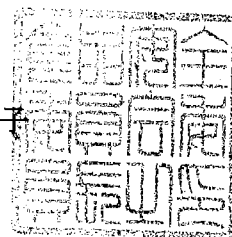




府食第600号  
平成24年6月21日

厚生労働大臣  
小宮山 洋子 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21年12月1日付け厚生労働省発食安1201第1号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた食品「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 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ワタ COT102 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と判断した。

# 遺伝子組換え食品等評価書

チヨウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統

2012年6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.....	7
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.....	8
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.....	14
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.....	16
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.....	16
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.....	18
<参照>.....	18

### <審議の経緯>

2009年12月1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1201第1号）、関係書類の接受
2009年12月3日	第312回食品安全委員会（要請事項説明）
2009年12月14日	第77回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年9月6日	第84回遺伝子組換え食品等専門調査会
2012年4月25日	第103回遺伝子組換え食品等専門調査会
2012年5月17日	第431回食品安全委員会（報告）
2012年5月17日から6月15日	国民からの御意見・情報の募集
2012年6月19日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長に報告
2012年6月21日	第436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>

2011年1月6日まで	2011年1月7日から
小泉直子（委員長）	小泉直子（委員長）
見上 彪（委員長代理）	熊谷 進（委員長代理*）
長尾 拓	長尾 拓
野村一正	野村一正
畑江敬子	畑江敬子
廣瀬雅雄	廣瀬雅雄
村田容常	村田容常

\*：2011年1月13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>

2011年9月30日まで	2011年10月1日から	
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）	
五十君静信	五十君静信	手島玲子
石見佳子	手島玲子	宇理須厚雄
海老澤元宏	中島春紫	橘田和美
小関良宏	飯 哲夫	児玉浩明
橘田和美	和久井信	澁谷直人
児玉浩明	山崎 壮	
	和久井信	

## 要 約

「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 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。

本系統は、*Bacillus thuringiensis* AB88 株に由来する改変 *vip3A* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Vip3A* タンパク質が発現することで、チョ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。なお、本系統には、選択マーカーとしてプラスミド pKC203 に由来するハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子が導入されている。

「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の比較の結果等について確認した結果、非組換えワタ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、「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統」については、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：チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統

性質：チョウ目害虫抵抗性

申請者：シンジェンタジャパン株式会社

開発者：Syngenta Seeds, Inc. (米国)

「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統」(以下「ワタ COT102」という。)は、*Bacillus thuringiensis* AB88 株に由来する改変 *vip3A* 遺伝子 (*mvip3A* 遺伝子) を導入して作出されており、改変 Vip3A タンパク質 (mVip3A タンパク質) が発現することで、チョウ目害虫による影響を受けずに生育することができるとされている。なお、ワタ COT102 には、選択マーカーとしてプラスミド pKC203 に由来するハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子 (*aph4* 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、アオイ科ワタ連ワタ属に属するワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の商業品種 Coker312 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 株である。また、*aph4* 遺伝子の供与体は、プラスミド pKC203 である。

##### (3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

*mvip3A* 遺伝子は、チョウ目害虫抵抗性を付与する mVip3A タンパク質を発現する。また、*aph4* 遺伝子は形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられ、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素 (APH4 タンパク質) を発現する (参照 1, 2, 3)。

*mvip3A* 遺伝子及び *aph4* 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

ワタの種子から搾油した綿実油及びリンター (綿毛を採取した後に種子の表面に残る地毛) を加工して得られたセルロースが食用に利用されている (参照 4)。

#### 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

ワタ種子の主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 11.7～34.2%、総脂質 9.2～36.3%、灰分 3.2～6.2%、炭水化物 23.0～74.4%及び総食物繊維 5.77～74.5%である（参照 4, 5）。

(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

ワタは、ゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸（ステルクリン酸、マルバリン酸及びジヒドロステルクリン酸）を含有しており、これらの含有量は、総ゴシポール 0.46～1.99%（対乾燥重量）、遊離ゴシポール 0.23～1.39%（対乾燥重量）、ステルクリン酸 0.13～0.70%（総脂質中）、マルバリン酸 0.17～0.66%（総脂質中）、ジヒドロステルクリン酸 0.11～0.50%（総脂質中）である（参照 4, 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

