

「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 *B.t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7」に係る安全性確認

I はじめに

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 *B.t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7(以下「Event DAS-59122-7」という。))について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名 : 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
B.t. Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7
性質 : 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
申請者 : デュポン株式会社
開発者 : ダウ・アグロサイエンス社(Dow AgroScience LLC)
パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社

Event DAS-59122-7 は、Cry34Ab1 たん白質、Cry35Ab1 たん白質及び PAT たん白質を発現する *cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び *pat* 遺伝子を導入したものであり、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の性質を付与されている。

Event DAS-59122-7 と既存のトウモロコシとの相違は、Event DAS-59122-7 が Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質の発現によりコウチュウ目害虫に抵抗性を持つ点と、PAT たん白質の発現によりグルホシネートの影響を受けない点だけである。

一般に、トウモロコシは主にその穀粒が家畜等の飼料として使用される。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

1 遺伝的素材に関する事項

宿主に用いた植物はトウモロコシ(*Zea mays* L.)で、イネ科トウモロコシ属に属する。導入に用いた *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、土壤中のグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株に由来(参考文献①)し、*pat* 遺伝子は、土壤中のグラム陽性放線菌である *Streptomyces viridochromogenes* に由来する(参考文献②)。*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、米国のトウモロコシ栽培において最も防除が必要とされる害虫であるコーンルートワームに対する抵抗性を付与する Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質を発現し、*pat* 遺伝子は、グルホシネートに対する耐性を付与する PAT たん白質を発現する。

2 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

宿主であるトウモロコシ(デント種)の主な利用目的は飼料用であり、広範囲な家畜等の飼養経験を持つ。

3 飼料の構成成分等に関する事項

穀粒の主要組成(乾物重%)は、たん白質 10.0%、脂質 4.69%、繊維質 2.30%、ADF3.50%、NDF10.8%、灰分 1.55%、炭水化物 83.8%であった。また、茎葉部の主要組成(乾物重%)は、たん白質 6.45%、脂質 2.73%、繊維質 24.0%、ADF31.7%、NDF49.4%、灰分 5.60%、炭水化物 85.2%であった。

栄養阻害物質であるフィチン酸含有量は 0.877%(乾物重中)、トリプシンインヒビター含有量は 2.820TIU/g 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事項

① 収穫時期と貯蔵方法

収穫時期及び貯蔵方法は、既存のトウモロコシと変わらない。

② 家畜等の摂取(可食)部位

摂取(可食)部位は、既存のトウモロコシと変わらない。

③ 家畜等の摂取量

摂取(可食)部位、調製及び加工方法は既存のトウモロコシと変わらない。したがって、家畜等の摂取量についても既存のトウモロコシと変わらないと考えられる。

④ 調製及び加工方法

調製及び加工方法は、既存のトウモロコシと変わらない。

以上 1.1～1.4 により、Event DAS-59122-7 の飼料としての安全性を評価するために、既存の飼料を比較対照として用いる方法が適用できると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

Event DAS-59122-7 は、コウチュウ目害虫であるコーンルーツワームに対して抵抗性を示し、また、グルホシネートに耐性を示す。結果として、Event DAS-59122-7 の栽培により、大豆との輪作や殺虫剤散布を行なわなくても、コーンルーツワームに対し効果的な防除を行なうことが可能となり、農家に対し、本害虫防除のための新たな選択肢を提供するものと期待されている。また、トウモロコシ畑でも本除草剤を雑草防除に使用することが可能となり、農家に雑草防除のための選択肢を提供することが期待されている。

3 宿主に関する事項

1 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

宿主はイネ科トウモロコシ属トウモロコシに属するトウモロコシ(*Zea mays* L.)である。

2 遺伝的先祖に関する事項

一般的には、紀元前 5,000 年のメキシコあるいはグアテマラが原産地と考えられている。植物学的起源は、育種過程でテオシントから派生したとする説が有力とされている(参考文献③)。

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④)。栄養阻害物質としてはフィチン酸及びトリプシンインヒビターが知られている。トリプシンインヒビターについては、トウモロコシ中の含有量が低いため栄養学的に問題にならないとされている(参考文献⑤)。

