

(別紙1)

1 背景

(1) Bt10とは

組換えDNA技術によって作出されたトウモロコシである「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシBt10」(以下「Bt10」という。)は、我が国において飼料としての利用を認めるため必要なすべてのデータをそろえた上での安全性評価(以下「フル評価」という。)がなされているBt11と同時期に開発された。しかしながら、商品化においては、Bt11が選択されBt10の開発が断念されたことから、Bt10については安全性評価が行われず、その申請に必要なデータも十分に蓄積されていない。

このような中、米国においてBt10が、Bt11に誤って混入して種子として販売されたため、2001～2004年の間に米国におけるトウモロコシの栽培面積の0.01%で栽培されたと報告された(別添1及び2)。

(2) 我が国の飼料用トウモロコシ

我が国において生産される配合飼料は、年間2,400万トに達し、その約半量(1,200万ト)をトウモロコシが占めている。さらに、我が国はトウモロコシの96%を米国からの輸入に依存しており、米国産飼料用トウモロコシの安全性及び品質の確保は、重要な事項となっている。

なお、米国から輸入される飼料用トウモロコシ製品としては、飼料用トウモロコシのほかコーングルテンフィードやコーングルテンミールが考えられるが、これらの輸入量は飼料用トウモロコシの輸入量に比較して極めて小さい(別添3)。

2 現在のリスク管理措置

Bt10の飼料としての利用については、いずれの国においてもフル評価はされていない。我が国においては、フル評価が行われていない遺伝子組換え体は、飼料としての利用が認められていないことから、農林水産省は、Bt10の混入の可能性が否定できない米国産飼料用トウモロコシについて、当面のリスク管理措置として、

①独立行政法人肥飼料検査所による米国産飼料用トウモロコシの輸入の際のBt10の混入検査(PCR法、検出限界0.05%)及び陽性品の排除

②飼料用トウモロコシの輸入業者に対する米国における飼料用トウモロコシ中のBt10の混入検査と陽性品の我が国への輸出禁止に関する要請を行っている(別添4)。

なお、独立行政法人肥飼料検査所が、平成17年5月23日から平成17年6月27日までに19件の検査を行ったところ、3件の陽性事例が判明し、その結果、廃棄等の対象となったトウモロコシは6,552トに及んでいる(別添5)。

3 海外での飼料利用のための安全性評価及びリスク管理措置

米国においては、Bt10のフル評価はなされていない。しかしながら、環境保護庁(EPA)は、Bt10において発現するたん白質のリスク評価を既に行っており、たん白質の発現量は少ないことが明らかになっている。この評価を受け、食品医薬品局(FDA)は、Bt10の安全性について懸念はないとするステートメントを公表し、特段のリスク管理措置を講じていない(別添6)。

EUにおいてもBt10のフル評価はなされていないが、欧州食品安全局(EFSA)は、Bt10とBt11で発現するたん白質が同じものであること、挿入された薬剤耐性遺伝子に関する情報等からBt10の飼料としての安全性について懸念はないとするステートメントを公表している。しかしながら、不確実さがあることから、輸入飼料原料(コーングルテンフィード

等)についてBt10を含まないことの証明を求めている(別添7)。

4 課 題

Bt10の飼料用トウモロコシへの混入については、農林水産省は、平成17年3月23日に、

- ①Bt10は安全性が確認されているBt11と同一のたん白質を生産し、毒素やアレルギー物質を含まないとのEPA等の判断があること
- ②Bt10と同様のたん白質を発現する遺伝子組換え飼料を家畜に給与した試験において、挿入遺伝子及び発現たん白質が家畜及び畜産物へ移行した事実は認められていないこと
- ③米国での作付面積が少ないこと

等から、家畜及び畜産物の安全性に問題は生じないとの当面の見解を示しているところである(別添1及び8)。しかしながら、当該見解に対しては科学的評価がなされていないことから、Bt10の混入の可能性が否定できない米国産飼料用トウモロコシについて、上記2のリスク管理措置を講じている。

今後、当該見解に対して科学的評価を進めるに当たり、Bt10のフル評価については、現段階では必要なデータが蓄積されておらず困難であることが予想されるが、上記3の海外での対応状況、及び上記1(2)の状況を踏まえ、Bt10の混入の可能性が否定できない米国産トウモロコシについて、新たなリスク管理措置を講じる必要がある。

5 新たなリスク管理措置

今回Bt10のフル評価(別紙2)について意見を求めているが、それが困難である可能性があるため、現在輸入されている米国産飼料用トウモロコシにBt10が混入したとしても家畜に由来する畜産物の安全性に問題を生じない範囲を定めることにより、リスクの程度に応じたリスク管理措置を設定する必要があると考えている。

具体的には、Bt10のフル評価が終了するまでの暫定的な措置として、「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づく組換えDNA技術によって得られた生物の混入基準」の規定に準じて、米国産の飼料用トウモロコシについてBt10の混入率が1%以下の許容基準を設定する(別添9)。

6 食品健康影響評価

上記5の新たなリスク管理措置を講じることについて、現段階で入手可能な範囲の知見に基づき、食品健康影響評価をお願いします。

7 家畜への影響に関する安全性評価及びリスク管理措置の検討

Bt10の家畜への影響に関するフル評価については、現在、農業資材審議会で検討しているが、現段階では、フル評価に必要な資料が一部不足していることから、継続審議となっている。しかしながら、農業資材審議会は、家畜に対して顕著なリスクを有するとする明確な根拠はないこと及び我が国の飼料の安定的供給の必要性にかんがみ、フル評価が終了するまでの暫定的な措置が必要と考えており、食品安全委員会の評価を受けて新たなリスク管理措置を講じることと検討することとしている(別添10)。

(別紙2)

安全性の確認に当たり意見を聴取する飼料の概要

1 品目名

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシBt10

2 安全性確認申請者

シンジェンタ ジャパン株式会社

3 使用方法

遺伝子組換え体でないトウモロコシと同様に、主にその穀粒が家畜及び家禽用の飼料として用いられる。

4 特徴

トウモロコシ害虫に抵抗性を有する性質及び除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育できる性質を付与

〔 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシBt10は、トウモロコシ害虫に抵抗性を有するたん白質(Cry1Ab)を発現する遺伝子(*cry1Ab*)及び除草剤グルホシネートに耐性を示すたん白質(PAT)を発現する遺伝子(*pat*)を導入したものである。 〕

平成17年3月23日

農 林 水 産 省

米国における安全性未確認の遺伝子組換えトウモロコシの栽培について

今般、在京米国大使館から、米国において安全性未確認の遺伝子組換えトウモロコシ（シンジェンタ社が開発したBt10という系統）が、過去、米国内において誤って栽培され、流通した事実が判明したとして農林水産省に報告があった。

1 米国大使館からの報告内容

- ① シンジェンタ社から米国政府に対し、米国政府の安全性確認を受けていない遺伝子組換えトウモロコシ（系統名Bt10）の種子が、誤って米国内の栽培農家に出荷され、2001年から2004年にかけて、最大で延べ1万5000ヘクタールで商業栽培（米国全体のトウモロコシ栽培のべ面積の0.01%程度）されたと思積もられるとの報告があった。
- ② 米国政府としては、関係当局（農務省動植物衛生検査部（APHIS）、保健省食品薬品局（FDA）、環境庁（EPA））における安全性評価の結果、食品・飼料の安全性上、及び環境安全性上の問題はないと判断し、栽培されたトウモロコシやその製品の回収は行っていない。
- ③ なお、栽培用に流通しているBt10の種子については、シンジェンタ社により既に回収し廃棄され、今年作付けされることはない。

2 農林水産省の見解

Bt10は、飼料安全法及び食品衛生法に基づく安全性の確認がとれていないが、飼料については、

- ① Bt10は安全性が確認されているBt11と同一のたん白質を生産し、毒素やアレルギー物質を含まないとのEPA等の判断があること
- ② 我が国で同様のたん白質を発現する遺伝子組換え飼料を家畜に給与した試験において、挿入遺伝子及び発現たん白質が家畜及び畜産物へ移行した事実は認められていないこと
- ③ Bt10の作付面積は米国でのトウモロコシ作付面積に占める割合は0.01%程度と非常に低いレベルであること

から、Bt10が日本に輸入された可能性が低く、仮に輸入されていたとしても、家畜及び畜産物の安全性に問題は生じないものと考えられる。

なお、厚生労働省では食品安全上の問題はないとしている。（別紙厚生労働省公表資料参照）。

3 今後の対応

B t 1 0 に対する検査の準備が整い次第、飼料の輸入時に検査を行うとともに、米国大使館及びシンジェンタジャパン社に対し、B t 1 0 に関する安全性情報等の提供を求めるほか、安全性確認を受けるよう指導することとしている。

なお、再発防止に向けた対応をとるよう米国大使館に対し、要請を行った。

問い合わせ先

消費・安全局 衛生管理課

TEL: (代表) 03-3502-8111 (夜間直通) 03-3502-8097

薬事・飼料安全室長 境 (内線 3160)

飼料安全管理官 浜本 (内線 3170)

課長補佐 山内 (内線 3171)

(参考)

○B t 1 1、B t 1 0について

B t 1 1は、害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性を有する。我が国では、食品衛生法及び飼料安全法に基づく安全性確認済み。カルタヘナ法上は、経過措置が適用され、みなし承認扱い。B t 1 0は、B t 1 1と同じ害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性に係る遺伝子を導入したもの。

○我が国のトウモロコシ輸入状況（2003年（平成15年））

①全体の輸入量】（単位：千トン、％）

生産国	輸入量	シェア
米 国	15,243	89.3
中 国	1,152	6.8
アルゼンチン	439	2.6
その他	231	1.4
合 計	17,064	100.0

②飼料用の輸入量】（単位：千トン、％）

生産国	輸入量	シェア
米 国	11,661	92.8
その他（中国等）	905	7.2
合 計	12,566	100.0

注1：トウモロコシ輸入量の74％が飼料用、26％が食品原料用。食品原料用については、大部分が分別流通管理され、非遺伝子組換えトウモロコシとして輸入されている。

注2：2003年の米国における遺伝子組換えトウモロコシの作付け割合は、40％、トウモロコシの全作付面積は、3,186万ヘクタール。

資料：財務省「貿易統計」、USDA農業統計部公表資料

平成 17 年 3 月 23 日
厚生労働省食品安全部
南 監視安全課長
担当：刈岡、土井
TEL：03-5253-1111(2447)

米国における安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ種子の流通事例について

標記について、3月22日付けの科学雑誌「Nature」のウェブの「本日のニュース」欄 (<http://www.nature.com/news/2005/050321/full/nature03570.html>) に、記事が掲載されたため、在京米国大使館等から入手した関係情報を整理し、Q&Aとしてまとめましたので情報提供いたします。

米国における安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ種子の流通事例について

Q1. 米国におけるトウモロコシ Bt10 の混入事例とはどのようなものですか。

A1. 本年3月22日付けの Nature のニュースによれば、シンジェンタ社が生産した遺伝子組換えトウモロコシ Bt11(デントコーン)の種子と混同して、安全性未審査の遺伝子組換えトウモロコシ Bt10 の種子が流通し、栽培されていたというものです。なお、トウモロコシ Bt11 は、日米両国政府いずれによる安全性審査で問題がないとされています。

Q2. トウモロコシ Bt10 とはどのようなものですか。

A2. トウモロコシ Bt11 と同じ害虫抵抗性の Bt タンパク質発現遺伝子及び除草剤耐性マーカーの PAT タンパク質発現遺伝子を組み込んだトウモロコシの一種です。

Q3. トウモロコシ Bt11 とトウモロコシ Bt10 にはどのような違いがありますか。

A3. シンジェンタ社(開発者)からの情報によると、両者は殺虫性を持つ同じ Bt タンパク質を発現しますが、その発現量に差があり、Bt10 は Bt11 のおよそ 250~450 分の 1 以下(溶解タンパク質当たり濃度)の発現量とされています。

Q4. トウモロコシ Bt10 は安全ですか。

A4. 米国政府においては、シンジェンタ社から提出されたトウモロコシ Bt10 の挿入遺伝子配列情報、Bt タンパク質発現量情報などをもとに、農務省動植物衛生検査部(APHIS)、保健省食品薬品局(FDA)、環境庁(EPA)が安全性評価を行っています。その結果、トウモロコシ Bt10 において発現する Bt タンパク質がトウモロコシ Bt11 で発現するタンパク質と同じであることに加え、重要な自然毒、アレルゲンを含まないことから、トウモロコシ Bt10 の安全性に問題はないとしています。

Q5. 米国政府ではどのような対応をとっていますか。

A5. 農務省動植物衛生検査部(APHIS)、保健省食品薬品局(FDA)、環境庁(EPA)が安全性の評価を実施し、トウモロコシ Bt10 の安全性については問題がないとの結論を出しましたが、シンジェンタ社では、トウモロコシ Bt10 の種子が混入したトウモロコシ Bt11 の種子を回収し、廃棄しました。

Q6. 日本にトウモロコシ Bt10 は輸入されていますか。

A6. 現在確認中ですが、米国政府によれば、トウモロコシ Bt10 の理論的な作付面積は、米国でのトウモロコシ作付面積の割合の 0.01%程度であり、仮に日本に輸入されていたとしてもごくわずかであるとしています。

Q7. トウモロコシ Bt10 が混入している製品を食べても大丈夫ですか。

A7. 米国政府の評価によれば、トウモロコシ Bt10 を食用としても安全性に問題はないとしており、栽培されたトウモロコシやその製品の回収は行われていません。このため、仮に摂取したとしても、食品安全上の問題はないと考えられています。

Q8. 厚生労働省では今後どのような対応をとりますか。

A8. 米国政府の評価によれば食品安全上の問題はないとされていますが、我が国においては安全性未審査の遺伝子組換え食品は食品衛生法により販売等が認められていません。

このため、①トウモロコシ Bt10 に対する検査の準備ができ次第、輸入時検査を行い、トウモロコシ Bt10 が混入していることが判明した場合には、食品衛生法に違反するものとして積戻し等の措置を行います。②また、米国に対しては、我が国に輸出されるトウモロコシに Bt10 が混入しないよう対応を要請するとともに、③シンジェンタジャパン社にはトウモロコシ Bt10 の安全性を確認するために必要な資料を提出するよう要請しています。

(参考)

食品として輸入届出があったトウモロコシ(デントコーン)の輸入実績

(平成16年次の速報値)

品目名	生産国	届出件数 (件)	届出重量(kg)
とうもろこし(遺伝子組換えでない)	アメリカ合衆国	575	2,960,886,127
	中華人民共和国	24	93,791,265
	ブラジル	4	37,570,330
	アルゼンティン	5	5,000,000
	フランス	28	2,163,000
	オーストラリア	22	1,250,262
	ペルー	3	7,525
	メキシコ	1	9
	小計	662	3,100,668,518
とうもろこし(遺伝子組換え)	アメリカ合衆国	57	666,140,827
とうもろこし (遺伝子組換え不分別)	中華人民共和国	68	92,235,850
	ペルー	10	32,000
	ブラジル	2	4,080
	小計	80	92,271,930
総計		799	3,859,081,275

品目名・数値は輸入食品監視支援システム(FAINS)の検索結果による。

遺伝子組換え食品一般の Q&A

<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/qa/qa.html>

平成 17 年 5 月 16 日

農林水産省 消費・安全局長 殿

シンジェンタ ジャパン株式会社
代表取締役社長 マイケル・ケスター遺伝子組換えトウモロコシ Bt10 について

平成 17 年 4 月 5 日付けの貴省からの書簡（16 消安第 11056 号）に対し、ご回答申し上げます。最初に、この度の事態が皆様に多大なるご迷惑ならびにご心配をおかけしておりますことを深くお詫び申し上げます。

さて本件の状況は刻々と変化しており、以下の情報は現在ご連絡できる最善の情報であり、今後新たな情報が入り次第その都度ご報告もうしあげます。

なお、2 から 7 までの内容についてはシンジェンタ ジャパン社のホームページ上に掲載する予定でございます。

記

1. Bt10 種子の系統特異的検査を行う上で必要となる全ての情報及び標準品等の提供

(回答)

ご存知のように、本日現在までに分析法、標準品、DNA など検査に必要な情報はお渡しております。また、その詳しい説明、意見交換のため、アメリカ GeneScan 社において分析法を開発した研究者の来日、肥飼料検査所への訪問を手配しておるところでございます。

2. Bt10 種子の米国等における作付け（農家（クロスポリネーションを起こしたと想定される農家を含む）を全て特定すること）及び収穫物の流通の状況

(回答)

米国において Bt10 トウモロコシが栽培された面積は、2001 年に 98ha（米国におけるトウモロコシの総栽培面積の 0.0003%）、2002 年に 3,699ha（同 0.012%）、2003 年に 4,255ha（同 0.013%）、2004 年に 7,054ha（同 0.021%）であります。2001～2004 年の Bt10 の累計栽培面積は 15,106ha であり、これは 4 年間の米国におけるトウモロコシの栽培面積の累計に対して約 0.012%に相当します。これらの数値は各年度における種子販売量を基に算出したもので、特定の圃場あるいは地域を示してはいません。栽培

されたトウモロコシはすでに収穫され販売されているため、どの農家から出荷されたかを追跡する事は困難です。Bt10 が栽培された面積が小さいこと、植物体と在庫の種子はすべて隔離・廃棄処分したことからクロスポリネーションの可能性は極めて低いものであると考えられます。

米国における Bt10 の商業栽培面積

年度	トウモロコシの 総栽培面積 (100 万 ha.)	Bt10 の 予想栽培面積 (ha)	総栽培面積に対する Bt10 の割合
2001	31	98	0.0003%
2002	32	3,699	0.012%
2003	32	4,255	0.013%
2004	33	7,054	0.021%

米国以外では、アルゼンチン、チリ、カナダ及びスペインにおいてごく少量栽培されました。アルゼンチン、チリ及びスペインでは試験目的あるいは交配による採種目的に限定していたため、収穫された穀粒が食品や飼料あるいは輸出の流通経路に乗ることはありませんでした。

カナダでは約 8ha が商業栽培されました。これは収穫物として約 50 トンに相当します。カナダ全体のトウモロコシの栽培面積と比較しますと極めて小さいものになりますが、ごく少量の穀粒が食品や飼料の流通経路に流れた可能性があります。

アルゼンチンでは、隔離圃場試験で約 0.4ha を作付しました。試験後に収穫物はすべて廃棄しましたので、食品や飼料あるいは輸出の流通経路に乗ることはありません。

チリでは、試験研究用および交配による採種目的に少量作付けされましたが、すべての植物体を廃棄しました。穀粒の収穫物は一切ありませんので、食品や飼料あるいは輸出の流通経路に乗ることはありません。

スペインでは、当局の許可に基づき Bt11 に関する試験を 2 年間に数回行いました。2003 年は 140 粒の種子 (25.48m²) が、2004 年は約 5000 粒の種子 (378m²) が作付されました。試験は隔離された圃場で行われ、試験後に収穫物はすべて廃棄しました。食品や飼料の流通経路に乗ることはありません。在庫の種子は、Saint Sauveur (フランス) にあるシンジェンタの施設内で廃棄処分しました。Saint Sauveur の施設は遺伝子組換え生物の隔離使用について許可を得ております。

次に米国における流通ですが、Bt10 の栽培用種子は 2005 年の作付け用として出荷されていません (試験用、商業用を問わず)。在庫の種子は USDA および APHIS の指示監督の下で廃棄または隔離処分しました。米国における種子の流通販売は卸と小売によってなされており、シンジェンタもこのような流通制度に従っております。そのため、シンジェンタは Bt10 トウモロコシを栽培した農家についての十分信頼できるリストを持ち合わせておりません。現在の米国の状況下においては、業者は自らが流通する農産物に対する米国以外のバイヤーへの風評被害を恐れ、生産者の情報収集は困難を極めると予想されます。

昨年収穫された大部分のトウモロコシはすでに農家から出荷されているものと思われます。米国における収穫物の収集システムは、輸送、貯蔵、輸出用出荷のように仕分けすることなく一括して行うようになっていますので、特定の農家から収穫されたトウモロコシのその後を追跡していくことは事実上不可能です。さらに一つの州の卸または小売が購入した Bt10 を含む収穫物が、他の州で栽培される可能性があります。これは同じ農家が複数の州に農地を所有している場合があるからです。また、一つの州での収穫物でも、それが他の複数の州に輸送され、他の州からの収穫物と一緒に貯蔵されることもあります。

以上、この点についてはご要望にそえない部分がございますが、これらの理由から Bt10 トウモロコシすべてを流通経路から見つけ出すことは現実的には不可能と考えられ、なにとぞご理解を賜りますようお願い申し上げます。

3. 米国において Bt10 種子が生産され、栽培された原因

(回答)

シンジェンタは意図的に Bt10 の種子を生産したわけではありません。Bt10 と Bt11 は同時期に開発していましたが、最終的に Bt10 の開発を中止し Bt11 を選びました

(Bt11 は日本においてもその安全性が評価され承認を得ています)。しかし、Bt11 系統の一部の育種過程において、人為的ミスにより Bt10 を Bt11 と誤認して使用してしまいました。Bt10 と Bt11 系統は同様の遺伝子構成であったため、2004 年後半に高性能の DNA 解析機器を用いた検出がなされるまで、この間違いに気が付きませんでした。

4. 米国において Bt10 種子が流通していた事実が判明するに至った経緯

(回答)

Bt11 のマーカー選抜育種の過程で、ある系統に導入された遺伝子が異なる染色体上に存在することを発見しました(染色体番号が違っていました)。シンジェンタは、この事態を直ちに米国当局に昨年末に報告いたしました。その後、この系統が Bt10 であることが判明しました。そして、シンジェンタの所有する Bt トウモロコシ育種系をすべて調査した結果、Bt11 と考えていたデント種の 5 つの育種系で誤って Bt10 の種子が使用されていたことを確認いたしました。さらに調査を進めたところ、5 育種系のうち 2 つの系が試販目的で、1 つの系がごく少量ながら販売目的で、種子が生産されていました。なお、残りの 2 つの系では種子の生産はありませんでした。

シンジェンタは、2004 年 9 月に Advanta USA, Inc.(Garst Seed Company として事業を行っている)社を買収しました。Garst 社において Bt11 のマーカー選抜育種を行っている際に、導入された遺伝子が異なる染色体上に存在することを発見しました。シンジェンタはこの事態を把握した時点で速やかに米国の関係当局に報告しましたが、その時点では原因はわかっていませんでした。個々の種子について数千の分析を行った結果、この原因が Bt10 であることを突き止めました。

5. 再発防止のために米国及び我が国において講じた措置

(回答)

社内においては、今後、本件のような問題が再発しないように標準手順を改善致しました。

従来品種（非遺伝子組換え体）に対する措置：

シンジェンタ社の標準プロトコールと作業手順に従い、すべての従来品種（非遺伝子組換え体）トウモロコシの同系交配の系統は、開発段階で DNA に基づく分析を行い、意図しない形質の遺伝子が誤って移入されていないかどうかを確認しております。研究段階から種子の商業生産段階へと移行する前に各系統の種子（3,000 粒）に対し、現在商業化されている遺伝子組換えトウモロコシに共通に使用されている 2 つの遺伝子配列である、カリフラワーモザイクウイルスのプロモーター配列（35s）と、アグロバクテリア由来のノパリン合成酵素のターミネーター配列（tNos）の存在を検出できるような DNA に基づく分析を実施しております。35s または tNos が検出された場合には、そのロットのトウモロコシ種子は全て廃棄処分しています。

さらに、2005 年よりシンジェンタは育種の開発プログラムに更なる手法を追加致します。本手法は DNA に基づく分析で、以下の系統に存在する典型的な遺伝子配列が検出できるようになります。

- 米国で現在商品化されている全ての遺伝子組換えトウモロコシ系統
- 米国において過去に販売された全ての遺伝子組換えトウモロコシ系統
- シンジェンタが開発した遺伝子組換えトウモロコシ系統の内、実験室または温室での開発段階を終えて圃場試験段階まで進んだ全ての系統

いずれかの検査で陽性と判定された系統はすべて隔離、廃棄処分に致します。

遺伝子組換え品種に対する措置：

遺伝子組換えトウモロコシ系統中の意図しない形質を検出するのは困難な場合があります。これは、もし移入した DNA 成分の検出に主眼を置いた分析を行った場合、この DNA の存在が意図しない形質または兄弟系統の存在を覆い隠してしまう可能性があるからです。例えば、Bt11 は tNos 配列を含んでいます。しかし tNos 配列は Bt11 を一部の系統と区別させる事は出来ませんが、Bt11 の兄弟系統（即ち、Bt10 のように Bt11 と同一もしくは類似した遺伝子を持つ系統）と区別させることはできません。

最近まで、シンジェンタは Cry1Ab タンパク質検出にはタンパク質に基づく検出法を、PAT タンパク質検出にはタンパク質に基づく検出法、もしくは葉身を用いたグルホシネート除草剤耐性形質の調査を行い、これらを併用しておりました。この方法を用いると、Bt11 系統を T25 系統（グルホシネート耐性）、Mon810（Cry1Ab 発現）および Herculex（Cry1F 発現およびグルホシネート耐性）から区別することができます。

2005 年より追加される 2 種類の DNA に基づく形質分析プログラムは、トウモロコシ系統に Bt11 系統か Bt10 系統が含まれているか否かを特異的に同定するための分析です。さらに全ての Bt11 系統に対して、上述いたしました DNA に基づく方法により、（イ）シンジェンタが開発した、または開発中の承認済みの系統、（ロ）市場に存在する可能性のある未承認の系統、の検査を実施いたします。これらの分析で Bt11 以外の形質が見られた系統は、全て隔離、廃棄処分します。

6. 米国において Bt10 種子が流通していた事実が判明した後、Bt10 種子及びその收穫物について、我が国に流入することを防止するために講じた及び講じようとしている措置

(回答)

シンジェンタは、過去に Bt10 種子が日本へ輸出されていないことを確認しております。また、米国内の在庫種子は、2005 年以降の栽培に用いられないように隔離、もしくは廃棄処分にいたしましたので、今後、Bt10 種子の流通や栽培の可能性はありません。従いまして、日本へ Bt10 種子が今後輸出される可能性はありません。また米国では、購買した種を使用しなかった場合、農家は種の販売者に買い戻してもらうのが慣例で、毎年春には農家は新しい種を再度購入します。

收穫物に対する措置としましては、現在米国における検査体制、輸入時に発見された場合の対応について農林水産省及び輸出入業者と話を進めております。

7. 本件に関するシンジェンタの問い合わせ窓口（担当者）及び連絡先

(回答)

会社名：シンジェンタ ジャパン株式会社

部署：開発本部

氏名：山元 広海（やまもと ひろみ）

電話：03-6221-3825（ダイヤルイン）

ファックス：03-6221-3898

E-mail：hiromi.yamamoto@syngenta.com

8. 飼料安全法に基づく飼料としての安全の確認、カルタヘナ法に基づく第一種使用規程の承認に係る申請の予定

(回答)

現在、Bt10 の飼料安全法に基づく飼料としての承認申請のための資料整備を行っております。また、カルタヘナ法に基づく承認の必要性につきましては、貴省と別途相談させていただきたく存じますので宜しくお願い申し上げます。

9. 通知に基づく報告

(回答)

シンジェンタは、本件について先ず Bt10 が栽培された事が判明した国々に連絡をしました。日本では Bt10 の栽培、あるいは Bt11 の商業栽培の実績がなかったためシンジェンタの日本法人へ Bt10 に関する事態が知らされたのは、しばらく時間が経過した後になってしまいました。このことが省令違反（「飼料及び飼料添加物の成分規格等省令の一部を改正する省令等について」（平成 15 年 4 月 1 日 14 生畜第 8598 号農林水産省生産局長通知）に基づく報告）につながる事になり、深く反省するとともに心よりお詫び申し上げます。

また以下にご要望のありました、日本においてシンジェンタ社が過去、計画または実行した試験内容を記載いたします。

1999年に、シンジェンタ ジャパン社と日本たばこ産業株式会社の合併会社であった株式会社オリノバが、低グルテリン米である4系統、KA45、KA48、KA119、KA130を隔離圃場で試験を行い、2000年にKA130の栽培認可を頂きました。承認後、KA130は、静岡県磐田郡のオリノバ圃場、茨城県牛久市の日本植物調節剤研究協会（日植調）、シンジェンタ ジャパン社の牛久試験地などいくつかの試験圃場で栽培実験が行なわれましたが、2003年にオリノバの活動を停止したことから、残りの種は全てイギリスにあるシンジェンタ社の試験地まで送り返しました。

2003年には北海道の隔離圃場にて除草剤耐性テンサイ RR77 系統の試験を申し込みましたが、最終的にキャンセルになり実行できませんでした。2004年には日植調の隔離ほ場でチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ 3243M 及びコウチュウ目抵抗性トウモロコシ MIR604 の試験を計画しましたが、諸般の事情により申請を取り下げとなりました。また、本年度は栃木県那須塩原市の畜産草地研究所において、コウチュウ目抵抗性トウモロコシ MIR604 及び耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 の試験を計画しています。

世界全体で過去試験をされた全品種を全て網羅するのは困難ですが、過去10年間の間、アメリカにおいてEPAのEUP (Experimental Use Permit) を取得し、試験された主なイベントは以下のとおりです。

1993～1995年：Event 176 (field corn)

1994～1996年：Bt11 and Bt10 (field corn)

1997～1998年：Bt11 sweet corn

1993～1998年：RR sugar beat

2004年：Cot102 (cotton) and 3243M (field corn)

2005年：Cot102 and Cot202 (cotton) and MIR604 (field corn)

以上

○我が国のトウモロコシ輸入状況（2003年（平成15年））

①全体の輸入量】

（単位：千トン、％）

生産国	輸入量	シェア
米 国	15,243	89.3
中 国	1,152	6.8
アルゼンチン	439	2.6
その他	231	1.4
合 計	17,064	100.0

②飼料用の輸入量】

（単位：千トン、％）

生産国	輸入量	シェア
米 国	11,661	92.8
その他（中国等）	905	7.2
合 計	12,566	100.0

注1：トウモロコシ輸入量の74％が飼料用、26％が食品原料用。食品原料用については、大部分が分別流通管理され、非遺伝子組換えトウモロコシとして輸入されている。

注2：2003年の米国における遺伝子組換えトウモロコシの作付け割合は、40％、トウモロコシの全作付面積は、3,186万ヘクタール。

資料：財務省「貿易統計」、USDA農業統計部公表資料

June 10, 2005

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE
FOREIGN AGRICULTURAL SERVICE
FAS AGRICULTURAL EXPORT COMMODITY AGGREGATIONS

AREA/COUNTRIES OF DESTINATION AND COMMODITIES EXPORTED	JANUARY - DECEMBER										JANUARY - DECEMBER					
	VALUES IN 1000 DOLLARS/QUANTITIES IN REPORTED VOLUMES										COMPARISONS					
	1999		2000		2001		2002		2003		2003		2004		%CHNG	
	Quantity	Value	Quantity	Value	Quantity	Value	Quantity	Value	Quantity	Value	Quantity	Value	Quantity	Value	Value	
JAPAN CORN GLUTEN FEED&ML MT	97,073.0	25,121	94,729.0	25,513	75,407.0	22,760	59,814.0	15,133	55,221.0	15,705	55,221.0	15,705	60,687.0	20,875	32.92	
TOTAL	MT	97,073.0	25,121	94,729.0	25,513	75,407.0	22,760	59,814.0	15,133	55,221.0	15,705	55,221.0	15,705	60,687.0	20,875	32.92

Data Source: Department of Commerce, U.S. Census Bureau, Foreign Trade Statistics

*** WARNING ***

Users should use cautious interpretation on QUANTITY reports using mixed units of measure. Commodity groups on a value report will reflect a total of all statistics for each commodity in the group in DOLLARS, whereas a QUANTITY line item will show statistics on the greatest number of like units of measure for grouped commodities.



