

資料1

遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の
承認申請に係る審査報告書

スギ花粉ポリペプチド含有イネ(OsCr11)

平成 28 年2月9日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

目 次

	頁
1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論	1
2. 審査の概要	2
〈審査参考資料〉	
資料 1. 第一種使用規程承認申請書	7
資料 2. 審査データの概要	9
資料 3. 緊急措置計画書	89

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. A registration authority outside of Japan should not grant a registration on the basis of an evaluation unless it has first received authorization for such use from the owner of the data submitted to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan or has received the data on which the summaries are based, either from the owner of the data or from a second party that has obtained permission from the owner of the data for this purpose.

1. 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論

国立研究開発法人農業生物資源研究所より、平成27年9月11日付けで隔離ほ場における試験栽培の承認申請のあった「スギ花粉ポリペプチド含有イネ (OsCr11)」(以下「本組換えイネ」という。)について、生物多様性影響評価を行った。

本組換えイネは、イネ及びスギ花粉由来の *GluA2-F1* 遺伝子、*GluB1-F2* 遺伝子、*GluC-F3* 遺伝子及び *SH-Cry j 2* 遺伝子を導入して作出している。

本組換えイネは、導入された遺伝子の発現により、本組換えイネ中で産生される各蛋白質の働きにより、本組換えイネ由来のコメを、スギ花粉症のヒトが一定期間食した後、スギ花粉に対するアレルギー反応を緩和するものである。

審査の概要は、本報告書の2のとおりである。学識経験者からは、本組換えイネを承認申請のあった第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は、妥当であるとの意見をj得ている。

これらの結果に基づいて、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(参考) これまでの審査経緯

日付	事項	備考
平成27年 9月11日	第一種使用規程承認申請受理	
平成27年10月 5日	生物多様性影響評価検討会農作物分科会における審査(第1回)	非公開※
平成27年11月 6日	生物多様性影響評価検討会農作物分科会における審査(第2回)	非公開※
平成27年12月21日	生物多様性影響評価検討会総合検討会における審査	公開
平成28年 1月12日	学識経験者からの意見提出	
平成28年 2月 9日	審査報告書とりまとめ	

※開発企業の知的財産等が開示され、特定の者に不当な利益又は不利益をもたらすおそれがあるため。

2. 審査の概要

本組換えイネは、大腸菌及びアグロバクテリウム由来の合成プラスミド pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入し作出されている。

本組換えイネには、

- ① イネ由来のグルテリン蛋白質とスギ由来の Cry j 1 蛋白質の一部を融合させた蛋白質 (GluA2-F1 蛋白質、GluB1-F2 蛋白質及び GluC-F3 蛋白質) をコードする *GluA2-F1* 遺伝子、*GluB1-F2* 遺伝子及び *GluC-F3* 遺伝子
- ② スギ由来の Cry j 2 蛋白質の立体構造を改変した蛋白質 (SH-Cry j 2 蛋白質) をコードする *SH-Cry j 2* 遺伝子
- ③ 改変 ALS 蛋白質をコードする改変 *ALS* 遺伝子

の発現カセットが染色体上に 1 コピー、並びに当該発現カセットの一部の断片配列が近傍に 1 カ所組み込まれており、複数世代にわたり安定して伝達されていることがサザンブロット解析及び PCR 解析により確認されている。

また、それら遺伝子が複数世代にわたり安定して発現していることがイムノブロット解析によって確認されている。

本組換えイネに関し、生物多様性影響を生じさせる可能性のある性質である、(1) 競合における優位性、(2) 有害物質の産生性、(3) 交雑性、の 3 つの項目について評価を行った。

(1) 競合における優位性

イネは、我が国において長年栽培されてきた歴史があるが、これまでに自然環境下において雑草化したとの報告はない。

本組換えイネ及び宿主の非組換えイネを特定網室において栽培し、形態及び生育の特性、花粉の充実度及びサイズ、種子の生産量等について調査したが、本組換えイネ及び宿主の非組換えイネとの間で統計学的有意差は認められなかった。また、文部科学省の承認を受けた研究目的の隔離ほ場試験の結果によると、形態及び生育の特性、花粉の充実度及びサイズ、種子の生産量等に関して本組換えイネ及び宿主の非組換えイネとの間で統計学的有意差は認められなかった。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合の優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれがないと判断した。

(2) 有害物質の産生性

本組換えイネで産生される GluA2-F1 蛋白質、GluB1-F2 蛋白質、GluC-F3 蛋白質及び SH-Cry j 2 蛋白質は、ヒトのスギ花粉症を誘発するスギ花粉抗原 Cry j 1

蛋白質及び Cry j 2 蛋白質に相同する一部アミノ酸配列を有している。このため、本組換えイネから生産されるコメは、ヒトに対するアレルギーを誘発する可能性が考えられるが、

- ① 大腸菌に産生させた Cry j 1-F1 蛋白質及び SH-Cry j 2 蛋白質を用いた、スギ花粉症モデルマウスの血液中の IgE 抗体との結合性が認められないこと
- ② 本組換えイネから生産されたコメの蛋白質等の濃縮物をラット及びカニクイザルに経口投与し、毒性試験を行ったが、毒性が認められないこと
- ③ 健常のニホンザルに本組換えイネから生産された精白米及び炊飯米を与えたが、血液中の抗原特異的な T 細胞及び IgE 抗体は認められないことが確認されている。

また、本組換えイネに導入されている改変 *ALS* 遺伝子については、カルスで特異的に発現するようプロモーターが設計されており、葉、茎、根及び胚乳において発現していないことが RT-PCR 法により確認されているほか、既知アレルゲンと類似の配列を有しないことも確認されている。

イネは他の植物の生長を抑えるアレロパシー活性を有することが知られているが、通常の湛水栽培においてそのような活性が生じたとの報告はない。

また、本組換えイネで産生される GluA2-F1 蛋白質、GluB1-F2 蛋白質、GluC-F3 蛋白質及び SH-Cry j 2 蛋白質は、胚乳で特異的に発現するようプロモーターが設計されているため、胚乳以外の葉、根等の組織において、宿主の代謝に影響を及ぼし有害物質を産生するとは考え難い。

実際に、鋤込み試験及び後作試験を行ったところ、レタスの発芽率、下胚軸長及び幼根長について本組換えイネ及び宿主の非組換えイネとの間に統計学的有意差は認められなかった。また、土壌微生物相試験を行ったところ、細菌、放線菌及び糸状菌数について本組換えイネ及び宿主の非組換えイネとの間に統計学的有意差は認められなかった。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれがないと判断した。

(3) 交雑性

栽培イネは、近縁野生種である *O.rufipogon* 及び *O.nivara* と交雑可能であるが、我が国において、これら近縁野生種の自生は報告されていない。このため、本組換えイネの交雑性に起因して生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(4) 結論

宿主が属する生物種であるイネは、我が国において長年栽培されてきた歴史があるが、これまでに自然環境下において雑草化したとの報告はない。

文部科学省の承認を受けた研究目的の隔離ほ場試験の結果によると、形態及び生育の特性、花粉の充実度及びサイズ、種子の生産量等に関して本組換えイネ及び宿主の非組換えイネとの間で統計学的有意差は認められなかったことから、本組換えイネの競合における優位性は高まっていないと考えられた。

以上より、一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用される範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定はされず、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

本組換えイネで産生される各蛋白質は、ヒトのスギ花粉症を誘発するスギ花粉抗原 Cry j 1 蛋白質及び Cry j 2 蛋白質に相同する一部アミノ酸配列を有している。このため、本組換えイネから生産されるコメは、ヒトに対するアレルギーを誘発する可能性が考えられた。

しかしながら、上述のとおり本組換えイネについて、花粉症モデルマウス、ニホンザル、ラット及びカニクイザルを用いたアレルギー性に対する安全性試験の結果、本組換えイネはアレルギー性を示さなかった。

本組換えイネに導入されている改変 *ALS* 遺伝子については、既知アレルゲンと類似の配列を有しないことが確認されている。

また、また、本組換えイネで産生される各蛋白質は、胚乳で特異的に発現するようプロモーターが設計されているため、胚乳以外の葉、根等の組織において、宿主の代謝に影響を及ぼし有害物質を産生するとは考え難い。

実際に我が国の隔離ほ場において行われた本組換えイネの有害物質の産生性の有無を後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験により検討した結果、本組換えイネの試験区と対照の非組換えイネの試験区との間に統計学的有意差は認められなかった。

以上より、一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用される範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定はされず、有害物質の産生性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

さらに、交雑性については、栽培イネは、近縁野生種である *O.rufipogon* 及び *O.nivara* と交雑可能であるが、我が国において、これら近縁野生種の自生は報告されていない。このため、一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用される範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

以上を総括して、本組換えイネは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬、廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断した。

〈審查參考資料〉

資料1. 第一種使用規程承認申請書

隔離ほ場での試験栽培の承認を受けるために申請者から提出された申請書類。

第一種使用規程承認申請書

平成 27 年 9 月 11 日

農林水産大臣 林 芳正 殿

環境大臣 望月 義夫 殿

氏名 国立研究法人農業生物資源研究所
申請者 理事長 廣近 洋彦 印
住所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地 2

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	スギ花粉ポリペプチド含有イネ (<i>GluA2-F1</i> , <i>GluB1-F2</i> , <i>Glu-F3</i> , <i>SH-Cry j 2</i> , 改変 <i>ALS</i> , <i>Oryza sativa</i> L.) (OsCr11)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所在地：茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地 2 名称：国立研究開発法人農業生物資源研究所隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 35 年 3 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

資料1. 第一種使用規程承認申請書

	<p>(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。</p> <p>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えイネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該イネの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。</p> <p>(4) 本組換えイネの開花期に、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置するとともに、防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本組換えイネ及び比較対照のイネ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを必要最小限に抑える。</p> <p>(2) 本組換えイネを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該イネが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えイネの栽培終了後は、当該イネ及び比較対照のイネを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えイネが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	--

資料2：審査データの概要

審査に用いた評価のデータ

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主または宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

和名：イネ

英名：Rice

学名：*Oryza sativa* L.

染色体数：2n=24

② 宿主の品種名又は系統名

コシヒカリ低グルテリン変異系統a123 (Iida et al., 1997) (以下「コシヒカリ変異系統a123」という。)

コシヒカリ変異系統a123は、複数の分子種 (大きな遺伝子ファミリー) からなる種子貯蔵蛋白質グルテリン(Kawakatsu et al., 2008)のうち、GluA1、GluA2、GluB4 の3種類を欠失させた突然変異系統である。コシヒカリへの γ 線照射によりGluA2とGluB4を、エチルメタンスルフォネート(EMS)¹処理によりGluA1を欠失させた変異体を得た後に、これらの変異体間の交雑後代から選抜した (別添資料1)。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

イネは、イネ科*Oryza*属に属する一つの種で*Oryza sativa* L.に分類されており、*O. sativa*は大別して、インディカ種、ジャポニカ種に分けられる。イネの近縁野生種については世界中の熱帯・亜熱帯に分布し、様々な環境、特に生育地の多様な水条件に適応分化している。多様性の中心あるいは多様性の中核地域は、インドの北東諸州 (マニプール、メガラヤ、ナガランド州など) を西端とし、ラオスを東端とする東西に延びる地域にあり、北端は中国雲南省のシーサンパンナ・タイ族自治州を含む西南地域、南端はミャンマー (ビルマ)、タイのデルタと丘陵部の境界地域にある。これらの地域はいずれも山岳地帯、丘陵地帯を背景とする地域で、現在では地形が複雑で、むしろ大規模稲作には適

¹ 強力な突然変異誘発性を持つ物質。植物において、化学的突然変異原の中で最も多く用いられる。

しない地域である（松尾, 1989）。最近では、中国南部・珠江（Pearl River）に自生している野生種が祖先に近いことが報告されている（Huang et al., 2012）。

イネの形態学的、生理学的及び分子生物学的知見から、栽培種であるイネ（*O. sativa*）は野生種である*O. rufipogon*が直接の祖先とする説と、*O. sativa*の祖先種は*O. nivara*及び*O. rufipogon*とする説がある（松尾, 1989）。また、西アフリカに局所的に栽培されている栽培種に、*O. glaberrima* Steud.という別の種がある。*Oryza*属には20余の種が含まれるが、それらのうち栽培種は上記の2種（*O. sativa*及び*O. glaberrima*）だけで、他は東南アジアからオーストラリア・アフリカ・南米・中米にかけて沼沢地・低湿地あるいは疎林内の半陰地に自生する野生種である（松尾, 1990c）。我が国において、これらの野生種の自生は見られない。

世界的に雑草イネが散見されるが、雑草イネは栽培イネの普及に伴う典型的な随伴雑草の一つである。我が国における雑草イネは、栽培イネと同じ*O. sativa*に属すると報告されている（牛木, 2005）。その分布は、これまで一部の地域（長野県、岡山県）に限定されていたが、直播栽培の普及にともなって発生地域が拡がり、現在では東北南部、関東甲信越、東海の直播栽培地域での発生が報告されている（渡邊, 2012）。しかしながら、その生育域は農耕地及びその近傍に限られており、自然環境下での自生は報告されていない。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

イネは、紀元前1万5千年から1万年の間に栽培化されたと考えられ、栽培の起源はインド説、中国説、アッサム・雲南説がある（松尾, 1989）。

日本へは縄文時代晩期から弥生時代初頭に中国から直接ないしは台湾または朝鮮半島を経由して伝来したと推定されている（甲元, 2005）。我が国の農耕の歴史とともに存在し、現在も我が国の最も重要な作物として広く栽培されている。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

アジアのモンスーン地帯を中心に、北緯53度～南緯40度にわたる種々の気候条件下で栽培されている（蓬原, 1990）。2012年の全世界におけるイネの栽培面積は約1億6300万ha、総生産量は7億tを越える。栽培面積の上位国を挙げるとインドが約4200万ha、中国が約3000万ha、インドネシアが約1300万haとなっており、米生産の約90%をアジアが占める（FAOSTAT, 2014）。なお、国際連合食糧農業機関統計データベース（FAOSTAT）の統計情報に基づく2012年の我が国における栽培面積は158万haである。また2012年の都道府県別作付面積は

資料2：審査データの概要

新潟県が11万7500haと最も多く、次いで北海道が11万2000ha、秋田県が9万1000haとなっている（農林水産省平成24年産作物統計）。

我が国での典型的なイネの慣行栽培法は以下のとおりである（農林水産省・統計部, 2015）。播種は、直接水田にまく直播栽培も一部にあるが、多くは育苗箱に播種する。その後、育苗施設で芽や根が出て10数cmほどに育てた苗（播種後30日程度）を水田に移植する。通常は田植え機を用い30cm間隔で移植する。田植え時期の最盛期は通常5月から6月であるが、最も早いのは沖縄県で3月上旬、最も遅いのは佐賀県の6月中下旬である。雑草の防除については田植え前後に使用する除草剤が主に利用されている。また、病害予防剤としては長期持続型の有効成分を含む育苗箱処理剤が用いられている。加えて、病虫害発生状況を見ながら、病虫害防除のため薬剤散布を行う。田植え時期や品種の違いによって稲刈り時期は違ってくるが、稲刈りの最盛期は9月中旬から10月上旬である。最も早い沖縄県で6月下旬、最も遅い群馬県で10月中旬に行う。通常は稲刈りから脱穀をまとめて行うコンバインで収穫後、直ちに専用の穀物乾燥機にかけられる。慣行栽培以外に、温暖な徳島県、高知県、宮崎県、鹿児島県及び沖縄県等では早期栽培や早期栽培と晩期栽培とを組み合わせた2期作が行われている。2期作の栽培時期としては、第1期作は、3月上・中旬に播種し7月中に収穫、第2期作は、7月中・下旬に播種し10月下旬から11月上旬に収穫する。

収穫後のイネの茎から自然に出るひこばえ（側芽）は、温暖地域（沖縄等）では越冬する場合があるが、九州以北では冬の低温のため枯死し越冬することはない。また、ひこばえが越冬可能な温暖地域においても、栽培管理等によってひこばえから結実することはない。

種籾の流通に関しては、国内栽培用のイネ種子は、主要農産物種子法に基づいて農林水産大臣が定めた基準（農林水産省, 2000年）に沿って、異物の混入状況等に関する審査が行われている。具体的には、各都道府県が主要農作物種子法施行細則を定めた後、異物混入を防止するため厳格に管理する指定された種子生産ほ場において原原種、原種及び一般栽培用種子が生産される。その後、審査に合格した種子が栽培農家に供給される。

収穫した米は農協等の出荷事業者、直接販売など多様なルートを通じて取引されている（農林水産省, 2008）。2014年の我が国の水陸稲の収穫量は約844万tであり、そのうち主食用水稲収穫量が約788万tであった（農林水産省, 2014）。主食用途以外には加工用（清酒・米菓・味噌等）、備蓄用、飼料用及びバイオ燃料用に使われている。

2014年に国家貿易により輸入した米（MA米）は約67万tであった（財務省貿易統計, 2014年）。MA米は主として、加工用、援助用、飼料用に用いられている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本特性

イネ (*O. sativa*) は植物学的には栄養繁殖性及び種子繁殖性を有している多年性植物であるが、栽培上は種子繁殖性の一年生作物として扱われる。またイネは風媒花であるが、雌しべが短いため外からの花粉を受けにくく、開花と同時に高い確率で自家受粉が行われる。ただし、同種のイネを近接で栽培すると、0～5%程度 (OECD, 1999)、または1%未満 (松尾ら, 1990a) の他殖が生じると報告されている。植物体は茎、葉、根、穂の各器官で構成されている。根は種子根と冠根に区別される。冠根は地上部の節部から発生する。茎は地上部の骨格をなすもので、ところどころ節で区切られ、伸長した節間は中空である。葉は葉身と葉鞘からなる。穂は茎の最上節につく。穂は総状花序型の分枝を呈す (松尾, 1960)。

ロ 生息又は生息可能な環境の条件

イネの生育最低温度は10～12℃、通常の栽培可能温度は20℃以上で、開花結実には22℃以上を必要とし、34℃以上では高温障害が発生する。イネは要水量の大きな植物であり、灌水がなく土壌水分が表面層で10%以下、下層土では12%以下で干ばつ害が発生する (表1)。イネの栽培適地は生育期間中20℃以上、多照で、多雨であることが望ましいが、今日では多様な亜種、変種、品種の分化により、各種の気候、環境条件に対する適応性が高くなっており、北緯53度の、中国黒竜江省でも栽培が可能である (蓬原, 1990)。

本組換えイネの宿主であるコシヒカリ突然変異系統a123の元品種のコシヒカリは、山形県を北限とし九州地方まで栽培されている水稻品種である。栽培適地は東北南部・北陸・関東東海・近畿中国四国・九州であり、通常、5月から6月に田植えされる。また、8月以降に出穂し、登熟日数は36日～40日程度である。

表1 生育時期別の温度変化に対するイネの反応 (吉田, 1986)

生育時期	限界温度 (℃)			生育時期	限界温度 (℃)		
	低	高	最適		低	高	最適
発芽	10	45	20～35	幼穂分化	15	—	—
出芽・苗立ち	12～13	35	25～30	幼穂形成	15～20	38	—
活着	16	35	25～28	開花	22	35	30～33
葉の伸長	7～12	45	31	登熟	12～18	30	20～25
分けつ	9～16	33	25～31				

ハ 捕食性又は寄生性

—

二 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

種子の散布は、籾の老化が進み枝梗から種子が脱落することで行われる。しかし、現在の日本における栽培品種では一般に脱粒性は極めて小さい（松尾，1960）。イネの休眠性には品種間差があり、一般にジャポニカ種は秋に収穫して室温に保管した場合、翌春には休眠は打破される。種子の寿命に関しては、低温・低湿条件下では長期間の保存が可能であり、室温下でも種子水分を9.7%以下にすることで95%以上の発芽率を5年間、維持することができる（松尾ら，1990c）。しかし、一般の白米の種子をほ場の土壌中に埋蔵した場合、収穫年の最初の冬の間ですべて発芽能を失ったと報告されている（松尾ら，1990b）。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

イネは栄養繁殖性及び種子繁殖性を有する多年生植物であるが、栽培上イネは一年生の種子繁殖植物として扱われる。しかし栄養繁殖性を有していることから、適切な水分や温度条件では種子収穫後も栄養体を維持できる。これは、“ひこばえ”と呼ばれ、新しい分げつが節から発生し生長するものであるが、我が国の露地栽培において、温暖地域（沖縄等）では越冬する場合があるが、九州以北では冬の低温のため枯死し越冬することはない。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

イネは風媒花であるが、雌しべが短いため外からの花粉を受けにくく、同花受粉しやすい構造になっていることから、極めて自殖性が高い。他殖性の程度は、0～5%程度という報告（OECD, 1999）や、空中花粉量、風速等の条件により変動するが、1%以内とする報告もある（松尾ら，1990a）。

モチ品種とウルチ品種間において交雑した時に種子に発現するキセニア²を利用して花粉源からの距離と自然交雑率との関係が調べられている。花粉源から4.5mの距離における交雑率は0.6%以下、10mでは0.04%以下（農林水産省，2003）、平成16年度に実施された調査では、風下側に25.5m離れた位置での交雑が認められた（農林水産省，2005）。さらに、平成18～19年度の北海道立農業試験場において、他殖率を高めるために、低温処理し花粉に不稔（不稔率40～50%）を生じさせた種子親を、卓越風の風下に配置し交雑試験を行ったところ、雄性不稔化に伴い他殖率が高まり、600m離れた場所でも交雑が確認された

² 植物の種子の形質に花粉親の持つ遺伝子の影響が現れる現象。ウルチ品種の胚乳は半透明なのに対してモチ品種の胚乳は白濁しており、ひと目で区別できる。モチ品種にウルチ品種の花粉が交雑すると、ウルチ形質の胚乳となる現象を利用して、交雑率を計測した。

資料2：審査データの概要

(平成18年度試験(北海道, 2007) : 花粉親から237m離れた位置、交雑率0.024%、平成19年度試験(北海道, 2008) : 花粉親から600m離れた位置、交雑率0.028%)。

米国農務省国際動物検疫課 (APHIS) は、イネは自殖性が高く花粉の寿命が短いことから、有用物質の生産などを行う非食用のイネの隔離距離は1320フィート (402 m) で十分と判断している (USDA-APHIS, 2014)。

なお、農業生物資源研究所では平成23年~27年にかけて本組換えイネを文部科学省/環境相の承認を得て隔離ほ場試験をしており、また本組換えイネの先行研究として「スギペプチド含有イネ」を栽培している。これらの栽培に伴って、当該遺伝子組換えイネから約10~130mの地点でモニタリングを行ってきた。その結果、5ヶ年で125,140粒の種子を調査したが交雑は認められてない。

自家不和合性、アポミクシスは報告されていない。また、東南アジアなど自生している近縁野生種 (野生イネ : AAゲノム³を有する *O. rufipogon*、*O. nivara* 等) は栽培イネと交雑可能であるが、それら野生イネが我が国で自生しているという報告はない (松尾ら, 1990a)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

イネの穎花は、1 葯当たり1000個以上の花粉が詰まった雄蕊を6本持ち、稔性はほぼ100%である。花粉の形状は球形で、葯内では粘質で花粉塊をなしているが、葯が開裂し始めると花粉表面が乾き、粘着性が失われ、飛散しやすくなる (松尾, 1990a)。受粉形式は風媒であるが、葯は開花 (穎) 直前に開裂するため、花粉の多くは自花の雌蕊にかかる (松尾, 1990a)。開花前に自花の葯から受粉してしまうため、他家 (花) からの風媒による受粉は栽培品種においては極めて低い。花粉の飛散による交雑距離としては、1-(3)-ニ-③に示した低温処理等の特殊な条件下では600 mまで交雑が認められた例もあるが、多くの報告では10m程度とされており、花粉の寿命は一般に3~5分、最大で10分程度とされ時間経過と共に急速に受粉能は低下する (藤巻ら, 1992)。

他家受粉の確率が極めて低いこと、及び花粉の寿命が短いことなどから、農林水産省の「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」 (農林水産省, 2008) では、30mの隔離距離をとることで交雑を防止することが可能として隔離距離が設定されている。なお、強風時、開花期の低温により花粉の不稔が生じることで交雑の可能性が高まることが想定される場合の措置が、別途定められている。