ワタ COT102 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来ワタと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

ワタ COT102 の摂取部位は、従来ワタと変わらない。

(3) 摂取量

ワタ COT102 の摂取量は、従来ワタと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ワタ COT102 の調理及び加工方法は、従来ワタと変わらない。

#### 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

ワタ COT102 は、*mvip3A* 遺伝子及び *aph4* 遺伝子の導入によって、mVip3A タンパク質及び APH4 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、ワタ COT102 の安全性評価においては、既存ワタ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

ワタ COT102 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ってチョウ目害虫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、アオイ科ワタ連ワタ属に属するワタ（*G. hirsutum* L.）の商業品種 Coker312 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

ワタ属に属する種のうち、栽培種は *G. hirsutum*、*G. barbadense*、*G. herbaceum* 及び *G. arboreum* の4種である。*G. hirsutum* の原産地は中央アメリカで、紀元前 3,500~2,300 年にはメキシコで既に栽培が行われていたと考えられている。

#### 3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタ種子は、ゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸を含有している（参照 4, 5）。

#### 4. アレルギー誘発性に関する事項

ワタは、種子から搾油した綿実油やリンター（地毛）を加工して得られたセルロースが食用に用いられており、いずれもタンパク質を含まないため、ワタがアレルギー誘発性食品とは考えられていない。

#### 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

ワタには、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という報告はない。

#### 6. 安全な摂取に関する事項

ワタに含有しているゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸は、綿実油の搾油・精製工程で除去されるか、著しく減少することが知られている。

#### 7. 近縁の植物種に関する事項

ワタ属に属するすべての種でゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸を産生していると考えられている。

### 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 pCOT1 の作製には、プラスミド pHiNK078 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 pHiNK078 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 pHiNK078 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 pHiNK078 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 pHiNK078 には、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して耐性を付与する *spec (aadA)* 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 pHiNK078 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* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* AB88 株である。また、*aph4* 遺伝子の供与体は、プラスミド pKC203 (参照 1, 2, 3) 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年にわたり安全に利用されており、ヒトや動物に対する病原性は報告されていない。

### 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、植物体内での発現が最適となるように GC 含量を高め、人工合成された遺伝子である。

*aph4* 遺伝子は、プラスミド pKC203 からクローニングされた遺伝子である。挿入 DNA 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

*mvip3A* 遺伝子及び *aph4* 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

#### ・ *mvip3A* 遺伝子

*mvip3A* 遺伝子が発現する mVip3A タンパク質は、殺虫性タンパク質である(参照 6)。*B. thuringiensis* が産生する殺虫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 6)。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 7)。

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を確認するために、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 8)。

#### ・ *aph4* 遺伝子

*aph4* 遺伝子は、ワタ COT102 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た。*aph4* 遺伝子が発現する APH4 タンパク質は、アミノシクリトール系抗生物質であるハイグロマイシン B の 4-ヒドロキシル基のリン酸化を触媒することによって、ハイグロマイシン B を不活化させる(参照 9) ことから、ハイグロマイシン B 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。

APH4 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 データベースを用いて 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 10)。

*Escherichia coli* で発現させた APH4 タンパク質を用いて CD-1 系マウス(1 群雌雄各 5 匹)における急性毒性試験(投与量: 1,828mg/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 11)。

### (4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

#### ・ *aph4* 遺伝子

ワタ COT102 に導入された *aph4* 遺伝子が発現する APH4 タンパク質は、ハイグロマイシン B 及び構造が類似しているハイグロマイシン B2、デストマイシン A 並びにデストマイシン B を不活化するが、ネオマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、スペクチノマイシン、トブラマイシン及びアミカシンを含めた他のアミノシクリトール系抗生物質又はアミノグリコシド系抗生物質を不活化しないことが示されている(参照 3, 12)。なお、APH4 タンパク質が不活化させる上記 4 つの抗生物質のうち、現在、我が国においてヒトの医薬品として利用されているものはない(参照 13)。