4 寄生性及び定着性に関する事項

トウモロコシには、寄生性及び定着性は知られていない。

5 ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

トウモロコシに感染する病原体は知られているが、家畜等に対する病原性は報告されていない。

6 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

トウモロコシは栽培作物であり、我が国において自生したという報告はない。

7 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

トウモロコシは種子繁殖する夏型一年生のイネ科植物である。98～99%が他家受粉であり、受粉は風媒によって行なわれる(参考文献⑥)。トウモロコシの近縁植物として、テオシントとトリプサカム属がある。自然条件下でトウモロコシと自然交雑が可能であるのはテオシントのみである。なお、テオシントが我が国に自生しているという報告はない。

8 飼料に利用された歴史に関する事項

トウモロコシの利用の歴史は、およそ紀元前 3,000 年前まで遡ることができ、その後、ヨーロッパ、アフリカ大陸及びアジアへと伝播し、現在、飼料、食品等として広く利用されている。

飼料としての利用は、子実を配合飼料の原料として利用することが最も多く、その他にも、サイレージとして利用する場合、青刈りのまま利用する場合がある。また、ウェットミリング及びドライミリング、アルコール発酵の際の副産物も飼料として利用されている(参考文献③)。

2002 年に我が国に輸入されたトウモロコシのうち、約 1,232 万トンが飼料として用いられ(参考文献⑦)、残りの 410 万トンのうち約 85%がウェットミリングと言われるコーンスターチ用、残り約 15%がドライミリングと言われるコーングリッツ(スナック菓子等)用に使用されている。

9 飼料の安全な利用に関する事項

上記8で述べたように、トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

10 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

トウモロコシは夏型一年生の植物であり越冬性がないため、翌年まで生存することはできない。トウモロコシ種子には休眠性がなく生理的に成熟すると発芽するため、自然環境下で雑草化する可能性は極めて低い。

11 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシの近縁種はテオシントとトリプサカム属であるが、これらについて有害生理活性物質についての報告はない。

4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

Event DAS-59122-7 の形質転換に用いたプラスミド PHP17662 の基となったベクターは、*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株由来の pSB1 である。

2 性質に関する事項

プラスミド PHP17662 の塩基数は、50,321bp である。プラスミド PHP17662 の制限酵素による切断地図、プラスミド PHP17662 に存在する全ての遺伝子は、その由来・機能が明らかになっており、既知の有害塩基配列を含まない。

3 薬剤耐性に関する事項

プラスミド PHP17662 の T-DNA 領域外の外骨格領域には、テトラサイクリンに対する耐性を付与する *tet* 遺伝子及びスペクチノマイシンに対する耐性を付与する *spc* 遺伝子が含まれているが、サザンブロット分析により、これらの抗生物質耐性マーカー遺伝子は宿主に導入されていないことが確認されている。

4 伝達性に関する事項

伝達に関与する配列を含まない。

5 宿主依存性に関する事項

植物、家畜等での増殖を可能とする配列は含まない。

6 発現ベクターの作成方法に関する事項

プラスミド pSB1 に、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセット及び *spc* 遺伝子を挿入し、PHP17662 が作出された。

7 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

アグロバクテリウム法により、プラスミド PHP17662 の T-DNA 領域が宿主に挿入されている。

5 挿入遺伝子に関する事項

1 供与体に関する事項

(1)名称、由来及び分類に関する事項

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、いずれも土壌中のグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株に由来する(参考文献①)。*pat* 遺伝子は、土壌中のグラム陽性放線菌 *Streptomyces viridochromogenes* に由来する(参考文献②)。