³ *O. sativa* とその近縁野生種の持つゲノム。 *O. rufipogon*、*O. nivara*、*O. perennis*、*O. glaberrima* などが含まれる。

ホ 病原性

—

ヘ 有害物質の産生性

イネは他の植物の生長を抑える物質（他感物質）を土壤に放出していることが報告されている。イネのアレロパシー（他感物質を産生することによる周囲の植物の生育抑制）活性を、レタス（*Lactuca sativa*）を検定植物としたプラントボックス法（PB法）により検定した結果、アレロパシー活性は品種間によって顕著な違いがあることが明らかとなった（Fujii, 1993）。また、概して日本の栽培品種（ササニシキ、トドロキワセ、コシヒカリ等）のアレロパシー活性は弱く（根の伸長を約50%阻害）、ジャポニカの変異型の熱帯島嶼型品種⁴（Canabongbong, Mack Kheua等）や赤米（紅血糯、Li Zi Hong等）の活性が強い（根の伸長を約70%阻害）と報告されている（Fujii, 1993）。PB法によりアレロパシー活性の強いことを見出した赤米（阿波赤米、紅血糯等）は圃場でも雑草抑制作用を示した（荒谷ら, 2004）。

コシヒカリ変異系統a123の親品種であるコシヒカリのレタスを検定植物としたPB法によるアレロパシー活性は日本の栽培品種の平均（根の伸長を50%阻害）と同程度であった（Fujii, 1993）。イネのアレロパシー物質としてコシヒカリの水耕培養液から単離されたモミラクトンBが同定され、イネの最も重要なアレロパシー物質と考えられている（猪野ら, 2007）。

ト その他の情報

コシヒカリ変異系統a123は、種子貯蔵蛋白質グルテリンの部分欠失変異系統であり、GluA1、GluA2、GluB4が存在しないことから、コシヒカリと比較して、全グルテリン量が低下している（Iida et al., 1997）。コシヒカリ変異系統a123のような低グルテリンイネが、外来遺伝子産物（組換え蛋白質）を胚乳に高蓄積させる材料として優れていることが報告されている（Tada et al., 2003）ことから、宿主としてコシヒカリ変異系統a123を用いた。

⁴ 主としてインドネシア、アジアの熱帯地域で栽培されているジャポニカ種の変異品種。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

ここでは、スギ花粉ポリペプチド含有イネ (*GluA2-F1*、*GluB1-F2*、*GluC-F3*、*SH-Cry j 2*、改変*ALS*、*Oryza sativa* L.) (OsCr11) (以下「本組換えイネ」という。) の作出に用いた供与核酸について記載する。これに先立ち、スギ花粉症抗原、発症のメカニズム、経口免疫療法、本組換えイネ開発の背景・目的について説明する。

スギ花粉症抗原

スギ花粉症では、スギ花粉に含まれるCry j 1蛋白質 (ペクテートリアーゼ) 及びCry j 2蛋白質 (ポリメチルガラクトナーゼ) と呼ばれる2種類の細胞壁修飾酵素蛋白質が主要な抗原 (アレルゲン) として同定されている (Taniguchi et al., 1995; Ohtsuki et al., 1995)。ペクテートリアーゼ、ポリメチルガラクトナーゼは、多くの微生物及び植物に存在している一般的なペクチン分解酵素である。

スギ花粉症発症のメカニズム

スギ花粉症は、鼻や目などの粘膜に取り付いた花粉から抗原の蛋白質が粘液に溶けだし粘膜から吸収された際に、それを排除する免疫反応が過剰状態となるアレルギー疾患である。図1に示すとおり、アレルギー応答では、まず抗原がマクロファージ等の抗原提示細胞⁵に捕捉され、細胞内で部分分解を受けた後、アミノ酸10数個からなるT細胞エピトープ⁶配列として細胞表面に提示される。これらのT細胞エピトープ配列が未分化のT細胞 (ナイーブT細胞⁷) に抗原情報として受容されることにより、ヘルパー2型T (Th2) 細胞⁸へと分化し、増殖する。Th2細胞はT細胞抗原受容体 (TCR) ⁹を介してB細胞¹⁰により提示された抗原断片を認識しB細胞を刺激すると共に、アレルギー関連のサイトカイン¹¹ (IL4、IL13) を産生する。その結果、B細胞は抗原特異的IgE抗体を産生する形質細胞¹²に分化する。産生された抗原特異的IgE抗体は肥満細胞¹³の表面に結合し、その後体内に侵入したスギ花粉抗

5 体内に侵入した蛋白質やウイルス感染細胞の断片を抗原として自己の細胞表面上に提示し、T細胞を活性化する細胞。

6 エピトープは抗体が認識する抗原の一部のこと。T細胞レセプターに結合する抗原部分を指すこともあり、その場合はT細胞エピトープと呼ぶ。

7 抗原タンパク質との接触経歴を持たないT細胞。抗原刺激にともない活性化されたナイーブT細胞は、活性化された時に存在するサイトカインなどの刺激によりTh1、Th2、TFH、Th17、Treg細胞などの特異的な機能を持ったT細胞へと分化する。

8 抗原蛋白質との接触経歴を持たないT細胞 (ナイーブT細胞) がサイトカインの刺激を受けることによりTh2細胞への分化が誘導される。液性免疫応答の活性化に関与する。

9 T細胞の細胞膜上に発現している抗原受容体分子。

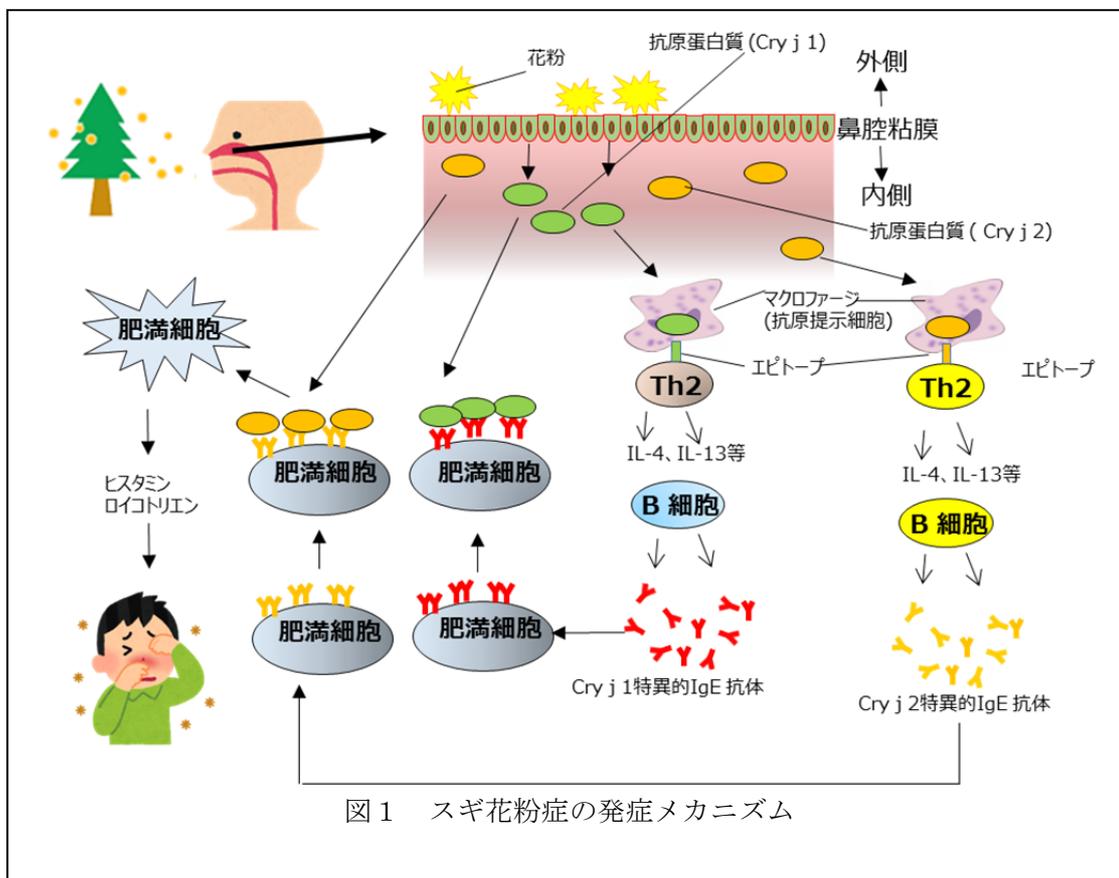
10 抗原の侵入に応答して増殖し、抗体 (免疫グロブリン) を生産する細胞へと分化する。

11 免疫システムの細胞から分泌される蛋白質で、特定の細胞に情報伝達をする。

12 B細胞から分化する。免疫グロブリンの合成と分泌をおこなう細胞。

13 IgEを介したI型アレルギー反応の主体。肥満細胞上の受容体に会合している抗原特異的IgEに抗原が結合すると、肥満細胞膜酵素の活性化がうながされ、ヒスタミンなどが放

原がIgEに結合すると、肥満細胞が脱顆粒¹⁴し、細胞内化学伝達物質であるヒスタミンやロイコトリエン等が放出され、くしゃみ、鼻水、鼻詰まり、眼のかゆみなどといったアレルギー症状が誘発される。



スギ花粉症の治療法

一般的な花粉症の治療法は、アレルギー反応の発現に係わる化学伝達物質の放出・受容を抑える薬物や免疫抑制剤を利用した対症療法である。

一方、唯一の根治的な治療法として、抗原特異的免疫療法がある。疾患の原因となる抗原を直接治療に用いる抗原免疫療法は、対症療法とは異なり、スギ花粉症を根治あるいは長期寛解させる可能性のある唯一の治療法であるとされている (Bousquet et al., 1998; Frew, 2010)。スギ花粉症の原因となるスギ花粉抗原 (アレルゲン) エキスを用い、皮下注射で極低濃度から徐々に濃度を高め、3年から5年間かけて摂取し、原因スギ花粉抗原に対する反応性を低下させ、最終的に抑制させる免疫療法が標準的な抗原特異的免疫療法として位置づけられている。この抗原特異的免疫療法は、継続した治療が可能な患者に対しての選択肢の1つとされ、

出される (脱顆粒)。

¹⁴ 肥満細胞は細胞内にヒスタミン等貯蔵している顆粒状構造物を持つ。肥満細胞がアレルゲンとの接触等により、顆粒状構造物を細胞外に放出すること。

資料2：審査データの概要

100年以上の実績を有する。問題点として、治療期間が長く、通院の手間と注射による苦痛、さらに時として死亡、アナフィラキシーショックといった重篤な副作用があることが指摘されている（Committee on Safety of Medicines, 1986）。近年、副作用を減少させるため摂取経路を変更した舌下を介した免疫療法が注目され、ヨーロッパではシラカバ花粉症を中心に実用化が進んでいる。舌下免疫療法では口腔粘膜下のランゲルハンス細胞様の樹状細胞¹⁵に取り込まれるので、免疫寛容を誘導させやすい特性を持つことが報告されている（Moingeon et al., 2006）。2014年、アメリカ及び日本でも舌下免疫療法薬が承認され（Oralair：イネ科植物の花粉によって引き起こされるアレルギー性鼻炎用（2014年アメリカで承認）、シダトレン®スギ花粉舌下液：スギ花粉症用（2014年日本で承認））、苦痛のない安全な治療法として注目を集めている。

他の抗原特異的免疫療法として、投与が簡便で苦痛もなく大量投与が可能で、体内最大の腸管関連免疫組織を利用して免疫寛容の誘導を目的とした経口免疫療法が報告されている。しかし、この経口免疫療法は古くから報告されているが、有効性に関する根拠が少なく、WHO（世界保健機構）も推奨しておらず、標準的摂取法にはなっていない（WHO, 1997）。経口免疫療法の有効性が不明確な理由は、摂取した抗原が体内最大の腸管免疫組織に到達する前に、胃や腸の消化器官により分解されてしまうためと考えられている。

注射や舌下による2-3年にわたる少量の抗原投与により誘導される抗原特異的免疫療法の機作に関してはTh2細胞増加の抑制、ヘルパー1型（Th1）細胞¹⁶の増加、制御性T細胞¹⁷の誘導、IgEに対する遮断抗体¹⁸の抗原特異的IgG4及びIgAが増加し、その結果として、アレルギー症状の発現が抑制されると推測されている（Akidis, 2012）。舌下免疫療法では摂取部位における局所的反応が比較的高頻度に発現するが、重度の副作用は報告されず、皮下注射と比較して安全性に優れていると報告されている（Cox et al., 2006; Calderón et al., 2012）。また「シダトレン®スギ花粉舌下液」のインタビューフォーム¹⁹（鳥居医薬品, 2014）においても重篤な副作用の発現がなく、皮下免疫療法と比較して安全であると記載されている。一方、経口免疫療法では、抗原を大量投与すると、短期間に抗原特異的T細胞のアナジー（無反応）²⁰やT細胞デリション²¹により免疫寛容が誘導されることが報告

¹⁵ 抗原提示細胞として機能する免疫細胞の一種。

¹⁶ ナイーブT細胞から分化誘導され、免疫応答の抑制的制御に関与する。免疫寛容に機構に関与している。

¹⁷ 免疫応答の抑制的制御（免疫寛容）に関与するT細胞の一種。免疫応答機構の過剰な免疫応答を抑制する。

¹⁸ アレルギー反応を起こす抗原と結合する抗体。

¹⁹ 処方箋医薬品の添付文書では不十分な情報を補うために企業から提供される総合的な情報提供書。

²⁰ T細胞に抗原特異的な不応答性（アナジー）が誘導されること。

²¹ 抗原特異的なT細胞が細胞死によって減少する機構。

されている (Friedman and Weiner 1994)。

現在実用化されている抗原特異的免疫療法薬は自然の抗原を利用しているため、花粉エキス中の抗原蛋白質の含有量を高めることができないことや、抗原と抗原特異的 IgE との結合による副作用の可能性は避けることはできないことから IgE 抗体との結合性を消失させた安全な人工抗原を用いた免疫療法の開発が進められている (Valenta et. al. 2010)。高い有効性と安全性を持つ人工抗原の設計には抗原蛋白質の全てのアミノ酸配列を持ち、抗原特異的 IgE 抗体との結合性を持たないことが必要と考えられている。

イネ種子においては、胚乳組織特異的に外来遺伝子産物を分泌蛋白質として発現させた場合、他の組織に比較して高度に蓄積させることが可能となる。特に外来遺伝子産物を蛋白質顆粒に集積させることで、高度かつ安定的に蓄積させることができ、高い消化酵素耐性が付与できることが示されている。そこで、我々は主要なスギ花粉抗原蛋白質の全アミノ酸配列を持ち、抗原特異的 IgE 抗体との結合性を持たない改変型アレルギー抗原蛋白質をイネ種子 (米) の蛋白質顆粒に高蓄積させ、簡便で安全な経口免疫療法 (薬) の開発を目指した。

イネ種子を用いた経口免疫寛容の利点

イネ種子の場合、組換え蛋白質を胚乳細胞中の蛋白質顆粒 (protein body (PB)) に集積させることで、大量に蓄積でき、胃や腸の消化酵素に対して高度の耐性を付与した組換え蛋白質を生産できる。また蛋白質顆粒のサイズは 2 μ m 以下であることから効率良く腸管に取り込まれる (別添資料 2)。そこで蛋白質工学的手法により、イネ種子中に抗原特異的 IgE 抗体との結合性を消失させ、摂取量を増大できる安全な立体構造改変型抗原を構築し、それを蛋白質顆粒に集積させることにより高度な消化酵素耐性を付与させ、さらに種子を介した経口摂取が可能になることから、極めて効率良く有効成分を大量に腸管免疫組織に搬送できるようになる。このような安定且つ効率的な有効成分運搬システムにより、抗原の大量投与による経口免疫寛容の誘導と同様なメカニズム (抗原特異的な T 細胞の無反応や欠失を誘導) を通じ、皮下注射や舌下を経由した抗原特異的免疫療法より短期間に免疫寛容を誘導できることから、治療効果の増大や治療期間の短縮を期待できる。

本組換えイネの開発

イネ種子をバイオリクター (生体内を有用物質生産等に利用するシステム) として外来の遺伝子産物を大量かつ安定的に蓄積させることが可能である。さらに先に述べた様に、種子胚乳細胞中の蛋白質顆粒に集積させることで、胃や腸の消化酵素に対して高度の耐性を付与できる。蛋白質顆粒に抗原蛋白質を蓄積させたコメや抗原蛋白質を集積している蛋白質顆粒を花粉症モデルマウスに経口投与することで、抗原蛋白質そのものを経口投与した場合と比較して、極めて少量で免疫寛容を誘導

資料2：審査データの概要

できることが明らかになっている (Takagi et al., 2010; Wakasa et al., 2015)。

図1に示す様に、スギ花粉アレルギー症状は、肥満細胞表面上にレセプターを介して結合している抗原特異的IgE抗体にスギ花粉抗原Cry j 1蛋白質やCry j 2蛋白質が結合する結果、肥満細胞の脱顆粒により放出されたヒスタミンやロイコトリエン等の細胞内化学伝達物質によって誘発される。この抗原特異的IgEとCry j 1及びCry j 2抗原蛋白質との結合には、アミノ酸の一次配列ではなく、抗原の立体構造が大きく関与している。そこで、農業生物資源研究所では、主要なスギ花粉抗原として同定されているCry j 1蛋白質及びCry j 2蛋白質それぞれの立体構造を改変し、抗原特異的IgE抗体との結合性を消失させたスギ花粉抗原(図2, 3, 4)をイネ種子(コメ)に高蓄積させた本組換えイネを開発した。また、抗原が胃や腸で分解されず腸管免疫組織に到達するように、本組換えイネで発現する立体構造改変型スギ花粉抗原が種子胚乳中の蛋白質顆粒に集積するように遺伝子発現カセットを設計した。

本組換えイネを原料とするスギ花粉症を対象とした経口免疫療法薬はスギ花粉抗原と抗原特異的IgEとの結合により引き起こされるアレルギーによる副作用がなく、従来法と比較して摂取量を増やすことが可能であることから治療期間を短縮できる画期的な新薬となる事が期待される。

なお医薬品原料としての品質を担保するため、栽培前に本組換えイネの玄米の品質・規格(導入遺伝子産物の発現量、外観等)を設定する。次いで、設定した品質・規格の玄米を得るため、本組換えイネの厳密な栽培管理規程を定め、栽培を実施する。収穫した玄米の品質・規格を確認後、本組換えイネ玄米を原料とする、臨床試験用の治験薬を製造し、医薬品の承認申請に必要な臨床試験を実施する計画である。

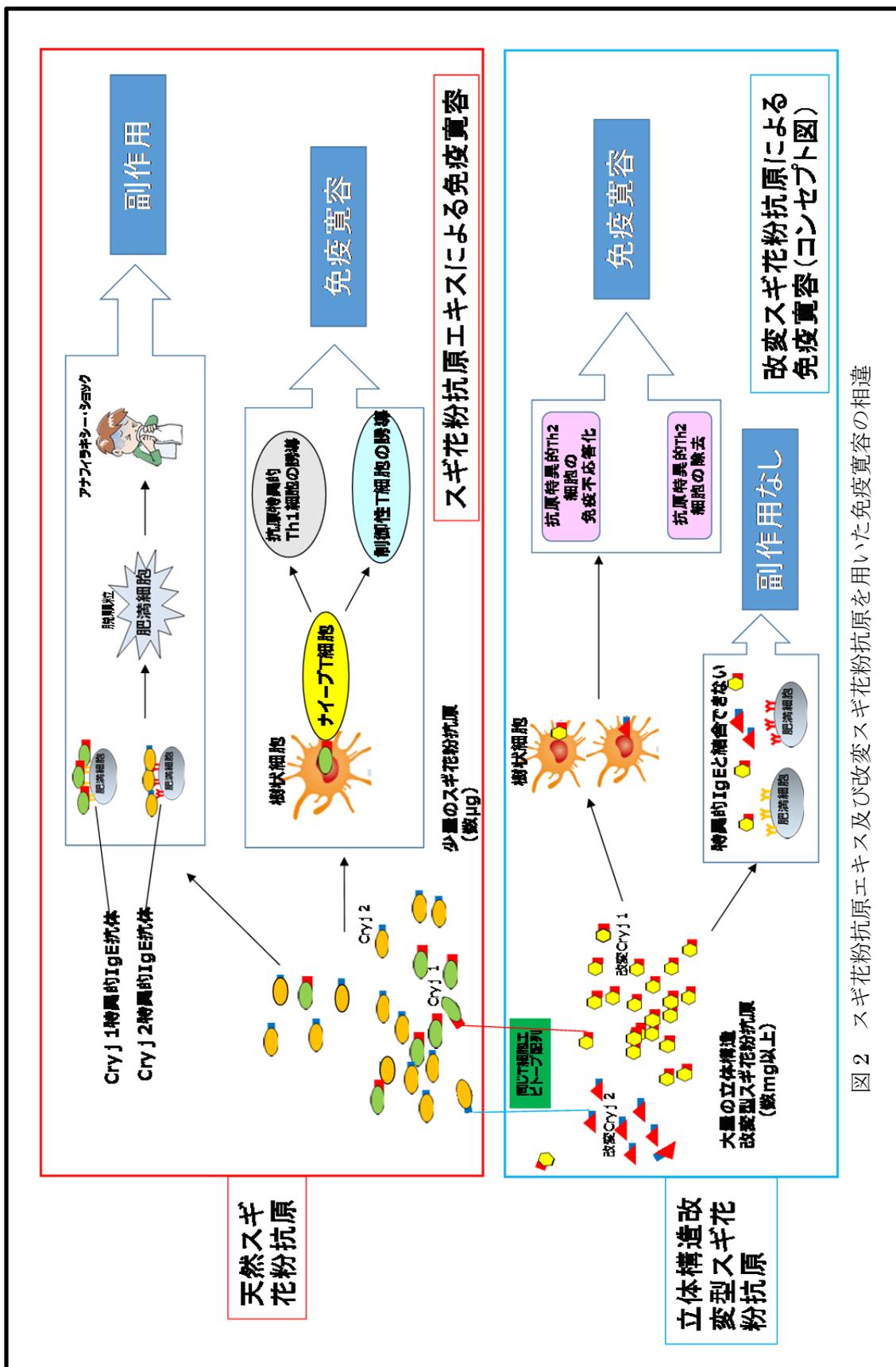


図2 スギ花粉抗原エキス及び改変スギ花粉抗原を用いた免疫寛容の相違

資料2：審査データの概要

図2に示す様に、経口免疫療法では腸管関連リンパ組織の樹状細胞による抗原の捕捉が起こり、免疫反応が引き起こされる。免疫反応にはT細胞が主要な役割を果たしており、摂取量等によってT細胞アナジー、T細胞デリーション、制御性T細胞等が誘導される（後藤，2006）。特に従来の注射や舌下からの免疫療法に比較して、イネ種子での経口摂取では大量の抗原を摂取することが可能になるため、効率的に抗原特異的Th2細胞のアナジーやデリーションにより免疫寛容が誘導されると考えられている。