17消安第 2395号
平成17年 6月 9日

飼料輸出入協議会理事長
社団法人配合飼料供給安定機構理事長 殿
各サイロ業者の長

農林水産省消費・安全局長

米国産飼料用とうもろこしに係る当面の取扱いについて

この度、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和28年法律第35号。以下「法」という。）第57条第1項の規定に基づき独立行政法人肥飼料検査所（以下「検査所」という。）が米国産飼料用とうもろこしについて検査を行ったところ、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和51年農林省令第35号）別表第1の1の(1)のシの規定に基づく安全性についての農林水産大臣の確認を受けていない遺伝子組換えトウモロコシB t 10（以下「B t 10」という。）の混入が確認された事例が複数認められました。

ついては、米国産のとうもろこしの輸入に際しては、B t 10が混入していないことを確認するため、当分の間、下記のとおりとすることとしたので、貴会傘下の会員に対し周知徹底の上、御協力をお願いします。

なお、下記3又は4の分析の結果、B t 10の混入が確認されたとうもろこしの輸入は、法第4条の規定に違反し、当該とうもろこしを国内において飼料として流通させることはできないことに留意願います。

また、米国産のとうもろこしの取扱いについては、今後、法第51条第1項の規定に基づく輸入届出の対象とすることを予定しておりますので、併せて御協力をお願いします。

（施行注意：下線部は、サイロ業者の長あてには記載しない。）

記

- 1 米国産のとうもろこしを輸入しようとする者（以下「輸入者」という。）は、当該とうもろこしを積載した船舶が我が国に到着する前に、輸入に関する情報を別記様式（以下「輸入届出書」という。）により農林水産省消費・安全局衛生管理課長あてに届け出ること。
- 2 輸入者は、1の届出を行うに当たっては、米国内においてあらかじめ、当該届出に係るとうもろこしの全量を対象として次に掲げる基準を満たす分析を行った結果、B t 10が混入していないことを証する書類を別記様式に添付すること。
 - (1) 5千トンを超えない範囲で設定した荷口ごとに代表する検体を採取し、分析すること（なお、分析用検体の採取方法については、別途事前に農林水産省消費・安全局衛

生管理課長に協議すること)

- (2) 分析方法は500g以上の穀粒を使用して行うPCR法によるものとし、妥当性の確認が行われていること
- (3) 国際標準化機構（ISO）の規格等に基づく第三者機関の認証を受けた機関による分析であること

3 輸入届出書にB t 1 0が混入していないことを証する書類が添付されていない場合の取扱い

- (1) 上記2で米国産のとうもろこしを積載した船舶が既に米国の港湾から出港している等の理由から、2の書類を添付することができない場合には、輸入者は1の届出を行うに当たってその旨を別記様式「9 その他」に記載すること。この場合にあっては、輸入者は、当該とうもろこしを積載した船舶が我が国に到着した後遅滞なく、当該とうもろこしからホールド（船倉）を単位として抽出した分析用検体（当該とうもろこしをサイロに搬入する際に、食品衛生法（昭和22年法律第233号）第4条第9項に規定する登録検査機関により、サイロビンごとにその全体を代表する検体となるようオートサンプラー等を用いて適正な時間的間隔をもって15回以上に分けて採取された検体及び当該検体からとうもろこしを等量ずつ抽出し混合して作成された検体（コンポジット・サンプル））を、検査所に提出すること。ただし、当該分析用検体の抽出の対象とするホールド、提出する検体の量及び検体の提出先とする検査所の事務所については、当局衛生管理課薬事・飼料安全室から個別に指示するので、当該指示に従うこと。
- (2) 当該分析用検体のうち、コンポジット・サンプルについて分析を行った結果、B t 1 0の混入について陽性となった場合、検査所は、当該とうもろこしについてサイロビン単位での再分析を行い、分析の結果、B t 1 0の混入について陽性となったサイロビンのとうもろこしについては、B t 1 0の混入が確認されたものとして取り扱うものとする。

4 輸入届出書にB t 1 0が混入していないことを証する書類が添付されている場合の取扱い

- (1) 輸入届出書にB t 1 0が混入していないことを証する書類が添付されている場合においては、検査所は、1及び2の手続が適正に行われていることを確認するため、必要に応じ、法第57条第1項の規定に基づく立入検査により「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令等の施行について」（平成15年4月1日付け14生畜第8598号農林水産省生産局長・水産庁長官通知）別添3 1. 1. 1. 2. 1. に規定する方法に従い、検体を収去の上、当該検体の分析を行うものとする。
- (2) 分析の結果、B t 1 0の混入について陽性となった場合は、輸入者は、陽性となった検体と同一のホールドに由来するすべてのとうもろこしについて、3(1)に規定する方法に従いサイロビンを単位として抽出した検体を検査所あて提出すること。
- (3) 検査所が当該とうもろこしについてサイロビン単位での分析を行い、分析の結果、B t 1 0の混入について陽性となったサイロビンに属するとうもろこしについては、B t 1 0の混入が確認されたものとして取り扱うものとする。

(別記様式)

年 月 日

農林水産省消費・安全局衛生管理課長 あて

住所（法人にあっては、主たる事務所の所在地）

氏名（法人にあっては、名称及び代表者の氏名）

米国産とうもろこしについて輸入を予定していることから、「米国産飼料用とうもろこしに係る当面の取扱いについて」（平成17年6月9日付け17消安第2395号農林水産省消費・安全局長通知）の記の1の規定に基づき、下記のとおり届け出ます。

記

- 1 輸入数量
- 2 輸入の相手方の氏名又は名称
- 3 荷姿
- 4 積込港
- 5 積込年月日
- 6 積降港及びサイロ会社名
- 7 積降予定年月日
- 8 船舶の名称
- 9 その他

備考1：届出は、船舶を単位として届け出ることとし、同一船舶に複数の者が荷を積載する場合には、連名により届け出ることができる。

備考2：記の1から8までの記載方法については、別紙の例によることができる。

(別 紙)

船舶の名称：

積 込 港：

積込年月日：

荷 姿：

輸入数量：

ホールド番号	数 量 (トン)	飼料用以外の用途がある 場合には、その用途

(注：輸入数量は、飼料用以外のものを含め記載する。)

積降計画：

積降港及び サイロ会社名	積降予定 年月日	積降予定数量 (トン)	飼料用以外の用途がある 場合にはその用途及び数量

(注：積降予定数量は、飼料用以外のものを含め記載する。)



17消安第 2395号
平成17年 6月 9日

独立行政法人肥飼料検査所理事長
財団法人日本穀物検定協会会長
社団法人日本海亭検定協会会長
東京穀物商品取引所理事長
福岡商品取引所理事長

殿

農林水産省消費・安全局長

米国産飼料用とうもろこしに係る当面の取扱いについて

このことについて、米国産飼料用とうもろこしの輸入関係者等に対して別紙のとおり通知したので、御了知の上、御協力をお願いします。

プレスリリース

平成17年6月1日
農 林 水 産 省

米国産飼料用トウモロコシから安全性未確認の遺伝子組換えトウモロコシが検出された事例について

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和28年法律第35号。以下「飼料安全法」という。）に基づき、独立行政法人肥飼料検査所が平成17年5月に港湾サイロに対して実施した立入検査において、飼料安全法に基づく安全性の確認がされていない遺伝子組換えトウモロコシBt10が検出された事例が別添のとおり認められましたのでお知らせします。

このトウモロコシは輸入通関前であり、飼料として国内に流通することはありません。

なお、これまで輸入の際の検査については、日本に入港する船のうち一定数を対象に行ってきましたが、今回の事例を機に検査を強化することとし、今後は当分の間、検査対象を全船に拡大します。

問い合わせ先

消費・安全局衛生管理課

薬事・飼料安全室

TEL：（代表）03-3502-8111

（直通）03-3502-8097

担当：濱本（内線3170）

元村（内線3171）

(別 添)

安全性未確認の遺伝子組換え体が検出されたトウモロコシの概要

積降港及び積降年月日	名古屋港 平成17年5月26日
立入検査実施日	平成17年5月26日
検査対象数量	390トン
分析法	PCR法(検出限界 0.05%)
検出された遺伝子組換え体	遺伝子組換えトウモロコシBt10

注： 分析試料は、船舶からサイロに荷揚げする際に、機器を用いて自動的に採取。

なお、当該サイロに荷揚げされたものと同一の船倉に収容されていたトウモロコシについては、全量検査し、Bt10が陽性の場合は飼料として国内に流通させないこととします。

- 参考① 飼料安全法に基づく成分規格において、飼料が遺伝子組換え体を含む場合は、その安全性につき、農林水産大臣の確認を受けたものでなければならないとされています。
- ② 今回検出されたBt10は、日本において飼料としての安全性の確認を受けていない遺伝子組換えトウモロコシです。
- ③ Bt10については、米国内において、2001年から2004年にかけて、最大でのべ1万5000ヘクタール(米国全体のトウモロコシ栽培のべ面積の0.01%程度)で誤って栽培され、流通したとされています。

プレスリリース

平成17年6月3日
農 林 水 産 省

米国産飼料用トウモロコシから安全性未確認の遺伝子組換えトウモロコシが検出された事例について（第2報）

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和28年法律第35号。以下「飼料安全法」という。）に基づき、独立行政法人肥飼料検査所が平成17年5月に港湾サイロに対して実施した立入検査において、飼料安全法に基づく安全性の確認がされていない遺伝子組換えトウモロコシBt10が検出された事例が別添のとおり認められましたのでお知らせします。

このトウモロコシは輸入通関前であり、飼料として国内に流通することはありません。

問い合わせ先

消費・安全局衛生管理課

薬事・飼料安全室

TEL：（代表）03-3502-8111

（直通）03-3502-8097

担当：濱本（内線3170）

元村（内線3171）

(別 添)

安全性未確認の遺伝子組換え体が検出されたトウモロコシの概要

積降港及び積降年月日	苫小牧港 平成17年5月30日
立入検査実施日	平成17年5月30日
検査対象数量	822トン
分析法	PCR法(検出限界 0.05%)
検出された遺伝子組換え体	遺伝子組換えトウモロコシBt10

注： 分析試料は、船舶からサイロに荷揚げする際に、機器を用いて自動的に採取。

なお、当該サイロに荷揚げされたものと同一の船倉に収容されていたトウモロコシについては、全量検査し、Bt10が陽性の場合は飼料として国内に流通させないこととします。

- 参考① 飼料安全法に基づく成分規格において、飼料が遺伝子組換え体を含む場合は、その安全性につき、農林水産大臣の確認を受けたものでなければならないとされています。
- ② 今回検出されたBt10は、日本において飼料としての安全性の確認を受けていない遺伝子組換えトウモロコシです。
- ③ Bt10については、米国内において、2001年から2004年にかけて、最大でのべ1万5000ヘクタール(米国全体のトウモロコシ栽培のべ面積の0.01%程度)で誤って栽培され、流通したとされています。

プレスリリース

平成17年6月23日
農 林 水 産 省

米国産飼料用トウモロコシから安全性未確認の遺伝子組換えトウモロコシが検出された事例について（第3報）

米国産飼料用トウモロコシについて独立行政法人肥飼料検査所が実施した分析の結果、飼料安全法に基づく安全性の確認がされていない遺伝子組換えトウモロコシB t 1 0が検出された事例が別添のとおり認められましたのでお知らせします。

このトウモロコシは輸入通関前であり、飼料として国内に流通することはありません。

なお、B t 1 0についての分析結果は、独立行政法人肥飼料検査所のホームページ（<http://www.ffa.go.jp/sub8/bt10.pdf>）にも掲載しております。また、食品用のトウモロコシの検査については厚生労働省のホームページ（<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2005/06/h0601-2.html>）をご確認ください。

問い合わせ先

消費・安全局衛生管理課
薬事・飼料安全室

TEL：（代表）03-3502-8111

（直通）03-3502-8097

担当：濱本（内線3170）

元村（内線3171）

(別 添)

安全性未確認の遺伝子組換え体が検出されたトウモロコシの概要

積降港及び着岸年月日	志布志港 平成17年6月10日
陽性数量	4,170トン
分析法	PCR法(検出限界 0.05%)
検出された遺伝子組換え体	遺伝子組換えトウモロコシBt10

- 参考① 飼料安全法に基づく成分規格において、飼料が遺伝子組換え体を含む場合は、その安全性につき、農林水産大臣の確認を受けたものでなければならぬとされています。
- ② 今回検出されたBt10は、米国及び日本において飼料としての安全性の確認を受けていない遺伝子組換えトウモロコシです。
- ③ Bt10については、米国内において、2001年から2004年にかけて、最大でのべ1万5000ヘクタール(米国全体のトウモロコシ栽培のべ面積の0.01%程度)で誤って栽培され、流通したとされています。

1/27/2005 16:08 FAX

US FDA/CFSAN - U.S. Food and Drug Administration's Statement on Bt 10

[FDA Home Page](#) | [CFSAN Home](#) | [Search/Subject Index](#) | [Q & A](#) | [Help](#)

CFSAN/Office of Food Additive Safety
April 27, 2005

U.S. Food and Drug Administration's Statement on Bt 10

The U.S. Food and Drug Administration (FDA) and the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) have coordinated efforts to determine the safety of genetically engineered Bt 10 corn in food and feed. Bt 10 is closely related to Bt 11, a genetically engineered corn line which has undergone full U.S. regulatory clearance. FDA has evaluated whether the inadvertent marketing of Bt 10 presents any food or feed safety concerns.

FDA does not believe that possible unintended changes in the composition of corn pose food or feed safety risks or regulatory issues in circumstances in which the corn makes up a small part of the total food or feed supply. In this type of situation, the relevant information for food and feed safety is the safety of the new protein(s) in the corn. Therefore, in circumstances such as those surrounding the presence of Bt 10 in food and feed, the information relevant to safety assessment is limited to the safety of the proteins evaluated by EPA.

Based on EPA's finding that the genetically engineered proteins in Bt 10 are safe, the extremely low levels of Bt 10 corn in the food and feed supply, and the fact that corn does not contain any significant natural toxins or allergens, FDA has concluded that the presence of Bt 10 corn in the food and feed supply poses no safety concerns.

Thus, under these circumstances, there are no further requirements under the U.S. regulatory process for Bt 10 to be legally present in the United States food and feed supply. However, it is not legal for Bt 10 to be planted in the United States.

For more information on the respective roles of USDA-APHIS, EPA, and FDA in the federal regulation of genetically engineered plants, see the [United States Agencies Unified Biotechnology Website](#).

FDA's Biotechnology Consultation (BNF No. 000017) on Bt 11 corn:

- [Agency Response Letter May 22, 1996](#)
- [Note to the File May 22, 1996](#)

[Biotechnology](#) | [Products: Completed Consultations](#)

[CFSAN Home](#) | [CFSAN Search/Subject Index](#) | [CFSAN Disclaimers & Privacy Policy](#) | [CFSAN Accessibility/Help](#)
[FDA Home Page](#) | [Search FDA Site](#) | [FDA A-Z Index](#) | [Contact FDA](#)

(1 of 2)



U.S. Environmental Protection Agency

Pesticides: Regulating Pesticides

[Recent Additions](#) | [Contact Us](#) | [Print Version](#) Search:

[EPA Home](#) > [Pesticides](#) > [Regulating Pesticides](#) > [Registering Pesticides](#) > [Regulating Biopesticides](#)

Regulating Biopesticides

[Registration](#)

[Reregistration](#)

[Pesticide-Producing Establishments](#)

[Laws](#)

[International Issues](#)

[Adverse Effects Reporting](#)

[Storage & Disposal](#)

[Restricted & Canceled Uses](#)

[Pesticide Tolerances](#)

[Registration Information Sources](#)

Before a pesticide can be marketed and used in the United States, the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) requires that EPA evaluate the proposed pesticide to assure that its use will not pose unreasonable risks of harm to human health and the environment. This regulation involves an extensive review of health and safety information.

Biopesticides include naturally occurring substances that control pests (biochemical pesticides), microorganisms that control pests (microbial pesticides), and pesticidal substances produced by plants containing added genetic material (Plant-Incorporated Protectants) or PIPs.

In the Biopesticide Registration Tools section below we provide links to information tools that may assist potential applicants. The Fact Sheets section provides links to information about each of the biopesticide active ingredients. The Product Lists section provides various lists of individual biopesticide products to assist the public in identifying appropriate biopesticide product for pest problems. Finally, the PIPs section provides extensive information regarding the regulation of genetically engineered plants.

Biopesticide Registration Tools

The federal pre-marketing approval of pesticides - termed Registration -- is a complex process. The documents linked from this page augment the general registration process as they relate specifically to the registration of biopesticides. The bpdcconsistency@epa.gov e-mail address has been created to respond to issues concerning Biopesticide registration inconsistency that affect processing of submissions. The Biopesticide Regulatory Action Leaders (RALs) will meet to discuss these issues and provide an answer usually within two to three weeks. Resolution of these issues will be posted to the Biopesticide website. Since this e-mail address is intended to focus only on addressing generic issues regarding consistency in the regulation of Biopesticides, other questions regarding biopesticides should be directed to the appropriate Biopesticide RAL or the Biopesticide Ombudsman, Brian Steinwand, steinwand.brian@epa.gov. If you have questions about conventional pesticides or antimicrobials, please contact the Ombudsman for Registration Division or Antimicrobial Division.

Highlights:

• [U.S. Environmental Protection Agency's Statement on Bt10](#)

• [New 2005 Biopesticide Active Ingredients](#)

[Highlights Archive](#)

Quick Resources:

• [US Regulatory Agencies Unified Biotechnology Website](#)
• [Current Plant Incorporated Protectant \(PIP\) Experimental Use Permits](#)
• [What are Biopesticides?](#)
• [Biopesticide EPA Contacts](#)
• [Octenol Fact Sheet](#)
• [Recent Biopesticide FR Notices](#)
• [Starlink™ Corn Archive](#)

Biopesticide Active Ingredient Fact Sheets

This collection of fact sheets contains chemical specific information about

Bt10 also has a marker gene for resistance to the antibiotic ampicillin which is not present in Bt11. The gene is under the control of a bacterial promoter and is not expected to be expressed in the corn so it does not need to be covered by any tolerance or tolerance exemption. According to information provided by Syngenta, the antibiotic resistance marker gene in Bt10 is the same as that in Event 176 corn.

40CFR 180.1173 - *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in all plants.

Bacillus thuringiensis CryIA(b) delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production in all plants are exempt from the requirement of a tolerance when used as plant pesticides in all plant raw agricultural commodities. "Genetic material necessary for its production" means the genetic material which comprise genetic material encoding the CryIA(b) delta-endotoxin and its regulatory regions. "Regulatory regions" are the genetic material that control the expression of the genetic material encoding the CryIA(b) delta-endotoxin, such as promoters, terminators, and enhancers. [61 FR 40343, Aug. 2, 1996]

40CFR 180.1151 - Phosphinothricin acetyltransferase (PAT) and the genetic material necessary for its production all plants; exemption from the requirement of a tolerance. Phosphinothricin acetyltransferase (PAT) and the genetic material necessary for its production in all plants are exempt from the requirement of a tolerance when used as plant-pesticide inert ingredients in all plant raw agricultural commodities. "Genetic material necessary for its production" means the genetic material which comprise genetic material encoding the PAT protein and its regulatory regions. "Regulatory regions" are the genetic material that control the expression of the genetic material encoding the PAT protein, such as promoters, terminators, and enhancers. [62 FR 17719, Apr. 11, 1997]

For more information on FDA's position on Bt10, see U. S. Food and Drug Administration's Statement on Bt10.

For more information on the respective roles of USDA-APHIS, EPA, and FDA in the federal regulation of genetically engineered plants, see the United States Agencies Unified Biotechnology Website at <http://usbiotechreg.nbiil.gov/>.

[Publications](#) | [Glossary](#) | [A-Z Index](#) | [Jobs](#)

[EPA Home](#) | [Privacy and Security Notice](#) | [Contact Us](#)

Last updated on Wednesday, April 27th, 2005

URL: http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/pips/bt10_statement.htm



Registration
Reregistration
Pesticide-Producing
Establishments
Laws
International Issues
Adverse Effects
Reporting
Storage & Disposal
Restricted & Canceled
Uses
Pesticide Tolerances
Registration
Information Sources

U.S. Environmental Protection Agency

Pesticides: Regulating Pesticides

[Recent Additions](#) | [Contact Us](#) | [Print Version](#) Search:

[EPA Home](#) > [Pesticides](#) > [Regulating Pesticides](#) > [Registering Pesticides](#) > [Regulating Biopesticides](#) > [Plant Incorporated Protectants](#) > U.S. Environmental Protection Agency's Statement on Bt10

U.S. Environmental Protection Agency's Statement on Bt10

EPA's Regulatory Process and Evaluation of Bt10

The United States Environmental Protection Agency regulates pesticidal substances produced in plants and the genetic material necessary for the plant to make those substances. Under the Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act, a compound is a pesticide if there is a claim that the substance will control a pest such as an insect, weed, or plant pathogen. EPA calls these pesticidal substances plant-incorporated protectants when they are intended to be used in the plant. EPA does not regulate such products when they are produced through conventional breeding techniques, but is regulating new substances such as those produced through modern biotechnology. EPA also must make a determination about the safety of any pesticide residues in food or feed as required under the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA). EPA's authority is only with pesticides and the U.S. Food and Drug Administration has authority for other provisions of FFDCA.

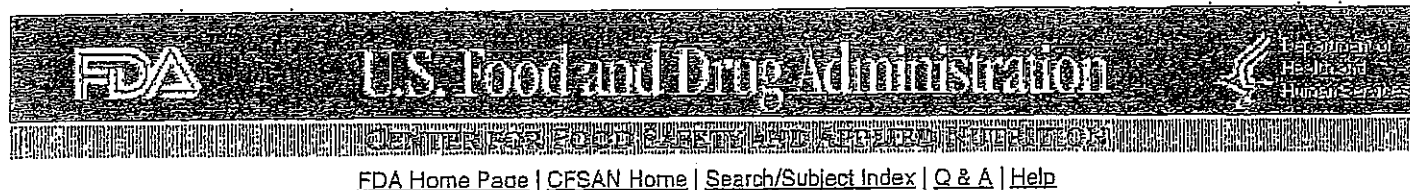
In order to be sold legally as food or feed in the United States, crops containing plant-incorporated protectants, such as the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ab protein produced by Bt10, must be covered by a tolerance or an exemption from tolerance issued by EPA under its FFDCA authority after completion of its safety review and a rule making process which allows for public comment and EPA to respond to any comments.

EPA granted an exemption from tolerance for Bt Cry1Ab protein in all food and feed commodities on August 2, 1996. The tolerance exemption is published in the Code of Federal Regulations (40CFR 180.1173). In September 2001, EPA completed a reassessment of this tolerance exemption considering all of the existing data, public literature, and public comments. The reassessment determined that the tolerance exemption met all the scientific and regulatory standards. This tolerance exemption for the Bt Cry1Ab protein is not event-specific and therefore applies to all Cry1Ab protein including Bt10, Bt11, MON810, Event 176 and any other event producing the Cry1Ab protein that might be found in the food supply.

EPA's Risk Assessment for Bt10 Plant-Incorporated Protectants

Syngenta performed the DNA sequence analysis of the genetic insert of the Bt10 event and submitted the sequence to the Agency. The coding sequences of the Bt10 event are identical to those previously reported for the registered event, Bt11. Syngenta provided data that all of the nucleotides in the coding region are identical in Bt10 and Bt11. The expressed proteins are Cry1Ab and the inert marker PAT for herbicide tolerance. Syngenta also performed western blot analysis on the proteins expressed in leaf tissue from the Bt10 event. The Cry1Ab and PAT proteins extracted from leaf tissue from the Bt10 event appear to be the same as the proteins from leaf tissue from Bt11 event based on the immunoreactivity of comigrating bands. Syngenta submitted a published article comparing the Cry1Ab expression level in corn from event Bt10 compared with event Bt11, which showed that a hybrid produced from event Bt10 has much lower expression levels of Cry1Ab (< 1 ng/mg soluble protein) than hybrids produced from event Bt11 (257-457 ng/mg soluble protein). Lower expression levels of the Cry1Ab protein mean there is even a lower potential for possible adverse environmental effects on animals, birds, fish, and non-target insects.

FDA/Center for Food Safety & Applied Nutrition
Hypertext updated by day April 27, 2005



Biotechnology

Announcements	Presentations & Testimony	Information for Consumers
Regulations & Guidance	Products: Completed Consultations	Compliance
Food Labeling		International
Center for Veterinary Medicine	Other Government Agencies	Non-Government Information

Announcements

~~2005~~

- [FDA Statement on Bt 10 Corn April 27, 2005](#) ~~NEW~~
 - [EPA Statement on Bt 10 Corn April 27, 2005](#)

2004

- [FDA Proposes Draft Guidance for Industry for New Plant Varieties Intended for Food Use](#) November 19, 2004 ~~NEW~~
 - [Notice of Availability: Draft Guidance: Recommendations for the Early Food Safety Evaluation of New Non-Pesticidal Proteins Produced by New Plant Varieties Intended for Food Use](#) November 24, 2004
 - [DRAFT Guidance: Recommendations for the Early Food Safety Evaluation of New Non-Pesticidal Proteins Produced by New Plant Varieties Intended for Food Use](#), November 24, 2004
- [National Research Council Report: Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects](#) (available in [PDF](#))

2003

- [Notice of Meeting, Food Advisory Committee: Food Biotechnology Subcommittee Meeting, September 24, 2003](#), September 5, 2003
 - [Transcript](#)

2002

- [FDA Action on Corn Bioengineered to Produce Pharmaceutical Material](#) November 19, 2002
- [Notice of Meeting, Food Advisory Committee: Food Biotechnology Subcommittee Meeting, August 13-14, 2002](#), July 25, 2002
 - [Transcript](#)
- [Genetically Modified Foods: Experts View Regimen of Safety Tests as Adequate, but FDA's](#)



European Food Safety Authority

9 June 2005

STATEMENT

EFSA follows up on Bt10 maize

On 12 April 2005 the European Food Safety Authority (EFSA) released a statement on the lack of data available to assess the risks of Bt10¹ following the inadvertent release in the United States of a non-authorised genetically modified (GM) maize line called Bt10 and its unintended export as Bt11 to the European Union (EU).

EFSA has received a confirmation from Syngenta (the company which developed the genetically modified maize Bt10 maize) that the material subjected to safety studies described in the application for the use of Bt11 maize in cultivation² was indeed Bt11 maize that had not been compromised by the presence of Bt10 maize. Hence the GMO Panel could conclude its risk assessment and finalised its opinion on the safety of Bt11 maize which was adopted on 20 April 2005 and published on 20 May 2005³.

As apparently Bt10 was not intended to be further developed for commercial market purposes, Syngenta did not provide sufficiently comprehensive data for performing a full risk assessment of Bt10. It is therefore not possible to conclude on the safety of Bt10 itself. However, information on the newly inserted genetic material and the protein characterisation confirmed the presence in Bt10 of a gene (*bla_{TEM}*) conferring resistance to the antibiotic ampicillin (see EFSA statement¹ of 12 April 2005 for more information on the antibiotic resistance marker gene). It also showed that the two new proteins, found in Bt 10 and Bt11 maize, Cry1Ab and PAT, are identical. These characteristics were addressed in the EFSA Bt11 risk assessment.

Syngenta has estimated that the overall contribution of Bt 10 to all maize imported from the United States to the European Union (EU) is extremely low. This estimation is based

¹ http://www.efsa.eu.int/press_room/press_statements/884_en.html

² EFSA-Q-2004-012, application under Directive 2001/18/EC

³ Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the notification (Reference C/F/96/05.10) for the placing on the market of insect resistant genetically modified maize Bt11, for cultivation, feed and industrial processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Syngenta Seeds, The EFSA Journal (2005) 213, 1-33
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_opinions/922_en.html

on the amount of Bt10 seeds distributed and the area which could potentially have been planted with Bt10 maize (relative to the total maize cultivation area). The low potential contamination level of maize grain imported into the EU with Bt10 would therefore imply a very low exposure to Bt10 maize and derived products. In addition, the applicant has confirmed that Bt10 maize has not been used in sweet corn varieties used for human consumption.

Given that the two new proteins found in Bt11 and Bt10 are identical, and on the basis that information provided by Syngenta is correct – which EFSA cannot independently verify-- it is not considered likely that the inadvertent contamination of the imported maize grain with Bt10 poses a safety concern to animals and consumers. In light of the remaining uncertainties, and given the impossibility of carrying out a full risk assessment on Bt10 maize, the European Commission has taken an emergency measure requiring imports from the US of maize gluten feed and brewers grain used as animal feed to be certified as free of Bt10⁴.

