

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められたチョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP-004114-3）に係る食品健康影響評価（平成 25 年 7 月 17 日付け厚生労働省発食安 0717 第 1 号）については、平成 26 年 10 月 3 日に開催された第 131 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

審議結果（案）については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

2. チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP-004114-3）に係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成 26 年 11 月 4 日（火）開催の食品安全委員会（第 536 回会合）の翌日の平成 26 年 11 月 5 日（水）から平成 26 年 12 月 4 日（木）までの 30 日間。

2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに
除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(DP-004114-3)

2014年11月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
＜審議の経緯＞.....	3
＜食品安全委員会委員名簿＞.....	3
＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞.....	3
要 約.....	4
I. 評価対象食品の概要.....	5
II. 食品健康影響評価.....	5
第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相 違に関する事項.....	5
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項.....	5
2. 宿主の食経験に関する事項.....	6
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	6
4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項.....	6
5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品として の性質に関する事項.....	7
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項.....	7
第 2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	7
第 3. 宿主に関する事項.....	7
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項.....	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	7
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	8
6. 安全な摂取に関する事項.....	8
7. 近縁の植物種に関する事項.....	8
第 4. ベクターに関する事項.....	8
1. 名称及び由来に関する事項.....	8
2. 性質に関する事項.....	8
第 5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝 子産物の性質に関する事項.....	9
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	13
第 6. 組換え体に関する事項.....	13
1. 遺伝子導入に関する事項.....	13
2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事	

項.....	15
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	16
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギ－誘発性に関する事項.....	16
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	19
6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項.....	19
7. 宿主との差異に関する事項.....	19
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	20
9. 栽培方法に関する事項.....	20
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	20
第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項.....	20
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	21
<参照>.....	21

＜審議の経緯＞

2013 年 7 月 18 日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安 0717 第 1 号）、関係書類の接受

2013 年 7 月 22 日 第 482 回食品安全委員会（要請事項説明）

2013 年 8 月 1 日 第 117 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2014 年 5 月 19 日 第 127 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2014 年 10 月 3 日 第 131 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2014 年 11 月 4 日 第 536 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森国敏（委員長代理）
石井克枝
上安平冽子
村田容常

＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞

2013 年 9 月 30 日まで	2013 年 10 月 1 日から	2014 年 4 月 1 日から
澤田純一（座長）	澤田純一（座長）	澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）	鎌田 博（座長代理）	小関良宏（座長代理*）
五十君静信 手島玲子	小関良宏 手島玲子	宇理須厚雄 手島玲子
宇理須厚雄 中島春紫	宇理須厚雄 中島春紫	岡田由美子 中島春紫
橘田和美 飯 哲夫	橘田和美 飯 哲夫	橘田和美 飯 哲夫
児玉浩明 和久井信	児玉浩明 和久井信	児玉浩明 和久井信
澁谷直人	近藤一成	近藤一成

（*2014 年 4 月 24 日から）

要 約

「チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ DP-004114-3」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本系統は、*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* に由来する改変 *cry1F* 遺伝子並びに *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株に由来する *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子を導入して作出されており、改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質を発現することで、チョウ目害虫及びコウチュウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。また、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変 *pat* 遺伝子を導入して作出されており、PAT タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネートによる影響を受けずに生育できるとされている。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、遺伝子の導入後の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分等の比較の結果等について確認した結果、非組換えトウモロコシと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ DP-004114-3」は、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名 称：チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ DP-004114-3

性 質：チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート耐性

申請者：デュポン株式会社

開発者：Pioneer Hi-Bred International, Inc. (米国)

「チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ DP-004114-3」(以下「トウモロコシ DP-004114-3」という。)は、*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* に由来する改変 *cry1F* 遺伝子並びに *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株に由来する *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子を導入して作出されており、改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質を発現することで、チョウ目害虫及びコウチュウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。また、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変 *pat* 遺伝子を導入して作出されており、PAT タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネートによる影響を受けずに生育できるとされている。

なお、これら 4 種類の遺伝子が導入された品種は、従来の交配育種法を用いた遺伝子組換え品種の掛け合わせとして作出され、食品としての安全性審査が終了している。

II. 食品健康影響評価

第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* L.) のデント種、PHWWE 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *cry1F* 遺伝子の供与体は、土壌中のグラム陽性菌である *B. thuringiensis* var. *aizawai* であり、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の供与体は土壌中のグラム陽性菌である *B. thuringiensis* PS149B1 株である。また、改変 *pat* 遺伝子の供与体は、*S. viridochromogenes* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *cry1F* 遺伝子は、チョウ目害虫抵抗性を付与する改変 Cry1F タンパク質を発現する。また、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質を発現する。Cry34Ab1 タンパク質は、Cry35Ab1 タンパク質と協調して機能する(参