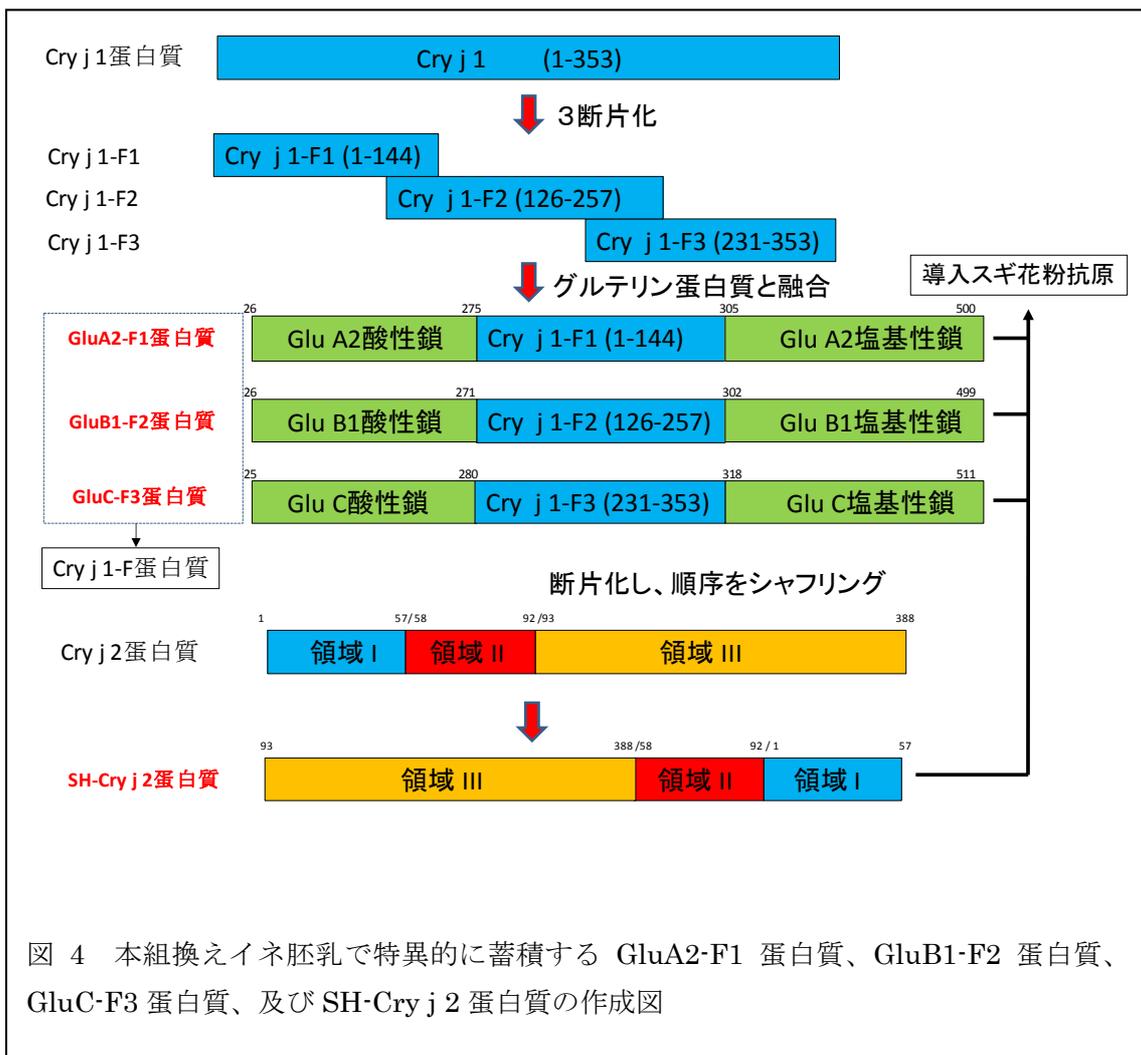
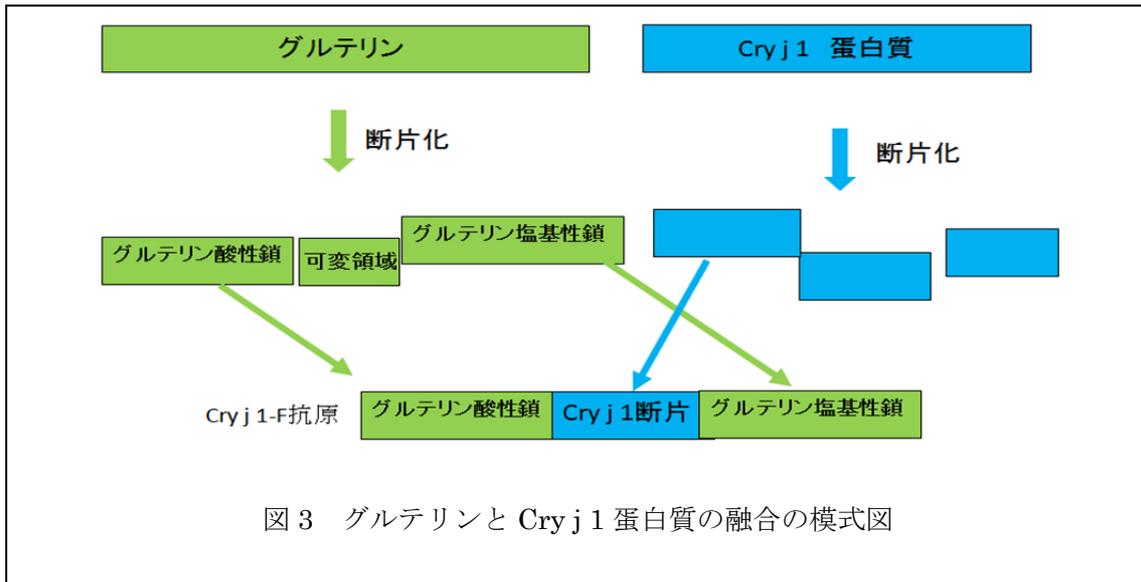
本組換えイネには、立体構造改変型スギ花粉抗原遺伝子として、*GluA2-F1*遺伝子、*GluB1-F2*遺伝子、*GluC-F3*遺伝子、*SH-Cry j 2*遺伝子が導入されている。このうち、本組換えイネの作出に用いられた*GluA2-F1*遺伝子、*GluB1-F2*遺伝子、*GluC-F3*遺伝子がコードするGluA2-F1蛋白質、GluB1-F2蛋白質、GluC-F3蛋白質（3種の蛋白質を合わせて「Cry j 1-F蛋白質」という。）は図3及び図4に示す様にグルテリン蛋白質とCry j 1蛋白質を融合させた蛋白質である。Cry j 1蛋白質の断片化ペプチドをグルテリン蛋白質と融合させることにより種子胚乳中に高蓄積させることが可能となった。

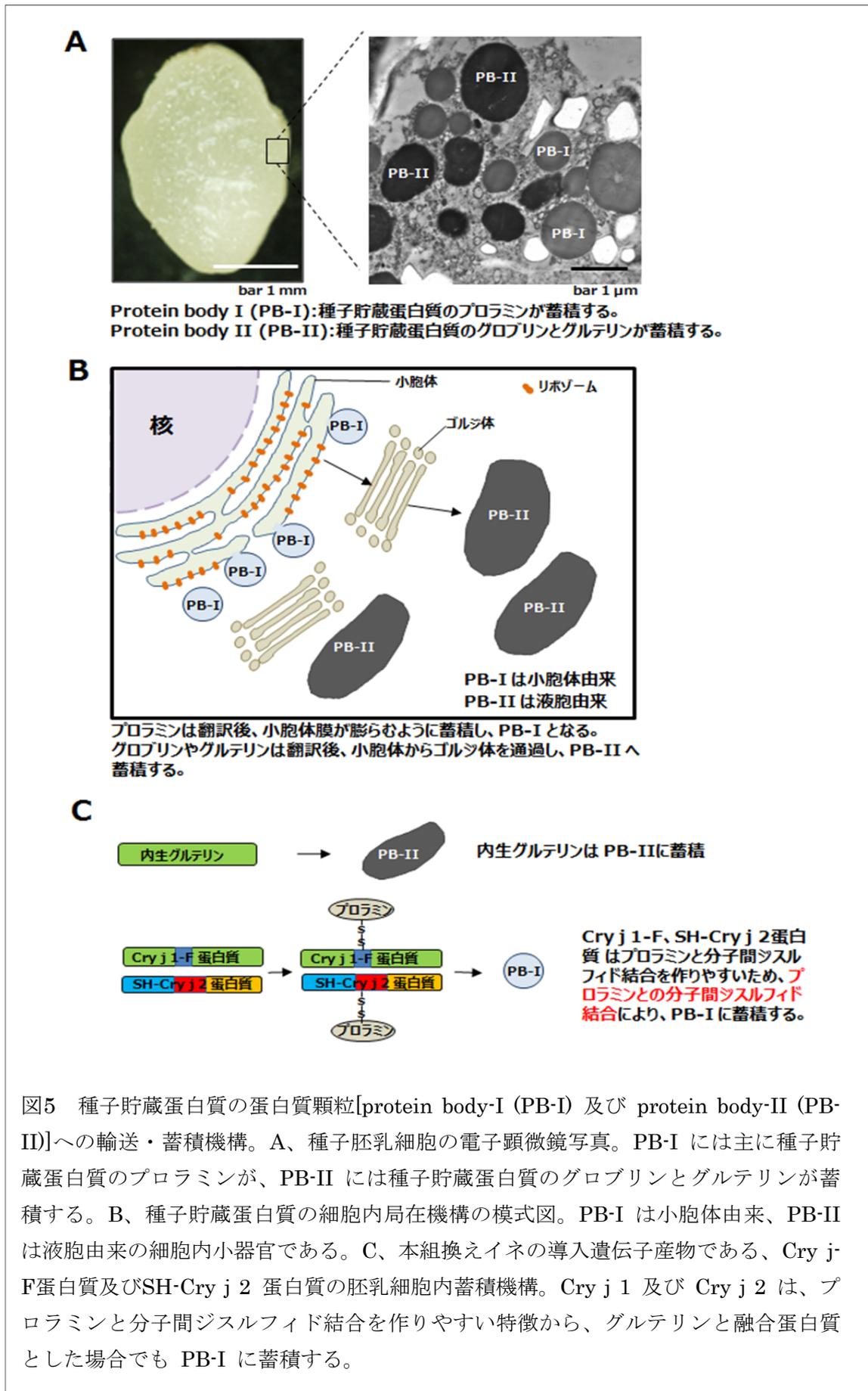
イネ胚乳中で*SH-Cry j 2*遺伝子のコードするSH-Cry j 2蛋白質は図4に示す様にCry j 2蛋白質のアミノ酸配列をシャフリング²²した新規蛋白質である。立体構造改変型スギ花粉抗原遺伝子のコードする4種類の立体構造改変型スギ花粉抗原は図5に示す様に小胞体局在化シグナル（KDELシグナル、p24 参照）やグルテリンの持つシグナルペプチドの働きにより、小胞体内腔に移行し、次いで内生の貯蔵蛋白質プロラミンとジスルフィド結合し小胞体由来の蛋白質顆粒protein body-I（以下「PB-I」という。）に蓄積する。

また本組換えイネには選抜マーカー遺伝子としてイネ由来の1点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子（以下「改変ALS遺伝子」という。）が導入されている。改変ALS遺伝子がコードする改変ALS蛋白質は野生型のイネALS蛋白質の第627番目のセリンがイソロイシンに置換されており、アセト乳酸合成酵素阻害剤（除草剤）であるピリミノバックに耐性を示す。

²² 蛋白質を断片化したペプチドの順番を変えて新たな蛋白質とすること。元の蛋白質の立体構造が失われる。

資料 2 : 審査データの概要

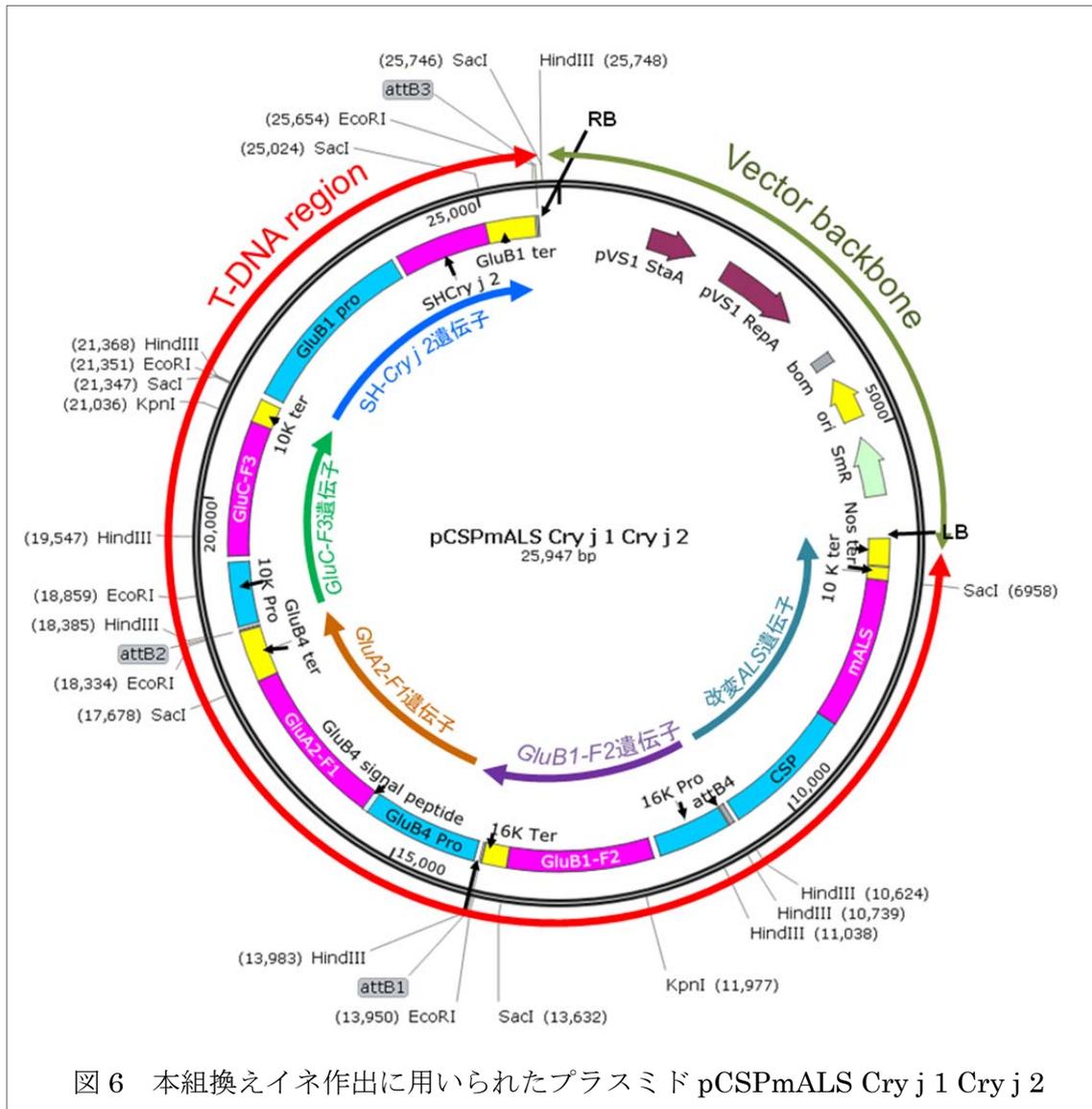




(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成および構成要素の由来

本組換えイネの作出に用いたプラスミドpCSPmALS_{Cryj1Cryj2}のマップを図6に、供与核酸の構成及び構成要素の由来は表2に示した。またその供与核酸の塩基配列を別添資料3-図1に示した。



資料2：審査データの概要

表2 本組換えイネの作出に用いた pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の各構成要素の由来及び機能

構成要素		サイズ (bp)	由来及び機能
<i>GluA2-F1</i> 遺伝子発現カセット			
<i>GluB4</i> プロモーター (<i>GluB4 pro</i>)		1471	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来の <i>GluB4</i> 遺伝子のプロモーター配列。イネ胚乳での転写を誘導する (Qu and Takaiwa, 2004)。
<i>GluB4</i> シグナルペプチド (<i>GluB4 sig</i>) 配列		72	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluB4</i> 遺伝子の翻訳開始点から72 bpの領域。蛋白質の小胞体膜の通過に参与するシグナル配列 (Masumura et al., 1989a)。
<i>GluA2-F1</i>	イネ種子貯蔵蛋白質グルテリン <i>GluA2</i> をコードする遺伝子 (<i>GluA2</i>) の部分配列	825	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluA2</i> 遺伝子のアミノ酸配列1~275の領域をコードする配列 (Takaiwa et al., 1987)。
	スギ由来の <i>Cry j 1</i> 遺伝子の部分配列 (<i>Cry j 1-F1</i> 遺伝子)	432	スギ (<i>Cryptomeria japonica</i>) 由来の <i>Cry j 1</i> 遺伝子のアミノ酸配列の1~144領域をコードする配列 (Sone et al., 1994)。
	<i>GluA2</i> 遺伝子の部分配列	821	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluA2</i> 遺伝子のアミノ酸配列305~449の領域をコードする配列及び3'UTR領域 (Takaiwa et al., 1987)。
<i>GluB4</i> ターミネーター (<i>GluB4 ter</i>)		654	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluB4</i> 遺伝子のターミネーター領域。転写を停止する (Masumura et al., 1989a)。

資料2：審査データの概要

表2 本組換えイネの作出に用いた pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素		サイズ (bp)	由来及び機能
<i>GluB1-F2</i> 遺伝子発現カセット			
16 kDa プロラミンプロモーター (<i>16k pro</i>)		933	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の16 kDa プロラミン遺伝子のプロモーター配列。イネ胚乳での転写を誘導する (Qu and Takaiwa, 2004)。
<i>GluB1-F2</i>	イネ種子貯蔵蛋白質グルテリン <i>GluB1</i> 遺伝子 (<i>GluB1</i>) の部分配列	813	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluB1</i> 遺伝子のアミノ酸配列1~271の領域をコードする配列 (Takaiwa et al., 1989)。 <i>GluB1</i> 遺伝子のアミノ酸配列1~25領域はシグナルペプチドとして蛋白質の小胞体膜の通過に関与するシグナル配列 (Takaiwa et al., 1989, 1991)。
	<i>Cry j 1</i> 遺伝子の部分配列 (<i>Cry j 1-F2</i> 遺伝子)	396	スギ (<i>C. japonica</i>) 由来の <i>Cry j 1</i> 遺伝子のアミノ酸配列126~257の領域をコードする配列 (Sone et al., 1994)。
	<i>GluB1</i> 遺伝子の部分配列	715	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluB1</i> 遺伝子のアミノ酸配列302~499の領域をコードする配列及び3'UTR領域 (Takaiwa et al., 1989)。
16 kDa プロラミンターミネーター (<i>16k ter</i>)		316	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の16 kDa プロラミン遺伝子のターミネーター配列。転写を停止する (Mitsukawa et al., 1999)。

資料2：審査データの概要

表2 本組換えイネの作出に用いた pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素		サイズ (bp)	由来及び機能
<i>GluC-F3</i> 遺伝子発現カセット			
10 kDaプロラミンプロモーター (<i>10k pro</i>)		825	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の10 kDa プロラミン遺伝子のプロモーター配列。イネ胚乳での転写を誘導する (Qu and Takaiwa, 2004)。
<i>GluC-F3</i>	イネ種子貯蔵蛋白質グルテリン <i>GluC</i> をコードする遺伝子 (<i>GluC</i>) の部分配列	840	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluC</i> 遺伝子のアミノ酸配列1~280の領域をコードする配列 (Qu et al., 2008; Mitsukawa et al., 1998)。 <i>GluC</i> 遺伝子のアミノ酸配列1~24領域はシグナルペプチドとして遺伝子産物の小胞体への通過に関与するシグナル配列 (Mitsukawa et al., 1998)。
	スギ由来の <i>Cry j 1</i> 遺伝子の部分配列 (<i>Cry j 1 - F3</i> 遺伝子)	369	スギ (<i>C. japonica</i>) 由来の <i>Cry j 1</i> 遺伝子のアミノ酸配列231~353の領域をコードする配列 (Sone et al., 1994)。
	<i>GluC</i> 遺伝子の部分配列	582	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluC</i> 遺伝子のアミノ酸配列318~511の領域をコードする配列。319番目のコドンがGTC (Val) からGGA (Gly) に変更 (Qu et al., 2008; Mitsukawa et al., 1998)。
10 kDaプロラミンターミネーター (<i>10k ter</i>)		302	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の10 kDaプロラミン遺伝子のターミネーター領域。転写を停止する (Masumura et al., 1989b)。

資料2：審査データの概要

表2 本組換えイネの作出に用いた pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>SH-Cry j 2</i> 遺伝子発現カセット		
<i>GluB1</i> プロモーター (<i>GluB1 pro</i>)	2336	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluB1</i> 遺伝子のプロモーター配列。イネ胚乳での転写を誘導する (Takaiwa et al., 1991; Qu and Takaiwa, 2004)。
<i>GluB1</i> シグナルペプチド (<i>GluB1 sig</i>)	55	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の <i>GluB1</i> 遺伝子の翻訳開始点から 55 bp の領域。SH-Cry j 2 蛋白質の小胞体膜の通過に関する (Takaiwa et al., 1989, 1991)。
<i>SH-Cry j 2</i>	1164	スギ (<i>C. japonica</i>) 由来の花粉抗原である Cry j 2 蛋白質のアミノ酸配列を3つの断片に分割し、順番を変えて (即ち、シャッフルして) 連結したシャッフルCry j 2 蛋白質をコードする遺伝子 (アミノ酸配列はCry j 2 蛋白質のアミノ酸配列で示すと 93~388-58~92-1~57 となる配列。ただし、本蛋白質の一番目のペプチド断片であるCry j 2 蛋白質の93~388ペプチド断片の93、94番目のアミノ酸は翻訳開始コドン(ATG)を導入したためにAsn-ArgからMet-Glyになるように塩基配列を変更)。また本遺伝子配列は胚乳における発現に最適化したコドンを用いて合成した (Suzuki et al., 2012; Komiyama et al., 1994)。
KDELシグナル (小胞体局在化シグナル)	12	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の導入遺伝子産物の小胞体係留に関するアミノ酸配列をコードする塩基配列。
<i>GluB1</i> ターミネーター (<i>GluB1 ter</i>)	632	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のグルテリン <i>GluB1</i> をコードする遺伝子 (<i>GluB1</i>) のターミネーター領域。転写を停止する (Takaiwa et al., 1991)。

資料2：審査データの概要

表2 本組換えイネの作出に用いた pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>mALS</i> 遺伝子発現カセット		
カルス特異的プロモーター (<i>CSP</i>)	1706	カルス (脱分化状態の培養細胞) において <i>mALS</i> 遺伝子の発現を誘導する (植物体では発現しない) イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の, <i>Os10g0207500</i> のプロモーター (<i>CSP</i> , <i>PCT/JP02/02817</i>)。 <i>Os10g0207500</i> はシロイヌナズナ由来の、葯や花粉の分化に関わる分子機能未知タンパク質 <i>TAPETUM DETERMINANT 1</i> と同源性を持つ。
改変 <i>ALS</i>	1935	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の1点変異型アセト乳酸合成酵素遺伝子。スルホニルウレア系除草剤 (ピリミノバック等) に耐性を示す様に、627番目のアミノ酸がSerからIleに置換されている (特許 <i>PCT/JP01/10014</i>)。
10 kDa プロラミンターミネーター (<i>10k ter</i>)	165	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の10 kDaプロラミン遺伝子のターミネーター領域。転写を停止する (Wakasa et al., 2012)。
<i>Nos</i> ターミネーター (<i>Nos ter</i>)	350	アグロバクテリウム (<i>Rhizobium radiobactor</i>) 由来のノパリン合成酵素遺伝子 (<i>Nos</i>) のターミネーター領域。転写を停止する。

資料2：審査データの概要

表2 本組換えイネの作出に用いた pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
T-DNA領域		
Right Border (RB)	25	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来のTiプラスミド (pTi) のT-DNA領域でT-DNAを伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列。
Ti plasmid Region	44	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来のpTiの機能を有しない配列。
pDEST TM R4-R3 vector (Invitrogen) 由来配列	44	pDEST TM R4-R3 (Invitrogen) ベクター中の配列。バクテリオファージM13由来。M13 Forward priming配列を含む。
<i>attB1</i>	21	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Dale and Ow, 1990)。
<i>attB2</i>	24	
<i>attB3</i>	21	
<i>attB4</i>	21	
Left Border (LB)	26	アグロバクテリウム (<i>R. radiobacter</i>) 由来のTiプラスミド (pTi) のT-DNA領域でT-DNAを伝達する際に利用される左側境界配列を含む配列。

資料2：審査データの概要

表2 本組換えイネの作出に用いた pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2 の各構成要素の由来及び機能（つづき）

