



UTTALELSE OM MONSANTOS GENMODIFISERTE MAIS MON 88017 x MON 810 (EFSA/GMO/CZ/2006/33)

Vurdert og godkjent av Faggruppe for genmodifiserte organismer

DATO: 4. JUNI 2007

SAMMENDRAG

Vurderingen av den genmodifiserte herbicidresistente og insekttolerante maislinjen MON 88017 x MON 810 fra Monsanto er utført av Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet. Mattilsynet ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maislinjen MON 88017 x MON 810 til bruk i næringsmidler og fôrvarer.

Hybriden MON 88017 x MON 810 er fremkommet ved krysning mellom MON 88017 og MON 810. VKM har tidligere vurdert MON 88017 og MON 810, der begge genkassetene til MON 88017 x MON 810 har vært representert. Hensikten med MON 88017 x MON 810 er motstandsdyktighet mot enkelte insektarter og sprøytemiddelet Roundup.

Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA-net. MON 88017 x MON 810 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's retningslinjer for risikovurdering av genmodifiserte planter (EFSA 99, 2004) og Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) konsensusdokument for mais (OECD 2002). Den vitenskapelige vurderingen omfatter transformeringsprosessen, bruk av vektor og det transgene konstruktet, komparativ analyse av ernæringsmessig kvalitet, mineraler, kritiske toksiner, antinæringsstoffer, allergener og nye proteiner.

Analysene av ernæringsmessige viktige komponenter ble vurdert. Det er funnet statistiske forskjeller for enkelte komponenter. De statistiske forskjellene for disse komponentene er ikke konsistente da forskjellene som er påvist i enkelte forsøksfelt, ikke er påvist i de andre forsøksfeltene. Faggruppen anser analysene for å være tilstrekkelige for en vurdering av hybridene MON 88017 x MON 810 til bruk som mat og fôr.

Ingen av proteinene som blir uttrykt som følge av genmodifiseringen har likheter med kjente allergener eller egenskaper som tilsier at de er allergener. Det er imidlertid ikke vurdert om det uttrykte toksinene Cry1Ab og Cry3Bb1 kan ha adjuvanseffekter.

Faggruppen finner det vanskelig å vurdere om næringsmidler og fôrvarer fra maisen MON 88017 x MON 810 er mer allergifremkallende enn næringsmidler og fôrvarer fra umodifisert maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos næringsmidler og fôrvarer fra MON 88017 x MON 810 i forhold til umodifisert mais med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Da mengde Cry1Ab og Cry3Bb1 i maiskorn henholdsvis kan være 0,39 (variasjon 0,16 – 0,63) µg/g og 9,3 (variasjon 3,9-13) µg/g tørrvekt, mener Faggruppen at det må kreves av Monsanto å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av det beslektede Cry1Ac.

NØKKELOD

Genmodifisert mais, MON 88017 x MON 810, insektresistens, herbicidtoleranse, CP4 EPSPS, Cry1Ab, Cry3Bb1, helsemessig trygghet, helse.

BAKGRUNN

Faggruppe for genmodifiserte organismer under Vitenskapskomiteen for mattrygghet er blitt bedt av Mattilsynet om en vitenskapelig risikovurdering av EFSA/GMO/CZ/2006/33 genmodifisert mais (MON 88017 x MON 810) til bruk i næringsmidler og fôrvarer, men ikke for dyrking. Vurdering av den genmodifiserte maisen er basert på den dokumentasjonen som er gjort tilgjengelig på EFSA's nettside GMO EFSA.net. MON 88017 x MON 810 er vurdert i henhold til tiltenkt bruk og de prinsipper som er lagt til grunn i EFSA's dokument "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2004). Ved vurdering av vesentlig likhet har Faggruppen lagt vekt på OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002), som gir anbefalinger over hvilke parametre som bør undersøkes.

I henhold til Vitenskapskomiteen for mattrygghets uttalelse på møtet 23. april 2004 har Faggruppe for genmodifiserte organismer vedtatt at i de sakene hvor EFSA har kommet med sine uttalelser før Faggruppe for genmodifiserte organismer får sakene til behandling, skal søknadene behandles på samme måte som i EU-landene, dvs. ved en noe forenklet risikovurdering. Det vil imidlertid bli tatt hensyn til særnorske forhold der slike kan påvises.

Det er kun medlemmene i Faggruppen som har vurdert den genmodifiserte maisen.

OPPDRAK FRA MATTILSYNET

Mattilsynet ber Vitenskapskomiteen for mattrygghet om å vurdere den genmodifiserte maisen. Bruksområdet som søknaden gjelder for er: import, prosessering, mat og fôr. Linje MON 88017 x MON 810 er søkt omsatt under forordning 1829/2003/EC. Norge har ikke tidligere uttalt seg om MON 88017 x MON 810.

