関する事項、第3. ベクターに関する事項は先ほど同様なので、割愛いたします。

第4. の1. (1) については記載のとおりです。

(2) 安全性に関する事項、202行目ですけれども、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525株は、昆虫に対して殺傷効果を示す結晶性タンパク質を産生する微生物として知られ、この結晶性タンパク質はヒトや環境に安全な微生物殺虫剤として使用されております。

続いて、2. (1) クローニングに関する事項ですけれども、*B. thuringiensis* subsp.

tenebrionis DSM 5525株由来のホスホリパーゼC遺伝子の配列に基づき合成しました。野生型のアミノ酸配列と比較して、コドン最適化により1アミノ酸が置換されております。また、*Bacillus clausii*由来の*aprH*遺伝子の分泌シグナル配列が付加されております。

(2) については記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能ですけれども、*lipBt1.s*遺伝子がコードするlipBt1は、リン脂質のsn-3位のリン酸ジエステル結合を加水分解し、1,2-ジアシルグリセロールとリン酸化合物を生ずる反応を触媒する酵素でございます。

①、②については記載のとおりでございます。

③物理化学的处理でございますが、人工胃液に対する感受性ですけれども、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2分以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。

b. 人工腸液でございますけれども、SDS-PAGE、ウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、6時間においても完全には消化されないが、徐々に消化されることが示されたとしております。

c. 加熱処理でございますが、80℃、30分で酵素活性が消失することが示されたとしております。

続いて、④既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見ですけれども、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アミノ酸配列以上で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する80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。

以上のことから総合的に判断し、lipBt1はアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられたとしております。

3. とその後の5. (1) までは記載のとおりでございます。

(2) については、第5-2- (2) に記載しております。

(3) 意図する挿入領域は*lipBt1.s*遺伝子発現カセットの領域でございます。

(4) は記載のとおりです。

6. 導入方法でございますが、こちらは記載のとおりでございます。

続いて、7. 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けれども、遺伝子導入用ベクターpJPV019はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主のゲノムからはループアウトにより脱落しております。抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことを標的遺伝子座のシーケンス解析により確認しております。

その後、第5. の1. については記載のとおりです。

2. (1) *lipBt1.s*遺伝子発現カセットの標的遺伝子座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、*lipBt1.s*遺伝子が複数コピー挿入されていることが確認されました。また、遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素切断地図はシーケンス解析により明らかになっております。

(2) ORFの有無ですけれども、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検索を行った結果、6つの読み枠においてORFが合計で278個検出されました。

これらのORFと、まず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いました結果、一致するものはございませんでした。さらに、既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、E-value<0.02を指標として検索を行いました結果、2個のORFがデータベース中のタンパク質と相同性を示しましたが、いずれも毒性を有するとは考え難いタンパク質でございました。

第6. は記載のとおりです。

第7. 諸外国における認可の状況でございますけれども、デンマークにおいては食品用加工助剤のポジティブリストに収載されております。米国では2017年にGRAS認証されております。

第7. の2. ドットプロット解析により、lipBt1製剤前の酵素サンプルには、組換えDNAが検出され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す。

評価書案の説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案について、御意見、コメントを承りたいと思います。細かい字句等の修正につきましては、後ほど修正箇所を事務局まで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。

○川西委員 記述に「ホスホリパーゼは」というところと「ホスホリパーゼCは」というところがあるのですけれども、この辺りは意識して書き分けているのかしら。細かく見ると、例えば2つ目の22ページ目、有効成分は英語で書いてあったりしているけれども、何か意識して使い分けているのかしら。参考までに。「ホスホリパーゼは」と書いてあるところと「ホスホリパーゼCは」と書いてあるところとか。特段になれば、最終的に仕上げるときでもいいとは思いますが、整理した方がよいように思いますが。

○山口係長 例えば、使用方法とか、植物油の精製に結びつくところであればホスホリパーゼCと書かないといけないかと考えまして、そこはホスホリパーゼCと書いてはいるのですけれども、例えば、1. の(1)の名称や基原ですと、あくまでも申請書に基づいて作成したときに、特に基原の部分などは限定できるような書き方ができなかったのも、網羅的に書いていると。そういう意味では統一が取れていない部分もあるかと考えております。

