

遺伝子組換え食品等評価書

低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤
グリホサート耐性ダイズ MON87705 系統

2012年8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	6
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	7
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	7
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	8
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 ..	8
6. 安全な摂取に関する事項	8
7. 近縁の植物種に関する事項	8
第 4. ベクターに関する事項	8
1. 名称及び由来に関する事項	8
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	9
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	9
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	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	13
第 6. 組換え体に関する事項	13
1. 遺伝子導入に関する事項	13
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	14
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	15
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.....	15
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.....	17
7. 宿主との差異に関する事項	17
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項	19
9. 栽培方法に関する事項	19
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項	19
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	19
III. 食品健康影響評価結果	19
<参照>	20

<審議の経緯>

2011年10月11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（厚生労働省発食安第1011第1号）、関係書類の接受
2011年10月13日	第403回食品安全委員会（要請事項説明）
2011年10月31日	第97回遺伝子組換え食品等専門調査会
2012年5月21日	第104回遺伝子組換え食品等専門調査会
2012年6月21日	第436回食品安全委員会（報告）
2012年6月21日から7月20日	国民からの御意見・情報の募集
2012年8月10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8月20日	第443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>

2012年6月30日まで	2012年7月1日から
小泉直子（委員長）	熊谷 進（委員長）
熊谷 進（委員長代理）	佐藤 洋（委員長代理）
長尾 拓	山添 康（委員長代理）
野村一正	三森国敏（委員長代理）
畑江敬子	石井克枝
廣瀬雅雄	上安平冽子
村田容常	村田容常

<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>

澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	手島玲子
宇理須厚雄	中島春紫
橘田和美	飯 哲夫
児玉浩明	和久井信
澁谷直人	

（専門参考人）

石見佳子

要 約

「低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ MON87705 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、ダイズ由来の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子及び脂肪酸加水分解酵素遺伝子の一部の領域からなる DNA 断片を導入して作出されており、ジーンサイレンシングにより、種子中のオレイン酸含有量が高まるとされている。なお、本系統には、選択マーカーとして利用するために *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 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、非組換えダイズ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、本系統については、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：低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ
MON87705 系統

性質：低飽和脂肪酸、高オレイン酸含有及び除草剤グリホサート耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ MON87705 系統」（以下「ダイズ MON87705」という。）は、ダイズ由来の脂肪酸不飽和化酵素遺伝子（*FAD2-1A* 遺伝子）の一部の領域からなる *FAD2-1A* 遺伝子断片及びダイズ由来の脂肪酸加水分解酵素遺伝子（*FATB1-A* 遺伝子）の一部の領域からなる *FATB1-A* 遺伝子断片を導入して作出されている。これらの遺伝子断片によってジーンサイレンシングが誘導され、ダイズ内在性の *FAD2* 遺伝子がコードする $\Delta 12$ デサチュラーゼ及び *FATB* 遺伝子がコードするアシル-アシルキャリアータンパク質（アシル-ACP）チオエステラーゼの発現が抑制される。その結果、種子中のオレイン酸の含有量が増加し、パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸の含有量が低下するとされている。

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 *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 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、マメ科 *Glycine* 属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の商業品種 A3525 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片の供与体はダイズであり、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は *Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片がジーンサイレンシングを誘導することによって、*FAD2* 遺伝子^a及び *FATB* 遺伝子^bの発現を抑制する。

^a *FAD2* 遺伝子は *FAD2-1* 及び *FAD2-2* 遺伝子のサブファミリーを持つ。*FAD2-1A* 遺伝子は *FAD2-1* 遺伝子のサブファミリーの1つである。

^b *FATB* 遺伝子は *FATB1* 及び *FATB2* 遺伝子のサブファミリーを持つ。*FATB1-A* 遺伝子は *FATB1* 遺伝子のサブファミリーの1つである。

改変 *cp4 epsps* 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、改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現する。

FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片並びに改変 *cp4 epsps* 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

ダイズの起源は中国であると言われている。日本には弥生時代に伝来、栽培が始まったと考えられており、古くから食品として利用されている。

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（タンパク質、脂質等）等の種類及びその量の概要

ダイズ種子の主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 33.19～45.48%、総脂質 8.10～23.56%、灰分 3.89～6.99%、炭水化物 29.6～50.2%である（参照 1）。