プラスミド外骨格領域（本組換えイネには存在しない）（Hajdukiewicz et al., 1994）		
スペクチノマイシン耐性遺伝子 (<i>SmR</i>)	792	<i>Escherichia. Coli</i> 由来。ベクターを大腸菌またはアグロバクテリウムに導入する時に用いる選抜マーカー遺伝子。
Intervening Sequence	243	<i>E. coli</i> 由来。
Ori	589	<i>E. coli</i> 由来。複製開始点。
Intervening Sequence	185	<i>E. coli</i> 由来。
Bom	141	<i>E. coli</i> 由来。プラスミドの複製に関与。
Intervening Sequence	603	<i>E. coli</i> 由来。
pVS1 RepA	1074	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来。プラスミドの複製に関与。
Intervening Sequence	588	<i>P. aeruginosa</i> 由来。
pVS1 StaA	630	<i>P. aeruginosa</i> 由来。プラスミドの安定化に関与。
Intervening Sequence	1299	<i>P. aeruginosa</i> 由来。

□ 構成要素の機能

① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

以下に、*GluA2-F1*遺伝子発現カセット、*GluB1-F2*遺伝子発現カセット、*GluC-F3*遺伝子発現カセット、*SH-Cry j 2*遺伝子発現カセット及び改変*ALS*遺伝子発現カセットを構成している目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナルなどについて、構成要素とその機能について説明する。

【*GluA2-F1*遺伝子発現カセット】

*GluA2-F1*遺伝子は、図4に示すように、グルテリンGluA2蛋白質の酸性鎖領域をコードする配列（C末端30アミノ酸（可変領域）をコードする配列は欠損させている）と塩基性鎖をコードする配列の間に*Cry j 1*遺伝子を断片化した*Cry j 1-F1*遺伝子（*Cry j 1*蛋白質の1～144アミノ酸をコードする断片）を挿入して作成した遺伝子である（図3、図4）。*GluB4*シグナルペプチドは小胞体膜の通過に関与するシグナル配列である。イネ*GluB4*プロモーターは登熟中の胚乳で特異的に転写を誘導し、葉や根では発現を誘導しないことが報告されている（Qu and Takaiwa, 2004、別添資料4）。イムノブロット解析により、本組換えイネにおいても*GluA2-F1*遺伝子は*GluB4*プロモーターにより登熟中の胚乳特異的に転写が誘導されていることを確認した（図7）。

翻訳産物であるGluA2-F1蛋白質は、シグナルペプチド及び自身の特性により、胚乳細胞中のPB-Iに種子貯蔵蛋白質として蓄積されている。

イネ*GluB4*ターミネーターは*GluA2-F1*遺伝子の転写終結を規定する。

【*GluB1-F2*遺伝子発現カセット】

*GluB1-F2*遺伝子は、グルテリンGluB1蛋白質の酸性鎖領域をコードする配列（C末端31アミノ酸（可変領域）をコードする配列は欠損させている）と塩基性鎖をコードする配列の間に*Cry j 1*遺伝子を断片化した*Cry j 1-F2*遺伝子（*Cry j 1*蛋白質の126～256アミノ酸をコードする断片）を挿入して作成した遺伝子である（図3、図4）。

*GluB1-F2*遺伝子のアミノ酸配列1～25領域はシグナルペプチドとしてGluB1-F2蛋白質の小胞体膜の通過に関与する。イネ16 kDaプロラミンプロモーターは登熟中の胚乳で特異的に転写を誘導し、葉や根では発現を誘導しないことが報告されている（Qu and Takaiwa, 2004、別添資料4）。イムノブロット解析により、本組換えイネにおいても*GluB1-F2*遺伝子は16 kDaプロラミンプロモーターにより登熟中の胚乳特異的に転写が誘導されていることを確認した（図7）。翻訳産物であるGluB1-F2蛋白質は、シグナルペプチド及び自身の特性により、PB-Iに蓄積される。

イネ16 kDaプロラミンターミネーターは*GluB1-F2*遺伝子の転写終結を規定する。

【*GluC-F3*遺伝子発現カセット】

*GluC-F3*遺伝子は、グルテリンGluC蛋白質の酸性鎖領域をコードする配列（C末端28アミノ酸（可変領域）をコードする配列は欠損させている）と塩基性鎖をコードする配列の間に*Cry j 1*遺伝子を断片化した*Cry j 1-F3*遺伝子（*Cry j 1*蛋白質の231～353アミノ酸をコードする断片）を挿入して作成した遺伝子である（図3、図4）。

*GluC-F3*遺伝子のアミノ酸配列1～24領域はシグナルペプチドとしてGluC-F3蛋白質の小胞体膜の通過に関与する。イネ10 kDaプロラミンプロモーターは登熟中の胚乳で特異的に転写を誘導し、葉や根では発現を誘導しないことが報告されている（Qu and Takaiwa, 2004、別添資料4）。イムノブロット解析により、本組換えイネにおいても*GluC-F3*遺伝子は10 kDaプロラミンプロモーターにより登熟中の胚乳特異的に転写が誘導されていることを確認した（図7）。翻訳産物であるGluC-F3蛋白質は、シグナルペプチド及び自身の特性により、PB-Iに蓄積される。

イネ10 kDaプロラミンターミネーターにより*GluC-F3*遺伝子の転写終結を規定する。

【*SH-Cry j 2*遺伝子発現カセット】

*SH-Cry j 2*遺伝子はスギ由来の*Cry j 2*遺伝子を3つの断片（領域I、領域II、領域III）にし順番を領域III-領域II-領域Iにシャフリングした新規遺伝子である（図4）。

イネ*GluB1*プロモーターは登熟中の胚乳で特異的に転写を誘導し、葉や根では発現を誘導しないことが報告されている（Qu and Takaiwa, 2004、別添資料4）。イムノブロット解析により、本組換えイネにおいても*SH-Cry j 2*遺伝子はイネ*GluB1*プロモーターにより登熟中の胚乳特異的に転写が誘導されていることを確認した（図7）。GluB1シグナルペプチドは小胞体膜の通過に関与するシグナル配列である。KDELはイネ由来の導入遺伝子産物の小胞体係留に関与するアミノ酸配列をコードする塩基配列である。翻訳産物であるSH-Cry j 2蛋白質は付加されたKDELシグナルにより小胞体に留まり、さらにSH-Cry j 2蛋白質の特性によりPB-Iに蓄積される。

イネ*GluB1*ターミネーターは*SH-Cry j 2*遺伝子の転写終結を規定する。

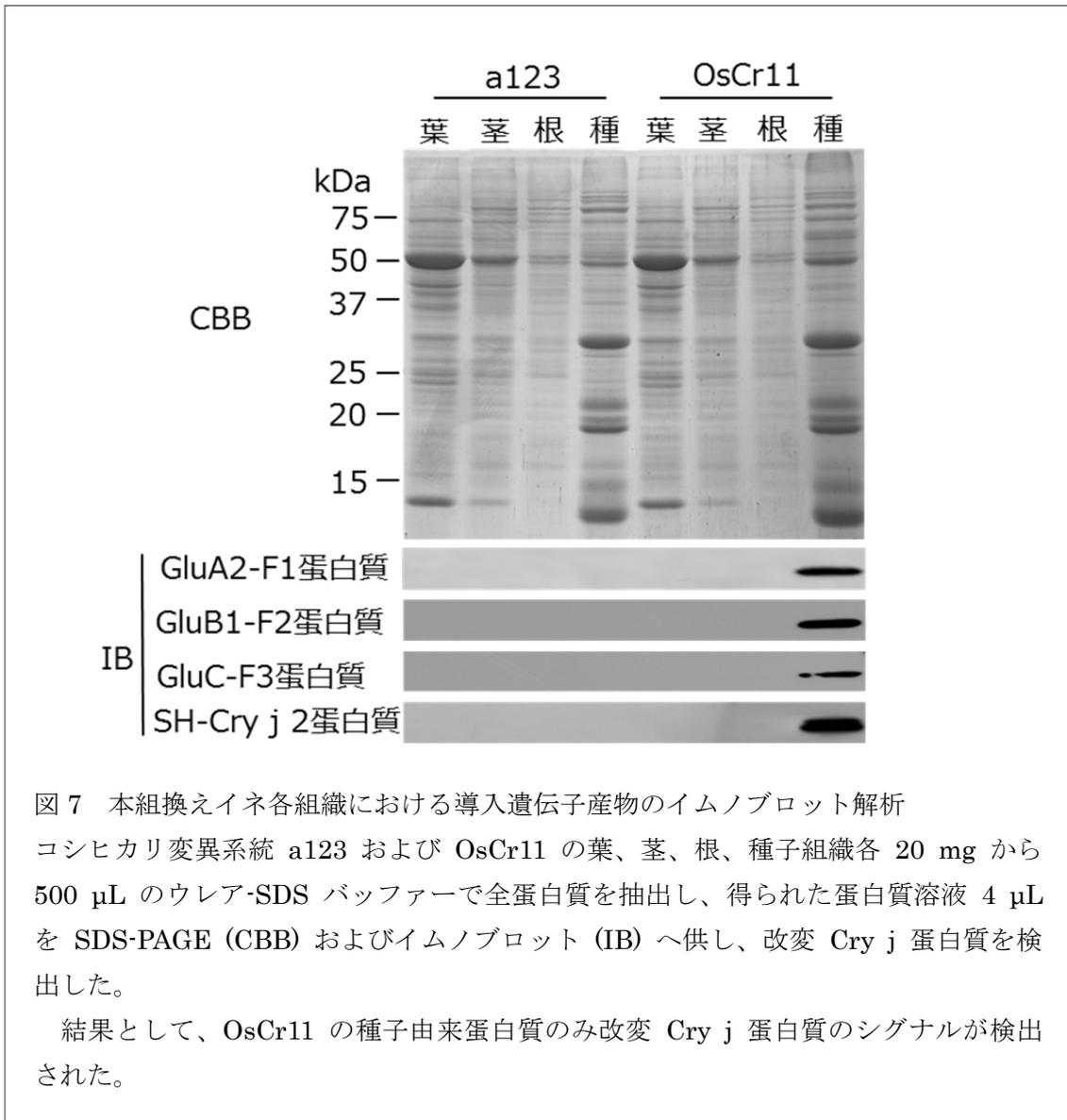


図7 本組換えイネ各組織における導入遺伝子産物のイムノブロット解析
 コシヒカリ変異系統 a123 および OsCr11 の葉、茎、根、種子組織各 20 mg から
 500 μ L のウレア-SDS バッファーで全蛋白質を抽出し、得られた蛋白質溶液 4 μ L
 を SDS-PAGE (CBB) およびイムノブロット (IB) へ供し、改変 Cry j 蛋白質を検
 出した。

結果として、OsCr11 の種子由来蛋白質のみ改変 Cry j 蛋白質のシグナルが検出
 された。

【改変ALS遺伝子発現カセット】

アセト乳酸合成酵素阻害剤である除草剤のピリミノバックは、植物中の分岐鎖アミノ酸合成に關与する内性アセト乳酸合成酵素（ALS）の活性を特異的に阻害するため、植物中に分岐鎖アミノ酸が合成されず、植物を枯死させる。本組換えイネにおいて、選抜マーカーとして用いた改変ALS遺伝子のコードする改変ALS蛋白質は、野生型のイネALS蛋白質（644アミノ酸残基）の第627番目のセリンをイソロイシンに変換した1点変異型アセト乳酸合成酵素蛋白質であり、ピリミノバック存在下でも活性が阻害されずにイネカルスにALS阻害剤耐性を付与するものである。

プロモーターは、イネ由来のカルス特異的プロモーターで、カルス（脱分化状態の培養細胞）特異的に目的遺伝子の発現を誘導する。カルス特異的プロモーターを用いた改変ALS遺伝子の発現解析を実施し、改変ALS遺伝子は、カルスにおいてのみ改変ALS蛋白質の発現を誘導することを確認している

（Wakasa et al., 2009）。カルス特異的プロモーターによる改変ALS遺伝子の組織特異的発現制御様式を別添資料5に示す。

イネ10 kDa プロラミンターミネーター及びアグロバクテリウム由来のNosターミネーターは改変ALS遺伝子の転写終結を規定する。

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により產生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

立体構造改変型スギ花粉抗原

Cry j 1-F蛋白質

本組換えイネ種子にはスギ由来のCry j 1蛋白質の断片とイネ由来のグルテリン蛋白質とを融合させた3種類のCry j 1-F蛋白質が蓄積している。Cry j 1-F蛋白質はPB-Iに蓄積している。Cry j 1-F遺伝子（GluA2-F1遺伝子、GluB1-F2遺伝子、GluC-F3遺伝子）のコードするアミノ酸配列を別添資料3-図2～図4に示した。Cry j 1-F蛋白質は、Cry j 1蛋白質に対する特異的免疫反応に必要なCry j 1蛋白質中のすべてのT細胞エピトープ配列を保持している。

経口免疫療法では腸管関連リンパ組織の樹状細胞により抗原が捕捉されることが重要であることから、Cry j 1-F蛋白質が胃では消化されず、腸に達することが必要である。Cry j 1-F蛋白質は、胚乳細胞中のPB-Iに種子貯蔵蛋白質として蓄積することで、ペプシン及びパンクレアチンのような蛋白質分解酵素に対して難消化性を示す（Wakasa et al., 2013、図8）。よって改変スギ花粉抗原は効率的に腸管免疫系に届くことが期待される。その後、Cry j 1-F蛋白質が腸管免疫系の樹状細胞に捕捉され、抗原の持つT細胞エピトープ配列がT細胞に提示

され免疫寛容が誘導されると考えられている。

本組換えイネで産生されるCry j 1-F蛋白質が、既知のアレルゲン及び毒性蛋白質との相同性がないかを調査した。相同性検索には、ネブラスカ大学Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) の既知アレルゲンデータベース (Release 15 2015年1月12日版、2015年6月8日検索) 及び毒性蛋白質データベース (MvirDB: <http://mvirdb.llnl.gov>、2015年6月8日検索)、がん遺伝子データベース (COSMIC : <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>、2015年6月8日検索) を用いた。WHOとFAOによって設置された国際食品規格委員会 (Codex Alimentarius Commission) は、新規蛋白質内の連続した80アミノ酸の内35%超が既知のアレルギー性を有する蛋白質と一致した場合に、IgEとの交差性の可能性を検討するように定めている (CODEX, 2003)。そこでOpen Reading Frame (ORF) 内の連続した80アミノ酸のうち、35%超が既知のアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と一致する場合、相同性があると定義した。

アレルゲン蛋白質であるスギ花粉抗原Cry j 1蛋白質は、Cry j 1-F蛋白質の構成要素となっている。よってCry j 1-F蛋白質はCry j 1蛋白質及びCry j 1蛋白質と相同なアレルゲン蛋白質と相同性を示した。また、Cry j 1-F蛋白質の構成要素であるイネ由来のグルテリン蛋白質はアレルゲン性を持つ豆類の11Sグロブリン蛋白質と相同性を持つ。よって、Cry j 1-F蛋白質はアレルゲン性を持つ豆類の11Sグロブリン蛋白質と相同性を示した。しかしイネグルテリン蛋白質がアレルゲン性を有するという報告はない。なお、これら配列以外は、既知のアレルゲン及び毒性蛋白質との類似の配列は認められなかった。

SH-Cry j 2蛋白質

本組換えイネ種子にはスギ由来のCry j 2蛋白質をシャフリングしたSH-Cry j 2蛋白質が蓄積している。SH-Cry j 2蛋白質はPB-Iに蓄積している。*SH-Cry j 2* 遺伝子のコードするアミノ酸配列を別添資料3-図5に示した。SH-Cry j 2蛋白質は、Cry j 2蛋白質に対する特異的免疫反応に必要なCry j 2蛋白質中のすべてのT細胞エピートープ配列を保持している。

経口免疫療法では腸管関連リンパ組織の樹状細胞による抗原の捕捉により、免疫反応が引き起こされることから、SH-Cry j 2蛋白質が胃では消化されず、腸に達することが必要である。SH-Cry j 2蛋白質は、胚乳細胞中のPB-Iに種子貯蔵蛋白質として蓄積することで、ペプシン及びパンクレアチンのような蛋白質分解酵素に対して難消化性を示す (Wakasa et al., 2013、図8) ことから、効率的に腸管免疫系に搬送されることが期待される。その後、SH-Cry j 2蛋白質が腸管免疫系の樹状細胞に捕捉され、抗原の持つT細胞エピートープ配列がT細胞に提示され免疫寛容が誘導されると考えられている。

資料2：審査データの概要

既知のアレルゲン及び毒性蛋白質との相同性がないかをCry j 1-F蛋白質と同様に調査した。アレルゲン蛋白質であるスギ花粉抗原Cry j 2蛋白質はSH-Cry j 2蛋白質の構成要素となっている。よって、SH-Cry j 2蛋白質はCry j 2蛋白質及びCry j 2蛋白質と相同なアレルゲン蛋白質と相同性を示した。なお、これら配列以外は、既知のアレルゲン及び毒性蛋白質との類似の配列は認められなかった。

改変スギ花粉抗原の安全性評価

立体構造改変型スギ花粉抗原は、スギ花粉抗原Cry j 1及びCry j 2蛋白質の立体構造を改変した蛋白質であることからアレルギー性に関する安全性評価を実施した。

スギ花粉抗原が特異的IgE抗体と結合することによりアレルギー症状を引き起こすことが知られている（図1）。しかし、IgE抗体は抗原の立体構造を厳密に認識して結合することから、立体構造の変化したスギ花粉抗原は、スギ花粉抗原に特異的なIgE抗体との結合性を消失し、アレルギー症状を引き起こさないことが予想された。そこで、立体構造改変型スギ花粉抗原とスギ花粉抗原特異的IgE抗体の結合性についてスギ花粉症モデルマウスを用いて評価した。評価する改変スギ花粉抗原として大腸菌で発現させたCry j 1-F1断片及びSH-Cry j 2蛋白質を用いた。その結果、スギ花粉症モデルマウスの抗血清は、Cry j 1蛋白質及びCry j 2蛋白質に対しては強い反応性を示したが、Cry j 1-F1断片及びSH-Cry j 2蛋白質との反応は検出限界以下であった。（別添資料6）。なお、Cry j 1-F2断片及びCry j 1-F3断片は不溶性で、本試験を実施することができなかった。

またマクロファージ等の抗原提示細胞がスギ花粉抗原を取り込み、スギ花粉抗原を認識するTh2細胞が分化増殖し、その結果としてスギ花粉症を発症することが知られている（図1）。改変スギ花粉抗原がスギ花粉症を発症させる可能性を評価するために、ニホンザルを用いた安全性試験を実施した²³。ニホンザルでは、本組換えイネ種子(精白米)の経口摂取により、末梢血の単核球²⁴におけるスギ花粉抗原特異的なT細胞反応増殖性及びスギ花粉抗原特異的IgE抗体価の上昇が認められない事を確認した（別添資料7）。以上の結果は、改変スギ花粉抗原を発現したイネ種子を摂取したニホンザルがスギ花粉症を発症する可能性が低い事を示している。

さらにラット、カニクイザルを用いた本組換えイネ（立体構造改変型スギ花粉抗原濃縮物²⁵・精白米）の薬事法に従った経口投与毒性試験²⁶の結果、有害事象

²³ 試験中の動物の健康管理及び試験に伴う苦痛等の軽減に対する対応は、動物愛護（福祉）の観点から十分考慮して対応した。

²⁴ 血液中の単核球細胞。白血球の一種であり、免疫原性のリスク評価に用いられる。

²⁵ 玄米粉末をアマラーゼ処理し、デンプンを除去、乾燥したもの。立体構造改変型スギ花

は確認されなかった（別添資料8）。

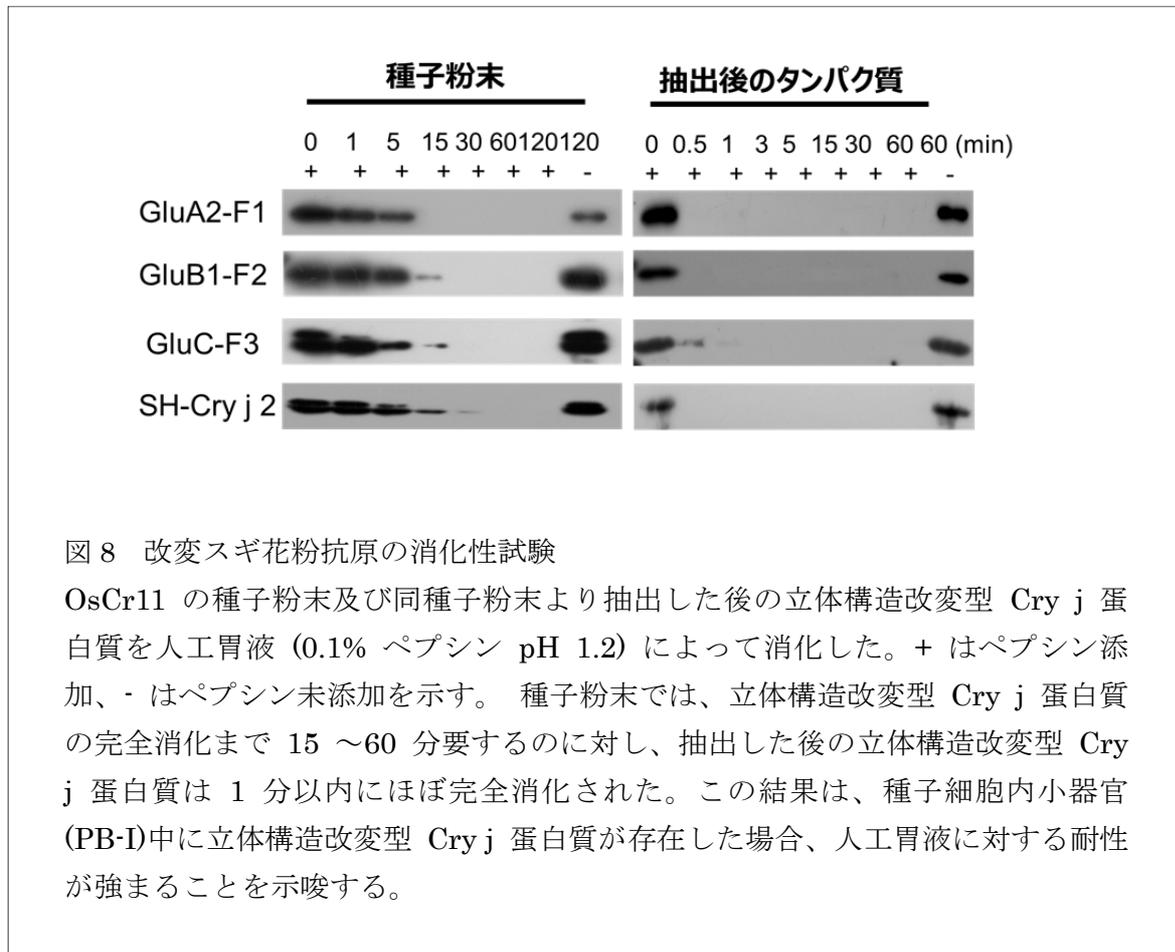


図8 改変スギ花粉抗原の消化性試験

OsCr11 の種子粉末及び同種子粉末より抽出した後の立体構造改変型 Cry j 蛋白質を人工胃液（0.1% ペプシン pH 1.2）によって消化した。+ はペプシン添加、- はペプシン未添加を示す。種子粉末では、立体構造改変型 Cry j 蛋白質の完全消化まで 15 ～60 分要するのに対し、抽出した後の立体構造改変型 Cry j 蛋白質は 1 分以内にほぼ完全消化された。この結果は、種子細胞内小器官 (PB-I)中に立体構造改変型 Cry j 蛋白質が存在した場合、人工胃液に対する耐性が強まることを示唆する。

粉抗原が濃縮されている。

²⁶実験計画は設置した動物実験委員会によって動物愛護・福祉の観点を含め審査した。また動物実験が動物愛護（福祉）の観点を十分考慮して適正に実行されたことを確認した。

改変ALS蛋白質

本組換えイネの選抜にはスルホニルウレア系除草剤耐性を付与するイネ由来の改変 ALS 蛋白質のカルスでの発現を利用した。改変 ALS 遺伝子のコードするアミノ酸配列を別添資料 3-図 6 に示した。

