

カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ (改変 *cry5IAa2*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88702, OECD UI : MON-88702-4) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書.....	1
生物多様性影響評価書.....	1
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	1
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	1
(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
① 和名、英名及び学名.....	1
② 宿主の品種名又は系統名.....	1
③ 国内及び国外の自然環境における自生地帯.....	1
(2) 使用等の歴史及び現状.....	2
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	2
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	2
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	3
イ 基本的特性.....	3
ロ 生息又は生育可能な環境の条件.....	3
ハ 捕食性又は寄生性.....	4
ニ 繁殖又は増殖の様式.....	4
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	4
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.....	4
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じる特性を有する場合はその程度.....	4
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	5
ホ 病原性.....	5
ヘ 有害物質の産生性.....	5
ト その他の情報.....	6
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	6
(1) 供与核酸に関する情報.....	6
イ 構成及び構成要素の由来.....	6
ロ 構成要素の機能.....	8
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	8
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産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	12
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	22
(2) ベクターに関する情報	22
イ 名称及び由来	22
ロ 特性	22
① ベクターの塩基数及び塩基配列	22
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	22
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	23
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	23
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	23
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	23
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	23
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	23
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の菌体の残存の有無	23
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	24
(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	26
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	26
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	28
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	32
④ (6) の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	32
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	34
(5) 遺伝子組換え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	34
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	34
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又は生態学的特性の具体的な内容	34
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作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	34
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	35
(1) 使用等の内容	35
(2) 使用等の方法	35
(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	37
(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	37
(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と類似の環境での使用等の結果	37
(6) 国外における使用等に関する情報	37
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	39
1 競合における優位性	39
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	39
(2) 影響の具体的内容の評価	39
(3) 影響の生じやすさの評価	40
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	40
2 有害物質の産生性	40
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	40
(2) 影響の具体的内容の評価	51
(3) 影響の生じやすさの評価	51
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	52
3 交雑性	52
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	52
(2) 影響の具体的内容の評価	52
(3) 影響の生じやすさの評価	52
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	52
4 その他の性質	52
第三 生物多様性影響の総合的評価	53
参考文献	56

緊急措置計画書.....	65
隔離ほ場試験計画書.....	67
別添資料リスト.....	81

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

平成 28 年 6 月 9 日

5 農林水産大臣 森山 裕 殿
環境大臣 大塚 珠代 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号

15 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	カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ (改変 <i>cry51Aa2</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.) (MON88702, OECD UI : MON-88702-4)
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	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地 名 称：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 33 年 5 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <ol style="list-style-type: none"> (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、本遺伝子組換えワタ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、当該ワタ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) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。 <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 本遺伝子組換えワタ及び比較対照のワタ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えワタを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ワタ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、本遺伝子組換えワタの栽培終了後は、当該ワタ及び比較対照のワタ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、意図せずに本遺伝子組換えワタ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)までに掲げる事項について第一種使用等

	<p>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>
--	---

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5

1 宿主又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

10

① 和名、英名及び学名

和名：ワタ

英名：cotton 又は upland cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は DP393 である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

ワタはアオイ科 *Gossypium* 属に属する。*Gossypium* 属の野生種は熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯に分布しており、Fryxell は野生の 2 倍体種をその地理的分布から、オーストラリア群 (11 種)、アフリカ・アラビア群 (8 種) 及びアメリカ群 (12 種) の 3 群にさらに分けている (Fryxell, 1984)。また、野生 2 倍体に加え、新大陸に自生する野生 4 倍体種には、*G. tomentosum* (ハワイ)、*G. mustelinium* (ブラジル北西部)、*G. darwinii* (ガラパゴス)、*G. lanceolatum* (メキシコ)、*G. barbadense* (アンチル列島、中南米) 及び *G. hirsutum* (中米) がある (Fryxell, 1984; Lee, 1984)。*G. hirsutum* の自生個体が群生していることは稀で、多くの場合海岸沿い、ないしは小島に分散して生育している (Lee, 1984)。

30

なお、わが国において *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属の植物の自然分布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

5 *Gossypium* 属のうち栽培種は 4 種に分けられ、旧大陸の「アジア綿」と総
称される 2 倍体種 ($2n=26$) の *G. herbaceum* と *G. arboreum*、及び新大陸の複 2
倍体種 ($2n=52$) で「陸地綿、アメリカ綿、メキシコ綿」として知られる *G.*
hirsutum、「ピマ綿、超長繊維 (ELS) 綿、海島綿、エジプト綿、クレオール
綿、インド綿」として知られる *G. barbadense* があり、個々に栽培品種化さ
10 れてきた (原田, 1981; Lee, 1984; Brubaker et al., 1999; OGTR, 2008)。

