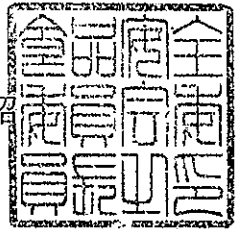




府食第986号
平成17年10月6日

厚生労働大臣
尾辻 秀久 殿

食品安全委員会
委員長 寺田 雅昭



食品健康影響評価の結果について

平成16年5月28日付け厚生労働省発食安第0528001号及び平成16年12月3日付け厚生労働省発食安第1203001号をもって貴大臣から当委員会に対し意見を求められた食品の安全性のうち、下記の食品については「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」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ましたので通知します。

なお、審議結果については、別添のとおりです。

記

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性 トウモロコシ <i>B. t. Cry34 / 35Ab1</i> Event DAS-59122-7	デュポン株式会社
除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性ト ウモロコシMON88017 系統	日本モンサント株式会社

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性
トウモロコシMON88017系統

2005年10月

食品安全委員会

目次

	頁
審議の経緯	1
食品安全委員会委員名簿	1
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	1
除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシMON88017系統 に係る食品健康影響評価に関する審議結果	2
．はじめに	2
．評価食品の概要	2
．食品健康影響評価	2
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	2
1 宿主及び導入DNAに関する事項	2
2 宿主の食経験に関する事項	3
3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項	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	3
5 宿主以外のものを比較対象に追加している場合、その根拠及び食品としての性質に 関する事項	3
6 安全性評価において検討が必要とされる相違点	3
第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
第3 宿主に関する事項	4
1 分類学上の位置付け（学名、品種名及び系統名等）	4
2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項	4
3 有害生理活性物質の生産に関する事項	4
4 アレルギー誘発性に関する事項	4
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	4
6 安全な摂取に関する事項	4
7 近縁の植物種に関する事項	5
第4 ベクターに関する事項	5
1 名称及び由来に関する事項	5
2 性質に関する事項	5
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	5
1 挿入DNAの供与体に関する事項	5
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	5
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	6

4	ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	6
5	構築された発現ベクターに関する事項	6
6	DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	7
第 6	組換え体に関する事項	7
1	遺伝子導入に関する事項	7
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	8
3	遺伝子産物（タンパク質）が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かに関する 事項	8
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	9
5	組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項	10
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	10
7	宿主との差異に関する事項	11
8	諸外国における認可、食用等	11
9	栽培方法	11
10	種子の製法及び管理方法	12
第 7	第 2 から第 6 までにより安全性の知見が得られていない場合に必要事項	12
	評価結果	12
	参考文献	12

審議の経緯

平成16年12月6日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の接受
平成16年12月9日	第73回食品安全委員会（要望事項説明）
平成17年1月24日	第21回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年4月25日	第26回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年6月17日	第28回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年8月1日	第30回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年8月18日	第107回食品安全委員会（報告）
平成17年8月18日～9月14日	国民からの意見・情報の募集
平成17年9月30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
平成17年10月6日	食品安全委員会委員長から厚生労働大臣に通知

食品安全委員会委員

委員長 寺田雅昭
委員長代理 寺尾允男
小泉直子
坂本元子
中村靖彦
本間清一
見上 彪

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

座長 早川堯夫
座長代理 澤田純一
五十君静信 手島玲子
池上幸江 丹生谷博
今井田克己 日野明寛
宇理須厚雄 室伏きみ子
小関良宏 山川隆
澁谷直人 山崎壮
渡邊雄一郎

除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果

はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 系統の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。(平成 16 年 12 月 6 日、関係書類を接受)

評価対象食品の概要

- 名称 : 除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ
MON88017 系統
- 性質 : 除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性
- 申請者 : 日本モンサント株式会社
- 開発者 : Monsanto Company (米国)

遺伝子組換えトウモロコシ「除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 系統 (以下、「MON88017 系統」という) は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子及びグラム陽性菌 *Bacillus thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* (*B. t. k*) に由来する改変 *cry3Bb1* 遺伝子を導入して作成され、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育し、コーンルートワーム (corn rootworm: *Coleoptera*, *Diabrotica* sp.) を防除することができるトウモロコシである。