(2)安全性に関する事項

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の供与体は、*Bacillus thuringiensis* PS149B1 株である。*B.t.*は、普遍的に土壌中に存在するグラム陽性菌であり、 δ -エンドトキシンとして知られる殺虫性たん白質(*B.t.*たん白質)を産生する。*B.t.*たん白質は、標的害虫の中腸細胞に存在する特異的受容体に結合し細胞に小孔を形成することでイオンチャネルを破壊し、結果的に中腸細胞を破壊し殺虫効果を示す。*B.t.*たん白質の安全性については、これまで多くの試験が行なわれており、家畜等に対しては毒性がないことが示されている(参考文献⑧)。

pat 遺伝子の供与体である *Streptomyces viridochromogenes* は、土壌中に普遍的に存在するグラム陽性菌であり、家畜等に対する病原性は知られていない(参考文献⑨)。

2 遺伝子の挿入方法に関する事項

4.6 及び 4.7 参照。

3 構造に関する事項

プラスミド PHP17662 に含まれる全ての遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

【*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット】

プロモーターには、*Zea mays* 由来のユビキチンプロモーターを用いた(参考文献⑩)。ターミネーターには、*Solanum tuberosum* 由来のプロテアーゼインヒビター II ターミネーターを用いた(参考文献⑪)。

【*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット】

プロモーターには、根における発現が知られている *Triticum aestivum* 由来のペルオキシダーゼプロモーターを用いた(参考文献⑫)。ターミネーターには、*Solanum tuberosum* 由来のプロテアーゼインヒビター II ターミネーターを用いた(参考文献⑬)。

【*pat* 遺伝子発現カセット】

プロモーターには、カリフラワーモザイクウイルス Strasbourg 株由来の *CaMV 35S* プロモーターを用いた。ターミネーターには、カリフラワーモザイクウイルス Strasbourg 株由来の *CaMV 35S* ターミネーターを用いた(参考文献⑭)。

4 性質に関する事項

Event DAS-59122-7 中に導入された *cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットの各構成要素、由来及び機能を表 1 にまとめた。

表 1 導入遺伝子の各構成要素

構成要素	由来及び機能
<i>cry34Ab1</i> 遺伝子発現カセット	
<i>UBI1ZM PRO</i>	<i>Zea mays</i> 由来のユビキチン構成的プロモーター
<i>cry34Ab1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry34Ab1 たん白質をコードする遺伝子
<i>PINII TERM</i>	<i>Solanum tuberosum</i> 由来の転写を停止するためのターミネーター
<i>cry35Ab1</i> 遺伝子発現カセット	
<i>TA Peroxidase PRO</i>	根における発現が知られている <i>Triticum aestivum</i> 由来のプロモーター
<i>cry35Ab1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry35Ab1 たん白質をコードする遺伝子
<i>PINII TERM</i>	<i>Solanum tuberosum</i> 由来の転写を停止するためのターミネーター
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
<i>35S PRO</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S 構成的プロモーター
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来の PAT たん白質をコードする遺伝子
<i>35S TERM</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の転写を停止するためのターミネーター

【*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子】

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子により発現する Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質は、いずれも土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *B.t.*が産生する、 δ -エンドトキシンとして知られる殺虫性たん白質(*B.t.*たん白質)の一種である。これらのたん白質は *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株より新たに発見された(参考文献①)。

これらのたん白質は揃って機能し、これまでの *B.t.*たん白質と同様に、中腸細胞膜に細孔をあけることで中腸細胞膜を破壊し、標的昆虫を死に至らしめることが示唆されている(参考文献⑭)。 *in vivo* 試験で、Cry34Ab1 たん白質は、単独でもコーンルートワームに対して活性を持つことが示されたが、Cry35Ab1 たん白質と一緒に存在すると相乗効果があることが認められている(参考文献⑮)。なお、Cry35Ab1 たん白質単独では、コーンルートワームに対する活性を示さない。

【*pat* 遺伝子】

pat 遺伝子が発現する PAT たん白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、植物にグルホシネートに対する耐性を付与する。

5 純度に関する事項

プラスミド PHP17662 の T-DNA 領域に含まれるすべての遺伝子は、その性質が明らかとなり、純化されている。

6 安定性に関する事項

サザンブロット分析の結果から、プローブにより検出された DNA 断片のサイズ及び数は全て一致し、Event DAS-59122-7 に挿入された 3 種類の遺伝子発現カセットが、安定して後代に遺伝することが示された。

