

平成 13 年 12 月 17 日厚生労働省組換え DNA 技術応用
食品及び添加物の安全性審査に関する部会報告書
(MON863)

部会報告書

品種： とうもろこし(商品名：「鞘翅目害虫抵抗性トウモロコシ MON863 系統」)

性質： 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)

日本モンサント株式会社から申請されたとうもろこし(商品名：「鞘翅目害虫抵抗性トウモロコシ MON863 系統」、以下「MON863 系統」という。)について開発者が行った安全性評価が、「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」(以下「審査基準」という。)に適合しているか否かについて審査した。その結果は次のとおりである。

I 申請された食品の概要

MON863 系統には、コーンルートワーム等の鞘翅目害虫に抵抗性をもつ *Bacillus thuringiensis* が産生する蛋白質(以下「Cry3Bb1 蛋白質」という。)を産生させる遺伝子(以下「*cry3Bb1* 遺伝子」という。)の塩基配列を改変した遺伝子(以下「改変 *cry3Bb1* 遺伝子」という。)が導入されている。

Cry3Bb1 蛋白質は、鞘翅目害虫に対して殺虫活性を持つ。B.thuringiensis の多数の株は、特定の害虫の防除に特に有効である結晶蛋白質 又は封入体を産生することが明らかにされている。B.t.蛋白質は殺虫活性に基づいて分類されており、Cry3 類の一つである Cry3Bb1 蛋白質は、米国のトウモロコシ栽培の鞘翅目害虫に対する殺虫活性を有する。B.t.蛋白質は鞘翅目昆虫の消化管において、中腸上皮細胞の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成する。その結果、消化プロセスが阻害され死に至る。

また、選択マーカー遺伝子として、NPTII 蛋白質を発現させるカナマイシン等耐性遺伝子(以下「*nptII* 遺伝子」という。)が導入されている。

II 審査結果

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

審査基準の第2章第1の各項に規定される資料(1.遺伝的素材に関する資料、2.広範囲な人の安全な食経験に関する資料、3.食品の構成成分等に関する資料、4.既存種と新品種との使用方法の相違に関する資料)について検討した結果、当該食品と既存のものが全体として食品としての同等性を失っていないと客観的に判断し、当該 MON863 系統の食品としての安全性を評価するために、既存の食品を比較対象として用いる方法が適用できると判断した。そこで、既存のとうもろこしとの比較において、審査基準の第2章第2以下の各事項に掲げられた審査基準に沿って審査を行った。

1)遺伝的素材に関する資料

宿主は、デント種のとうもろこしである。遺伝子供与体としては、*cry3Bb1* 遺伝子は *Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis* 由来の変異株に、また、*nptII* 遺伝子は *E.coli* に由来する。

2) 広範囲なヒトの安全な食経験に関する資料

デント種の主要利用目的は飼料用であるが、食品としてもコーン油や澱粉等に広く利用されている。Cry3Bb1 蛋白質は、1995 年から鞘翅目害虫用の微生物農薬として米国において販売されている B.t.蛋白質とアミノ酸レベルで 99%以上の相同性を示している。また、*nptII* 遺伝子の供与体である *E.coli* はヒトの腸管内に存在する一般的な細菌である。

3) 食品の構成成分等に関する資料

MON863 系統は、構成成分等(アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル等)に関し、既存のとうもろこしと同等であった。

4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する資料

MON863 系統は、食品としての利用方法は既存のとうもろこしと同等である。なお、既存のとうもろこしとの栽培上の相違は、鞘翅目害虫に対する殺虫剤の使用量を削減できる点のみである。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON863 系統は、Cry3Bb1 蛋白質の発現により鞘翅目害虫の食害を受けないため、それらの防除のための殺虫剤散布を軽減することができる。この点以外、栽培方法、利用目的及び利用方法は従来のとおりと変わらない。

3 宿主に関する事項

とうもろこし *Zea mays* L. は、イネ科トウモロコシ属に属し、子実の形状と粒質からデントコーン、スイートコーン、ポップコーン及びポッドコーン等に分類される。MON863 系統の遺伝子導入親品種であるデントコーンの主な用途は飼料用であるが、食用としても広く利用されており、広範囲なヒトの安全な食経験がある。また、とうもろこしのアレルギー誘発性の報告は少なく、有害生理活性物質の産生等は知られていない。

4 ベクターに関する事項

MON863 系統の作出には、プラスミド PV-ZMIR13 を制限酵素 *Mlu* で処理して得られた DNA 断片 PV-ZMIR13L が用いられた。

PV-ZMIR13L は、それぞれ 1 コピーの Cry3Bb1 蛋白質産生に関与する遺伝子(4-AS1/wtCAB/ract1/*cry3Bb1*/tahsp 17 3') 及び NPTII 蛋白質産生に関与する遺伝子(35S/*nptII*/NOS 3') を含む。