本食品の宿主であるトウモロコシ (デント種) は、主に飼料として利用されるが、食品としてもコーン油やでんぷん等に幅広く用いられている。

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

宿主植物として用いたトウモロコシ *Zea mays* L. は、イネ科トウモロコシ属トウモロコシのデント種のものである。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

MON88017 系統に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株から単離された *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列に変更を加えたものである。また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* から単離された *cry3Bb1* 遺伝子の塩基配列に変更を加えたものである。

(3) 導入 DNA の性質及び導入方法

組換えトウモロコシのゲノムに組み込まれた改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、

除草剤グリホサート耐性を付与するタンパク質及びコウチュウ目害虫（コーンルートワーム）に対する殺虫活性を付与するタンパク質（B.t.タンパク質）を発現させる。デント種トウモロコシである遺伝子導入用交配雑種に、*cp4 epsps* 遺伝子及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子を含むプラスミド・ベクターPV-ZMIR39 を用いてアグロバクテリウム法により導入した。

2 宿主の食経験に関する事項

宿主のトウモロコシ（デント種、イネ科トウモロコシ属）は、小麦、稲と並ぶ三大穀物であり、紀元前から食されており、現在、世界中で栽培されている（参考文献 1）。2000 年における全世界の生産量は約 5 億 9 千万トンである（参考文献 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

トウモロコシ（デント種）の穀粒中の主要栄養組成はタンパク質 6-16.1%、脂質 2.48-5.7%、繊維 10.99-11.41%、灰分 0.89-6.28%、炭水化物 77.4-88.1%と報告されている（文献値）。

（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

宿主であるトウモロコシ（デント種）には、ヒトの健康に悪影響を与える毒性物質・栄養阻害物質の産生性は知られていない（参考文献 3）。

4 宿主の組換え体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

MON88017 系統の収穫時期及び貯蔵方法は、従来 of トウモロコシと変わらない。

（2）摂取（可食）部位

MON88017 系統の可食部位は、従来 of トウモロコシと変わらない。

（3）摂取量

MON88017 系統の摂取量は、従来 of トウモロコシと変わらない。

（4）調理及び加工方法

MON88017 系統の調理及び加工方法は、従来 of 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

MON88017 系統において、改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセット及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子カセットの導入により、改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 タンパク質が産生されていることが、宿主との唯一の相違点である。

以上、1~6 により、MON88017 系統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

MON88017 系統のゲノムに組み込まれた改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、改変 CP4 EPSPS タンパク質を産生し、除草剤グリホサートの作用を不活化し、植物の枯死(除草作用)を妨げる。この作用により、グリホサート耐性組換え植物は、その栽培中にグリホサートを散布しても影響を受けずに作物の成長を続ける一方、耐性を持たない一般の雑草の防除をすることが可能となる。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、改変 Cry3Bb1 タンパク質を産生し、コウチュウ目害虫であるコーンルートワーム(corn rootworm : *Coleoptera, Diabrotica* sp.)に対して抵抗性を示し、本害虫の防除を可能にする。

第3 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け(学名、品種及び系統名等)

宿主植物として用いたトウモロコシは、デント種トウモロコシの交雑種である。

2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの原産地は、決定的な説はないが、メキシコ、あるいはグアテマラと考えられている。植物学的には、育種の過程でブタモロコシ(*teosinte, Zea mexicana*)から派生したとする説が有力とされている(参考文献 4,5,6)。

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、有害生理活性物質の産生性は知られていない(参考文献 3)。

4 アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシは重要なアレルギー誘発食品であるとは考えられておらず(参考文献 7)、アレルギーの報告例は少なく、数件(参考文献 8,9)が報告されているが、いずれの場合もアレルゲンは特定されておらず、稀なアナフィラキシーの事例等とされている。