照 1)。

改変 *pat* 遺伝子は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する PAT タンパク質を発現する。

これらの遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシは、世界の主要穀物の一つで、古くから多くの食経験がある。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

- (1) 宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子（デント種）中の主要栄養組成（対乾燥重量）はタンパク質 6.0～17.3%、脂質 2.5～5.9%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.5%、粗繊維分 0.5～5.5%である（参照 2, 3, 4）。

- (2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子（デント種）中の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、フィチン酸 0.111～1.57%、ラフィノース 0.020～0.320%、フルフラール 0.0003～0.000634%、*p*-クマル酸 0.003～0.0576%、フェルラ酸 0.02～0.389%、トリプシンインヒビター 1.09～7.18 TIU^a/mg である（参照 2, 3）。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

- (1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

トウモロコシ DP-004114-3 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (2) 摂取（可食）部位

トウモロコシ DP-004114-3 の摂取部位は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (3) 摂取量

トウモロコシ DP-004114-3 の摂取量は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (4) 調理及び加工方法

トウモロコシ DP-004114-3 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

^a TIU : Trypsin Inhibitor Unit

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主と従来品種以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 は、改変 *cry1F* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の導入によって、改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質及び PAT タンパク質を発現することが宿主との相違点である。

以上、1～6により、トウモロコシ DP-004114-3 の安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 は、導入された改変 *cry1F* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子が、改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質及び PAT タンパク質を発現することによって、チョウ目害虫及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を有し、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができるとされている。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Z. mays* L.) のデント種である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの遺伝的先祖は同属のテオシントで、原産地は、メキシコ、中米、南米等と考えられている。現在では世界的に広く栽培されている。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシ種子には、フィチン酸、ラフィノース及びトリプシンインヒビターが含まれている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシによるアレルギー誘発性の報告は少なく、重要なアレルギー誘発食品とは考えられていない（参照 2）。

トウモロコシの Lipid Transfer Protein (LTP) と呼ばれる分子量 9 kDa のタンパク質及び 50 kDa のタンパク質がアレルゲンとして作用することを示唆する報告がある（参照 5, 6）。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

トウモロコシには、ウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られているが、これらがヒトに対して病原性を持つことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは世界の主要穀物の一つで、古くから多くの食経験がある。

7. 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、テオシント及びトリプサクムが知られているが、食用に供されることはない。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

導入用プラスミド PHP27118 の構築には、プラスミド pSB1 が用いられた。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pSB1 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pSB1 の制限酵素切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pSB1 の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

プラスミド pSB1 には、テトラサイクリンに対して耐性を付与する *tetA* 遺伝子及びその調節因子である *tetR* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pSB1 には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子の供与体は、土壌中のグラム陽性菌である *B. thuringiensis* var. *aizawai* である。また、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の供与体は土壌中のグラム陽性菌である *B. thuringiensis* PS149B1 株、改変 *pat* 遺伝子の供与体は、土壌中のグラム陽性放線菌である *S. viridochromogenes* である。

(2) 安全性に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は微生物農薬として長期に利用されており、ヒトに対する病原性は報告されていない（参照 7, 8, 9）。

改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壌中に広く存在し、ヒトに対する病原性は知られていない（参照 10）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子は、*B. thuringiensis* var. *aizawai* 由来の *cry1F* 遺伝子の塩基配列に基づき、植物体内での発現が最適となるように塩基配列の改変を行い、制限酵素切断部位を追加するため、604 番目のアミノ酸がフェニルアラニンからロイシンに置換されている。

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、*B. thuringiensis* PS149B1 株由来遺伝子の塩基配列に基づき、植物体内での発現が最適となるように塩基配列の改変を行ったが、アミノ酸配列に変化はない。

改変 *pat* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* に由来する遺伝子の塩基配列に基づき、植物体内での発現が最適となるように塩基配列の改変を行ったが、アミノ酸配列に変化はない。

挿入 DNA の構成要素は表 1 のとおりである。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子がコードする改変 Cry1F タンパク質 Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質は、殺虫性結晶タンパク質（Bt タンパク質）であり、標的昆虫の中腸細胞の特異的な受容体に結合して、細胞に小孔を形成し中腸細胞を破壊することにより殺虫活性を示す（参照 9）。哺乳類の腸細胞表面には Bt タンパク質の結合部位がないため、Bt タンパク質はヒト及び家畜に毒性を示さない（参照 11）。

