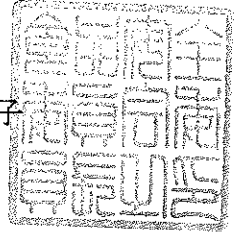




府食第1051号
平成21年11月5日

厚生労働大臣
長妻 昭 殿

食品安全委員会
委員長 小泉 直子



食品健康影響評価の結果の通知について

平成20年2月25日付け厚生労働省発食安第0225001号をもって貴省から当委員会に意見を求められた食品「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMIR162系統」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMIR162系統」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ものと判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統

2009年11月

食品安全委員会

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.....	5
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	5
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.....	6
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.....	6
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	6
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.....	7
6. 安全な摂取に関する事項.....	7
7. 近縁の植物種に関する事項.....	7
第4. ベクターに関する事項.....	7
1. 名称及び由来に関する事項.....	7
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.....	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	10
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	12
第6. 組換え体に関する事項.....	12
1. 遺伝子導入に関する事項.....	12
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.....	13
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.....	13
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.....	14
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	15
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.....	15
7. 宿主との差異に関する事項.....	16
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	17
9. 栽培方法に関する事項.....	17
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	17
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.....	17
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	17
<参照>.....	18

<審議の経緯>

2008年2月26日	厚生労働大臣より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（厚生労働省発食安第0225001号）、関係書類の接受
2008年2月28日	第228回食品安全委員会（要請事項説明）
2008年3月17日	第60回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年3月10日	第69回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年7月10日	第72回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年9月14日	第73回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年10月1日	第303回食品安全委員会（報告）
2009年10月1日より30日	国民からの御意見・情報の募集
2009年11月2日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
2009年11月5日	第308回食品安全委員会（報告） （同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

2009年6月30日まで

見上 彪（委員長）
小泉直子（委員長代理）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
本間清一

2009年7月1日から

小泉直子（委員長）
見上 彪（委員長代理*）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
村田容常

*：2009年7月9日から

<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>

2009年9月30日まで

澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）
五十君静信 丹生谷博
石見佳子 飯 哲夫
宇理須厚雄 山川 隆
小関良宏 山崎 壮
橘田和美 和久井信
澁谷直人 渡邊雄一郎
手島玲子

2009年10月1日から

澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）
五十君静信 澁谷直人
石見佳子 手島玲子
海老澤元宏 中島春紫
小関良宏 飯 哲夫
橘田和美 山崎 壮
児玉浩明 和久井信

要 約

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統」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行った。

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統」は、*Bacillus thuringiensis* AB88 株に由来する改変 *vip3A* 遺伝子を導入して作製されており、チョウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。なお、本品には、選択マーカーとして *Escherichia coli* K-12 株に由来するマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子が導入されている。

B. thuringiensis が産生する殺虫活性タンパク質としては、結晶性の Cry タンパク質が知られているが、導入した改変 *vip3A* 遺伝子により発現する改変 Vip3A タンパク質は *B. thuringiensis* AB88 株において新たに見いだされた可溶性タンパク質である。したがって、特に改変 Vip3A タンパク質について、既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの構造相同性、物理化学的処理に対する感受性の確認に加え、細胞毒性試験及びラットにおける急性毒性試験について確認したところ、問題のある結果は認められなかった。

これらのことから、「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、「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統」はヒトの健康を損なうおそれはないものと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名称：チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統

性質：チョウ目害虫抵抗性

申請者：シンジェンタシード株式会社

開発者：Syngenta Seeds, Inc. (米国)

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統」(以下「トウモロコシ MIR162」という)は、*Bacillus thuringiensis* AB88 株に由来する *vip3Aa1* 遺伝子の塩基配列を基に合成した改変 *vip3A* 遺伝子 (*mvip3A* 遺伝子) を導入して作製されており、改変 Vip3A タンパク質 (mVip3A タンパク質) を発現することで、チョウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。なお、トウモロコシ MIR162 には、選択マーカーとして *Escherichia coli* K-12 株のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子 (*pmi* 遺伝子) が導入されている。