また、プラスミド PV-ZMIR13 には、PV-ZMIR13L の他に、*ori-pUC* 及び細菌プロモータにより制御される *nptII* 遺伝子が含まれ、そのサイズは 7,292bp である。

PV-ZMIR13L に存在する全ての遺伝子は、その特性が明らかとなっており、既知の有害塩基配列を含まない。また、伝達を可能とする配列を含まないので、伝達性はなく、植物細胞中では自立増殖しない。

5 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

1) 供与体に関する事項

MON863 系統に導入されている *cry3Bb1* 遺伝子は *Bacillus thuringiensis subsp. Kumamotoensis* に、また、*nptII* 遺伝子は *E.coli* に由来する。

導入に用いた *cry3Bb1* 遺伝子は *B.t.k.*由来の変異株よりクローニングし、植物での発現を高めるために塩基配列を改変したものである。

2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

PV-ZMIR13L の宿主への導入には、パーティクルガン法が用いられている。

3) 構造に関する事項

MON863 系統には *cry3Bb1* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子が存在している。既知の有害塩基配列は含まれていない。

4) 性質に関する事項

Cry3Bb1 蛋白質は、特定の鞘翅目昆虫の消化管において、中腸上皮細胞の特異的受容体と結合し陽イオン選択的小孔を形成する。その結果、消化プロセスが阻害され昆虫は死に至る。

また、NPTII 蛋白質は、ATP の存在下でアミノ配糖体系抗生物質をリン酸化し不活化する。

5) 純度に関する事項

遺伝子導入に用いた PV-ZMIR13L の各構成要素はクローン化されており、その特性も明らかにされている。

6) 安定性に関する事項

MON863 系統の5系列について、サザンプロット分析及び PCR 分析を行った結果、挿入遺伝子の安定性及び同一性が示されている。また、5 世代について Cry3Bb1 蛋白質の発現を指標とした分離比調査を行った結果、統計的に有意の差は見られなかった。さらに、9 世代について全長 *nptII* 遺伝子を用いてサザンプロット分析を行った結果、同一のバンドパターンを確認した。以上のことから、MON863 系統における挿入遺伝子は、メンデルの法則に従って単一の遺伝子として後代に安定的に遺伝していることが示された。

7) コピー数に関する事項

サザンプロット分析の結果より、MON863 系統には、1コピーの PV-ZMIR13L(それぞれ1コピーの完全な *cry3Bb1* 遺伝子カセット及び *nptII* 遺伝子カセット)が導入されており、また、プラスミド PV-ZMIR13 の外骨格領域は導入されていないことが示された。

8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

米国にて4ヶ所の圃場から採取した MON863 系統の各種組織について、ELISA 法を用いて分析を行った結果、Cry3Bb1 蛋白質の発現量は、生組織重1g 当たり穀粒で平均 70 µg であった。また、NPTII 蛋白質の発現量は、穀粒で検出限界値(0.076 µg/g 生組織重)以下であった。

9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

NPTII 蛋白質は、ATP の存在下でアミノ配糖体系抗生物質をリン酸化し不活化する。NPTII 蛋白質については、加熱、人工胃液・腸液により急速に免疫反応性が消失することが確認されている。

10) 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

外来のオープンリーディングフレームは、*cry3Bb1* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子の発現に係るもののみである。

6 組換え体に関する事項

1)組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

MON863 系統に新たに導入された性質は、Cry3Bb1 蛋白質の発現により鞘翅目害虫に対し抵抗性を持つ点のみである。

2)遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する事項

a 供与体の生物の食経験に関する事項

cry3Bb1 遺伝子の供与体である *Bacillus thuringiensis subsp. kumamotoensis* は、ヒトの直接の食経験はないが、これを基材とする微生物農薬としてこれまで米国やヨーロッパを中心に安全に使用されてきた。

nptII 遺伝子の供与体である *E.coli* は、ヒトの腸管内に存在する一般的な細菌である。

b 遺伝子産物がアレルゲンとして知られているか否かに関する事項

Cry3Bb1 蛋白質及び NPTII 蛋白質が、アレルゲンとしてアレルギー誘発性を有するという事は報告されていない。

c 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

ア 人工胃液・人工腸液に対する感受性

多くの既知アレルゲンは、ペプシン及びトリプシン消化に対して安定であることを踏まえ、Cry3Bb1 蛋白質を人工胃腸消化液に反応させ、ウェスタンブロット分析した結果、人工胃液中で Cry3Bb1 蛋白質の免疫反応性は、30～60 秒後に消失することが確認された。人工腸液中では、59kD のトリプシン耐性コア蛋白質は、24 時間後も完全には分解されなかった。

NPTII 蛋白質については、人工胃液及び人工腸液中で免疫反応性が速やかに消失することが、ニューリーフ・ジャガイモ等における厚生労働省の審査において確認されている。