日本で古くから栽培されているワタはアジア綿の *G. arboreum* である。ワ
タの日本への伝来は、799 年にインド人によってもたらされたのが最初であ
るとされているが、このワタはすぐに消滅したようである。その後、文禄年
15 間 (1592~1595) にワタの種子が九州に再び伝えられ、ワタ作は関東以南に広
がり、明治 15~20 年頃には 10 万 ha、2 万 4 千トンの生産をみるにいたった
が、その後、外綿の輸入に押されて次第に衰微した (原田, 1981)。現在では、
ワタの日本国内における商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用な
どの目的で栽培されているのみである。

20

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

G. herbaceum はアフリカ及びアジアの乾燥地帯で、また、同じく 2 倍体種
の *G. arboreum* は主にインドで栽培されている。

25 *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* は、主要な栽培ワタ種であり、世界的なワ
タの主要栽培地域で栽培されている (Lee, 1984; Jenkins, 2003)。

米国農務省の統計情報に基づくと、2013/14 年の全世界におけるワタの栽
培面積は 3,279 万 ha であり、上位国を挙げるとインドが 1,170 万 ha、中国が
30 480 万 ha、米国が 305 万 ha、パキスタンが 290 万 ha となっている (USDA-
FAS, 2010)。

2015 年のわが国における綿実の輸入量は 10 万 3,247 トンであり、そのう
ち約 41.8%がオーストラリア、約 30.5%が米国、約 25.1%がブラジルから輸
35 入されている (財務省, 2016)。

摘採した実綿には種子がついており、これを繰綿機にかけて分離した綿毛 (lint) を綿花あるいは原綿と呼んでいる。綿花は綿糸・綿織物などの製綿用、あるいは綿火薬や充填用などに用いられる。実綿から綿毛を分離した残りが種子 (綿実) で、その表面につく平均 3~5mm の短い繊維 (短毛又は地毛) を脱
5 リンター機でかき取ったものをリンターと呼ぶ。リンターは搾油工場で副産物として生産され、人造繊維や綿火薬の原料とされ、やや長いものは太糸の原料ともされる。リンターをとった種子 (綿実) は 17~23%の油分を含み、これを圧搾するか溶媒で抽出するかして種子油 (綿実油) が得られる。種子 (綿
10 実) 1t から約 130kg の種子油 (綿実油) が得られ、食用油のほかマーガリンや石鹼の原料などとして用いられる。搾油後の種子粕 (綿実粕) は精製して主に飼料や肥料として用いられる (原田, 1981)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

15 イ 基本的特性

ワタは種子繁殖する多年生のアオイ科作物で、草丈は 1.0~2.0m に伸び、発育枝と結果枝を生ずる (OECD, 2008)。葉は主茎あるいは枝の軸にらせん状に交互につき、各結果枝は 6~8 個の花芽を付ける (OECD, 2008)。
20

なお、栽培条件下では一年生農作物として栽培され、草丈に関しては 1~1.5m 程度に抑制される (OECD, 2008)。

25 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの生育に最適な気温は 30~35°C である (OECD, 2008)。ワタは通常年降水量 1,000~1,500mm ぐらいのところで作られるが、灌漑ができれば、降雨は少ないほうがよい (原田, 1981)。着蕾期及び開花期に多雨、日照不足、干ばつなどが起こると落蕾や落さくが増加する (平野, 1987)。ワタの栽培は
30 主にオーストラリアやアルゼンチン北部などの北緯 37 度から南緯 32 度の間で行われているが、中央アジアや中国など北緯 43~45 度に至る地域でも栽培されている (OECD, 2008)。ワタは様々な土壌で栽培されているが、生育に最適なのは有機質が多くて水分保持力が高く、水はけの良い耕作地である (OECD, 2008)。
35

ハ 捕食性又は寄生性

—

5 ニ 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

10 ワタのさくは 3~5 室で構成されている (OECD, 2008)。ワタの完熟したさくはさく皮が裂けて開じょするが、種子は綿毛に覆われているために脱粒性は低い (Llewellyn and Fitt, 1996)。近年のワタ品種は、雑草種特有の特性 (長い種子休眠期間、埋土種子の長い寿命、伝播を促す種子散布機構) を失っている (OECD, 2008; OGTR, 2008; d'Eeckenbrugge and Lacape, 2014)。

15 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

20 ワタは塊茎や地下茎などによる栄養繁殖を行わず、種子繁殖する。自然条件下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があるという報告はこれまでのところない。