For media enquiries, please contact:

Carola Sondermann, Senior Press Officer

Tel: + 39 0521 036 294

Email: Carola.Sondermann@efsa.eu.int

Or Anne-Laure Gassin, EFSA Communications Director,

Tel: +32 2 337 2248 – Mobile: + 32 473 301 968

Email: Anne-Laure.Gassin@efsa.eu.int

For more background information about the European Food Safety Authority, go to:

<http://www.efsa.eu.int>

⁴http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/en/oj/2005/L_101/L_10120050421en00140016.pdf

飼料由来消化管内生産物の 家畜に対する影響と動態解明

In vivo and *in vitro* Assessment of Genetically Modified
Corn Bt11 Feeding to Animals

農林水産技術会議事務局

飼料由来消化管内生産物の 家畜に対する影響と動態解明

In vivo and *in vitro* Assessment of Genetically Modified
Corn Bt11 Feeding to Animals

2004年1月

序 文

研究成果シリーズは、農林水産技術会議が関係研究機関の協力を得て推進したプロジェクト研究等の成果を研究・行政等の関係者に総合的かつ体系的に報告することにより、今後の研究及び行政の効率的推進等に資することを目的として刊行するものである。

この第422集「飼料由来消化管内生産物の家畜に対する影響と動態解明」は、農林水産技術会議の行政対応特別研究として、平成12年度から平成14年度までの3年間にわたり、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構動物衛生研究所（旧・農林水産省家畜衛生試験場）が実施した研究の成果を取りまとめたものである。

農林水産省は平成8年4月に、組換え体を利用した飼料の安全性を確保するため、「組換え体利用飼料の安全性評価指針」を制定した。また、「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」に基づく「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令」を、組換え体利用飼料等について農林水産大臣による安全性確認を義務づけるよう改正し、この改正省令が平成15年4月に施行されたところである。

このように、組換え体利用飼料等について安全性評価手法の開発が求められていることから、本研究は、組換え体利用飼料の消化・吸収等、動物体内における動態の把握を行い、生産される畜産物への組換えDNAやその生成物の移行の有無を確認するとともに、組換え体利用飼料の給与動物に対する安全性評価に資することを目的として実施した。

この研究成果は、今後の農林水産関係の研究開発及び行政を推進する上で貴重な知見を与えるものと考え、ここに本書を刊行し、広く関係者の参考に供することとした次第である。

最後に、本研究を担当し、推進された方々の労に対し、深く感謝の意を表する。

平成16年1月

農林水産技術会議事務局長
石原 一郎

目 次

研究の要約	1
第1編 動物を用いた組換え体利用飼料の影響評価技術の確立	5
第1章 組換え体利用飼料由来物質の動物体内代謝の解明	5
1. 組換え体利用飼料由来物質の組織局在検出法	5
2. 組換え遺伝子及びその産物のルーメン内代謝	13
第2章 組換え体利用飼料給与が動物の生体機能に与える影響の解明	19
1. 反芻家畜を用いた飼養試験による組換え体利用飼料の影響評価	19
2. 鶏・豚を用いた飼養試験による組換え体利用飼料の影響評価	24
3. マウス2世代繁殖成績及び生存性に及ぼす組換え体利用飼料の影響評価	29
4. 組換え体飼料由来物質の培養細胞を用いた影響評価	33

研究の要約

I 研究年次・予算区分

平成12～14年度・農林水産技術会議行政対応特別研究

II 主任研究者

主 査：動物衛生研究所長（家畜衛生試験場長）
寺門 誠致（平成12年4月～15年3月）

副主査：家畜衛生試験場 飼料安全性研究部長
元井 霞子（平成12年4月～13年3月）
動物衛生研究所 安全性研究部長
三浦 克洋（平成13年4月～15年3月）

チームリーダー：

動物衛生研究所 安全性研究部
安全性評価研究室長
村田 英雄

III 研究担当機関

（独）農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所、同 畜産草地研究所（農林水産省家畜衛生試験場、農林水産省畜産試験場）

IV 研究目的

遺伝子組換え体（以下「組換え体」）農産物利用については、消費者からその安全性に対する懸念が広がっており、組換え体農産物を用いた食品については、安全性の審査と表示が法的に義務づけられることとなった。一方、組換え体利用飼料は、肉、乳、卵等畜産食品生産のためのものとなる農産物資材となりうることから、組換え体農産物を利用した食品と同様に安全性評価手法の開発が求められている。

そこで、本研究では、家畜等における組換え体利用飼料の消化・吸収等体内動態を把握し、生産される畜産物への組換え DNA やその産生蛋白質の移行の有無を確認するとともに、組換え体利用飼料を給与した家畜等に対する影響を調べ、その安全性評価に資することを目的とする。

V 研究方法

組換え体利用飼料由来遺伝子として、殺虫性蛋白

質 Cry1Ab 遺伝子を組み込んだトウモロコシ (Bt11 トウモロコシ) を家畜(ウシ、豚、鶏)、実験動物(マウス)に長期間投与するとともに、Cry1Ab 遺伝子やその産生蛋白質を人工ルーメン液や消化器官等由来の培養細胞とともに培養することにより、以下の検討を行なった。

1. 組換え体利用飼料由来遺伝子および蛋白質の動物体内における動態解明手法を明らかにするため、1) 組換え体利用飼料由来遺伝子および蛋白質の家畜の消化管および組織局在を検出する手法を検討した。2) また、Bt11 トウモロコシに含まれる組換え遺伝子及びその産物の人工ルーメン内における分解・代謝を解析した。

2. 組換え体利用飼料給与が動物の生体機能に与える影響を解明するため、1) 牛を用いた飼養試験による組換え体利用飼料の増体量・飼料効率・ルーメン機能に対する影響を調べた。2) 組換え体利用飼料の栄養成分、飼養試験による豚と鶏に対する栄養評価および病理組織学的影響を調べた。3) マウスを用いて、組換え体利用飼料を世代を越えて給与した時の繁殖および寿命に対する影響を調べた。4) 組換え体利用飼料由来蛋白質の消化管上皮細胞や肝臓細胞の形態と機能に対する影響などを検討した。

これらの試験は、Cry1Ab 遺伝子のみが異なる非組み換え体トウモロコシについて同様に行い両者の成績を比較検討した。

VI 研究結果

遺伝子組み換え体利用飼料の家畜に対する影響評価手法の開発に資するため、上記の研究方法で述べたような総合的検討を行った。

その結果、1. 「組換え体利用飼料由来物質の動物体内代謝の解明」においては、Bt11 トウモロコシを給与した家畜の組織（肝臓・腎臓・筋肉・リンパ組織）に、トウモロコシ本来の DNA は検出されたが、Cry1Ab 遺伝子は検出されないことを示した。また、牛のルーメン液を用いてその消化について調べたところ、Cry1Ab 遺伝子やその遺伝子産物は速やかに分解されるが、消化残渣においては、それらが検出される可能性があることを明らかにするとともに、

研究計画表

研究課題 (課題番号)	研究実施年度			担当研究機関(部・研究室)	
	12	13	14		
動物を用いた組換え体利用飼料の影響評価技術の確立 (1000)					
1 組換え体利用飼料由来物質の動物体内代謝の解明 (1100)					
ア 組換え体利用飼料由来物質の組織局在検出法 (1110)				動物衛生研究所	安全性研究部 毒性病理研
イ 組換え遺伝子及びその産物のルーメン内代謝 (1120)				畜産草地研究所	家畜生理栄養部 消化管微生物研
2 組換え体利用飼料給与が動物の生体機能に与える影響の解明 (1200)					
ア 反芻家畜を用いた飼養試験による組換え体利用飼料の影響評価 (1210)				動物衛生研究所	安全性研究部 毒性物質制御研
イ 鶏・豚を用いた飼養試験による組換え体利用飼料の影響評価 (1220)				畜産草地研究所	家畜生理栄養部 中小家畜代謝研
ウ マウス2世代繁殖成績及び生存性に及ぼす組換え体利用飼料の影響評価 (1230)				動物衛生研究所	安全性研究部 上席研究官
エ 組換え体飼料由来物質の培養細胞を用いた影響評価 (1240)				動物衛生研究所	安全性研究部 安全性評価研

ルーメン細菌対してはその生態に影響を与えないことを示した。

2.「組換え体利用飼料給与が動物の生体機能に与える影響の解明」においては、Bt11トウモロコシを子牛に12週間給与し、増体量、血液生化学所見、ルーメン性状等を観察した結果、Bt11トウモロコシに起因すると思われる異常はみられなかった。また、Bt11トウモロコシの豚および鶏における栄養価や、豚および鶏を同トウモロコシを4週間与えた飼養成績および病理組織学的所見において、非組換え体トウモロコシを与えた成績との間に違いが認められなかった。

また、Bt11トウモロコシを68%含有し標準の栄養価をもつ固形飼料を、マウスに2世代にわたって給与したところ、生存胎児数や産児数などの繁殖成績は、非組換え体トウモロコシを給与したマウスのそれと差異を認めなかった。なお、継続給与3世代目のマウスの寿命に与える影響も検討中であるが、平均24ヶ月齢を過ぎた時点において、死亡マウスの出現率においてもBt11トウモロコシ給与区と非組換え体トウモロコシ給与区間で差はみられていない。

組換え体遺伝子で作る Cry1Ab 蛋白質のヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞におよぼす影響を検討した結果、形態、細胞数、LDH 遊離率、膜電位、アルブミン分泌量のいずれにおいても昆虫の中腸上皮細胞でみられる毒性は認められないことを明らかにした。

以上のように、本研究で設計されたような試験を実施することにより、種々の角度から組換え体利用飼料の家畜・実験動物・培養細胞等に対する影響を検討した結果、組換え体遺伝子やその産生蛋白質に特異的な変化は見られないとの成績を得た。今回用いた解析法は、今後の組換え体利用飼料の安全性評価のための資料となりうるものと考えられた。

VII 今後の課題

家畜の消化管内の未消化部分においては、Cry1Ab 遺伝子や蛋白質は残存し、環境に排泄されることが示された。また、牛や豚の消化管内容から、組換え体遺伝子およびトウモロコシの家畜遺伝子のDNA断片が検出され、子牛では家事遺伝子DNAの断片は末梢血単核細胞、臓器や筋肉に移行するこ

とが示唆された。その意義については、今後の検討課題である。

他の遺伝子組換え体農産物について、本研究における手法によって同様な結果が得られるとは、必ずしも言い切ることはできない。飼料用作物に導入される遺伝子は様々なものがあるため、Cry1Ab 遺伝子以外の導入作物については、その目的・機能を考慮にいたした影響評価が必要となるものと考えられる。

VIII 研究発表

- 1) Chowdhury, EH. et al. (2003) Detection of Genetically Modified Maize DNA Fragments in the Intestinal Contents of Pigs Fed Star-Link™ CBH351. Vet. Hum. Toxicol. 45 : 95-96
- 2) Chowdhury, EH. et al. (2003) Detection of Cry1Ab Protein in the Gastrointestinal Contents but not in the Visceral Organs of Genetically Modified Bt11-Fed Calves. Vet. Hum. Toxicol. 45 : 72-75
- 3) Chowdhury, EH. et al. (2003) Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. J. Anim. Sci. 81 : 2546-2551
- 4) Chowdhury, EH. et al. (2004) The Fate of Maize Intrinsic and Recombinant Genes in Calves Fed Genetically Modified Maize Bt11. J. Food. Protect. 67 : 365-370
- 5) Chowdhury, EH.ら (2003) 遺伝子組み換えトウモロコシ CBH351 スターリンクを給与した豚の腸管内容からのトウモロコシ由来 DNA 断片の検出. 第136回日本獣医学会講演要旨集 : 181
- 6) 宮崎茂ら、遺伝子組み換えトウモロコシの子牛への給与試験. 第136回日本獣医学会講演要旨集 : 181
- 7) 山崎信ら (2003) Bt トウモロコシの豚および鶏に対する栄養価と飼養成績に及ぼす影響. 畜産草地研究所研究報告. 4 : 15-21
- 8) Shimada, N. et al (2003) Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. J. Vet. Med. Sci. 65 : 187-191
- 9) 嶋田伸明ら (2002) 殺虫性毒素 Cry 蛋白質の昆

虫細胞への作用機序と動物細胞への影響. 獣医生化学. 39(1) : 11-19

- 10) 嶋田伸明ら (2001) 殺虫性タンパク Cry1Ab がウシ初代培養肝細胞に与える影響. 第132回日本獣医学会学術集会講演要旨集 : 144
- 11) 嶋田伸明ら (2002) 殺虫性タンパク Cry1Ab : 昆虫細胞への作用機序と動物細胞への影響. 第37回獣医生化学会学術集会講演要旨集 : 41
- 12) 嶋田伸明ら (2003) 殺虫性蛋白質 Cry1Ab がヒト小腸上皮細胞に与える影響. 第135回日本獣医学会学術集会講演要旨集 : 202

IX 特許取得・申請

なし

X 担当研究者

(数字は、研究計画表における課題番号)

- 1000 三浦 克洋* (独農業・生物系特産業技術研究機構・動物衛生研究所・安全性研究部)
- 1110 中島靖之[○]、¹Chowdhury, E. Haque、山本祥子、三上 修 (同・動物衛生研究所・安全性研究部・毒性病理研究室、¹科学技術振興事業団)
- 1120 田島清[○]、三森眞琴*、梶川博、栗原光規、竹中昭雄 (同・畜産草地研究所・家畜生理栄養部・消化管微生物研究室)
- 1210 宮崎 茂[○]、山中典子、グルゲキールティ・シリ (同・動物衛生研究所・安全性研究部・毒性物質制御研究室)
- 1220 山崎信[○]、¹斎藤守、村上斉 (同・畜産草地研究所・家畜生理栄養部・中小家畜代謝研究室、¹同研究室前任室長)
- 1230 佐伯隆清[○]、¹三浦 克洋、²羽龍 芳彦、²田口 葉子 (同・動物衛生研究所・安全性研究部・上席研究官、¹安全性研究部長、²独アニマルケア)
- 1240 嶋田伸明[○]、村田英雄*、吉岡 都、¹宮本和久 (同・動物衛生研究所・安全性研究部・安全性評価研究室、¹(独) 農業生物資源研究所・動物生命科学研究所・昆虫適応遺伝研究グループ・昆虫病理研究チーム長)

*取りまとめ者、[○]執筆者

XI 取りまとめ責任者あとかき

本研究で得られた組換え体の動物に及ぼす影響評価の結果は、今後の遺伝子組換え飼料の安全性審査や組換え体に関する規制等を検討する場において、科学的知見として利用できるものと思われる。また、本研究において実施された組換え体の家畜の消化管や組織における動態解明手法は、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続（農林水産省告示第1780号）」において組換え体の安全性に関わる成績を得るための試験方法の参考となりうるものと考えられる。今日、スターリンクの

飼料への混入が検出されるなど、組換え体農作物（飼料）の安全性に対する消費者の関心が高まってきており、これについての正確な科学的情報の発信と、消費者と行政・研究機関のリスクコミュニケーションのあり方が問われている。今後も、遺伝子組み換え作物の動物に対する影響や組換え体遺伝子・蛋白質の動態など、必要な解析手法にもとづいた情報を得て、新たに開発される組換え体作物の安全性に関わるリスク評価およびリスクコミュニケーションに活かしていくべきと考えられる。

（三浦 克洋）

第1編 動物を用いた組換え体利用飼料の影響評価技術の確立

第1章 組換え体利用飼料由来物質の動物体内代謝の解明

1. 組換え体利用飼料由来物質の組織局在検出法

ア 目的

組換え体利用作物には害虫や農薬への抵抗性が付与され、作物の効率的な生産に有用である^{2,11,12,14)}。一方で、その有用性が生態系、食品や飼料としての安全性にあたえる影響が懸念されている^{14,18)}。遺伝子組換えコーン Bt11には *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の殺虫性タンパク Cry1Ab をコードする DNA が、またスターリンクには *B. thuringiensis* の殺虫性タンパク Cry9C に加え除草剤抵抗性遺伝子が組み込まれている。組換え体利用飼料の家畜への給与ではヒトに比べてはるかに大量が給与されるので、農家など消費者の側には、異なる種から組み込まれたこれらの遺伝子やその産物が動物の体内に移行するのではないかという漠然とした不安がある^{2,14,18)}。一部では組換え遺伝子が生体内に移行しないとの成績が出始めているが^{3,9,20)}、相対的に比較評価できる尺度がしめされていないために、生体内移行についての漠然とした不安を解消するには至っていない。不安の解消のためには飼料由来の組換え体 DNA やタンパクの家畜体内での消長を遺伝子断片を検出する PCR やタンパクを検出する免疫学的検査によって解析し、得られた結果をコーン由来遺伝子や植物に共通する DNA をモノ指シの尺度として比較しながら評価することが必要とおもわれる。そのための尺度を得る。

イ 研究方法

実験的に Bt11 やスターリンクを含む飼料を給餌した子牛と豚の消化管内容と血液などの臨床材料について PCR や免疫学的検査をおこなった。

(ア) PCR 用プライマー

臨床材料中の組換え体遺伝子は消化により短い断片となっていると予想される。そこで、長さ100から1,000塩基対を目標として組換え体遺伝子 (*cry1Ab*, *cry9C*) とコーンに特異的な家事遺伝子、植物に遍在するゲノム DNA 断片検出のためのプライマー情報

の収集、改良をはかった。プライマーとして *cry1Ab* のために IV01-CR01 (464bp, F; 5'-GGT ACA GTA CAC ACA CAT GTA T-3', R; 5'-GAT GTT TGG GTT GTT GTC CAT-3'), Bt111-5'-*cry I* A1-3' (103bp, F; 5'-CCA TTT TTC AGC TAG GAA GTT C-3', R; 5'-TCG TTG ATG TTK GGG TTG TTG TCC-3'), *cry9C* のために CM03-CBH1-3' (170bp, F; 5'-CCT TCG CAA GAC CCT TCC TCT ATA-3', R; 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC G-3'), CBH1-5'-CBH1-3' (103bp, F; 5'-CTA TTA CTT CAG CCA TAA CAA AAG AAC TCT-3', R; 5'-GTA GCT GTC GGT GTA GTC CTC G-3'), コーンの家事遺伝子としてコーン特異的 *zein* (*Ze1*) のために ZE01-ZE02 (329 bp, F; 5'-TGC TTG CAT TGT TCG CTC TCC TAG-3', R; 5'-GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT-3'), ZEn1-5'-ZE02 (242bp, F; 5'-TTG GGT ACC ATG AAC CCA T-3', R; 5'-GTC GCA GTG ACA TTG TGG CAT-3') invertase のために; IVR1-IVR2 (226bp, F; 5'-CCG CTG TAT CAC AAG GGC TGG TAC C-3', R; 5'-GGA GCC CGT GTA GAG CAT GAV GAT C-3'), コーン由来で他の植物にもクロスする RUBISCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) のために *rbcL* (1,028bp, F; 5'-ATG TCA CCA CAA ACA GAG AGA CTA AAG C-3', R; 5'-AAA GTT ATT TCG CGT TCC CCT TCT AAC T-3'), *rbcL*02-5'-*rbcL*02-3' (231bp, F; 5'-GCA TGA CTA CTT AAC AGG AGG ATT CA-3', R; 5'-AAA GTT ATT TCG CGT TCC CCT TCT AAC T-3'), 植物共通として葉緑体に存在する運搬(t)RNA の *trnT* と *trnF* 間の塩基配列を検出する Plant2 (196bp, F; 5'-GGA AGC TGT TCT AAC GAA TCG-3', R; 5'-CTC GAA AAC AAT GAA TTG AAG G-3'), ウシに特異的なプライマー; L8129-H8357 (271bp, F; 5'-GCC ATA TAC TCT CCT TGG TGA CA-3', R; 5'-GTA GGC

TTG GGA ATA GTA CGA-3') を選択、合成した4-8,10,13,16,17,19)。

(イ) PCR

各実験で使ったプライマーはことなるが、方法はすべて同じとし国内の公的検査機関での方法に準じた^{16,17)}。臨床材料からのDNAの抽出は市販のキット QIAamp Dneasy (キアゲン) を、PCR は AmpliTaq Gold (Applied Biosystems) をもちいた。

タンパクの検出：検体からの Cry1Ab タンパクの検出のため ELISA (Cry1Ab/Ac kit、Envirologix)、イムノクロマトグラフィー (Trait Btl, SDI)、イムノブロットをもちいて検出をこころみた。

(ウ) 検体

豚では害虫抵抗性遺伝子と除草剤耐性遺伝子が組みこまれたスターリンクコーン CBH351 または通常のトウモロコシを70%含む飼料を2週間給与された豚 (LW x D) 各8頭の腸管内容について、組換え害虫抵抗性 *cry9C* 遺伝子とトウモロコシ家事遺伝子 *zein (Zel)* の DNA 断片を標的としてそれぞれ2種類のプライマーによる PCR をおこなった⁷⁾。

同様に、害虫抵抗性遺伝子 (*cry1Ab*) を組み込んだコーン Bt11 または非組換えコーンをそれぞれ60%含む飼料を4週間給餌した豚 (LWD) 計10頭の消化管内容と血液についてコーン家事遺伝子のための IVR (226bp)、*rbcl* (1,028bp)、*ZEN1-5'-ZE02* (242bp) と組換え *cry1Ab* 遺伝子のための IV01-CR01 (464bp)、*Bt111-5'-cry I A1-3'* (103bp) の5種のプライマーによる PCR をおこなった。また、組み換え産物の Cry1Ab タンパクについても ELISA、イムノクロマトグラフィー、イムノブロットでの検出を検討した⁶⁾。

子牛では第一胃フィステルを装着したおよそ3か月齢の去勢牛12頭に44%の Bt11 または non-Bt を含む飼料^{15,7)}を3か月間^{4,14)}給餌した子牛での DNA⁷⁾とタンパク⁶⁾の検出をこころみた。給与期間中 Bt 群と対照群各6頭からルーメンと直腸内容、末梢血を、解剖時には消化管各部位の内容と臓器を採材して、組換え Cry1Ab タンパクの検出と病理検査をおこなった。PCR 用のプライマーには IVR (226bp)、*ZEN1-5'-ZE02* (242bp)、*rbcl* (1,028bp)、*rbcl02-5'-rbcl02-3'* (231bp)、*Plant2* (196bp)、*Bt111-5'-cryIA1-3'* (110bp)、*IV01-CR01* (437bp)、*L8129-H8357* (271bp) をもちいた⁷⁾。

表1-1 スターリンクを給餌した豚腸管内容でのコーン家事遺伝子と組換え *cry9C* 遺伝子の検出

豚 No.	Zein (Zel)						<i>cry9C</i>					
	ZE01-ZE02			ZEN1-5'-ZE02			CM03-CBH1-3'			CBH1-5'-CBH1-3'		
	Du	Ce	Re	Du	Ce	Re	Du	Ce	Re	Du	Ce	Re
1			+			+			-			-
2			+			-			-			-
3			-			+			-			-
4			-			-			-			-
5	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9			+			+			+			+
10			-			-			-			-
11			-			-			-			+
12			+			+			-			+
13	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
14	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
%	0	38	31	0	25	31	0	50	25	0	25	38

Du：十二指腸、Ce：盲腸、Re：直腸

豚 No. 1-8：non-Gm fed, 9-16：StarKink fed.

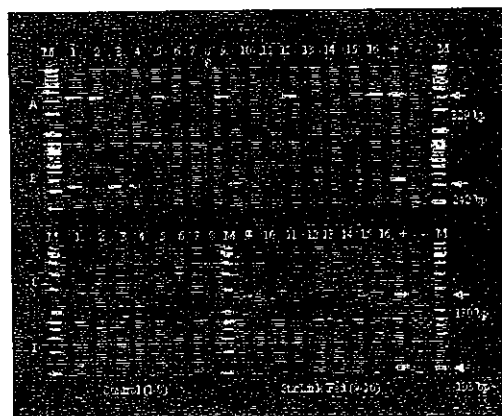


図1-1 スターリンク給餌豚直腸内容の PCR 矢印は PCR 産物の長さを示す。

プライマーは、A：ZE01-ZE02、B：ZEN1-5'-ZE02、C：CM03-CBH1-3'、D：CBH1-5'-CBH1-3'、M：100 bp マーカー

Lane1-8：対照 lane9-16：スターリンク

+: 陽性対照 -: 陰性対照

ウ 結果

豚では、まず *cry9C* はスターリンク給与群の直腸内容から37.5% (103bp) または25% (170bp) に、盲腸内容からは25% (103bp) または50% (170bp) に検出され、対照群からは *cry9C* が検出されなかった。いっぽう、家事遺伝子 *Ze1* は直腸内容から31.3% (242bp, 329bp) に、盲腸内容から25% (242bp) または37.5% (329bp) に検出された。(表1-1、図1-1)

表 1-2 Bt11を給与した豚消化管内容からの PCR によるコーン遺伝子の検出

コーン家事遺伝子															組換え cry1Ab 遺伝子											
ZEn1-5'-ZE02 (142 bp)					IVR1-IVR2 (226 bp)					rbCLP-rbCLR(1,028 bp)					Bt11 1-5'-cry1Ab 1-3'(110bp)					IVO1-CRO1 (437 bp)						
株	S	D	I	C	R	S	D	I	C	R	S	D	I	C	R	S	D	I	C	R	S	D	I	C	R	
E1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
E2	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	E2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-
E3	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	E3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
E4	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	E4	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
E5	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	E5	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C1	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-											
C2	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-											
C3																										
C4	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-											
C5	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-											

S; 胃、D; 十二指腸、I; 回腸、C; 盲腸、R; 直腸

E1-E5; Bt11給与豚、C1-C5; 対象豚。

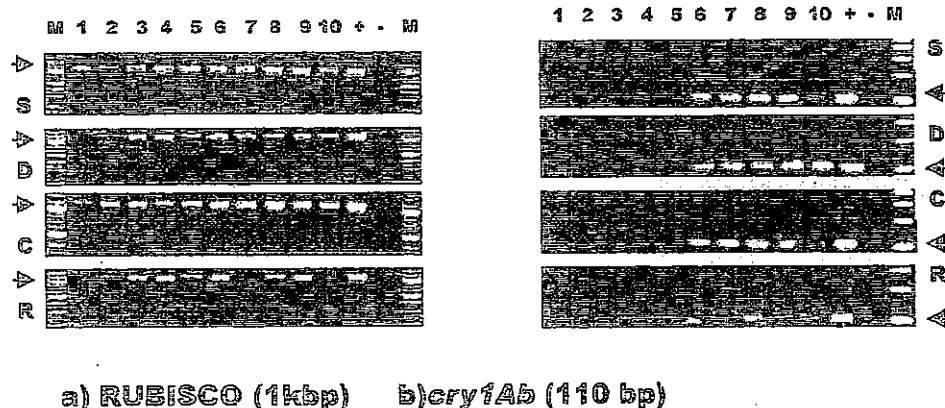


図 1-2 Bt11給餌豚消化管内容の PCR

プライマーは、a) rbCL(1028bp)、b) Bt111-5'-cry1Ab1-3'(110bp) 矢印は PCR

産物の長さを示す。Lanes1-5: 対照豚 lanes6-10: Bt11給餌豚

+ : 陽性対照 - : 陰性対照 M : マーカー

S : 胃 D : 十二指腸 C : 盲腸 R : 直腸

Bt11または non-Bt コーンを 4 週間給餌した豚では、*Ze1*(242bp)、*IVR*(226bp)と *RUBISCO* (*rbCL*, 1,028bp) が、常にはないが消化管内容に検出され、Bt11を給餌した豚には *cry1Ab* (110bp と 437bp) が検出された(表 1-2、図 1-2)。一方末梢血単核細胞からはこれらの家事遺伝子と組換え体遺伝子はこれらのプライマーによる PCR では検出されなかった。組換え体由来タンパクもイムノクロマトグラフィー、ELISA とイムノブロットで微量ながら消化管内容に検出された(表 1-3、図 1-3)。なお、これらタンパクの検出系は血液には機能しなかった。

子牛では遺伝子組換え Bt11コーンを給与で組換え *Cry1Ab* タンパクは微量が消化管内容から検出されたが、各臓器からは検出されず病理検査でも異常がみられなかった(表 1-4 a、表 1-4 b、表 1-5、図 1-4、図 1-5)。環境中では糞便中の *Cry1Ab* タンパクが速やかに検出不能となった(図 1-8)。

DNA では葉緑体、コーン家事遺伝子と組換え *cry1Ab* の DNA 断片は常にはないが、実験の全期間中、ルーメンと直腸内容から検出された(図 1-7、図 1-9、図 1-8)。葉緑体、コーン家事遺伝子 (*rbCL02-5'-rbCL02-3'*, 231bp) は末梢血単核球、

表1-3 Bt11を給餌した豚消化管内容でのELISAとimmunochromatographyによるCry1Ab蛋白の検出

部位/豚番号	1	2	3	4	5
Stomach	±/+	-/+	+/+	+/+	+/+
Duodenum	±/±	-/±	-/-	±/+	-/±
Ileum	±/±	+/+	±/±	±/+	-/±
Cecum	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Rectum	+/+	+/+	±/-	+/+	+/+

ELISA 値/Immunochromatography 結果。

+: ELISA 値>200ng/g または immunochromatography 陽性、

±: ELISA 値>50ng/g または immunochromatography 弱陽性、-: 陰性。

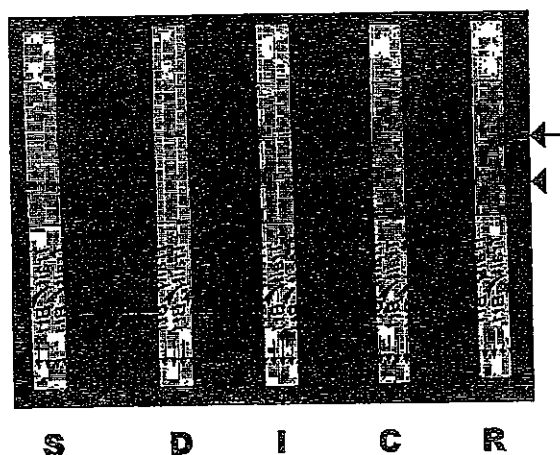


図1-3 Bt11を給餌した豚消化管内容からのImmunochromatographyによるCry1Abタンパクの検出

S; 胃、D; 十二指腸、C; 盲腸、R; 直腸
矢頭は陽性、矢印は反応終了を示す。

主要臓器と筋肉から常にではないが、検出された(表1-6、図1-10、図1-11)。

これらの結果から子牛では、組換え遺伝子を含む飼料由来DNAは消化管内で完全には分解されず、PCRで検出可能な形で残存し、200塩基対程度でゲノム内のコピー数が多いDNAは生体内に移行すること、いっぽう、組み換え体DNA(コピーが数個以下)を含むコピー数が少ないDNA(zeinは100以下)では生体内移行の検出はきわめて困難なことが示された。

エ 考 察

飼料はヒトに比べてはるかに大量が家畜へ給与される。しかし遺伝子組換えには消費者に漠然とした懸念があるので、組換え体利用飼料の使用を農家など消費者に評価してもらうためには、判断材料のひとつとして組み換えDNAを含む飼料成分の家畜体

表1-4 a Bt11給与5時間後の子牛ルーメンと直腸内容中のELISAによる組み換えCry1Ab蛋白量(ppb)

