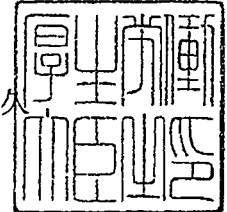




厚生労働省食安第 0318001 号  
平成 17 年 3 月 18 日

薬事・食品衛生審議会  
会長 井村 伸正 殿

厚生労働大臣 尾辻 秀久



諮 問 書

食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）第 19 条第 1 項の規定に基づき、  
下記の事項について、貴会の意見を求めます。

記

「遺伝子組換えアルファルファ」及び「遺伝子組換えアルファルファを主な  
原材料とする加工食品」に関する表示対象品目見直しについて

平成17年6月13日

薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会  
分科会長 吉倉 廣 殿

薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会表示部会  
部会長 丸井 英二

「遺伝子組換えアルファルファ」及び「遺伝子組換えアルファルファを主な原材料とする加工食品」に関する表示対象品目見直しについて

「遺伝子組換えアルファルファ」及び「遺伝子組換えアルファルファを主な原材料とする加工食品」に関する表示対象品目見直しについて、当部会において審議した結果、別添改正案のとおり「遺伝子組換えアルファルファ」及び「遺伝子組換えアルファルファを主な原材料とする加工食品」を表示対象品目とするよう進めることについて議決したので報告する。

○食品衛生法施行規則（昭和二十三年省令第二十三号）

（傍線の部分は改正部分）

改 正 案		現 行
別表第七（第二十一条関係）		別表第七（第二十一条関係）
大豆（枝豆及び大豆もやしを含む。） 一 豆腐類及び油揚げ類 二 凍豆腐、おから及びゆば 三 納豆 四 豆乳類 五 みそ 六 大豆煮豆 七 大豆缶詰及び大豆瓶詰 八 きな粉 九 大豆いり豆 十 第一号から前号までに掲げるものを主な原材料とするもの	大豆（枝豆及び大豆もやしを含む。） 一 豆腐類及び油揚げ類 二 凍豆腐、おから及びゆば 三 納豆 四 豆乳類 五 みそ 六 大豆煮豆 七 大豆缶詰及び大豆瓶詰 八 きな粉 九 大豆いり豆 十 第一号から前号までに掲げるものを主な原材料とするもの	大豆（枝豆及び大豆もやしを含む。） 一 豆腐類及び油揚げ類 二 凍豆腐、おから及びゆば 三 納豆 四 豆乳類 五 みそ 六 大豆煮豆 七 大豆缶詰及び大豆瓶詰 八 きな粉 九 大豆いり豆 十 第一号から前号までに掲げるものを主な原材料とするもの

とうもろこし	ばれいしよ
十一 調理用の大豆を主な原材料とするもの 十二 大豆粉を主な原材料とするもの 十三 大豆たんぱくを主な原材料とするもの 十四 枝豆を主な原材料とするもの 十五 大豆もやしを主な原材料とするもの	一 ポテトスナック菓子 二 乾燥ばれいしよ 三 冷凍ばれいしよ 四 ばれいしよでん粉 五 調理用のばれいしよを主な原材料とするもの
一 コーンスナック菓子 二 コーンスターチ 三 ポップコーン 四 冷凍とうもろこし 五 とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰 六 コーンフラワーを主な原材料とするもの 七 コーングリッツを主な原材料とするもの（コーンフレークを除く。） 八 調理用のとうもろこしを主な原材料とするもの 九 第一号から第五号までに掲げるものを主な原材料とするもの	