本組換えイネで産生される改変ALS蛋白質が、既知のアレルゲン及び毒性蛋白質との相同性がないかをCry j 1-F蛋白質と同様に調査した。相同性検索を実施したところ、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。毒性蛋白質データベースにおいては、phosphonopyruvate decarboxylase (*Streptomyces coelicolor* A3 2 由来) と弱い相同性を示した (e-value: 0.0003)。なお、イネ内生ALS蛋白質も同様に相同性を示した。しかしながら、イネ内生ALS蛋白質は恒常的に発現していること (Wakasa et al., 2009)、また極めて長期に渡る食経験があり、これまで毒性に関する報告は無い。したがって、内生ALS蛋白質と1アミノ酸のみ異なる改変ALS蛋白質が毒性を示す可能性は極めて低い。がん遺伝子との相同性は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

立体構造改変型スギ花粉抗原

本組換えイネ種子中の4種類の立体構造改変型スギ花粉抗原は、プロラミンとジスルフィド結合を介して会合・凝集する形でPB-I中のみ不溶性の種子貯蔵蛋白質として蓄積しているため、代謝にかかわる酵素の基質となる事や酵素活性を有するとは考えにくい。また、立体構造改変型スギ花粉抗原を発現させるために用いた胚乳特異的プロモーターは種子でのみ発現を誘導し、イネ植物体の他の組織 (根、葉、茎等) では発現を誘導しないことが調べられている (図7)。よって立体構造改変型スギ花粉抗原がイネの代謝系を変化させることは考えられない。

改変 ALS 蛋白質

改変 ALS 蛋白質を発現させるために用いたカルス特異的プロモーターは、イネカルス特異的に発現し、イネ植物体の各部位 (根、葉、茎、胚乳、胚) では検出限界以下であることが調べられている (特許 PCT/JP02/02817)。また同プロモーター制御下の改変 ALS 遺伝子が、イネカルス特異的に発現し、根、茎、葉及び種子では発現しないことを RT-PCR で確認した (別添資料 5、Wakasa et al., 2009)。また本組換えイネを用いた mRNA-seq のデータも、葉、及び胚乳で同遺伝子が発現していないことを示していた (別添資料 9)。このように、改変 ALS 蛋白質は、内生の ALS 蛋白質と独立して発現していることが示された。さらに本組換えイネの発芽試験の結果、幼苗がピリミノバックに耐性を持たないことを確認した。

これらのことから、改変 *ALS* 遺伝子発現産物は本組換えイネで発現していないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本組換えイネの作出に用いたpCSPmALS Cry j 1 Cry j 2は、pPZP200 系バイナリーベクターpCSPmALS43GW (Hajduliewicz et al., 1994; Wakasa et al., 2009) を基に構築された。詳細は表2及び図6に記載した。T-DNA領域 (Right BorderとLeft Borderの間) に、選抜マーカー遺伝子である、改変*ALS*遺伝子及び立体構造改変型スギ花粉抗原遺伝子 (*GluA2-F1*遺伝子、*GluB-F2*遺伝子、*GluC-F3*遺伝子、*SH-Cry j 2*遺伝子) の5つの発現遺伝子カセットが挿入されている。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えイネの作出に用いられたpCSPmALS Cry j 1 Cry j 2の全塩基数は25,947bpである。挿入した塩基配列は別添資料3-図1に示した通りである。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

大腸菌及びアグロバクテリウムにおける構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として大腸菌由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*SmR*) がプラスミド外骨格領域に存在しているものの、本組換えイネのゲノム中にこの遺伝子は導入されていない。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

本ベクターには感染性の知られている配列は含まれていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された核酸全体の構成図は図9のとおりである。

資料2：審査データの概要

次世代シーケンサー（Next Generation Sequencing: NGS）²⁷による全ゲノムにわたる解析の結果、導入されたT-DNA領域のLB外側に構成要素の断片化配列が挿入されていることを確認した。断片化配列の構成は表4及び別添資料10に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

pCSPmALS Cry j 1 Cry j 2をアグロバクテリウム法によって、非組換えイネ、コシヒカリ変異系統a123の胚盤由来カルスに導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

コシヒカリ変異系統a123種子胚盤由来のカルスとpCSPmALS Cry j 1 Cry j 2を含むアグロバクテリウム（*R. radiobacter*）EHA105株を共存培養した後、ピリミノバック（1 μ M）を添加した組織培養培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウム菌体の残存の有無

本組換えイネT₅世代の幼苗10個体から抽出したDNAを断片化し、全断片をPCR増幅した後にNGS解析を行った結果、アグロバクテリウムゲノム及びT-DNA外骨格領域の混入は認められなかった（別添資料11-7）。以上の結果から、アグロバクテリウム菌体は残存していないことを確認した。

²⁷次世代シーケンス技術（NGS）は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析はNGSのうちIllumina社製の次世代シーケンサーHiSeq 2000を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

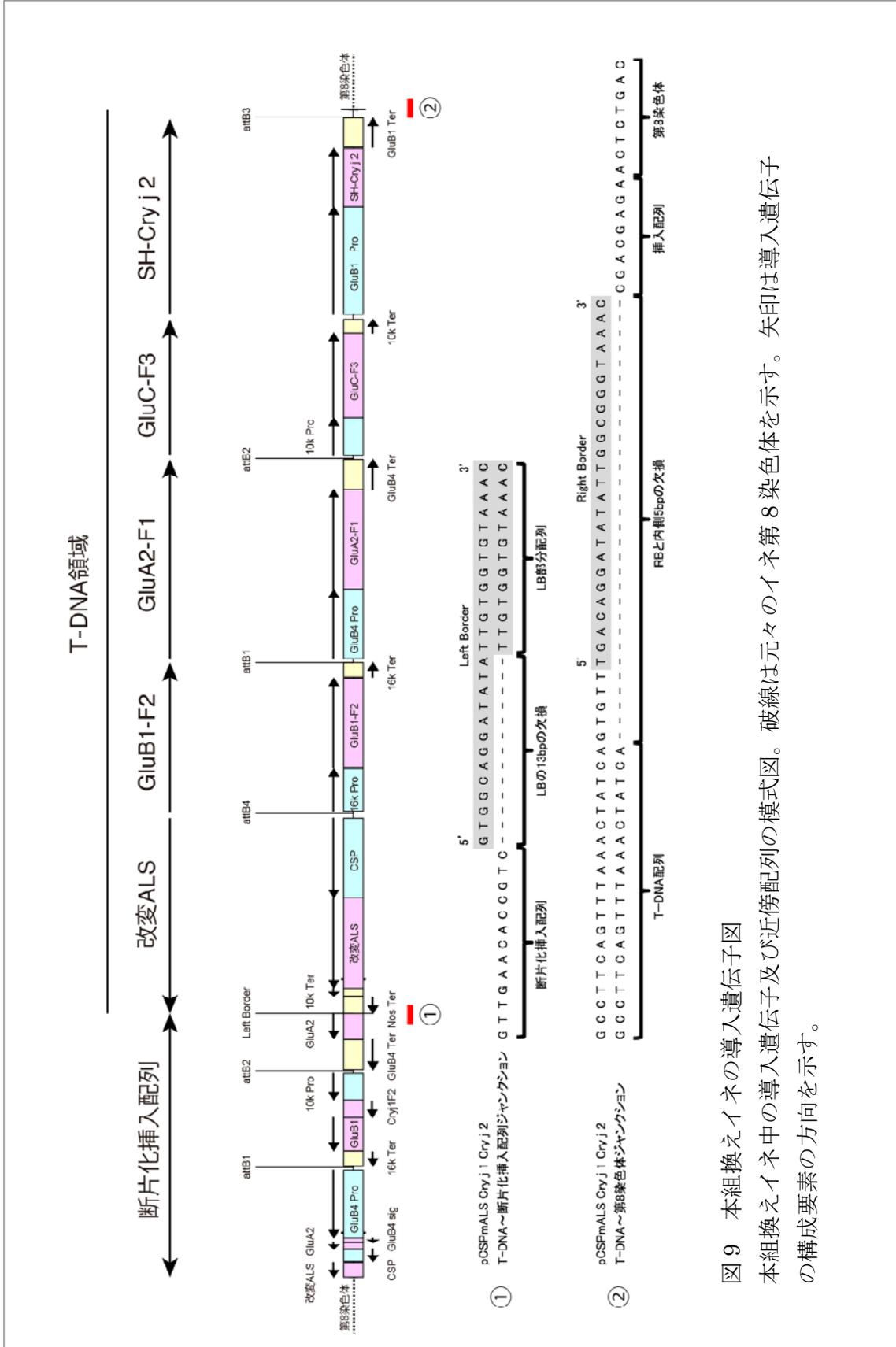
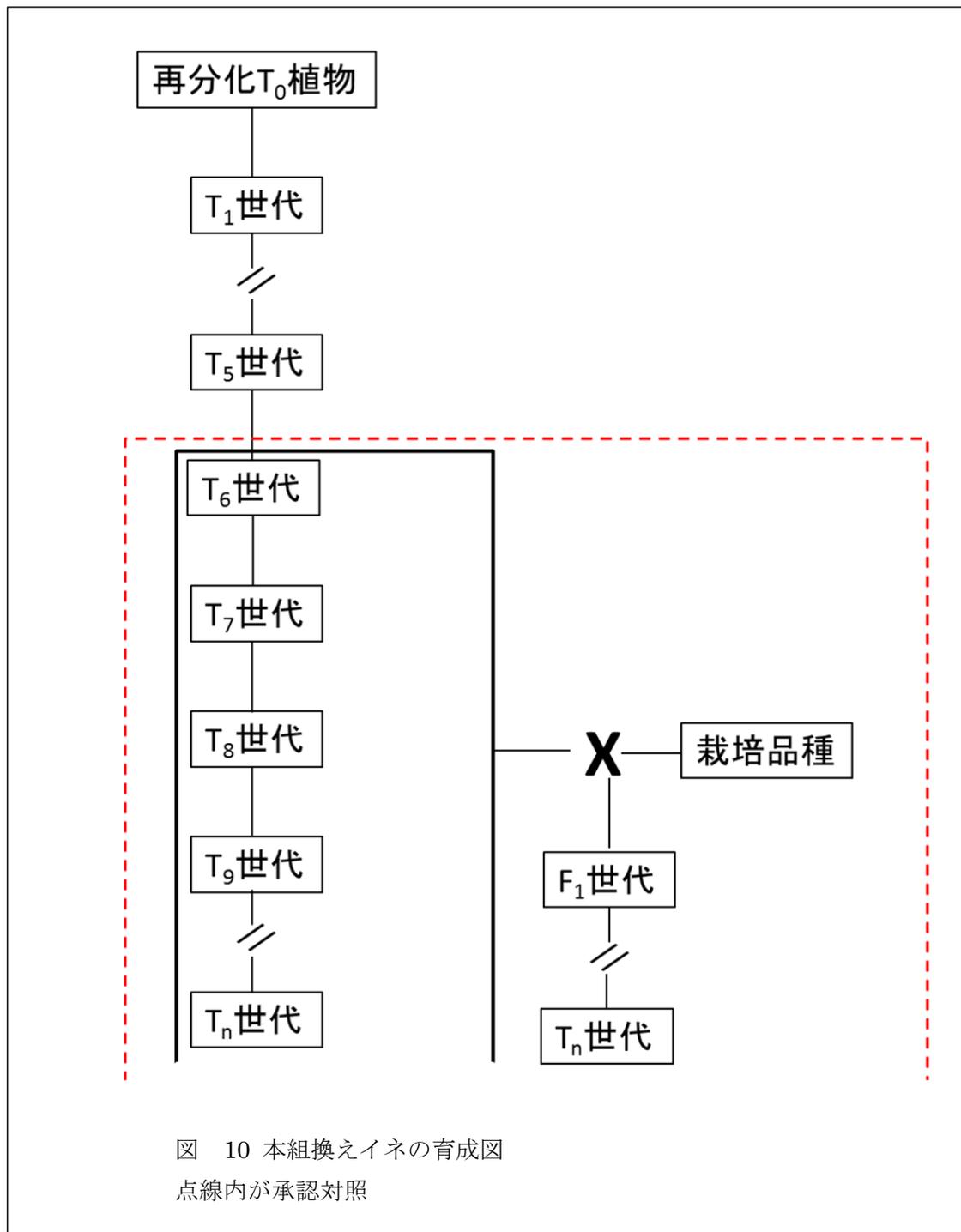


図9 本組換えイネの導入遺伝子図
 本組換えイネ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図。破線は元々のイネ第8染色体を示す。矢印は導入遺伝子の構成要素の方向を示す。

- ③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

形質転換された再分化個体（T₀）を得た。各T₀の後代T₁世代を用い、4種類の立体構造改変型Cry j蛋白質を種子中に最も多く蓄積している系統を選抜した。この1系統の後代を自殖により世代を進めた。T₅世代で優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に、最終的に本組換えイネ系統を選抜した(図10)。後代T₆世代でホモ系統である事を確認し、OsCr11系統とした。選抜したT₅植物において、サザンブロット分析による導入遺伝子の存在状態、NGSや導入遺伝子部分シーケンスにより導入遺伝子の詳細な解析を行った。また、各世代において導入遺伝子の存在がPCRにより確認された（表3）。なお、本申請における承認対象の範囲はT₆世代とその自殖後代及び非組換えイネの正逆交雑した後代である（図10）。

文部科学大臣・環境大臣により承認された第一種使用規程（研究開発分野）（平成23年6月20日～平成25年3月31日まで、平成26年4月15日～平成30年3月31日まで）に基づき、農業生物資源研究所の隔離ほ場において平成23年から26年に栽培した世代は、T₅、T₆及びT₉である。



資料2：審査データの概要

表3 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために行った試験（T₀は遺伝子を導入した当代。○印は試験を実施したことを示す。）

試験項目	系統	遺伝子組換えイネ									
	世代	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉
遺伝子の存在状態 (サザン)							○				
導入遺伝子のPCR増幅				○	○	○	○	○	○	○	○
全ゲノムシーケンス							○				
導入遺伝子部分シーケンス							○				○
目的蛋白質の発現状態			○	○	○	○	○	○	○	○	○
アグロバクテリウムの残存性							○				
形態及び生態学的特性					○		○	○			
生育初期における低温耐性					○						
花粉の稔性及び直径					○		○	○			
種子の生産性、発芽率、休眠性及び脱粒性					○		○	○			

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

本組換えイネのT-DNA領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、平均30xのカバレッジでNGSによる全ゲノムにわたる解析を実施し、移入された核酸の複製物が第8染色体上に存在していることを確認した（図9）。

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

導入遺伝子のコピー数、非意図的なプラスミド配列の有無を調べるため、NGS及びバイオインフォマティクスによる接合領域の解析²⁸を実施した。本組換えイネのゲノムをPEでシーケンシングした場合、T-DNAとイネゲノムの境界付近のゲノム領域由来のPEリード²⁹は、一方のリードがT-DNA配列（Vector含む）に、もう一方のリードがイネゲノム配列にマップされる（discordant PE read）。このようなスプリットリードの解析結果、第8染色体366,600近傍のみがT-DNA挿入候補領域として検出された。次いで、サザンブロット解析及びPCR解析を実施した結果、本組換えイネの第8染色体上の1箇所³⁰に断片化されたT-DNAと、ほぼ全長のT-DNAが組み込まれていることを確認した（別添資料11）。

また、T₂からT₄世代におけるPCR解析の結果、ほぼ全長のT-DNA領域が1コピー挿入されており、導入遺伝子が複数世代において安定に伝達されていることを確認した（別添資料12）。さらに、表3に示す様に、T₅世代以降においてもPCR解析、移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性を確認した。

再度、NGSを用いた全ゲノムにわたる解析を行った結果、本組換えイネにはT-DNA領域のほぼ全長のT-DNAが組み込まれているが、RB及びその内側5bpとLBの13bpが欠失していることを確認した（図9）。

PCR解析、NGS解析、サザンブロット解析の結果（別添資料11-図2～4）、図9に示す通り、T-DNA領域のLB外側に構成要素の断片化配列が挿入されていることが明らかになった。その断片化配列の構成を表4に、塩基配列を別添資

²⁸ NGSとバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザン解析及びPCR解析と同程度の分子生物学的評価を行った。まず、NGSにより本組換えイネのゲノムの全領域に相当する配列を400～500bp程度のフラグメントとして増幅し、両端の100bpずつの配列を決定する。フラグメントの片側の配列が導入遺伝子に由来し、もう一方側の配列がイネゲノムに由来するフラグメントを抽出してT-DNAが導入された領域を同定することで、T-DNA領域の導入箇所数、コピー数を特定する。

²⁹ paired-end read。NGS解析では、解読されたそれぞれの100bpをread（リード）、DNAフラグメント両端の対になるリードをpaired-end read（PEリード）、DNAフラグメント片端のみ解読したリードをsingle-end read（SEリード）と呼ぶ。

資料2：審査データの概要

料10に示した。T₂からT₄世代におけるPCR解析の結果、断片化挿入配列についても複数世代において安定に伝達されていることを確認した（別添資料12）。以上のことから、染色体に移入したT-DNA及び断片化挿入配列は、世代間で安定的に伝達されることが確認された。

mRNA-seqの結果（別添資料9）、断片化配列部の4867-5157部位、291bpのmRNAへの転写が確認された。転写されているmRNA配列は*GluA*遺伝子の断片化配列と*CSP*の断片化配列により構成されていることから、*GluA*抗体を用い、イムノブロット解析を実施した。その結果、この転写物由来の蛋白質は産生されていないことを確認した（別添資料13）。推定されるアミノ酸配列について、*Cry j 1-F*蛋白質と同様に相同性検索を行った結果、既知のアレルゲン及び毒性蛋白質と類似の配列は認められなかった。

表4 LB外側に挿入された断片化配列の構成要素及び由来（5669bp）

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
Left Border (LB)	13	表2のプラスミド構成要素のLeft Border (26bp) の5'側の13bp。
断片化配列		
<i>GluA2</i>	549	表2のプラスミド構成要素の <i>GluA2</i> 遺伝子のアミノ酸配列305～449の領域をコードする配列及び3'UTR領域（821bp）の3'側から549bp。
Intervening Sequence	4	表2のプラスミド構成要素の <i>GluA2</i> と <i>GluB4 ter</i> 間の介在配列。
<i>GluB4 ter</i>	654	表2のプラスミド構成要素の <i>GluB4 ter</i> の全長。
Intervening Sequence	7	表2のプラスミド構成要素の <i>GluA2</i> と <i>GluB4 ter</i> 間の介在配列。
<i>attB2</i>	24	表2のプラスミド構成要素の <i>attB2</i> の全長。
Intervening Sequence	33	表2のプラスミド構成要素の <i>attB2</i> と <i>10k pro</i> 間の介在配列。
<i>10k pro</i>	583	表2のプラスミド構成要素の <i>10k pro</i> (825b) の5'側から583bp。

資料2：審査データの概要

表4 LB外側に挿入された断片化配列の構成要素及び由来（5669bp） つづき

<i>Cry j 1-F2</i>	372	表2のプラスミド構成要素の <i>Cry j 1-F2</i> （396bp）の3'側から339bp。
Intervening Sequence	6	表2のプラスミド構成要素の <i>Cry j 1-F2</i> と <i>GluB1</i> の部分配列間の介在配列。
<i>GluB1</i> の部分配列	715	表2のプラスミド構成要素の <i>GluB1</i> 遺伝子のアミノ酸配列302～499の領域をコードする配列及び3'UTR領域。
Intervening Sequence	6	表2のプラスミド構成要素の <i>GluB1</i> の部分配列と <i>16k ter</i> 間の介在配列。
<i>16k ter</i>	316	表2のプラスミド構成要素に含まれる全長。
Intervening Sequence	7	表2のプラスミド構成要素の <i>16k ter</i> と <i>attB1</i> 間の介在配列。
<i>attB1</i>	21	表2のプラスミド構成要素の <i>attB1</i> 。
Intervening Sequence	65	表2のプラスミド構成要素の <i>attB1</i> と <i>GluB4 pro</i> 間の介在配列。
<i>GluB4 pro</i>	1471	表2のプラスミド構成要素に含まれる全長。
<i>GluB4 sig</i>	72	表2のプラスミド構成要素の <i>GluB4 sig</i> 。
<i>GluA2</i>	141	表2のプラスミド構成要素の <i>GluA2</i> 遺伝子のアミノ酸配列1～275の領域をコードする配列（825bp）の5'側141bp。
挿入配列	8	断片化配列に挿入された配列。プラスミド配列ではないことからイネ由来と想定される。
<i>CSP</i>	276	表2のプラスミド構成要素の <i>CSP</i> のC末端側から276bp。
Intervening Sequence	6	表2のプラスミド構成要素の <i>CSP</i> と改変 <i>ALS</i> 遺伝子間の介在配列。
<i>mALS</i>	333	表2のプラスミド構成要素の改変 <i>ALS</i> 遺伝（1935bp）の5'側から333bp。

③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

ほぼ全長のT-DNA領域1コピー及びLB外側に隣接して構成要素の断片化配列が染色体の単一箇所に挿入されている（図9）。

④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件下での個体間及び世代間での発現の安定性

イムノブロット解析により、本組換えイネの複数世代（T₂～T₉）にわたり立体構造改変型 Cry j 蛋白質が安定して発現していた。T₄、T₅世代の発現解析結果を別添資料14に示す。またT₇、T₈及びT₁₀世代の玄米中の立体構造改変型 Cry j 蛋白質の発現量をELISA法により定量したが、その発現量は世代間で安定していた（表5）。

表5 導入遺伝子産物の世代間での発現量

所外秘情報につき非開示

T₇種子においては、1個体より収穫した種子全量をよく混合した後に、玄米を粉末化し、50 mgの粉末を3回測り取り測定を実施した。T₈、T₁₀種子は栽培した植物体（50個体以上）から収穫した種子全量を均一に攪拌した後、玄米を粉末化し、50 mgの粉末を3回測り取り測定を実施した。分析値は平均値±標準偏差。

⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された供与核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まないため、ウイルス感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換えの生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えイネは移入した遺伝子特異的に結合可能なプライマーセットを利用してPCR法により検出及び識別が可能である（別添資料12）。検定に用いるDNA濃度はPCRの一反応あたり、Genomic DNA 5～200ng/50μL 反応液が推奨されている。本PCR法において、2ng～20ngのGenomic DNAで再現性の高い安定した検出結果を示した（別添資料15）。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的または形態学的特性の具体的な内容

2-(1)-ロ-②に示した通り本組換えイネ種子に導入した *GluA2-F1* 遺伝子、*GluB1-F2* 遺伝子、*GluC-F3* 遺伝子、*SH-Cry j 2* 遺伝子は4種類の改変スギ花粉抗原 (*GluA2-F1* 蛋白質、*GluB1-F2* 蛋白質、*GluC-F3* 蛋白質、*SH-Cry j 2* 蛋白質) をPB-I中のみに不溶性の種子貯蔵蛋白質として蓄積させる。これら立体構造改変型スギ花粉抗原は特異的免疫反応に必要なCry j 1蛋白質及びCry j 2蛋白質中のすべてのT細胞エピトープ配列を含む。改変スギ花粉抗原は胃液中の蛋白質分解酵素に対して難消化性を示すことから、効率的に腸管免疫系に届くことが期待される。その後、立体構造改変型スギ花粉抗原が腸管関連リンパ組織の樹状細胞に捕捉され、抗原の持つT細胞エピトープがT細胞に提示され免疫寛容が誘導されると考えられている。

立体構造改変型スギ花粉抗原はスギ花粉抗原Cry j 1蛋白質及びCry j 2蛋白質の立体構造を改変した蛋白質であることから、スギ花粉アレルゲンと相同性を示す。しかしスギ花粉症モデルマウスのスギ花粉抗原特異的IgE抗体が改変スギ花粉抗原と結合しない事、本組換えイネ種子 (精白米) を摂取したニホンザルが、スギ花粉症を発症しないことを確認した。よって、スギ花粉抗原と異なり、立体構造改変型スギ花粉抗原は、IgEが関与することで引き起こされるスギ花粉アレルギー反応及びスギ花粉症の発症に関与するTh2経路を経る免疫反応を誘導しないことが示唆された。

さらにラット、カニクイザルを用いた本組換えイネ (立体構造改変型スギ花粉抗原濃縮物・精白米) の薬事法に従った経口投与毒性試験の結果、有害事象は確認されなかった (別添資料8) ことから、毒性はないと判断した。