最近になって、Pasterollo は lipid transfer protein(LTP)が、トウモロコシの主なアレルゲンであると示唆する報告をしている(参考文献 10,11)。この感作は主に南ヨーロッパで認められている症状であり、また、トウモロコシの LTP への感作を起こした患者は、LTP を含む他の野菜にも感作反応を起こす可能性が高いと考察されている。

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

多くの植物と同様に、トウモロコシの病気は多く知られているが、それらが人や動物に感染する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、米、小麦とともに、世界の主要な穀物の一つであり、古くから食されている。我が国では 2003 年、でん粉製造用としておよそ 359 万トン、その他の製造用原料としておよそ 83 万トンのトウモロコシを輸入している。(参考文献 12)

一方、飼料としては、2003 年に約 1,186 万トンが配合飼料の原料として用いられており、2003 年の輸入量は、約 1,239 万トンであり、その約 93%は米国から輸入されている。(参考文献 12,13)

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、*Tripsacum* 属及び *Zea* 属のブタモロコシがある。トウモロコシと自然交雑が可能なのはブタモロコシのみで *Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない(参考文献7)。我が国では、*Tripsacum* 属の野生種及びブタモロコシは報告されていない(参考文献14,15)。

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

MON88017 系統の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR39 は、中間体プラスミド A ~ D を用いて作出されている。

これらのプラスミドは、いずれも *Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*)あるいは非病原性の *Escherichia coli* 由来のプラスミドから作製されたものである。

2 性質に関する事項

中間体として用いられたプラスミド A ~ D の制限酵素切断地図は明らかとなっており、また、これらのプラスミドからベクター PV-ZMIR39 の構築のために用いた各構成要素の機能は明らかとなっている。

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

MON88017 系統に導入された遺伝子のうち、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* (*B. t. k*) に由来する。

(2) 安全性に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子が由来する *Agrobacterium* sp. は、土壌中及び植物の根圏に存在するグラム陰性菌の1つである。*Rhizobium* (*Agrobacterium*) はヒトや家畜に対し病原性等の問題は報告されていない。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子が由来する *B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* (*B. t. k*) は、土壌中に一般的に存在するグラム陽性菌であり、ヒトや家畜に対し病原性等の問題は報告されていない。

2 挿入 DNA または遺伝子 (抗生物質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

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株からクローニングされた *cp4 epsps* 遺伝子の遺伝子産物の植物中での発現量を高めるために改変したものである。また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* (*B. t. k*) からクローニングされた *cry3Bb1* 遺伝子の遺伝子産物の殺虫活性を増強するために改変したものである。挿入 DNA の遺伝要素は表のとおりであり、制限酵素による切断地図、機能等は明らかとなっている。

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

プラスミド PV-ZMIR39 の 2 つの遺伝子発現カセットのうち、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、イネ由来のアクチン 1 遺伝子の P-ract1 (ライソアクチン 1 プロモーター) (参考文献 16) であり、改変 *cry3Bb1* 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 (CaMV) 由来の P-e35S (e35S プロモーター) (参考文献 17) である。

(2) ターミネーターに関する事項

プラスミド PV-ZMIR39 の 2 つの遺伝子発現カセットのうち、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のノパリン合成遺伝子の 3' 末端非翻訳領域である NOS 3' である。改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギ由来の熱ショックタンパク質 17.3 の 3' 末端非翻訳領域である tahsp17 3' である。

(3) その他

プラスミド・ベクター中に、ヒト及び家畜に有害であることが知られているタンパク質をコードする DNA 配列は存在しない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

MON88017 系統の作出に用いた発現ベクター PV-ZMIR39 は、大腸菌の pUC119 由来の発現ベクターに組み込まれた改変 *cry3Bb1* 遺伝子カセットを、大腸菌由来の pUC119 由来のカナマイシン耐性を付与する発現ベクターに組み込み、さらに改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットを、pBR322 由来であらかじめ改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットが組み込まれたベクターへ連結して構築された。