Produktet som ønskes vurdert, er:

Genmodifisert mais, EFSA/GMO/CZ/2005/27 (MON 88017 x MON 810). Unik kode er MON-88Ø17-3 x MON ØØ81Ø-6.

Status i EU: Søknad under 1829/2003/EF. EFSA's frist for innspill er 21.05.07.

Ønsket svarfrist til Mattilsynet er juni 2007.

RISIKOVURDERING

Innledning

Den genmodifiserte maishybriden MON 88017 x MON 810 ble vurdert ut fra Mattilsynets oppdrag. I henhold til Monsanto er søknaden for import og bruk som næringsmidler, fôrvarer og industrielle produkter, ikke for utsetting. Primærbruken av maiskorn i Norge i dag er til dyrefôr, men mais brukes også til industriell produksjon av etanol, maismel, popkorn, raffinert stivelse og søtningsprodukter.

Faggruppe for genmodifiserte organismer har på faggruppemøtet 02.02.05 vedtatt å bruke EFSAs retningslinjer som gruppens retningslinjer for vurdering av genmodifiserte planter. Prinsippene som er lagt til grunn for vurderingen, er derfor hentet fra EFSAs dokument "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed" (EFSA 99, 2004).

Faggruppe for genmodifiserte organismer vurderer søknaden om markedsføring av genmodifisert mais (EFSA/GMO/CZ/2006/33) til bruk i næringsmidler og fôrvarer under forordning 1829/2003.

Bakgrunnsinformasjon

Transformasjonssystemet/konstruksjon av MON 88017:

Til transformasjon er brukt *Agrobacterium* mediert transformering av kallus fra kultiverte embryo. Plasmidet PV-ZMIR39 ble benyttet til å transformere celler fra den umodifiserte maislinjen A x Hi-II. Et rekombinant DNA fragment på ca 7100 basepar (bp) er satt inn i maisgenomet. Fragmentet inneholder to ekspresjonskassetter. Den ene kassetten inneholder ris aktin promoteren P-ract1, et ract1 intron, et optimalisert kloroplast dirigeringsseptid (CTP2), *cp4 epsps* genet og NOS3 terminatoren. Den andre kassetten inneholder en 35S-promoter (P-e35S), en ikke uttrykt ledersekvens (wt CAB) fra hveteklorofyll a/b-bindende protein genet, et ract1 intron, et endret cry3Bb1 gen og et 3'-ende terminatorområde (tahsp17 3') fra hvete "heat shock" genet. DNA-fragmentet inneholder ikke antibiotikaresistensgen. Transformanter ble selektert ved at de overlevde og vokste i nærvær av glyfosat.

Beskrivelse av de innsatte genene:

Southern blot og PCR har blitt brukt for å karakterisere det rekombinante DNA-fragmentet i planten. Molekylærbiologisk karakterisering viser at det er satt inn bare en kopi av rekombinant DNA-fragmentet i maisens genom. Dette fragmentet inneholder:

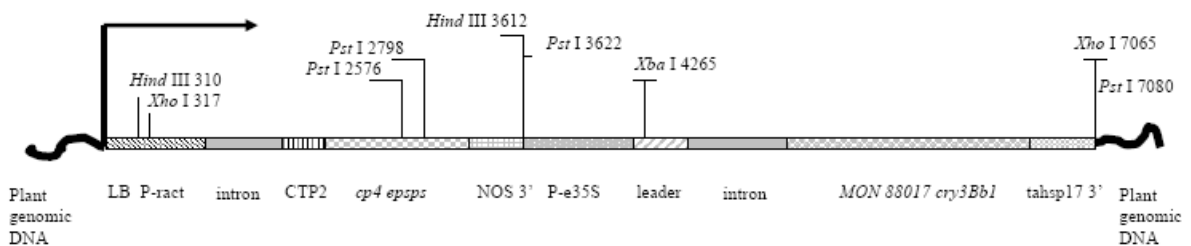
cp4 epsps ekspresjonskasset

- | | |
|---------------------|--|
| a) P-ract1 | promoter fra risaktin gen |
| b) ract1 intron | intron fra risaktin gen |
| c) CTP2 | DNA sekvens som koder for kloroplastdirigeringsseptid, fra <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| d) <i>cp4 epsps</i> | DNA sekvens som koder for CP4 EPSPS protein, fra <i>Agrobacterium</i> stamme CP4 |

- e) NOS 3' 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra nopalinsyntase gen til *Agrobacterium tumefaciens*, uttrykkes ikke i planten

cry3Bb1 ekspresjonskasset

- d) P-e35S promoter fra blomkålmosaikk virus
- e) wt CAB 5' DNA ledersekvens fra hveteklorofyll a/b-bindende protein gen, uttrykkes ikke i planten
- f) ract1 intron intron fra risaktingen
- g) *cry3Bb1* gen som koder et syntetisk CRY3Bb1 protein, fra *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*
- h) tahsp17 3' 3' DNA sekvens som avslutter transkripsjonen, kommer fra hvete "heat shock" gen 17, uttrykkes ikke i planten.