Sampling /calf No.	Rumen Juice								Feces			
	Sediment				Supernatant							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2nd	81	—	29	19	—	—	455	111	—	—	—	—
3rd	262	35	—	—	331	—	41	—	135	—	147	—
4th	72	165	31	—	31	61	—	—	27	22	28	16
5th	18	—	32	—	26	—	77	—	—	92	18	—
6th	—	29	—	—	—	—	—	20	—	—	22	51
7th	19	—	—	16	34	—	34	—	35	37	—	40

—: 陰性

表 1-4 b Bt11 給与 18 時間後の子牛ルーメンと直腸内容中の ELISA による組み換え Cry1Ab 蛋白量 (ppb)

Sampling /calf No.	Rumen Juice								Feces			
	Sediment				Supernatant							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
2nd	48	16	31	24	57	15	—	18	49	66	59	35
3rd	77	—	66	—	226	—	—	—	91	—	143	—
4th	—	28	—	—	—	—	—	—	56	119	32	26
5th	15	—	19	18	—	—	—	15	30	50	51	28
6th	43	71	—	—	—	—	—	32	82	85	24	31
7th	48	—	17	23	—	—	—	—	20	112	33	56

— : 陰性

表 1-5 Bt11 給与 5 および 18 時間後の子牛ルーメンと直腸内容中の immunochromatography による組み換え Cry1Ab 蛋白の検出

Calf No.	Rumen sediment		Supernatant		Feces	
	5 h	18 h	5 h	18 h	5 h	18 h
1	5/5*	0/5	2/7	0/7	1/5	1/5
2	3/5	0/5	0/7	0/7	1/5	0/5
3	5/7	4/6	3/7	2/6	3/7	3/6
4	4/7	3/6	4/7	1/6	3/7	3/6
5	4/6	1/6	3/6	0/6	4/6	4/6
6	0/6	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6

* 数字は陽性数/子牛の数

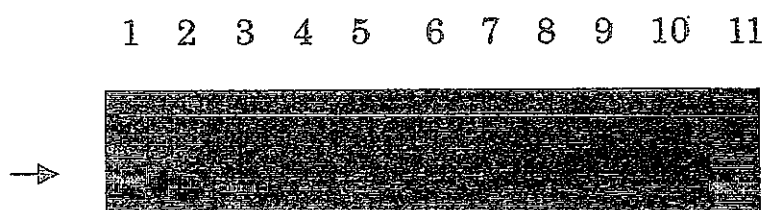


図 1-4 Bt11 を給餌した子牛消化管内容からの Immunoblot による Cry1Ab タンパクの検出

1 と 11 ; 陽性対照、2 ; ルーメン上清、3 ; 同沈査、4 ; 5h 後の糞便、6-8 ; 対照、9 ; Bt11 含有飼料、10 ; non-Bt 含有飼料。矢印は Cry1Ab タンパクの大きさ 65kDa を示す。

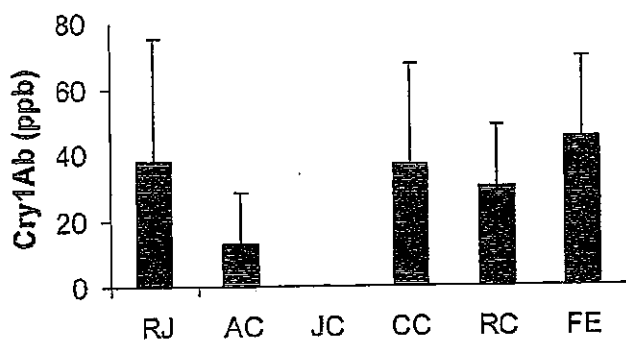


図1-5 Bt11給餌子牛消化管内容でのELISAによるCry1Abタンパクの検出

RJ; ルーメンジュース、AC; 四胃内容、JC; 十二指腸、CC; 盲腸内容、RC; 直腸内容、FE; 糞便。

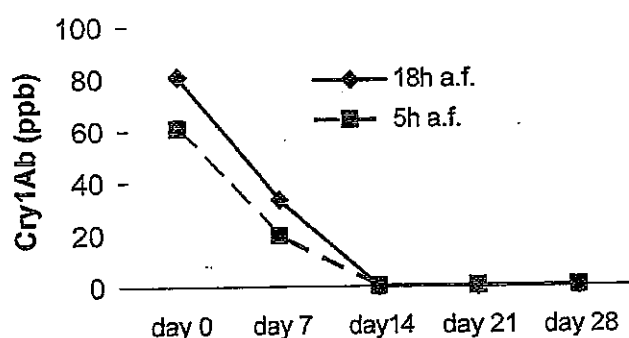


図1-6 Bt11給餌子牛糞便排泄後のELISAによる環境中でのCry1Abタンパクの検出

18h af; 給餌18時間後の糞便。

5h af; 給餌5時間後の糞便。

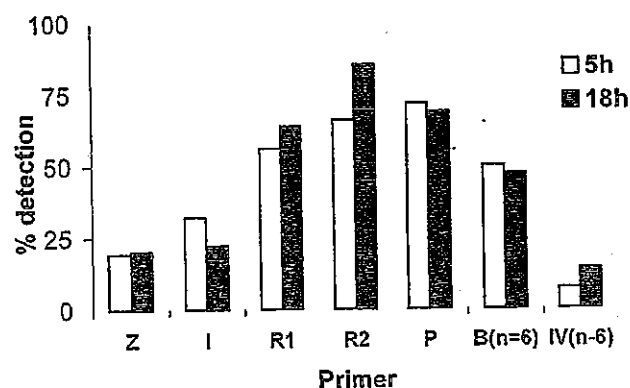


図1-7 Bt11給餌子牛ルーメン内容からのコーン由来DNAのPCRによる検出

横軸は使用プライマー。Z: ZEn1-5'-ZE02、I: IVR、R1: rbcL、R2: rbcL02-5'-rbcL02-3'、P: Plant2、B: Bt111-5'-cry1Ab1-3'、and IV: IV01-CR01。

子牛数; 12(Z to P) and 6(B and IV)。

cry1Ab 遺伝子是对照子牛では検出されなかった。

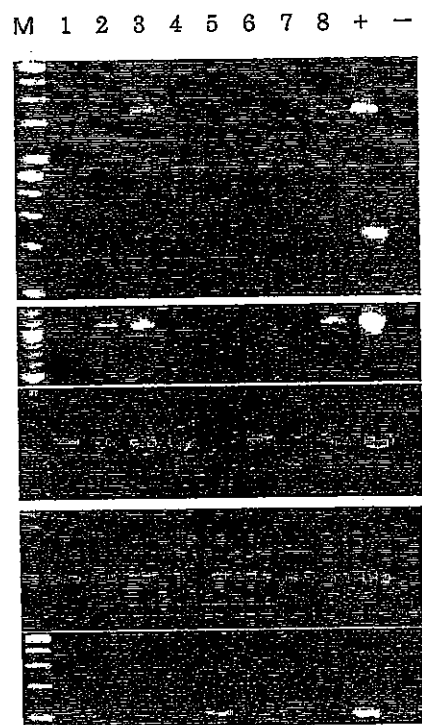


図1-8 Bt11給餌子牛直腸内容からのコーン由来DNAのPCRによる検出

縦軸は使用プライマー。Z: ZEn1-5'-ZE02、I: IVR、R1: rbcL、R2: rbcL02-5'-rbcL02-3'、P: Plant2、B: Bt111-5'-cry1Ab1-3'。

non-Bt 2例(#1レーン1、2、#2レーン3、4)とBt11給餌子牛2例(#1レーン5、6、#2レーン7、8)の結果を示す。レーン1、3、5、7は給餌18時間後、レーン2、4、6、8は給餌5時間後。

+ : 陽性対照(Bt11)、- : 陰性対照(水)、M : Molecular marker(100bp ladder)。

内での動態(何が残り、何が体内に移行するか)について知見を得ることが必要である。一部では組換え遺伝子が生体内に移行しないとの成績が出始め^{3,20)}、生体内移行の意義も議論されている^{2,14)}。しかし、前述したような漠然とした不安を解消するに至る、わかり易い尺度となる研究成果はほとんどない^{10,18)}。尺度を得る一環として組換え体DNAの家畜体内での消長をコーン由来遺伝子や植物に共通するDNAのそれとを比較した。また組換え産物のタンパクについても給与後の消長を検査した。

飼料中のDNAやタンパクは牛や豚の消化管でヌクレオチド、ヌクレオシド、アミノ酸レベルに消化分解され栄養源として吸収されるものと従来は考えられていた^{2,14,15)}。また、人工胃液を用いた試験でも同様の結果が得られていた。しかし、今回の結果が

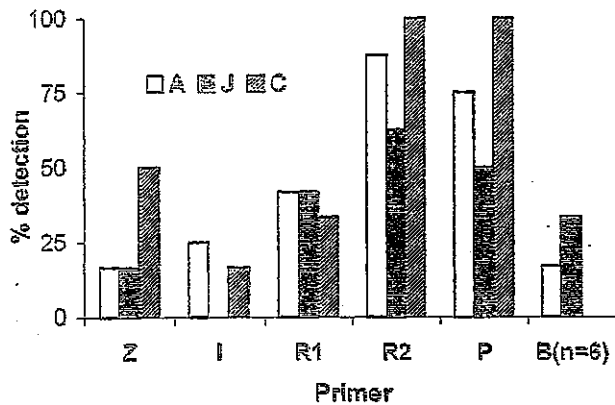


図1-9 Bt11給餌子牛消化管内容からのコーン由来DNAのPCRによる検出率

横軸は使用プライマー。Z: ZEn1-5'-ZE02、I: IVR、R1: rbcL、R2: rbcL02-5'-rbcL02-3'、P: Plant2、B: Bt111-5'-cryIAb1-3'。

A: 第四胃、J: 十二指腸、C: 盲腸。

子牛(n=12、うち対照は6例、IV01-CR01プライマーによる cryIAb の検出は全例で陰性、対照牛からの Bt111-5'-cryIAb1-3'プライマーによる検出は陰性であった。)

表1-6 Bt11給与子牛組織からのコーン由来DNA断片のPCRによる検出

プライマー	組織	Bt11	non-Bt
rbcL02-5'	肝臓	3/6	3/5
	脾臓	3/6	3/6
	腎臓	2/6	2/6
	腸リン	2/6	3/6
	最長筋	1/6	4/6
Plant 2	肝臓	0/6	2/6
	脾臓	1/6	2/6
	腎臓	1/6	1/6
	腸リン	1/6	1/6
	最長筋	1/6	2/6
Bt11 1-5'	肝臓	0/6	0/6
	脾臓	0/6	0/6
	腎臓	0/6	0/6
	腸リン	0/6	0/6
	最長筋	0/6	0/6
cryIA1-3'	肝臓	0/6	0/6
	脾臓	0/6	0/6
	腎臓	0/6	0/6
	腸リン	0/6	0/6
	最長筋	0/6	0/6

* 数字は陽性数/子牛の数

ら豚や子牛では、組換え体を含む飼料由来DNAや組換え産物のタンパクの少なくとも一部は消化管内で完全には分解されず、PCRで検出可能な形や抗原性を保持した形で残存することが示された。このPCRによるDNAの検出では、単一のプライマーの使用より複数のプライマーの使用で頻度が高まった。子牛では長さ200塩基対程度のDNAは血液、臓器、組織に移行することが示唆された。全ゲノム内

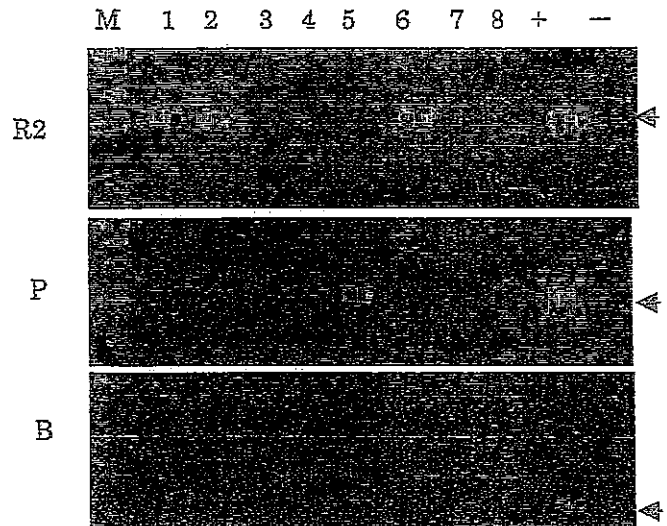


図1-10 Bt11給餌子牛末梢血単核細胞からのコーン由来DNAのPCRによる検出

使用プライマーは、R2: rbcL02-5'-rbcL02-3'、P: Plant2、B: Bt111-5'-cryIAb1-3'。

レーン1-4は対照子牛、レーン5-8はBt11給餌子牛。M: マーカー、+: 陽性対照、-: 陰性対照。他のプライマーによる検出は陰性であった。

でコピー数1個程度の cryIAb は末梢血単核球から検出されず、反復コピーの多い葉緑体DNAは臓器、組織に検出されたことから、DNAの体内移行は全ゲノム内でのコピー数の多さとDNA断片の長さに左右されるとおもわれた。

オ 今後の課題

現在までに植物由来DNAの動物体内移行についてヨーロッパから断片的な知見が公表されつつある^{2,10,18}。国内でも今回の知見を確かなものとするために、他の研究室での同様実験による検証がのぞましい。

また、組織や臓器中のどのような細胞に植物由来DNAが検出されるかを調べる必要があろう。

カ 要約

牛や豚で従来は、DNAやタンパクなど飼料成分は消化管内でアミノ酸やオリゴヌクレオチドレベルに分解後栄養素として吸収利用され、人工胃液などでの実験でも組換えDNAは速やかに分解されると考えられていた。今回の結果では、Bt11を給餌した子牛や豚の消化管内容から、市販のELISAとイムノクロマトグラフィーのキットでBtトキシンが検出できた。また、子牛と豚の消化管内容から、組換え体遺伝子とコーンの家事遺伝子断片を検出でき

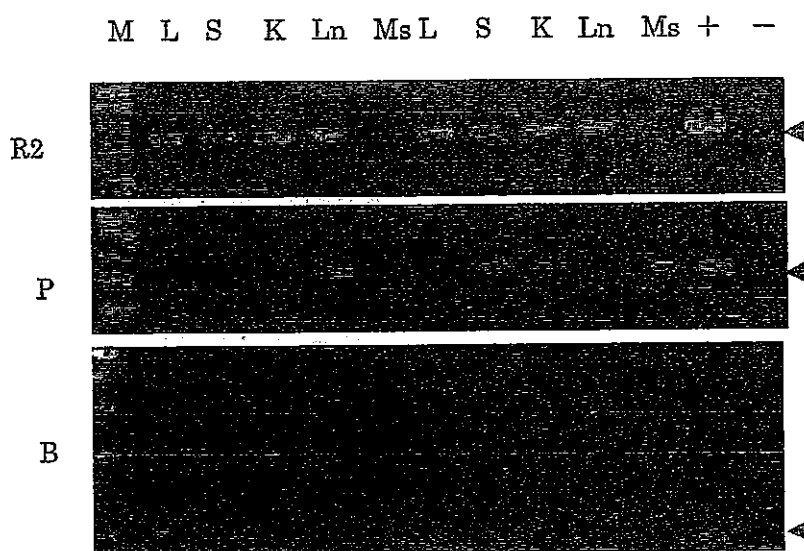


図1—11 Bt11給餌子牛組織からのコーン由来DNAのPCRによる検出

Bt11給餌子牛2例の結果を例に示す。使用プライマーは、R2；
rbcL02-5'-rbcL02-3'、P；Plant2、B；Bt111-5'-cry1Ab1-3'。
レーン L；肝臓、S；脾臓、K；腎臓、Ln；腸管膜リンパ節、
Ms；最長筋、M；マーカー、+；陽性対照、-；陰性対照。

た。単一のプライマーよりも複数のプライマーの使用で頻度が高まった。さらに子牛ではコーン由来DNAの断片は末梢血単核細胞、臓器や筋肉に移行し、その検出頻度にはゲノム内の遺伝子のコピー数とPCR産物の塩基対の長さ(200塩基対程度)が関与することが示唆された。

キ 文 献

- 1) Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat. 2000. Japanese feeding standard for beef cattle (2000) 38-41 (*in Japanese with word for word translation into English*)
- 2) Beever, D. E. and Kemp, C. F. (2000) Safety issues associated with the DNA in animal feed derived from genetically modified crops. A review of scientific and regulatory procedures. *Nutr. Abstr. Rev. Ser. B: Livestock Feed Feeding.* 70: 175-182
- 3) Beever, D. E. and Phipps, R. H. (2001) The fate of plant DNA and novel proteins in feeds for farm livestock: A United Kingdom perspective. *J. Anim. Sci.* 79 (E. Suppl.) : E290-E295
- 4) Chowdhury, E. H. et al. (2003a) Detection of

genetically modified maize DNA fragments in the intestinal contents of pigs fed StarLink™ CBH351. *Vet. Hum. Toxicol.* 45: 95-96

- 5) Chowdhury, EH. et al. (2003b) Detection of Cry1Ab Protein in the Gastrointestinal Contents but not in the Visceral Organs of Genetically Modified Bt11-Fed Calves. *Vet. Hum. Toxicol.* 45: 72-75
- 6) Chowdhury, EH. et al. (2003c) Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J. Anim. Sci.* 81: 2546-2551
- 7) Chowdhury, EH. et al. (2004) The Fate of Maize Intrinsic and Recombinant Genes in Calves Fed Genetically Modified Maize Bt11. *J. Food. Protect.* 67: 365-370
- 8) Doebley, J. et al. (1990) Evolutionary analysis of the large subunit of carboxylase (rbcL) nucleotide sequence among the grasses (Gramineae). *Evolution.* 44: 1097-1108
- 9) Duggan, P. S. et al. (2000) Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of

- DNA in ovine saliva, ovine rumen fluid and silage effluent. FEMS Microbiol. Lett. 191 : 71-77
- 10) Einspanier, R. et al. (2001) The fate of forage DNA in farm animals : a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. Eur. Food Res. Technol. 212 : 129-134.
 - 11) FAO/WHO. (2000) Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of a joint FAO/WHO consultation, 1991. World Health Organization, Geneva, Switzerland
 - 12) FDA. (1992) Statement of policy : Foods derived from new plant varieties. Food and Drug Administration. Federal Register 57 : 22984-23005.
 - 13) Hurst, C. D. et al. (1999) PCR detection of genetically modified soya and maize in food-stuffs. Mol. Breed. 5 : 579-586
 - 14) Kuiper, H. A. et al. (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. Plant J. 27 : 503-528
 - 15) McAllan, A. B. (1980) The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. British J. Nutr. 44 : 99-112
 - 16) Matsuoka, T. et al. (2000). A method of detecting recombinant DNAs for four lines of genetically modified maize. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 41 : 137-143.
 - 17) Matsuoka, T. et al. (2001). A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 42 : 1-9
 - 18) Schubbert, R. et al. (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently link to mouse DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 94 : 961-966.
 - 19) Tartaglia, M. et al. (1998). Detection of bovine mitochondrial DNA in ruminant feeds : A molecular approach to the test for the presence of bovine-derived materials. J. Food Protect. 61 : 513-518
 - 20) Yonemochi, C. et al. (2002) Evaluation of transgenic event CBH351 (StarLink) corn in broiler chicks. Anim. Sci. J. 73 : 221-228
(中島 靖之)
- ## 2. 組換え遺伝子及びその産物のルーメン内代謝
- ### ア 目的
- 遺伝子組換え技術を用いて開発された農産物の家畜用飼料への利用が進んでいる。これらは主に害虫抵抗性または除草剤耐性遺伝子が組み込まれており、安全性が確認されたものは、飼料としての利用が可能になっている。しかしながら、こうした組換え体飼料の反芻家畜への利用について、あるいは生産畜産物に与える影響については研究の蓄積が少ない。害虫抵抗性蛋白質である Cry 蛋白質については、ラット、マウスを用いた急性毒性試験や胃液、小腸液を用いた人工消化試験による分解速度についても検討され、迅速に分解され検出限界以下になることが報告されている²⁾。しかしながら、反芻家畜に投与した場合、ルーメン内でのこれらの遺伝子や Cry タンパク質の消長については報告がなされていなかった。そこで本研究では害虫抵抗性トウモロコシ Bt11を用い、これらの組換え体飼料給与が反芻家畜に及ぼす影響について、Cry タンパク質及びその遺伝子のルーメン内での動態を調べることにより推定することを目的とする。
- このため本研究においてはまずはじめに、ルーメンのように数多くの微生物が生息し、かつ目的とする組換え飼料以外にも多種類の飼料が含まれている場合でも、確実に標的遺伝子が検出可能な PCR プライマーについての検討を行った。次いでルーメン液を用いたバッチ培養による試験管内消化試験を行い、ルーメン液及び消化残渣における、組換え遺伝子と Cry タンパク質の推移を明らかにした。最後に、反芻家畜の第一胃モデルである人工ルーメン(連続培養装置、RUSITEC)²⁾を用いた組換えトウモロコシの消化試験と組換え遺伝子および Cry タンパク質のルーメン内での動態解析を行った。
- ### イ 研究方法
- #### (ア) 組換え体トウモロコシの検出系の検討

表1-7 組換えトウモロコシ検出プライマー

標的遺伝子	フォワード	リバース	産物 (bp)
Cry1Ab	CGTTGATGTTTGGGTTGTGTCC	CTGAACCCAGCAGATTG	464
Rubisco	ATGTCACCACAAACAGAGAGACTAAAGC	AAAGTTATTTTCGGTTCCTTCTAACT	1028

ルーメン内容物からのDNA抽出を想定し、組換えトウモロコシ Bt11粉末とオートクレーブ処理したルーメン液とを混合して37℃で10分間処理した物を実験に供した。また、組換え体トウモロコシ粉末及び非組換え体トウモロコシ粉末からのDNA抽出も試みた。これらの試料からのDNA抽出は、Wizard magnetic DNA purification system for food (プロメガ、以下 Wizard と略) と QIAamp DNA Stool mini kit (キアゲン、以下 QIAamp と略) で行った。抽出したDNAから組換え体特異的DNA断片 (*cry1Ab* 遺伝子) 及びトウモロコシ特異的DNA断片 (*rubisco*, *invertase*, *high mobility group protein* 遺伝子) を検出するために9種類のプライマーセットを選び³⁻⁶⁾、PCR検出を実施した。

(4) 組換えトウモロコシの試験管内消化試験

PCR法による遺伝子の検出として、前年度確立されたトウモロコシ内在性遺伝子 (*rubisco*)、*cry1Ab* 遺伝子 (464bp) に加え (表1-7)、*cry1Ab* の短い断片 (128bp) と⁷⁻⁸⁾、トウモロコシ内在性遺伝子として *zein*⁷⁻⁸⁾ の検出を試みた。また、組換えタンパク質である Cry1Ab は、Trait Bt1Corn Grain Test Kit (アヅマックス) による標識抗体法を用いて検出した。

組換え体飼料の試験管内消化試験はバッチ培養により行った。新鮮ルーメン液と人工唾液を1:4の割合で混合し、それに粉碎したトウモロコシ Bt11を全液量に対して1%の割合で添加したものを Hungate チューブに入れCO₂ガス下で培養し、開始後0、1、3、6、9、12、24時間の培養物を採取した。培養物は15000回転にて遠心分離し、上清画分と沈殿画分に分け、Cry1Ab タンパク質、及び *cry1Ab* 遺伝子とトウモロコシ内在性遺伝子 (*zein*, *rubisco*) の検出を行った。各画分からのDNAの抽出には QIAamp を用いた。

(5) 人工ルーメンを用いた組換えトウモロコシの消化試験

組換えトウモロコシは内在性遺伝子である *rubisco* と *zein*、及び Cry1Ab 遺伝子を標的として PCR 法により検出した。Cry1Ab タンパク質は Trait Bt1 Corn Grain Test Kit を用いて検出した。人工ルーメンは人工唾液による希釈率を3%に設定し、チモシー、トウモロコシ、大豆粕を標準試料に用いて10日間の前培養を行い、各発酵槽が均一の乾物消化率を示すことを確認した後、標準試料中のトウモロコシを組換え体である Bt11に代えて試験培養を行った。培養前、培養後6、12、24及び48時間後の内容物を採取し、トウモロコシの乾物の消化率を求めるととともに、ルーメン液中とトウモロコシ消化残渣中の *cry1Ab*、内在性遺伝子と組換え Cry1Ab タンパク質の検出を行った。また、ルーメンに生息する優勢菌種7種の検出・定量を行い、組換えトウモロコシによる影響を調べた。試料からのDNAの抽出には QIAamp を用いた。

ウ 結 果

(ア) 組換え体トウモロコシの検出系の検討

a 試料からのDNA抽出: トウモロコシ粉末からのDNA抽出は Wizard のみで行い、ルーメン液と混合したトウモロコシ粉末からのDNA抽出は Wizard と QIAamp で行った。得られたDNA量を測定したところ、抽出に用いたトウモロコシ100mg当たり、Wizard で6.4~15μg、QIAamp で5.6~10μgであった。

b 抽出したDNAを鋳型としてPCR法による検出を行ったところ、Cry1Ab 遺伝子の464bpのDNA断片が非組換えトウモロコシ粉末から Wizard で抽出したDNA試料を除いて検出された (図1-12)。トウモロコシ内在性遺伝子の検出では、いずれの試料からも目的のDNA断片が検出された。しかし、増幅量と非特異的増幅に差が見られた (図1-13)。

(イ) 組換えトウモロコシの試験管内消化試験

a 各画分中のCry1Ab タンパク質の検出: 上

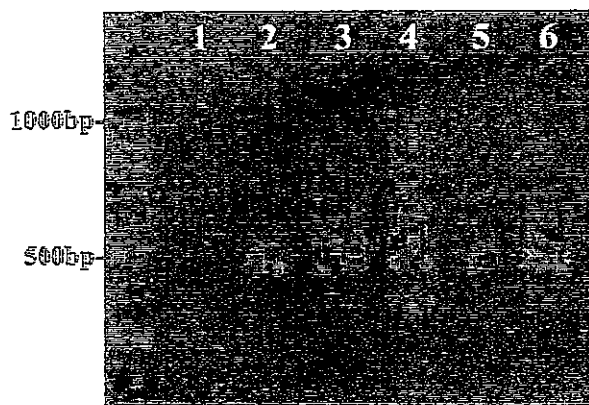


図1-12 組換え体特異的DNAの検出
左端：分子量マーカー、1：NW、2：NRW、3：PW、4：PRW、5：NQ、6：PQ。
Nは非組換え体トウモロコシ、Pは組換え体トウモロコシ、Rはルーメン液との混合物、WはWizardによる抽出。QはQIAampによる抽出を意味する。

清画分では、Cry1Abタンパク質は培養後1時間までは検出されたが、それ以降では検出されなかった。また、沈殿画分においては、培養後3時間までは検出されたが、それ以降では検出されなかった(表1-8 a、b)。

b 各画分中のトウモロコシ内在性遺伝子の検出：上清画分では、内在性タンパク質の遺伝子は、*zein* および *rubisco* 共に検出されなかった。また、沈殿画分では、*zein* は培養後6時間までは確実な増幅産物が得られたが、それ以降は検出されないか、検出されたとしても、その増幅量は少ないと考えられた。*rubisco* は全てのサンプルで検出された(表1-

8 a、b)。

c 各画分中のCry1Ab遺伝子の検出：上清画分中のCry1Ab遺伝子は、昨年確立した464bpを増幅するプライマーでは検出されなかった。128bpを増幅するプライマーでは、培養後3時間、9時間、12時間の一部での検出が見られた。沈殿画分においては、培養後3時間までは464bpのCry1Ab遺伝子の増幅が見られた。128bp断片は、沈殿画分において24時間までのサンプルで増幅が確認された(表1-8 a、b)。

(v) 人工ルーメンを用いた組換えトウモロコシの消化試験

a 組換えトウモロコシの消化率と遺伝子の検出：培養後各時間毎の組換えトウモロコシの乾物消化率は、 $54.4\% \pm 7.1$ 、 $66.7\% \pm 7.8$ 、 $69.5\% \pm 9.4$ 、 $92.9\% \pm 4.8$ と推移した。*zein* および *rubisco* の内在性遺伝子は、ルーメン液及び組換えトウモロコシ消化残渣とともに全ての時間で検出された。Cry1Ab遺伝子はルーメン液では検出されなかったが、消化残渣中では24時間までは全て検出され、48時間後でも検出される場合があった。一方、組換えタンパク質はルーメン液からは検出されなかったが、消化残渣中では全て検出された(表1-9)。

b ルーメン細菌への影響：0時間、24時間と48時間のルーメン液から抽出したDNAを用いて、ルーメンに生息する主要な細菌である、*Fibrobacter succinogenes*、*Ruminococcus flavifaciens*、*Prevotella ruminicola*、*P. albensis*、*P. bryantii*、*Ruminobacter amylophilus* および *Selenomonas*

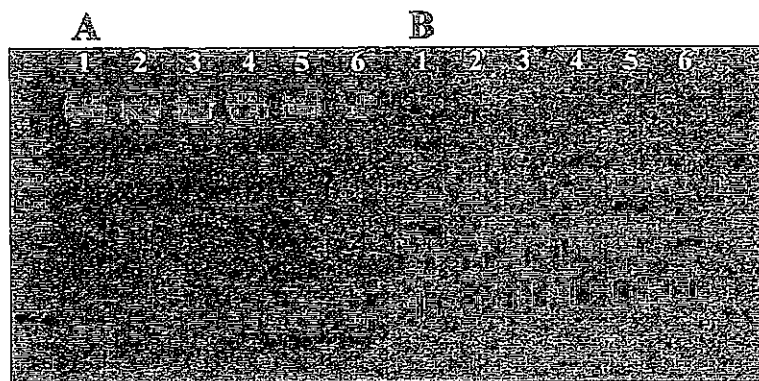


図1-13 トウモロコシ特異的DNAの検出
A：Rubisco 遺伝子、B：High mobility group protein 遺伝子。両端は分子量マーカー。サンプル番号は図1-12と同じ。

表 1-8 a バッチ培養上清画分での組換えタンパク質と遺伝子の検出

	Cry Pretein	CryIAb (128bp)	CryIAb (464bp)	Zein	Rubisco
0h	+++	---	---	---	---
1h	+++	---	---	---	---
3h	--±	++-	---	---	---
6h	---	---	---	---	---
9h	---	-++	---	---+	---
12h	---	++-	---	---	---
24h	---	---	---	---	---

表 1-8 b バッチ培養沈殿画分での組換えタンパク質と遺伝子の検出

	Cry Pretein	CryIAb (128bp)	CryIAb (464bp)	Zein	Rubisco
0h	+++	+++	+++	+++	+++
1h	+++	+++	+++	+++	+++
3h	+++	+++	+++	+++	+++
6h	-±-	+++	---+	+++	+++
9h	---	-++	-+-	-++	+++
12h	---	-++	-±-	---±	+++
24h	---	+--	±--	---±	+++