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じる特性を有する場合はその程度

25 ワタの受粉様式に関しては、基本的には自家受粉である (Niles and Feaster, 1984)。虫媒による他家受粉も可能であることが知られており、その際の家受粉率は 5~30%であったと報告されている (Kerkhoven and Mutsaers, 2003)。なお、わが国においてワタと交雑可能な近縁野生種は知られていない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

5 *Gossypium* 属の花粉の生産量は 1 花当たりおよそ 4 万 5,000 粒である (McGregor, 1976)。花粉は直径 101 μm 、刺状突起の長さは 12.1 μm 、刺状突起の密度は 1 μm^2 当たり 8.3×10^3 本である (Kakani et al., 1999)。ワタは、基本的には自家受粉であるが、虫媒による他家受粉も可能であることが知られている。ワタの花粉媒介者としては特にハチが知られており、いずれもハチ目ミツバチ科に属するマルハナバチ (*Bombus* spp.)、セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*)、単独性で土中に営巣するハチ (*Melissodes* spp.) が最も高い頻度で報告されている (McGregor, 1976)。ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから風により飛散する可能性は少ない (OECD, 2008)。*G. hirsutum* の花粉に蛍光粒子を付着させて周辺の花への花粉の飛散を追跡した結果、ハチの巣箱を回りに配置したワタ畑から約 45~60m 離れた花畑で約 1.6%の花からワタの花粉が検出された (McGregor, 1976)。さらに、ワタ畑から 1m 離れた場合の交雑率は 0.4%以下であり、16m 離れると 0.03%以下まで減少していた (Llewellyn and Fitt, 1996)。ワタの花粉の生存率は、オーストラリアでの試験において 32 時間で 95%から 10%に低下したことが報告されている (Richards et al., 2005)。

20 ホ 病原性

—

25 へ 有害物質の産生性

ワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、種子を含む全植物組織の分泌腺に存在する (OGTR, 2008)。ゴシポールは哺乳動物の腹腔内臓器や肺に炎症を起し、実験動物においては呼吸困難、麻痺を起こす毒性物質として知られているが (生化学辞典, 1990)、搾油過程の加熱により無毒化される (Harris, 1981; NCPA, 1993)。

35 また、ワタにはジヒドロステルクリン酸、ステルクリン酸、マルバリン酸などのシクロプロペン脂肪酸 (CPFA) が含まれており、種子の総脂質中のおよそ 0.5~1.0%を占める (OECD, 2008)。本物質は鶏において卵黄の変色及びふ化率の低下などの有害な影響を及ぼすとされているが、搾油工程の脱臭過程において著しく減少する (OECD, 2008; OECD, 2009)。

ト その他の情報

5 これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、自然条件下で世代交代を繰り返し、自生化したという報告はされていない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

10

モンサント・カンパニーは、*Bacillus thuringiensis* 由来の改変 Cry51Aa2 蛋白質を産生するカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ (改変 *cry51Aa2*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88702, OECD UI: MON-88702-4) (以下、「本組換えワタ」という。) を作出した。

15

本組換えワタは、改変 Cry51Aa2 蛋白質を発現することで、標的カメムシ目及びアザミウマ目害虫に対する抵抗性を付与されている。このカメムシ目及びアザミウマ目害虫抵抗性の形質が付与されることにより、本組換えワタは、害虫による被害が深刻な地域において、効果的な害虫防除方法を農家に提供することが期待されている。

20

なお、第一の 2-(1)-ロ-② (p12~35) に記載されているとおり、改変 Cry51Aa2 蛋白質はコウチュウ目昆虫に対しても殺虫活性を示すが、商業栽培を予定している米国においては通常、コウチュウ目昆虫種は、経済的損失を与えるほどワタを食害しない。このため、本組換えワタを米国で商業栽培する際は、カメムシ目及びアザミウマ目害虫に対する抵抗性のみが商品コン

25

セプトとなる。

(1) 供与核酸に関する情報

30

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えワタの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、図 1 (p8) 及び表 1 (p9~11) に示した。

35

本組換えワタに導入された *cry51Aa2* 遺伝子から発現する Cry51Aa2 蛋白質は、野生型 Cry51Aa2 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、9 ヶ所の改変があ

る。このうち、8カ所¹がアミノ酸置換、1カ所(196-198番)が3アミノ酸の欠失であり、いずれも殺虫活性を増強する目的で改変されたものである。したがって、本組換えワタに導入された *cry51Aa2* 遺伝子を「改変 *cry51Aa2* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 Cry51Aa2 蛋白質²」とする。なお、本組換えワタにおいて発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質の推定アミノ酸配列と、野生型 Cry51Aa2 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は約 96%であり、本組換えワタにおいて発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質の推定アミノ酸配列は、別添資料 1 に示した。