(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

ダイズ種子の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、トリプシンインヒビター 19.59～118.68 TIU^c/mg、レクチン 0.11～9.04 HU^d/mg、ダイゼイン 60.0～2,453.5mg/kg、ゲニステイン 144.3～2,837.2 mg/kg、グリシテイン 15.3～310.4 mg/kg、スタキオース 1.21～3.50%、ラフィノース 0.21～0.84%及びフィチン酸 0.41～1.96%である（参照 1,2）。

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

ダイズ MON87705 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のダイズと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

ダイズ MON87705 の可食部位は、従来のダイズと変わらない。

(3) 摂取量

ダイズ MON87705 の摂取量は、従来のダイズと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ダイズ MON87705 の調理及び加工方法は、従来のダイズと変わらない。

^c TIU : trypsin inhibitor unit

^d HU : hemagglutinating unit

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

脂肪酸組成の比較において、宿主以外にオレイン酸を多く含有する植物油を比較対象とした。

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

ダイズ MON87705 は、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片の導入によって種子中のオレイン酸含有量が有意に増加し、パルミチン酸、ステアリン酸及びリノール酸の含有量が有意に減少すること並びに改変 *cp4 epsps* 遺伝子の導入によって改変 CP4 EPSPS タンパク質が発現することが宿主との相違点である。

以上、1～6により、ダイズ MON87705 の安全性評価においては、既存のダイズ等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

ダイズ MON87705 は、種子中の単価不飽和脂肪酸であるオレイン酸の含有量が高められ、多価不飽和脂肪酸であるリノール酸の含有量が減少するとされている。オレイン酸は、ヒト血中の LDL コレステロールを低下させるが HDL コレステロールを低下させないことが報告されている（参照 3,4）。また、多価不飽和脂肪酸の含有量の減少により、水素添加を行わなくても油の熱安定性を保つことができるとしている。

なお、本系統の作出過程における選択マーカーとして利用するために改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されており、除草剤グリホサートに対する耐性が付与されている。

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、マメ科 *Glycine* 属に属するダイズ (*G. max* (L.) Merr.) の商業品種 A3525 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

ダイズ (*Glycine* 属) の起源は、アジアとオーストラリアであり、植物学的には、*Glycine* 属は *Glycine* 亜属と *Soja* 亜属に分かれる。*Soja* 亜属にはダイズの他に、ダイズの祖先である野生ダイズの一つであるツルマメが含まれる。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズ種子には、有害生理活性物質であるトリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン類、スタキオース、ラフィノース及びフィチン酸が含まれている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ダイズはアレルギー誘発性が知られている主要食物の一つである。代表的なアレルゲンとして、ダイズ疎水性タンパク質、ダイズプロフィリン、ダイズ液胞タンパク質、グリシニン、 β -コングリシニン、トリプシンインヒビター等が知られている。

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

ダイズには、真菌類、寄生虫及び細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示すことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

ダイズは、豆腐、味噌等の様々な食品に加工されており、これらを通じてヒトに摂取されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ダイズの近縁種であるツルマメには、トリプシンインヒビター、フィチン酸、ラフィノース等の有害生理活性物質が含まれている。

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 PV-GMPQ/HT4404 の構築には、ベクターB 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

ベクターB 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

ベクターB 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

ベクターB 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

ベクターB にはストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

ベクターB 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

FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片の由来はダイズであり、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の由来は *Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(2) 安全性に関する事項

FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片の供与体であるダイズは、古くから多くの食経験がある。また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株は、ヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

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

FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片は、ダイズ由来の *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の一部の領域の塩基配列を基にして構築された。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現が最適となるように *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列を改変することによって構築された遺伝子である。クローニングの過程で、*cp4 epsps* 遺伝子がコードするアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

挿入 DNA の構成要素は表 1、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

・ *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片

FAD2 遺伝子は種子中でオレイン酸からリノール酸への生合成を触媒する $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする。*FAD2-1A* 遺伝子断片の導入によって、ジーンサイレンシングを引き起こし、内在性の *FAD2* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、内在性の $\Delta 12$ デサチュラーゼが産生されず、オレイン酸からリノール酸への生合成が阻害され、種子中のオレイン酸含有量が高まるとされている。

FATB 遺伝子はアシル-ACP チオエステラーゼをコードし、飽和脂肪酸残基を持つアシル-ACP を加水分解することにより、飽和脂肪酸は ACP から切り離され、それ以上炭素鎖が伸長しなくなる。*FATB1-A* 遺伝子断片の導入によって、ジーンサイレンシングを引き起こし、内在性の *FATB* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、内在性のアシル-ACP チオエステラーゼが産生されず、飽