7 コピー数に関する事項

サザンブロット分析の結果から、Event DAS-59122-7 のゲノム中に、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットが、それぞれ 1 コピーずつ導入されたことが確認された。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

Cry34Ab1 たん白質の発現量は、T1S1 世代の穀粒で 34.1~130ng/mgdwt、BC1 世代の穀粒で 28.9~84.8ng/mgdwt であった。

Cry35Ab1 たん白質の発現量は、T1S1 世代の穀粒で 0.67~3.09ng/mgdwt、BC1 世代の穀粒で 0.48~1.58ng/mgdwt であった。

PAT たん白質の発現量は、T1S1、BC1 世代ともに穀粒で検出限界以下であった。

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

プラスミド PHP17662 の T-DNA 領域外の外骨格領域には、微生物中でベクターを増殖する際に、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するための抗生物質耐性マーカー、*tet* 遺伝子及び *spc* 遺伝子が含まれているが、サザンブロット分析により、これらの抗生物質耐性マーカー遺伝子は、Event DAS-59122-7 には導入されていないことが確認された。

- 10 外来の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
遺伝子解析ソフト Vector NTI8.0 を用いた分析により、Event DAS-59122-7 に挿入された遺伝子のオープンリーディングフレームは、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質、PAT たん白質の発現に係るもののみであることが確認された。

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

Event DAS-59122-7 は、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質の発現によりコーンルートワームに対する抵抗性が付与されている。さらに、PAT たん白質の発現により除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

ア Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質と既知毒性たん白質との構造相溶性

公開データベース (GenPept、Swiss-Prot、PIR、Protein Research Foundation、Protein Data Bank 等)に登録されている配列情報を基に、BLASTP により、アミノ酸配列の比較を行なった結果、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質は、既知の毒素たん白質及び家畜に悪影響を与えるような活性を有する酵素と、アミノ酸配列の相溶性を有さないことが確認された。

イ PAT たん白質の安全性

PAT たん白質については、これまでも多くの安全性評価試験が行なわれており、ヒトや動物に対する安全性上の問題のないことが証明されている。本たん白質が、人工胃液中で 15 秒以内に消化されること、哺乳類の胃内環境を模した条件下では 1 分以内に活性を失うこと、GENEBANK に登録されている既知の毒性たん白質とアミノ酸配列の相溶性を示さないこと、並びにマウスに対する 14 日間の連続投与試験において 5,050mg/kg の投与量でも何ら影響が認められなかったこと等が報告されている(参考文献⑨)。

3 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

Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質の物理化学的処理に関する試験には、微生物 (*Pseudomonas fluorescens*) 中で産生させたたん白質を供試した。なお、微生物中で産生させたたん白質と Event DAS-59122-7 中に産生されるたん白質の生化学的同等性を、分子量及び免疫反応性、転写後の糖化の有無、ペプチドマスフィンガープリント解析、N-末端アミノ酸配列の解析を行って確認した。

また、PAT たん白質については、人工胃液中で 15 秒以内に消化されること、哺乳類の胃内環境を模した条件下では 1 分以内に活性を失うことが確認されている(参考文献⑨)。

1) 人工胃液による消化性

Cry34Ab1 たん白質の 90%消化時間は 6.3~6.8 分、Cry35Ab1 たん白質の 97%消化時間は 5 分以内であり、いずれのたん白質も人工胃液中で速やかに消化されることが示された。なお、本試験における消化時間は、ペプシン飽和状態下(0.32%)、pH1.2、37℃でのたん白質の消化性を反応速度理論に基づき計算されたものである。

2) 人工腸液による消化性

SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティング分析の結果、Cry34Ab1 たん白質はトリプシン消化を受けず、240 分後もバンドが検出された。Cry35Ab1 たん白質については、80 分後に検