Figur: Rekombinant DNA fragment i genomet til maisen MON 88017. Hind, Pst, Xba og Xho er seter for de respektive restriksjonsenzymene.

Transformasjonssystemet/konstruksjon av MON 810:

Til transformasjon av kallusbiter (plantevev) er brukt partikkelakselerasjonsmetoden. Plasmid-DNA fra plasmidene PV-ZMBK07 og PV-ZMGT10 ble felt ut på mikroskopiske gull eller wolframpartikler. Disse partiklene akselereres v.h.a. kruttexplosjon og bombarderer kallusbitene. Partiklene penetrerer plantevevet som blir bombardert. DNAet avsettes inne i cellene og inkorporeres deretter i plantecellenes kromosomer.

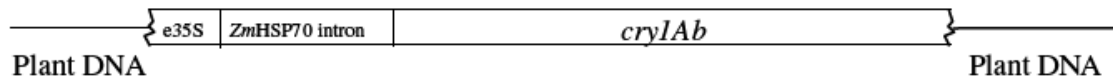
Plasmidet PV-ZMGT10 inneholder gener som koder for glyfosattoleranse. Glyfosat, dvs. Roundup-sprøytemiddel, brukes til seleksjon av de genetisk modifiserte cellene. Glyfosattoleransegenene (genene *cp4 epsps* og *gox*) er ikke til stede i MON 810 planter. Det er derfor sannsynlig at cellen som resulterte i cellelinjen MON 810 har unngått glyfosatseleksjonen, f.eks. ved at cellene i nærheten degraderte det tilgjengelige glyfosatet slik at MON 810 cellen overlevde. Mais-cellelinjen MON 810 inneholder genet *cry1Ab* som kommer fra plasmidet PV-ZMBK07. Genet koder for Cry1Ab proteinet, som gir insekttoleranse.

Vektorkonstruksjon

Transformasjonsplasmidet som dannet den insekttolerant maislinjen MON 810 var PV-ZMBK07.

Plasmid PV-ZMBK07 inneholder genelementene:

<i>E35S</i>	Blomkål mosaikk virus (CaMV) promoter med dobbel enhancer.
<i>hsp70</i>	Intron fra mais <i>hsp70</i> gen (heat-shock protein) er til stede fordi intronet vil øke nivået av gentranskriptet
<i>cryIAb</i>	Koder for Cry1Ab proteinet
<i>NOS 3'</i>	Et 3'-område til nopalinnosyltransferase gen som ikke blir translatert, men som terminerer transkript og som dirigerer polyadenylering
<i>lacZ</i>	En del av <i>E. coli lac1</i> gens kodende sekvens som inneholder promoteren Plac og en delvis kodende sekvens for beta-D-galaktosidase
<i>ori-pUC</i>	Replikasjonsorigo som dirigerer replikasjon av plasmidet i <i>E. coli</i>
<i>nptII</i>	Genet for enzymet neomycin fosfotransferase type II.



Figur: Rekombinant lineært DNA fragment i genomet til maisen MON 810. Det rekombinante DNA fragment er på 3582 basepar og stammer fra plasmidet PV-ZMBK07. Det rekombinante DNA fragmentet i planten inneholder ikke *nptII* antibiotikaresistensgenet.

Beskrivelse av gener i plasmidet PV-ZMBK07.

E35S promoteren binder RNA polymerase, men er ikke del av transkriptet (mRNAet) eller det senere proteinet.

hsp70 gens intron er satt inn for å øke gentranskripsjonen av *cryIA(b)* gen. Intronet kommer fra mais. Intron uttrykkes ikke.

Deler av *cryIA(b)* gen er den eneste plasmidderiverte nukleotidesequensen som kunne påvises i maisplanten. Den delen av gen som er satt inn koder for et insektaktivt *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (B.t.k.) protein. B.t.k. er en vanlig jordbakterie. Det vanlige navnet på proteinet er Cry1Ab.

lacZ gen, alfa området, koder for enzymet beta-galaktosidase, som er et laktose-metaboliserende enzym fra *E. coli*. Enzymet katalyserer hydrolyse av laktose til sine enkelte monosakkarider. Der er ingen helsemessige betenkeligheter med dette enzymet da det er naturlig til stede i menneskets tarmbakterier.

ori-pUC området er replikasjonsgenet for pUC plasmidet, og dets funksjon er at plasmidet kan replikeres i *E. coli*. Genet uttrykkes ikke i andre organismer.

nptII Genet for enzymet neomycin fosfotransferase type II, som er i stand til å inaktivere kanamycin. *NptII*-genet anvendes i forbindelse med utvelgelse av de bakterieceller som har fått satt inn de gener som er ønsket overført til planten i neste omgang, fordi disse cellene også er resistente mot kanamycin. Genet uttrykkes ikke i maisplanten MON 810.