和脂肪酸が ACP と切り離されずに炭素鎖伸長反応が継続してオレイン酸の生合成が促進される。よって、種子中のオレイン酸含有量が高まり、パルミチン酸及びステアリン酸含有量が低くなることとなる。

FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片は、導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域の両方に含まれており、それらが隣接して逆方向に導入されることで、*FAD2-1A*・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセットとして機能するとされている。

ダイズ MON87705 において、内在性の *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の発現が抑制されていることを確認するためにノーザンブロット分析を行った結果、mRNA 量の蓄積が抑制されていることが確認された。実際に、ダイズ MON87705 由来のダイズ油は従来のダイズ油と比較してオレイン酸含有量が増加し、リノール酸、パルミチン酸及びステアリン酸の含有量が減少していることが確認された。

・ 改変 *cp4 epsps* 遺伝子

改変 *cp4 epsps* 遺伝子がコードする改変 CP4 EPSPS タンパク質は、CP4 EPSPS タンパク質の改変タンパク質である。CP4 EPSPS タンパク質は、EPSPS 活性を阻害する除草剤グリホサートの存在下でも EPSPS 活性を示すことができる（参照 5）。

改変 CP4 EPSPS 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、毒性タンパク質データベース（TOX_2009^o）を用いて FASTA 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 6）。

（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 PV-GMPQ/HT4404 はストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を有するが、ダイズ MON87705 には導入されていないことがサザンブロット分析により確認されている。

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

FAD2-1A・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセットのプロモーターは、ダイズ由来の *7S α '* プロモーターである（参照 7）。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子プロモーターは、シロイヌナズナ由来の *EF-1 α* 遺伝子プロモーターと Figwort Mosaic virus (FMV) 由来の 35S RNA プロモーターのエンハンサー配列を結合させた *FMV/EF-1 α* プロモーターである（参照 8,9）。

^o TOX_2009: GenBank (GenBank protein database, 169.0 版、2008 年 12 月 16 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース (PROTEIN) をもとに作成したデータベースで、7,651 配列のサブセット。

(2) ターミネーターに関する事項

FAD2-1A・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセットのターミネーターは、*Gossypium barbadense* (ワタ) 由来の *H6* 遺伝子の 3' 非翻訳領域配列である (参照 10)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子のターミネーターはエンドウの *RbcS2* 遺伝子由来の *E93'* 非翻訳領域配列である (参照 11)。

(3) その他

FAD2-1A・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセットには、ダイズの β -コングリシニン貯蔵タンパク質をコードする *Sphas1* 遺伝子由来のリーダー配列が挿入されている (参照 7)。改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットには、シロイヌナズナ由来の *EF-1 α* リーダー配列及びイントロン配列 (参照 8)、改変 CP4 EPSPS タンパク質を細胞質から葉緑体へと移動させるためにシロイヌナズナの *shkG* 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列が挿入されている (参照 12)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを有するベクター B に *FAD2-1A* 遺伝子断片、*FATB1-A* 遺伝子断片等を挿入することによって、導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 を構築した。

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 PV-GMPQ/HT4404 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 PV-GMPQ/HT4404 の T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域には、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 6)。

(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

導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の意図する挿入領域は、T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域のそれぞれの右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までの領域である。

(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 PV-GMPQ/HT4404 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化されている。

表1 ダイズ MON87705 への挿入 DNA①

構成 DNA	由来及び機能
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	
FMV/EF-1 α 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) シロイヌナズナ由来の <i>EF-1α</i> プロモーターに FMV 由来の 35S RNA のエンハンサー配列を結合させたプロモーター
L- <i>EF-1α</i>	<i>EF-1α</i> 遺伝子のリーダー配列
I- <i>EF-1α</i>	<i>EF-1α</i> 遺伝子のイントロン配列
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ由来の EPSPS タンパク質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の改変 CP4 EPSPS タンパク質をコードする遺伝子
<i>E9</i> 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) エンドウ由来のリブローズ 1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3' 非翻訳領域
(FAD2-1A・FATB1-A 遺伝子発現抑制カセット構成要素 1)	
7S α ' プロモーター	ダイズの β -コングリシニン貯蔵タンパク質をコードする <i>Sphas1</i> 遺伝子に由来するプロモーター及びリーダー配列
FAD2-1A (部分配列)	ダイズの FAD2-1A 遺伝子の一部の領域からなる配列
FATB1-A (部分配列)	ダイズの FATB1-A 遺伝子の一部の領域からなる配列
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