出限界以下に消化された

3) 加熱処理による変性

コーンスターチに加工するウェットミリング工程を想定し、ウェットミリング浸漬液(2%乳酸及び0.2%硫酸ナトリウム)中において 50℃、48 時間の処理を行なった。なお、本条件では、加熱ではなく、ウェットミリング浸漬液の影響により、たん白質が変化する可能性があったため、20mM のクエン酸緩衝液で 54℃、30 分間及び 100℃、5 分間の加熱条件における検討も合わせて行なった。

SDS-PAGE 及び ELISA 法により分子量変化及び免疫反応性の確認を行ったところ、分子量に変化はなかったが、90%以上免疫反応性が減少することが確認された。

4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項(既存種中の基質と反応する可能性に関する事項を含む。)

Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質は、他の *B.t.* の Cry たん白質と同様に、植物体内で酵素として働くことは報告されていない。また、PAT たん白質は、除草剤グルホシネートの活性成分である *L*-グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有し、*L*-グルホシネートの光学異性体である *D*-グルホシネートをも基質としないことが報告されている(参考文献⑨)。

5 宿主との差異に関する事項

Event DAS-59122-7 と対照の遺伝的背景がほぼ同等な非組換えトウモロコシについて、穀粒中の主要構成成分(たん白質及び脂質、繊維質、灰分、炭水化物)及び脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類、栄養阻害成分等を分析し比較した。なお、主要構成成分及びカルシウムとリンは、穀粒に加え茎葉部についても分析し比較した。

その結果、穀粒のたん白質、灰分、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、トリプトファン、イソロイシン等、カルシウム、葉酸、 α -トコフェロールについて、また、茎葉部の灰分、炭水化物、カルシウム、リンについて統計学的有意差が認められたが、平均値の差はわずかであり、それらの分析値は文献値の範囲内であった。その他の分析値については有意差が認められなかった。また、前述の成分に加えて、ラフィノース及びイノシトール、フルフラール、*p*-クマル酸、フェルラ酸の分析を行なったところ、フルフラールについてはいずれのサンプルからも検出されず、その他の成分については、Event DAS-59122-7 及び非組換え体対照の間に統計学的有意差は認められなかった。

6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

2001 年から 2003 年にかけて、米国、プエルトリコ及びチリで行われた圃場試験の結果、Event DAS-59122-7 の外界における生存及び増殖能力は、既存のトウモロコシと同等であることが確認されている。

7 生存及び増殖能力の制限に関する事項

上述のように、Event DAS-59122-7 の外界における生存及び増殖能力は、既存のトウモロコシと同等であることが示されており、生存及び増殖能力の制限についても既存のトウモロコシと同等であると考えられる。

8 不活化法に関する事項

Event DAS-59122-7 は、グルホシネート以外の除草剤散布及び耕起等による機械的処理によって容易に不活化される。

9 外国における認可等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁(FDA)より、食品と飼料としての安全性について、2004年10月4日付けで承認が得られている。

カナダにおいては、2004年4月7日に、飼料としての安全性確認の申請をカナダ食品検査庁(Canadian Food Inspection Agency)に行なった。

メキシコにおいては、2004年6月8日に、メキシコ保健省(Ministry of Health)へ食品安全性にかかる申請が行なわれ、2004年12月に食品としての安全性が承認され、その後動物保健局(Animal Health)により飼料としての安全性が承認された。

オーストラリアとニュージーランド(2004年7月)、大韓民国(2004年9月)、中華民国(台湾)(2004年9月)、南アフリカ(2005年2月)において Event DAS-59122-7 の食品安全性に係る申請が行なわれた。欧州連合(EU)では、輸入のための申請が2005年1月に行なわれ、栽培に対する申請も2005年の後半に行なう予定である。

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

コウチュウ目害虫の防除に必要な薬剤の使用が不要であること、及び生育期の雑草防除に除草剤グルホシネートを使用できること以外は、Event DAS-59122-7 の栽培方法は既存のトウモロコシと変わらない。

11 種子の製法及び管理方法に関する事項

Event DAS-59122-7 の種子の製法及び管理方法は、既存のトウモロコシと同じである。各種分析に用いた世代の種子は、発芽能力をそなえた状態で、パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社(米国、アイオワ州、ジョンストン)の種子保管庫(温度 50℃、湿度 50%)に保存されている。