・改変 *cry1F* 遺伝子

改変 *cry1F* 遺伝子が発現する改変 Cry1F タンパク質によって、ヨーロッパアワノメノガ等のチョウ目害虫に殺虫活性を示す。

改変 Cry1F タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために National Center for Biotechnology Information (NCBI) タン

タンパク質データベース^bを用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 12）。

- ・ *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子がコードする Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質は、協調して働き（参照 1）、ウエスタンコーンルーフトワーム等のコウチュウ目害虫に殺虫活性を示す。

Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために National Center for Biotechnology Information (NCBI) タンパク質データベースを用いて blastp 検索を行った結果、*E*-value1.0 以下の配列がそれぞれ 45 個及び 42 個見いだされた。Cry34Ab1 タンパク質と 31%の相同性を示す *Streptomyces griseus* 由来のエジロリシンが見いだされたが、溶血作用の報告のある 4 種類のエジロリシンとの相同性は 8~15%と低かった。また、トウモロコシ DP-004114-3 を用いたラットの 13 週間混餌投与試験において溶血性を示す所見はなく（参照 13）、Cry34Ab1 タンパク質はエジロリシンの溶血作用を有しないと考えられた。それ以外に、いずれのタンパク質についても既知の毒性タンパク質との相同性は見られなかった（参照 14）。

- ・ 改変 *pat* 遺伝子

改変 *pat* 遺伝子が発現する PAT タンパク質により、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変換して無毒化することにより、トウモロコシ DP-004114-3 は除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することが可能となる。PAT タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、NCBI タンパク質データベース^bを用いて相同性検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 15）。

（4）抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PHP27118 は、テトラサイクリンに対して耐性を付与する *tetA* 遺伝子及びその発現を調節する *tetR* 遺伝子、スペクチノマイシンに対して耐性を付与する *spc* 遺伝子を有するが、トウモロコシ DP-004114-3 には導入されていないことがサザンブロット分析によって確認されている。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

（1）プロモーターに関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び *cry34Ab1* 遺伝子発現カセットのプロモ

^b National Center for Biotechnology Information (NCBI) タンパク質データベース (187.0 版、nonredundant entries from all Genbank and RefSeq nucleotide translations along with protein sequences from SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB.)

ーターは、トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子の *ubiZM1* プロモーターである（参照 16）。

cry35Ab1 遺伝子発現カセットのプロモーターは、コムギ（*Triticum aestivum*）由来のペルオキシダーゼ遺伝子のプロモーター領域である（参照 17）。

改変 *pat* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター領域である（参照 18）。

（2）ターミネーターに関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter*（*Agrobacterium tumefaciens*）由来の pTi15955 のターミネーター領域である（参照 19）。

cry34Ab1 遺伝子発現カセット及び *cry35Ab1* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ジャガイモ（*Solanum tuberosum*）由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子の *pinII* ターミネーターである（参照 20,21）。

改変 *pat* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S ターミネーター領域である（参照 22）。

（3）その他

改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び *cry34Ab1* 遺伝子発現カセットには、発現を高めるために、トウモロコシ（*Zea mays*）由来のポリユビキチン遺伝子の *ubiZM1* イントロンが挿入されている（参照 16）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pSB1 に改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット及び改変 *pat* 遺伝子発現カセットを挿入することによって導入用プラスミド PHP27118 が作製された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

（1）塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PHP27118 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

（2）原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

導入用プラスミド PHP27118 の T-DNA 領域の塩基配列は明らかになっており、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム（ORF）は含まれていない。

そのことを確認するために、EMBOSS tool GETORF を用いて 30 アミノ酸

配列以上の ORF 検索を行った結果、223 個の ORF が検出された。NCBI タンパク質データセット^b 及びネブラスカ大学のアレルゲンデータベース^cを用いて、それぞれ、既知毒性タンパク質及び既知アレルゲンとの相同性の検討をした結果、いずれの ORF も既知の毒性タンパク質及び既知アレルゲンとの相同性は見られなかった（参照 23）。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

導入用プラスミド PHP27118 の意図する挿入領域は、左側境界領域 (LB) から右側境界領域 (RB) までの T-DNA 領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用プラスミド PHP27118 は、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