また、改変ALS遺伝子はカルス特異的に改変ALS蛋白質を発現することによりカルスにピリミノバック等のスルホニルウレア系除草剤耐性を付与する。しかし、植物体では発現しないことから、生理学的または形態学的特性を本組換えイネに付与しない。

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農産物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

2-(1)-ロ-③に示した通り、本組換えイネ種子中の4種類の立体構造改変型スギ花粉抗原は、PB-I中のみに不溶性の種子貯蔵蛋白質として蓄積している。ま

資料2：審査データの概要

た立体構造改変型スギ花粉抗原を発現させるために用いた胚乳特異的プロモーターは種子でのみ発現を誘導し、イネ植物体の他の組織（根、葉、茎等）では発現を誘導しないことが確認されている（図7）。よって、導入遺伝子である *GluA2-F1* 遺伝子、*GluB1-F2* 遺伝子、*GluC-F3* 遺伝子、*SH-Cry j 2* 遺伝子により生理学的又は形態学特性に相違が生じることは考えられない。

改変 *ALS* 遺伝子はカルス特異的に改変 *ALS* 蛋白質を発現することによりカルスにスルホニルウレア系除草剤耐性を付与する。しかし、植物体では改変 *ALS* 蛋白質は発現していない（図8）ことから導入遺伝子である改変 *ALS* 遺伝子により生理学的又は形態学特性の相違が生じることは考えられない。

また、本隔離ほ場試験申請にあたり、本組換えイネの生理学的及び生態学的特性については、平成22年に特定網室において、平成23年及び平成24年には、文部科学大臣及び環境大臣より研究開発段階の組換え植物として第一種使用規程承認を受け、隔離ほ場において調査を行った。

なお本組換えイネの特定網室試験及び隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査した。

- a. 形態及び生育の特性
- b. 生育初期における低温耐性
- c. 成体の越冬性
- d. 花粉の充実度及びサイズ
- e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
- f. 交雑率
- g. 有害物質の産生性

a. 形態及び生育の特性

本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、平成22年度に特定網室において、平成23年度及び平成24年度に農業生物資源研究所隔離ほ場において、形態及び生育の特性の指標となる以下の項目について調査した。

- ・ 出穂時期（出穂開始日、出穂期、穂ぞろい期）
- ・ 稈長
- ・ 穂長
- ・ 穂数

調査の結果、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123は、同じ日に出穂を開始し、出穂期・穂ぞろい期を迎えたことから、出穂時期について、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に差は認められなかった。また、稈長の平均値は、本組換えイネでは72.1cmから80.9cm、コシヒカリ変異系統a123では73.3cmから82.6cmであり、統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、稈長について、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった。一方、穂長の平均値は、本組換えイネでは19.7cmから

資料2：審査データの概要

25.1cm、コシヒカリ変異系統a123では19.9cmから25.7cmであり、穂数の平均値は、本組換えイネでは20.0本から26.8本、コシヒカリ変異系統a123では22.2本から28.8本であり、統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、穂長・穂数についても、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料16）。

b. 生育初期における低温耐性

本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、平成22年度に、生育初期における低温耐性を調査した。本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123各々の2葉期イネ30個体を暗所4℃で10日間処理した後、これらのイネを特定網室に移動して栽培し、栽培開始後4週間目のイネの生育状況を調査した。その結果、本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123どちらのイネも、調査した30個体全てが枯死したことから、生育初期における低温耐性について、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に差は認められなかった（別添資料16）。

c. 成体の越冬性

本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、平成23年度及び平成24年度に隔離ほ場において、収穫後の切り株から生え出たひこばえの生育状況を観察し、イネ成体の越冬性を調査した。その結果、平成23年度の調査では平成24年1月4日に、平成24年度の調査では平成24年12月13日に、本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123どちらのイネも、全ての個体のひこばえが枯死したことから、イネ成体の越冬性について、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に差は認められなかった（別添資料16）。

d. 花粉の充実度及びサイズ

本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、平成22年度に特定網室において、平成23年度及び平成24年度に隔離ほ場において、花粉の充実度及びサイズを調査した。その結果、花粉の充実度の平均値は、本組換えイネでは93.4%から95.4%、コシヒカリ変異系統a123では94.4%から95.7%であり、統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、花粉の充実度について、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料16）。また、花粉のサイズ（直径）の平均値は、本組換えイネでは42.8～44.8μm、コシヒカリ変異系統a123では43.1～44.9μmであり、統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、花粉のサイズについて、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料16）。

資料2：審査データの概要

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、平成22年度に特定網室において、平成23年度及び平成24年度に隔離ほ場において、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を調査した。その結果、本組換えイネの一株粒数はコシヒカリ変異系統a123の粒数の約84%から98%であり、本組換えイネの稔実率はコシヒカリ変異系統a123より3.8%から6.7%低かったが、統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、一株粒数及び稔実率について、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった。また、本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123の種子の脱粒性は約0.3%、休眠性は約50%、発芽率は約90%であり、統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、脱粒性、休眠性、発芽率について、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料16）。

f. 交雑率

我が国に交雑可能な近縁野生種が自生していないとされていることから、交雑率の試験は行わなかった。

g. 有害物質の産生性

本組換えイネの種子中に立体構造改変型スギ花粉抗原が蓄積する。立体構造改変型スギ花粉抗原はアレルギー性を有するスギ花粉抗原Cry j 1蛋白質及びCry j 2蛋白質の立体構造を改変した蛋白質であることからアレルギー性を有する可能性があった。しかし、スギ花粉症モデルマウスの抗血清はCry j 1蛋白質を断片化したCry j 1-F1断片及びSH-Cry j 2蛋白質とは結合性を示さず、また本組換えイネ精白米を摂取したニホンザルがスギ花粉症を発症しないことを明らかにした。さらにラット及びカニクイザルを用いた安全性試験の結果、本組換えイネ（立体構造改変型スギ花粉抗原濃縮物・精白米）は有害性を示さなかったことから、立体構造改変型スギ花粉抗原は、IgEが関与することで引き起こされるスギ花粉アレルギー及びスギ花粉症の発症に関与するTh2経路の免疫反応を誘導しないことが示唆された。

したがって、本組換えイネ種子に蓄積する立体構造改変型スギ花粉抗原を摂取した野生動物がスギ花粉症を発症したり、自然環境下でスギ花粉症を発症した野生動物が本組換えイネ種子の摂取により、ショックやアナフィラキシーを起こすことは考えにくい。

鳥類はIgEを持たず、またスギ花粉症の発症の報告はないことから、本組換えイネ種子を摂取した鳥類が影響を受けることは考えにくい。

イネの種子を食害する昆虫は立体構造改変型スギ花粉抗原の影響を受ける可能性は否定できない。しかしイネ種子を食害する昆虫（表6）の中に、レッドデータブック(http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html)に記載されているような希

資料2：審査データの概要

少な昆虫は報告されていない。よって、絶滅危惧種等の希少な昆虫が本組換えイネによって影響を受けることは考えにくい。

本組換えイネ及び宿主であるコシヒカリ変異系統a123について、有害物質の産生性として、アレロパシー活性を調査した（別添資料16）。

根から分泌され、他の植物に影響を与えるものを調査するため、本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、特定網室においてポット栽培した後の根圏土壌、若しくは隔離ほ場において本組換えイネあるいはコシヒカリ変異系統a123の栽培区画由来の根圏土壌を用い、検定植物であるレタスの発芽率、下胚軸長及び幼根長を測定した。統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、レタスの発芽率、下胚軸長及び幼根長いずれにおいても、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった。

根から分泌され、土壌微生物に影響を与えるものを調査するため、本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、特定網室においてポット栽培した後の根圏土壌、若しくは隔離ほ場において本組換えイネあるいはコシヒカリ変異系統a123の栽培区画由来の根圏土壌における、細菌、放線菌及び糸状菌の数を調査した。統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、細菌数、放線菌数、糸状菌数全てについて、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった。

植物体が内部で産生され、枯死した後に他の植物に影響を与えるものを調査するため、本組換えイネ及びコシヒカリ変異系統a123について、特定網室及び隔離ほ場で栽培、収穫、乾燥させた稲わらともみを微粉末化し、培土と混合したものにレタス種子を播種し、発芽率、下胚軸長及び幼根長を測定した。統計的検定（有意水準 5 % の t 検定）の結果、レタスの発芽率、下胚軸長及び幼根長いずれにおいても、本組換えイネとコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的有意差は認められなかった。

資料2：審査データの概要

表6 イネ種子を食害する主要な昆虫

カメムシ類	学名	分布	生息環境	寄生植物	特徴
ブチヒゲカメムシ	<i>Dolycoris baccarum</i>	全国	草上性	イネ科、アカザ科、マメ科、ナス科、キク科	成・幼虫が出穂～乳熟期の籾に口針を挿し込んで吸汁すると、登熟せずシイナや屑米発生。黄熟期以降に吸汁されると斑点米になる。
アオクサカメムシ	<i>Nezara antennata</i>	全国		イネ科、マメ科、その他野菜類	
ミナミアオカメムシ	<i>Nezara viridula</i>	和歌山以西に多い		イネ科	
イネカメムシ	<i>Lagynotomus elongatus</i>	東北南部以南に多い		イネ科	
トゲシラホシカメムシ	<i>Eysarcoris aeneus</i>	本州以南		イネ科、マメ科	
オオトゲシラホシカメムシ	<i>Eysarcoris lewisi</i>	北海道と本州		イネ科	
シラホシカメムシ	<i>Eysarcoris ventralis</i>	全国		イネ科	
アカヒゲホソミドリカスミカメ	<i>Trigonotylus caelestialium</i>	全国		イネ科、アカザ科	
アカスジカスミカメ	<i>Stenotus rubrovittatus</i>	全国		イネ科、キク科	
クモヘリカメムシ	<i>Leptocorisa chinensis</i>	北南部、関東以西の山間部及び近傍		イネ科、シダ類	
ホソハリカメムシ	<i>Cletus punctiger</i>	本州以南		イネ科、ヒノキ科	
コバネヒョウタンナガカメムシ	<i>Togo hemipterus</i>	北海道を除く本州中部以北		イネ科、ヒノキ科、キク科	
イネクロカメムシ	<i>Scotinophara lurida</i>	福島県以南		イネ科	
その他	学名	分布	生息環境	寄生植物	特徴
イネアザミウマ	<i>Stenchaetothrips biformis</i>	全国	草上性	イネ科	育苗期～本田初期には葉を食害する。出穂期頃急増し、籾内に侵入し、黒点米に似た着色粒（黒点症状米）や屑米、変色米を発生させる。
イネシンガレセンチュウ	<i>Aphelenchoides besseyi</i>	全国	植物体内部（生長点付近及び貯蔵中の乾燥種籾）	イネ科	成・幼虫が生長点付近を加害。籾への寄生で黒点米が発生、時に減収する。
貯蔵害虫	学名	分布	生息環境	寄生植物	特徴
イッテンコクガ	<i>Paralipsa gularis</i>	全国	食品貯蔵施設	イネ科他	イネ、コムギ、トウモロコシ等穀粒・穀粉を食害。多くの発育段階を貯蔵食品中で過ごし、野外ではほとんど見られない。
オオメノコギリヒラタムシ	<i>Oryzaephilus mercator</i>	沖縄県			
ガイマイゴミムシダマシ	<i>Alphitobius diaperinus</i>	全国			
ガイマイツツリガ	<i>Corcyra cephalonica</i>	鹿児島および沖縄			
カクムネヒラタムシ	<i>Cryptolestes pusillus</i>	全国			
カシノシマメイガ	<i>Pyralis farinalis</i>	全国			
クロゴミムシダマシ	<i>Neatus ventralis</i>	全国			
コクゾウムシ	<i>Sitophilus zeamais</i>	全国			
コクヌスト	<i>Tenebroides mauritanicus</i>	全国			
コクヌストモドキ	<i>Tribolium castaneum</i>	全国			
ココクゾウムシ	<i>Sitophilus oryzae</i>	全国			
コナナガシクイムシ	<i>Rhyzopertha dominica</i>	全国			
コメノケシキスイ	<i>Carpophilus pilosellus</i>	全国			
コメノゴミムシダマシ	<i>Tenebrio obscurus</i>	全国			
ジンサンシバンムシ	<i>Stegobium paniceum</i>	全国			
コメノシマメイガ	<i>Aglossa dimidiata</i>	全国			
スジマダラメイガ	<i>Cadra cautella</i>	全国			
タバコシバンムシ	<i>Lasioderma serricornes</i>	全国			
チビタケナガシクイムシ	<i>Dinoderus minutus</i>	全国			
ノコギリヒラタムシ	<i>Oryzaephilus surinamensis</i>	全国			
シメマダラメイガ	<i>Plodia interpunctella</i>	全国			
バクガ	<i>Sitotroga cerealella</i>	全国			
ヒメゴミムシダマシ	<i>Alphitobius laevigatus</i>	全国			
ヒラタコクヌストモドキ	<i>Tribolium confusum</i>	全国			
ヒラタチャタテ	<i>Liposcelis bostrychophila</i>	全国			
フタオビツヤゴミムシダマシ	<i>Alphitophagus bifasciatus</i>	全国			

稲の病害虫と雑草（防除ハンドブック）及び食品総合研究所 食品害虫サイト <http://www.naro.affrc.go.jp/org/nfri/yakudachi/gaichu/index.html> を参考に作成

3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

(2) 使用等の方法

所在地：茨城県つくば市観音台2丁目1番地2

名称：国立研究開発法人 農業生物資源研究所 隔離ほ場

使用期間：承認日から平成35年3月31日まで

イ 隔離ほ場の施設

- ① 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- ② 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- ③ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えイネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該イネの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- ④ 本組換えイネの開花期に、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置するとともに、防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。

ロ 隔離ほ場での作業要領

- ① 本組換えイネ及び比較対照のイネ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- ② 本組換えイネを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該イネが漏出しない構造の容器に入れる。
- ③ ②により運搬又は保管する場合を除き、本組換えイネの栽培終了後は、当該イネ及び比較対照のイネを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- ④ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えイネが隔離ほ場の外に持ち出

資料2：審査データの概要

されることを防止する。

- ⑤ 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- ⑥ ①から⑤までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- ⑦ 農林水産省が所掌する試験研究を行う独立行政法人に対して実施を義務付けている第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針(農林水産省, 2008)に基づき、別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。
- ⑧ 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

なお、国立研究開発法人農業生物資源研究所隔離ほ場の地図を、受容環境の図(図1-3)に示した。

(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

農林水産省が所掌する試験研究を行う独立行政法人に対して実施を義務付けている第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針(農林水産省, 2008)に基づき、別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境での使用等の結果

平成23年度から平成26年度に、農業生物資源研究所 隔離ほ場において、文部科学大臣・環境大臣により承認された第一種使用規程に基づき、本組換えイネを栽培している。平成23年度及び平成24年度に、イネ植物体の形態・特性、越冬性、花粉の稔性・サイズ、種子の生産量・脱粒性・休眠性・発芽率及び有害物質の産生性等について調査した。その結果、これらの調査項目に関して、本組換えイネと宿主であるコシヒカリ変異系統a123との間に統計学的な有意差は認められなかった(別添資料16)。

また、第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針(農林水産省, 2008)のモニタリング措置に基づき、農業生物資源研究所と外部との境界近くに、交雑を確認するための同種栽培作物であるモチ品種「関東糯236号」を、開花期間が重複するように栽培した。モチ品種にウルチ品種の花粉が交雑すると、ウルチ形質の胚乳となる現象を利用して、栽培した「関東糯236号」の種子 22,840粒(平成23年

度)、22,988粒(平成24年度)、20,820粒(平成25年度)、13,071粒(平成26年度)を調査した結果、ウルチ形質の玄米は0粒であり、本組換えイネの花粉飛散による交雑は認められなかった。

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えイネは医薬品原料として開発していることから、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」に従い非臨床試験を実施している。また、医薬品原料の品質管理・栽培管理に関する医薬品/医療機器/再生医療等製品戦略相談³⁰を実施している。今後、厚生労働省通知に従い、第一種使用規程承認を受けた後に栽培した本組換えイネを治験薬原料として、治験薬を製造し第I相臨床試験³¹を実施する予定である。

³⁰薬事戦略相談の相談区分。医薬品/医療機器/再生医療等製品戦略相談、再生医療等製品等の品質及び安全性に係る相談、薬事開発計画等戦略相談に区分されている。薬事戦略相談は、大学・研究機関、ベンチャー企業を主な対象として、医薬品医療機器総合機構が実施している相談。開発初期から必要な品質・非臨床試験及び治験に関し、倫理面にも配慮した指導・助言を実施する。

³¹医薬品医療機器等法上の承認を得るために行われる臨床試験のうち、健康な成人ボランティアを対象として、主に治験薬の安全性及び薬物の体内動態について確認するための試験。臨床試験から遺伝子組換え植物の産業上の利用となることから、農林水産省による第一種使用規程承認が必要となる。

参考文献

- Akidis, C. A. (2012) Therapies for allergic inflammations: refining strategies to induce tolerance. *Nature Med.* 18, 736-749.
- Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H.J. (1998) Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergy diseases. A WHO position paper. *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 558-562.
- CODEX (2003) Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant DNA plants. CAC/GL 45.
- Committee on Safety of Medicines (1986) CSM update. Desensitizing vaccine. *BMJ*, 293 :948.
- Cox, L. S., Larenas Linnemann, D. et al. (2006) Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117,1021-1035.
- Calderón, M. A., Simons, F. E., Malling, H. J. et al. (2012) Sublingual allergen immunotherapy: mode of action and its relationship with the safety profile. *Allergy* 67, 302-311.
- Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990) Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage PI recombinase. *Gene.* 91, 79-85.
- FAOSTAT (2014) <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Frew, A .J. (2010) Allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S306-313.
- Friedman, A., Weiner, H.L. (1994) Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6688-6692.
- Fujii, Y., (1993) The Allelopathic Effect of Some Rice Varieties. Asian and Pacific Council. Food & Fertilizer Technology Center, Technical Bulletin No. 134, 1-6, Taiwan.
- Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. (1994) The small, versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25, 989-994.
- Huang X., Kurata N., Wei X., Wang Z.X., Wang A., Zhao Q., Zhao Y., Liu K., Lu H., Li W., Guo Y., Lu Y., Zhou C., Fan D., Weng Q., Zhu C., Huang T., Zhang L., Wang Y., Feng L., Furuumi H., Kubo T., Miyabayashi , Yuan X., Xu Q. (2012) A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. *Nature* 490, 497-501.
- Iida, S., Kusaba, M. and Nishio, T. (1997) Mutants lacking glutelin subunits in rice: Mapping and combination of mutated glutelin genes. *Theor. Appl. Genet.* 94, 177-183.

- Kawakatsu, T., Yamamoto, M. P., Hirose, S., Yano, M., Takaiwa, F. (2008) Characterization of a new rice glutelin gene GluD-1 expressed in the starchy endosperm. *J. Exp. Bot.* 59, 4233-4245.
- Komiyama, N., Sone, T., Shimizu, K., Morikubo, K., Kino, K. (1994) cDNA cloning and expression of Cry j II, the second major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201,1021-1028.
- Masumura, T., Kidzu, K., Sugiyama, Y., Mitsukawa, N., Hibino, T., Tanaka, K., Fuji, S. (1989a) Nucleotide sequence of cDNA encoding major rice glutelin. *Plant Mol. Biol.* 12, 723-725.
- Masumura, T., Shibata, D., Hibino, T., Kato, T., Kawabe, K., Takeba, G., Tanaka, K., Fujii, S. (1989b) cDNA cloning of an mRNA encoding a sulfur-rich 10 kDa prolamin polypeptide in rice seeds. *Plant Mol Biol.* 12, 723-725.
- Mitsukawa, N., Hayashi, H., Yamamoto, K., Kidzu, K., Konishi, R., Masumura, T., Tanaka, K. (1998) Molecular cloning of a novel glutelin cDNA from rice seeds. *Plant Biotechnol.* 15, 205-211.
- Mitsukawa, N., Konishi, R., Uchiki, M., Masumura, T., Tanaka, K. (1999) Molecular cloning and characterization of a cysteine-rich 16.6-kDa prolamin in rice seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63,1851-1858.
- Moingeon, P., Batard, T., Fadel, R., Frati, F., Sieber, J., Van Overtvelt L. (2006) Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy* 61, 151-165.
- OECD. (1999) Consensus Document on the Biology of *Oryza sativa* (Rice), OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.14.
- Ohtsuki, T., Taniguchi, Y., Kohno, K., Fukuda, S., Usui, M., Kurimoto, M. (1995) Cry j 2, a major allergen of Japanese cedar pollen, shows polymethylgalacturonase activity. *Allergy* 50, 483-488.
- Qu, L. Q. and Takaiwa, F. (2004) Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice. *Plant Biotechnol.* 2, 113-125.
- Qu, L. Q., Xing, Y.P., Liu, W.X., Xu, X.P., Song, Y.R. (2008) Expression pattern and activity of six glutelin gene promoters in transgenic rice. *J. Exp. Bot.* 59,2417-2424.
- Sone, T., Komiyama N., Shimizu, K., Kusakabe, T., Morikubo K., Kino, K. (1994) Cloning and sequencing of cDNA coding for Cry j 1, a major allergen of Japanese cedar pollen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 619-625.
- Suzuki, K., Yang, L., Takaiwa, F. (2012) Transgenic rice accumulating modified cedar pollen allergen Cry j 2 derivatives. *J. Biosci. Bioeng.* 113, 249-251.

- Tada, Y., S. Utsumi, and F. Takaiwa. (2003). Foreign gene products can be enhanced by introduction into storage protein mutants. *Plant Biotechnol. J.* 1, 411-422.
- Takagi H, Hiroi T, Hirose S, Yang L, Takaiwa F. (2010) Rice seed ER-derived protein body as an efficient delivery vehicle for oral tolerogenic peptides. *Peptides*. 2010 31(8):1421-1425.
- Takaiwa, F., Kikuchi, S., Oono, K. (1987) A rice glutelin gene family-A major type of glutelins mRNAs can be divided into two classes. *Mol. Gen. Genet.* 208, 15-22..
- Takaiwa, F., Kikuchi, S., Oono, K. (1989) The complete nucleotide sequence of new type cDNA coding for rice storage protein glutelin. *Nucleic Acids Res.* 17, 3289.
- Takaiwa, F., K. Oono, D. Wing, A. Kato. (1991) Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice. *Plant Mol. Biol.* 17, 875-885.
- Taniguchi, Y., Ono, A., Sawatani, M., Nanba, M., Kohno, K., Usui, M., Kurimoto, M., Matsuhashi, T. (1995) Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has pectate lyase enzyme activity. *Allergy* 50, 90-93.
- USDA-APHIS (2014) NEPA Decision Summary for Permit #14-016-102r
https://www.aphis.usda.gov/brs/aphisdocs/14_016102r_nds.pdf
- Valenta, R., Ferreira, F., Focke-Tejkl, M., Linhart, B., Niederberger, V., Swoboda, I., Vrtala, S. (2010) From allergen genes to allergy vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 211-241.
- Wakasa, Y., Ozawa, K., Takaiwa, F. (2009) Higher-level accumulation of foreign gene products in transgenic rice seeds by the callus-specific selection system. *J. Biosci. & Bioeng.* 107, 78-83.
- Wakasa, Y., Ozawa, K., Takaiwa, F. (2012) *Agrobacterium*-mediated co-transformation of rice using two selectable marker genes derived from rice genome components. *Plant Cell Rep.* 31, 075-2084.
- Wakasa, Y., Takagi, H., Hirose, S., Yang, L., Saeki, M., Nishimura, T., Kaminuma, O., Hiroi, T., Takaiwa, F. (2013) Oral immunotherapy with transgenic rice seed containing destructed Japanese cedar pollen allergens, Cry j 1 and Cry j 2, against Japanese cedar pollinosis. *Plant Biotechnol. J.* 11, 66-76.
- Wakasa Y, Takagi H, Watanabe N, Kitamura N, Fujiwara Y, Ogo Y, Hayashi S, Yang L, Ohta M, Thet Tin WW, Sekikawa K, Takano M, Ozawa K, Hiroi T, Takaiwa F. (2015) Concentrated protein body product derived from rice endosperm as an oral tolerogen for allergen-specific immunotherapy--a new mucosal vaccine formulation against Japanese cedar pollen allergy. *PLoS One.* 16;10(3):e0120209.