とうもろこし	ばれいしよ
十一 調理用の大豆を主な原材料とするもの 十二 大豆粉を主な原材料とするもの 十三 大豆たんぱくを主な原材料とするもの 十四 枝豆を主な原材料とするもの 十五 大豆もやしを主な原材料とするもの	一 ポテトスナック菓子 二 乾燥ばれいしよ 三 冷凍ばれいしよ 四 ばれいしよでん粉 五 調理用のばれいしよを主な原材料とするもの
一 コーンスナック菓子 二 コーンスターチ 三 ポップコーン 四 冷凍とうもろこし 五 とうもろこし缶詰及びとうもろこし瓶詰 六 コーンフラワーを主な原材料とするもの 七 コーングリッツを主な原材料とするもの（コーンフレークを除く。） 八 調理用のとうもろこしを主な原材料とするもの 九 第一号から第五号までに掲げるものを主な原材料とするもの	

アルファアルファ	綿実	菜種	
アルファアルファを主な原材料とするもの			六 第一号から第四号までに掲げるものを主な原材料とするもの

綿実	菜種	
		六 第一号から第四号までに掲げるものを主な原材料とするもの

平成17年 6月13日

薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会表示部会  
部会長 丸井 英二 殿

薬事・食品衛生審議会  
食品衛生分科会表示部会  
食品表示調査会長 丸井 英二

「遺伝子組換えアルファルファ」及び「遺伝子組換えアルファルファを主な原材料とする加工食品」に関する表示対象品目見直しについて

「遺伝子組換えアルファルファ」及び「遺伝子組換えアルファルファを主な原材料とする加工食品」に関する表示対象品目見直しについて、当調査会（農林水産省農林物資規格調査会表示小委員会との共同開催）において審議した結果、別添改正案のとおり「遺伝子組換えアルファルファ」及び「遺伝子組換えアルファルファを主な原材料とする加工食品」を表示対象品目とするよう進めるのが望ましいとしたので報告する。

（別添は省略）



府食第303号

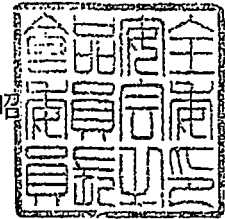
平成17年3月31日

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の通知について

平成16年10月1日付け厚生労働省発食安第1001001号をもって貴省より当委員会に対して意見を求められたラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統、ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 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しましたので通知します。

なお、食品健康影響評価の結果は別添のとおりです。

(別添)

ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及び  
ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統に係る  
食品健康影響評価に関する審議結果

## I 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、ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及びラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 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10月4日、関係書類を接受)

## II 評価対象食品の概要

名称 : ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統  
ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統

性質 : 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 : モンサント社 (米国)  
Forage Genetics Incorporated 社 (米国)

遺伝子組換えアルファルファ「ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統」(以下、J101 系統)、「ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統」(以下、J163 系統)は *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素発現遺伝子(改変 *cp4 epsps* 遺伝子)を導入することにより、CP4 EPSPS タンパク質が発現し、除草剤グリホサート(ラウンドアップ)の影響を受けずに生育することができるアルファルファである。

本食品の宿主であるアルファルファは、食用としては、いわゆる健康食品の素材として用いられているほか、播種後、数日間生育させたもやし(アルファルファ・スプラウト)がサラダ向けで生食される。

## III 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

J101 系統、J163 系統の宿主として用いたアルファルファは、マメ科 *Medicago* 属のアルファルファ (*Medicago sativa* L.) であり、いずれの系統の作出にも、アルファルファ品種の育種母本群である R2336 系統が用いられている。

##### (2) DNA 供与体の種名及び由来

J101 系統、J163 系統に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株から分離された。

##### (3) 導入DNAの性質及び導入方法

植物中での発現量を高めるため塩基配列の一部を変更した改変 *cp4 epsps* 遺伝子が、組換え植物のゲノムに組み込まれている。この改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性の CP4 EPSPS タンパク質を発現させる。このタンパク質は、除草剤グリホサート耐性を植物に付与する。



アルファルファ品種の育種母本群である R2336 系統に、この遺伝子を含んだプラスミド・ベクターPV-MSHT4 をアグロバクテリウム法で導入した。

## 2 宿主の食経験に関する事項

アルファルファは、古くから牧草として栽培されてきたものであり、食用としては、播種後 3～7 日後の幼苗がアルファルファ・スプラウトとして食されるほか、茎葉を粉砕し圧縮したもの、あるいはそれを固めたものがいわゆる健康食品等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等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