表 1 トウモロコシ DP-004114-3 への挿入 DNA

構成 DNA	機能及び由来
RB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の Ti プラスミドの T-DNA 領域の右側境界配列
(改変 <i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>ubiM1</i> プロモーター	プロモーター領域 トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター
<i>ubiZM1</i> 5'UTR	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子の 5'非翻訳領域
<i>ubiZM1</i> イントロン	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域
改変 <i>cry1F</i>	<i>B. licheniformis</i> var. <i>aizawai</i> 由来の改変 <i>Cry1F</i> タンパク質をコードする遺伝子
ORF25 ターミナー	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の pTi15955 のターミネーター
(改変 <i>cry34Ab1</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>ubiZM1</i> プロモーター	プロモーター領域 トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター
<i>ubiZM1</i> 5'UTR	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子の 5'非翻訳領域
<i>ubiZM1</i> イントロン	トウモロコシ由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域

^c FARRP12 (Food Allergen Research and Resource Program、2012 年 2 月公表)

<i>cry34Ab1</i>	<i>B. thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry34Ab1 タンパク質をコードする遺伝子
<i>pinII</i> ターミネーター	ターミネーター領域 ジャガイモ由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター
(<i>cry35Ab1</i> 遺伝子発現カセット)	
TA ペルオキシダーゼプロモーター	プロモーター領域 コムギ由来のペルオキシダーゼプロモーター
<i>cry35Ab1</i>	<i>B. thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry35Ab1 タンパク質をコードする遺伝子
<i>pinII</i> ターミネーター	ターミネーター領域 ジャガイモ由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター
(改変 <i>pat</i> 遺伝子発現カセット)	
CaMV 35S プロモーター	プロモーター領域 カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター
改変 <i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> 由来の PAT タンパク質をコードする遺伝子
CaMV 35S ターミネーター	ターミネーター領域 カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S ターミネーター
LB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の Ti プラスミドの T-DNA 領域の左側境界配列

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド PHP27118 を含むアグロバクテリウムを、宿主の未熟胚に接種後、植物の細胞内で除草剤グルホシネートとなる除草剤ビアラホスを添加した培地で選抜し、再生個体が得られた。次に、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、既存の優良品種との交配及び自殖を行うことによって、トウモロコシ DP-004114-3 が得られた。

第 6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 のゲノムに挿入された改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット及び改変 *pat* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、それぞれの遺伝子発現カセットが 1 コピー挿入されていることが

確認された（参照 24,25,26）。

導入用プラスミド PHP27118 の外骨格領域がトウモロコシ DP-004114-3 のゲノムに挿入されていないことを確認するため、サザンブロット分析を行った結果、外骨格領域は挿入されていないことが確認された（参照 24,27）。

トウモロコシ DP-004114-3 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PHP27118 の T-DNA 領域と塩基配列を比較した結果、右側境界領域の 29 bp の欠失、24 bp の DNA 断片の挿入及び左側境界領域の 24 bp の欠失を除き、塩基配列は一致していることが確認された（参照 28）。

トウモロコシ DP-004114-3 の挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するため、5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列にプライマーを設計し PCR 分析を行い、トウモロコシ DP-004114-3 及び非組換えトウモロコシの PCR 産物の塩基配列を比較した。その結果、トウモロコシ DP-004114-3 及び非組換えトウモロコシの塩基配列は一致し、挿入 DNA の近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された。

トウモロコシ DP-004114-3 に DNA を挿入することによって、宿主の内在性遺伝子が損なわれていないかを確認するために、5'末端近傍配列（2,398 bp）及び 3'末端近傍配列（2,405 bp）について、all_maize_nt データセット^d及び NCBI タンパク質データセット^eを用いて blastn 検索を行った。その結果、3'末端近傍配列には相同性を示す配列は見いだされなかったが、5'末端近傍配列に、イネ由来の細胞内酸化還元制御に関与する推定グルタレドキシシン（GRX）タンパク質をコードする cDNA と 99%の相同性が認められた。そこで、この cDNA 配列と相同性が認められた 5'末端領域をプローブとして、トウモロコシ DP-004114-3 並びに非組換えトウモロコシの葉及び種子組織から抽出した mRNA を用いてノーザンブロット分析を行った結果、トウモロコシ DP-004114-3 及び非組換えトウモロコシのいずれの組織においてもバンドは検出されず（参照 29）、相同性が認められた 5'末端領域は非組換えトウモロコシにおいてもトウモロコシ DP-004114-3 においても、ともに転写される可能性は低いと考えられた。また、植物の酸化還元制御に関与する遺伝子 1 つが不活化されていても、植物体に影響が見られない場合が多く、他の遺伝子によりその機能が補完されるとの報告がある（参照 30,31）。これらのことから、仮に 5'末端近傍配列が GRX タンパク質をコードしていたとしても、トウモロコシ DP-004114-3 植物体に影響を与える可能性は低いと考えられた。