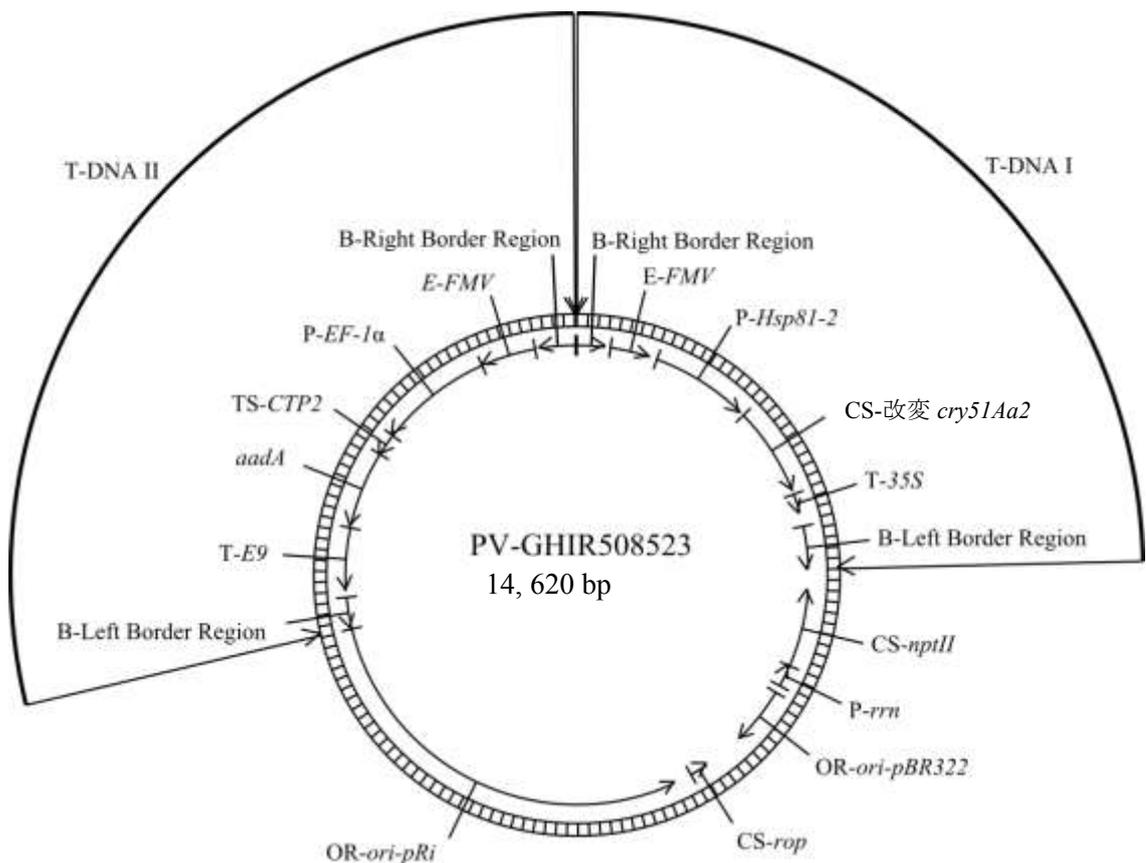
¹ N末端から46番目のアミノ酸がフェニルアラニンからセリンへ、N末端から54番目のアミノ酸がチロシンからヒスチジンへ、N末端から95番目のアミノ酸がセリンからアラニンへ、N末端から147番目のアミノ酸がフェニルアラニンからセリンへ、N末端から149番目のアミノ酸がグルタミンからグルタミン酸へ、N末端から167番目のアミノ酸がセリンからアルギニンへ、N末端から219番目(欠失後は216番目)のアミノ酸がプロリンからアルギニンへ、N末端から273番目(欠失後は270番目)のアミノ酸がアルギニンからトリプトファンへ置換されている。

² 文献では *Cry51Aa2.834_16* 遺伝子及び蛋白質と名づけられており、別添資料では *Cry51Aa2.834_16* 遺伝子及び蛋白質又は *mCry51Aa2* 遺伝子及び蛋白質と記載されている。