アルファルファの可食部である茎葉部の主要構成成分（水分、タンパク質、灰分、炭水化物、総脂質）は、水分 77%、タンパク質 17-27%、灰分 9.5%と報告されている（引用文献①）。炭水化物、総脂質については文献報告がない。また、アルファルファ・スプラウトについては、水分 91.14%、粗タンパク質 45%、粗脂質 7.8%、炭水化物 43%、灰分 4.5%と報告されている（引用文献②）。

### (2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質（栄養素の吸収、代謝を阻害する物質。例えばトリプシンインヒビター、フィチン酸等）の種類及びその量の概要

アルファルファの食品としての利用における有害な物質として、サポニン及び L-カナバニンが報告されている（引用文献③）。発芽後 8 日目までの間に、アルファルファ中のサポニン蓄積量は 2.1mol/g から 6.0mol/g まで増加する。これはアルファルファ・スプラウトの乾物重の 0.6% に相当するが、脱脂ダイズ粉末等と同程度の含有量である（引用文献④）。

また、L-カナバニンについては、種子及びスプラウトの乾物重の約 1.5%含まれており、アルギニンにより生成される（引用文献⑤）。

## 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

アルファルファ・スプラウトは、播種後、3～7 日で食用に供される状態に生育する。また、いわゆる健康食品（サプリメント）としての利用では、茎葉の栄養成分が最も高まった開花 10% 期頃に収穫されているとのことであり、J101 系統、J163 系統の栽培においても変わりはない。また、収穫後の収穫物の使用方法や貯蔵方法にも相違はない。

### (2) 摂取（可食）部位

J101 系統、J163 系統の可食部位は、従来のアルファルファと変わらない。

### (3) 摂取量

アルファルファの摂取量は正確に把握されていないが、可食部位等に変わりはないことから、J101 系統、J163 系統の摂取量も従来のアルファルファと変わらないと考えられる。

### (4) 調理及び加工方法

非組換えのアルファルファと J101 系統、J163 系統との調理及び加工方法に相違はない。

## 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に関する事項

J101 系統、J163 系統は、*cp4 epsps* 遺伝子の導入により、それぞれ CP4 EPSPS タンパク質を産生

することが、宿主との唯一の相違点と考えられる。

以上、1～6により、J101系統、J163系統の安全性評価においては、既存のアルファルファ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

アルファルファの食品としての利用においては、いわゆる健康食品として茎葉を粉碎した乾燥粉末が用いられる。

J101系統、J163系統のゲノムに組み込まれた改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、CP4 EPSPS タンパク質を産生し、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育することができる。

この作用により、ほ場における、除草剤グリホサート耐性をもたない一般の雑草の防除が可能になる。

また、播種後 3～7 日の幼苗をスプラウト（もやし）として消費するが、スプラウト生産は室内でおこなわれるため、グリホサートを含む除草剤を使用することはない。

## 第3 宿主に関する事項

### 1 分類学上の位置付け等（学名、品種及び系統名等）に関する事項

宿主植物として用いたアルファルファは、マメ科の *Medicago sativa* L. の育種母本群 R2336 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

アルファルファの属する *Medicago* 属は、60 種以上の種からなる。

現在、商業栽培が行われているアルファルファは、*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*（紫花アルファルファ）、*Medicago sativa* L. subsp. *falcata*（黄花アルファルファ）の2つの亜種とこれらの交雑種が存在しており、栽培種の多くは、*Medicago sativa* L. subsp. *sativa* に属する。

### 3 有害生理活性物質の生産に関する事項

アルファルファは、サポニン、L-カナバニンといった有害物質を産生することが報告されている（引用文献③）。

#### (1) サポニン

サポニンは植物界に広く分布する配糖体で、ステロイドやトリテルペノイドを非糖部とする一群の化合物の総称であり、その水溶液が著しい起泡性を持ち、溶血作用を示す（引用文献⑤）。発芽したアルファルファには発芽後 8 日目までの間に徐々にトリテルペンのサポニンが蓄積されるが、量的にヒトに対して有害な量とは考えられないとの報告がある（引用文献④）。