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* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

mvip3A 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* AB88 株であり、*pmi* 遺伝子の供与体は *E. coli* K-12 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

mvip3A 遺伝子は mVip3A タンパク質を発現し、チョウ目害虫に対して殺虫活性を示す。また、*pmi* 遺伝子はマンノースリン酸イソメラーゼ (PMI タンパク質) を発現し、形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられた (参照 1)。挿入 DNA は、発現ベクター pNOV1300 を用いてアグロバクテリウム法により宿主に導入した。

2. 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシは、世界的に古くから食品として利用された歴史がある。今日、トウモロコシから食用油、コーンスターチ、コーングリッツ等が製造され、広く食品として利用・摂取されている (参照 2)。

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

トウモロコシ穀粒中の主要栄養組成（乾燥重量換算）は、タンパク質 6.0～17.3%、脂質 1.7～5.8%、総食物繊維 8.9～35.3%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.5%である（参照 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

トウモロコシ穀粒中の栄養阻害物質組成は、フェルラ酸 0.02～0.39%、p-クマル酸 0.003～0.058%、フルフラール 6.34ppm 以下、イノシトール 89～3,765ppm、フィチン酸 0.11～1.57%、ラフィノース 0.02～0.32%及びトリプシンインヒビター1.09～7.18TIU^a/mg である（参照 5）。

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 MIR162 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

トウモロコシ MIR162 の可食部位は、従来のトウモロコシと変わらない。

(3) 摂取量

トウモロコシ MIR162 の摂取量は、従来のトウモロコシと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

トウモロコシ MIR162 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

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 MIR162 は、*mvip3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の導入により、mVip3A タンパク質及び PMI 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 MIR162 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された。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

^a TIU : Trypsine Inhibitor Unit

トウモロコシ MIR162 は、導入された *mvip3A* 遺伝子が mVip3A タンパク質を発現することにより、チョウ目害虫の影響を受けずに成長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* subsp. *mays* (L.) Iltis) 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祖先についての決定的な説はないが、育種過程で近縁野生種であるブタモロコシから派生した説が有力とされている（参照 6）。トウモロコシはその後の新大陸の発見に伴い、アメリカ大陸からヨーロッパ、アジア及びアフリカへと普及し、現在、世界的に栽培されている（参照 7）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシには、有害と考えられるレベルの有害生理活性物質の産生は知られていない（参照 8）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシのアレルゲン性に関する報告はわずかであり、トウモロコシは主要な食物アレルゲンではないとされている（参照 9）。

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（参照 10）、これらのウイルス等はヒトに対して病原性を持つという報告はない。

6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは、世界的に古くから食品として利用された歴史がある。今日、トウモロコシから食用油、コーンスターチ、コーングリッツ等が製造され、広く食品として利用・摂取されている（参照 2）。

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、ブタモロコシ及びトリプサカム属があるが、いずれも野生種であり食用にされることはなく、また、これらについて有害生理活性物質の報告もない（参照 6, 11）。

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

トウモロコシMIR162の作出に使用した発現ベクターpNOV1300の構築には、プラスミド pSB12 を用いた。

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 pSB12 の全塩基数は 6,330bp であり、その塩基配列は明らかとなっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pSB12 の制限酵素切断地図は明らかとなっている。

(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 pSB12 の塩基配列は明らかにされており、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 pSB12 には、*E. coli* 由来の *spec(aadA)* 遺伝子が含まれている。この遺伝子によって、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに対する耐性が付与される（参照 12）。なお、*spec* 遺伝子は、宿主ゲノムには挿入されていない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pSB12 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

mvip3A 遺伝子の由来は、*B. thuringiensis* AB88 株由来の *vip3Aa1* 遺伝子（参照 13）であり、*pmi* 遺伝子の由来は、*E. coli* K-12 株由来の *manA* 遺伝子（参照 14）である。

(2) 安全性に関する事項

mvip3A 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* AB88 株が属する *B. thuringiensis* は、微生物農薬の基材として長期に利用されており、ヒトや動物に対する病原性は報告されていない。

pmi 遺伝子の供与体である *E. coli* は、自然界やヒトの消化器官に広く存在していることが知られており、これまでヒトは食物を通じて間接的に摂取している。また *E. coli* K-12 株にはヒトに影響を与えるような量の毒性物質を生産する能力はないことが報告されていることから（参照 15）、ヒトや動物に対して病原性を持たないと考えられる。