表2 ダイズ MON87705 への挿入 DNA②

構成 DNA	由来及び機能
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(FAD2-1A・FATB1-A 遺伝子発現抑制カセット構成要素 2)	
H6 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>G. barbadense</i> 由来の H6 遺伝子の 3' 非翻訳領域配列

<i>FAD2-1A</i> (部分配列)	ダイズの <i>FAD2-1A</i> 遺伝子の一部の領域からなる配列
<i>FATB1-A</i> (部分配列)	ダイズの <i>FATB1-A</i> 遺伝子の一部の領域からなる配列
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法によって導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 を宿主に導入した後、グリホサートを含む培地で選抜することによって、再生個体が得られた。得られた再生個体について、一般的なダイズの育成プロセスに従い、自殖を行うことによってダイズ MON87705 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

ダイズ MON87705 のゲノム中に、*FAD2-1A*・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセット構成要素 1 及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域と *FAD2-1A*・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセット構成要素 2 を含む T-DNA II 領域が隣接して、それぞれ 1 コピー挿入されていることがサザンブロット分析で確認された (参照 13)。

導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の外骨格領域がダイズ MON87705 のゲノムに挿入されていないことがサザンブロット分析で確認された (参照 13)。

ダイズ MON87705 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の T-DNA 領域と比較した結果、T-DNA I 領域では LB の 183 bp の欠失、*FATB1-A* 配列に続く介在配列の 30 bp の欠失及び RB の欠失を除き、塩基配列は一致していた。T-DNA II 領域では LB の 167 bp の欠失、*FATB1-A* 配列の 30 bp の欠失、それに続く介在配列及び RB の欠失を除き、塩基配列は一致し、T-DNA I 領域とは逆向きに挿入されていることが確認された。また、T-DNA I 領域と T-DNA II 領域の間に RB 由来の 20 bp 及び LB 由来の 38 bp の挿入が確認された (参照 13)。

ダイズ MON87705 の挿入 DNA 近傍配列と宿主ゲノムを比較した結果、DNA 挿入に伴う 36 bp の欠失及び 5'末端側に 3'近傍配列由来 DNA 断片 (2,374 bp) の挿入を除き、塩基配列は一致していた。したがって、近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された (参照 13)。

ダイズ MON87705 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 (895 bp)、欠失した 36 bp 及び 3'末端近傍配列 (2,704 bp) について、公的に利用できるデータベース (GenBank) を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結

果、blastn 検索において、95%以上の相同性のある配列は認められなかった。また、blastx 検索において、相同性の高い配列の多くはレトロトランスポゾンの逆転写酵素であった。しかし、この配列はフレームシフト変異、多くの塩基配列の欠失及び停止コドンを含んでおり、既知の遺伝子としての機能は既に失われていると考えられた。したがって、DNA の挿入によって、ダイズの既知の内蔵性遺伝子は損なわれていないと考えられた（参照 14）。

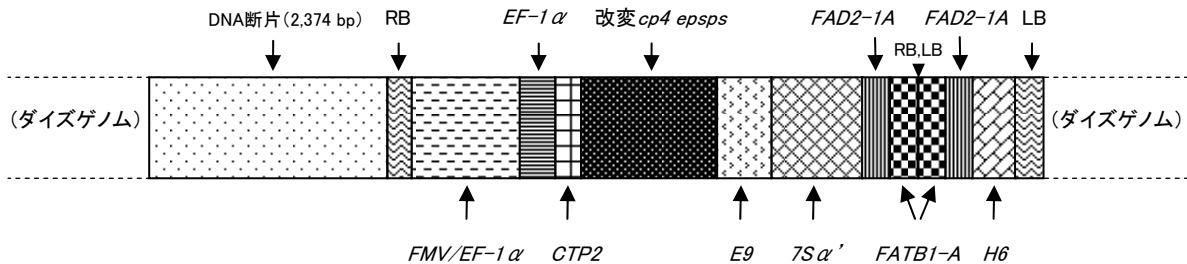


図1 ダイズ MON87705 に挿入された DNA (模式図)