アルファルファのサポニンは、トリテルペノイドグルコシドの混合体であり、化学構造からメディカジェニック酸グリコシド、ヒドラジングリコシド、ソヤサポニン、ザーニック酸グリコシドに分類され、メディカジェニック酸グリコシド、ソヤサポニンの2種類で総サポニンの約 90% を占めている（引用文献⑥）。これら特定のサポニンがヒトに対して有害であるとの報告は見られないが、ザーニック酸グリコシドについては、ヒトが摂取した際に苦味と咽喉への刺激を生ずることが報告されている。（引用文献⑥）

#### (2) L-カナバニン

L-カナバニンはアルギニンの構造類似体として作用し、例えばアルギニンに関する拮抗阻害剤として作用したり、アルギニンが阻害する酵素活性をアルギニンと同様に阻害する（引用文献

⑤)。

L-カナバニンは種子及びスプラウトの乾燥重の約 1.5%含まれている。

#### 4 アレルギー誘発性に関する事項

これまで、アルファルファの摂食が原因で明確な食物アレルギーが生じたという報告はない。

#### 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

他の植物同様に、アルファルファの病害は多く知られているが、それらがヒトに対する病原性をもつことは知られていない。

#### 6 安全な摂取に関する事項

アルファルファの食品としての利用については、アルファルファ・スプラウト(もやし)が利用されているほか、主に開花 10%期に収穫された茎葉を粉砕したものがいわゆる健康食品として利用されている。これまでにアルファルファを食用に供して何らかの問題が生じたという報告はない。

#### 7 近縁の植物種に関する事項

アルファルファの近縁種である他の *Medicago* 属の種において、有害生理活性物質の産生は知られていない。

### 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

J101 系統、J163 系統の形質転換に用いられたベクター PV-MSHT4 は、中間的に用いられたプラスミド A1、A2 から構築されたプラスミド A、中間的に用いられたプラスミド B1、B2、B3 から構築されたプラスミド B を用いて作出されたものである。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 *E. coli* 由来のプラスミドから作製されたものであり、PV-MSHT4 には、プラスミド A1 由来の [CTP2] 領域、プラスミド A2 由来の [改変 *cp4 epsps*]-[E9 3'] 領域及び外骨格領域、プラスミド B2 由来の [P-eFMV]-[HSP70-Leader] 領域がクローニングされている。

#### 2 性質に関する事項

プラスミド A、B 及び A1、A2、B1~B3 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-MSHT4 の作出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

J101 系統、J163 系統に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株から単離した *cp4 epsps* 遺伝子配列に植物中での発現を高めるため、CP4 EPSPS タンパク質の機能活性を変更しないよう、塩基配列に変更を加えたものである。*Agrobacterium* sp. は、土壤中及び植物の根圏に存在する微生物類の一つである。

##### (2) 安全性に関する事項

*Agrobacterium* sp. は、土壤中及び植物の根圏に存在し、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。挿入 DNA の遺伝要素は以下の表のとおりであり、制限酵素による切断地図、機能等は明らかとなっている。

・ J101 系統、J163 系統への挿入 DNA

略 称	機 能
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット	
P-eFMV	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） ゴマノハグサモザイクウイルス由来の重複エンハンサー-35S プロモーター
HSP70-Leader	ハチマキの熱ショックタンパク質遺伝子の 5' 非翻訳リーダ配列
<i>CTP2</i>	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列（CP4 EPSPS タンパク質を芳香族アミノ酸合成部位である葉緑体へ輸送するのに必要な配列）
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の合成 <i>epsps</i> 遺伝子配列
E9 3'	エンドウの ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit ( <i>rbcS</i> ) E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域（遺伝子の転写を終結させる配列）