イ 加熱処理に対する感受性

Cry3Bb1 蛋白質は、加熱により免疫反応性の 99%以上が失われることが、ELISA 分析等により確認されている。

d 遺伝子産物の摂取量を有意に変えるか否かに関する事項

MON863 系統の穀粒中での発現蛋白質の平均発現量は、生組織重 1g 当たり、Cry3Bb1 蛋白質で 70 µg、NPTII 蛋白質では検出限界値 (0.076 µg/g) 以下であった。MON863 系統はデント種であるが、日本人の一日一人あたりの「その他の穀類」の平均摂取量 2.0g (国民栄養の現状、1999) を全て MON863 系統に置き換えて計算すると、加工損失等がないとして、Cry3Bb1 蛋白質の一日一人あたりの予想摂取量は、140 µg となる。

また、NPTII 蛋白質の産生量を、仮に検出限界値の生組織重 1g 当たり 0.076 µg とすると、加工損失がないとして、NPTII 蛋白質の一日一人あたりの予想摂取量は 0.152 µg となる。

ある蛋白質に対してヒトが抗体を産生するには、ある程度の量を摂取することが必要で

あり、また、これら蛋白質が速やかに消化されること等を考慮すると、これらの蛋白質がアレルゲンとなるとは考えにくい。

e 遺伝子産物と既知の食物アレルゲンとの構造相同性に関する事項

Cry3Bb1 蛋白質及び NPTII 蛋白質について、既知のアレルゲンとの構造相同性を検索するため、659 のアレルゲン及びグリアジンの配列の比較をデータベースより抽出して解析した結果、Cry3Bb1 蛋白質及び NPTII 蛋白質と 8 個以上隣接したアミノ酸配列が一致するような配列はなく、既知アレルゲンとの間に相同性は認められなかった。

f 遺伝子産物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

日本人の一日一人あたりの蛋白質の平均摂取量 80.5g (国民栄養の現状、1999) に基づいて計算すると、Cry3Bb1 蛋白質及び NPTII 蛋白質の一日平均予想摂取量の一日蛋白摂取量に対する割合は、それぞれ 0.000174%、0.0000002% と極めて少ない。

3) 遺伝子産物の毒性に関する事項

Cry3Bb1 蛋白質及び NPTII 蛋白質について、マウスを用いた強制経口投与試験を行った結果、それぞれ最大投与量 2,980 mg/kg、5,000 mg/kg まで投与してもマウスに有害な影響は認められなかった。この投与量は、加工損失がないと仮定して、日本人 (体重 50kg) がとうもろこしから摂取する Cry3Bb1 蛋白質及び NPTII 蛋白質の一日最大予想摂取量 140 µg、0.152 µg の、それぞれ 106 万倍、16 億倍に相当する。

また、毒素配列データベースを用いて検索を行った結果、Cry3Bb1 蛋白質及び NPTII 蛋白質と既知の毒性蛋白質との間に相同性は認められなかった。

4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

Cry3Bb1 蛋白質は酵素活性をもたないため、代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。また、NPTII 蛋白質は基質特異性が高く、その基質となり得る化合物又は分子はとうもろこし中には存在しない。

5) 宿主との差異に関する事項

主要構成成分 (アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル他) について、既存のとうもろこしとの間で比較したところ、いくつかの項目で統計学的に有意な差が認められたものの、圃場間での一致もなく、いずれも文献値の範囲内であったことから、生物学的に意味のある差異はないと考えられた。

6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

1998 年から 1999 年にかけて米国で野外試験が行われているが、MON863 系統の生存・増殖能力は非組換えとうもろこしと同等であった。

7) 組換え体の生存及び増殖能力の制限に関する事項

MON863 系統の生存・増殖能力は非組換え品種と同等であることから、生存・増殖能力の制限要因についても両者の間に変化はないと考えられた。

8) 組換え体の不活化法に関する事項

MON863 系統は、物理的防除 (耕耘) や化学的防除 (感受性を示す除草剤の散布) など、とうもろこしを枯死させる従来の方法によって不活化される。

9)諸外国における認可、食用等に関する事項

MON863 系統については、米国において、2000 年 9 月に食品及び飼料としての安全性評価の申請を行っており、2002 年 1 月中には認可される予定となっている。また、2001 年 5 月に無規制裁培の申請を行っており、2002 年の春には認可される予定である。

10)作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON863 系統と既存のとうもろこしの栽培方法の相違は、鞘翅目害虫の防除に薬剤散布を必要とするか否かの点のみであり、他の点では同等である。

11)種子の製法及び管理方法に関する事項

MON863 系統の製法及び管理方法については、既存のとうもろこしと同様である。

III 基準適合性に関する結論

以上のことから、日本モンサント株式会社から申請された鞘翅目害虫抵抗性トウモロコシ MON863 系統については、申請に際して提出された資料を審査基準に基づき審査した結果、人の健康をそこなうおそれがあると認められないと判断される。