Den genmodifiserte maislinjen MON 88017 x MON 810 uttrykker glyfosattoleranse og insektresistens. Bakgrunnen for glyfosattoleranse er *cp4-epsps*-genet som stammer fra

jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* og som koder for 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfatsyntetase. Enzymet omdanner fosfoenolpyruvat og sikimat-3-fosfat til 5-enolpyruvylsikimat-3-fosfat, som er en viktig metabolitt i syntesen av aromatiske aminosyrer. Alle planter og mikroorganismer inneholder dette enzymet, noe som dyr ikke gjør. Dyr må dermed få aromatiske aminosyrer fra føden. Plantens enzym er imidlertid sensitiv for glyfosat, mens det mikrobielle enzymet er tolerant.

Bakgrunnen for insektresistens er at planten uttrykker en variant av bakterieproteinene CRY1Ab og CRY3Bb1. CRY1Ab og CRY3Bb1 proteinene, som uttrykkes av *cry1Ab* og *cry3Bb1* - genet, er naturlige toksiner som gir planten toleranse mot biller fra ordenen Coleoptera og Lepidoptera. *cry1Ab* og *cry3Bb1* - genet stammer henholdsvis fra jordbakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* og *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*.

Molekylærbiologiske analyser av MON 88017 x MON 810

Molekylærbiologiske analyser viser at de rekombinante fragmentene i planten inneholder de samme gener og genelementer som er i MON 88017 og MON 810. Både EPSPS-, CRY3Bb1 og CRY1Ab proteinene som uttrykkes i maiskorn er undersøkt med Western-blot analyse og densitometri, SDS-PAGE og densitometri, MALDITOF massespektrometri i maisene MON 88017 og MON 810. Det er foretatt glykosyleringsanalyse av Cry3Bb1 proteinet som uttrykkes i MON 88017. Det ble ikke påvist glykoliserings seter på proteinet. Proteinene er også undersøkt for henholdsvis enzymaktivitet og bioaktivitetsassay. Analysene viser at EPSPS og CRY3Bb1 proteinene er strukturelt og funksjonelt like de *E. coli*-produserte proteinene, mens for Cry1Ab proteinet henvises det analyser fortatt i 1995. Genene på de rekombinante DNA-fragmentene i MON 88017 x MON 810 uttrykker EPSPS-protein som er identisk med proteinet som uttrykkes i jordbakterien *Agrobacterium* stamme CP4, mens for CRY3Bb1 proteinet er 6 aminosyrer endret i forhold til proteinet som uttrykkes i jordbakterien *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis*. CRY1Ab-protein som uttrykkes i MON 810 maisplanten har insektaktivitet.

Flankerende sekvenser til de rekombinante DNA-fragmentene i MON 88017 x MON 810 er ikke sekvensert. Siden MON 88017 x MON 810 er fremkommet ved konvensjonell kryssing mellom MON 88017 og MON 810 hevder Monsanto at sekvensene i og rundt de respektive fragmentene er uendret.

Stabilitet av de rekombinante fragmentene i de respektive maisene er vist eksperimentelt over flere generasjoner og kryssninger.

Analyse av enzymatisk aktivitet av EPSPS proteinet viser ingen forskjell mellom plante- og bakterieprodusert protein. Fordøyelighetstest viste også at CP4 EPSPS-protein fordøyes raskt i simulert mage- og tarmsaft. Fordøyelighetstest av CRY3Bb1 og CRY1Ab viser at proteinene fordøyes raskt i simulert magesaft. CRY3Bb1 og CRY1Ab proteinene består av en proteaseresistent og en proteasefordøyelig del. I insektarmen vil den proteasefordøyelige delen spaltes til aminosyrer, mens den resistente delen ikke blir fordøyd. I simulert tarmsaft fra mennesker fordøyes fullengde proteinene raskt. Den proteaseresistente delen av proteinene er etter 24 timer spaltet i minst 3 biter.