ロ 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

本組換えワタの作出に用いられた供与核酸の機能は、表 1 (p9~11) に示した。



10

図 1 本組換えワタの作出に用いられた PV-GHIR508523 のプラスミドマップ³

本組換えワタの育成過程で、上図の T-DNA I 領域は持つが、T-DNA II 領域は持たない個体を選抜した。

15

³本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHIR508523 の各構成要素の由来及び機能⁴

構成要素	由来及び機能
T-DNA I 領域	
B ^{注1} -Right Border Region	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の 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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
E ^{注2} - <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注3} - <i>Hsp81-2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来の、熱ショック蛋白質 (HSP81-2 蛋白質) のプロモーター及び 5' 末端非翻訳リーダー配列 Yabe et al. (1994)。常温で植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ^{注4} -改変 <i>cry51Aa2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の改変 <i>Cry51Aa2</i> 蛋白質をコードする配列 (Baum et al., 2012; Anderson et al., 2015) で、カメムシ目及びアザミウマ目昆虫に対する抵抗性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注5} -35S	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S RNA の 3' 末端非翻訳領域 (Mogen et al., 1990)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来の 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 (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えワタには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II (NPTII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)。
P- <i>rrn</i>	<i>A. tumefaciens</i> のリボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta et al., 2002)。細菌細胞内での恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注6} - <i>ori-pBR322</i>	pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHIR508523 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
CS-rop	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (rop)) のコード配列であり、 <i>E. coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori-pRi	プラスミド pRi に由来する複製開始領域 (Ye et al., 2011)。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-DNA II 領域 (本組換えワタには存在しない)	
B-Left Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来の 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 (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-E9	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
aadA	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
TS ^{注7} -CTP2	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P-EF-1 α	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-1 alpha</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンで目的遺伝子の植物体内での恒常発現に関与する (Axelos et al., 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
E-FMV	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

表1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHIR508523 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
B-Right Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来の 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 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (本組換えワタには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹ B - Border (境界配列)

注² E - Enhancer (エンハンサー)

注³ P - Promoter (プロモーター)

注⁴ CS - Coding Sequence (コード配列)

注⁵ T - Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注⁶ OR - Origin of Replication (複製開始領域)

注⁷ TS - Targeting Sequence (ターゲティング配列)

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産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

5

本組換えワタには、*B. thuringiensis* 由来の改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現により、カメムシ目及びアザミウマ目昆虫に対する抵抗性が付与されている。

改変 Cry51Aa2 蛋白質の作用機作

10

改変 Cry51Aa2 蛋白質は、本組換えワタ中でプロトキシン (毒前駆体) として産生され、一般的な Cry 蛋白質と同様に、感受性のある昆虫種による摂食を通じて、消化管内で結晶封入体が可溶化し、且つ蛋白質分解酵素により部分的に分解されることにより活性を持つコア蛋白質へと変換される。活性化されたコア蛋白質は、昆虫の中腸上皮上の特異的受容体に結合し、中腸上皮細胞膜に小孔を形成し、その結果として昆虫の消化プロセスを阻害し、殺虫活性を示す (Schnepf et al., 1998; OECD, 2007; Soberón et al., 2009; Vachon et al., 2012; Jerga et al., 2016)。

15

なお、哺乳動物の消化器内では、蛋白質分解酵素や酸性の消化液によってコア蛋白質を含めて消化されること、また、消化器官には特異的受容体は存在しないことから、Cry 蛋白質が哺乳類に対して影響を及ぼすとは考えにくく、また、これまで鳥類、両生類及び爬虫類に対しても悪影響を及ぼしたことはない (Schnepf et al., 1998; OECD, 2007)。

20

25 改変 Cry51Aa2 蛋白質の殺虫スペクトラム

改変 Cry51Aa2 蛋白質のアミノ酸配列と約 96%の相同性を示す野生型 Cry51Aa2 蛋白質 (別名 TIC807) は、カメムシ目カスミカメムシ科に属するウエスタンターニッシュドプラントバグ (*Lygus hesperus*)、及びコウチュウ目に属するコロラドポテトビートル (*Leptinotarsa decemlineata*) に対して殺虫活性を示すことが報告されている (Baum et al., 2012)。また、野生型 Cry51Aa2 蛋白質のアミノ酸配列と約 97%の相同性を示す野生型 Cry51Aa1 蛋白質は、コウチュウ目に属するコロラドポテトビートル (*L. decemlineata*) に対して殺虫活性を示すことが報告されている (Xu et al., 2015)。

30

35

上述した野生型蛋白質の文献情報と、以下に示した本組換えワタの標的昆虫及び非標的生物に対する改変 Cry51Aa2 蛋白質の生物検定の結果に基づき、改変 Cry51Aa2 蛋白質の殺虫スペクトラムを考察した。