(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

ダイズ MON87705 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (3,279 bp) 及び 3'末端近傍配列 (2,713 bp) 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、六つの読み枠において、ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 8 アミノ酸以上の ORF が 12 個見いだされた。12 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、毒性タンパク質データベース (TOX_2009)、タンパク質データベース (PRT_2009^f) 及びアレルゲンデータベース (AD_2009^g) を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質やアレルゲンは見いだされなかった。さらに、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2009 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 15）。

5'末端に挿入された 3'近傍配列由来の DNA 断片 (2,374 bp) とダイズゲノム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、六つの読み枠において ORF 検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸以上の ORF が 6 個見いだされた。6 個の ORF の既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性と抗原決定基の有無を確認した結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲン、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 16）。

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

^f PRT_2009: GenBank (GenBank protein database, 169.0 版、2008 年 12 月 16 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるデータベース (PROTEIN) で、14,717,352 配列のサブセット。

^g AD_2009: FARRP (Food Allergy Research and Resource Program Database) から得られた配列を元に作成されたデータベース。

・ *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片転写産物

ダイズ MON87705 の種子における *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の発現が抑制されていることを確認するためにノーザンブロット分析を行った結果、mRNA の蓄積が抑制されていることが確認された。一般的にジーンサイレンシングを誘導させるために転写された mRNA は分解されることが知られており（参照 17,18）、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片がタンパク質に翻訳されている可能性は低いと考えられた。

・ 改変 CP4 EPSPS タンパク質

ダイズ MON87705 の葉、根、地上部及び種子における改変 CP4 EPSPS 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 19）。

表 3 ダイズ MON87705 における改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量
(単位は $\mu\text{g/g}$ 新鮮重)

分析組織*	改変 CP4 EPSPS タンパク質
葉	11~230
根	14~34
地上部	22~40
種子	35~190

* 葉は 3 葉期~16 葉期の値を示した。

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

日本人一人が一日に摂取するダイズ加工品及び味噌・醤油の摂取量 85.0 g（参照 20）をすべてダイズ MON87705 に置き換えて改変 CP4 EPSPS タンパク質の摂取量を計算すると、ダイズ MON87705 の成熟種子における改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量平均（100 $\mu\text{g/g}$ ）より、8.5 mg となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 69.8 g（参照 20）に占める割合は 1.2×10^{-4} 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

改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium sp.* に関してアレルギー誘発性の報告はない（参照 21）。

(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

*Escherichia coli*で発現させた改変 CP4 EPSPS 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 15 秒以内に消化されることが確認された（参照 22）。また、ウェスタンブロット分析においても、試験開始後 15 秒以内に消化されることが確認された（参照 22）。

② 人工腸液に対する感受性

*E. coli*で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、100 分で完全に消化されることが確認された（参照 23）。

③ 加熱処理に対する感受性

*E. coli*で発現させた改変 CP4 EPSPS 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 分析を行った結果、改変 CP4 EPSPS タンパク質は、75°C、15 分間及び 30 分間の加熱処理に対して免疫反応性が失われることが確認された（参照 24）。

(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、AD_2009 を用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン等は見いだされなかった（参照 6）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2009 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 6）。

上記、(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

ダイズ MON87705 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、4 世代のダイズ MON87705 について挿入遺伝子の期待分離比と実測値を比較した。その結果、H6ターミネーターは、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 25）。

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、4 世代のダイズ MON87705 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検出され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認さ

れた（参照 13）。

さらに、改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現の安定性を確認するために、4 世代のダイズ MON87705 の種子から抽出した試料を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、いずれの世代においても改変 CP4 EPSPS タンパク質が発現していることが確認された（参照 26）。

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

・ *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片

FAD2 遺伝子は種子中でオレイン酸からリノール酸への生合成を触媒する $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードする。*FAD2-1A* 遺伝子断片の導入によって、ジーンサイレンシングを引き起こし、内在性の *FAD2* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、内在性の $\Delta 12$ デサチュラーゼが産生されず、オレイン酸からリノール酸への生合成が阻害され、種子中のオレイン酸含有量が高まることとなる。

FATB 遺伝子は飽和脂肪酸基を持つアシル-ACP を加水分解するアシル-ACP チオエステラーゼをコードする。*FATB1-A* 遺伝子断片の導入によって、ジーンサイレンシングを引き起こし、内在性の *FATB* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、内在性のアシル-ACP チオエステラーゼが産生されず、飽和脂肪酸が ACP と切り離されずに炭素鎖伸長反応が継続してオレイン酸の生合成が促進される。よって、種子中のオレイン酸含有量が高まり、パルミチン酸及びステアリン酸含有量が低くなることとなる。