各時間とも3点の繰り返しの結果。+: ポジティブ, -: ネガティブ, ±: ポジティブ/ネガティブ

表 1-9 人工ルーメンを用いた組換えトウモロコシ Bt11の乾物消化率と CryIAb の検出

発酵槽 No.	時間	ルーメン液			トウモロコシ消化産物				
		Zein & Rubisco	CryAlb	Cry タンパク	Zein	Rubisco	CryIA	Cry タンパク	消化率
0	0	+	-	-	+	+	-	-	N.D.
1	6	+	-	-	+	+	+	+	62.2
2	6	+	-	-	+	+	+	+	58.2
3	6	+	-	-	+	+	+	+	46.8
4	6	+	-	-	+	+	+	+	50.3
5	12	+	-	-	+	+	±	+	69.1
6	12	+	-	-	+	+	+	+	58.8
7	12	+	-	-	+	+	+	+	76.5
8	12	+	-	-	+	+	+	+	62.3
9	24	+	-	-	+	+	+	+	67.9
10	24	+	-	-	±	+	+	+	59.6
11	24	+	-	-	+	+	+	+	82.3
12	24	+	-	-	+	+	+	+	68.3
13	48	+	-	-	+	+	+	+	87.8
14	48	+	-	-	±	+	±	+	98.2
15	48	+	-	-	±	+	±	+	95.5
16	48	+	-	-	+	+	±	+	89.9

+: ポジティブ, -: ネガティブ, ±: ポジティブ/ネガティブ

表1—10 組換えトウモロコシ給与によるルーメン細菌の量的変化

標的菌種	0時間	24/48時間
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	17.9±9.9	21.4±5.7
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	5.7±1.7	3.1±1.2
<i>Prevotella ruminicola</i>	59.3±8.4	44.8±4.2
<i>Prevotella bryantii</i>	3.1±2.0	4.6±3.0
<i>Prevotella albensis</i>	11.6±7.7	6.9±6.4
<i>Selenomonas ruminantium</i>	4.8±4.1	5.6±4.2
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	2.4±0.9	1.6±0.8

DNA pg/ ng of total rumen DNA

ruminantium の定量を行ったところ、差は認めなかった (表1—10)。

エ 考 察

反芻動物のルーメンには宿主が摂取する飼料の他、細菌、原虫及び真菌などの多様な微生物が生息している。従って、ルーメン内での組換えトウモロコシの確実な検出のためには、プライマーの選択が重要になると考えられた。そこで本研究では組換え遺伝子である *cry1Ab*、及び内在性遺伝子である *rubisco*、*invertase*、*high mobility group protein* 遺伝子を検出するプライマー9種類の他³⁻⁹⁾、市販されている *cry1Ab* と *zein* を特異的に検出するプライマー (日本ジーン) を用いて検討を行った。各プライマーはルーメン液に試料を混合した場合でも目的の増幅産物が得られたが、非特異増幅の有無、Nested PCR の別、及び検出感度を考慮し、*cry1Ab* は464bp と128bp を増幅するプライマーを、内在性遺伝子は *zein* と *rubisco* を検出するプライマーを選択し、以後の実験に用いた。

組換えトウモロコシのルーメン内での検出では、*cry1Ab* は用いた2つのプライマー間 (増幅サイズ464bp と128bp) で差が生じているが、これはトウモロコシの消化過程で標的とする遺伝子の鎖長が短くなったためと考えられた。内在性遺伝子である *zein* (157bp) と *rubisco* (1028bp) にも検出の差が見られているが、これは消化の影響に加え遺伝子のコピー数も影響していると考えられる。

in vitro での人工消化試験では、Cry タンパク質は30秒から1分で完全に分解され、特にペプシン存

在下では速やかに分解されることが報告されている¹⁾。本研究でもバッチ培養による人工消化試験ならびに人工ルーメンを用いた消化試験において、*Cry1Ab* タンパク質、および遺伝子はルーメン液部において、培養1時間以降検出されなかった。しかしながら、組換えトウモロコシの消化残渣においては、*Cry1Ab* タンパク質は48時間後でも検出され、*cry1Ab* 遺伝子も検出される場合があった。48時間後のトウモロコシの乾物消化率は92.9%であるにもかかわらず、トウモロコシの未消化物が残存している状態では、組換え遺伝子や Cry タンパク質が検出される可能性があることを示唆している。本研究では組換えトウモロコシは粉碎して4mm目のふるいを通した物を用いたが、実際に家畜に給与する場合の形状 (圧片、粒状など) によってトウモロコシの乾物消化率が変わってくれば、ルーメン内での Cry タンパク質、遺伝子の残存率も変わってくることが予想される。

また、組換えトウモロコシ投与により、ルーメンに生息する主要な細菌、繊維分解菌である *F. succinogenes*、*R. flavefaciens*、水溶性糖類利用菌である *P. ruminicola*、*P. albensis*、*P. bryantii*、*S. ruminantium*、及び *R. amylophilus* に対する量的な変化は見られず、ルーメン細菌に対しては影響がないと考えられた。

オ 今後の課題

組換えトウモロコシが残存している場合には、Cry タンパク質及び遺伝子が検出される可能性が示された。家畜に給与するトウモロコシの形状によるルーメン内での消化率、及び組換えタンパク質、遺伝子の検出について更なる研究が必要と考えられる。また、これらのトウモロコシが下部消化管に移行した場合の腸管内と糞中での Cry タンパク質、遺伝子の動態も観察する必要がある。

カ 要 約

ルーメン内の組換えトウモロコシを検出するための PCR プライマーについて検討を行った。これらのプライマー (組換え遺伝子特異的プライマー及びトウモロコシ内在性遺伝子特異的プライマー) を用いて、24時間のバッチ培養、ならびに人工ルーメンを用いた人工消化試験を行った。組換えトウモロコシの乾物消化率は、54.4% (6時間)、66.7% (12時間)、69.5% (24時間)、92.9% (48時間) で推移し

た。

ルーメン液においては組換えタンパク質である Cry1Ab とその遺伝子は検出されなかったが、トウモロコシの消化残渣においては、Cry1Ab とその遺伝子は消化率が90%を超えても検出される場合があった。ルーメン細菌7菌種をリアルタイムPCRを用いて定量し、組換えトウモロコシによる影響を調べたが、0時間と比較して量的な差は見られなかった。

キ 文 献

- 1) Betz, F.S., Hammond, B.G. and Fuchs, R.L. (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32 : 156-173
- 2) 梶川 博, 金 海, 寺田文典, 須賀庸行. (2003) 新たに改良された汎用型人工ルーメン (ルシテック) の操作と特性. 畜産草地研究所研究資料第2号. (独) 農業技術研究機構 畜産草地研究所
- 3) Zimmermann, A., Hermmer, W., Liniger, M., Lüthy, J. and Pauli, U. (1998) A sensitive detection method for genetically modified Mais-Grad™ corn using a nested PCR-systems. *Lenesm.-Wiss. u.-Technol.*, 31 : 664-667
- 4) Hurst, C.D., Knight, A. and Bruce, I.J. (1999) PCR detection of genetically modified soya and maize in foodstuffs. *Molecular Breeding* 5 : 579-586
- 5) Gawienowski, M.C., Eckhoff, S.R., Yang, P., Rayapati, P.J., Binder, T and Briskin, D.P. (1999) Fate of maize DNA during steeping, wet-milling, and processing. *Cereal Chemistry*, 76 : 371-374
- 6) Bonnet, D. and Gielen, J. (2000) Novartis PCR protocol for E176and Bt11maize. Development of nested-PCR assay for the positive identification of European maize borer-resistant maize event Bt11. Novartis Seeds Pty, Ltd-Bt11 maize. (personal communication)
- 7) 松岡 猛, 栗原秀夫, 末藤晴子, 三浦裕仁, 日下部裕子, 穂山 浩, 合田幸広, 一色賢司, 豊田正武, 日野明寛. (2001) 遺伝子組換えトウモロコシ CBH351系統からの組換え遺伝子の検知法. *食品衛生学雑誌*, 42 : 197-201
- 8) Matsuoka, T., Kuribara, H., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M and Hino, A. (2000) A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J. Food Hyg. Soc. Japan.*, 42 : 24-32
(田島 清、三森 眞琴)

第2章 組換え体利用飼料給与が動物の生体機能に与える影響の解明

1. 反芻家畜を用いた飼養試験による組換え体利用飼料の影響評価

ア 目的

農林水産業・食品産業等における遺伝子組換え技術の利用については、画期的な新品種の作出、生産工程の効率化等といった生産分野への貢献はもちろんのこと、21世紀半ばの人口100億人時代の食料問題、地球環境問題等を解決するためのキーテクノロジーとしても期待されている。組換え作物の食品としての安全性については、厚生労働省の「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」¹⁾に基づき、飼料については、農林水産省の「組換え体利用飼料の安全性評価指針」²⁾に基づき、それぞれ安全性の確認を行うこととされているが、一般消費者の間には安全性に対する懸念が根強く存在している。

本課題では、消化管の構造や代謝機構が単胃の動物とは大きく異なる反芻家畜への組換え体利用飼料の影響を評価するため、子牛を用いた飼養試験を実施した。

イ 研究方法

今回の試験には、Bt11遺伝子組換えトウモロコシ(N58-D1 Lot No. 2608611、殺虫性蛋白 Cry1Ab 発現)を用いた。対照として、非組換えトウモロコシ(non-Bt isolate, NX5768 Lot No.2608612)を用いた。この2種のトウモロコシをNovartis Seed(NC, USA)に生産委託したものを輸入した。Bt11遺伝子組換えトウモロコシの純度は99%、対照トウモロコシへのBt11遺伝子組換えトウモロコシの混入率は、1.3%であった(ジェネティックID、分析依頼)。また、これらのトウモロコシのカビ毒汚染については、Novartis Seedの検査により汚染がないことが確認されている(表2-1)。

第1回目の飼養試験は、入荷したトウモロコシを粉碎後冷蔵保存して給与した。残りのトウモロコシはカビ発生等の変質を防止するため凍結保存した。第2回および3回目の飼養試験は、凍結保存トウモロコシを自然解凍後粉碎して用いた。

およそ3ヶ月齢の、第1胃フィステルを装着した

表2-1 使用したトウモロコシのカビ毒検査結果

カビ毒	検出限界 (ppb)	カビ毒濃度	
		組換え体	非組換え体
Aflatoxin B1	1	検出限界以下	検出限界以下
Aflatoxin B2	1	検出限界以下	検出限界以下
Aflatoxin G1	1	検出限界以下	検出限界以下
Aflatoxin G2	1	検出限界以下	検出限界以下
Zearalenone	0.1	検出限界以下	検出限界以下
Deoxynivalenol	0.1	検出限界以下	検出限界以下
Fumonisin B1	0.1	検出限界以下	検出限界以下
Fumonisin B2	0.1	検出限界以下	検出限界以下
Fumonisin B3	0.1	検出限界以下	検出限界以下

交雑種去勢雄牛4頭を2群に分割し、対照トウモロコシあるいは組換えトウモロコシを12週間給与する試験を、各年度で1回ずつ計3回実施した。

およそ2ヶ月齢で体重100 kg前後の交雑種雄子牛を家畜市場で購入した。導入した牛をおよそ2週間馴化飼育した後、キシラジン鎮静、塩酸プロカイン局所麻酔下で、第1胃フィステル装着手術を実施した。およそ2週間の回復期間の後、飼養試験を開始した。なお、術後回復期間中に、バルザック法による去勢を実施した。実験牛を、室温をおよそ24℃に保った物理的封じ込め畜舎の個別牛房に収容し、12時間照明、12時間暗黒として飼育した。

1日あたりの体重増加(DG)が1 kgとなるよう給与飼料の設計を行った。日本飼養標準³⁾にしたがい、試験期間を通じてエネルギー量を充足させ、乾物給与量については、試験初期にはほぼ飽食、試験後半には制限給餌となるよう設計した。飼料原料の栄養成分含量は、日本標準飼料成分表⁴⁾によった。現物あたりのトウモロコシの配合割合は44%とした。飼料の配合割合を表2-2に、飼料の給与量および栄養素の充足率を表2-3に示した。飼養試験中は体重を週1回測定し、飼料給与量を計算した。残飼があ

表2-2 飼料の配合割合

	配合割合 (%)	
	原物	乾物
国産チモシー乾草(出穂期)	14.0	13.7
ヘイキューブ(普通品)	20.0	20.3
トウモロコシ	44.0	43.3
大豆粕	15.0	15.1
加熱大豆	5.0	5.4
第3リンカル	2.0	2.3

表2-3 飼料給与量および充足率

体 重 (kg)	乾物給与量 (kg)	充足率 (%)		
		DM	CP	TDN
100	2.80	99	83	100
125	3.25	96	92	101
150	3.65	93	99	100
200	4.50	86	111	100

った場合はそのつど計測した。

被検トウモロコシは3mmスクリーンを用いて粉碎した。その他の飼料原料は茨城県の飼料業者（米沢商店）より購入した。チモシー乾草は国産品を用いた。ヘイキューブは輸入ルーサンヘイキューブ（Eckenberg Farms）、大豆粕は脱脂大豆フレーク（明糖油脂）、加熱大豆はスーパーソーヤ（ドライエクストルーダ処理、中村商会）、リンカルはハイホス（東洋電化工業）をそれぞれ用いた。なお、ヘイキューブはヘイキューブ用粉碎器（岩田工業）により粉碎して給与した。

試験期間中は体温測定と臨床症状観察を毎日実施した。血液および第1胃液を2週間隔で採取した。ヘパリン加血は採血後直ちに遠心分離し、得られた血漿を-20℃で凍結保存した。ブレイン血は室温で数時間放置後遠心分離し、得られた血清を分析まで-20℃で凍結保存した。また、EDTA-Na加血の一部を用いて血液塗抹を作製した。実験牛に装着した第1胃フィステルから第1胃液を採取した。第1胃液を滅菌2重ガーゼで濾過し、濾液の一部を用いて第1胃液pHをpHメーターで測定した。濾液を等量の20%ホルマリン加生理食塩水と混合し、第1胃原虫数定量用試料とした。ガーゼ濾液の一部を30,000g、30分遠心したのち、上清を0.2μmの滅菌メンブランフィルターで濾過して菌体除去第1胃液を調製し、分析時まで-20℃で凍結保存した。第1胃液の処理に用いたガラス器具は、あらかじめ250℃、3時間の乾熱滅菌を行った。プラスチック製器具類は、パイロジェンフリーが確認されているディスポーザブル製品あるいは、洗浄後オートクレーブ滅菌（121℃、15分）したものを用いた。

採取したEDTA-Na加血は、ただちに血球自動計算機 Celltac MEK-5158（日本光電）による赤血球数（RBC）、白血球数（WBC）、血小板数（Pt）、ヘマ

トクリット値（Ht）およびヘモグロビン濃度（Hb）の測定に供した。

血液生化学分析（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性（AST）、γ-グルタミルトランスフェラーゼ活性（GGT）、アルカリ性ホスファターゼ活性（ALP）、総ビリルビン濃度（T-Bil）、血清総蛋白質濃度（TP）、アルブミン濃度（Alb）、総コレステロール濃度（T-Ch）、トリアシルグリセロール濃度（TG）、血液尿素態窒素濃度（BUN）、クレアチニン濃度（Cre）、カルシウム濃度（Ca）、無機リン濃度（iP）、マグネシウム濃度（Mg）、グルコース濃度（Glu））は、オートアナライザー（7050型、日立）で実施した。血清ナトリウム（Na）、カリウム（K）および塩素（Cl）イオン濃度は、ELECTROLYTE ANALYZER IS-50C（常光）で測定した。

第1胃液有機酸濃度はポストカラムラベル高速液体クロマトグラフ（HPLC）法で測定した。菌体除去第1胃液1mLに50μLの20%スルホサリチル酸水溶液を加えてよく攪拌し、18,000gで10分間遠心分離した上清をHPLC用試料とした。分析カラムには、Shodex KC-811（8mm×250mm、昭和電工）を用いた。溶離液は3mM過塩素酸を用い、カラム温度を60℃に保持し、1mL/分で送液した。ポストカラム反応試薬には、0.2mMブロムチモールブルー、15mMリン酸水素2ナトリウムを用い、1.5mL/分の流速でカラム流出液と混合した。溶出した有機酸によるブロムチモールブルーの色調の変化を、445nmでの吸光度で検出した。

第1胃液アンモニア濃度は、ドライケミストリー法（富士ドライケム5500、富士フイルムメディカル）で測定した。菌体除去第1胃液中の遊離エンドトキシン濃度は、カプトガニ血球ライセートゲル化法（トキシノメーターET-201、和光純薬）で測定した。ホルマリン固定第1胃液をメチルグリーンで染色後鏡

検し、原虫数を計数した。

飼養試験終了時に、実験牛をペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血殺後病理解剖し、異常の有無を形態学的に検索した。

ウ 結果

(ア) 一般臨床症状への影響

実験牛の体温および肉眼臨床所見は、3回の試験ともに、組換えトウモロコシ給与によると思われる異常は見られなかった。

なお、第3回飼養試験の対照牛1頭が、試験期間中に水中毒を発症した。原因は、自動給水用ウォーターカップを乳首と同様に吸引したための水多飲であった。このため、当該牛への給水をバケツからの給水に変更し、飲水量を制限したところ、症状（赤色尿、軽度の溶血）は軽快した。

(イ) 成長への影響

いずれの試験においても、組換えトウモロコシの給与の体重増加への影響は見られなかった。第1回試験における体重増加曲線を図2-1に例示した。一方、試験間の比較では、第2回の試験での体重増

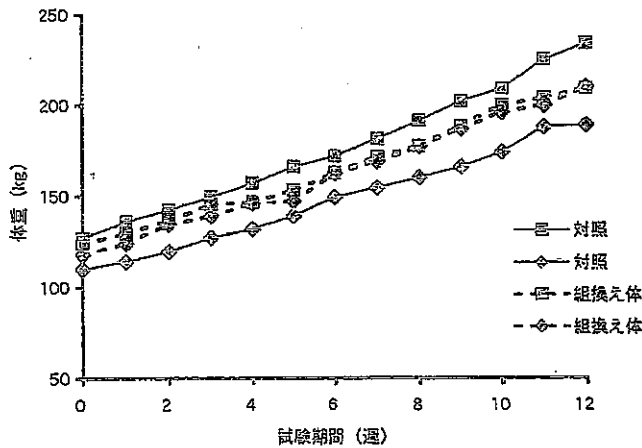


図2-1 第1回飼養試験の体重曲線

加は、他の2回の試験での体重増加に較べて低い傾向が見られた（表2-4）。

(ウ) 血液所見への影響

すべての測定項目（RBC、WBC、Pt、Ht、Hb、AST、GGT、ALP、T-Bil、TP、Alb、T-Ch、TG、BUN、Cre、Ca、iP、Mg、Glu、Na、Kおよび塩素Cl）において、組換えトウモロコシ給与の影響は観察されなかった。

第1回試験において、試験開始時に3頭（対照群1頭および試験群2頭）のAST活性が高かった。しかし、2週間後にはこれら3頭のASTは正常値に回復していた（図2-2）。

第3回試験において、上述の水中毒牛（対照群）のClが低下したが、飲水制限により回復した（図2-3）。

(エ) 第1胃機能への影響

第1胃液のpH、揮発性脂肪酸濃度、乳酸濃度、アンモニア態窒素濃度および遊離エンドトキシン濃度に対する、組換えトウモロコシ給与の影響は観察されなかった。

第3回試験の試験群1頭では、試験期間を通じて

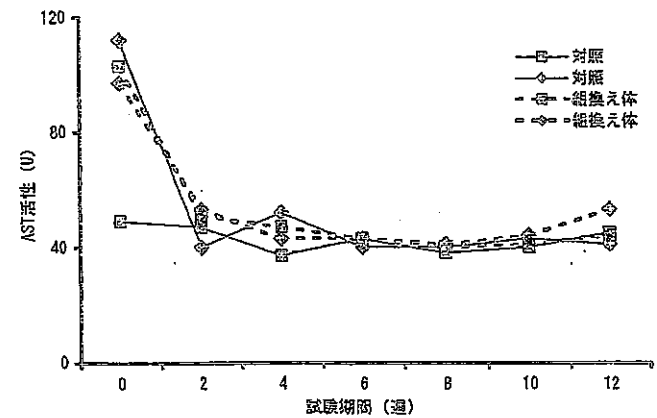


図2-2 第1回飼養試験の血清AST活性の変動

表2-4 3回の飼養試験の増体日量

飼養試験	対照群		組換え体給与群	
1回目	1.11	(1.27, 0.94)	1.05	(1.01, 1.10)
2回目	0.93	(1.05, 0.81)	0.80	(0.88, 0.72)
3回目	0.85	(0.89, 0.82)	1.12	(1.26, 0.97)

2頭の平均値、カッコ内は各個体の増体日量

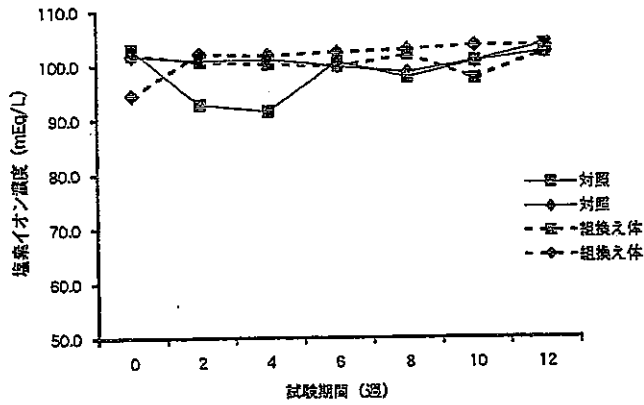


図2-3 第3回飼養試験の血清塩素イオン濃度の変動

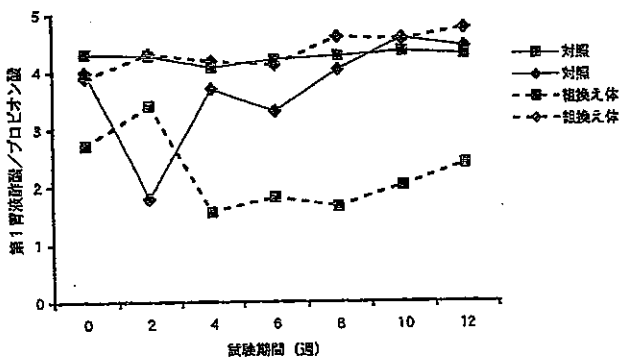


図2-4 第3回試験の第1胃液酢酸・プロピオン酸比の変動

第1胃液の酢酸・プロピオン酸比 (A/P) が低く経過した (図2-4)。

第1胃原虫は、第1回試験ではすべての牛が *Entodinium* 属原虫のみの感染であった (図2-5)。第2回試験では、すべての牛に原虫感染が見られなかった。第3回試験では、4頭とも *Entodinium* 属をはじめ複数の原虫に感染していた (図2-6)。原虫感染が認められた第1回および第3回試験とも、第1胃原虫数への組換えトウモロコシ給与の影響は観察されなかった。

第1胃遊離エンドトキシン濃度は、対照群、試験群とも比較的高濃度に経過していた (図2-7)。また、第1胃液pHも比較的低めであった。しかし、組換えトウモロコシ給与による影響は見られなかった。

(オ) 病理組織学的所見

飼養試験終了後に試験牛を解剖し、病理組織学的に検索したが、組換えトウモロコシ給与に起因する

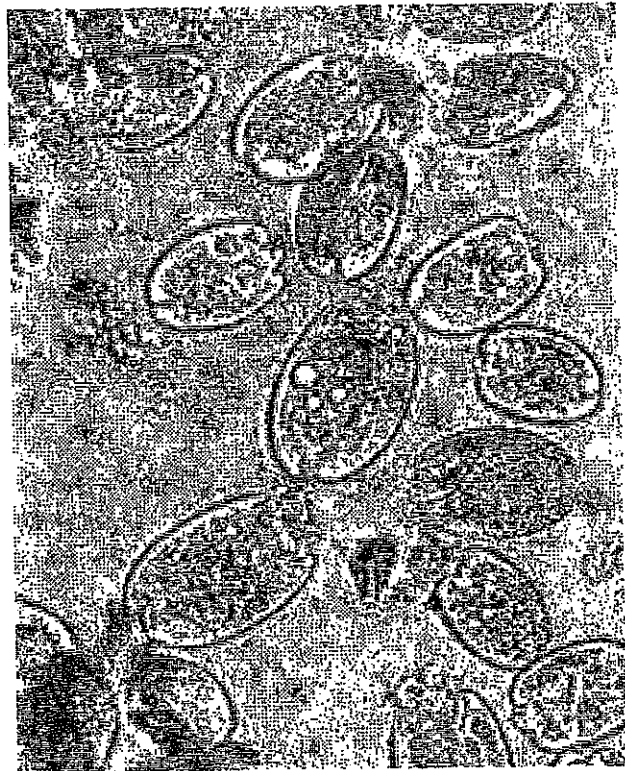


図2-5 第1回飼養試験牛の第1胃液原虫 (400倍)



図2-6 第3回飼養試験牛の第1胃原虫 (200倍)

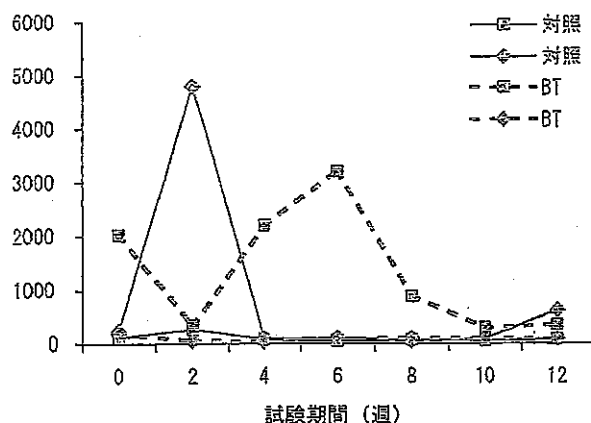


図 2-7 第 1 回試験の第 1 胃液 LPS 濃度の変動

異常は検出されなかった。

エ 考 察

Bt 蛋白質遺伝子を導入したトウモロコシの給与が反芻家畜の生産性に及ぼす影響を調べた報告はあるが⁵⁻⁷⁾、毒性試験という観点からの検討は報告されていない。「組換え体利用飼料の安全性評価指針」²⁾、組換え体利用飼料にかかわる動物を用いた毒性試験は、「飼料の安全性評価指針」(昭和63年、畜産局長通知)にしたがって実施することとされている。したがって、本課題で実施した飼養試験は、「飼料の安全性評価指針」で提示されている子牛を用いた飼養試験の方法に準拠して実施した。

今回の給与試験では、およそ3ヶ月齢の交雑種去勢雄に Bt11 遺伝子組換えトウモロコシを原物あたり44%となるよう設計した飼料を12週間給与し、臨床症状、血液生化学所見、第1胃液性状の変化を観察するとともに、試験後に病理組織学的に検索した。今回の飼養試験では、検索した検査項目には、Bt11 遺伝子組換えトウモロコシ給与によると思われる変化は観察されなかった。

組換えトウモロコシの給与量を可能な限り増やしたことにより濃厚飼料多給気味になったため、第1胃液 pH は比較的低めに経過し、第1胃液遊離 LPS 濃度も高めであった。しかし、第1胃の機能のパラメータには組換えトウモロコシ給与による影響は見られなかった。第3回試験の組換えトウモロコシ給与牛のうちの1頭は、試験期間を通じて第1胃液の酢酸・プロピオン酸比が低く経過した。しかし、この牛の第1胃液酢酸・プロピオン酸比は試験開始時から低かったことから、この現象は組換えトウモロコシ給与によるものではなく、当該個体特有の第1胃

性状であると思われる。

子牛導入時(およそ2ヶ月齢)には第1胃原虫に感染していないことが多く、試験期間中は清浄な畜舎で成牛と接触することなく飼養していたことから、第1回試験においては *Entodinium* 属原虫のみの感染、第2回試験では原虫フリー、第3回試験では *Entodinium* 属をはじめ複数の原虫に感染という結果となった。したがって、期せずして原虫感染に関して異なる3種の状況で飼養試験ができ、いずれの第1胃状況でも、組換えトウモロコシ給与による影響がないことが明らかになった。

第1回試験では、試験開始時に3頭(対照群1頭および試験群2頭)の AST 活性が高く、何らかの原因による軽度の肝機能障害があったものとおもわれる。しかし、2週間後にはいずれの牛の AST 活性も正常値になっていた。このことは、試験開始時すなわち組換えトウモロコシ未給与の時点で存在した肝機能障害が、組換えトウモロコシ摂取によっても悪化しなかったことを示している。

第3回試験では、対照牛の1頭が水中毒になり、採血時に軽度の溶血が観察されるとともに、赤色尿を排泄していた。また、血清塩素イオン濃度は低下していた。水中毒の原因は、哺乳癖が抜けずに自動給水用ウォーターカップを頻繁に吸飲したための水多飲であった。日本飼養標準を参考に飲水量を制限したところ、中毒症状は速やかに消失し、その後の試験にも影響は見られなかった。

オ 今後の課題

遺伝子組換え技術は植物の育種においてもきわめて有用な技術であり、食料増産への寄与が期待されている。しかしながら、一方では、組換え作物に対する懸念が根強く存在している。これらの懸念を解消するためには、安全性の確認のみならず、この技術が真に人類にとって有用であるよう、その利用法についての自己規制が必要であろう。

食料は人類生存の基本であり、農作物を生産する「種」は人類共有の財産である。食料生産にも利潤の追求は求められるが、食料の寡占や、食料やこれを生産する「種」による「支配」があってはならない。

また、導入する遺伝子(形質)についても、十分吟味する必要がある。自社の農薬に対する耐性遺伝子を組み込むなどという行為は、人類共通の利益と

は相容れないものである。

いずれにしても、組換え技術の農業分野での利用においては、「科学」以外の大きな障害が存在している。科学的な安全性の確認はもちろんであるが、この技術を人類全体の利益とできるかどうか、政治や行政のみならず、科学技術に携わるものにとっても今後の大きな課題といえる。

カ 要 約

Bt11遺伝子組換えトウモロコシを交雑種子牛に12週間給与し、その成長、血液生化学所見、第1胃性状等を観察したが、遺伝子組み換えトウモロコシに起因すると思われる異常は観察されなかった。