資料2：審査データの概要

- World Health Organization (WHO) position paper (1997) Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. Geneva: January 27-29
- 荒谷博、平舘俊太郎、藤井義晴（2004）赤米等のアレロパシー活性とアレロケミカルの探索 雑草研究49 174-175.
- 蓬原雄三（1990）イネの育種学. 東京大学出版会. 東京.
- 猪野剛史、加藤尚（2007）イネ芽生えのモミラクトンB放出量とアレロパシー活性 日本作物学会会報 76(1) 108-111
- 牛木純（2005）岡山県に発生した日本型及びインド型雑草イネの生理・形態的形質と分布の特徴.育種学研究 7. 179-187.
- 甲元眞之（2005）稲作の伝来 青驪 37-40 六一書房.
- 後藤真生（2006）経口免疫寛容. 日本食品科学工学会誌 53(9), 526.
- 財務省貿易統計（2014）<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
- 鳥居医薬品（2014）「シダトレン®スギ花粉舌下液」インタビューフォーム
http://www.torii.co.jp/iyakuDB/data/if/if_cdt.pdf
- 根本 文宏、平井 一男、森田 弘彦（共著）（2005）稲の病害虫と雑草（防除ハンドブック）
全国農村教育協会
- 農林水産省（2000）「主要農作物種子法第4条第5項に基づき、農林水産大臣が定める基準」農林水産省告示第112号
- 農林水産省（2003）「栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方」第2回「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料5-1
- 農林水産省（2005）「交雑に関する新たな科学的知見」第5回「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料1
- 農林水産省（2008）「米流通をめぐる状況」
http://www.maff.go.jp/j/study/ryutu_system/01/pdf/data8.pdf
- 農林水産省作物統計（普通作物・飼料作物・工芸農作物）平成24年産
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html#r
- 農林水産省・農林水産統計（2014）「平成26年産水陸稲の収獲量」
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/pdf/syukaku_suiriku_14.pdf
- 農林水産省・統計部（2015）「グラフと絵で見る食糧・農業」
<http://www.toukei.maff.go.jp/digest/kome/kome05/kome05.html>
- 農林水産省農林水産技術会議事務局長通知（2008）第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針 平成20年7月31日付け20農会第 606号
- 藤巻 宏/鶴飼 保雄/山元 皓二/藤本 文弘（共著）（1992）植物育種学上 基礎編
- 北海道（2007）北海道食の安全・安心委員会遺伝子組換え作物交雑等防止部会 第1回「平成18年度遺伝子組換え作物交雑等防止検討調査事業成績書－他家受粉による交雑に関する調査（イネ）」資料2

資料2：審査データの概要

北海道（2008）北海道食の安全・安心委員会遺伝子組換え作物交雑等防止部会 第2回
「平成19年度遺伝子組換え作物交雑等防止検討調査事業成績書－他家受粉による交
雑に関する調査（イネ）」資料2

松尾孝嶺（編）（1960）稲の形態と機能 農業技術協会. 東京

松尾孝嶺（監修）（1989）植物遺伝資源集成1, I. 食用作物, 1. イネ. 講談社. 東
京.

松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、山
口彦之、菊池文雄（編）（1990a）稲学大成（第1巻）形態編、農山漁村文化協会
東京.

松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、石
原 邦、平田熙、石井龍一（編）（1990b）稲学大成（第2巻）生理編. 農山漁村文
化協会. 東京.

松尾孝嶺、清水正治、角田重三郎、村田吉男、熊澤喜久雄、蓬原雄三、星川清親、山
口彦之、菊池文雄（編）（1990c）稲学大成（第3巻）遺伝編. 農山漁村文化協会.
東京.

吉田昌一（1986）稲作科学の基礎.博友社.東京.

渡邊寛明（2012）雑草イネの特徴とまん延防止 グリーンレポートNo522 全国農業
協同組合連合会

資料 2 : 審査データの概要

農業生物資源研究所 隔離ほ場 受容環境

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

国立研究開発法人 農業生物資源研究所 隔離ほ場

2. 住所

茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地 2 (図 1、図 2)

3. 連絡先電話番号

029-838-7927 (農業生物資源研究所 安全管理室)

4. 地図

図 1 を参照

II. 責任者等

1. 隔離ほ場試験の責任者

遺伝子組換え研究センター長 【個人情報につき非表示】

2. 隔離ほ場管理責任者

業務管理責任者 【個人情報につき非表示】

III. 試験期間

承認日から平成 35 年 3 月 31 日まで

IV. 施設概要

部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えイネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場

資料2：審査データの概要

を設置しているとともに、当該イネの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している（図3）。

V. 面積

1. 隔離ほ場全体の面積

約 55.4a

2. 試験に使用する面積

約 20.8a

VI. 隔離ほ場の周辺環境

1. 隔離ほ場の周辺地形

茨城県つくば市内、筑波・稲敷台地に位置する

2. 土地利用状況

隔離ほ場は、研究機関の敷地内にある。隔離ほ場外周から研究機関の敷地境界まで最短で約 2m である。

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

半径 1km 圏内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域）はない。なお、最も近い自然保護地域は水郷筑波国定公園であり、茨城県土浦市の霞ヶ浦まで約 10km である。

4. 気象条件

隔離ほ場の最寄りの気象情報観測地点である茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値を表 1 に示した。

気象庁ホームページ、気象統計情報ページ

アクセス日 2015 年 9 月 10 日

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_sfc_ym.php?prec_no=40&bloc

k_no=47646

5. 台風の襲来歴

① 平年値

気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信地方への台風の接近数^{*32}の平年値は 3.1 個である。

気象庁ホームページ、気象統計情報ページ

アクセス日 2015 年 9 月 10 日

<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>

② 過去 10 年の隔離ほ場周辺への接近数

気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東地方に、2005 年～2014 年の間に接近した台風は、計 27 個である（表 2）。

気象庁ホームページ、気象統計情報ページ

アクセス日 2015 年 9 月 10 日

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

2004 年に隔離ほ場を建設した以降、隔離ほ場を含め農業生物資源研究所の敷地が冠水したことはない。

7. 過去 10 年における強風の経験とその程度

2004 年に隔離ほ場を建設した以降、隔離ほ場を含め農業生物資源研究所の施設が、強風により施設の使用に影響するような被害はなく、作物の収穫に影響するよ

³² 台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方（伊豆諸島及び小笠原諸島を除く）に接近した台風」としている。（注）接近は 2 か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しない。

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

資料2：審査データの概要

うな被害は報告されていない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け

隔離ほ場は、つくば市が作製した「つくば市洪水ハザードマップ」(<http://www.city.tsukuba.ibaraki.jp/14210/14221/007878.html>)において、浸水想定区域に指定されていない。また茨城県河川課による「土砂災害警戒区域指定箇所」(<http://www.city.tsukuba.ibaraki.jp/14210/14221/017647.html>)に指定されていない。

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

隔離ほ場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、イネの栄養生長期における鳥類による被害は報告されていない。出穂期以降は防鳥網によってこれらの侵入を防ぐことができる。また、隔離ほ場には周囲にフェンスが設置されており、獣害は発生していない。

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え植物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称

影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。

2. 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称

交雑可能な近縁野生種はない。

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は以下のとおりである。

栽培年月		植物
2005年	6月－9月	イネ*
2006年	4月－8月	イネ*
	8月－11月	イネ*
2007年	7月－10月	イネ*
2008年	6月－10月	イネ*
2011年	7月－11月	イネ*
2012年	6月－9月	イネ*
2013年	5月－9月	イネ*
2014年	6月－10月	イネ*

*は遺伝子組換え植物を含む

2. 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には、緊急措置計画書にしたがって速やかに対策を講じる。

3. 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内での不活化や拡散防止措置を行うとともに、その他の適切な措置を講じる（実験終了後も継続してボランティア植物の発生の有無を確認していく）。

4. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

隔離ほ場は下記（1）～（4）の設備を有している。

- （1）部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- （2）隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- （3）隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えイネの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該イネの

資料2：審査データの概要

隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

- (4) 本組換えイネの開花期に、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置するとともに、防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。

5. 作業要領

- (1) 本組換えイネ及び比較対照のイネ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本組換えイネを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該イネが漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2) により運搬又は保管する場合を除き、本組換えイネの栽培終了後は、当該イネ及び比較対照のイネを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えイネが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1) から (5) までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (7) 農林水産省が所掌する試験研究を行う独立行政法人に対して実施を義務付けている、別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

資料2：審査データの概要



図1 農業生物資源研究所周辺の地形図（Yahoo 地図より）
農業生物資源研究所隔離ほ場は赤線で囲った場所に位置する。

資料2：審査データの概要

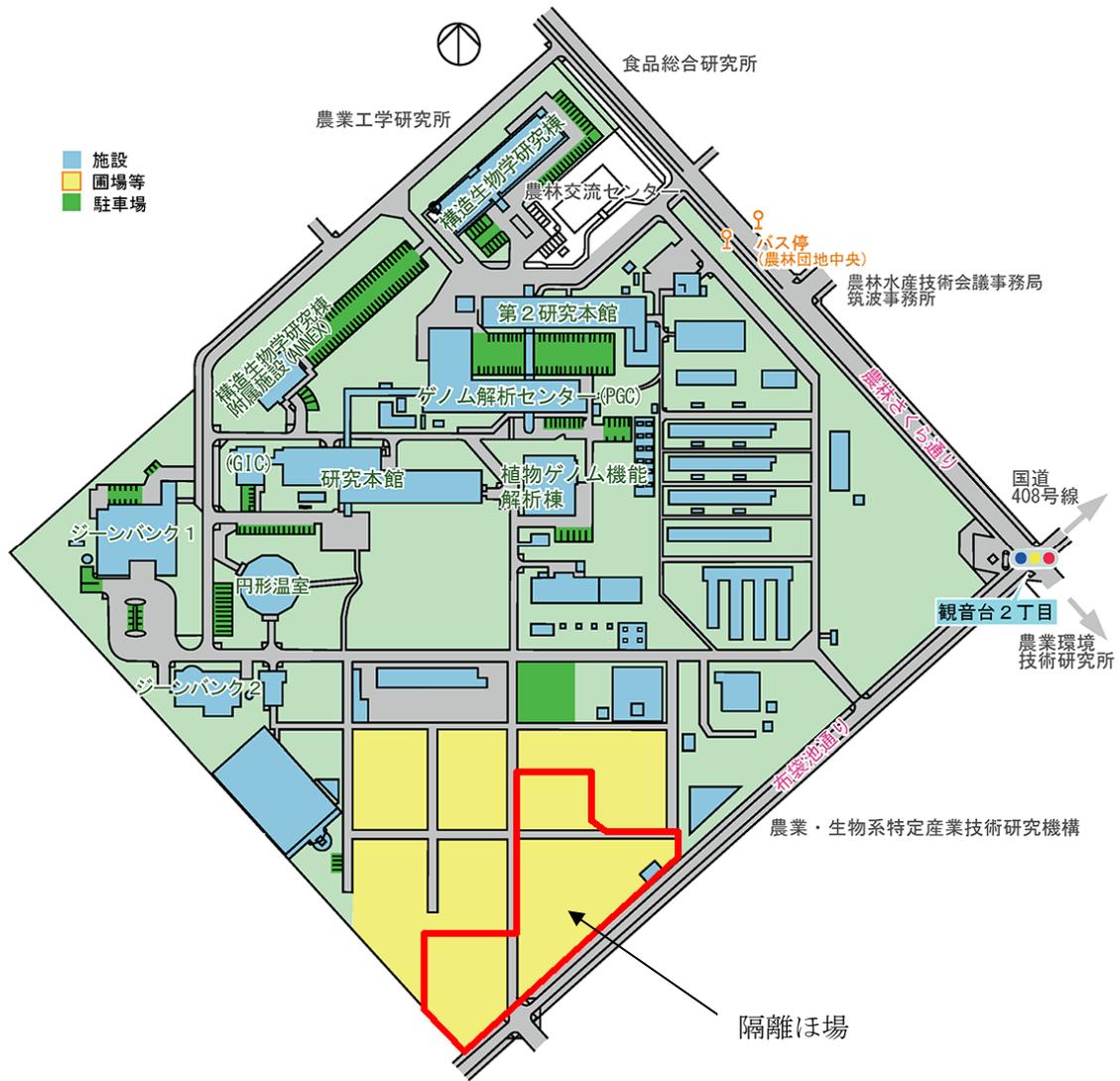


図2 農業生物資源研究所所内配置図

隔離ほ場略図

- 水田
- 畑地・土
- 舗装コンクリート
- 建物等
- フェンス
- 出入口
- 給水施設
- 浸透升
- 排水用溝 及び 流路



図 3 隔離ほ場内の配置及び排水流路

資料2：審査データの概要

表1 茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値

要素	降水量	平均 気温	最高 気温	最低 気温	平均 風速	最多 風向	日照 時間
	(mm)	(℃)	(℃)	(℃)	(m/s)		(時間)
統計 期間	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	2014	1981～ 2010
資料 年数	30	30	30	30	30	1	30
1月	43.8	2.7	9.0	-3.2	2.3	北西	194.1
2月	51.6	3.7	9.7	-2.2	2.5	西北西	174.2
3月	99.5	7.1	12.8	1.2	2.6	西北西	171.0
4月	105.6	12.5	18.3	6.6	2.8	東	173.3
5月	120.3	16.9	22.0	11.8	2.6	南	172.7
6月	133.1	20.2	24.6	16.3	2.4	北東	121.2
7月	127.1	23.9	28.3	20.4	2.4	東	139.5
8月	130.6	25.5	30.2	21.8	2.4	南	178.6
9月	183.2	21.9	26.2	18.1	2.3	北東	123.9
10月	165.9	16.0	20.9	11.3	2.0	北東	136.5
11月	78.8	10.0	15.9	4.6	1.9	北西	146.5
12月	43.6	5.0	11.4	-0.9	2.1	西北西	181.3
年	1282.9	13.8	19.1	8.8	2.4		1912.8

表2 関東地方への過去10年間の台風の接近数

年	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	年 間
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2
2011							1		1				2
2010								1	1	1			3
2009								2	1	2			4
2008								1	1				2
2007							1		1	1			3
2006								1					1
2005							1	1	1				3

資料2：審査データの概要

第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針に基づく モニタリング計画書

平成 27 年 9 月 11 日

氏名 国立研究開発法人 農業生物資源研究所
申請者 理事長 廣 近 洋 彦 印
住所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地2

1 実施体制及び責任者

スギ花粉ポリペプチド含有イネ (*GluA2-F1*、*GluB1-F2*、*GluC-F3*、*SH-Cry j 2*、*改変ALS*、*Oryza sativa* L.) (OsCr11) (以下「本組換えイネ」という。) のモニタリングについて、実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

平成27年5月1日現在

- 【個人情報につき非表示】* 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット ユニット長
- 【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット主任研究員
- 【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット 主任研究員
- 【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット 主任研究員
- 【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット 上席研究員
- 【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット 研究専門員

(*責任者)

2 モニタリングの対象となる野生または栽培動植物等の名称 イネ (*Oryza sativa* L.)

3 モニタリングを実施する場所

本申請における本組換えイネの使用は国立研究開発法人 農業生物資源研究所の隔離ほ場 (以下「隔離ほ場」という。) に限られる。

資料2：審査データの概要

4 モニタリングの期間

花粉飛散による隔離ほ場外のイネとの交雑の発生状況を調査するためのモニタリングは、本組換えイネの開花時期に実施することが適切である。これまでの調査より、隔離ほ場における本組換えイネの開花期間は2週間程度であることから、本組換えイネの出穂から2週間程度、開花時期を同調させた関東糯236号の鉢植えを指定位置に配置する。開花期間経過後、関東糯236号の鉢植えを回収し、所定の位置にて育成を続ける。関東糯236号の種子完熟後、得られた種子を観察することで交雑があったかどうかの判定をおこなう。この過程の内、本組換えイネの出穂から関東糯236号の鉢植えを回収するまでをモニタリングの期間とする。

5 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

- 1) 本組換えイネは、食品安全性承認作物・飼料安全性承認作物に該当しないため、農林水産省の定めた「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」（2008）に基づき実施する。
- 2) 交雑を確認するためのモチ品種として、茨城県における開花期が本組換えイネの開発に用いた「コシヒカリ低グルテリン変異系統 a123」と同時期である関東糯236号を栽培する。
- 3) モニタリングに用いる関東糯236号は、国立研究開発法人 農業生物資源研究所と外部との境界近くの10ヶ所（図1）にて栽培する。

6 モニタリング結果の解析方法

交雑しているか否かの確認として、関東糯236号の種子を収穫し、キセニア現象（モチ品種にウルチ品種の花粉が受粉して、玄米がウルチ品種の様な半透明になること）の有無を調査する。キセニア現象が検出された場合には、本組換えイネに導入した遺伝子の有無を検知できるPCR法により、花粉源が本組換えイネか否かを検定する。

7 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法

モニタリングの調査結果は、調査終了後に、農林水産大臣及び環境大臣へ報告する。

8 その他必要な事項

隔離ほ場で栽培する本組換えイネと、隔離ほ場外のイネとの交雑の可能性について、最新の研究成果や知見を収集し、生物多様性影響及び食用イネへの影響を防止するための管理措置やモニタリング手法の改善に活用する。

モニタリング結果の解析により、本組換えイネと関東糯236号との交雑と疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と協議を行うものとする。

資料2：審査データの概要

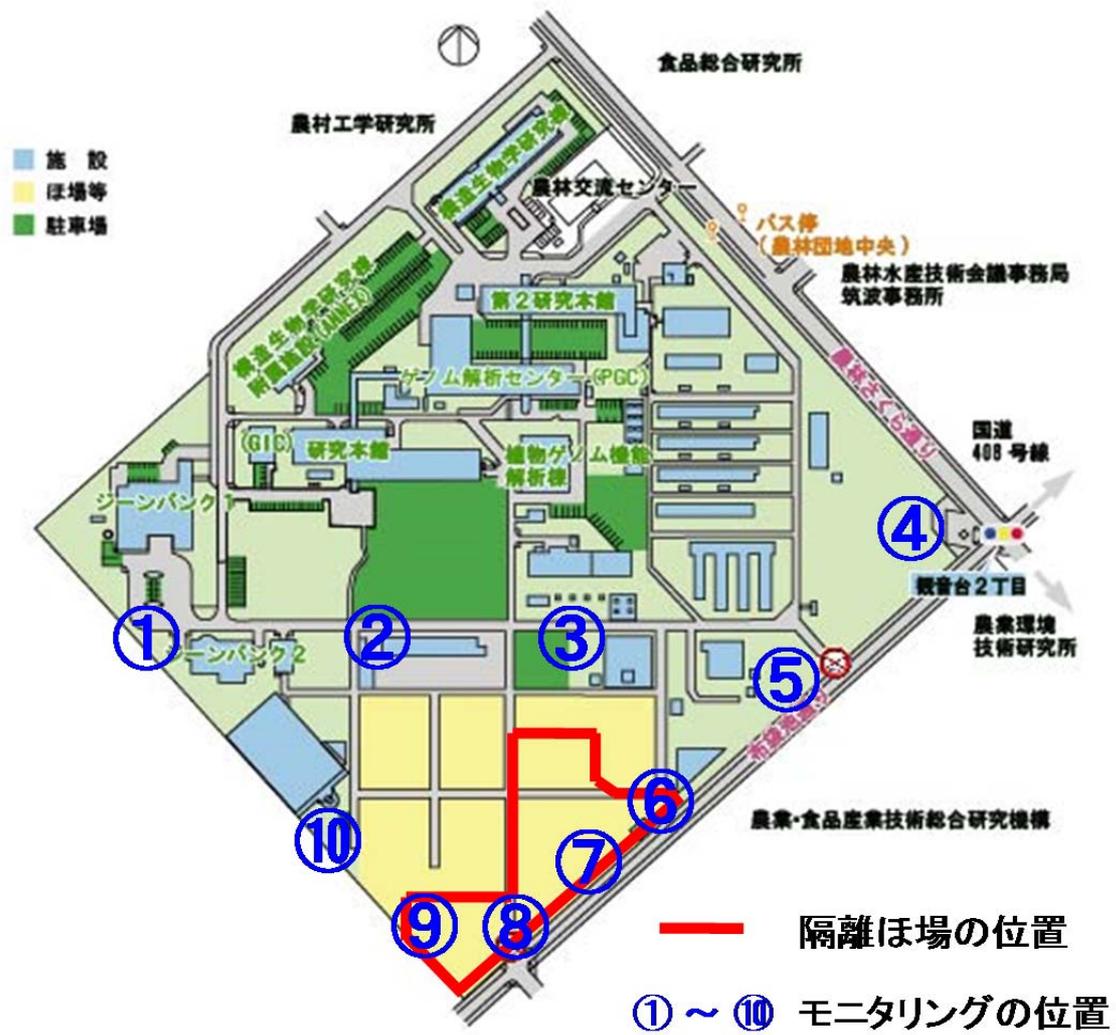


図1 農業生物資源研究所敷地図及びモニタリング位置

資料2：審査データの概要

第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針に基づく 交雑・混入防止措置計画書

平成27年9月11日

氏名 国立研究開発法人 農業生物資源研究所
申請者 理事長 廣 近 洋 彦 印
住所 茨城県つくば市観音台2丁目1番地2

1 実施体制及び責任者

スギ花粉ポリペプチド含有イネ (*GluA2-F1*、*GluB1-F2*、*GluC-F3*、*SH-Cry j 2*、*改変ALS*、*Oryza sativa* L.) (OsCr11) (以下「本組換えイネ」という。)の交雑・混入防止措置について、現時点での実施体制及び責任者は、以下に示すとおりである。

平成27年5月1日現在

【個人情報につき非表示】* 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
ユニット長

【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
主任研究員

【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
主任研究員

【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
主任研究員

【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
上席研究員

【個人情報につき非表示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
研究専門員

(*責任者)

2 交雑・混入防止措置の対象となる野生または栽培動植物等の名称 イネ (*Oryza sativa* L.)

3 交雑・混入防止措置を実施する場所

本申請における本組換えイネの使用は、国立研究開発法人 農業生物資源研究所

資料2：審査データの概要

の隔離ほ場（以下「隔離ほ場」という。）に限られる。

4 交雑・混入防止措置の期間

混入防止措置：試験全期間

交雑防止措置：隔離ほ場における本組換えイネの開花期間は2週間程度であることから、交雑防止措置の期間を基本的には本組換えイネの出穂直前から開花終了後1週間程度とする。

5 交雑・混入防止措置の方法

1) 農林水産省の定めた「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」（農林水産省，2008）と農業生物資源研究所で定めた栽培自主基準に従って実施するが、さらに交雑防止を徹底するために以下の取組を行う。

2) 隔離距離による対応：本隔離ほ場から、他の国立研究開発法人の最も近い水田まで約200m、研究所外の最も近い農家の水田まで約750m離れており、「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」（農林水産省，2008）に示された隔離距離（30m）の約6倍以上の隔離距離を確保する。

また、平成18～19年度の北海道立農業試験場が、種子親を低温処理し花粉に不稔（不稔率40～50%）を生じさせ、さらに卓越風の風下に種子親を栽培するという特殊な条件で交雑試験を行った結果、雄性不稔化に伴い他殖率が高まり、600m離れた場所でも交雑が確認された（平成18年度試験（北海道，2007）：花粉親から237m離れた位置、交雑率0.024%、平成19年度試験（北海道，2008）：花粉親から600m離れた位置、交雑率0.028%）。本組換えイネを栽培する隔離ほ場と農家の水田までの距離は約750mであり、600mを超えている。

3) 防風ネットの設置：農林水産省が所掌する試験研究を行う独立行政法人に対して実施を義務付けている「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」（農林水産省，2008）では、台風等の特段の強風が想定される場合、または開花前の低温により雄性不稔が生じることで交雑の可能性が想定される場合に防風ネット等による交雑防止措置をとることになっているが、本栽培では強風等の発生に関わらず、開花前から防風ネットを設置することとする。

6 交雑防止に関する海外の動向や対応等

2000年前後から、遺伝子組換え植物を「物質生産用バイオリクター」と考え、植物に有用遺伝子を導入し、効率的に有用蛋白質等を生産させる、遺伝子組換え植物の実用化研究が世界的にも急速に進んでいる。研究の進展に併せ、「医薬品生産用」「工業製品用」遺伝子組換え植物の栽培ルールが確立されつつある。

アメリカでは2003年に「医薬品生産用」あるいは「工業製品用」の遺伝子組換え植物の栽培に関する方針が示され、具体的な栽培ルールが確立している

資料2：審査データの概要

(USDA-APHIS, 2012)。また、EU においても、食品ではない遺伝子組換え植物の栽培ルールが示され (EFSA, 2009)、いずれも食品への混入を防止する措置について言及されている。

日本においても「医薬品生産用」や「工業製品用」の遺伝子組換え植物の栽培を行うためには、交雑及び物理的な食品流通過程での混入を防止する必要がある。本組換えイネと栽培イネの交雑を防止するため、栽培工程に関しては各工程のリスク評価を実施し、「圃場設置・管理」「農機器管理」「栽培管理」「栽培後管理」「貯蔵・輸送管理」「作業員教育訓練」に関する栽培自主基準を作成した。交雑による食品チェーンへの混入を防止するために、「第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」(農林水産省, 2008)を基にして、「交雑可能な食品用イネとの隔離距離」、「花粉飛散防止措置」「周囲の食品用イネの栽培状況」の検討を行い、必要な栽培管理項目を栽培自主基準に記載した。

参考文献

United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service (2012) Biotechnology Regulatory Services Permit User's Guide with Special Guidance for ePermits, v.5/30/2012,

http://www.aphis.usda.gov/biotechnology/downloads/permit_guidance.pdf

European Food Safety Authority (2009) Scientific Opinion on Guidance for the risk assessment of genetically modified plants used for non-food or non-feed purposes. EFSA Journal, 1164, 1-42.

