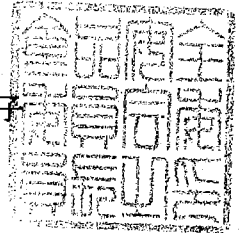




府食第599号
平成24年6月21日

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22年4月6日付け厚生労働省発食安0406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 COT67B 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 COT67B 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 COT67B 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.....	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.....	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.....	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.....	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.....	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.....	9
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.....	11
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.....	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.....	15
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	16
9. 栽培方法に関する事項.....	16
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>.....	17

<審議の経緯>

2010年4月6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0406第1号）、関係書類の接受
2010年4月8日	第327回食品安全委員会（要請事項説明）
2010年4月19日	第81回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年11月16日	第86回遺伝子組換え食品等専門調査会
2011年5月30日	第91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へ報告
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
石見佳子	手島玲子
海老澤元宏	宇理須厚雄
小関良宏	中島春紫
橘田和美	飯 哲夫
児玉浩明	和久井信
	和久井信
	澁谷直人

要 約

「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT67B 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* ssp. *kurstaki* HD-1 株に由来する改変 *cry1Ab* 遺伝子を導入して作出されており、改変 Cry1Ab タンパク質を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、本系統の作出過程において選択マーカーとして利用するために、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たが、交配による遺伝的分離を利用して同遺伝子をもたない個体が選抜されている。

「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 COT67B 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 COT67B 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 COT67B 系統」(以下「ワタ COT67B」という。)は、*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 株に由来する改変 *cry1Ab* 遺伝子 (*mcry1Ab* 遺伝子) を導入して作出されており、改変 *Cry1Ab* タンパク質 (*mCry1Ab* タンパク質) を発現することで、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、ワタ COT67B の作出過程において選択マーカーとして利用するために、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) が導入されたが、交配による遺伝的分離を利用して本遺伝子をもたない個体が選抜されている。

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

mcry1Ab 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 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

mcry1Ab 遺伝子は、チョウ目害虫抵抗性を付与する *mCry1Ab* 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)。

mcry1Ab 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ゲノムに導入された。なお、交配による遺伝的分離を利用して *aph4* 遺伝子をもたない個体を選抜したため、ワタ COT67B には *aph4* 遺伝子が含まれていない。

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。

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 2,3）。

- (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、マルバリニ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 0.23～1.40%（対乾燥重量）、ステルクリン酸 0.13～0.70%（対総脂肪酸）、マルバリニン酸 0.17～0.66%（対総脂肪酸）及びジヒドロステルクリン酸 0.11～0.50%（対総脂肪酸）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

ワタ COT67B 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 COT67B の摂取部位は、従来ワタと変わらない。

- (3) 摂取量

ワタ COT67B 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 COT67B 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 COT67B は、*mcry1Ab* 遺伝子の導入によって、mCry1Ab 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 COT67B 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 COT67B は、導入された *mcry1Ab* 遺伝子が mCry1Ab 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。

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、ワタが主要な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

ワタには、ゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸が含まれているが、綿実油の搾油・精製工程で除去されるか、著しく減少する。

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

ワタ COT67B の作出に使用した導入用プラスミド pNOV4641 の構築にはプラスミド pNOV2114 が用いられた。また、導入用プラスミド pNOV1914 の構築に

はプラスミド pNOV2122 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 pNOV2114 及び pNOV2122 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 pNOV2114 及び pNOV2122 の制限酵素による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 pNOV2114 及び pNOV2122 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 pNOV2114 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。

プラスミド pNOV2122 には、カナマイシンに対して耐性を付与する *npt3* 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 pNOV2114 及び pNOV2122 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

mcry1Ab 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis ssp. kurstaki* HD-1 株である。また、*aph4* 遺伝子の供与体は、プラスミド pKC203 である（参照 1）。なお、ワタ COT67B には *aph4* 遺伝子は含まれていない。

(2) 安全性に関する事項

mcry1Ab 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis ssp. kurstaki* HD-1 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

mcry1Ab 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-1 株の *cry1Ab* 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合成した遺伝子である。

aph4 遺伝子は、プラスミド pKC203 からクローニングされた。
挿入 DNA は、表 1 及び表 2 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