・ 改変 CP4 EPSPS タンパク質

改変 CP4 EPSPS タンパク質は、シキミ酸合成経路（芳香族アミノ酸合成経路）の律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、改変 CP4 EPSPS タンパク質は、基質であるホスホエノールピルビン酸塩（PEP）とシキミ酸-3-リン酸塩（S3P）と特異的に反応することが知られている。したがって、改変 CP4 EPSPS タンパク質の作用機作は独立しており、植物の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

チリ又は米国のほ場で栽培されたダイズ MON87705 と宿主である非組換えダイズについて、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類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 27,28）。

(1) 主要構成成分

種子及び地上部の水分、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について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズ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ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であ

った。

(2) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 26 種類について分析を行った結果、オレイン酸は有意に増加し、リノール酸、パルミチン酸及びステアリン酸が有意に減少した。これら以外の脂肪酸については、対照に用いた非組換えダイズ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ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内もしくは ILSI データベースの範囲内であった。なお、ステアリン酸は、一般の商業ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲を超えて有意に減少していたが、ILSI データベースの範囲内であった。

ナタネ油やオリーブ油はオレイン酸含有率が高く（参照 29,30,31）、ダイズ MON87705 由来のダイズ油と同様の脂肪酸組成である。このような高オレイン酸含有の植物油は食経験が豊富であると考えられる。

我が国においては、リノール酸を含む n-6 系脂肪酸の目安量は一日当たり 8.7 g とされており（参照 32）、日本人が摂取する n-6 系脂肪酸の 98% がリノール酸であるとの報告を基に計算すると、リノール酸を一日当たり 8.5 g 摂取していると推定される。日本人一人が一日に摂取するダイズ加工品及びダイズ油をダイズ MON87705 由来のものに置き換えた場合のリノール酸摂取量は、日本人の脂質摂取量から推定されたリノール酸摂取量の範囲内であった。また、この値は、FAO/WHO により報告されているリノール酸の一日摂取許容区間（参照 33）の範囲内であり、国際脂肪酸・脂質学会（ISSFAL）により報告されている摂取目安量（参照 34）を上回っている。したがって、リノール酸含有量の有意な減少による栄養学的な影響はないと考えられた。

我が国におけるパルミチン酸を含む飽和脂肪酸の摂取目標量（下限）は、摂取エネルギーの 4.5% とされており（参照 32）、日本人一人が一日に摂取するダイズ加工品及びダイズ油をダイズ MON87705 由来のものに置き換えた場合の飽和脂肪酸の摂取量は摂取目標量（下限）を上回っている。また、乳製品、肉等の食品からも日常的に摂取されており、ダイズ MON87705 におけるパルミチン酸含有量の有意な減少による影響はないと考えられた。

以上のことから、ダイズ MON87705 において、意図した脂肪酸組成の変化がヒトの健康に影響を及ぼすとは考えにくい。

(3) アミノ酸組成

種子のアミノ酸 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ダイズ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ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(4) ミネラル類

種子のカルシウム、銅等の主要なミネラル 9 種類の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えダイズ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非組換えダイズの分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(5) ビタミン類

種子のビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ナイアシン、パントテン酸、葉酸及びビタミン 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ダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(6) 有害生理活性物質

種子のレクチン、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース及びトリプシンインヒビター並びにイソフラボン類 (ダイゼイン、ゲニステイン及びグリシテイン) について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。

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・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2011 年 1 月に確認が終了した。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、2011 年 12 月に承認を得た。

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 9 月に承認を得た。

EU においては、2010 年 2 月に欧州食品安全機関 (EFSA) に対する食品・飼料及び輸入のための申請を行った。

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) に対する食品としての安全性審査の申請が行われ、2011 年 7 月に承認を得た。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ MON87705 の栽培方法については、従来のダイズと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ダイズ MON87705 の種子の製法及び管理方法については、従来のダイズと同じである。