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

改変 *cp4 epsps* 遺伝子には、ゴマノハグサモザイクウイルス由来の重複エンハンサー-35S プロモーター-P-eFMV が連結されている（引用文献⑧）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子には、エンドウの ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域（E9 3'）が連結されている。

(3) その他

上記プロモーター、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導入されていない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

J101 系統、J163 系統の作出に用いた発現ベクター PV-MSHT4 は、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 両境界型植物形質転換ベクターであり、その T-DNA の右境界配列から左境界配列との間に改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット（[P-eFMV] - [HSP70-Leader] - [*CTP2*] - [改変 *cp4 epsps*] - [E9 3' ]）を挿入して構築された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

- ・ J101、J163 系統は、発現ベクター PV-MSHT4 を用いて作出された。
- ・ 発現ベクター PV-MSHT4 の塩基数は 9,023bp である。本プラスミド・ベクターの塩基配列は明らかとなっている。
- ・ 発現ベクター PV-MSHT4 の各構成要素の機能は既に明らかとなっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

## 6 DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項

DNAの宿主への導入にはアグロバクテリウム法が用いられ、発現ベクターPV-MSHT4のT-DNA領域が導入された。

導入方法の詳細は、R2336系統の植物組織に、プラスミド・ベクターPV-MSHT4を含む*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AB I株と共置培養接種したものを、組織培養培地に移して、*Rhizobium radiobacter* AB I株の除菌を行った後、さらにグリホサートを添加した培地に置床し、増殖してきたカルス組織から植物体を再分化させた。

得られた再分化個体(=T<sub>0</sub>世代)については、グリホサート耐性検定及びサザンブロット分析により導入遺伝子の確認が行われており、最終的にJ101系統及びJ163系統が選抜された。

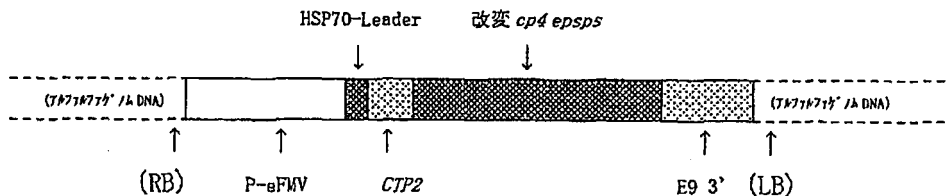
## 第6 組換え体に関する事項

### 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

J101系統、J163系統のゲノム中に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子のコピー数と完全性を確認するために、サザンブロット分析を行い、さらに、挿入遺伝子の5'及び3'末端の配列を確認するためにポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を行った結果、1箇所に改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセットの完全な1コピーがアルファルファゲノムに組み込まれていることが示された。また、プラスミド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。

#### ・J101系統、J163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に関する事項

J101系統、J163系統における5'及び3'末端の挿入遺伝子接合領域のDNA配列を解析した結果、5'末端は右側境界領域、ポリリンカー配列、P-eFMVプロモーターが続く形で接合していることが示され、3'末端は、E9 3'からT-DNA由来のポリリンカー、左側境界領域に続いて、アルファルファゲノムに接合していることが示された。

また、決定された挿入遺伝子接合領域の塩基配列に基づいて、5'及び3'末端近傍配列に特異的なプライマー対を作成してPCR分析を行った結果、予想されたサイズの特異的なPCR増幅産物が得られた。

従って、J101系統、J163系統はいずれも完全な改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットがゲノム中に導入されており、目的以外のタンパク質を発現する可能性のあ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。

### 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

J101系統、J163系統でのCP4 EPSPSタンパク質の発現量について調べるため、カリフォルニア州、イリノイ州、ワシントン州の3箇所のほ場で収穫されたアルファルファ茎葉(計6つ)及びアイオワ州、ニューヨーク州、ウィスコンシン州で収穫されたアルファルファ茎葉(計3つ)のCP4 EPSPSタンパク質の発現量(計9つ)をELISA法で分析した。