5 1. 標的昆虫に対する活性

標的昆虫とは、改変 Cry51Aa2 蛋白質に対する感受性を有する可能性があるもの、ワタ栽培の主要害虫であるものの2つを満たしているものを指す。上述のとおり、改変 Cry51Aa2 蛋白質と96%の相同性を有する野生型の Cry51Aa2 蛋白質は、米国でのワタの主要吸汁害虫であるカメムシ目カスミカメムシ科に属するウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*) に対して殺虫活性を示すことが報告されている (Baum et al., 2012)。このことから、本組換えワタ中で発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質も、カメムシ目の昆虫に対して殺虫活性を示すと予想された。そこで、ウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*) に、同じカメムシ目カスミカメムシ科で米国でのワタの主要吸汁害虫であるコットンフリーホッパー (*Pseudatomoscelis seriatus*) と、米国でのワタの主要吸汁害虫であるアザミウマ目昆虫を加えた合計3種の標的昆虫について改変 Cry51Aa2 蛋白質の殺虫活性を調査した (別添資料2)。アザミウマ目は、2亜目8科で構成され、約6,000種の昆虫種が知られている (Mound et al., 2009)。アザミウマ亜目は7科に分かれ2,000種以上、クダアザミウマ亜目は1科で3,000種以上を含む。亜目は、腹部末端節の形状で分類され、短く尖った形状はアザミウマ亜目、長く管状のものはクダアザミウマ亜目に分類されている。8科中アザミウマ科は最大の科で、約1,700種含まれており、*Scirtothrips* 属、*Thrips* 属、及び *Frankliniella* 属等を含む (Mound and Teulon, 1995; Mound et al., 2009)。米国において、ワタの幼植物に一般的に発生するアザミウマ目昆虫として5種 (タバコスリップス (*Frankliniella fusca*)、フラワースリップス (*F. tritici*)、ウエスタンフラワースリップス (*F. occidentalis*)、オニオンリップス (*Thrips tabaci*) 及びソイビーンズリップス (*Neohydatothrips variabilis*)) が知られている (Leigh et al., 1996; Albeldaño et al., 2008; Cook et al., 2011; Stewart et al., 2013)。この5種のアザミウマ目昆虫は、全てアザミウマ科に属する。なお、ウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*) については、混餌投与による生物検定を行った。コットンフリーホッパー (*P. seriatus*) 及びアザミウマ目昆虫については生物検定の手法が確立していないため、これらの種への殺虫活性は、ほ場で調査することで確認した。コットンフリーホッパー (*P. seriatus*) の調査では、本組換え

ワタ栽培区と対照の非組換えワタ栽培区の個体をそれぞれ防虫網で覆い、その中へ雄雌 2 匹ずつのコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) を放し、自由に交尾する状態で 30 日間飼育した後の次世代の生存個体数を成育ステージごと (3 齢以下幼虫、4 齢と 5 齢幼虫、成虫) に確認した。アザミウマ目昆虫については、3 ヲ所のほ場において、本組換えワタと対照の非組換えワタを栽培し、アザミウマ目昆虫による食害程度⁵を調査した。なお、上記の試験とは別試験だが、アザミウマ目昆虫の種を特定する試験を、同一ほ場の隣接するプロットで実施した。米国の 3 ヲ所のほ場において、アザミウマ昆虫による食害程度の調査日 (2 回 : 1~2 葉期及び 3~4 葉期) と同日にアザミウマ昆虫を採取し、調査日ごとにアザミウマ目昆虫の成虫を顕微鏡を用いて、種レベルで同定した。

その結果、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、ウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*) に対して殺虫活性を示すことが明らかとなり、その LC₅₀ (半数致死濃度) は 3.009 µg/mL diet であった (表 2, p20)。また、本組換えワタ栽培区におけるコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) の平均生存個体数は 10.5 (3 齢以下幼虫が 4.5、4 齢と 5 齢幼虫が 2.5、成虫が 3.5) であり、対照の非組換えワタ栽培区におけるコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) の平均生存個体数である 20.86 (3 齢以下幼虫が 6.43、4 齢と 5 齢幼虫が 1.43、成虫が 13) の半数程度であった (別添資料 2 の 10.4, p41)。さらに、非組換えワタ栽培区におけるコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) の成虫は、本組換えワタ栽培区におけるコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) の約 4 倍の数が確認され、本組換えワタ栽培区ではコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) の大部分の幼虫が成虫になれなかったことを示している。このことから、本組換えワタはコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) に対する抵抗性を有することが確認された (表 2, p20)。また、3 ヲ所のほ場におけるアザミウマ目昆虫による平均食害程度において、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められた (表 3, p21)。本組換えワタの平均食害程度はそれぞれ 1.3、0.9 及び 0.3 であり、対照の非組換えワタではそれぞれ 4、3 及び 2.7 であり、本組換えワタの方が低かった (表 3, p21)。なお、この試験が実施された 3 ヲ所のほ場をアザミウマ目昆虫による対照の非組換えワタに対する食害程度から 3 段階にカテゴリー分け (低度 (0~2)、中度 (2~4)、高度 (4~5)) をしたところ、1 ヲ所が高度、2 ヲ所が中度の食害程度のほ場であった。以上のことから、ア