欧州食品安全機関(EFSA)では、*aph4* 遺伝子の利用を規制又は制限する必要はないとの見解を示している(参照 14)。また、オーストラリア政府 保健・高齢化省遺伝子技術規制局(OGTR)では、*aph4* 遺伝子やハイグロマイシン抵

抗性を付与する他の遺伝子を有する細菌は、既にヒトの消化器官を含め、自然環境に広く存在していることから、仮にワタ COT102 に導入された *aph4* 遺伝子が水平移行したとしても何らかのリスクが生じる可能性は考えにくいとの見解を示している（参照 15）。

以上のことから、*aph4* 遺伝子がワタ COT102 からヒトの腸内細菌へ水平移行すること及び APH4 タンパク質がヒトで利用されている抗生物質を不活化することによってヒトの健康に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

・ *aadA* 遺伝子

導入用プラスミド pCOT1 の外骨格領域には、*aadA* 遺伝子が含まれているが、ワタ COT102 には挿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

*mvip3A* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、シロイヌナズナ のアクチン 2 遺伝子由来のイントロンを含むプロモーター領域 (Act2 プロモーター) である (参照 16)。

*aph4* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、シロイヌナズナのユビキチン 3 遺伝子由来の第 1 イントロンを含むプロモーター領域 (Ubc3 プロモーター) である (参照 17)。

(2) ターミネーターに関する事項

*mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 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ポリアデニル化シグナルを含む配列 (NOS ターミネーター) である (参照 18)。

(3) その他

プロモーター及びターミネーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は用いられていない。

### 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 pHiNK078 の T-DNA 領域に *mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 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 pCOT1 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 pCOT1 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 pCOT1 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。

(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

意図する挿入領域は、導入用プラスミド pCOT1 の右側領域 (RB) から左側領域 (LB) 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 pCOT1 は、外骨格領域に選択マーカー遺伝子である *aadA* 遺伝子を有しており、プラスミドの選抜及び増殖を通じて純化されている。

表 1 ワタ COT102 への挿入 DNA

構成 DNA	機能及び由来
RB	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA の右側境界配列
<i>mvip3A</i> 遺伝子発現カセット	
Act2 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) シロイヌナズナのアクチン 2 遺伝子由来のイントロンを含むプロモーター領域
<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
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> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリンシンターゼ遺伝子由来のポリアデニル化シグナルを含む配列
<i>aph4</i> 遺伝子発現カセット	
Ubq3 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) シロイヌナズナのユビキチン 3 遺伝子由来の第 1 イントロンを含むプロモーター
<i>aph4</i>	プラスミド pKC203 由来の APH4 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> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリンシンターゼ遺伝子由来のポリアデニル化シグナルを含む配列

LB	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA 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

*mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 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、ハイグロマイシンを添加した培地で選抜し、再生個体が得られた。得られた再生個体について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の存在を確認した後、既存の優良品種との戻し交配又は自殖を行い、ワタ COT102 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

ワタ COT102 のゲノムに挿入された *mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、*mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 遺伝子発現カセットがそれぞれ 1 コピー挿入されていることが確認された (参照 19)。

導入用プラスミド pCOT1 の外骨格領域がワタ COT102 のゲノムに挿入されていないことを確認するためにサザンブロット分析を行った結果、挿入されていないことが確認された (参照 19)。

ワタ COT102 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pCOT1 の T-DNA 領域の塩基配列と比較した結果、RB の 19 bp 及び LB の 24 bp の欠損を除き塩基配列は一致していることが確認された (参照 19)。

ワタ COT102 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に、5'末端近傍配列 (1,000 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000 bp) 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、82 bp の欠損及び 3'末端近傍配列に DNA 断片 (690 bp) の挿入を除き宿主ゲノムの塩基配列と一致していることが確認された (参照 19)。

この 690 bp の DNA 断片の由来について確認するために、ワタ属のゲノム配列データベース (cottondb.org) を用いて相同性検索を行った結果、ワタのゲノム配列と高い相同性が認められたが、導入用プラスミド pCOT1 の T-DNA 領域及び外骨格領域とは相同性が認められなかった (参照 19)。また、この DNA 断片にコードされているタンパク質の有無を確認するために、公的に利用できるデータベース (NCBI) を用いて blastx 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見いだされなかった (参照 19)。したがって、この DNA 断片からタンパク質が発現したとしても、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