5 構築された発現ベクターに関する事項

- ・ MON88017 は、発現ベクター PV-ZMIR39 を用いて作出された。
- ・ 発現ベクター PV-ZMIR39 の塩基数は 12,368bp であり、本プラスミドの塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。
- ・ PV-ZMIR39 の各構成要素の機能は既に明らかになっており、既知の有害塩基配列を含まない。
- ・ 発現ベクター上での意図する発現領域は、左側境界領域から時計回りに右側境界領域までである。
- ・ 導入遺伝子の大きさ、由来並びに塩基配列は明らかになっている。

・ MON88017 系統への挿入 DNA

略 称	機 能
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット	
P-ract	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域
ract1 intron	イネ由来アクチン遺伝子のイントロン
CTP2	シロイヌナズナ由来で、EPSPS タンパク質の N 末端側に存在する葉緑体に輸送するペプチド部分をコードする塩基配列。

改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の 5-イノリルピルピルキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子
NOS3	<i>R. radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子のターミネーター領域
改変 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子カセット	
P-e35S	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) のプロモーター領域
wt CAB leader	コムギ葉緑素 a/b 結合タンパク質遺伝子の 5' 末端非翻訳リーダ領域
ract1 intron	イネ由来アクチン遺伝子のイントロン
改変 <i>cry3Bb1</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の、改変 Cry3Bb1 タンパク質をコードする遺伝子
tahsp17 3	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) コムギ熱ショックタンパク質 17.3 のターミネーター領域

6 DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

宿主への導入にはアグロバクテリウム法を用い、発現ベクターPV-ZMIR39 の T-DNA 領域が宿主に導入されている。

導入後は、グリホサートを含む培地上で形質転換カルスを選抜して再生個体を得た。再生個体について、改変 Cry3Bb1 タンパク質の発現を ELISA 分析により検定し、グリホサート耐性とコウチュウ害虫抵抗性が付与された系統を選抜した。

第 6 組換え体に関する事項

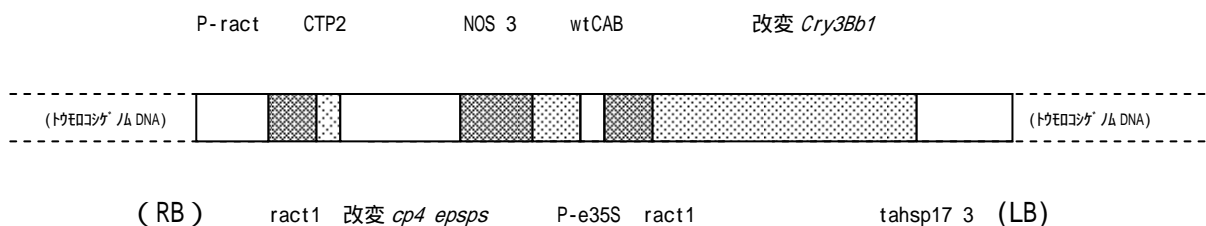
1 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

MON88017 系統のゲノム中に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子並びに改変 *cry3Bb1* 遺伝子の挿入箇所数、コピー数、挿入遺伝子発現カセットの完全性及び外側骨格配列の有無を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、MON88017 系統の T-DNA 領域中の 1 箇所に 2 種類の遺伝子発現カセットが完全な状態でそれぞれ 1 コピーずつ導入されていることが確認された。また、プラスミド外骨格は検出されなかった。

なお、挿入近傍配列も明らかとなっている。

・組換えトウモロコシ MON88017 系統に挿入された DNA (模式図)



(2) オープンリーディングフレームの有無ならびにその転写及び発現の可能性

サザンブロット分析及び PCR 分析の結果、MON88017 系統中には改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットを含むプラスミド PV-ZMIR39 の T-DNA 領域 1 コピーのみが導入されており、その他の遺伝子断片は導入されていないことが確認されていることから、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は含まれていないと考えられたが、MON88017 系統の挿入遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端に PCR 産物の DNA 配列と一致しない 19bp 及び 1bp 配列がそれぞれ隣接していることが判明した。