7 2から6までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項

- 1 単回投与の毒性に関する試験
- 2 反復投与の毒性に関する試験(短期)
- 3 反復投与の毒性に関する試験(長期)
- 4 世代繁殖に関する試験
- 5 催腫瘍性に関する試験
- 6 変異原性に関する試験
- 7 催奇形性に関する試験
- 8 対象家畜等を用いた飼養試験
- 9 その他必要な試験

2 から 6 までの事項に加え、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質を用い、マウスの強制経口投与試験を行ない、安全性のさらなる確認を行なった。

急性毒性に関する試験

Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質が急性毒性を有しないことを確認するために、微生物中(*Pseudomonas fluorescens*)で産生させた Cry34Ab1 たん白質 2,700mg/kg 又は Cry35Ab1 たん白質 1,850mg/kg を生後 2 ヶ月の雄マウス各 5 個体に単回強制経口投与した。その結果、試験終了時(摂取2週間後)まで、5 個体すべてにおいて、Cry34Ab1 たん白質又は Cry35Ab1 たん白質の影響と考えられる臨床症状は認められず、また病理解剖においても何ら肉眼的な病理学的所見は認めなかった。

さらに、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質を等モル比(1:3)になるように混合し、二つのたん白質を一緒に、生後 2 ヶ月の雌雄マウス各 5 個体に強制経口投与した。投与量は Cry34 Ab1 たん白質 482 mg/kg、Cry35Ab1 たん白質 1,520 mg/kg に相当する。その結果、すべての個体において臨床症状や肉眼的な病理学的所見は認められなかった。

IV 審議結果

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 *B.t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7 について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献

- ① Ellis, R.T., Stockhoff, B.A., Stamp, L., Schnepf, H.E., Schwab, G.E., Knuth, M., Russell, J., Cardineau, G.A. and Narva, K.E. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* Binary Insecticidal Crystal Protein Active on Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. Applied Environmental Microbiology 68: 1137 – 1145.
- ② Eckes, P., Uijtewaal, B., and Donn, G. 1989. A synthetic gene confers resistance against the broad spectrum herbicide L-phosphinothricin in plants. Journal of Cellular Biochemistry. Abstract M516, 13D: 334.
- ③ 菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用 株式会社 光琳.
- ④ White, P.J., and Pollack, L.M. 1995. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition and Nutritive Values. Cereal Foods World 40: 756-762.
- ⑤ OECD. 2002. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 6: Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO(2002)25.
- ⑥ 農学大事典 第 2 次増訂改版 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 1994. 株式会社 養賢堂発行.
- ⑦ 財務省貿易統計. 2002. (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>)
- ⑧ MacKenzie, D., and McLean, M. 2002. Who's afraid of GM feed? FEED MIX 10(3): 16-19.
- ⑨ OECD. 1999. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.
- ⑩ Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. 1992. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Mol. Biol. 18: 675-689.
- ⑪ An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. 1989.

- Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible protease inhibitor II gene. *Plant Cell* 1: 115-122.
- ⑫ Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., Mauch, F., and Dudler, R. 1991. Sequence and tissue specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* 16: 171-174.
 - ⑬ Hohn, T., Richards, K., Genevieve-Lebeurier. 1982. Cauliflower mosaic virus on its way to becoming useful plant vector. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 96: 194-236.
 - ⑭ Masson, L., Schwab, G., Mazza, A., Brousseau, R., Potvin, L., and Schwartz, J-L. 2004. A Novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1) Containing a Cry34Ab1/Cry35Ab1 Binary Toxin Specific for the Western Corn Rootworm *Diabrotica Virgifera Virgifera* LeConte Forms Ion Channels in Lipid Membranes. *Biochemistry* 43, 12349-12357.
 - ⑮ Herman, R.A., Scherer, P.N., Young, D.L., Mihaliak, C.A., Meade, T., Woodsworth, A.T., Stockhoff, B.A., and Narva, K.E. 2002. Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: Effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. *J. Econ. Entomol.* 95: 635-639.