・ *mcry1Ab* 遺伝子

mcry1Ab 遺伝子がコードする mCry1Ab タンパク質は、殺虫性タンパク質である。*B. thuringiensis* が産生する殺虫性タンパク質と知られている Cry タンパク質は、特定のチョウ目昆虫に摂取されると、活性ポリペプチドを生じ、昆虫の中腸に作用して殺虫活性を示すことが報告されている（参照 4,5,6,7,8,9,10,11,12）。

mCry1Ab 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 13）。

・ *aph4* 遺伝子

aph4 遺伝子がコードする APH4 タンパク質は、ワタ COT67B の形質転換体の選択マーカーとして用いられた。APH4 タンパク質は、ハイグロマイシン B をリン酸化し、不活化することから（参照 14）、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。

なお、交配による遺伝的分離を利用して *aph4* 遺伝子をもたない個体を選抜したため、ワタ COT67B には *aph4* 遺伝子が含まれていない（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 pNOV1914 の T-DNA 領域には、*aph4* 遺伝子が含まれているが、ワタ COT67B 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。

導入用プラスミド pNOV4641 及び pNOV1914 の外骨格領域には、*spec* (*aadA*) 遺伝子及び *npt3* 遺伝子がそれぞれ含まれているが、ワタ COT67B 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

mcry1Ab 遺伝子のプロモーターは、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 (Ubq3 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

mcry1Ab 遺伝子及び *aph4* 遺伝子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 18,19)。

(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 pNOV2114 の T-DNA 領域に *mcry1Ab* 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 pNOV4641 が作製された。また、プラスミド pNOV2122 の T-DNA 領域に *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 pNOV1914 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 pNOV4641 及び pNOV1914 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 pNOV4641 及び pNOV1914 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 pNOV4641 及び pNOV1914 の左側境界配列 (LB) から右側境界配列 (RB) までの T-DNA 領域である。この領域をアグロバクテリウム法を用いて宿主に導入した。

(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

導入用プラスミド pNOV4641 及び pNOV1914 は、それぞれ外骨格領域に選抜マーカー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 COT67B への挿入 DNA①

構成 DNA	由来及び機能
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 領域の左側境界配列
(mcry1Ab 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
mcry1Ab	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株由来の <i>cry1Ab</i> 遺伝子を改変した遺伝子で、mCry1Ab タンパク質をコードする
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
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 領域の右側境界配列

表2 ワタ COT67B への挿入 DNA②

構成 DNA	機能及び由来
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 領域の左側境界配列
(aph4 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領域
aph4	<i>E. coli</i> のプラスミド由来の 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
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 領域の右側境界配列

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

mcry1Ab 遺伝子発現カセット及び aph4 遺伝子発現カセットを、アグロバクテリア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

て再分化個体を得た。再分化個体について、PCR 分析を行い、*aph4* 遺伝子及び *mcry1Ab* 遺伝子が存在する個体を選抜した。選抜した個体の自殖を行い、得られた個体のそれぞれについて PCR 分析を行い、*aph4* 遺伝子が存在せず、*mcry1Ab* 遺伝子がホモ接合体である個体を選抜した（参照 15）。さらに、既存の品種との戻し交配又は自殖を行い、ワタ COT67B 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

ワタ COT67B のゲノムに挿入された *mcry1Ab* 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、*mcry1Ab* 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 20）。

導入用プラスミド pNOV4641 の外骨格領域及び導入用プラスミド pNOV1914 由来の配列がワタ COT67B 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 20）。

ワタ COT67B の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pNOV4641 の T-DNA 領域の塩基配列と比較した結果、左側境界配列の 25 bp 及びそれに続く T-DNA 領域の 13 bp 並びに右側境界配列の 24 bp の欠損を除き一致していることが確認された（参照 20）。

ワタ COT67B 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、DNA の挿入に伴う 50 bp の欠損及び 1 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 20）。

ワタ COT67B 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 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）を用いた blastx 検索を行った結果、相同性を示す既知の塩基配列は見いだされなかった。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た（参照 20）。