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

mvip3A 遺伝子は、*B. thuringiensis* AB88 株からクローニングされた *vip3Aa1* 遺伝子（参照 13）の塩基配列に基づき、発現するタンパク質のアミノ酸配列を改変せずに、宿主のトウモロコシでの発現が最適となるように GC 含量を高め、人工合成した遺伝子である。

pmi 遺伝子は、*E. coli* K-12 株からクローニングされたマンノースリン酸イソメラーゼを発現する *manA* 遺伝子である（参照 14）。

挿入 DNA は表のとおりである。

（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 DNA 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

・ *mvip3A* 遺伝子

mvip3A 遺伝子がコードする mVip3A タンパク質は、*B. thuringiensis* AB88 株において見出された殺虫性タンパク質である（参照 13）。*B. thuringiensis* が産生する殺虫活性タンパク質として知られている Cry タンパク質は、芽胞形成期に産生され、細胞内に存在する結晶タンパク質であるのに対し、Vip3A タンパク質は、*B. thuringiensis* の芽胞形成期及び栄養生長期に産生され、細胞外に分泌される可溶性タンパク質である（参照 14）。この Vip3A タンパク質がチョウ目昆虫の幼虫に摂取されて消化されると、コアタンパク質を生じ、このタンパク質が腸管に作用して殺虫活性を示すことが報告されている（参照 13）。

なお、*mvip3A* 遺伝子を導入する際に塩基置換が起こったため、トウモロコシ MIR162 で実際に発現する mVip3A タンパク質は導入する前の *mvip3A* 遺伝子がコードするタンパク質とアミノ酸が 1 つ異なっている。

トウモロコシ MIR162 で発現する mVip3A 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について確認するために、NCBI データベースを用いて blastp 検索を行ったところ、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 16）。

また、*E. coli* で発現させた mVip3A タンパク質を用いて CD-1 系マウス（雌雄各 5 匹）における急性毒性試験（投与量：1,250mg/kg 体重）を行った結果、投与に関連した異常は認められなかった（参照 17 及び第 7）。さらに哺乳動物細胞に対する細胞毒性試験を、ヒト結腸がん由来の Caco-2 細胞及びマウス線維芽細胞由来の 3T3 細胞を用いて行った結果、細胞に対する毒性影響は認められなかった（参照 18,19 及び第 7）。

・ *pmi* 遺伝子

pmi 遺伝子がコードする PMI タンパク質は、トウモロコシ MIR162 の作出において形質転換体の選択マーカーとして用いられている（参照 20）。トウモロコシを含む多くの植物細胞は、マンノースを炭素源として利用して生育することはできないが、*pmi* 遺伝子の導入によって PMI タンパク質を産生し、マンノースを生育に利用可能なフルクトース-6-リン酸に変換することができることから、マンノースを培地に添加することによって、形質転換体の選抜が可能となる。

PMI 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について確認するために、NCBI データベースを用いて *blastp* 検索を行ったところ、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 21）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

発現ベクター pNOV1300 には、選抜・維持のために抗生物質耐性マーカー遺伝子として *spec* 遺伝子が組み込まれているが、トウモロコシ MIR162 には導入されていないことが確認されている（参照 22）。

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

mvip3A 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来のプロモーターである（参照 23）。

(2) ターミネーターに関する事項

mvip3A 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 ターミネーターである（参照 24）。

pmi 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリンシンターゼ遺伝子由来のターミネーターである（参照 25）。

(3) その他

mvip3A 遺伝子発現カセットには、発現量を高めるためにトウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9 配列が挿入されている（参照 26）。

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 pSB12 に *pmi* 遺伝子発現カセットを導入し、次いで *mvip3A* 遺伝子発現カセットを導入することにより、発現ベクター pNOV1300 を得た（参照 27）。

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
 発現ベクターpNOV1300の塩基数は14,405bpであり、その塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかとなっている。
- (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
 発現ベクターpNOV1300のT-DNA領域に、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(参照22)。
- (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
 発現ベクターpNOV1300のT-DNA領域をアグロバクテリウム法により宿主に導入した。
- (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
 発現ベクターpNOV1300は、そのT-DNAの外骨格領域に選択マーカー遺伝子として *spec* 遺伝子を有しており、ベクターの選抜及び増殖を通じて純化されている。