Analyse av mengde CP4 EPSPS protein og CRY-proteiner

Mengde CP4-EPSPS i fôr og korn er målt til henholdsvis 51 µg/g tørrvekt (SD=9,2; Range = 38 - 70) og 4,3 µg/g tørrvekt (SD = 1,6; Range = 2,2 - 6,2). Mengde Cry3Bb1 protein i fôr og korn er målt til henholdsvis 100 µg/g tørrvekt (SD = 23; Range = 71 - 150) og 9,3 µg/g

tørrvekt (SD = 3,4; Range = 3,9 - 13). Mengde Cry1Ab protein i fôr og korn er målt til henholdsvis 14 µg/g tørrvekt (SD = 3;4 Range = 11 - 17) og 0,39 µg/g tørrvekt (SD = 0,13; Range = 0,16 - 0,63). Mengde av proteiner er også målt i pollen og rot. Prøvene som er analysert stammer fra tre feltforsøk utført i USA i 2002. Det er tatt ut fire prøver fra hvert feltforsøk.

Krysning over syv generasjoner og tre selvpollineringsgenerasjoner viser at det rekombinante CRY3Bb1/EPSPS-fragmentet er stabilt inkorporert i MON 88017 maisgenomet. Dyrking i over 10 år viser det rekombinante DNA fragmentet MON 810 er stabilt inkorporert i MON 810 maisgenomet.

Delkonklusjon

Faggruppen har vurdert de fysiske, kjemiske og funksjonelle karakteriseringene av proteinene til å være tilstrekkelige.

Dokumentasjon av ”vesentlig likhet”

Analyser av variasjon i fenotype og agronomiske karakteristika for MON 88017, MON 810 og konvensjonelle maissorter er undersøkt i mange feltforsøk på flere forskjellige steder. MON 88017 har blitt testet i feltforsøk i Argentina og USA siden 2002. MON 810 har blitt kommersielt dyrket siden 1997 i USA og dyrkes nå i Europa, Canada, Argentina og Sør Afrika.

Analyse av sammensetning i maiskorn fra maislinjen MON 88017 x MON 810 stammer fra tre feltforsøk utført i USA i 2002. Det er tatt ut prøver fra fire blokker fra hvert felt. Analysene omfatter også MON 88017, MON 810 og en umodifisert kontrollhybrid (ikke spesifisert hvilken) dyrket på de samme feltene som MON 88017 x MON 810. Fire forskjellige umodifiserte kommersielle referanse maishybrider er dyrket på hvert av forsøksfeltene, dvs. 12 forskjellige hybrider totalt.

Hovedkomponenter i maiskorn og andre plantedeler:

For MON 88017 x MON 810 er valget av analyseparametere gjort i henhold til OECDs konsensusdokument for mais (OECD 2002). Det er foretatt forskjellige analyser av hovedkomponenter for fôr og korn. For fôr ble det analysert for aske, fett, protein, vann, ADF (acid detergent fibre), NDF (neutral detergent fibre), fosfor, kalsium og karbohydrater. For korn ble det analysert for protein, fett, aske, karbohydrater, ADF, NDF, total fiber, kalorier, vann, aminosyrer, fettsyrer (C8-C22), fosfor, jern, kalium, kalsium, kobber, magnesium, mangan, natrium, sink, vitaminene B1, B2, B6, E, folinsyre og niacin, de sekundære metabolittene furfural, ferulsyre og p-kumarinsyre, og anti-næringsstoffene fytinsyre og raffinose. Analysene ble utført under god laboratoriepraksis (GLP). Femten komponenter ble ekskludert fra statistisk analyse fordi >50 % av observasjonene var ved eller lavere enn kvantifiseringsgrensen. Fra feltforsøkene i USA er det funnet 16 signifikante statistiske forskjeller ($p < 0,05$) av 248 statistiske sammenligninger, 4 parallelle prøver x 62 komponenter fra korn og fôr. Fire sett av analyser ble utført: MON 88017 versus umodifisert kontroll, MON 88017 x MON 810 versus umodifisert kontroll, MON 88017 x MON 810 versus MON 810 og MON 88017 x MON 810 versus MON 88017. Ved statistisk sammenligning mellom MON 88017 og umodifisert kontroll er det for fôr og korn ikke funnet signifikante statistiske forskjeller ($p < 0,05$) for 232 av 248 statistiske sammenligninger, for MON 88017 x MON 810

versus umodifisert kontroll er det for fôr og korn ikke funnet signifikante statistiske forskjeller ($p < 0,05$) for 216 av 248 statistiske sammenligninger, for MON 88017 x MON 810 versus MON 810 er det for fôr og korn ikke funnet signifikante statistiske forskjeller ($p < 0,05$) for 226 av 248 statistiske sammenligninger og for MON 88017 x MON 810 versus MON 88017 er det for fôr og korn ikke funnet signifikante statistiske forskjeller ($p < 0,05$) for 223 av 248 statistiske sammenligninger. Fem prosent, eller omtrent 12 ($0,05 \times 248$), er forventet å være signifikant forskjellige p.g.a. tilfeldigheter. For de signifikante statistiske forskjellene som er funnet ligger verdiene innenfor 99 % toleranseintervall, og innenfor typiske verdier for mais som er rapportert i litteraturen.