ワタ COT102 のゲノムに 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ことを確認するために、5'末端近傍配列 (1,000 bp) 及び隣接する挿入 DNA 領域 (90 bp) 並びに新たに確認された DNA 断片を含む 3'

末端近傍配列（1,000 bp）及び隣接する挿入 DNA 領域（90 bp）について、公的に利用できるデータベース（NCBI）を用いて blastx 検索を行った結果、相同性を示す既知の宿主由来のタンパク質は見いだされなかった（参照 19）。したがって、DNA の挿入によって宿主の既知の内在性遺伝子が損なわれていないと考えられる。

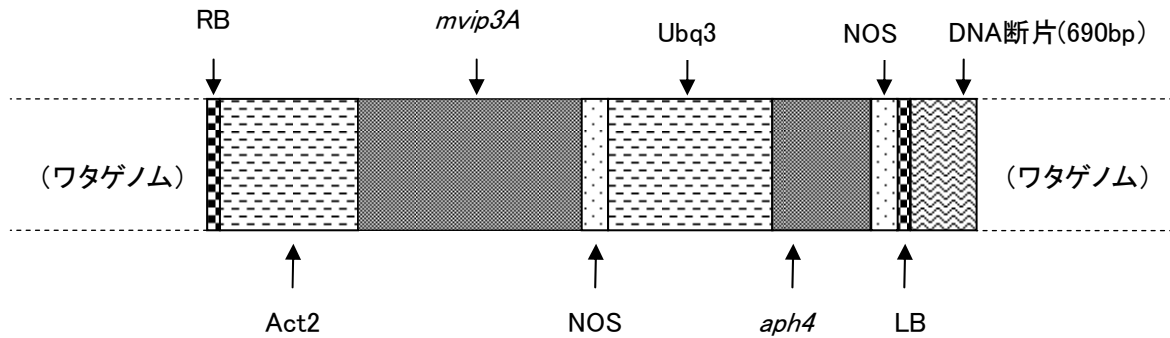


図1 ワタ COT102 に挿入された DNA (模式図)

(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

ワタ COT102 の挿入 DNA 領域（90 bp）と隣接する 5'末端近傍配列（1,000 bp）との接合部及び挿入 DNA 領域（90 bp）と隣接する 3'末端近傍配列（1,000 bp）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 ORF 検索を行った。その結果、30 アミノ酸以上の ORF が 5 個見いだされた（参照 19）。

5 個の ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、NCBI データベースを用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見いだされなかった（参照 19）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、Food Allergy Research and Resource program (FARRP) を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 19）。なお、見いだされた ORF はすべて 80 アミノ酸以下であったため、80 アミノ酸以上のアレルゲンについて 35%以上の相同性を確認するための検索は行われなかった。

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

ワタ COT102 の葉、花蕾、さく、植物全体及び種子における mVip3A タンパク質及び APH4 タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析を行った。結果は表 2 のとおりである（参照 20）。

表2 ワタ COT102 における mVip3A タンパク質及び APH4 タンパク質の  
発現量 (単位は $\mu\text{g/g}$  乾燥重)

分析組織*1	mVip3A タンパク質	APH4 タンパク質
葉	1.21~135.60	定量限界以下*3
花蕾	定量限界以下*2~23.69	定量限界以下
さく	定量限界以下~1.36	定量限界以下
全植物体	0.82~81.81	定量限界以下
種子	2.33~3.65	定量限界以下

\*1 葉及び全植物体は 4 葉期から収穫直前、花蕾は開花始めから収穫直前、さく及び種子は収穫直前の値を示した。

\*2 定量限界は  $0.30 \mu\text{g/g}$  乾燥重。

\*3 定量限界は  $0.15 \mu\text{g/g}$  乾燥重。

### 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

ワタは主として綿実油として摂取されるが、一般に食用油に検出可能な量のタンパク質が含まれることはなく、精製した綿実油中のタンパク質含有量は検出限界値以下であることが示されている (参照 21)。したがって、ワタ COT102 由来の綿実油に含まれる mVip3A タンパク質及び APH4 タンパク質は、ほとんどヒトに摂取されることはなく、その摂取量は無視できるレベルであると考えられる。