目的外のタンパク質が発現する可能性のあるオープンリーディングフレームについて、挿入遺伝子周辺の植物ゲノムの DNA 配列 (5' 末端は 103bp、3' 末端は 221bp) を DDBJ を含む GenBank を用いて BLASTN 法により、検索した。転写することが既知の配列および機能を有すると推定される配列と比較したところ、e value が $1e-30$ 以下の高い相同性を持つ配列は存在せず、挿入遺伝子がトウモロコシ・ゲノム中に存在する遺伝子を破壊している可能性は低いと考えられた。また、現時点においては機能が不明もしくは機能を有すると推測されていない配列と比較したところ、e value が $1e-30$ 以下の高い相同性を持つ配列は 5' 末端の近傍配列で 30 個、3' 末端の近傍配列で 10 個の配列が見つかった。しかし、仮にこれら配列を含む領域が発現・翻訳されたと仮定して、フレームシフトも想定してこの推定上のオープンリーディングフレーム (ORF) と既知のアレルゲンあるいは毒素の配列との相同性を検索した結果、有意な相同性を有するものは見いだされることが確認された。

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

改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 *Cry3Bb1* タンパク質の組換え体及び非組換え体中の発現量を測定した。

2000 年に行った栽培試験において、3 箇所のほ場からそれぞれ 4 試料を採取して供試し、MON88017 系統及び対照の非組換え体の花粉、絹糸、茎葉、穀粒、収穫後の地上部について、ELISA 法 (参考文献 18) により改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 *Cry3Bb1* タンパク質の発現レベルを測定した。

MON88017 系統における改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量の平均値は、花粉で $220 \mu\text{g/g}$ 生組織重、茎葉で $16 \mu\text{g/g}$ 生組織重、穀粒で $5.1 \mu\text{g/g}$ 生組織重であった。

MON88017 系統における改変 *Cry3Bb1* タンパク質の発現量の平均値は、花粉で $14 \mu\text{g/g}$ 生組織重、絹糸で $37 \mu\text{g/g}$ 生組織重、茎葉で $27 \mu\text{g/g}$ 生組織重、穀粒で $13 \mu\text{g/g}$ 生組織重、収穫後の地上部で $30 \mu\text{g/g}$ 生組織重であった。

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

・改変 CP4 EPSPS タンパク質

圃場試験で収穫された MON88017 系統の穀粒における改変 CP4 EPSPS タンパク質の最大発現量は、 $6.3 \mu\text{g/g}$ 生組織重であった。

日本人一日一人当たりの「とうもろこし・加工品」の平均摂取量 0.4g (参考文献 19) をすべて MON88017 系統に置き換えて計算すると、改変 CP4 EPSPS タンパク質の一日一人当たりの予想平均摂取量は最大で $2.52 \mu\text{g}$ となる。

また、一日一人当たりのタンパク質平均摂取量 71.5g (参考文献 20) に基づき、改変 CP4 EPSPS タンパク質が一日タンパク摂取量に占める割合を計算したところ、 $3.5 \times 10^{-6}\%$ であった。

・ 改変 Cry3Bb1 タンパク質

圃場試験で収穫された MON88017 系統の穀粒における改変 Cry3Bb1 タンパク質の最大発現量は、19 µg/g 生組織重であった。

日本人一日一人当たりの「とうもろこし・加工品」の平均摂取量 0.4g (参考文献 19) をすべて MON88017 系統に置き換えて計算すると、改変 Cry3Bb1 タンパク質の一日一人当たりの予想平均摂取量は最大で 7.6 µg となる。

また、一日一人当たりのタンパク質平均摂取量 71.5g (参考文献 20) に基づき、改変 Cry3Bb1 タンパク質が一日タンパク摂取量に占める割合を計算したところ、 $1.06 \times 10^{-5}\%$ であった。

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 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株が属する *Rhizobium* (*Agrobacterium*) のヒトに対するアレルギー誘発性の報告はない。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* (*B. t. k.*) のヒトに対するアレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性

改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 タンパク質がアレルギー誘発性を持つという知見はこれまでのところ報告されていない。