Fettsyresammensetning i maiskorn:

Fettsyresammensetningen for MON 88017 x MON 810 er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Det ble analysert for 22 fettsyrer. Av disse ble 13 ekskludert fra statistiske analyser fordi mengdene var lavere enn deteksjonsgrensene. For syv fettsyrer er det funnet statistiske forskjeller innenfor enkelte felt. Statistisk analyser over alle feltene viser statistiske forskjeller på under 10 % for 6 fettsyrer fra feltene, mens for en fettsyre (20: 1 eicosenoic acid) viser statistisk forskjell over de enkelte feltene og også når de statistiske analysene for alle feltene er stilt sammen. De statistiske analysene for denne fettsyren viser at forskjellene er mindre enn 10 %. Alle verdiene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Aminosyrer i maiskorn:

Både essensielle og ikke-essensielle aminosyrer ble analysert. Det er ikke funnet store statistiske forskjeller for noen av forsøksfeltene i USA for 2002. Det er funnet statistiske forskjeller for 6 aminosyrer over enkelte felt, Ved å kombinere statistiske undersøkelser for alle forsøksfeltene i er det ikke påvist statistiske forskjeller.

Vitaminer:

Vitaminer som det i henhold til OECDs konsensusdokument for mais bør undersøkes for, er B1, B2, B6, E, folinsyre, niacin, vitamin A og vitamin C. Følgende vitaminer er ikke målt: vitamin A og vitamin C. For de fleste vitaminene som er målt ligger de statistiske forskjellene innenfor 20 %, og innenfor typiske verdier som er rapportert i litteraturen. For vitamin B1 er den statistiske forskjellen på ca 27 % når alle feltene kombineres..

Mineraler:

Med unntak for selen er mineralene som er målt i henhold til OECDs konsensusdokument for mais. Natriuminnholdet var lavere enn påvisningsgrensen. For kalium, kalsium og kobber er det funnet statistiske forskjeller. Det er imidlertid ikke funnet slike statistisk forskjeller når alle feltene kombineres. For kobber er det for et forsøksfelt i USA funnet forskjell på ca. 24 %.

Sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer:

Det er ikke funnet store statistiske forskjeller for sekundære metabolitter og antiernæringsstoffer. Det er ikke målt for toksinene DIMBOA og MBOA.

Delkonklusjon

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametre. Verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen.

Faggruppen konkluderer med at de påviste forskjellene ikke utgjør en endret helserisiko for mennesker og dyr i forhold til annen mais.

Dokumentasjon av toksisitet og allegenisitet

Toksisitet:

Søknaden inneholder ikke dokumentasjon på fôringsforsøk med renfremstilt CP4 EPSPS-protein. Monsanto hevder at siden dokumentasjon over disse fôringsforsøkene finnes i andre av Monsanto søknader som for eksempel NK603, MON810, MON863xMON810 og GA11, er det ikke nødvendig å inkludere denne dokumentasjonen i denne søknaden. Akutt oral fôringsstudie på mus med Cry1Ab er utført tidligere og Monsanto henviser til disse studiene.

Akutt oral fôringsstudie på mus med renfremstilt Cry3Bb1 protein

Monsanto har i 2003 utført akutt oral fôringsstudie på mus med renfremstilt Cry3Bb1 produsert av *E. coli*. Studien er utført i henhold til retningslinjene fra EPA (OPPTS 870.1100) og OECD (akutt toksisitetstest nr. 401). I studien ble det benyttet 10 hann og 10 hunn mus. For kontroll ble det benyttet serumalbumin. Cry3Bb1- og serumalbumindosen var henholdsvis 1930 og 1900 mg/kg kroppsvekt. Etter 14 dagers observasjonsperiode ble alle dyrene avlivet. Det er utført patologiske undersøkelser. Det er ikke påvist testrelaterte skader på dyrene. Ut fra den dosen som ble benyttet i dette fôringsforsøket har Monsanto foretatt en beregning av antatt eksponeringssikkerhetsmargin (margin of exposure (MOE)). Monsanto har benyttet et høyest tenkelig inntak av Cry3Bb1 fra maiskorn på 9,46 µg/kg kroppsvekt og 4,84 µg/kg kroppsvekt for henholdsvis småroller (vekt 14,5 kg) og voksne (vekt 70 kg). MOE ble kalkulert til $\geq 3,99 \cdot 10^5$ og $\geq 2,04 \cdot 10^5$ for henholdsvis småroller og voksne. En MOE på ≥ 100 for akuttoksiske stoffer er generelt regnet for være et rimelig beskyttelsesnivå for mennesker. Høyest tenkelig inntak av Cry3Bb1-proteinet for småroller og voksne blir henholdsvis 140 µg og 340 µg. Monsanto har ikke foretatt vurdering av eventuell adjuvanseffekt av Cry3Bb1-proteinet.