表 トウモロコシMIR162への挿入DNA

<i>mvip3A</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiInt プロモーター	プロモーター領域(遺伝子の転写に必要な配列) トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来のプロモーター
<i>mvip3A</i>	<i>B. thuringiensis</i> AB88株由来のmVip3Aタンパク質をコードする遺伝子
iPEPC9	(遺伝子産物の発現量を高めるための配列) トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9配列
35S ターミネーター	ターミネーター領域(遺伝子の発現を終結させるための配列) 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
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiInt プロモーター	プロモーター領域(遺伝子の転写に必要な配列) トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来のプロモーター
<i>pmi</i>	<i>E. coli</i> K-12株由来のPMIタンパク質をコードする遺伝子
NOS ターミネーター	ターミネーター領域(遺伝子の発現を終結させるための配列) <i>R. radiobacter</i> のノパリンシンターゼ遺伝子由来のターミネーター

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

mvip3A 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットを、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入した後、マンノースを添加した培地で選抜して再生個体を得た。得られた個体について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の存在を確認した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスにしたがって、既存の優良トウモロコシ自殖系統との戻し交配あるいは自殖を行い、トウモロコシ MIR162 を得た。

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 MIR162 のゲノムに挿入された *mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットのコピー数及び完全性を確認するため、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 22)。

発現ベクター pNOV1300 の外骨格領域が導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、外骨格領域は導入されていないことが確認された (参照 22)。

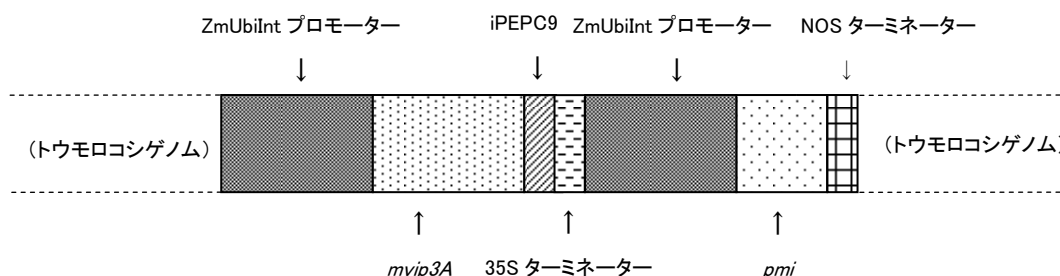
トウモロコシ MIR162 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、発現ベクター pNOV1300 の T-DNA 領域と比較した結果、5'末端側の 27bp 及び 3'末端側の 57bp の欠損並びに *mvip3A* 遺伝子領域の 2 箇所に塩基置換が確認された。なお、この塩基置換によってコードする mVip3A タンパク質の 129 番目アミノ酸がメチオニンからイソロイシンに置換されることが確認されたが、遺伝子発現カセットのその他の DNA は完全に一致することが確認された (参照 22)。

挿入遺伝子の近傍配列がトウモロコシ由来であることを確認するため、5'末端近傍配列 (1,000bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000bp) の塩基配列を決定し、宿主ゲノムの塩基配列と比較した。その結果、遺伝子の挿入に伴う 58bp の欠失を除き、挿入遺伝子の近傍配列と宿主のゲノムの塩基配列は一致していたことから、挿入遺伝子の近傍配列はトウモロコシゲノム由来であることが確認された (参照 22)。

遺伝子挿入によりトウモロコシの内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5'末端近傍配列 (1,000bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000bp) について、公的に利用できる核酸データベース (GenBank、RefSeq Nucleotides、EMBL、DDBJ 及び PDB) を用いた blastn 検索を行った。その結果、5'末端近傍配列において、*Dissociation1* 関連転移エレメント (*Ds1* エレメント) との相同性が認められたが、挿入遺伝子の 5'末端から 500bp 以上離れているため、*Ds1* エレメントが転移したとしても、挿入遺伝子に影響を与える可能性は著しく低いと考えられた。一方、3'末端近傍配列において、トウモロコシのシクロフィリン遺伝子を含む配列と相同性が認められたが、相同性が認められた配列はシクロフィリン遺伝子のコード領域でないこと、5'末端近傍配列とシク