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 までにより、安全性の知見が得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ MON87705 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 ILSI. 2008. International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Version 3.0 <http://www.cropcomposition.org> . Search criteria soybean seed, all locations, all years, all proximates, amino acids, fatty acids, bio-actives, fiber, dry weight other than moisture [Accessed June 3, 2008]
- 2 Lundry, D.R., W.P. Ridley, J.J. Meyer, S.G. Riordan, M.A. Nemeth, W.A. Trujillo, M.L. Breeze, and R. Sorbet. 2008. Composition of grain, forage, and processed fractions from second-generation glyphosate-tolerant soybean, MON 89788, is equivalent to that of conventional soybean (*Glycine max* L.). *J Agric Food Chem* 56:4611-4622.
- 3 Kris-Etherton, P.M. 1995. Trans acids and coronary heart disease risk. Report of the expert panel on trans fatty acids and coronary heart disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 63:655S-708S.
- 4 Hu, F.B., M.J. Stampfer, J.E. Manson, E. Rimm, G.A. Colditz, B.A. Rosner, C.H. Hennekens, and W.C. Willett. 1997. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 337:1491-1499.
- 5 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore, and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*, S.O. Duke, (ed.) CRC Press, New York.
- 6 Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2009 and TOX_2009 Databases (MSL-0021842) (社内報告書)
- 7 Doyle, J.J., M.A. Schuler, W.D. Godette, V. Zenger, R.N. Beachy and J. L. Slightom. 1986. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *J Biol Chem* 261:9228-9238.
- 8 Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie, and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α : molecular cloning, characterization and expression. *Mol Gen Genet* 219:106-112.
- 9 Richins, R.D., H.B. Scholthof, and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Res.* 15:8451-8466.
- 10 John, M.E., and G. Keller. 1995. Characterization on mRNA for a proline-rich

- protein of cotton fiber. *Plant Physiol* 108:669-676.
- 11 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards, and N.H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* 3:1671-1679.
 - 12 Klee, H.J., Y.M. Muskopf, and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol Gen Genet* 210:437-442.
 - 13 Amended Report for MSL0022130: Molecular Analysis of Soybean MON 87705 (MSL0022384) (社内報告書)
 - 14 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87705: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL-0022136) (社内報告書)
 - 15 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87705: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0021929) (社内報告書)
 - 16 Additional Bioinformatic Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' Junction of the Inserted DNA in MON 87705: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0022346) (社内報告書)
 - 17 Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
 - 18 Waterhouse P.M., and C.A. Helliwell. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4: 29-38
 - 19 Assessment of CP4 EPSPS Protein Levels in Leaf, Seed, Root, and Forage Tissues from MON87705 soybean Grown in 2007/2008 Chile Field Trials (MSL-0021832) (社内報告書)
 - 20 健康・栄養情報研究会 編 2009 国民健康・栄養の現状 平成 18 年国民健康・栄養調査報告 第一出版
 - 21 FAO/WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of joint FAO/WHO consultation, World Health Organization, Geneva.
 - 22 Assessment of the in vitro digestibility of purified E. coli-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid (MSL17566) (社内報告書)
 - 23 Assessment of the in vitro digestive fate of CP4 EPSPS synthase (MSL12949) (社内報告書)
 - 24 Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (MSL0022764) (社内報告書)
 - 25 Heritability and Stability of Genes Present in Biotechnology-Derived Soybean MON 87705 Across Multiple Generations (RPN-08-504) (社内報告書)
 - 26 Western Blot analysis of CP4 EPSPS Protein in MON 87705 Mature Soybean Seed across Multiple Generations Produced in the United States and Puerto Rico during 2006 and 2007 in Support of a Japan Stage III Application

- (MSL0021243) (社内報告書)
- 27 Composition Analyses of Forage and Seed Collected from MON 87705 Produced in Chile during the 2007-2008 Growing Season (MSL0021756) (社内報告書)
 - 28 Analysis of Minerals and B Vitamins of Seed Collected from MON 87705 Grown in the United States during 2009 (RAR-2011-0452) (社内報告書)
 - 29 Codex. 2003. Codex standard for olive oils and olive pomace oils. Codex-STAN 33.
 - 30 Codex. 2005. Codex standard for named vegetable oils. Codex-STAN 210.
 - 31 五訂増補食品成分表 2009 資料編 (2008) 女子栄養大学出版部
 - 32 厚生労働省 2009、日本人の食事摂取基準 (2010 年版)
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/s0529-4.html>
 - 33 FAO/WHO. 2008. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and World Health Organization (WHO), Geneva.
 - 34 ISSFAL.1999. Workshop on the Essentiality of and Recommended Dietary Intakes (RDI) for Omega-6 and Omega-3 Fatty Acids.