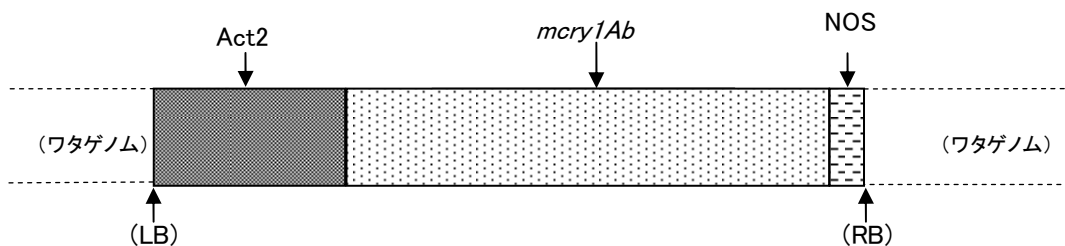


図 1 ワタ COT67B に挿入された DNA（模式図）

(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 COT67B の挿入 DNA (90 bp) と 5' 末端近傍配列 (1,000 bp) との接合部及び挿入 DNA (90 bp) と 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、六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 3 個見いだされた (参照 20)。

3 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、データベース (NCBI) を対象に、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 20)。

また、3 個の ORF のうち、80 アミノ酸以上の長さを持つ 1 個の ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) を用いて相同性検索を行った結果、相同性を示すアレルゲンは見いだされなかった。また、3 個の ORF について、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 20)。

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 COT67B の葉、根、全植物体、種子、さく及び花における mCry1Ab 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 3 のとおりである (参照 21)。

表 3 ワタ COT67B における mCry1Ab タンパク質の平均発現量
(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

分析組織*	mCry1Ab タンパク質
葉	194.02~246.03
根	12.61~56.56
全植物体	42.87
種子	25.17
さく	45.24
花	161.74

* 葉及び根は着蕾始めから開花最盛期 (発芽後約 4~15 週目)、全植物体及び種子は収穫直前 (発芽後約 22 週目)、さくは第一さく開じょ期 (発芽後約 15 週目)、花は開花最盛期 (発芽後約 13 週目) 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

ヒトが最も多く摂取するワタ産物は綿実油であるが、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 22）。

したがって、ワタ COT67B 由来の綿実油に含まれる mCry1Ab タンパク質は、ほとんど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

mcry1Ab 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 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 23,24）。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

mCry1Ab 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

E. coli で発現させた mCry1Ab 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。その結果、SDS-PAGE 分析においては、試験開始後 1 分以内に約 60 kDa 及び約 3 kDa のポリペプチド断片に分解され、約 60 kDa のポリペプチド断片は 30 分以内に消化されたが、約 3 kDa のポリペプチド断片は、バンドの濃度は薄くなるものの 60 分後においても消化されないことが確認された。また、ウェスタンブロット分析においては、試験開始後 1 分以内に約 60 kDa のポリペプチド断片に分解され、30 分以内に消化されることが確認された。なお、SDS-PAGE 分析において検出された約 3kDa のポリペプチド断片のバンドは検出されなかった（参照 25）。

SDS-PAGE 分析において検出された約 3kDa のポリペプチド断片の消化性について確認するために、人工胃液で 2 分処理後、人工腸液で処理した結果、約 3kDa のポリペプチド断片は人工腸液処理後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 26）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた mCry1Ab タンパク質の人工腸液中における消化性を確認するために、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、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 27）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた mCry1Ab タンパク質の加熱処理に対する感受性を確認するために、ELISA 法を用いて分析を行った。その結果、95°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）。

- (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
mCry1Ab タンパク質と既知のアレルゲン等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等は見いだされなかった（参照 24,29）。

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 29,30）。

上記、(1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断した結果、mCry1Ab 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 COT67B 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 COT67B について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の分離比の期待値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 20）。

また、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、3 世代のワタ COT67B 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 20）。

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

mCry1Ab タンパク質は、酵素活性を持つとは考えられておらず、宿主の代謝系と独立して機能している。したがって、mCry1Ab タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

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 COT67B と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 E、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を行った（参照 31）。

- (1) 主要構成成分

水分、タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維並びに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は認められなかった。

(2) ミネラル類

カルシウム及びリンについて分析を行った結果、カルシウムについては、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たが、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。なお、リンについては統計学的有意差は認められなかった。

(3) ビタミン E

α -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たが、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。