この結果、J101 系統における CP4 EPSPS タンパク質発現量は、2001 年は平均 276  $\mu\text{g/g}$  新鮮重（範囲：220～340  $\mu\text{g/g}$  新鮮重）、2002 年は平均 238  $\mu\text{g/g}$  新鮮重（範囲：160～340  $\mu\text{g/g}$  新鮮重）であった。J163 系統では、CP4 EPSPS タンパク質発現量は、2001 年は平均 317  $\mu\text{g/g}$  新鮮重（範囲：270～380  $\mu\text{g/g}$  新鮮重）、2002 年は平均 223  $\mu\text{g/g}$  新鮮重（範囲：140～340  $\mu\text{g/g}$  新鮮重）であった。

なお、J101 系統、J163 系統のスプラウトにおける CP4 EPSPS タンパク質の発現量は直接測定されていないが、J101 系統、J163 系統と全く同様の方法で同時に作出され、我が国における模擬的環境利用における環境安全性の認可を受けている J119 系統、J286 系統との掛け合わせ品種（J101×J119 系統、J163×J286 系統）のスプラウトについてウェスタンブロット分析が行われている。この結果と、莖葉での発現量とを合わせて考えると、アルファルファ・スプラウトにおける CP4 EPSPS タンパク質の発現量は、開花 10%期の莖葉より高い傾向はあるもののほぼ同等と判断されている。

### 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

米国のほ場試験において収穫された J101 系統、J163 系統の莖葉における CP4 EPSPS タンパク質の最大発現量は、それぞれ 340  $\mu\text{g/g}$  新鮮重、380  $\mu\text{g/g}$  新鮮重であった。これら、アルファルファの莖葉の水分含量を 80%とし、健康食品に含まれるアルファルファ乾燥粉末中の CP4 EPSPS タンパク質含量を加工損失がないと仮定して試算した場合、アルファルファにおける CP4 EPSPS タンパク質は 1.9mg/g 乾燥重となる。財団法人日本健康・栄養食品協会が策定したアルファルファ加工食品の規格基準における一日摂取目安量はアルファルファ乾燥粉末 20g/人日とされていることから、本 20g 中には最大 38mg の CP4 EPSPS タンパク質が含まれると推算される。

これは、日本人の一日一人当たりのタンパク摂取量 72.15g（平成 14 年国民栄養調査）の 0.053% となり、一日蛋白摂取量の有意な量を占めないと判断される。

### 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に関する知見

cp4 epsps 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株がアレルギーを誘発するとの報告はない。

#### (2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する知見

CP4 EPSPS タンパク質が、既知アレルゲンと構造相同性を持たないことについては、既に安全性審査を経て承認された、ラウンドアップ・レディー・ダイズ 40-3-2 系統、ラウンドアップ・レディー・カノーラ RT-73 系統・RT-200 系統、ラウンドアップ・レディー・トウモロコシ NK603 系統、ラウンドアップ・レディー・ワタ 1445 系統においても確認されている。

#### (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 人工胃液による酸処理及び酵素処理

人工胃液中での CP4 EPSPS タンパク質の消化液に対する安定性を *in vitro* で評価したところ、人工胃液中の CP4 EPSPS タンパク質は、試験開始後 15 秒以内に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, 2000）に記載されている方法に従って調製した。

##### ② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理

人工腸液中での CP4 EPSPS タンパク質の消化性をウェスタンブロット分析により評価したところ、10 分後に CP4 EPSPS タンパク質の大半が失われ、100 分後には完全に消失することが確認された。

なお、人工腸液は、米国薬局方（The United States Pharmacopeia, 2000）に記載されている

方法に従って調製した。

### ③ 加熱処理

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、熱処理によって脱脂大豆中での免疫反応性が 99%以上失われることが ELISA 分析によって確認されている。また、CP4 EPSPS タンパク質の酵素活性も 99%以上消失することが確認されている(引用文献⑨、⑩)。