⁵ 食害程度は 0~5 の 6 段階で評価された。0 は食害痕もスリップスも認められない状態を示し、数字が大きくなるほど、食害程度が高くなる。5 は枯死又は強い成育阻害が認められたことを示す。

ザミウマ目昆虫による食害程度の段階にかかわらず、一貫して本組換えワタは非組換えワタと比較して、アザミウマ目昆虫による平均食害程度が低かった。このことから、本組換えワタはアザミウマ目昆虫に対する抵抗性を有することが確認された。なお、アザミウマ目昆虫の種を特定する試験の結果、タバコスリップス (*F. fusca*)、フラワースリップス (*F. tritici*)、ウエスタンフラワースリップス (*F. occidentalis*) 及びソイビーンスリップス (*N. variabilis*) の 4 種が同定された。この 4 種のうち、3 種 (タバコスリップス (*F. fusca*)、フラワースリップス (*F. tritici*)、ウエスタンフラワースリップス (*F. occidentalis*)) が全体の 97%以上を占めていた。ソイビーンスリップス (*N. variabilis*) 及び未同定のアザミウマ昆虫は少数しか確認されなかった。両試験は同一ほ場の隣接するプロットで調査を実施しているため、両試験間でアザミウマ目昆虫種の構成が異なる可能性は極めて低いと考えられた。したがって、改変 Cry51Aa2 蛋白質を発現する本組換えワタへの感受性を調査する試験において、食害していたアザミウマ昆虫は、主に *Frankliniella* 属と考えられた。

2. 非標的生物に対する活性

全ての非標的生物に対して改変 Cry51Aa2 蛋白質の生物検定を行うことは技術的に不可能であることから、本組換えワタを直接的又は間接的に摂食する可能性のある非標的生物種を、栽培作物周辺に生息する生物の機能群⁶ (植食者、天敵 (捕食者、寄生者)、花粉媒介者、分解者; 図 2, p19) に基づいて、以下のように 14 種選定し、混餌投与による生物検定を行った (別添資料 2)。

なお、栽培作物周辺に生息する生物の機能群から指標生物を選定して、それらの指標生物への影響から殺虫スペクトラムを推定する手法は、殺虫剤を散布した際の環境影響評価にも用いられている (EPA, 1998; Romeis et al., 2013; Wach et al., 2016)。また、過去に第一種使用の承認がなされている害虫抵抗性の遺伝子組換え作物の非標的生物に対する活性もこの手法を用いて調査されてきた。

さらに、各機能群からの指標生物の選定に際しては、ワタ周辺に生息する生物の機能群のそれぞれにおいて主要な種であること、生物検定の手法が確立していること (Romeis et al., 2013; Wach et al., 2016)、文献情報によ

⁶栽培作物周辺の生態系において、非標的生物種、特に非標的節足動物は、植食者、天敵、花粉媒介者、分解者等の機能を有するため、害虫抵抗性作物の生物多様性影響評価を行う際にこれらの非標的生物種が影響を受けるか調査される (Romeis et al., 2013)。

り殺虫活性を示すことが確認されているカメムシ目及びコウチュウ目昆虫種であることを考慮した。

5 栽培作物周辺に生息する生物の機能群から選定した 6 つの目 (コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目、ハチ目、トビムシ目、ナガミミズ目) に分類される合計 14 種の指標生物に対する生物検定の結果、以下に示すように改変 Cry51Aa2 蛋白質は、植食者であるコウチュウ目に属するコロラドポテトビートル (*L. decemlineata*) 及びサザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) に対して殺虫活性を示すことが確認された。また、天敵であるカメムシ目ハナカメムシ科に属するインシディアスフラワーバグ (*Orius insidiosus*) に対しても殺虫活性を示すことが確認された。