^d 申請者のトウモロコシゲノム及び EST 配列並びに以下の①から⑧までの公開データベースから構築したデータセット。①NCBI マクロオチドデータセット(189.0 版)、②トウモロコシ EST、③Genome Survey Sequence(GSS)トウモロコシゲノム塩基配列、④Sequence Tagged Site(STS)、⑤High Throughput Genomic(HTG)サブセット、⑥The Institute for Genome Research(TIGR)のトウモロコシゲノム塩基配列及び繰り返し配列、⑦トウモロコシミトコンドリア DNA 全塩基配列(AY506529)及び⑧葉緑体 DNA 全塩基配列(X86563)

^e NCBI タンパク質データセット(189.0 版、non-redundant entries from all Genbank and RefSeq nucleotide translations(Genpept “nr”) along with protein sequences from SWISS-PROT , PIR, PRF, PDB.)

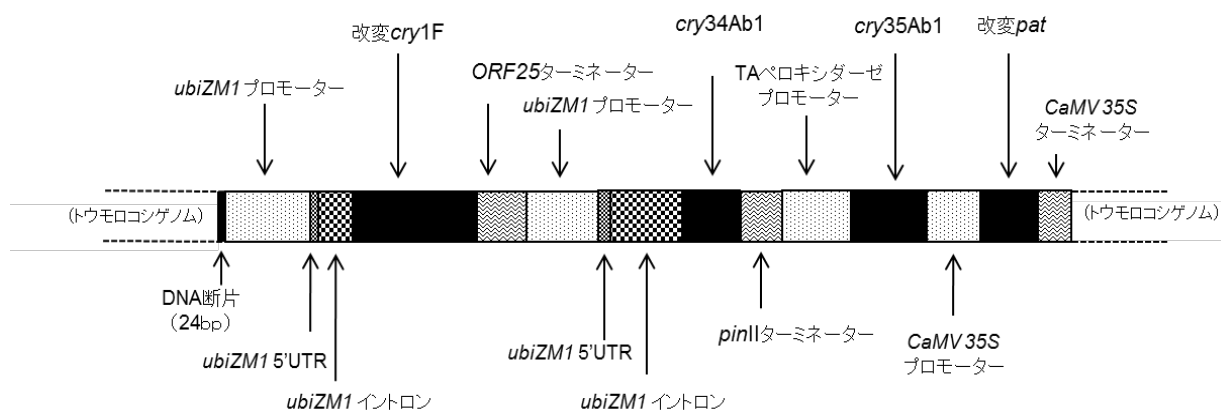


図1 トウモロコシ DP-004114-3 の挿入 DNA (模式図)

(2) オープンリーディングフレーム (ORF) の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列との接合部において、意図しない ORF が生じていないことを確認するために、Vector NTI 10.3 Sequence analysis software を用いて、六つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 7 個見いだされた (参照 32)。

これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、NCBI タンパク質データセット^fを用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった。また、既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^eを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を示す既知アレルゲンは見いだされなかった。さらに、抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^eを用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列について既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった (参照 32)。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 の葉、茎、根、花粉、種子及び地上部植物体における改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質及び PAT タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。結果は表 2 のとおりである (参照 33)。

^f NCBI タンパク質データセット(188.0 版)

表2 トウモロコシ DP-004114-3 における改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質及び PAT タンパク質の発現量

(単位は ng/mg 乾燥重)

分析組織*	改変 Cry1F タンパク質	Cry34Ab1 タンパク質	Cry35Ab1 タンパク質**	PAT タンパク質***
葉	0.32～28	4.2～84	17～130	定量限界値未満 ～24
茎	3.4～9.4	19～36	6.6～13	0.054～0.11
根	0.69～7.8	5.4～54	2.2～20	定量限界値未満 ～0.78
花粉	19～49	4.7～16	定量限界値未満 ～0.53	定量限界値未満
種子	2.3～7.2	14～39	0.54～2.3	定量限界値未満
地上部植物体	2.4～13	20～62	13～100	定量限界値未満 ～7.4

* 葉及び根は6葉期、絹糸抽出期及び成熟期、茎及び花粉は絹糸抽出期、種子は成熟期、地上部植物体は絹糸抽出期及び成熟期の値を示す。

** 定量限界値は花粉 0.32 ng/mg

*** 定量限界値は葉 0.14 ng/mg、花粉 0.28 ng/mg、根及び種子 0.069 ng/mg、地上部植物体 0.046 ng/mg

3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

日本人一人が一日あたりに摂取するトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量 0.3 g (参照 34) を全てトウモロコシ DP-004114-3 に置き換えて計算すると、改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質の一人一日あたりの摂取量は 0.99、7.2 及び 0.33 μg となり、一人一日あたりのタンパク質摂取量 67.3 g (参照 34) に占める割合は、それぞれ 1.5×10^{-8} 、 1.1×10^{-7} 及び 4.9×10^{-9} となる。また、PAT タンパク質は種子では定量限界値未満であったことから、定量限界値の量を含っていると仮定し、日本人一人が一日あたりに摂取するトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量 0.3 g (参照 34) を全てトウモロコシ DP-004114-3 に置き換えて PAT タンパク質の摂取量を計算すると 0.02 μg となり、一人一日あたりのタンパク質摂取量に占める割合は 3.1×10^{-10} となる。