キ 文 献

- 1) 「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」(平成3年12月26日衛食第153号厚生省生活衛生局長通知)
- 2) 「組換え体利用飼料の安全性評価指針」(平成8年四月十九日付け八畜B第五百八十五号農林水産事務次官通知)
- 3) 農林水産技術会議事務局 (2000) 日本飼養標準肉用牛 (2000年版)
- 4) 農林水産技術会議事務局 (2000) 日本標準飼料成分表 (2000年版)
- 5) Barriere, Y. et al (2001) Feeding value of corn silage estimated with sheep and dairy cows is not altered by genetic incorporation of Bt176 resistance to *Ostrinia nubilalis*. *J. Dairy Sci.* 84: 1863-1871
- 6) Donkin, S. S. et al. (2003) Effect of feeding silage and grain from glyphosate-tolerant or insect-protected corn hybrids on feed intake, ruminal digestion, and milk production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86: 1780-1788
- 7) Folmer, J. D. et al. (2002) Utilization of Bt corn residues by grazing beef steers and Bt corn silage and grain by growing beef cattle and lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 80: 1352-1361

(宮崎 茂)

2. 鶏・豚を用いた飼養試験による組換え体利用飼料の影響評価

ア 目 的

Btトウモロコシの飼料としての栄養的適性に関する報告は数少なく、栄養価評価から飼養試験および病理検査まで一通りの検討を行った報告はない。そこで本研究では、殺虫性遺伝子が導入された組換えトウモロコシ (Btトウモロコシ) の家畜飼養に関する栄養的効果などを検討するため、栄養成分、豚と鶏に対する栄養価、給与した際の飼養成績および病理学的な面への影響について非組換えトウモロコシを対照として比較検討を行った。

イ 研究方法

遺伝子組換えトウモロコシとして Bt11 (交雑番号 N58-D1) および対照トウモロコシ (非遺伝子組換えトウモロコシ、交雑番号 NX5768) を供試した。これらのトウモロコシは遺伝的に近縁であり、2000年秋にアメリカ合衆国で収穫され輸入されたものであった。一般成分は AOAC 法、ミネラルは原子吸光光度法、アミノ酸はアミノ酸自動分析法および液体クロマトグラフ法、脂肪酸組成はガスクロマトグラフ法により分析を行った。

(ア) 栄養価評価試験

a 豚

供試トウモロコシの基礎飼料への配合率は供試動物に影響が出ない程度の40%とした⁷⁾。平均体重が約44kgのLWD種の肉豚(雌・去勢、各9頭)を基礎飼料(市販肉豚用飼料)区、基礎飼料に対照トウモロコシを40%配合した区および基礎飼料にBtトウモロコシを40%配合した区の計3区に、各区雌3、去勢雄3頭の6頭ずつ配分し、単飼豚房内で飼育した。1日当たりの飼料給与量は、試験開始時の平均体重の4%量とし、7日間の予備試験後に3日間採糞し、酸化クロム指示物質法により消化率を算出した。これらの値を用いて、対照およびBtトウモロコシ自体の栄養価を推定した。

b 鶏

10日齢の白色レグホーン種のヒナ(雄、45羽)を、基礎飼料(市販中雛用飼料)区、基礎飼料60%に対照トウモロコシを40%配合した区および基礎飼料60%にBtトウモロコシを40%配合した区の計3区に各区15羽ずつ配分し、バタリーケージ内で飼育した。

4日間の予備試験後に4日間排泄物を採取し、酸化

クロム指示物質法により、対照および Bt トウモロコシ自体の窒素補正見かけの代謝エネルギー (AMEn) 含量を算出した。

いずれの試験とも、酸化クロム含量は武政の方法¹⁰⁾により、窒素含量は Kjeldahl 法により、熱量はボンブカロリメーターにより測定した。

(イ) 飼養試験および病理学的検査

a 豚

Bt または対照トウモロコシ、マイロおよび大豆粕を主体とした栄養価がほぼ等しい 2 種類の飼料を調製した (表 2-5)。トウモロコシの配合率は飼料中の栄養素のバランスを崩すことなく配合できる最大量の 60% とした。これら飼料を、試験開始時の平均体重が約 42kg の LWD 種の去勢豚、各 5 頭ずつに単飼豚房内で不断給餌し、4 週間の飼養試験を行った。日増体量は試験期間中の増体量を日数で割ったもの、飼料摂取量は試験期間中の総飼料摂取量を日数で割った値とした。試験終了時に屠殺し、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、リンパ節、胸腺、扁桃、胃、十二指腸、脾臓、空腸、回腸、回盲部、盲腸、結腸、直腸および脊髄を採取し、10%ホルマリン固定、常法に従い、パラフィン包埋した。薄切標本を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、鏡検に供した。

b 鶏

対照または Bt トウモロコシ、大豆粕を主体とした栄養価がほぼ等しい 2 種類の飼料を調製した (表 2-6)。これらの飼料を、1 週齢の産卵鶏雄ヒナに 4 週間不断給餌する飼養試験を行った。増体量は試験開始時と終了時の体重の差、飼料摂取量は試験期間中の総摂取量とした。試験終了時に屠殺し、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、胸腺、甲状腺、腺胃、筋胃、十二指腸、脾臓、空回腸および脊髄を採取し、10%ホルマリン固定、常法に従い、パラフィン包埋した。薄切標本を作製、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、鏡検に供した。

(ウ) 鶏の血液および組織中の Bt 遺伝子の検出

飼養試験終了時に、各区 5 羽ずつの鶏の翼下静脈から採血を行い試料とした。肝臓および深胸筋の一部を切り出し、液体窒素で冷却しながら微粉砕器を用いて凍結粉末を調製した。血液は血液用 DNA 抽出キット (宝酒造) を、肝臓および深胸筋については組織用 DNA 抽出キット (ニッポンジーン) を用い

て DNA を抽出した。

血液および組織中への Bt 遺伝子移行の確認は、以下の方法で行った。すなわち、鶏の内性遺伝子であるミトコンドリアシトクロム b 遺伝子のプライマー¹¹⁾と、Bt11 トウモロコシ遺伝子の Bt11 1-5' と Cry1Ab 1-3'¹²⁾ および IV01 と CR01¹³⁾ の 2 組のプライマーを用いる PCR により検出を試みた。PCR では、1 サンプル当たり DNA100ng を鋳型として、100 μ M dNTPs、各 1 μ M プライマー、添付の 10 $\times$ PCR バッファー、5U の Ex Taq (宝酒造株式会社、京都) を加え、25 μ l の反応液により行った。増幅反応は、TaKaRa Thermal Cycler MP (宝酒造株式会社、京都) を用い、熱変性 94 $^{\circ}$ C 40 秒、アニーリング 55 $^{\circ}$ C 45 秒、伸長反応 70 $^{\circ}$ C 1 分を 1 サイクルとし、これを 30 サイクル行った。PCR 反応終了後、3% アガロースゲル電気泳動で分画した後、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線照射下でその検出の有無を確認した。

ウ 結果および考察

一般分析の結果を表 2-7 に示した。これまで、Bt トウモロコシと非遺伝子組換えトウモロコシの栄養成分を比較した報告¹²⁾があるが、いずれの報告でも両者の間に差は認められていない。本試験においては、Bt トウモロコシの CP 含量が対照トウモロコシよりも若干低くなる傾向がみられた。トウモロコシの成分変動要因としては、施肥、土壌等の栽培条件や気象条件がある。Cromwell ら¹⁴⁾は、3 年間にわたって成分含量を調査したところ、CP は 8.00~8.59% の間で変動したことを報告していることから、本試験で見られた両区間の差は栽培および気象条件による変動の範囲内にあると考えられる。また、ミネラル (表 2-7)、脂肪酸 (表 2-8) およびアミノ酸 (表 2-9) 含量についても CP 同様変動する。例えばアルギニン含量は 0.40~0.51% と比較的大きく変動することが報告されている¹⁵⁾。したがって、本試験で得られた結果も変動の範囲内と考えられる。Bt トウモロコシ作出の目的は、殺虫効果を示すタンパク質 (Cry1Ab) を産生する遺伝子を導入することであり、一般成分含量等の増減を目的としていないことから、当然の結果と考えられる。

豚における可消化粗タンパク質、可消化エネルギーおよび TDN 含量 (表 2-10)、鶏における AMEn (表 2-11) は、Bt トウモロコシと対照トウモロコシとの間に差は認められなかった。また、供試豚の

性（雌および去勢）による差は認められなかった。この結果は、遺伝子組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に豚における可消化エネルギー、産卵鶏およびブロイラーにおける代謝エネルギー含量に差がなかったとする報告¹⁾と一致する。また、彼らは卵用鶏の成鶏およびブロイラーを用いた飼養試験を行っており、その結果においても、それぞれのトウモロコシを給与した区に差が認められないことを報告している。本試験においても、豚、鶏の双方において飼養成績（表2-12、13）および病理組織学的検査の結果（表2-14、15）にBtトウモロコシ給与の影響は認められなかった。豚の飼養試験において両試験区で間質性腎炎が認められた。一般的に間質性腎炎は細菌などの感染によって起こるとされており、本試験においても何らかの病原体に起因すると考えられたが、確定することはできなかった。また、囲管性肺炎は、マイコプラズマによって起こる慢性呼吸器伝染病の豚流行性肺炎の症状の一つとされているが、遺伝子組換えトウモロコシ給与との関連は考えにくい。したがって、本試験で見られた症状は給与トウモロコシとは関係のない偶発的な病変であったと考えられる。これまでのCryタンパク質を含むトウモロコシの豚および鶏への給与を検討した報告においても^{1,2,13)}、遺伝子組換えトウモロコシ給与に伴う病変等は認められていない。更に、Btトウモロコシ給与豚における血中へBt遺伝子の移行³⁾、産卵鶏およびブロイラーにおける臓器および筋肉へのBt遺伝子の移行⁶⁾が調査されて

表2-5 豚肥育試験の飼料組成（%）

	Bt 区	対照区
対照トウモロコシ (NX5768)	-	60.00
Bt トウモロコシ (N58-D1)	60.00	-
マイロ	15.31	16.11
大豆粕 (CP45%以上)	20.40	19.60
魚粉 (CP60%以上)	2.50	2.50
炭酸カルシウム	0.65	0.65
第2リン酸カルシウム	0.44	0.44
食塩	0.35	0.35
ミネラル混合物 ²⁾	0.10	0.10
ビタミンADE混合物 ³⁾	0.10	0.10
ビタミンB類混合物 ³⁾	0.15	0.15
分析値		
可消化粗タンパク質 (%)	11.3	11.4
可消化エネルギー (Mcal/kg)	3.20	3.25
可消化養分総量 (%)	73.6	74.0

いるが、いずれにおいてもその移行は認められていない。本試験においても鶏の血液、肝臓および深胸筋へのBt遺伝子の移行は確認されなかった。Dugganら⁵⁾は、Bt遺伝子を綿羊のルーメン液で1分間培養したところ、検出できなくなったことを報告しており、単胃動物においてもそれらの遺伝子は消化管で分解される可能性が高いと考えられる。

以上の結果から、殺虫タンパク質を産生する遺伝子を導入したトウモロコシの一般成分は、対照のト

表2-6 鶏飼養試験の飼料組成（%）

	Bt 区	対照区
対照トウモロコシ (NX5768)	-	61.22
Bt トウモロコシ (N58-D1)	61.22	-
脱皮大豆粕	23.67	23.67
魚粉 (CP60%以上)	4.00	4.00
脱脂米ヌカ	4.00	4.00
アルファルファミール	5.17	5.17
炭酸カルシウム	0.67	0.67
第2リン酸カルシウム	0.89	0.89
食塩	0.23	0.23
ビタミン・ミネラル混合物 ¹²⁾	0.15	0.15
計算値		
代謝エネルギー (Mcal/kg)	2.91	2.91
粗タンパク質 (%)	19.11	19.48
リジン (%)	1.13	1.13
含硫アミノ酸 (%)	0.63	0.65

表2-7 Btおよび対照トウモロコシの一般成分およびミネラル含量

	Bt	対照
%		
水分	11.8	11.6
粗タンパク質	5.7	6.3
粗脂肪	3.4	3.2
可溶無窒素物	76.3	76.0
粗繊維	1.7	1.7
粗灰分	1.1	1.2
ミネラル含量 mg/100g 原物あたり		
Ca	5.3	4.2
P	217	225
Na	0.2	0.3
K	310	301
Mg	88.4	90.8
Fe	2.14	1.79
Zn	2.02	1.82
Mn	0.48	0.49
Cu	0.19	0.16

表2-8 Btおよび対照トウモロコシの脂肪酸組成 (%)

	Bt	対照
C16:0	14.6	14.8
C16:1	0.1	-
C17:0	0.2	-
C18:0	2.4	2.2
C18:1	21.5	20.9
C18:2	58.3	59.1
C18:3 (n-3)	1.7	1.8
C20:0	0.5	0.5
C20:1	0.2	0.2
C22:0	0.2	0.2
C24:0	0.3	0.3

表2-9 Btおよび対照トウモロコシのアミノ酸組成 (%)

	Bt	対照
Arg	0.30	0.31
Lys	0.22	0.22
His	0.18	0.20
Phe	0.27	0.31
Tyr	0.21	0.25
Leu	0.66	0.78
Ile	0.19	0.22
Met	0.15	0.17
Val	0.27	0.30
Ala	0.46	0.51
Gly	0.27	0.28
Pro	0.52	0.60
Glu	1.12	1.29
Ser	0.29	0.33
Thr	0.23	0.25
Asp	0.41	0.45
Trp	0.05	0.05
Cys	0.17	0.19

表2-10 豚における Bt および対照トウモロコシの栄養価¹

	Bt	対照
可消化粗蛋白質 (%)	3.69±0.68	3.67±0.72
可消化エネルギー (Mcal/kg)	3.25±0.10	3.17±0.13
可消化養分総量 (%)	75.8±2.3	75.5±2.9

¹ 平均値±標準偏差, n=6.

表2-11 鶏における Bt および対照トウモロコシの見かけの代謝エネルギー価¹

	Bt	対照
窒素補正見かけの代謝エネルギー (Mcal/kg)	3.34±0.05	3.34±0.05

¹ 平均値±標準偏差, n=5.

表2-12 豚の飼養成績に及ぼす Bt トウモロコシ給与の影響¹

	Bt 区	対照区
日増体量 (kg/日)	1.03±0.15	1.02±0.10
飼料摂取量 (kg/日)	2.20±0.32	2.20±0.41
飼料効率	0.47±0.01	0.47±0.05

¹ 平均値±標準偏差, n=5.

表2-13 鶏の飼養成績に及ぼす Bt トウモロコシ給与の影響¹

	Bt 区	対照区
増体量 (g/28 日)	338±7.2	333±14.3
飼料摂取量 (g/28 日)	1028±70.9	1013±47.0
飼料効率	0.33±0.02	0.33±0.01

¹ 平均値±標準偏差, n=5.表2-14 豚の病理組織学的検査結果¹

	Bt 区	対照区
腎臓	間質性腎炎:5 例	間質性腎炎:5 例
肺	細管性肺炎(軽度):1 例	異常なし
その他の組織	異常なし	異常なし

¹ 各区 5 頭検査. いずれの症状も軽度であった.表2-15 鶏の病理組織学的検査結果¹

	Bt 区	対照区
肺	異常なし	白血球の遊走(軽度):1 例
その他の組織	異常なし	異常なし

¹ 各区 5 羽検査.

ウモロコシと変わらず、豚および鶏における栄養価、飼養試験および病理学的検査の結果において、両者の間に差は認められないことが明らかになった。

エ 今後の問題点

特になし。

オ 要 約

遺伝子組換えトウモロコシの豚および鶏に対する栄養価を評価するとともに、飼養成績に及ぼす影響を検討した。細菌バチルス・チューリンゲンシス (*Bacillus thuringiensis*) の殺虫性タンパク質の産生をコードする遺伝子 (Bt 遺伝子) を導入した Bt トウモロコシおよび非遺伝子組換え (対照) トウモロコシの豚における可消化エネルギー、TDN 含量、鶏における見かけの代謝エネルギー含量を測定した。また、豚および鶏において、それぞれのトウモロコシを主原料とした飼料を給与する飼養試験を行い、病理組織学的検査を実施するとともに、鶏については、組換え体遺伝子の体組織への移行の有無を調査した。その結果、Bt および対照トウモロコシの豚における現物あたりの可消化エネルギー含量は、それぞれ 3.25 および 3.17 Mcal/kg、TDN 含量はそれぞれ 75.8 および 75.5% で、両者の間に差は認められなかった。鶏における見かけの代謝エネルギー含

量は、Bt および対照トウモロコシの双方とも 3.34 Mcal/kg であった。豚および鶏それぞれの飼養試験において、飼養成績にトウモロコシの違いの影響は認められず、病理学的にも異常は認められなかった。体組織への Bt 遺伝子の移行も認められなかった。

以上の結果から、Bt トウモロコシおよび対照トウモロコシの豚および鶏における栄養価、飼養試験および病理学的検査の結果において、両者の間に差は認められないことが明らかになった。

カ 文 献

- 1) Aulrich, K. et al. (2000) Genetically modified feeds in animal nutrition 1st communication: *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn in poultry, pig and ruminant nutrition. Arch. Anim. Nutr., 54: 183-195
- 2) Brake, J. and D. Vlachos (1998) Evaluation of transgenic event 176 "Bt" corn in broiler chickens. Poultry Sci., 77: 648-653
- 3) Chowdhury, E. et al. (2003) Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. J. Anim. Sci., 81: 2546-2551

- 4) Cromwell, G. L. et al. (1999) Variability among sources and laboratories in nutrient analyses of corn and soybean meal. J. Anim. Sci., 77 : 3262-3273
- 5) Duggan, P. S. et al. (2000) Survival of free DNA encoding antibiotic resistance from transgenic maize and the transformation activity of DNA in bovine saliva, bovine rumen fluid and silage effluent. FEMS Microbiol. Lett., 191 : 71-77
- 6) Einspanier, R. et al. (2001) The fate of forage DNA in farm animals : a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. Eur. Food Res. Technol., 212 : 129-134
- 7) 石橋晃監修 (2001) 新編動物栄養試験法, 養賢堂 : 181-183
- 8) Matsuoka, T. et al. (2000) A method of detecting recombinant DNAs for four lines of genetically modified maize. J. Food Hyg. Soc. Jpn., 41 : 137-143
- 9) Matsuoka, T. et al. (2001) A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. J. Food Hyg. Soc. Jpn., 42 : 1-9
- 10) 武政正明 (1992) リン酸カリ試薬による酸化クロム定量法の改良. 畜産試験場研究報告, 52 : 7-13
- 11) Shen, X. J. et al. (1999) Comparison of cytochrome b region among chinese painted quail, wild-strain quail, and white broiler chicken based on PCR-RFLP analysis. Jpn. Poultry Sci., 36 : 287-294
- 12) 山崎信ら (1996) プロイラーヒナにおける低タンパク質アミノ酸添加飼料給与による排泄窒素の低減. 日本家禽学会誌, 33 : 249-255
- 13) Yonemochi, C. et al. (2002) Evaluation of transgenic event CBH 351 (StarLink) corn in broiler chicks. Anim. Sci. J., 73 : 221-228

(山崎 信)

3. マウス2世代繁殖成績及び生存性に及ぼす組換え体利用飼料の影響評価

ア 目的

近年、従来の化学薬品をベースとした農薬を用いず、農産物の病害虫による被害を防除する目的で、種々の遺伝子組換え作物が栽培され、生産量の大幅な増大等の新しい生産技術として注目されている。これらの遺伝子組換え作物の利用については、一方で消費者が安心して利用するために、その安全性の検討が不可欠である。

この検討の一環として、世代交代が速い哺乳動物の一つであるマウスに遺伝子組換え体トウモロコシを混じた飼料を2世代にわたって与え、その繁殖、発生、育成、生存性等への影響の有無を評価検討することを目的とする。

イ 研究方法

(ア) 飼料の調製

トウモロコシの栄養成分値からマウスを長期間飼育可能な実験用固形飼料を設計した。研究目的より、長期間の健康維持に必要な固形飼料の作成を試みた。American Institute of Nutritionの齧歯類用AIN-93精製飼料：AIN-76A 齧歯類用飼料の配合変更に関するアメリカ国立栄養研究所特別文書委員会最終報告の設計¹⁾に準じて計算した結果、トウモロコシの配合割合は最大67.8%まで可能と算定された。そこで、表2-16に示す組成の固形飼料をBT組換えトウモロコシおよび対照非組換えトウモロコシについて作成し、実験に供試した。使用したコーンスターチは全て非遺伝子組換えのものである。この固形飼料のトウモロコシ含有量は重量比で約68%であり、一般成分値(%)は、粗蛋白質12.8、粗脂肪5.1、粗灰分3.7、粗繊維3.9、可溶性無窒素物67.6、カルシウム0.9、リン0.7であった。

表2-16 試験に用いた固形飼料の配合組成

使用材料	配合割合(重量%)
トウモロコシ	67.85
ミルクカゼイン	8.4
DL-メチオニン	0.05
コーンオイル	3.0
コーンスターチ	10.0
セルロースパウダー	5.0
AIN-76ミネラル混合	3.5
AIN-76ビタミン混合	1.0
重過硫酸コリン	0.2
炭酸カルシウム	1.0

(イ) 飼料の給与方法と各世代における成長および繁殖成績

遺伝子組換えトウモロコシ(BT コーン)及び対照の非遺伝子組換えトウモロコシを親世代のICR系マウス雌雄に若齢時より長期間連続投与し、飼料の嗜好性(採食量)や増体量等についての差異の有無を調べた。また、親世代マウスとその次世代(F1)による妊娠繁殖および次世代仔の生産成績等について両群間の違いを比較検討した。

BT コーン及び対照非組換えトウモロコシより作成した飼料を親世代マウスを2群に分けてそれぞれ4週齢より給餌を開始し、60日齢まで、体重と飼料摂取量を測定した。60—70日齢で、両群の親世代マウスを交配し、膣栓形成率、分娩率、分娩期間などの妊娠成績と産仔数、産仔の雌雄比率、離乳成績などを調べた。離乳後60日齢まで、親世代と同様にBT コーン給餌群(BT 群)と対照群について体重と飼料消費量の比較を行った。さらに、このF1世代を交配して次世代(F2)を生産し、F2を交配して得たF3世代まで同様な比較検討を行った。

(ウ) 胎仔体重および子宮内胎児数の検査

F3を交配して得たF4世代マウスを交配し、F5世代に相当する胎仔の発生に及ぼす飼料の影響の有無を調べる目的で、両群の妊娠マウス(F4世代)を膣栓確認18日後にエーテル麻酔下で安楽死させた後に解剖し、その胎仔、胎盤、卵巣等の比較検討を行った。

ウ 結 果

親世代マウス(P)の分娩数は対照群27腹、BT 群27

腹であり、対照群の産仔数、雌(♀)仔数、雄(♂)仔数は、それぞれ347匹、172匹、175匹、BT 群では同じく378匹、176匹、202匹で、両群間での平均産仔数、雌雄の比率の差は認められなかった。

F1の性別平均体重(g)の推移を図2—8に平均採食量(g/day/匹)を図2—9に示す。図2—8では明瞭でないが、F1では、♀♂ともに対照群の出生1日後の体重が危険率1%以下でBT 群に比べて有意に重かったが1週間以後の体重については♀♂いずれにおいてもBT 群と対照群間には有意差は見られなかった。嗜好性の判定用の採食量(g/day/匹)はばらつきが大きかったが両群間に有意差は見られなかった。

F2世代のマウスの分娩数は対照群5腹、BT 群17腹であり、その産仔数、♀仔数、♂仔数は、それぞれ56匹、32匹、24匹、BT 群では同じく198匹、97匹、101匹で、両群間での平均産仔数、雌雄の比率に差は認められなかった。F2の性別平均体重の推移を図2—10に平均採食量(g/day/匹)を図2—11に示す。

F2の出生1日目のものでは♀において対照群の体重がBT 群に比べて有意に重かったが♂では有意差は認められなかった。両群間の増体量の推移、採食量に差異は認められなかった。またPおよびF1世代における妊娠成績(交配雌群における分娩率や膣栓形成率)にも差は認められなかった。

F3世代マウスの分娩数は対照群21腹、BT 群52腹で、対照群の産仔数、♀仔数、♂仔数は、それぞれ174匹、93匹、81匹、BT 群では同じく430匹、199匹、231匹で、両群間での平均産仔数、雌雄の比率の差は

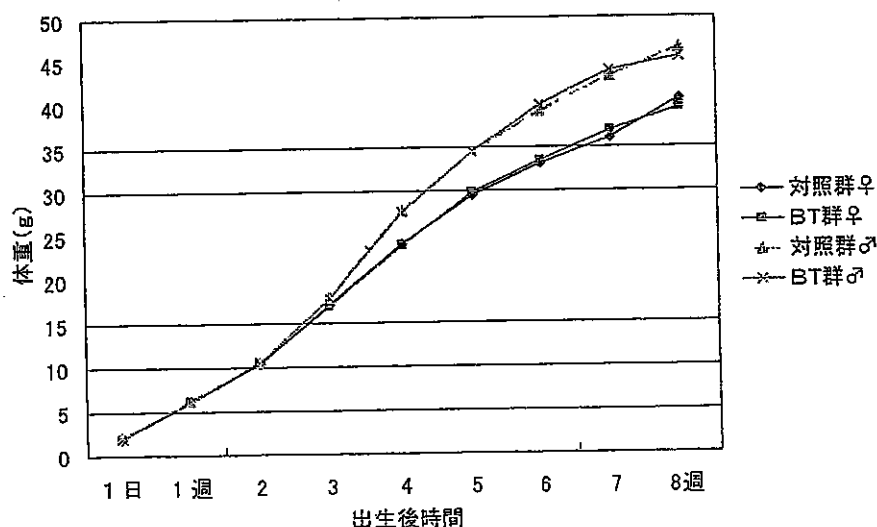


図2—8 F1世代マウスにおける体重の推移

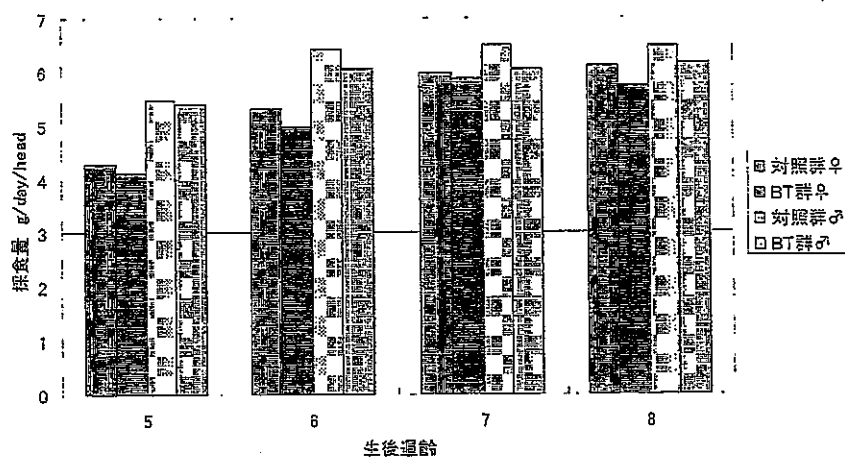


図 2-9 F1世代マウスにおける飼料消費量

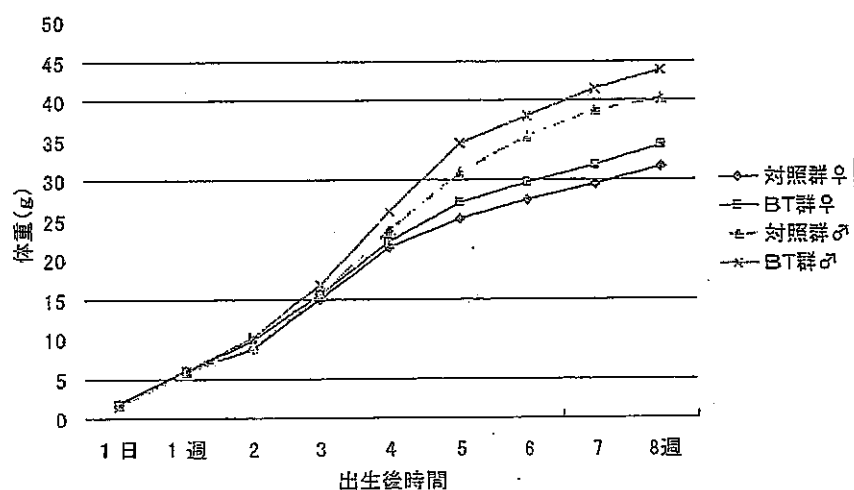


図 2-10 F2世代マウスにおける体重の推移

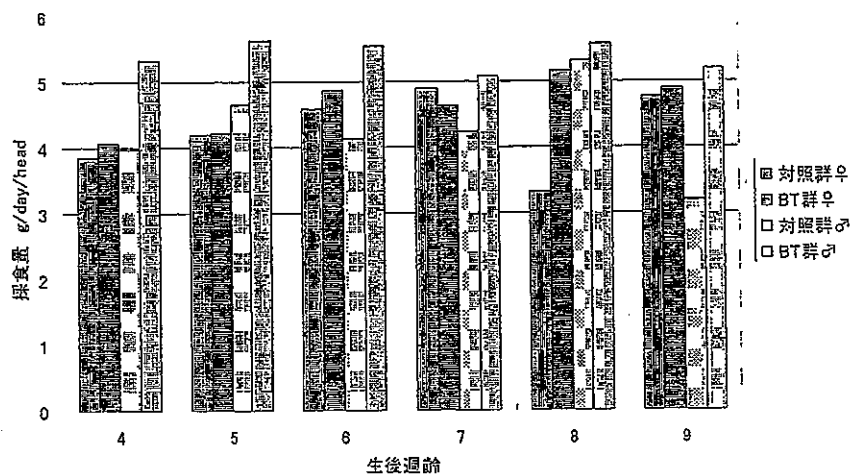


図 2-11 F2世代マウスにおける飼料消費量

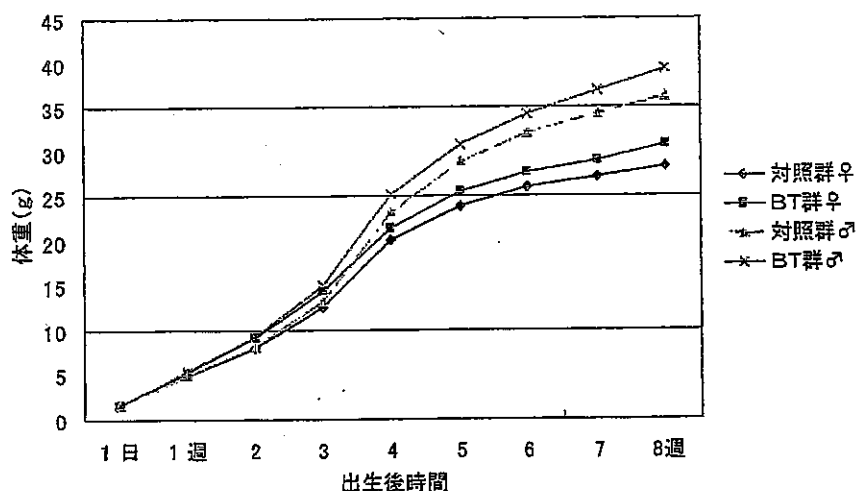


図 2-12 F3世代マウスにおける体重の推移

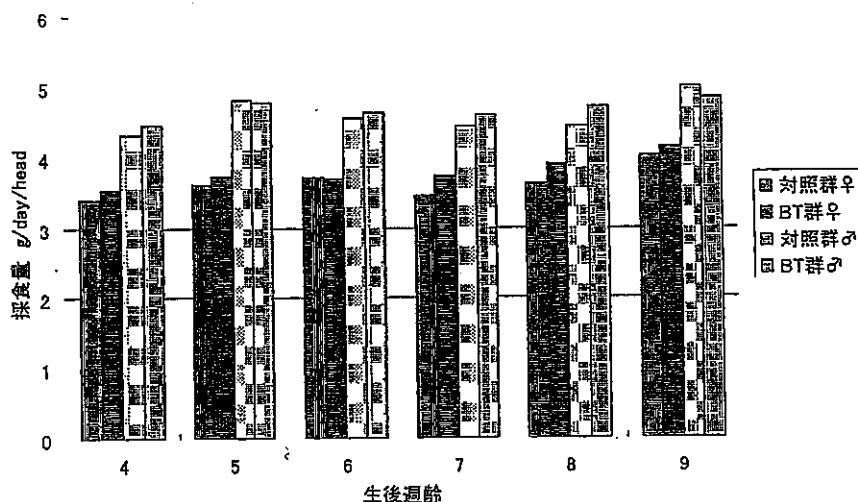


図 2-13 F3世代マウスにおける飼料消費量

認められなかった。

F3の性別平均体重の推移を図 2-12に平均採食量 (g/day/匹) を図 2-13に示す。F3においては出生 1 日後の体重には両群に有意差は見られなかったが、1 週目以降は、♀ともに BT 群の方が有意に (危険率 1%、または 5%) 重かった。摂食量については有意な差は見られなかった。