なお、一般的にアルファルファをスプラウトとして摂食する場合は、生食されることが多い。

### (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

CP4 EPSPS タンパク質が既知のアレルゲン等と機能上重要なアミノ酸配列を有するかどうかを確認するため、利用可能な全てのタンパク質データベース(AD4、TOXIN5、ALLPEPTIDES:SwissProt version 38+、TrEMBL、Genpept version 116 から構築されるデータベース、2003年10月時点)を用いて、アレルゲン、グリアジン及びグルテニンをキーワードとしてタンパク質を抽出し、相同性比較用データベースを構築してそのペプチド配列を比較した。

配列の比較は、データベース検索の標準法である FASTA 型アルゴリズムを使用した(Pearson and Lipman, 1988; Wilbur and Lipman, 1983; Pearson, 1990; Gibskov and Devereux, 1992; Doolittle, 1990)。また、CP4 EPSPS タンパク質のアミノ酸配列中に抗原決定基(エピトープ)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結果、既知アレルゲンと相同性を示す配列は含まれていなかった。

既知アレルゲンとの相同性比較の結果、CP4 EPSPS タンパク質は既知アレルゲン及びグリアジンあるいはグルテニンと免疫学的な類似性を示す配列を共有していないことが確認された。

(1)～(4)及び前項3から総合的に検討した結果、CP4 EPSPS タンパク質のアレルギー誘発性については、その安全性を確認しうると判断された。

### 5 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

J101 系統、J163 系統に挿入された遺伝子の安定性を確認するため、J101 系統と J163 系統の T<sub>0</sub> 世代及び J101 系統と J163 系統の掛け合わせ品種のサザンブロット分析を行ったところ、J101 系統の T<sub>0</sub>、J163 系統の T<sub>0</sub>、及び J101 系統と J163 系統の掛け合わせた品種との間で一致したバンド・パターンが認められたことから、J101 系統及び J163 系統では挿入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが示された。

### 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

EPSPS タンパク質は、芳香族アミノ酸の合成経路であるシキミ酸経路を触媒し、植物が固定する炭素のおよそ5分の1に関与していると推測されている(引用文献⑪、⑫)。

本経路における炭素の流れは、3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(DAHP)合成酵素の活性による調節を受け制御されることが証明されているが(引用文献⑬、⑭)、DAHP からコリスミ酸が生成されるまでの段階は、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制されることはほとんどないことが知られている(引用文献⑬、⑭)。

これらのことは、EPSPS タンパク質が本経路における律速酵素ではないことを示唆するものであり、仮に EPSPS タンパク質活性が増加したとしても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高くなることはないと推測され、その代謝に影響を及ぼすことは考えにくい。

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が(引用文献⑨)、この PEP と S3P 以外に唯一 EPSPS タンパク質と反応することが報告されているのは、S3P の類似体であるシキミ酸のみである(引用文献⑩)。

しかしながら、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 であり、したがって、シキミ酸が植物中で EPSPS タンパク質と反応することはないと考えられ、代謝に影響は及ぼすことは考えにくい。

#### 7 宿主との差異に関する事項

J101 系統、J163 系統と非組換えアルファルファとの主要構成成分、アミノ酸組成等を比較するため、米国内の 5 箇所のは場から適期に茎葉を収穫し、分析に供試した。

なお、対照のアルファルファとしては、各は場で栽培された非組換えの商業アルファルファ 12 品種とラウンドアップ・レディー・アルファルファの BC2 世代から分離によって得られた Null 個体 (RR (-)) の後代が用いられている。

この結果、J101 系統、J163 系統の主要構成成分 (灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質、アミノ酸組成、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、ナトリウム及び亜鉛)、繊維 (酸性デタージェントファイバー (ADF ; Acid Detergent Fiber)、中性デタージェントファイバー (NDF ; Neutral Detergent Fiber)、リグニン) について、非組換え商業アルファルファ 12 品種及び Null 個体の分析値の範囲内であった。