したがって、いずれのタンパク質も一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと考えられる。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

改変 *cry1F* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* var. *aizawai*、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* PS149B1 株がヒトに対してアレルギー誘発性を有することは知られていない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質に関して、ヒトに対するアレルギー誘発性を有するとの報告はない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 人工胃液に対する感受性

・改変 Cry1F タンパク質

Pseudomonas fluorescens で発現させた Cry1F タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された（参照 35）。

・Cry34Ab1 タンパク質

P. fluorescens で発現させた Cry34Ab1 タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 20 分以内に消化されることが確認された。SDS-PAGE 分析の結果から、試験開始後 6.3 分～6.8 分以内に Cry34Ab1 タンパク質の約 90%が消化されることが示された（参照 36）。

・Cry35Ab1 タンパク質

P. fluorescens で発現させた Cry35Ab1 タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 5 分以内に消化されることが確認された。また、SDS-PAGE 分析の結果から、試験開始後 5 分以内に Cry35Ab1 タンパク質の約 97%が消化されることが示された（参照 36）。

② 人工腸液に対する感受性

・改変 Cry1F タンパク質

P. fluorescens で発現させた改変 Cry1F タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析を行った結果、試験開始後 120 分においても消化されないことが確認された（参照 37）。

・Cry34Ab1 タンパク質

P. fluorescens で発現させた Cry34Ab1 タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 240 分においても消化されないことが確認さ

れた（参照 38）。

- ・ Cry35Ab1 タンパク質

P. fluorescens で発現させた Cry35Ab1 タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、44 kDa の Cry35Ab1 タンパク質は直ちに 40 kDa のタンパク質に分解し、試験開始後 80 分にはこの分解物は消失した（参照 39）。

③ 加熱処理に対する感受性

- ・ 改変 Cry1F タンパク質

P. fluorescens で発現させた改変 Cry1F タンパク質の加熱による免疫反応性の変化を ELISA 法を用いて分析した結果、75℃、30 分間の加熱処理により 98.3%減少することが確認された（参照 40）。

- ・ Cry34Ab1 タンパク質

P. fluorescens で発現させた Cry34Ab1 タンパク質の加熱による免疫反応性の変化を ELISA 法を用いて分析した結果、100℃、5 分間の加熱処理により 82.8%減少することが確認された（参照 41）。

- ・ Cry35Ab1 タンパク質

P. fluorescens で発現させた Cry35Ab1 タンパク質の加熱による免疫反応性の変化を ELISA 法を用いて分析した結果、100℃、5 分間の加熱処理で 98.6%減少することが確認された（参照 41）。

PAT タンパク質については、トウモロコシ DP-004114-3 で産生される PAT タンパク質と同一のアミノ酸配列である *Escherichia coli* 由来の PAT タンパク質を用いた試験において、人工胃液中及び人工腸液中で 30 秒以内に消化されること、また、90℃で 60 分間の加熱処理により免疫反応性が認められたが酵素活性は失われることが明らかにされている（参照 42）。これらのことから、PAT タンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いとされている（参照 42,43）。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。）との構造相同性に関する事項

改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質及び PAT タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース（FARRP12）を用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン等は見いだされなかった。

また、抗原決定基の有無を確認するため、FARRP12 を用いて相同性検索を

行った結果、連続する 8 アミノ酸配列について既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 44,45,46）。

上記、（１）～（４）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質及び PAT タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 に挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、5 世代のトウモロコシ DP-004114-3 についてサザンブロット分析を行った結果、各世代において共通のバンドが検出され、導入遺伝子が世代間で安定していることが確認された（参照 26）。

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

改変 Cry1F タンパク質、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質は、殺虫性結晶タンパク質（Bt タンパク質）であり、植物体内で酵素として働くことは報告されていない。

PAT タンパク質は、グルホシネートをアセチル化することによって、グルホシネートの除草剤としての機能を失わせる。その反応は L-グルホシネートに特異的で、類縁体との反応性は低く、生体内の L-アミノ酸に対する反応も認められなかったことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上から、これらのタンパク質が、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