(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

人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 タンパク質を人工胃液中で処理し、ウェスタンブロット分析を行ったところ、両タンパク質とも試験開始後 15 秒以内で免疫応答反応の検出限界以下に消化された。

なお、人工胃液は、米国薬局方 (The United States Pharmacopeia) に記載されている方法に従って調製した。

人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質を人工腸液中で処理し、ウェスタンブロット分析を行ったところ、人工腸液中では 10 分後に改変 CP4 EPSPS タンパク質の免疫反応性の大半が失われ、100 分後には完全に消失することが確認された。

E. coli で発現させた改変 Cry3Bb1 タンパク質を人工腸液中で処理し、ウェスタンブロット分析を行ったところ、人工腸液中では 59kDa のトリプシン耐性コアタンパク質は 24 時間後も分解されなかった。

加熱処理に対する感受性

改変 CP4 EPSPS タンパク質を産生するラウンドアップ・レディー大豆を用いた加熱試験では、100 の温度で 38 分間熱処理することによって脱脂大豆中改変 CP4 EPSPS タンパク質の免疫反応性が 99% 以上失われることが ELISA 分析により確認されている (参考文献 21, 22)。

MON88017 系統の穀粒を、標準的なトウモロコシ加工条件 (約 206 度、20 分間) で加熱処理した後、改変 Cry3Bb1 タンパク質を抽出し、ウェスタンブロット分析を行ったところ、加熱処理後の MON88017 系統の穀粒の改変 Cry3Bb1 タンパク質の免疫反応性は検出限界以下であった。

(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 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 タンパク質について、既知アレルゲンとの構造相同性を確認するため、752 の既知アレルゲン及びグリアジンからなるデータベースを用いて比較を行った。比較は、データベース検索の標準法である FASTA 型アルゴリズム(参考文献 23,24,25,26,27)を使用した。また、改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 タンパク質について、アミノ酸配列中に抗原決定基を示す可能性のある配列が含まれているかを確認するために、連続する 8 つのアミノ酸による相同性検索を行った。

いずれの検索においても、改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 タンパク質について、既知アレルゲン及びグルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質との間に構造相同性がないことが確認された。

(1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 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

MON88017 系統の 10 世代について、改変 Cry3Bb1 タンパク質の発現を指標として分離比調査を行った結果、1 つを除く全ての世代で実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的な有意差は認められなかった。有意差が認められた 1 つの世代で実測値が期待値を上回ったが、これは導入遺伝子に関してヘテロである前の世代において高濃度のグリホサート散布を行った結果、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を有する花粉のみが生存して交雑した結果、その後代である当該世代では分離が起きなかったためであると考えられた。

MON88017 系統の挿入遺伝子の後代における安定性を確認するために、複数世代のゲノム DNA を発現ベクターの T-DNA 領域を 1 箇所 で切断する制限酵素で切断し、T-DNA 領域をカバーする 4 つのプロープを用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。

MON88017 系統における改変 Cry3Bb1 タンパク質の発現の安定性を確認するために、複数世代の穀粒粉末を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、各世代において改変 Cry3Bb1 タンパク質の分子量と一致するバンドが示された。

また、MON88017 系統における改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現の安定性は、複数世代において除草剤グリホサートを散布することにより確認した。

以上のことから、MON88017 系統の挿入遺伝子は、メンデルの法則に従って単一の優性遺伝子として後代に安定して遺伝することが確認された。

6 遺伝子産物(タンパク質)の代謝経路への影響

EPSPS タンパク質は、芳香族アミノ酸合成経路であるシキミ酸経路を触媒する。本代謝経路において重要とされている 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(DAHP)からコリスミ酸が生成されるまでの段階は、中間代謝産物や最終生成物によって阻害されたり抑制されたりされることはほとんどないことが知られている(参考文献 28,29)。このことから、EPSPS タンパク質は本経路において律速酵素ではないことが示唆される。

また、EPSPS タンパク質は、ホスホエノールピルビン酸(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸(S3P)