Fôringsforsøk på broiler:

Søknaden inneholder dokumentasjon fra 42-dagers fôringsforsøk på broilere, 800 dyr, fordelt i åtte grupper som ble fôret med henholdsvis mais fra MON 88017 x MON 810, MON 88017, en umodifisert kontrollhybrid og fem kommersielle umodifiserte referansehybride maissorter. Det ble ikke påvist vesentlige endringer ved fôring med maiskorn fra MON 88017 x MON 810, MON 88017, tradisjonell kontroll og tre av de fem referansehybridene. For de to andre referansehybridene ble det målt noe høyere vekt av lårene.

Subkronisk fôringsforsøk på rotter

Det er ikke blitt utført 13 ukers fôringsforsøk med med MON 88017 x MON 810. Monsanto hevder at slike forsøk er utført på MON 88017 og MON 810. Siden krysning mellom MON 88017 og MON 810 er konvensjonell krysning er det ikke nødvendig å utføre subkronisk fôringsforsøk

Faggruppen konkluderer med at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen er lik umodifisert mais.

Allergenitet:

Bt-proteiner

Til tross for vel 50 års bruk av B.t.k. som sprøytemiddel er det ingen bekreftede rapporter over øyeblikkelige eller forsinkede allergiske reaksjoner til tross for betydelig human oral-, dermal- og inhalasjonseksponering. Laboratoriestudier med pattedyr indikerer heller ingen potensielle allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* eller dets komponenter innbefattet delta-endotoksinet i krystallproteinene. Allergiske reaksjoner mot *Bacillus thuringiensis* har vært rapportert, men disse har ikke vært tilskrevet krystallproteinene.

Det har ikke vært utført immunologiske studier med de transgene produktene. Det er vist at Cry1Ac-proteinet binder seg til musetarmoverflaten og induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og mot proteiner gitt samtidig (Vazquez-Padron *et al.* 2000a, Vazquez *et al.* 1999, Moreno-Fierros *et al.* 2003, Rojas-Hernández *et al.* 2004). Immunologisk kartlegging av systemisk og mucosal immunreaksjon på Cry1Ac har videre påvist at mus lager både systemisk IgM, IgG og sekretorisk IgA etter intraperitoneal og intragastrisk immunisering (Vazquez-Padron *et al.* 2000b). Det er ukjent om Cry1Ac-proteinet som er benyttet i disse studiene, tilsvarer Cry1Ab og Cry3Bb1 toksinet som den transgene maislinjen lager. Det er vist at domene II fra Cry3Bb1 og Cry1Ac genererer ulik immunologisk respons i kanin (Vazquez-Padron *et al.* 1998). I en annen studie er det vist at Cry1Ac hadde utpreget mucosal adjuvanseffekt ved å potensere IgM-, IgG- og IgA-responsen mot hepatittvirusantigen og bovint serumalbumin som ble gitt med sondeføring samtidig med Cry1Ac (Vazquez *et al.* 1999). Produksjonen av IgE-antistoff, som er knyttet til allergisk reaksjon, ble ikke målt. Også i tidligere studier (Prasad & Shetna 1975) er det påvist adjuvanseffekt av krystallprotein fra *Bacillus thuringiensis*. Adjuvanseffekten av Cry1Ac er bekreftet i to senere publikasjoner med henholdsvis pneumokokk-antigen (Moreno-Fierros *et al.* 2003) og amøbe-lysate (Rojas-Hernández *et al.* 2004). Adjuvanseffekten av Cry1Ac ble funnet å være like sterk som adjuvanseffekten av koleratoksin (Vazquez-Padron *et al.* 1999), som er et mye brukt slimhinneadjuvant i eksperimentelle studier av vaksinasjon og av allergi, og som regnes for å være det sterkeste slimhinneadjuvant vi kjenner.

Det er mulig at Cry1Ab og Cry3Bb1 som benyttes i MON 88017 x MON 810, kan ha tilsvarende effekter som vist for det beslektede Cry1Ac-proteinet, som induserer immunologiske reaksjoner mot seg selv og økt reaksjon mot proteiner gitt samtidig. Dersom Cry1Ab og Cry3Bb1 har tilsvarende adjuvanseffekt som det beslektede Cry1Ac-proteinet er rapportert å ha, vil dette teoretisk kunne føre til økt utvikling av allergi mot matvarer spist sammen med maisen, foruten mot maisen selv. Matallergi mot mais er lite vanlig i Norge, men er et problem i noen områder, bl.a. Nord-Italia. Man ville vente at adjuvanseffekten kom til syne først og fremst som økt forekomst av allergi mot de matvarene der matallergi fra før er vanligst. IgE ble ikke målt i de refererte studiene av adjuvanseffekt av Cry1Ac-proteinet.