ロフィリン遺伝子を含む配列との相同性は認められなかったことから、遺伝子挿入によってシクロフィリン遺伝子が損なわれていないと考えられた(参照 22)。

・組換えトウモロコシ「トウモロコシ MIR162」に挿入された DNA (模式図)



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

挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (1,000bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000bp) 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、InforMax の Vector NTI (version 9.0) ソフトウェアを用いて、6つの読み枠において連続する 50 アミノ酸以上の ORF について分析した。その結果、ORF は生じていないことが確認された (参照 22)。

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

米国の 2 箇所の圃場から採取したトウモロコシ MIR162 の葉、根、穀粒及び全植物体における mVip3A タンパク質及び PMI タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。結果は次表のとおりである (参照 28)。

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

分析組織*	mVIP タンパク質	PMI タンパク質
葉	13.88~148.21	検出限界以下~12.85
根	12.57~33.33	0.76~4.97
全植物体	25.05~93.52	1.92~8.99
穀粒	33.57~45.72	0.69~2.23

* 葉、根及び全植物体は生育期から収穫期、穀粒は成熟期から収穫期の値を示した。

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 1 人が 1 日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 0.5g (参照 29) をすべてトウモロコシ MIR162 に置き換えて mVip3A タンパク質及び PMI タンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ 22.86 μg 及び 1.12 μg となり、1 人 1 日当たりのタンパク質摂取量 70.8g (参照 29) に占める割合はそれぞれ 3.2×10^{-7} 及び 2.0×10^{-8} となる。したがって、一日蛋白摂取量の有意な量

を占めることはないと判断される。

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

mvip3A 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* AB88 株及び *pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* K-12 株は共に細菌であり、これまで細菌にアレルギー誘発性があるとは考えられていない（参照 30, 31）。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

mVip3A タンパク質及び PMI タンパク質に関してアレルギー誘発性の報告はない。

(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

・ mVip3A タンパク質

E. coli で発現させた mVip3A タンパク質の人工胃液中における消化性を SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行った結果、いずれの方法においても試験開始後 1 分以内に消化された（参照 32）。

・ PMI タンパク質

E. coli で発現させた PMI タンパク質の人工胃液中における消化性を SDS-PAGE 分析により分析を行った結果、10000 分の 1 のペプシン濃度で、10 分以内に消化された（参照 33）。

② 人工腸液に対する感受性

・ mVip3A タンパク質

E. coli で発現させた mVip3A タンパク質の人工腸液中における消化性を SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行った結果、いずれの方法においても試験開始後 5 分以内にポリペプチド断片に分解され、それ以上の消化が進まないことが確認された（参照 34）。

・ PMI タンパク質

E. coli で発現させた PMI タンパク質の人工腸液中における消化性を SDS-PAGE 法により分析を行った。その結果、10 分の 1 のパンクレアチン濃度では、試験開始後 30 分以内に消化された（参照 35）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた mVip3A タンパク質及び PMI タンパク質の加熱処理に対する感受性について、ELISA 法により分析した。その結果、mVip3A タンパク質は、150℃、30 分間の加熱で、PMI タンパク質は、95℃、30 分間の加熱で免疫反応性が失われることが確認された（参照 36）。

(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
トウモロコシ MIR162 で発現する mVip3A タンパク質及び PMI タンパク質について、アレルゲンとの構造相同性を確認するために、Syngenta Biotechnology, Inc. (SBI) Allergen Database^bを用いて相同性検索を行った。その結果、80 残基以上のアミノ酸について 35%以上の相同性を有するアミノ酸配列は見いだされなかった（参照 37, 38）。

また、アミノ酸配列中の抗原決定基の存在を確認するために、SBI Allergen Database を用いて、連続する 8 つのアミノ酸の相同性検索を行った。その結果、PMI タンパク質と相同性を有する *Rana species* CH2001（カエル的一种）由来の α -パルブアルブミンが検索された（参照 37, 38）。

(5) 遺伝子産物（タンパク質）の IgE 結合能の検討

PMI タンパク質と *Rana species* CH2001 由来の α -パルブアルブミン感受性患者の血清 IgE との結合能の検討を行った結果、交叉反応は認められなかった（参照 38）。