### 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

*mvip3A* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* AB88 株は細菌であり、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 22, 23)。

#### (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 APH4 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 24)。

##### ・ APH4 タンパク質

*E. coli* で発現させた APH4 タンパク質の人工胃液中における消化性について



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。その結果、SDS-PAGE 分析においては、試験開始後 1 分以内に約 3 kDa のポリペプチド断片に分解され、その後徐々に消化されると考えられた。また、ウェスタンブロット分析においては、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 25）。

## 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 5 分以内に複数の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 26）。

### ・ APH4 タンパク質

*E. coli* で発現させた APH4 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 5 分以内に消化されることが確認された（参照 27）。

## 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 APH4 タンパク質の加熱処理に対する感受性について確認するために、ELISA 法を用いて分析を行った。その結果、mVip3A タンパク質は、65°C、30 分の加熱で免疫反応性が 1/3 程度にまで減少し、150°C、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 28）。APH4 タンパク質は、95°C、30 分間の加熱までは変化がなく、170°C、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 29）。

## (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

mVip3A タンパク質及び APH4 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に、FARRP 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は見いだされなかった（参照 30, 31）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、FARRP を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 30, 31）。

上記、(1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、mVip3A タンパク質及び APH4 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が確認された。

## 5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

ワタ COT102 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のワタ COT102 について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の期待分離比と実測分離比を比較した。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 19）。

また、ワタ COT102 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、4 世代のワタ COT102 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確認された（参照 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

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。したがって、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る。

また、APH4 タンパク質は基質特異性が高く、ハイグロマイシン B 及びハイグロマイシン B と構造が類似しているハイグロマイシン B2、デストマイシン A 及びデストマイシン B のみを不活化することが示されている（参照 3, 12）。また、植物には APH4 タンパク質の基質となり得る物質が存在することは知られていない。したがって、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る。

## 7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたワタ COT102 と宿主である非組換えワタの種子の主要構成成分、ミネラル類、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成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 32）。

### (1) 主要構成成分

水分、タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、粗繊維、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び総食物繊維について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められなかった。

### (2) ミネラル類

ミネラル 9 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタ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ワタ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

ビタミン E ( $\alpha$ -トコフェロール) について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められなかった。

### (4) アミノ酸組成

アミノ酸 18 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタと

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一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

#### (5) 脂肪酸組成

脂肪酸 9 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められなかった。

#### (6) 有害生理活性物質

総ゴシポール、遊離ゴシポール、ステルクリン酸、マルバリン酸及びジヒドロステルクリン酸について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められなかった。

### 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) に対する食品としての安全性審査の申請が行われ、2005 年 7 月に安全性が確認された。また、米国農務省 (USDA) に対する無規制裁培の承認申請が行われ、2005 年 7 月に承認された。さらに、米国環境保護庁 (EPA) に対する mVip3A タンパク質の許容値設定免除の申請が行われ、2008 年 6 月に承認された。

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が行われ、2011 年 4 月に安全性が確認された。また、カナダ食品検査庁 (CFIA) に対する環境・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2011 年 3 月に安全性が確認された。

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) に対する食品としての安全性審査の申請が行われ、2005 年 2 月に承認された。

### 9. 栽培方法に関する事項

ワタ COT102 の栽培方法は、従来ワタと同じである。

### 10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ワタ COT102 の種子の製法及び管理方法は、従来ワタと同じである。

## 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、APH4 タンパク質の急性毒性試験の確認を行った。

CD-1 系マウス (1 群雌雄各 5 匹) に *E. coli* で発現させた APH4 タンパク質を 1,828 mg/kg 体重の用量で投与し、その後 14 日間観察した。その結果、臨床観察、体重、摂餌量、剖検及び病理組織学的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 (参照 11)。

### Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 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と判断した。