Delkonklusjon:

Faggruppen finner det ut fra tilgjengelige data vanskelig å vurdere om korn fra MON 88017 er mer allergifremkallende enn umodifiserte maiskorn. På bakgrunn av foreliggende eksperimentelle studier i mus, finner Faggruppen imidlertid at muligheten for økt allergifremkallende aktivitet hos MON 88017x MON 810 med den informasjon vi har tilgang til, ikke med rimelig sikkerhet kan utelukkes. Da mengde Cry3Bb1 i maiskorn kan være opp til

19 µg/g fersk vekt, mener Faggruppen at det må kreves av Monsanto å kommentere forsøkene som viser adjuvanseffekt av Cry1A.

KONKLUSJON

Det er funnet statistiske forskjeller i enkeltparametere, men verdiene for de enkelte analyserte komponentene ligger innenfor typiske verdier for andre maissorter som er rapportert i litteraturen. Faggruppen anser at disse forskjellene ikke har noen helsemessig betydning, og Faggruppen konkluderer med at det ikke er grunn til å anta at den ernæringsmessige kvaliteten til den genmodifiserte maisen MON 88017 er forskjellig fra umodifisert mais.

Flere studier viser at proteinene CP4 EPSPS og Cry3Bb1 ikke er akutt toksiske. Monsanto har utført sub-kroniske studier på rotter med MON 88017. Det er ikke funnet testrelaterte endringer hos rottene. Faggruppen konkluderer med at det er lite sannsynlig at eksponering for CP4 EPSPS- proteinet i seg selv og i de mengder som tilføres via genmodifisert mais, er helsemessig betenkelig.

Faggruppen mener at det må kreves av Monsanto å kommentere de forsøk som er gjort der det er påvist adjuvanseffekter av Cry1Ac og om slike effekter kan oppstå ved inntak av maisprodukter som inneholder aktivt Cry3Bb1-protein.

VURDERT AV

Faggruppe for genmodifiserte organismer:

Knut G. Berdal (leder), Jihong Liu Clarke, Sonja Klemsdal, Helge Klungland, Casper Linnestad, Anne Ingeborg Myhr, Audun Nerland, Ingolf Nes, Kåre M. Nielsen, Hilde-Gunn Opsahl Sorteberg, Odd E. Stabbetorp, Vibeke Thrane.

Koordinator fra sekretariatet: Arne Mikalsen

REFERANSER

- EFSA 99, 2004. "Guidance document for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed".
- EHC, 1999. Environmental Health Criteria 217. *Bacillus thuringiensis*. WHO, Geneve 1999
- EPA, 2003. Event MON863 *Bt* Cry3Bb1 Corn Biopesticide Registration Action Document.
- Guerrero GG, Russell WM, Moreno-Fierros L, 2007. Analysis of the cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin. *Mol Immun* 44, 1209–1217.
- Moreno-Fierros L, Ruiz-Medina EJ, Esquivel R, López-Revilla R, Piña-Cruz S. 2003. Intranasal Cry1Ac protoxin is an effective mucosal and systemic carrier and adjuvant of *Streptococcus pneumoniae* polysaccharides in mice. *Scand J Immunol.*, 57: 45-55.
- OECD, 2002. Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, No. 6, Series on Safety of Novel Foods and Feeds.
- Prasad S.S.S.V. & Shethna, Y.I., 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 62: 517-521.
- Rojas-Hernández S, Rodríguez-Monroy MA, López-Revilla R, Reséndiz-Albor AA, Moreno-Fierros L., 2004. Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis. *Infect Immun.*, 72:4368-4375.
- Vazquez-Padron RI, Martinez-Gil AF, Ayra-Pardo C, Gonzalez-Cabrera J, Prieto-Samsonov DL, de la Riva GA, 1998. Biochemical characterization of the third domain from *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins. *Biochem Mol Biol Int.*, 45(5):1011-20.
- Vazquez RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, De La Riva GA, Lopez-Revilla R, 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand J Immunol.*, 49: 578-84.
- Vazquez-Padron RI, Gonzales-Cabrera J, Garcia-Tovar C, Neri-Bazan L, Lopez-Revilla R, Hernandez M, Moreno-Fierro L, de la Riva GA, 2000a. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun.*, 271:54-8.
- Vazquez-Padron RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazan L, Martinez-Gil AF, de-la-Riva GA, Lopez-Revilla R, 2000b. Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz J Med Biol Res.*, 33:147-55.