7. 宿主との差異に関する事項

米国及びカナダのほ場で栽培されたトウモロコシ DP-004114-3 及び非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ビタミン類及び有害生理活性物質の分析を行い、統計学的有意差について検討が行われた（参照 47）。

（１）主要構成成分

タンパク質、脂質、灰分、炭水化物及び粗繊維の分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても非組換えトウモロコシの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であった。

（２）脂肪酸組成

脂肪酸（29 種類）の分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても非組換えトウモロコシの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であった。

(3) アミノ酸組成

アミノ酸 18 種類の分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) ミネラル類

ミネラル 9 種類の分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても非組換えトウモロコシの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であった。

(5) ビタミン類

ビタミン類 12 種類の分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(6) 有害生理活性物質

フィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビター、フルフラール、*p*-クマル酸、フェルラ酸及びイノシトールの分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁（FDA）に対して食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2013 年 3 月に確認が終了した。また、米国農務省（USDA）に対して無規制栽培の承認申請が行われ、2013 年 6 月に承認を得た。

カナダにおいては、カナダ保健省（Health Canada）に対する食品としての安全性審査の申請及びカナダ食品検査庁（CFIA）に対する飼料としての安全性審査の申請が行われ、2013 年 6 月に承認を得た。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 の栽培方法は、チョウ目及びコウチュウ目害虫の防除に必要な薬剤使用が不要である点並びに雑草防除に除草剤グルホシネートが散布可能な点を除き、従来のトウモロコシ（デント種）と同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシ DP-004114-3 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と同じである。

第 7. 第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られている。

(参考)

ラットを用いた 13 週間反復混餌投与試験の公表論文が提出されたことから、これを確認した。

SD 系ラット（1 群雌雄各 12 匹）を用いた 13 週間反復混餌投与試験が実施された。試験には、除草剤グルホシネート散布又は非散布のトウモロコシ DP-004114-3 を 32%(W/W)配合した飼料を用い、対照には、非組換えトウモロコシを 32%(W/W)配合した飼料を用いた。その結果、被検物質投与に関連した毒性学的意義のある変化は認められなかった（参照 13,48）。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ DP-004114-3」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

- 1 Ellis, R.T., Stockhoff, B.A., Stamp, L., Schnepf, H.E., Schwab, G.E., Knuth, M., Russell, J., Cardineau, G.A. and Narva, K. E. (2002). Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. Applied and Environmental Microbiology. 68(3): 1137-1145.
- 2 OECD. (2002). Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 6. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2002) 25.
- 3 ILSI. (2006). International Life Sciences Institute Crop Composition Database Search Results (Version 3.0). Maize: Forage, Grain.
- 4 Watson, S.A. (1982). Corn: Amazing Maize. General Properties. CRC handbook of processing and utilization in agriculture. CRC Press Inc., Florida. pp.3-29.
- 5 Pasini, G., Simonato, B., Curioni, A., Vincenzi, S., Cristaudo, A., Santucci, B., Peruffo, A.D.B. and Giannattasio, M. (2002). IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the reduced soluble proteins, is a major allergen. Allergy. 57: 98-106.

- 6 Pastorello, E.A., Pompei, C., Pravettoni, V., Farioli, L., Calamari, A.M., Scibilia, J., Robino, A.M., Conti, A., Iametti, S., Fortunato, D., Bonomi, S. and Ortolani, C. (2003). Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100°C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 112(4): 775-783.
- 7 McClintock, J.T., Schaffer, C.R. and Sjoblad R.D. (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. *Pesticide Science*. 45: 95-105.
- 8 EPA. (1998). Reregistration Eligibility Decision (RED): *Bacillus thuringiensis*. United States Environmental Protection Agency. EPA738-R-98-004.
- 9 Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(3): 775-806.
- 10 OECD. (1999). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No. 11. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(99)13.
- 11 Hammond, B., Stanisiewski, E., Fuchs, R., Astwood, J. and Hartnell G. (2002). Testing for genetic manipulation in plants. Jackson, J.F. and Linskens, H.F. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. pp.125-126.
- 12 Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the Cry1F Protein to the NCBI protein Sequence. (社内報告書)
- 13 Delaney, B., Karaman, S., Roper, J., Hoban D., Sykes, G., Mukerji, P. and Frame, S.R. (2013). Thirteen week rodent feeding study with grain from molecular stacked trait lepidopteran and coleopteran protected (DP-004114-3) maize. *Food and Chemical Toxicology*. 53:417-427.
- 14 CLUSTALW Analysis of the Cry34Ab1 Protein In Comparison to Known Aegerolysin Toxins. (社内報告書)
- 15 Evaluation on the Amino acid Sequence Similarity of the PAT Protein Sequence Datasets. (社内報告書)
- 16 Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*. 18: 675-689.
- 17 Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., Mauch, F. and Dudler, R. (1991). Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Molecular Biology*. 16: 171-174.