と特異的に反応することが知られている（参考文献 30）。このほかに、唯一 EPSPS タンパク質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸のみであるが、EPSPS タンパク質とシキミ酸の反応性は、EPSPS タンパク質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 に過ぎないことから、シキミ酸が植物体内で EPSPS タンパク質と反応することはないと考えられる。

改変 Cry3Bb1 タンパク質は酵素活性を持たず、植物体内の代謝経路に影響を与えとは考えられない。

以上から、これら遺伝子産物が、宿主であるトウモロコシの代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考察した。

7 宿主との差異に関する事項

MON88017 系統と非組換え体および非組換え商業トウモロコシ 12 品種との間で、茎葉及び穀粒について、主要構成成分、繊維、脂肪酸組成、アミノ酸組成、無機物、ビタミン類、抗栄養素及び二次代謝産物の分析、比較を行った。

茎葉中の主要構成成分（灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質）、繊維（酸性デタージェントファイバー、中性デタージェントファイバー）及び無機物（カルシウム、リン）を測定したところ、各成分とも MON88017 系統と非組換え対照品種との間に統計学的な有意差は認められなかった。

穀粒中のアミノ酸 18 種類、脂肪酸 9 種類、無機物（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、亜鉛）、主要構成成分（灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質）、繊維（酸性デタージェントファイバー、中性デタージェントファイバー、総食物繊維）、ビタミン類（葉酸、ナイアシン、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B6 及びビタミン E）、二次代謝産物（フェルラ酸、p-クマル酸）及び抗栄養素（フィチン酸、ラフィノース）を分析したところ、18:2 リノール酸、20:0 アラキジン酸及びビタミン B1 で、MON88017 系統と非組換え体との間に統計学的な有意差が認められたが、平均値は、従来商業品種の分析値の範囲内であったことから、これらの統計学的な有意差は生物学的に有意な差ではないと考えられた。

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、食品医薬品局（FDA）に 2004 年 3 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、2005 年 1 月に許可を得ている。また、2004 年 1 月、環境保護庁（EPA）に改変型 Cry3Bb1 タンパク質に対する残留基準値の設定免除の申請を行い、同年 4 月、農務省（USDA）に無規制栽培（商業栽培）のための申請が行われている。

また、カナダ保健省には、2004 年 5 月、食品としての安全性審査の申請が、カナダ食品検査庁（CFIA）には、同じく 5 月、環境・飼料についての安全性の申請が行われた。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準局（FSANZ）には、2004 年 10 月、食品、飼料としての安全性審査の申請が行われた。

9 栽培方法に関する事項

MON88017 系統と従来のトウモロコシの栽培方法の違いは、生育期間を通じて除草剤グリホサートを利用できる点、コーンルートワームの防除が可能になる点であり、それ以外は従来と同じである。

10 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON88017 系統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品種と同じである。

第7 第2から第6まで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までにより安全性の知見は得られており、次に示された試験は必要ないと判断される。なお、申請者からは急性毒性試験のデータが提出されていたことから、このデータを念のため確認した。

1. 急性毒性に関する試験
2. 亜急性毒性に関する試験
3. 慢性毒性に関する試験
4. 生殖に及ぼす影響に関する試験
5. 変異原性に関する試験
6. がん原性に関する試験
7. その他必要な試験（腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等）

1. 急性毒性に関する試験

なお、*E. coli* で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質及び改変 Cry3Bb1 タンパク質を用いてマウスの急性強制経口投与試験が行われている。それぞれ最大投与量でもマウスに有害な影響は認められなかった。

評価結果

遺伝子組換えトウモロコシ（除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 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」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された。

参考文献

1. 菊池一徳. トウモロコシの生産と利用. (1987). 光林.
2. 2002 年版 FAO 農業生産年報. (2003). FAO.
3. White PJ, Pollak LM. Corn as a Food Source in the United States: Part . Processes, Products, Composition and Nutritive Values. *Cereal Food World* (1995) 40:756-761.
4. Aldrich SR, Scott WO, Hoelt RG. Modern Corn Production, Third Edition. (1986). A&L Publication, Inc. Champaign, Illinois, USA.
5. Galinat WC. The Origin of Corn. Corn and Corn Improvement, Third Edition. #18 in the series *Agronomy* (Ed. Sprague GF, Dudley JW). (1988) 1-31. American Soc. of Agronomy. Madison, WI, USA.
6. Jugenheimer RW. Corns for special purposes and uses. Corn: Improvement, Seed Production and Uses. (1976) 215-233. John Wiley & Sons. New York.