分娩前日に当たる妊娠 18 日齢の F4 世代の妊娠マウス (対照群 22 匹、BT 群 16 匹) の諸成績を表 2-17 に示す。

両群間の体重、総子宮重量、胎仔重量 (以上平均重量、g) 胎盤、卵巢重量 (同、mg)、一腹当たりの平均胎仔数、平均死亡胎児数、平均吸収胎児数の差異は認められなかった。また、両交配群における受胎率や膈栓形成率などにも有意な差は見られなかつ

表 2-17 妊娠マウスにおける胎仔体重、子宮、胎盤、卵巢重および胎仔数

	対照群 (n=22)	BT 群 (n=16)
体 重	54.24 ± 4.16g	56.53 ± 6.33g
子宮重量	19.66 ± 3.16g	19.60 ± 4.63g
胎仔重量	1.26 ± 0.13g	1.22 ± 0.18g
胎盤重量	72.99 ± 15.54mg	75.70 ± 15.07mg
卵巢重量	11.50 ± 3.36mg	10.87 ± 4.64mg
生存胎仔数	12.45 ± 2.24匹	12.75 ± 3.09匹
死亡胎仔数	0.80 ± 1.20	0.31 ± 0.60
吸収胎仔数	0.70 ± 1.03	0.75 ± 0.93

産後確認日を 0 日として妊娠 18 日目のマウスを検査した。

た。

エ 考 察

F2世代の受胎率が対照群、BT 群の両群において低かったのはトウモロコシ含量を可能な限り大きくするため飼料の蛋白含量が低かったことによるものか、繁殖時期が盛夏に当たったためか不明であるが、F3世代のそれは問題がなかったことから後者の可能性が高いと思われた。トウモロコシ含量の多い今回供試した固形飼料を長期間摂取したマウスの世代が増えると、雌雄ともに体重が減少する傾向が見られたが、これは BT 群、対照群いずれにも共通して見られていることより、組換え体の影響以外の何らかの別の因子が関与しているものと思われた。

組換え体を給与した群の方が雌雄ともに体重の増加が大きい傾向が見られたが、この試験だけではその理由は解明不可能である。F2ではマウスの例数が比較的少なかったため、有意差は見られなかったが、図2-10に示すように平均値の推移で、雌雄ともに体重増加が大きい傾向が見られ、F3世代では1~5%の危険率で有意な差が認められた(図2-12)。

野外のトウモロコシ畑では、BT 組換えトウモロコシの方が、害虫に犯されにくいためにカビなどの発生が少なく、その結果非組換え体トウモロコシのカビによる汚染の影響で組換え体のトウモロコシを給与した方が体重増加が良い²⁾という報告も見られるが、今回供試したトウモロコシは外見上カビによる影響はないものと考えられるので、マイコトキシン説は該当しないものと思われた。

BT 組換えトウモロコシ給与群と対照トウモロコシの嗜好性を反映すると思われる採食量を比較する目的で、投与したの飼料重量から食べ残した飼料の重量を差し引いた消費量を測定したが、マウスが採食以外にいたずらにより削り取るのみで敷料に使用したチップに散逸するようなケージも見られ、採食量を必ずしも示していないことも考えられるが、傾向としては嗜好性に差はないものと思われた。

表2-17に示したように、妊娠18日目の出産予定前日のマウスの体重、胎仔を含む総子宮重量、個々の胎仔重量、胎盤重量、卵巣重量や一腹当たりの平均生存胎仔数、平均死亡胎仔数、すでに死亡後吸収が見られた胎仔数などには両群間での差異は認められず、その他の繁殖成績(受胎率、産仔形成率、雌雄分娩胎仔数等)にも差異は見られなかった。

オ 今後の問題点

現在 F3世代の観察を継続し(2003年11月現在で生後約2年を経過)、生存寿命(自然死)データの蓄積をはかっているが、対照群と BT 群の生存個体数に顕著な違いはみられていない(ともに約60%が生存)。

カ 要 約

BT 組換えおよび対照トウモロコシをトウモロコシ含量約68%の固形飼料により長期間飼育し、試験飼料の嗜好性(採食量)、体重増加(体成長)についての差の有無を調べた。採食量についてはほとんど差異が見られなかったが、雌雄いずれの場合でも生後の体重が小さいものでは発育(成長)曲線はほぼ同様に追いつき、また生後の体重が同じのものでは BT 群の方が発育(成長)が良い傾向が認められた。

繁殖・次世代生産成績などの比較を F4世代の妊娠マウスにつき両飼料給与群について妊娠前日の体重、解剖後の総子宮重量、胎仔重量、胎盤重量、卵巣重量、一腹当たりの平均死亡胎仔数、平均胎仔数、平均吸収胎仔数には有意な差異は認められなかった。

両群間での受胎率や産仔形成率についても有意差は見られなかった。以上、現在までに得られたデータからは、BT 組換え体飼料を投与したマウスへの有害作用は認められなかった。

キ 文 献

- 1) Reeves P. G., Nielsen F.H. and George C. Fahey G.C., Jr.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. J. Nutr. 123: 1939-1951 (1993)
- 2) Munkvold G.P. and Desjardins A.E.: Fumonisin in Maize. Can we reduce their occurrence? Plant Dis. 81: 556-565 (1997)

(佐伯 隆清)

4. 組換え体飼料由来物質の培養細胞を用いた影響評価

ア 目 的

遺伝子組換え技術は、目的とする有用遺伝子を植物に導入することにより、従来の交配による育種では成し得なかった飛躍的な農作物の改良を可能にし

た。現在、世界規模で食糧や飼料不足が深刻化しているが、この技術により生まれた遺伝子組換え農作物はこれらの問題解決に貢献すると期待されている。遺伝子組換え農作物は1994年にアメリカにおいて「日持ちの良いトマト」が世界で初めて販売されて以来、除草剤耐性、害虫耐性などの様々な特性を持った遺伝子組換え農作物が開発、実用化されており、2002年4月現在、日本において食品としての安全性を確認されている組換え農作物は39品種、飼料は35品種にのぼっている。そのうち *Bacillus thuringiensis* が産生する Cry 蛋白質をコードする遺伝子が組み込まれている害虫耐性の飼料用遺伝子組換え農作物は8品種となっている。

Bacillus thuringiensis が産生する Cry 蛋白質は殺虫活性をもつ毒素で、その活性は極めて特異的である。この蛋白質は、昆虫に餌と共に食下されると、中腸内で消化酵素の働きにより活性化され、レセプターである中腸上皮細胞の膜蛋白質に結合する。その後、活性化 Cry 蛋白質はコンフォメーションを変化させることにより、その構造の一部を細胞膜に刺入する。次に、この一部分が刺入した4～6個の活性化 Cry 蛋白質が凝集して小孔が形成される。この細胞膜に形成された小孔は、イオン、水などの低分子物質、ついで高分子物質を流入させ、その結果、中腸上皮細胞は膨潤破裂し、昆虫は摂食停止や敗血症を起こして死に至る、と考えられている^{1,2)}。つまり、Cry 蛋白質の毒性発現にはこのような条件が整う必要があり、これがこの蛋白質の活性スペクトルの狭さに関係していると考えられている。

しかし、組換え体の安全性については、実験動物を用いた試験や家畜を用いた飼養試験が行われているにもかかわらず、消費者が完全に首肯しているとは言い難い。そこで本課題では、組換え体飼料の安全性をより詳細に把握するため、Bt11コーンに発現する殺虫性蛋白質 Cry1Ab が動物細胞に与える影響について培養細胞を用いて検討する。

イ 研究方法

(ア) Cry1Ab

本課題では、大腸菌発現系を用いて組換え Cry1Ab を作成し、選択的沈殿法³⁾により精製したものを使用した。

(イ) ヒト小腸上皮細胞への影響評価

a ヒト小腸上皮細胞の培養

本課題で使用したヒト小腸上皮細胞は正常小腸上皮由来の細胞で、Applied Cell Biology Research Institute より入手した。培養は添付の指示書に従い、最初の5日間は Rocket Fuel™ 含有の CS-2.0 無血清培地 (Cell systems) で培養し、残りの5日間は DMEM と Entero-Stim™ 分化培地 (Becton Dickinson) を 1 : 1 の割合で混合した培地に MITO Serum Extender™ (Becton Dickinson) を加えた分化培地で培養した。計10日間培養した後、実験に使用した。

b 形態観察

Cry1Ab を終濃度2000ng/mlで添加し、1、8、24および48時間後の形態変化を微分干渉顕微鏡法により観察した。

c LDH 遊離率と細胞数

LDH 遊離率は CytoTox96® (Promega) を用いて測定した。細胞に Cry1Ab を添加し、24および48時間後の培養上清中の LDH 活性を測定した。測定は ELISA reader (Wako) を使用し、490nm (測定波長) で測定した。遊離率は、以下の式により算出した。(LDH 遊離率 = $100 \times \frac{\text{培養上清中 LDH 活性}}{\text{ウェル内総 LDH 活性}}$ 、ウェル内総 LDH 活性とは、0.1% Triton X-100で細胞を溶解したウェル内の全 LDH 活性のこと。)さらに、ウェル内の総 LDH 活性は、細胞数に比例することから、ウェル内の総 LDH 量を測定し、細胞数の増減を推定した。

d 膜電位測定

細胞膜電位の測定には、膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)を使用した。この色素は細胞が脱分極を起こすと細胞内に取り込まれ、蛍光を発する。測定は、Cry1Ab (終濃度2000ng/ml) を1、8、24および48時間作用させた細胞に DiBAC₄(3)を添加し、5% CO₂インキュベーター内で37℃、30分インキュベートした後、KCl 添加に対する細胞の膜電位変化を測定した。測定開始から9秒間 KCl 添加前膜電位を測定した後、KCl (終濃度100mM) を加え、その後の膜電位の変化 (ΔRFU) を135秒間測定した。測定には Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems) を使用し、485/510nm (励起波長/測定波長) で測定した。

e 蚕中腸上皮細胞

本課題では形態観察と膜電位測定において、Cry1Ab に感受性である蚕の中腸上皮細胞をコントロー

ルとして使用した。蚕中腸上皮細胞は Baines^{4,5)}らの方法に従い分離・培養を行った。5 齢幼虫から中腸を取り出し、Grace's insect 培地で洗浄後、コラゲナーゼ処理 (27℃、2 時間) を行い、低速遠心 (500g、1 分) で中腸上皮細胞を分画・収集し、培地で洗浄後、実験に使用した。

(ウ) ウシ初代培養肝細胞

a ウシ肝細胞の分離と初代培養

ウシ肝細胞の分離は、Higuchi⁶⁾らの方法により行った。生後 1 から 2 週齢の雄のホルスタイン種から無菌的に肝尾状葉を採取し、Ca²⁺および Mg²⁺を含まない 0.5mM EDTA および 10mM HEPES を添加した前灌流液で灌流脱血し、0.05% コラゲナーゼで肝細胞を分離した。分離した肝細胞は低速遠心 (50 g、1 分間) により分画・収集した。分離した肝細胞は 10⁻⁹M インスリン、10⁻⁹M デキサメタゾン、5 kIU アプロチニン、0.1μM CuSO₄·5H₂O、3nM H₂SeO₃、50pM ZnSO₄·7H₂O、100U/ml ペニシリン、100mg/ml ストレプトマイシン、250μU/ml アンフォテリシン B を添加した William's 培地で培養した。24 時間ごとに培地交換を行い、3 日間培養した後、実験に使用した。

b 形態観察

Cry1Ab を終濃度 2000ng/ml で添加し、24 および 48 時間後の形態変化を微分干渉顕微鏡法により観察した。

c LDH 遊離率と細胞数

ヒト小腸上皮細胞と同様の方法で LDH 遊離率と細胞数を測定した。

d アルブミン分泌量

培養上清中に含まれるアルブミン含量は、Yamanaka⁷⁾らの方法に準じてサンドイッチ ELISA 法で定量した。培養上清を平底の 96 穴ポリエチレンマイクロプレート (Nalge Nunc International) に加え、蛋白質をプレート表面に吸着させた。ブロッキングの後、一次抗体として抗ウシアルブミンウサギ IgG、二次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギ IgG やぎ血清 (Sigma) を用いた。基質には、1 mg/ml パラニトロフェニルリン酸を含む 1 M ジエチルアミン緩衝液を用いてアルカリフォスファターゼを発色させ、0.75M 水酸化ナトリウムで反応を停止して、405nm での吸光度を ELISA reader (Wako) で測定した。

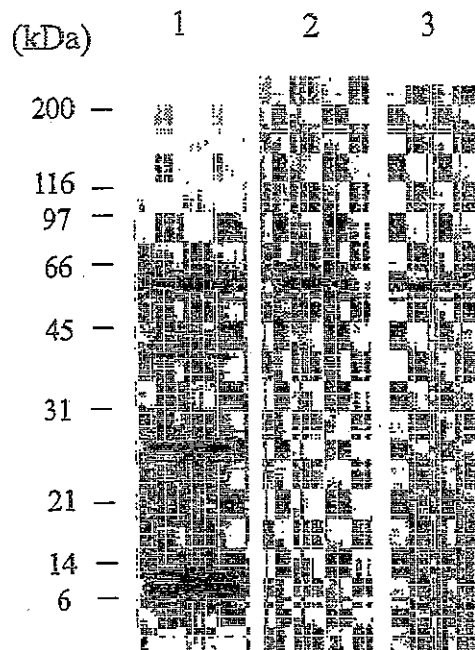


図 2-14 組換え Cry1Ab の精製状態

1: 精製前フラクション、2: 精製後フラクション、3: 精製後フラクションの抗 Cry1A ウサギ血清によるウェスタンブロッティング像

ウ 結果

(ア) Cry1Ab の精製

生物活性は蚕で確認し、投与後 1 日で蚕は全て死滅した。また、精製レベルは、銀染色でモノバンドにまで精製されており、LPS の混入も 2.5ng/ml と本試験に支障のないレベルであった (図 2-14)。

(イ) 蚕中腸上皮細胞、ヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞の形態観察

蚕中腸上皮細胞は Cry1Ab (終濃度 2000ng/ml) 添加 1 時間後に、細胞膜が剥離したようなバルーン状の形態を呈した。一方、ヒト小腸上皮細胞とウシ初代培養肝細胞は Cry1Ab (終濃度 2000ng/ml) 添加 48 時間経過しても形態的な変化は認められなかった (図 2-15)。

(ロ) ヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞の細胞数

Cry1Ab のヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞増殖能に与える影響を測定したが、有意な変化は認められなかった (図 2-16)。

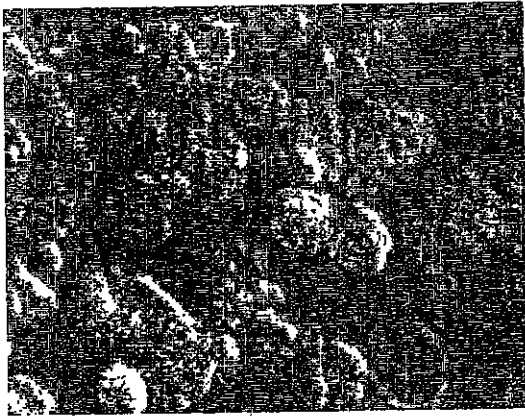
(ハ) ヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞の LDH 遊離率

LDH は細胞質に存在する酵素であるが、細胞膜が障害を受けると細胞外に放出されてくる。この性

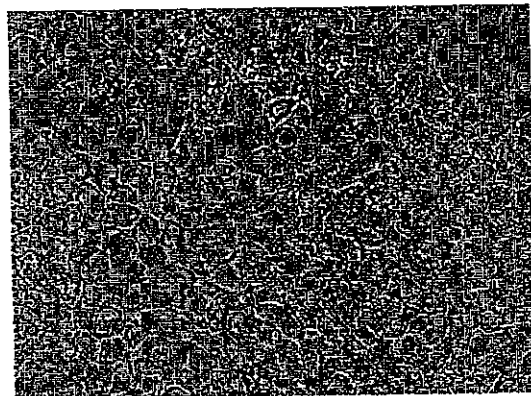
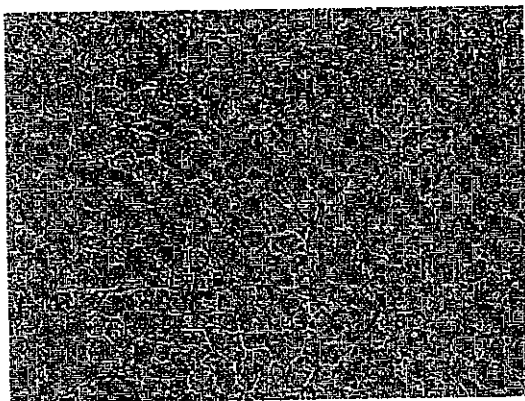
Cry1Ab (0 ng/ml)

Cry1Ab (2000ng/ml)

a



b



c

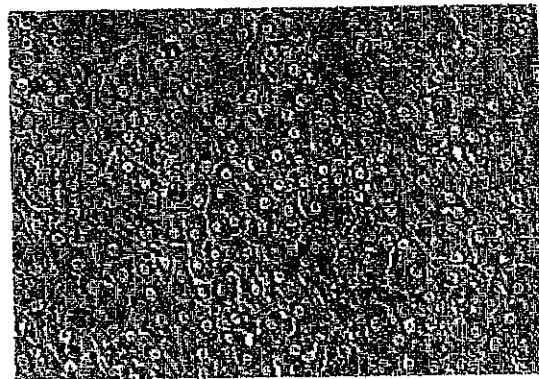
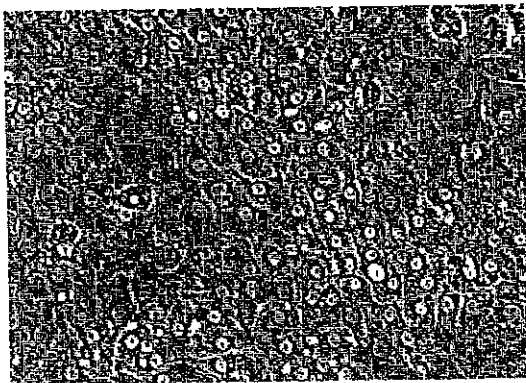


図 2-15 Cry1Ab 添加による各種細胞の形態変化

a : 昆虫中腸上皮細胞(Cry1Ab 添加 1 時間後)、b : ヒト小腸上皮細胞(Cry1Ab 添加 24 時間後)、c : ウシ初代培養肝細胞(Cry1Ab 添加 24 時間後)、矢印 : バルーン状に膨満した細胞

質を利用して、現在、 ^{51}Cr 放出細胞毒性試験に代わる比色定量的な方法として細胞毒性試験に応用されており、本試験においても細胞膜の障害の有無を確認する目的で LDH 遊離率を測定した。

ヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞に Cry1

Ab を添加し、24 および 48 時間後の培養上清中の LDH 遊離率を測定した。その結果、ヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞ともにコントロールに対して有意な変化は示さなかった (図 2-17)。

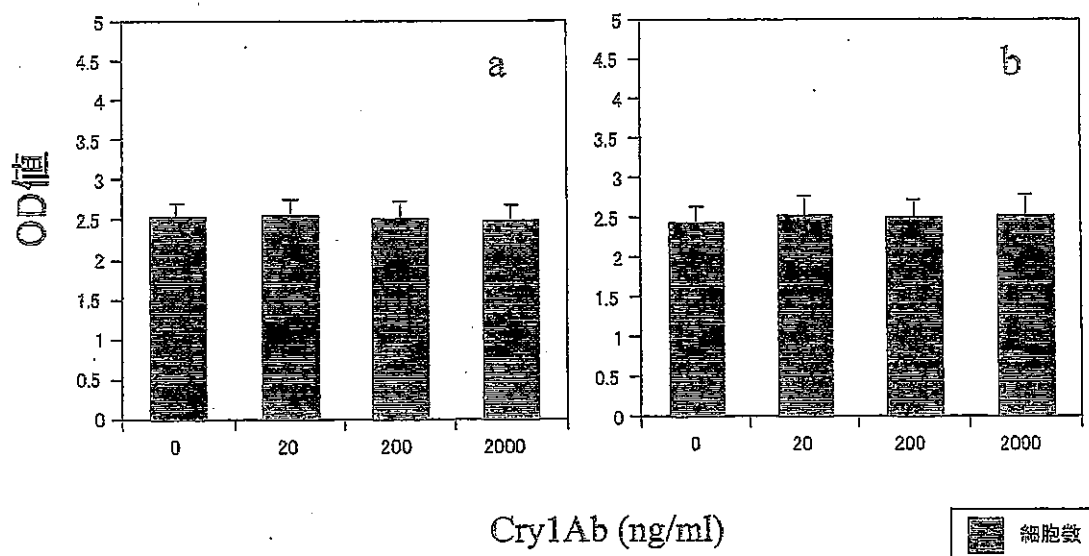


図 2-16 Cry1Ab 添加による各種細胞の細胞数

a : ヒト小腸上皮細胞 (Cry1Ab 添加24時間後)、b : ウシ初代培養肝細胞 (Cry1Ab 添加24時間後)

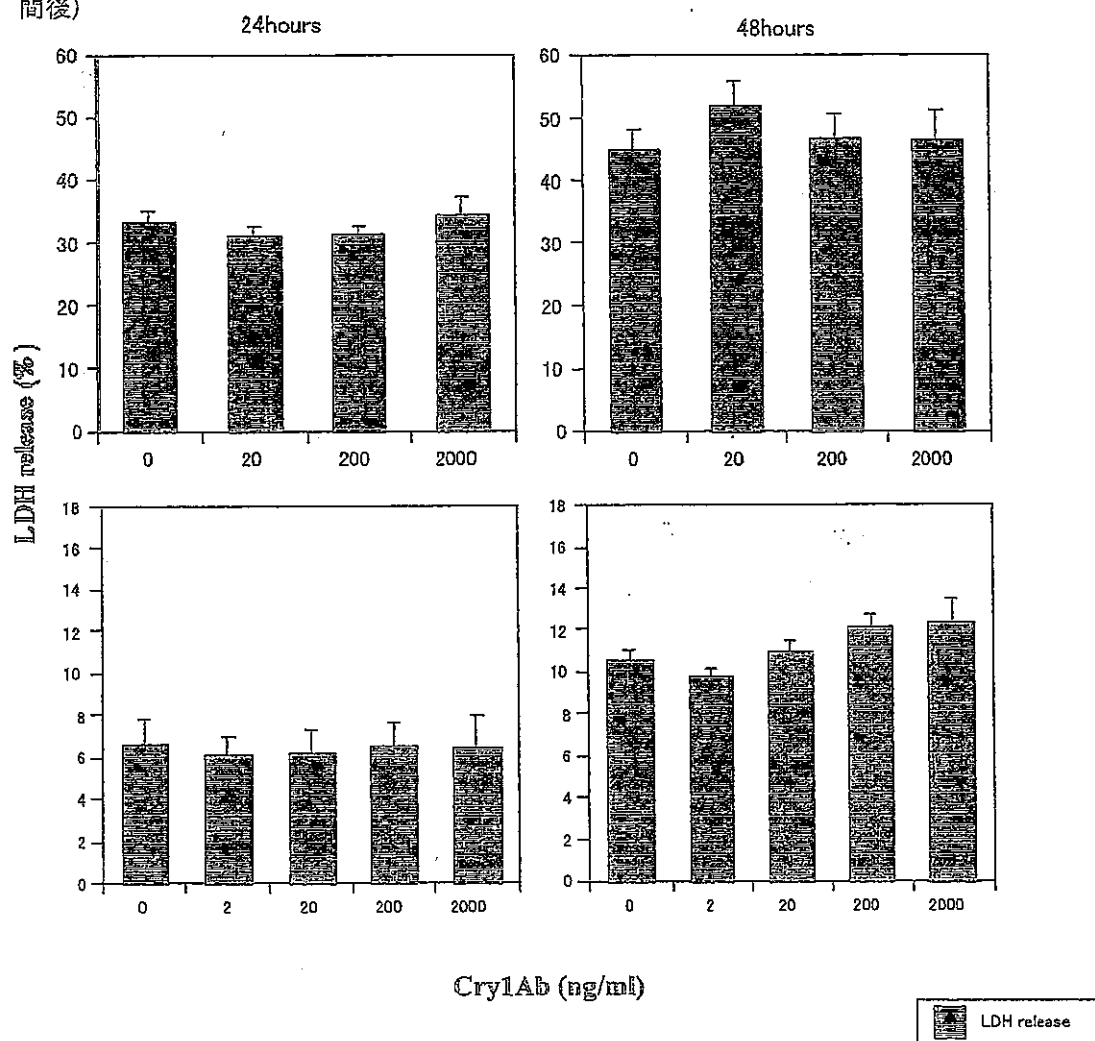


図 2-17 ヒト小腸上皮細胞とウシ初代培養肝細胞の LDH 遊離率

上段：ヒト小腸上皮細胞の LDH 遊離率 (Cry1Ab 添加24および48時間後)、下段：ウシ初代培養肝細胞の LDH 遊離率 (Cry1Ab 添加24および48時間後)

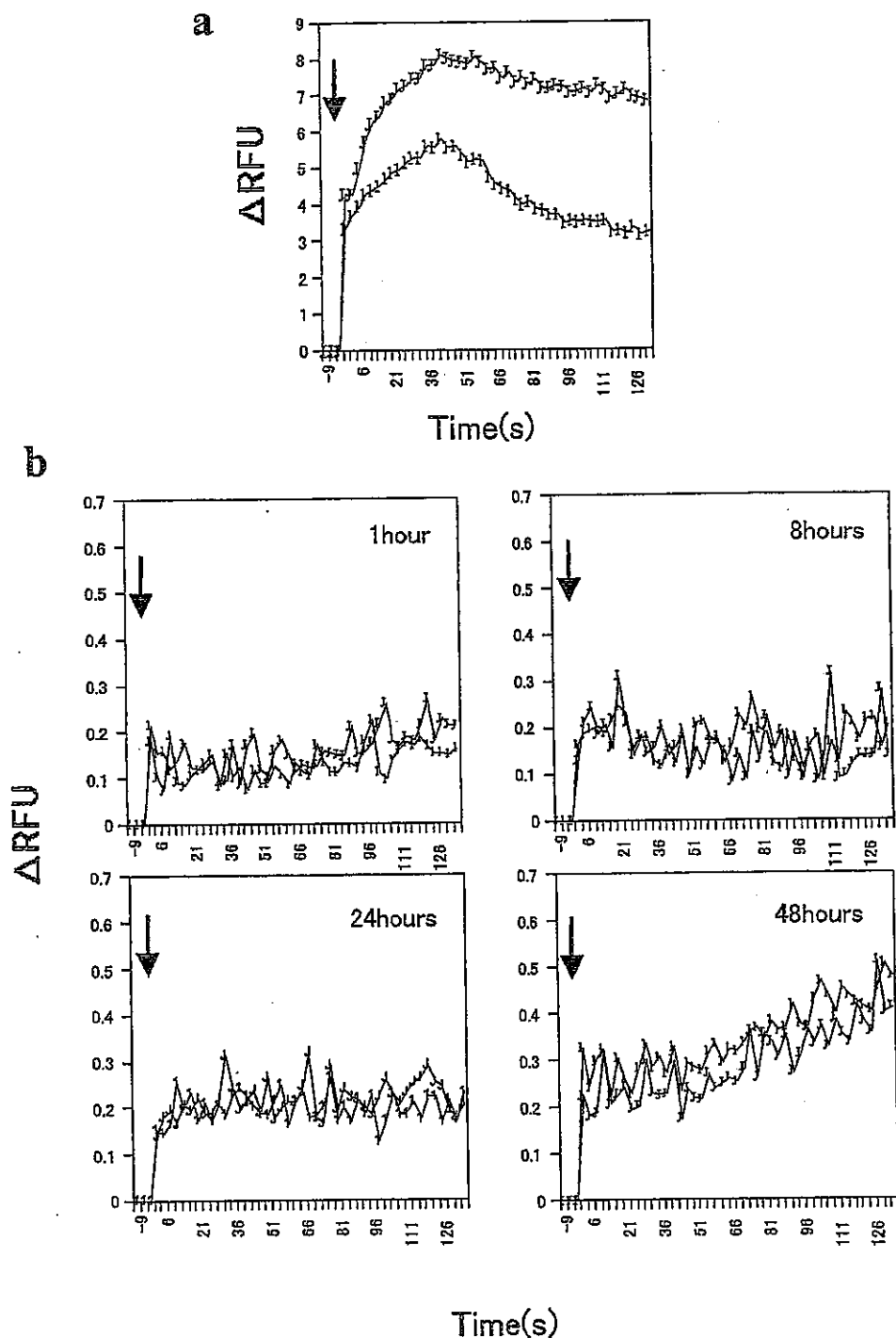


図2-18 昆虫中腸上皮細胞とヒト小腸上皮細胞の膜電位変化

a : 昆虫中腸上皮細胞の膜電位変化 (Cry1Ab 添加1時間後)、b : ヒト小腸上皮細胞の膜電位変化 (Cry1Ab 添加1、8、24および48時間後)、矢印：KCl 添加時点、●：Cry1Ab 添加群、×：PBS 添加群