上記、(1)～(5)及び前項 3 から総合的に判断し、mVip3A タンパク質及び PMI 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 MIR162 における挿入遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のトウモロコシ MIR162 について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の期待分離比と実測値を比較した。その結果、挿入遺伝子は、メンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝していることが示された（参照 22）。

また、後代における挿入遺伝子の安定性を確認するために、3 世代のゲノム DNA についてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において共通のバンドが確認された（参照 22）。

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

mVip3A タンパク質は、酵素活性を持たず、宿主の代謝系と独立して機能している。また、PMI タンパク質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する触媒酵素タンパク質であり、その反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で、他の天然基質は知られていない（参照 39）。

これらのことから、両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

^b GenPept, PIR あるいは SWISS-PROT protein databases においてアレルゲンあるいは推定アレルゲンと定義されているタンパク質、SWISS-PROT Allergen database (2001)、International Union of Immunological Societies(2001)、FARRP Allergen database (2001)及びこれらのデータベース以外で推定アレルゲンと定義されているタンパク質を科学文献検索から抽出し構築したデータベース（登録件数は 1,735 件）。

めて低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

2005年に米国の6カ所の圃場で栽培されたトウモロコシMIR162と非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、ミネラル、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、2次代謝物及び栄養阻害物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照5）。

(1) 主要構成成分

穀粒及び茎葉の主要構成成分（水分、タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、総食物繊維、デンプン）について分析したところ、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一般の商業トウモロコシ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(2) ミネラル成分

穀粒及び茎葉のミネラル成分（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、セレン、ナトリウム、亜鉛）について分析したところ、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一般の商業トウモロコシ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(3) ビタミン類

穀粒のビタミン類（ β -カロテン、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ナイアシン、ビタミンB₆、葉酸、 α -トコフェロール）について分析したところ、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一般の商業トウモロコシ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(4) アミノ酸組成

穀粒のアミノ酸18種類について分析したところ、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。

(5) 脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸（パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸）について分析したところ、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一般の商業トウモロコシ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(6) 2次代謝産物及び栄養阻害物質

穀粒の2次代謝物及び栄養阻害物質（フェルラ酸、p-クマル酸、イノシトール、フィチン酸、トリプシンインヒビター、フルフラール、ラフィノース）について分析したところ、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一般の商業トウモロコシ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

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を行い、2007年8月に問題がないことが確認された。米国農務省（USDA）に対しては2007年9月に無規制裁培のための申請を行った。米国環境保護庁（EPA）に対してはPMIタンパク質の許容値設定免除の申請を行い、2004年5月に承認を得た。また、2007年5月にmVip3Aタンパク質の許容値設定の免除の申請を行った。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対して食品としての安全性審査の申請を行い、2009年2月に確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシMIR162の栽培方法については、従来のトウモロコシと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシMIR162の種子の製法及び管理方法については、従来のトウモロコシと同じである。

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5の2（3）に係る安全性の確認のために、mVip3Aタンパク質の急性毒性試験及び細胞毒性試験の確認を行った。

- ・ mVip3Aタンパク質の急性毒性試験（参照17）

CD-1系マウス（雌雄各5匹）に*E. coli*で発現させたmVip3Aタンパク質を1,250mg/kg体重の用量で単回強制経口投与し、15日目に剖検を行った。その結果、血液検査、血液生化学検査、組織重量及び組織病理学検査において、被験物質の投与に関連した異常は認められなかった。

- ・ mVip3Aタンパク質の細胞毒性試験（参照1819）

ヒト結腸がん由来のCaco-2細胞及びマウス線維芽細胞由来の3T3細胞に*E. coli*で発現させたmVip3Aタンパク質を1ng/ml～10µg/mlの濃度で暴露し、乳酸脱水素酵素活性及びニュートラルレッドの取り込み量を測定した。その結果、細胞に対する毒性影響は認められなかった。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMIR162系統」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ものと判断した。