(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かった。

(5) 脂肪酸組成

脂肪酸 7 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。

(6) 有害生理活性物質

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。

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・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2009年2月に安全性が確認された。米国農務省（USDA）に対する無規制裁培のための承認申請が行われ、2011年9月に承認された。また、米国環境保護庁（EPA）に対する mCry1Ab タンパク質の許容値設定免除の申請が行われ、2008年6月に許可された。

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、2009年9月に承認された。

9. 栽培方法に関する事項

ワタ COT67B 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 COT67B の種子の製法及び管理方法は、従来のワタと同じである。

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2 から第6 までの事項により安全性の知見は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT67B 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 Waldron, C. Selectable marker for development of vectors and transformation systems in plants. U. S. Patent No.5, 668, 298, 1997-09-16.
- 2 ILSI, International Life Sciences Institute Crop Composition Database version 3.0 (<http://www.cropcomposition.org/>), 2006.
- 3 OECD, Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.11,2009.
- 4 Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Luthy, P. Wolfersberger, M.G. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. FEBS Lett. 1986, 204, p.213-218.
- 5 Wolfersberger, M.G., Hofmann, C, Luthy, P. “Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut”. Bacterial Protein Toxins. Falmagne, P., Fehrenbech, F.J., Jeljaszewics, J. Thelestam, M. eds. New York, Gustav Fischer, 1986, p.237-238.
- 6 Hofmann, C., Luthy, P., Hütter, R., Pliska, V. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). Eur J Biochem. 1988a, 173, p.85-91.
- 7 Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van, R.J., Jansens, S., Van, M.H., Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc Natl Acad Sci USA. 1988b, 85, p.7844-7848.

- 8 Van, R.J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D., Van, M.H., Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: Importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. Eur J Biochem. 1989, 186, p.239-247.
- 9 Van, R.J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D, Van, M.H., Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. Appl Environ Microbiol. 1990, 56, p.1378-1385.
- 10 English, L. Slatin, S.L., Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. Insect Biochem Mol Biol. 1992, 22, p.1-7.
- 11 Schnepf, E., Crickmore, N., Van R.J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 1998, 62, p.775-806.
- 12 Broderick, N.A., Raffa, K.F. Handelsman, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103, p.15196-15199.
- 13 Full Length Cry1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社内報告書)
- 14 Pardo, J.M., Malpartida, F., Rico, M. and Jimenez, A. Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*- the producing organism. J Gen Microbiol, 1985, 131, p.1289-1298.
- 15 Event COT67B cotton: Real-Time PCR Analysus of Individual T1 Plants. (社内報告書)
- 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 Genebank. Accession number V00087. National Institutes of Health, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/39105>.
- 20 Molecular Characterization of the Transgenic DNA in Event COT67B Cotton for Japan. (社内報告書)
- 21 Quantification of Cry1Ab Protein in Event COT67B Cotton Tissues and Whole Plants. (社内報告書)
- 22 Monsanto Company. "Safety Assessment of Bollgard? Cotton Event 531". 2002,

- http://www.monsanto.com/pdf/products/bollgard_pss.pdf.
- 23 Taylor, S.L. Hefle, S. Will genetically modified foods be allergenic? *J Allergy Clin Immunol.* 2001, 107, p.765-771.
 - 24 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. Rome, January 22-25, 2001, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2001, 27p.
 - 25 *In vitro* Digestibility of Full-Length Cry1Ab Protein (Test Substances FLCRY1AB-0103 and IAPCOT67B-0106) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)
 - 26 *In vitro* Digestibility of Full-length Cry1Ab (FLCry1Ab) Protein Under Sequential Simulated Mammalian Gastric Conditions and Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 - 27 *In vitro* Digestibility of Full-length Cry1Ab Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 - 28 Effect of Temperature on the Immunoreactivity of Full-Length Cry1Ab Protein. (社内報告書)
 - 29 FLCry1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known or Putative Allergens. (社内報告書)
 - 30 Hileman, R.E., Silvanovich, A., Goodman, R.E., Rice, E.A., Holleschak, G., Astwood, J.D., Hefle, S.L. Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002, 128, p.280-291.
 - 31 Vitamin E Analysis of Cottonseed from Event COT67B Cotton Plants. (社内報告書)