#### <参照>

- 1 Waldron, C. Selectable marker for development of vectors and transformation systems in plants. U. S. Patent 5, 668, 298, 1997-09-16.
- 2 Kaster, K.R., Burgett, S.G., Rao, R.N., and Ingolia, T.D. (1983) Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 1983, 11, p.6895-6911.
- 3 Rao, R.N., Allen, N.E., Hobbs, Jr., J.N., Alborn, Jr., W.E., Kirst, H.A. Paschal, J.W. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983, 24, p.689-695.
- 4 Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. Paris, 2004-08-16, Environment Directorate, Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 32p, (Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 11). With 2009 correction.
- 5 ILSI. Crop Composition Database. Version 3.0, International Life Sciences Institute, 2006, <http://www.cropcomposition.org>.
- 6 Estruch, 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, 93, p5389-5394.
- 7 Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. Chen, J.-S. The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin. *Appl Environ Microbiol.* 2003, 69, 4648-4657.
- 8 Vip3Aa19 (Entrez Database Accession No. ABG20428): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社内報告書)
- 9 Pardo, J.M., Malpartida, F., Rico, M. Jimenez, A. Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygrosopicus* – the producing organism. *J. Gen. Microbiol.* 1985, 131, p.1289-1298.
- 10 APH4 (Entrez Database Accession No. CAA85741): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社内報告書)
- 11 ACUTE ORAL TOXICITY OF APH4 PROTEIN IN THE MOUSE. (社内報告書)

- 12 EPA, Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food, Federal Register, 2004, 68, p.34959-34962.
- 13 厚生労働省保健局 . 薬剤分類情報閲覧システム . <http://www.iryohoken.go.jp/shinryohoshu/yakuzaiMenu/>, (accessed 2008-01-28).
- 14 EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (Question N EFSA-Q-2003-109). The EFSA Journal. 2004, 48, p.1-18
- 15 Office of the Gene Technology Regulator (OGTR), Australian Government Department of Health and Ageing. Risk Assessment and Risk Management Plan: Application for license for dealings involving intentional release of a genetically modified organism into the environment: DIR034/2003. Title: Field Trial of Genetically Modified Cotton (*Gossypium hirsutum*) Expressing an Insecticidal Gene (vip3A). applicant: Syngenta Seeds Pty Ltd, 2003-10-15
- 16 An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S. Meagher, R.B. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. Plant J. 1996, 10, p.107-121.
- 17 Norris, S.R, Meyer, S.E. Callis, J. The intron of Arabidopsis thaliana polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. Plant Mol Biol. 1993, 21, p.895-906.
- 18 Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982, 1, p.561-573.
- 19 Molecular Characterization of Transgenic DNA in Event COT102 Cotton for Japan. (社内報告書)
- 20 Quantification of VIP3A and APH4 Proteins in Cotton Tissues and Whole Plants Derived from Transformation Event “COT102” . (社内報告書)
- 21 Monsanto Company. “Safety Assessment of Bollgard® Cotton Event 531”. 2002, [http://www.monsanto.com/pdf/products/bollgard\\_pss.pdf](http://www.monsanto.com/pdf/products/bollgard_pss.pdf).
- 22 Taylor, S.L. Hefle, S. Will genetically modified foods be allergenic? J. Allergy Clin. Immunol. 2001, 107, p.765-771.
- 23 Evaluation of allergenicity of genetically modified foods: Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology. Rome, Italy. 2001-1-22/25, 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2001, 27p.
- 24 In Vitro Digestibility of Vip3Aa19 as Contained in Test Substance VIP3A-0204 under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)
- 25 In Vitro Digestibility of Hygromycin B Phosphotransferase (Test Substance APH4-0102) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)

- 26 In vitro Digestibility of Vip3Aa19 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
- 27 In Vitro Digestibility of Hygromycin B Phosphotransferase (Test Substance APH4-0102) Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
- 28 Effect of Temperature on the Stability of Vip3Aa19 Protein. (社内報告書)
- 29 Effect of Temperature on the Stability of Hygromycin B Phosphotransferase from Test Substance APH4-0102 as Assessed by Immunoreactivity. (社内報告書)
- 30 Vip3Aa19 (Entrez Database Accession No. ABG20428.1): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内報告書)
- 31 APH4 (Entrez Database Accession No. CAA85741): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内報告書)
- 32 Compositional Analysis of Cottonseed from Event COT102 Cotton Plants. (社内報告書)