(オ) 蚕中腸上皮細胞、ヒト小腸上皮細胞の膜電位変化

膜電位感受性色素 DiBAC₄(3)は細胞が脱分極を起こすと細胞内に取り込まれ、蛍光を発する。本実験では DiBAC₄(3)を用いて Cry1Ab を作用させた

細胞の KCl に対する膜電位の変化を測定した。Cry1Ab (終濃度2000ng/ml) を1時間作用させた蚕中腸上皮細胞では、KCl が添加されることにより、大幅な電位上昇が認められ、また、各測定時における ΔRFU の合計値はコントロールに対して統計的に

表 2-18 昆虫中腸上皮細胞とヒト小腸上皮細胞の膜電位変化

	ΔRFU 合計値 (平均±標準誤差)			
	1h	8h	24h	48h
ヒト小腸上皮細胞				
PBS 添加群	6.118±1.270	7.876±1.018	8.964±1.936	15.721±1.688
Cry1Ab 添加群	6.997±1.526	7.380±1.348	9.843±1.404	13.202±3.209
昆虫中腸上皮細胞				
PBS 添加群	192.778±16.393			
Cry1Ab 添加群	319.679±16.217*			

* スチューデントの t 検定により、有意差有り (P<0.01)

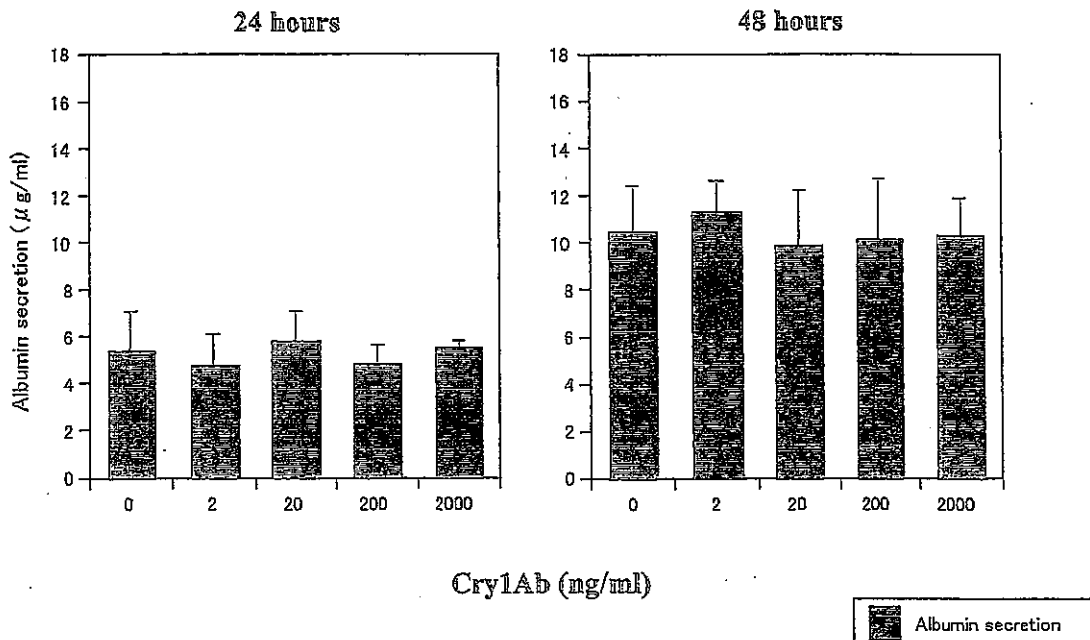


図 2-19 ウシ初代培養肝細胞のアルブミン分泌量

ウシ初代培養肝細胞のアルブミン分泌量 (Cry1Ab 添加24および48時間後)

有意な増加が認められた(図2-18、表2-18)。一方、ヒト小腸上皮細胞においては、Cry1Ab(終濃度2000ng/ml)を1、8、24および48時間作用させた後に、KClに対する膜電位変化の測定を行ったが、すべての測定においてコントロールとほぼ同様の変化パターンを示し、各測定時におけるΔRFUの合計値も有意な差は認められなかった(図2-18、表2-18)。

(カ) ウシ初代培養肝細胞のアルブミン分泌量

本課題で用いたウシ初代培養肝細胞はアルブミン分泌能を保持している。そこで、Cry1Abが細胞機能

に与える影響について評価を行うため、アルブミン分泌機能へ与える影響について検討した。

ウシ初代培養肝細胞にCry1Abを添加し、24および48時間後の培養上清中のアルブミン分泌量を測定した。その結果、どの群においてもコントロールに対して有意な変化は示さなかった(図2-19)。

エ 考 察

本課題においては、害虫耐性トウモロコシ Bt11中に発現している殺虫性蛋白質Cry1Abの動物細胞への影響をヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞

を用いて検討した。

Bt11中に発現している殺虫性蛋白質 Cry1Ab に関する安全性試験においては、大腸菌による組換え Cry1Ab で代替可能であると Environmental Protection Agency においても確認されていることから、本課題においては、大腸菌発現系により作成した組換え Cry1Ab を実験に使用した。精製フラクシオン中の LPS 混入量は 2.5ng/ml であったが、1 μ g/ml の混入量でもウシ初代培養肝細胞のアルブミン分泌量に変化が認められないことはすでに確認されており、本課題における試験項目に関しては問題のない混入量であると考えられた。

殺虫性蛋白質 Cry1Ab は昆虫中腸上皮細胞の細胞膜に小孔を形成し、流入するイオンにともない過剰な水などの低分子物質を細胞内に引き込むことにより、細胞に障害を与えると考えられている^{1,2)}。そこで我々は、Cry1Ab が動物細胞の細胞膜に与える影響（形態変化、LDH 遊離率、膜電位）と細胞の活性状態に与える影響（細胞数、アルブミン分泌量）について観察・測定を行った。昆虫の中腸上皮細胞は、Cry1Ab を作用させると細胞膜が剥離したようなバルーン状の形態を呈することが明らかとなった。一方、ヒト小腸上皮細胞とウシ初代培養肝細胞では Cry1Ab を 48 時間作用させても昆虫中腸上皮細胞で確認されるような形態的变化は認められなかった。また、細胞膜障害の指標とされている LDH の遊離率についてもヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞の両細胞からの LDH 遊離率には有意な増加は認められず、細胞膜の障害はないと考えられた。

しかし、Cry1Ab が形成する小孔は直径 1 - 2 nm 程度と考えられており³⁾、LDH は約 140kDa の蛋白質であることを考慮すると、LDH が細胞外に遊離するには、細胞膜がかなり重度の障害を受けないと遊離してこないと考えられる。そこで、より詳細に細胞膜の状態を把握する目的で Cry1Ab が形成する小孔を通過できる K⁺イオンの動態を、膜電位を測定することにより間接的に測定することを試みた。その結果、K⁺イオン運搬体薬剤であるバリノマイシンを用いた前実験で細胞膜の障害を K⁺イオンの流入による膜電位の変化から検出可能であることが確認された。そこで、この実験系を用いて Cry1Ab の細胞膜障害作用について影響評価を行った。Cry1Ab を作用させた昆虫中腸上皮細胞では、KCl を添

加することにより、膜電位が大幅に上昇し、元の電位に戻らなかった。この測定における膜電位の変化と K⁺イオン動態の関係について、我々は以下のように考えている。KCl 添加時点での急激な蛍光値の上昇は、KCl 添加によるウェル内溶液量の増加が原因となったクエンチング現象と考えられる⁹⁾。その後、緩やかに蛍光値が上昇するが、これは添加した KCl の影響による細胞の脱分極を反映していると思われる。続いて、コントロールでは徐々に蛍光値が減少したが、これは細胞膜上のイオンチャンネルのような細胞のホメオスタシス機構が作用した結果であると考えられた。以上の考察から、Cry1Ab を作用させた昆虫中腸上皮細胞においては Cry1Ab による小孔が形成されることにより、過剰に K⁺イオンが流入し、かつ、細胞のホメオスタシス機構が障害されるため、正常な電位に戻ることができないと考えられた。一方、ヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞においては、Cry1Ab を作用させた群においても、K⁺イオンに対する膜電位の変化パターンにコントロール群と違いが認められなかったことから、Cry1Ab による小孔は形成されていないと考えられた。

細胞の活性状態の指標となる細胞増殖能とアルブミン分泌量においても、有意な差は認められなかったことから、細胞の活性状態についても影響を与える可能性は低いと考えられた。

以上の結果から、Cry1Ab は動物細胞に対して、細胞膜に障害を与える可能性は低く、細胞増殖能、細胞機能への影響も認められないことから、家畜に毒性を示す可能性は極めて低いと考えられる。

オ 今後の問題点

本プロジェクトの飼養試験においても Cry1Ab の毒性は認められなかったことから、Cry1Ab が家畜に毒性を示す可能性は低いと考えられる。しかしながら、試験管内消化試験では Cry1Ab の易分解性が報告されているにもかかわらず¹⁰⁾、Bt11 トウモロコシ給与牛の消化管内容物から Cry1Ab が検出されたことは大変興味深い¹¹⁾。つまり、実際に家畜がトウモロコシを給与された場合、完全に消化されることはなく、わずかな量ではあるものの消化管に到達し、糞便中にまで残存していることが明らかとなったのである。Cry 蛋白質はマルチバインディングな性質をもつことが知られており、動物細胞の膜蛋白質と結合する可能性は否定できない¹²⁾。本プロジ

エクトの結果から、飼料用遺伝子組換え農作物を介して摂取された Cry 蛋白質が家畜に毒性を示す可能性は、消化管に到達する量から考えて、極めて低いと考えられる。しかし、Cry 蛋白質と結合する蛋白質が動物細胞においても存在した場合、充分量の Cry 蛋白質が膜蛋白質に結合すると何らかの作用を及ぼす可能性はある。

Bacillus thuringiensis は環境中に常在している細菌であり、人類と家畜はこの殺虫性蛋白質を産生している細菌と古くから共存してきた。しかし、昨今の科学技術の進歩により、この細菌と人類・家畜との関係は大きく変化し始めている。*Bacillus thuringiensis* が産生する殺虫性蛋白質は農薬や遺伝子組換え農作物に利用されることにより、人類と家畜は、これまでにはほとんど起こり得なかった経口的摂取という新たな様式で Cry 蛋白質と接触するようになった。Cry 蛋白質を利用した農薬や遺伝子組換え農作物は今後ますます普及することが予測されており、人類と家畜が Cry 蛋白質と接触する機会は増加すると思われる。Cry 蛋白質の人類・家畜への影響については、有用な効果を示す可能性も含めて、未知な部分が残されている。今後も Cry 蛋白質の動物細胞に与える影響についてデータを蓄積し、知見を深めていく必要があると思われる。

カ 要 約

培養細胞を用いて殺虫性蛋白質 Cry1Ab が与える動物細胞への影響を検討した。

- (ア) 殺虫性蛋白質 Cry1Ab は組換え大腸菌の系で作成し、精製度、生物活性を確認した後に、試験に使用した。
- (イ) ヒト小腸上皮細胞、ウシ初代培養肝細胞を用いて、Cry1Ab の影響を検討したが、形態、細胞数、LDH 遊離率、膜電位、アルブミン分泌量のいずれの項目においても蚕中腸上皮細胞で確認されるような毒性は認められなかった。

キ 文 献

- 1) Schnepf, E. et al (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 : 775-806
- 2) de Maagd, R. A. et al (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends. Genet. 17 : 193-199
- 3) Shimada, N. et al (2003) Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells. J. Vet. Med. Sci. 65 : 187-191
- 4) Baines, D. et al (1994) Establishment of primary and continuous cultures of epithelial cells from larval lepidopteran midguts. J. Insect Physiol. 40 : 347-357
- 5) Baines, D. et al (1997) Comparison of the response of midgut epithelial cells and cell lines from lepidopteran larvae to CryIA toxins from *Bacillus thuringiensis*. J. Insect Physiol. 43 : 823-831
- 6) Higuchi, H. et al (1994) Dexamethasone-induced haptoglobin release by calf liver parenchymal cells. Am. J. Vet. Res. 55 : 1080-1085
- 7) Yamanaka, N. et al (1997) Serum-free culture of adult chicken hepatocytes: morphological and biochemical characterization. Res. Vet. Sci. 62 : 233-237
- 8) Knowles, B. H. and Ellar, D. J. (1987) Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with different insect specificity. Biochim. Biophys. Acta. 924 : 509-518
- 9) Chen, Pei-Yuan, Pearce, D. and Verkman, A. S. (1988) Membrane water and solute permeability determined quantitatively by self-quenching of an entrapped fluorophore. Biochemistry. 27 : 5713-5718
- 10) Okunuki, H. et al (2002) Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. J. Food Hyg. Soc. Japan. 43 : 68-73
- 11) Chowdhury E. H. et al (2003) Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. Vet. Hum. Toxicol. 45 : 72-75
- 12) Vázquez-Padrón, R. I. et al (2000) Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 271 : 54-58

(嶋田 伸明、村田 英雄)

既刊行抜粋（最新号より70号）

352. ミカンキイロアザミウマの防除に関する研究	(12年 3 月)
353. 物質循環の高度化に基づく生態系調和型次世代農業システムの開発	(")
354. 超省力水稻直播栽培技術を基幹とする寒冷地大規模生産システムの開発	(")
355. 組換え体の実用化のための安全性確保に関する研究	(")
356. 屠場油脂廃水の浄化及び有機性廃棄物の処理利用に関する研究	(")
357. 湖沼での有機物の動態解析手法の開発に関する研究	(")
358. 渦鞭毛藻ラフィド藻等による新型赤潮の発生機構と出現予測技術の開発に関する研究	(")
359. 希少野生生物の保護とその生息地としての湿地生態系の保全及びその周辺地域との調和的管理手法の開発に関する研究	(")
360. パルプ産業におけるグアイオキシシン等有機塩素化合物の生成機構の解明ならびに防止技術・除去無害化技術の開発に関する研究	(")
361. マメハモグリバエの防除に関する研究	(12年10月)
362. きのか菌糸の変異判別及び予防技術の開発	(")
363. オオタバコガの防除に関する研究	(13年 3 月)
364. 昆虫の機能利用と資源化に関する基礎研究	(")
365. 穀粒の一粒判定技術の開発	(")
366. 急性期反応物質による牛呼吸器病の早期診断技術の開発	(")
367. 溜池の機能回復・機能向上技術の開発	(")
368. 水田における省力・高付加価値露地野菜生産システムの確立	(")
369. 中回遊型魚類の回帰特性の解明と資源管理技術の開発	(")
370. 漁業資源量調査のためのマリノセンシング技術の開発	(")
371. イネ・ゲノムの効率的解析手法及び遺伝子分子地図の利用技術の開発	(")
372. 中山間地域における地域資源の活用に関する総合研究	(")
373. 新機能性木質系内装材料の開発	(")
374. アントシアニンの花色発現機能の解明	(")
375. 小笠原森林生態系の修復・管理技術に関する研究	(")
376. バイオマイクロマシン開発のための基盤研究	(")
377. 病原微生物の遺伝子解析と利用技術の開発	(14年 2 月)
378. WTO 体制下における安定的食料供給システムの構築に関する研究	(14年 3 月)
379. 環境保全のための総合モニタリング手法の開発	(")
380. 亜熱帯地域での農地からの細粒赤土流出防止技術の確立と海洋生態系への影響解明に関する研究	(")
381. 流出油が沿岸・沖合生態系に及ぼす中・長期的影響の解明	(")
382. フィルダム等の進行性破壊現象の解明	(")
383. 農業政策評価及び農産物市場予測のための国際的計量経済モデルに関する研究	(")
384. 米の流通・消費の多様化に対応した新食味評価手法の開発	(")
385. 有用植物の水質浄化特性の解明による資源循環型水質浄化システムの開発に関する研究	(")
386. 高精度観測衛星を利用した地球温暖化等に伴うアジアの食料生産変動の予測手法の高度化	(")
387. 微生物の機能活用・増強による環境修復手法の開発	(")
388. 家畜の脳・神経機能の解明と評価に関する基礎的研究	(")
389. ルーメン共生微生物研究	(")
390. 動物ゲノムの効率的解析手法及び有用遺伝子の利用技術の開発	(")
391. 水田生態系におけるスクミリングガイの総合的管理技術の開発	(")
392. 新形質付与のためのエンドファイトの機能解明	(")

393. 種苗放流が生物多様性に与える影響に関する研究	(14年 3 月)
394. 細胞生理機能の解明による果実の成熟制御技術の開発	(14年12月)
395. 低温限界環境下における作物・微生物の代謝制御系の解明	(〃)
396. 中山間地域における軟弱野菜の省力安定生産技術体系の確立	(〃)
397. 麦新品種緊急開発プロジェクト —麦類の高品質・早生化のための新品種育成及び品質制御技術に関する緊急研究—	(〃)
398. 指標生物による有害物質海洋汚染の監視手法の高度化に関する研究	(〃)
399. 魚介類の新興及び再興感染症の病害防除技術の開発	(〃)
400. ナラ類の集団枯損機構の解明と枯損防止技術の開発	(〃)
401. スイカ果実汚斑細菌病の防除技術の開発	(〃)
402. 我が国周辺海域における漁業資源の変動予測技術の開発 —環境変動が生物生産力と漁業資源に及ぼす影響の解明—	(〃)
403. 農村における多目的水利用の解明と最適利用技術の開発	(〃)
404. 肉用牛からのメタン産生抑制技術の開発	(〃)
405. サルモネラ等に対する畜産物の生産段階における安全性確保技術の開発	(〃)
406. 新規水田転作作物ケナフの栽培・収穫・調製技術等の開発	(〃)
407. 暖地畑作地帯における環境保全的畑作物生産技術の確立	(15年 3 月)
408. 有機性資源の循環的利用システムに関する研究	(〃)
409. 集団茶園からの環境負荷窒素化合物の流出防止技術の開発に関する研究	(〃)
410. ダイオキシン類の野菜等農作物可食部への付着・吸収実態の解明	(〃)
411. 繁殖技術の高度化に基づく新乳肉複合子牛生産技術の開発	(〃)
412. 寒地の乾田播種早期湛水栽培を基幹とする大規模水稻生産技術の確立	(〃)
413. 早期警戒システムを基幹とする冷害克服型営農技術の確立	(〃)
414. 農林水産業及び農林水産物貿易と資源・環境に関する総合研究	(〃)
415. アンブレラ種であるオオタカを指標とした生物多様性モニタリング手法の開発に 関する研究	(15年12月)
416. 生物間相互作用ネットワークの動態解析に基づく孤立化した森林生態系の修復技 術に関する研究	(〃)
417. 外来魚コクチバスの生態学的研究及び繁殖抑制技術の開発	(〃)
418. 規制項目等有害元素による地下水高濃度汚染実態解明と修復技術の開発に関する研究	(〃)
419. 四万十川流域における環境保全型農林水産業による清流の保全に関する研究	(〃)
420. 白神山地世界自然遺産地域の森林生態系保全のためのモニタリング手法の確立と 外縁部の森林利用との調和を図るための森林環境管理法に関する研究	(〃)
421. 湿原生態系及び生物多様性保全のための湿原環境の管理及び評価システムの開発 に関する研究	(16年 1 月)

研究成果第422集「飼料由来消化管内生産物の家畜に対する影響と動態解明」

Kenkyuseika 422 “*In vivo* and *in vitro* Assessment of Genetically Modified Corn Bt11
Feeding to Animals”

平成16年 1 月27 日 印 刷

平成16年 1 月30 日 発 行

編集・発行 農林水産省農林水産技術会議事務局
〒100-8950 東京都千代田区霞が関1-2-1
印 刷 株式会社 丸井工文社

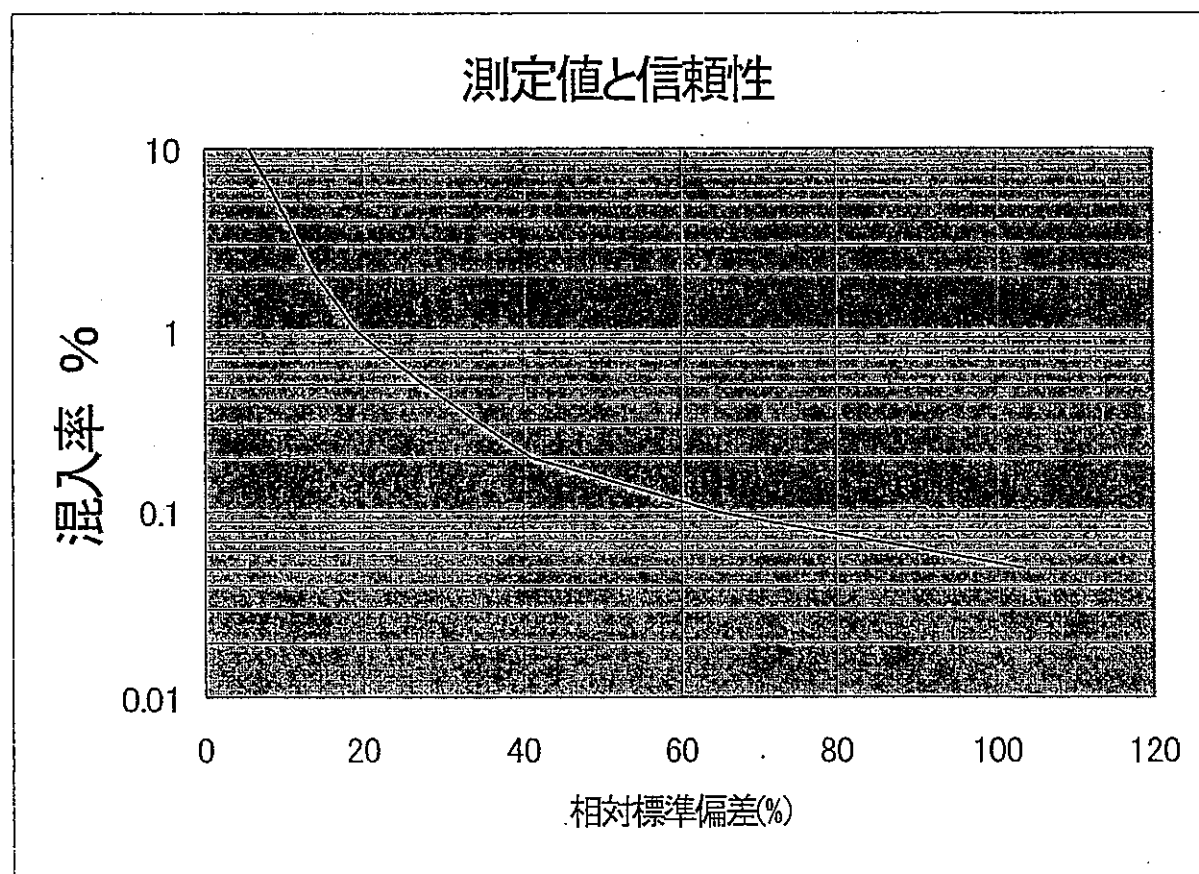
(別添)

飼料用トウモロコシ中のBt10の混入基準の設定根拠

1. 飼料用トウモロコシ中のBt10の混入基準の設定において、Bt10の混入基準を最も厳しく設定することを原則としている。
2. 一方、混入基準値の設定に当たっては、基準値付近における測定値が信頼できる値でなければならない。
3. 飼料用トウモロコシ中のBt10の混入率を測定する場合、膨大な量の母集団からごく限られた穀粒をサンプリングすることとなる。
4. 測定値はごく限られた穀粒をサンプリングすること起因する誤差を含んでおり、測定値が低くなるほど、大きな誤差を含むことが知られている。

1%の測定値は、20%の誤差（相対標準偏差）を含む（下図）

5. 1%以下の測定値では、測定値の信頼性が大きく低下することから、混入基準値を1%と設定した。



Bt10の許容基準の設定について（検討案）

農業資材審議会飼料分科会
飼料安全性部会組換え体委員会

1. 背景

Bt10は、組換えDNA技術によって作出されたトウモロコシであるが、安全性が確認されていないままに2001～2004年の間に米国におけるトウモロコシの栽培面積の0.01%で栽培されたと報告されている。

我が国は、配合飼料(2400万ト)の約半量(1200万ト)をトウモロコシが占め、その96%を米国に依存している。

我が国に輸入される米国産トウモロコシに、Bt10トウモロコシ（以下「Bt10」という。）が飼料原料として混入して輸入されるおそれがある。

2. 課題

(1) Bt10が混入したトウモロコシの飼料としての安全性

Bt10の飼料としての安全性については、いずれの国においても評価されていないことから、我が国においては飼料としての利用は認められていない。

Bt10の飼料用トウモロコシへの混入については、農林水産省は、3月23日にBt10の安全性について、米国での作付け面積が少ないこと等から、家畜及び畜産物の安全性に問題は生じないとの当面の見解を示しているが、これについて、科学的評価を進める必要がある。

こうした中で、Bt10が混入した飼料用トウモロコシの家畜に対する安全性及び給与された家畜に由来する畜産物の安全性について、早急に科学的リスク評価を行なうことが求められる。

(2) Bt10 が混入した飼料用トウモロコシの取扱い

米国産飼料用トウモロコシを利用する場合には、Bt10が混入している可能性を排除できず、混入する恐れを前提とした対処方法を考える必要がある。

本来、輸入される飼料用トウモロコシについてBt10が混入していないことを確保することが必要であるが、現状では、我が国において飼料用トウモロコシからBt10だけを分別し、除去する手段は無い。このような状況を踏まえると、我が国の家畜の飼養に必要な飼料用トウモロコシの安定的な供給を確保するためには、安全性に影響のない範囲についての指標を明らかにすることが重要である。

3. 諮問内容

(1) 諮問内容

前項の課題を解決する方策として、農林水産省はBt10の混入について許容基準の設定を諮問している。

具体的な許容基準は、飼料用トウモロコシ中のBt10の混入率を1%以下に設定する内容である。

(2) 許容基準の設定

許容基準については、飼料用トウモロコシにおけるBt10の混入率を最も厳しく設定する方針で提案されている。飼料用トウモロコシの分析法は、サンプリングに起因する測定値の誤差を含んでおり、測定値が低くなるほど大きな誤差を含むことが知られている。許容基準の数値は飼料用トウモロコシの安全性を判定する根拠になり、測定値の信頼性が必要なことから、分析値の誤差（相対標準偏差）20%を限界としており、この場合、許容基準の値が1%となる。なお、分析法については現在開発中である。

4. Bt10が混入した飼料の安全性

Bt10の飼料としての安全性については、別途飼料としての安全性確認を実施している。現段階では、評価に必要な資料が一部不足しており、追加提出を求めているところである。Bt10の許容基準設定については、我が国の飼料用トウモロコシの需給事情等を踏まえれば、迅速に評価することが必要であることから、現在利用可能なBt10の資料に基づいて評価を行っている。

(1) Bt10の飼料としての安全性

Bt10の飼料としての安全性について、既に安全性が確認されている組換えDNA技術応用飼料であるBt11と比較検討した結果は以下のとおりである。

- ① Bt10に導入されているCry1Ab及びPAT遺伝子は、既に安全性が確認されているBt11と同一のものである。
- ② 穀粒の成分その他について、Bt10と一般のトウモロコシの間に差異は見出されていない。
- ③ Bt10は抗生物質のアンプシリンを不活化する酵素遺伝子を含んでいるが、この遺伝子はトウモロコシ中では発現しないと考えられる。
- ④ 生産されるたん白質(Cry1Ab)の量はBt11の量を上回っていない。
- ⑤ 植物ゲノム中の導入遺伝子のコピー数及び挿入部位に関しては一部データが不足しているため、データの提供を待つて評価する必要がある。

(2) Bt10の混入率

Bt10の飼料用トウモロコシにおける混入量は、2001年～2004年の平均で0.01%であり、2004年のみでは、0.021%と推定されている。

(3) リスク管理措置

農林水産省は、Bt10の混入の可能性が否定できない米国産飼料用トウモロコシについて、当面のリスク管理措置として、①独立行政法人肥飼料検査所による米国産飼料用トウモロコシの輸入の際のBt10の混入検査及び陽性品の排除、②米国における飼料用トウモロコシのBt10の混入検査と陽性品の我が国への輸出禁止に関する指導を行っている。

米国においては、Bt10の開発会社は、Bt10の2005年用栽培用種子については回収を実施したと説明している。また、Bt10の収穫物は適法な遺伝子組換え体作物として取り扱われており、これまで回収は行われていない。

(4) Bt10に起因する物質の畜産物への移行等

Bt10を飼料として家畜に給与した試験は実施されていない。Bt10と同じたん白質を発現する遺伝子を挿入したBt11については、牛、豚、鶏及びマウスを用いた給与試験が独立行政法人動物衛生研究所及び畜産草地研究所により実施されており、これら動物に対する影響がなかったこと及びCry1Ab遺伝子及びたん白質の畜産物中への移行も認められなかった。

(5) 留意点

Bt10が我が国に流入する経路としては、飼料用トウモロコシの他にコーングルテンフィードやコーングルテンミールが考えられる。しかしながら、これらの輸入量は飼料用トウモロコシの輸入量に比較して極めて小さい。

(6) まとめ

Bt10の安全性については、植物ゲノム中の導入遺伝子のコピー数、挿入部位等が評価できていないが、既に安全性が確認されているBt11と基本的に同一種の組換え体と考えられることやBt11の給与試験の結果等から類推すると、飼料用トウモロコシ中に混入したBt10が家畜に対して明らかなリスクを有するとは考えにくい。

5. 検討結果

現段階では、Bt10が混入した米国産飼料用トウモロコシが、家畜に対して顕著なリスクを有するとする明確な根拠はない。以上の点と我が国の飼料の安定的供給の必要性に鑑み、安全性評価が終了するまでの暫定的な措置として、「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づく組換えDNA技術によって得られた生物の混入基準」の規定に準じて、飼料用トウモロコシ中のBt10について1%の許容基準を設定することが適当であると考えられる。