- 18 Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 313: 810-812.
- 19 Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V. and Kemp, J.D. (1983). Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 2: 335-350.
- 20 Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Research*. 14: 5641-5650.
- 21 An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. (1989). Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *The Plant Cell*. 1: 115-122.
- 22 Pietrzak, M., Shillito, R.D., Hohn, T. and Potrykus, I. (1986). Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Research*. 14: 5857-5868.
- 23 Reading Frame Analysis of the PHP27118 Transformation Fragment. (社内報告書)
- 24 Southern Blot Analysis of the F1*1 Generation of DP-004114-3 Maize to Verify Gene Copy Number and Integrity and Absence of Backbone DNA (社内報告書)
- 25 Southern Blot Analysis of the T2 Generation of DP-004114-3 Maize to Verify Gene Copy Number and Integrity (社内報告書) .
- 26 Amended Final Report. Characterization of DP-004114-3 Maize: Insertion Integrity, Stability, Copy Number, and Backbone Analysis (社内報告書)
- 27 Amended Final Report. Southern Blot Analysis of DP-004114-3 Maize (T2 Generation) Verifying Absence of Backbone DNA (社内報告書) .
- 28 Sequencing Characterization of Insert and Genomic Border Regions of Maize Event DP-004114-3 (社内報告書) .
- 29 Summary Report: Molecular Characterization of PHP27118 T-DNA Insertion in Maize Event DP-004114-3 (社内報告書) .
- 30 Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F., and Reichheld, J. P. (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1783: 589-600.
- 31 Riondet, C., Desouris, J.P., Montoya, J.G, Chartier, Y., Meyer, Y. and Reichheld, J-P. (2012). A dicotyledon-specific glutaredoxin GRXC1 family with dimer-dependent redox regulation is functionally redundant with GRXC2. *Plant, Cell and Environment*. 35: 360-373.
- 32 Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-004114-3 (社内報告書) .

- 33 Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Events DP-004114-3, DAS-01507-1, DAS-59122-7, and Combined Trait Product DAS-01507-1 x DAS-59122-7: US and Canada Test Sites (社内報告書) .
- 34 厚生労働省. (2012). 平成 22 年国民健康・栄養調査報告. p.62, p.78.
- 35 *B.t.* Cry1F 害虫抵抗性、グルホシネート耐性トウモロコシ 1507 系統の安全性審査に関する資料. 六-2-(3). 遺伝子産物の物理化学処理に対する感受性. Cry1F 蛋白の物理化学処理に対する感受性. 人工胃液に対する感受性; pp43-45.
- 36 Herman, R.A., Schafer, B.W., Korjagin, V.A. and Ernest, A.D. (2003). Rapid digestion of Cry34Ab1 and Cry35 Ab1 in simulated gastric fluid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 6823-6827.
- 37 In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Microbially Derived Cry1F (tr) (社内報告書) .
- 38 In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Recombinant Cry34Ab1 (社内報告書) .
- 39 In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Recombinant Cry35Ab1 (社内報告書) .
- 40 Gel Electrophoresis, Western Blot, and ELISA of Truncated Cry1F Delta-endotoxin following Heat treatment (社内報告書) .
- 41 Heat Lability of Insecticidal Crystal Proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 (社内報告書) .
- 42 Hérouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis R-J. and Rouan, D. (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 41: 134-149.
- 43 ILSI. (2011). A Review of the Environmental Safety of the PAT Protein. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation.
- 44 Comparison of the Amino Acid Sequence Identity between the Cry1F Protein and Known Protein Allergens (社内報告書)
- 45 Comparison of the Amino Acid Sequence Identity between the Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Proteins and Known Protein Allergens (社内報告書) .
- 46 Comparison of the Amino Acid Sequence Identity between the PAT Protein and Known Protein Allergens (社内報告書)
- 47 Nutrient Composition of a Maize Line Containing Event DP-004114-3 US and Canada Test Sites (社内報告書) .
- 48 Hardisty, J.F., Banas, D.A., Gopinath, C., Hall, W.C., Hard, G.C. and Takahashi, M. (2013). Spontaneous renal tumors in two rats from a thirteen week rodent feeding study with grain from molecular stacked trait lepidopteran and coleopteran resistant (DP-004114-3) maize. Food and Chemical Toxicology. 53:428-431.