農林水産省農林水産技術会議事務局長通知 (2008) 第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針 平成20年7月31日付け20農会第 606号

北海道 (2007) 北海道食の安全・安心委員会遺伝子組換え作物交雑等防止部会 第1回「平成18年度遺伝子組換え作物交雑等防止検討調査事業成績書—他家受粉による交雑に関する調査 (イネ)」資料2

北海道 (2008) 北海道食の安全・安心委員会遺伝子組換え作物交雑等防止部会 第2回「平成19年度遺伝子組換え作物交雑等防止検討調査事業成績書—他家受粉による交雑に関する調査 (イネ)」資料2

資料2：審査データの概要

農業生物資源研究所隔離ほ場試験計画

(1) 使用するイネ品種

スギ花粉ポリペプチド含有イネ (*GluA2-F1*、*GluB1-F2*、*GluC-F3*、*SH-Cry j 2*、改変*ALS*、*Oryza sativa* L.) (OsCr11) (以下「本組換えイネ」という。)

対照品種：コシヒカリ変異系統a123。

(2) 試験の目的

本組換えイネの試験栽培の目的は、商業利用のための隔離ほ場栽培における生物多様性影響評価に必要なデータを得ることである。

また、本組換えイネを原料とする治験薬の製造と治験の実施等の医薬品承認申請に向けた基礎データも併せて取得する。

(3) 試験の場所

所在地：茨城県つくば市観音台2丁目1番地2

名称：国立研究開発法人農業生物資源研究所隔離ほ場

(4) 栽培の方法

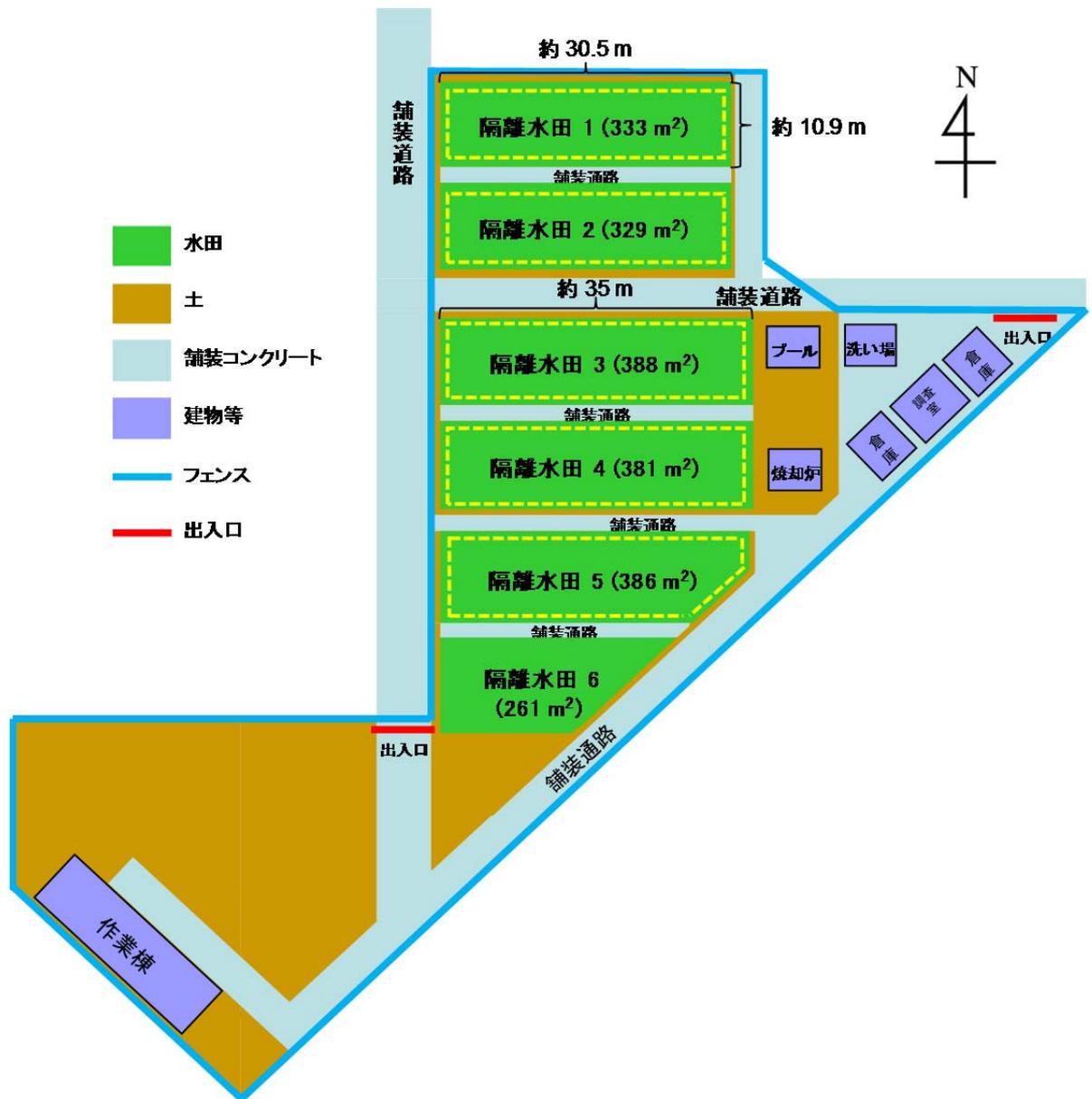
1 栽培区画

隔離水田 1～6 のうち、隔離水田 1～5 において、治験薬の原料として、本組換えイネを栽培する。隔離水田 6 において、本組換えイネと比較対照のイネとを栽培する。

なお、気候条件や研究の進捗等により、栽培区画を変更する場合がある。

資料2：審査データの概要

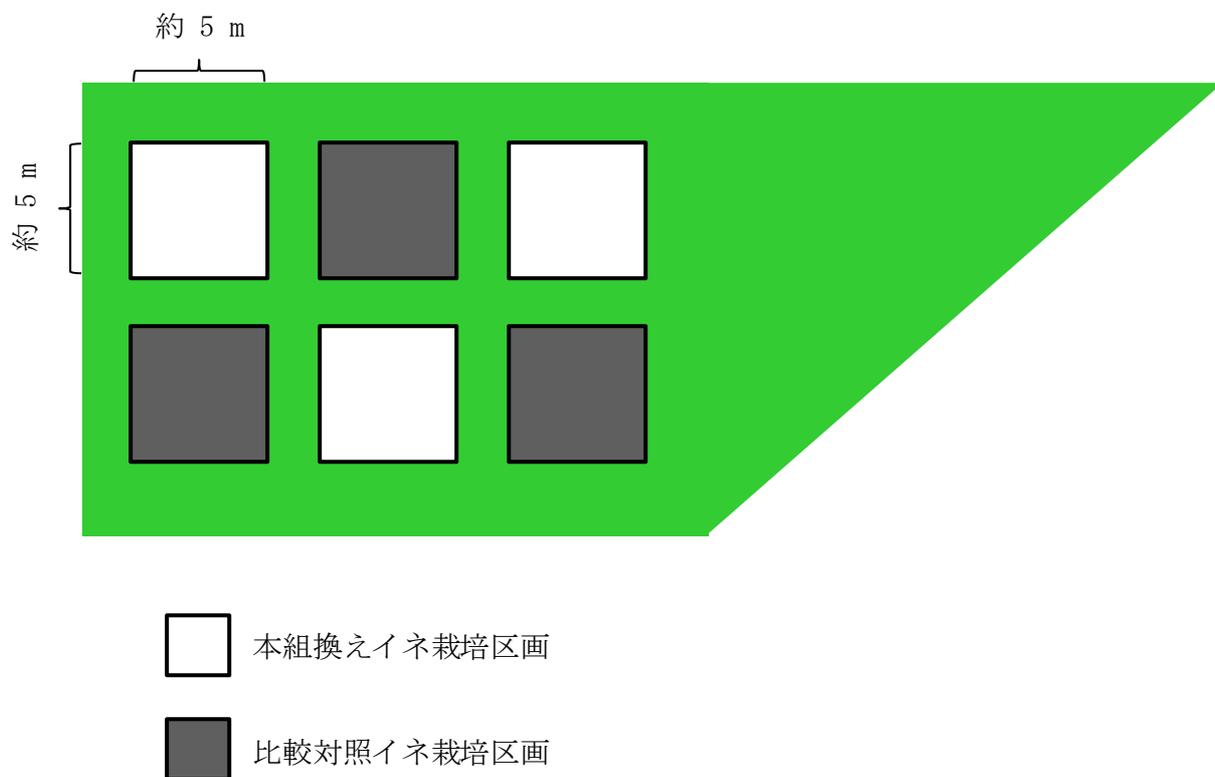
隔離ほ場の栽培区画を、以下に示す。



隔離水田 1～5 の全面（黄色点線で囲んだ範囲）において、苗の株間間隔として行間 18 cm x 列間 30 cm 程度で、1 株当たり 3～5 本程度の苗を、機械植え、あるいは、手植えにより定植する。

資料2：審査データの概要

隔離水田 6 における栽培区画を、以下に示す。本組換えイネと比較対照のイネそれぞれについて、苗の株間間隔として行間 30 cm x 列間 30 cm 程度で、1 株当たり 3~5 本程度の苗を、手植えにより定植する。



資料2：審査データの概要

2 栽培方法の概要

- ① 播種：隔離ほ場作業棟にて、種もみを袋に詰め、農薬液に浸して消毒した後、発芽の不揃いを抑制するため、水に浸して浸種させる。ハト胸状態になった種もみを、水稻育苗用培土を詰めた育苗箱に均等にまく。
- ② 育苗：隔離ほ場作業棟にて、播種した種もみについて、育苗器を用いて発芽を誘導し、コンテナ・プール等にて育苗する。
- ③ 田植え：トラクターによる隔離ほ場水田の耕起・代かきを行い、田植への準備を行う。田植え機を用いた機械植え、あるいは、手植えにより、隔離ほ場水田に苗を移植する。移植後、枯死した苗や、活着していない苗、苗が移植されていない場所について、補植する。
- ④ 栽培（水管理・追肥）：生育ステージに応じて、浅水・深水・中干し・間断かん水等、水田の水管理を行う。出穂期前後に葉中窒素含有率を調査・管理し、調査結果に基づき追肥して、玄米中の有効成分量を管理する。
- ⑤ 雑草防除・病虫害防除：隔離ほ場水田における雑草や病虫害の発生状況を把握して、雑草防除・病虫害防除のための農薬を散布する。
- ⑥ 収穫・乾燥・脱穀・保管：稲刈り機を用いて、隔離ほ場水田のイネを収穫する。ハザガケ乾燥によりもみ米を乾燥させる場合は、パイプなどを組んだ柱にイネ束を掛けて乾燥させる。乾燥機を用いる場合は、隔離ほ場水田にて脱穀作業を行い、回収したもみ米を乾燥機に投入して乾燥させる。もみ米の水分量が14.5%以下になった時点で乾燥を終了し、治験薬原料（もみ米）ラベルを貼付したハーベスタ袋に回収して、隔離ほ場保冷庫等にて保管する。
- ⑦ もみすり・包装・表示・保管：もみすり機を用いてもみ米をもみすりし、治験薬原料（玄米）ラベルを貼付した米袋に回収して、隔離ほ場保冷庫等にて保管する。
- ⑧ 栽培後管理：防鳥網を撤去し、トラクター等を用いて、隔離ほ場水田のイネの刈り株などをすき込み、完全に不活化させ、堆肥化させる。稲わら・もみ殻などは、水田へのすき込み、オートクレーブ処理、あるいは、焼却処分により、完全に不活化させる。

資料2：審査データの概要

3 作業要領の概要

- ① 入退場者の管理：カードキー方式セキュリティーシステムを設置して、入退場者を管理・制限し、部外者の立ち入りや、意図しない隔離ほ場内への種もみ・植物・土壌・資材等の搬入や隔離ほ場外への本組換えイネの搬出を防止する。
- ② 栽培管理機器の管理・清掃：機器の定期点検、使用前点検・清掃、使用后点検・清掃を行い、機器が正常に稼働することを確認するとともに、機器の清掃を徹底することにより、意図しない隔離ほ場内への種もみ・植物・土壌等の搬入や隔離ほ場外への本組換えイネの搬出を防止する。点検・清掃作業内容について、栽培管理機器使用記録簿、点検・清掃チェックシート等に記録し、点検・清掃作業が適切に実施されたことを文書化して、保管する。
- ③ 本組換えイネの保管・運搬：漏出しないような構造の容器等に本組換えイネを入れ、保管・運搬する。本組換えイネを運搬する際は、取扱いに注意を要する旨を容器等に表示する。
- ④ 本組換えイネの種もみ・もみ米等の品質管理：栽培自主基準に従い、本組換えイネの種もみ・もみ米等を調査し、それらの品質を管理する。
- ⑤ 作業者の衛生・安全管理：作業者の健康状態・衛生状態を管理するとともに、作業者の安全性の確保のため、作業内容に適した作業着・帽子・保護メガネ・保護マスク・保護手袋等を着用する。隔離ほ場への入退場の際、手・作業着等の付着物を除去し、隔離ほ場内では専用の長靴を着用して、意図しない隔離ほ場内への種もみ・植物・土壌等の搬入や隔離ほ場外への本組換えイネの搬出を防止する。
- ⑥ 隔離ほ場の衛生管理：隔離ほ場の清掃、隔離ほ場外周部の雑草防除・病虫害防除等を行い、隔離ほ場の衛生状態を管理する。
- ⑦ 自己点検の実施：本使用等の遂行状況や記録文書の作成・保管状況の確認、栽培自主基準の手順書等の作成・点検・改訂、改善が必要な場合の改善措置の指示等を行い、本使用等の適正かつ円滑な実施を確認し、栽培自主基準の継続的な改善を管理する。
- ⑧ 教育訓練の実施：計画的に、作業者に対する教育訓練を行う。
- ⑨ 文書・記録等の管理：文書・記録等の配布・保管・廃棄等を管理する。

資料2：審査データの概要

なお、栽培方法及び作業要領については、国立研究開発法人 農業生物資源研究所が規定した栽培自主基準に従う。

(5) 遺伝子組換えイネを使用する試験の内容（宿主のコシヒカリ変異系統a123との比較試験）

1 供与核酸の発現により付与された生理学的又は生態学的特性についての調査

- ① Cry j 1-F1蛋白質の発現
- ② Cry j 1-F2蛋白質の発現
- ③ Cry j 1-F3蛋白質の発現
- ④ SH-Cry j 2蛋白質の発現

調査方法：収穫した種子を乾燥させ、変性剤を用いて種子蛋白質を抽出した後、イムノブロット法及び ELISA 法により、各蛋白質の発現を調査する。

2 生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え植物と宿主の属する分類学上の種との間の相違についての調査

① 形態及び生育の特性

調査方法：生育経過にあわせて、イネの稈長、穂長、穂数や出穂時期を調査する。

② 花粉の充実度及びサイズ

調査方法：酢酸カーミン染色法を用いて花粉の充実度を調査し、光学顕微鏡を用いて花粉の直径を測定する。

③ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

調査方法：収穫時の種子生産性、収穫直前の脱粒性を調査し、収穫種子を直ぐに発芽させることにより休眠性と発芽率を調査する。

④ 有害物質の産生性

調査方法：土壤微生物相への影響として、希釈平板法を用いた細菌及び糸状菌数の比較を行う。栽培土壌および植物体における有害物質産生性について、ブロッコリーやレタス等を用いた他感物質の検出を行う。

⑤ 越冬性

調査方法：栽培終了後の株からひこばえを生育させ、その後の低温によるひこばえの枯死の有無を観察し、本組換えイネと比較対照のイネについて、低温感受性及び越冬性を比較する。

⑥ 花粉飛散性に係るデータ

調査方法：中心部にドナーとして本組換えイネ、または、比較対照のイネのポットを 5 つ置き、周囲にレシピエントとなるモチ品種を同心円状（半径2m）に配置して栽培し、モチ品種から得られた種子における他殖率を調査する。調

資料2：審査データの概要

査方法は、まずキセニアによる雑種種子を確認し、キセニア現象が確認されたら導入遺伝子を確認し、ドナーからの花粉飛散を確認する。最終的に、距離と交雑率の関係をとりまとめる。

(6) 栽培後の処理

栽培終了後、隔離ほ場水田に設置された防鳥網を撤去し、トラクター等を用いて隔離ほ場水田のイネの刈り株などを水田にすき込み、完全に不活化させ、堆肥化させる。稲わら・もみ殻などは、水田へのすき込み、オートクレーブ処理、あるいは、焼却処分等により、完全に不活化させる。

別添資料の内容 (所外秘情報につき非開示)

別添資料 1. 宿主基本特性及び育成図

別添資料 2. 腸管粘膜組織における導入遺伝子産物の取り込みに関する考察

別添資料 3. 供与核酸

別添資料 4. 立体構造改変型 Cry j 蛋白質の発現に用いた胚乳特異的プロモーターの特異性

別添資料 5. カルス特異的プロモーターによる、改変 *ALS* 遺伝子 の転写制御

別添資料 6. GluA2-F1 蛋白質及び SH-Cry j 2 蛋白質の低アレルゲン性について

別添資料 7. ニホンザルを用いた組換えイネ(OsCr11)種子の安全性の検討

別添資料 8. ラット及びカニクイザル毒性試験、ラット胚・胎児試験

別添資料 9. mRNA-seq による導入遺伝子発現解析

別添資料 10. 挿入された断片化配列

別添資料 11. 細胞内に移入した核酸の存在状態

別添資料 12. 導入遺伝子の世代間における伝達の安定性解析

別添資料 13. 本組換えイネに含まれる断片化配列部遺伝子産物の検出

別添資料 14. 供与核酸の翻訳産物の個体間及び世代間での発現の安定性

別添資料 15. 本組換えイネ導入遺伝子の PCR 検出法の再現性

別添資料 16. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

資料3. 緊急措置計画書

申請に係る第一種使用等により生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合に、申請者自らが可能な範囲で行う生物多様性影響を効果的に防止するための措置を定めた申請書類。

緊急措置計画書

平成 27 年 9 月 11 日

氏名 国立研究開発法人農業生物資源研究所
理事長 廣近 洋彦
住所 茨城県つくば市観音台 2 丁目 1 番地 2

第一種使用規程の承認を申請しているスギ花粉ポリペプチド含有イネ(*GluA2-F1*、*GluB1-F2*、*GluC-F3*、*SH-Cryj2*、改変 *ALS*、*Oryza sativa* L.) (OsCr11) (以下「本組換えイネ」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、また、農家等で栽培しているイネ(以下、一般栽培イネという)との交雑が生じたおそれがあると認められた場合、生産・流通上の混乱を防止するため、以下の措置を執ることとする。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は、以下に示す通りである。

業務管理責任者（責任者）

【個人情報につき非開示】 遺伝資源センター長（Tel: 【非開示】）

業務管理主任者

【個人情報につき非開示】 安全管理室 主任研究員（Tel: 【非開示】）

業務従事者

【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
ユニット長（Tel: 【非開示】）

【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット
主任研究員（Tel: 【非開示】）

(以上は現時点での体制及び責任者であり、異動や所内での業務体制の見直しによる 変更の際には速やかに対応する)

- 2 第一種使用等の状況の把握の方法

- (1) 第一種使用等の状況は、作業従事者から得られた情報により把握するとともに、農業

資料3. 緊急措置計画書

生物資源研究所作物業務安全委員会に所属する当所職員による視察を行う。現時点における当該職員は以下の通りである。

- 【個人情報につき非開示】 遺伝資源センター長（委員長）
- 【個人情報につき非開示】 安全管理室 主任研究員（業務管理主任者）
- 【個人情報につき非開示】 植物科学研究領域長
- 【個人情報につき非開示】 農業生物先端ゲノム研究センター ゲノム機能改変研究ユニット長
- 【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター 機能性作物研究開発ユニット上級研究員
- 【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究センター 耐病性作物研究開発ユニット 研究員（兼）知的財産室
- 【個人情報につき非開示】 遺伝資源センター 遺伝資源国際連携室長
- 【個人情報につき非開示】 遺伝資源センター 多様性活用研究ユニット長
- 【個人情報につき非開示】 植物科学研究領域 植物・微生物間相互作用研究ユニット上級研究員
- 【個人情報につき非開示】 広報室長
- 【個人情報につき非開示】 技術支援室長
- 【個人情報につき非開示】 遺伝子組換え研究推進室長（兼）遺伝子組換え研究センター 耐病性作物研究開発ユニット
- 【個人情報につき非開示】 安全管理室長

- (2) 本組換えイネについては管理を徹底し、部外者が入手できないようにするとともに、その情報を整理して記録する。
- (3) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合及び一般栽培イネとの交雑が生じたおそれがあると認められた場合には、得られた情報を整理し、記録する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置に従って対処する必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

業務従事者等の間での情報共有を速やかに行う。また、生物多様性影響が生ずるおそれが認められた場合及び一般栽培イネとの交雑が生じたおそれがあると認められた場合には、直ちに隔離ほ場のある自治体に電話、ファックス、電子メール、文書などにより連絡する。さらにホームページ等でお知らせを掲載する。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

不要な種子は漏出しないような容器に納め、オートクレーブまたは焼却炉を用い不活化する。栽培した本組換えイネは、地上部は刈り取り、オートクレーブ又は焼却炉を用い不活化する。残りの本組換えイネの残渣及び発生した植物は速やかに隔離ほ場内に埋設又はすき込み処理により確実に不活化する。

また、農林水産省が所掌する試験研究を行う独立行政法人に対して実施を義務付

資料3. 緊急措置計画書

けている第一種使用規程承認組換え作物栽培実験指針（農林水産省, 2008）に基づき、隔離ほ場周辺のモニタリングをすることにより隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

5 一般栽培イネとの交雑が生じたおそれがあると認められた場合の具体的な措置内容

一般栽培イネと本組換えイネが交雑したおそれがあるとする情報を受けた場合、作物業務安全委員会において情報の信ぴょう性を確認するとともに、必要と認められた場合、農業生物資源研究所において、開発従事者とは独立の科学的検証のためのチームを設置する。

科学的検証の結果、交雑が認められた場合、市場への交雑米の流通を防止するための措置を検討・実施する。

6 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずるおそれが示唆された場合及び一般栽培イネとの交雑が認められた場合、緊急措置を講じた後、速やかに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。