<参照>

- 1 Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A. R. Wenck and G. Hansen. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.* 2000, 19, 798-803.
- 2 菊池一徳. トウモロコシの生産と利用. 光琳. 1987.
- 3 OECD. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Publication No.6, 2002. ENV/JM/MONO (2002) 25.
- 4 ILSI. Crop Composition Database Version 3.0. International Life Sciences Institute, 2006. <http://www.cropcomposition.org>.
- 5 Compositional Analysis of Grain and Forage Derived from Event MIR162 Hybrid Maize Grown During 2005 in the USA. (社内報告書)
- 6 Galinat, W. C. "The origin of corn". *Corn and corn improvement*. Agronomy Monographs No.18, G. F Sprague and J. W. Dudley, Eds. Madison, Wisconsin, American Society of Agronomy, 1998, 1-31.
- 7 野口弥吉, 川田信一郎監修. 農学大事典. 養賢堂. 1994.
- 8 White, P. J. and L. M. Pollak. Corn as a food source in the United States: Part II Processes, Products, Composition and Nutritive values. *Cereal Foods World.* 1995, 40, 756-762.
- 9 Frisner, H., A. Rosendal, and V. Barkholt. Identification of immunogenic maize proteins in a casein hydrolysate formula. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2000, 11, 106-110.
- 10 OECD. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27, 2003, Env/JM/MONO(2003)11.
- 11 Watson, S.A. "Structure and Composition". *Corn: Chemistry and Technology*. S. A. Watson and P.E. Ranstead eds. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. 1987.
- 12 Fling, M. E., J. Kopf and C. Richards. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 1985, 13, 7095-7106.
- 13 Estrush, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996, 91, 5389-5394.
- 14 Miles, J. S. and J. R. Guest. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene.* 1984, 32, 41-48.
- 15 US EPA. *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment. 1997,

- http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm
- 16 Vip3Aa20: Assessment of Amino Acid Sequence homology with Known Toxins. (社内報告書)
 - 17 MIR162VIP3A-0106 Single Dose Oral Toxicity Study In Mice AM7543 / Regulatory / Report. (社内報告書)
 - 18 Customized Screening Report Prepared for :Syngenta Crop Protection, Inc. T/O 09-6080 August 28, 2009. (社内報告書)
 - 19 Customized Screening Report Prepared for: Syngenta Crop Protection, Inc. T/O 09-6080 August 28, 2009. (社内報告書)
 - 20 Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A. R. Wenck and G. Hansen. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via Agrobacterium transformation. Plant Cell Rep. 2000, 19, 798-803.
 - 21 Phosphomannose Isomerase Protein: Assessment of Amino Acid Sequence homology with Known Toxins. (社内報告書) .
 - 22 Molecular characterization of the Transgenic DNA in Event MIR162 maize for Japan. (社内報告書)
 - 23 Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Mol. Biol. 1992, 18, 675-689.
 - 24 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. Cell. 1980, 21, 285-294.
 - 25 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman. Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. J. Molecular Applied Genetics. 1982, 1: 561-573.
 - 26 Hudspeth, R. L. and Guala, J. W. Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. Plant Mol. Biol. 1989, 12, 579-589.
 - 27 Description of the Plasmid Lineage Leading to the Final Plasmid Used in the Transformation Resulting in Event MIR162 Maize, pNOV1300. (社内報告書)
 - 28 Quantification of Vip3A20 and Phosphomannose Isomerase (PMI) in Tissues of Maize Derived from Transformation Event MIR162. (社内報告書)
 - 29 厚生労働省. 健康・栄養情報研究会. 平成 16 年国民健康・栄養調査報告. 第一出版. 2006.
 - 30 Taylor, S. L. and S. Hefle. Will genetically modified foods be allergenic? J. Allergy Clin. Immunol.. 2001, 107(5), 765-771.
 - 31 FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. January 22 – 25, 2001. Food and Agriculture Organization of

- the United Nations, Rome, Italy. 2001.
- 32 *In vitro* Digestibility of Vip3Aa20 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)
 - 33 *In vitro* Digestibility of PMI protein Under Stimulated Mammalian Gastric and Intestinal conditions. (社内報告書)
 - 34 *In vitro* Digestibility of Vip3Aa20 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 - 35 *In vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) from Test Substance PMI-0198 Under Diluted Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 - 36 Effect of Temperature on the Immunoreactivity of Vip3Aa20 Protein. (社内報告書)
 - 37 Vip3Aa20: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内報告書)
 - 38 Phosphomannose Isomerase (Entrez Accession Number AAA24109): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内報告書)
 - 39 Freeze, H. H. "Phosphomannose isomerase". Handbook of glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Eds, Springer-Verlag, Tokyo and New York. 2002, 595-599.