7. OECD Consensus document on the Biology of *Zea Mays* subsp. *mays* (Maize). (2003). OECD.
8. Tanaka LG, El-Dahr JM, Lehrer SB. Double-blind, placebo-controlled corn challenge resulting in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.*(2001)107:744.
9. Pasimi G, Simonato B, Curioni A, Vincenzi S, Cristaudo A, Santucci B, Dai Belin Peruffo A, Giannattasio M. IgE-mediated allergy to corn:a 50 KDa protein belonging to the reduced soluble proteins, is major allergen. *Allergy*(2002)57:98-106.
10. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C, Giuffrida MG, Ansaloni R, Godovac-Zimmermann J, Conti A, Fortunato D, Ortolani C. The maize major allergen,which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol.*(2000)106(4):744-751.
11. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, Conti A, Iametti S, Fortunato D, Bonomi S, Ortolani S. Lipid-transfer protein is the maize major allergen, maintaining IgE-binding activity after cooking 100 degC, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol.*(2003)112(4):744-751.
12. 日本貿易月表 2003 年 12 月号(通巻 689 号). 日本関税協会. (2004).
13. 農林水産省生産局畜産部畜産振興課編. 飼料月報.通巻 474 ~ 485 号. 2003 - 2004. 社団法人配合飼料安定供給機構.
14. 長田武正. 日本イネ科植物図譜. (1989) 平凡社.
15. 畑作全書 雑穀編. (1981) 農文協.
16. McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R. Isolation of an Efficient Action Promoter for Use in Rice Transformation. *Plant Cell.*(1990)2:163-171.
17. Odell JT, Mag F, Chua HH. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature.* (1985) 313:810-812.
18. Harlow E, Lane D. Immunoassay. Antibodies: A Laboratory Manual. (1988) 14:553-612.
19. 厚生労働省. 平成 14 年国民栄養の現状国民栄養調査結果. (2004)
20. 厚生労働省. 平成 15 年国民健康・栄養調査結果の概要. (2005)
21. Padgett SR. *et al.* Glyphosate Tolerant Soybeans in Puerto Rico in 1992: Field Test, Processing Studies & Analytical Evaluation. Study#92-01-30-02 (MO). MSL-12902. (1993a) (社内報告書)
22. Pagdette SR, Nida DL, Biest NA, Bailey MR, Zobel JF. Glyphosate Tolerant Soybeans in the U.S. in 1992: Field Test, Processing Studies & Analytical Evaluation. Study#92-01-30-02 (Monsanto). MSL-12906. (1993b) (社内報告書)
23. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1988)85:2440-2448.
24. Wilbur WJ, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1983)80:726-730.
25. Pearson WR. Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Meth. Enzymol.* (1990)183:63-98.

26. Givskov M, Devereux J. Sequence Analysis Primer. (1992) W.H. Freeman and Co. New York.
27. Doolittle RF. Searching Through Sequence Databases. *Meth. Enzymol.* (1990)183:99-110.
28. Weiss U. Edwards JM. Regulation of the Shikimate Pathway. The Biosynthesis of Aromatic Compounds. (1980) 287-301. John Wiley and Sons. New York.
29. Herrman KM. The Common Aromatic Biosynthetic Pathway. Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation. (Eds. Herrman KM, Somerville RL.) (1983) 301-302. Addison-Wesley, Reading, MA.
30. Gruys KJ, Walker MC, Sikorski JA. Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *E. coli*. *Biochem.* (1992)31:5534-5544.