○中島座長 ただ、申請のタイトルがホスホリパーゼになっているし、添加物としての公定書もホスホリパーゼとしかなくないで、全部ホスホリパーゼCにできてしまっている、それはまた別だと思います。おおむね、今の事務局のやり方でいいかなと思ったのですが。

山川先生、どうぞ。

○山川専門委員 ホスホリパーゼCというのは、この遺伝子を取ってきたのがホスホリパーゼCなので、その有効成分がホスホリパーゼCだから、この使い方についてはホスホリパーゼCだけれども、ホスホリパーゼの一般論の話のときにはホスホリパーゼで話をすればよいのではないのでしょうか。

○川西委員 ただ、実は前者の004株のほうは、ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼCとなっています。また、実際に今までのホスホリパーゼの評価書を見ていても、ホスホリパーゼとあったり、ホスホリパーゼCとなっていたり、ホスホリパーゼA1となったり、A2となっていたりしていて、これはまだ今のうちにはいいのだけれども、このペースで増えていったときに、厚労省とも相談しなくてはならないかもしれないのだけれども、その辺も多少は調整できる限りは意識して決めておいたほうがいいのではないかと。

○中島座長 ただ、それも例えばホスホリパーゼDになると、ホスファチジルイノシトールにしか効かないDとか、そういうものもございますので、これもまた事情があるので、今日のところはこのぐらいでいいことにしておかないと、とことんつじつまを合わせるのは難しいかと思えます。

どうぞ。

○小関専門委員 私も最初にこれを読んだときから、昔、たしかこれで引っかかったよねというのがあって、どこを切るかということについての話が、たしか随分前のもので、ホスホリパーゼで公定書のほうに載っているけれども、位置特異的にどこを切るかという話で混乱したことがあったと思うのです。それを基質特異性として限定するかしらないかとか何とか。たしか前にそういうものが何かありませんでしたか。2年か3年ぐらい前だと思うのです。

○川西委員 多分、ホスホリパーゼCだったのだけれども、既存品がホスホリパーゼA1というので評価書が書かれているものがあります。

○小関専門委員 何かありましたよね。

○川西委員 この点は気になって、今までの評価書を調べてみたことがあります但しはらのように思えます。このままとにかくその場の雰囲気というか、その場でやっていくと、後で混乱がおきないでしょうか。

○小関専門委員 あのときの議論は私もよくは覚えていないのですが、たしかA、B、Cと、今日はきれいに出ていますね。どこで切るかという特異性の話と、公定書でノミネートされている、これというのはどこを切るかということは書かれていないはずなのです。そのところでそごが生じたような記憶があるので、そこは事務局のほうで厚生労働省さんともお話をさせていただいて整理していただいたほうが、何かあのときに相当ぐちゃぐちゃしたような記憶があるのです。そうでしたよね。

○松井技術参与 2016年にノボザイムズからホスホリパーゼというものが出ていまして、これはタイトルはホスホリパーゼなのですが、実際はホスホリパーゼCで、既存の比較対

象がはっきりしていなくて、A1やA2の説明が載っていると。その後、2017年には違う会社からホスホリパーゼCというタイトルでホスホリパーゼCの申請が来ていて、この場合にも比較対象でいろいろ先生方が議論してくれたという過去があります。

○川西委員 この評価が終わったものは何々株で製造されたというものが入るから一社一品みたいなものなので、区別はつくのだけれども、ホスホリパーゼであったり、ホスホリパーゼCであったり、ホスホリパーゼA1と書かれているものなどがいろいろ混在しているなと思って、僕はどういう考え方でこれはやっているのだろうか、知っている人がいたら聞きたいなと思ったのです。

○中島座長 これは事例が積み重なる前は仕方がなかったと思うので、これ以降、ちゃんと整理していただければと思います。AとCとDは恐らく用途が違いますので、先々はちゃんと比較対象としても区別していかないと整合性が取れなくなると思うので、これまではいいにしても、先々はお願いします。

ほかに先生方、よろしいでしょうか。

それでは、評価書は問題ないということで、先ほどの指摘につきましては、事務局と私、それから、関係する先生で確認して、その後、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

それでは、JPBL004株、005株を利用して生産されたホスホリパーゼについての審議はこれで終了いたします。

議題（1）についてはこれで終わりたいと思いますが、議題（2）その他、事務局から何かございますでしょうか。

○飯塚課長補佐 特にございません。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、本日の議題についてはこれで終了でございます。

それでは、第199回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。お疲れさまでした。