また、J101 系統、J163 系統、アルファルファ商業品種 6 品種ならびに Null 個体を用いて、開花 10% 期の茎葉とスプラウトにおける総サポニン、L-カナバニン、ザーニック酸の含有量を測定したところ、すべての分析値において、J101 系統、J163 系統は、従来品種とほぼ同等の値であった。

#### 8 諸外国における認可、食用等に関する事項

J101 系統、J163 系統については、米国では、2003 年 10 月、米国食品医薬品局に食品及び飼料利用のための申請を行い、2004 年 12 月に認可された。また、2004 年 4 月、米国農務省に無規制栽培 (商業栽培) のための申請を行い、同年 10 月、認可された。

カナダでは、2003 年 12 月、カナダ保健省及びカナダ食品検査庁へ食品及び飼料利用のための申請を行った。

#### 9 栽培方法に関する事項

J101 系統、J163 系統と従来のアルファルファの栽培方法の違いは、栽培期間中に除草剤グリホサートが利用できる点であり、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

J101 系統、J163 系統の種子の製法及び管理方法については、従来のアルファルファ品種と同じである。

#### 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た。なお、CP4 EPSPS タンパク質については、これまでマウスを用いた急性経口投与毒性試験の報告があり、572mg/kg 体重/マウスの投与でも有害な影響は認められていない。

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)

#### IV 評価結果

遺伝子組換えアルファルファ、「ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及び J163 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。

#### V 引用文献

- ① National Research Council, United States-Canadian Tables of Feed Composition, 1982
- ② USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 17, 2004
- ③ Peary, W., and Peavy, W. 2004. Natural toxins in sprouted seeds: separating myth from reality [http://chetday.com/sprouttoxins.html] (accessed 11/04).
- ④ Bialy, Z., Jurzysta, M., Oleszek, W., Piacente, S., and Pizza, C. 1999. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. *J. Agric. Food. Chem.* 47:3185-3192.
- ⑤ 生化学辞典, 1990. 東京化学同人
- ⑥ Oleszek, W. 1996. Alfalfa saponins: structure, biological activity, and chemotaxonomy. (New York: Plenum Press)
- ⑦ Fling, M., J. Kopf, and C. Richards. 1985. Nucleotide Sequence of the Transposon Tn7 Gene Encoding an Aminoglycoside-Modifying Enzyme, 3(9)-O-Nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 13(9): 7095-7106.
- ⑧ Richins, R. D., H. B. Scholthof, and R. J. Shepard. 1987. Sequence of Figwort Mosaic Virus DNA (Caulimovirus Group). *Nucl. Acids Res.* 15: 8451-8466.
- ⑨ Padgett, S. R. et al. 1993b. Glyphosate Tolerant Soybeans in Puerto Rico in 1992: Field Test, Processing Studies & Analytical Evaluation, Study#92-01-30-01 (Monsanto), MSL-12902.
- ⑩ Padgett, S. R., Nida, D. L., Biest, N. A., Bailey, M. R. and Zobel, J. F. 1993c. Glyphosate Tolerant Soybeans in the U. S. in 1992: Field Test, Processing Studies & Analytical Evaluation, Study #92-01-30-02 (Monsanto), MSL-12906.
- ⑪ Haslam, E. 1974. The Shikimate Pathway. John Wiley and Sons, New York, New York.
- ⑫ Haslam, E. 1993. Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites, John Wiley and Sons, Chichester, England.
- ⑬ Herrmann, K. M. 1983. The Common Aromatic Biosynthetic Pathway. In *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. K. M. Herrmann and R. L. Somerville, eds. Addison-Wesley, Reading, MA. 301-322.
- ⑭ Weiss, U. and J. M. Edwards. 1980. Regulation of the Shikimate Pathway. In *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley and Sons, New York. pp287-301.
- ⑮ Gruys, K. J., M. C. Walker, and J. A. Sikorski. 1992. Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *E. coli*. *Biochem.* 31, 5534-5544.