<植食者>

15 作物を直接食餌する植食者の指標生物種として、コウチュウ目に属するコロラドポテトビートル (*L. decemlineata*)、ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*)、サザンコーンルートワーム (*D. u. howardi*)、インゲンテントウ (*Epilachna varivestis*) の 4 種、チョウ目に属するフォールアーミーワーム (*Spodoptera frugiperda*)、コーンイヤールーム (*Helicoverpa zea*)、ヨーロッパアンコーンボーラー (*Ostrinia nubilalis*)、コナガ (*Plutella xylostella*) の 4 種を選定した。このうち、ワタを食害することが知られているのは、フォールアーミーワーム (*S. frugiperda*) とコーンイヤールーム (*H. zea*) である。

25 混餌投与による生物検定の結果、改変 Cry51Aa2 蛋白質はコウチュウ目に属するコロラドポテトビートル (*L. decemlineata*) 及びサザンコーンルートワーム (*D. u. howardi*) に対して殺虫活性を示すことが確認された。しかし、同じコウチュウ目に属するウエスタンコーンルートワーム (*D. v. virgifera*) 及びインゲンテントウ (*E. varivestis*) に対しては殺虫活性を示さなかった (表 2, p20)。また、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、チョウ目に属するフォールアーミーワーム (*S. frugiperda*)、コーンイヤールーム (*H. zea*)、ヨーロッパアンコーンボーラー (*O. nubilalis*)、コナガ (*P. xylostella*) に対しても殺虫活性を示さないことが確認された (表 2, p20)。

35 なお、上述したように、野生型 Cry51Aa2 蛋白質 (Baum et al., 2012) 及び野生型 Cry51Aa1 蛋白質 (Xu et al., 2015) は、コウチュウ目に属するコロラドポテトビートル (*L. decemlineata*) に対して殺虫活性を示すことが報告されている。

<天敵(捕食者、寄生者)>

植食者を捕食又は植食者に寄生する天敵の指標生物種として、カメムシ目のインシディアスフラワーバグ (*O. insidiosus*)、コウチュウ目のピンクスポッテッドレディビートル (*Coleomegilla maculate*)、ハチ目のユーロフィドワスプ (*Pediobius foveolatus*) の3種を選定した。

5

混餌投与による生物検定の結果、改変 Cry51Aa2 蛋白質はカメムシ目ハナカメムシ科に属するインシディアスフラワーバグ (*O. insidiosus*) に対して殺虫活性を示すことが確認された(表 2, p20)。この昆虫はワタの害虫ではないため標的昆虫ではないが、カメムシ目カスミカメムシ科に属する標的昆虫ウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*) 及びコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) の近縁種であるため、この結果は予想されたものであった。

10

一方、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、コウチュウ目のピンクスポッテッドレディビートル (*C. maculate*) 及びハチ目のユーロフィドワスプ (*P. foveolatus*) に対しては殺虫活性を示さないことが確認された(表 2, p20)。

15

<花粉媒介者>

作物の花粉を運んで受粉させる花粉媒介者の指標生物種として、ハチ目のセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を選定した。

20

混餌投与による生物検定の結果、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、セイヨウミツバチ (*A. mellifera*) に対して殺虫活性を示さないことが確認された(表 2, p20)。

<分解者>

25

有機物の分解及びそれを補助する分解者の指標生物種として、トビムシ目のオオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*) 及びナガミミズ目のアースワーム (*Eisenia andrei*) の2種を分解者の指標生物種として選定した。

混餌投与による生物検定の結果、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、オオフォルソムトビムシ (*F. candida*) の生存及び生殖、アースワーム (*E. andrei*) の生存に対して影響を及ぼさないことが確認された(表 2, p20)。

30

3. 改変 Cry51Aa2 蛋白質の殺虫スペクトラムのまとめ

5 上述したように、改変 Cry51Aa2 蛋白質の標的昆虫に対する生物検定と、
本組換えワタに暴露される可能性のある非標的生物種に対する生物検定の
結果から、改変 Cry51Aa2 蛋白質はカメムシ目、アザミウマ目及びコウチ
10 ュウ目の 3つの目に属する昆虫に対して殺虫活性を示すと考えられた。な
お、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、ハチ目の異なる 2つの科に属する 2種 (ヒ
メコバチ科のユーロフィドワスプ (*P. foveolatus*) 及びハチ目ミツバチ科の
セイヨウミツバチ (*A. mellifera*)) に対して殺虫活性を示さないことが確認
15 された。このため、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、主要な訪花昆虫が属するハ
チ目ミツバチ科に対して影響を及ぼすことはないと考えられた。

15 改変 Cry51Aa2 蛋白質や野生型 Cry51Aa2 蛋白質のように、複数の目に
またがって活性を示す Cry 蛋白質については既に報告がある。例えば、
Cry2Aa 蛋白質はチョウ目、ハエ目及びカメムシ目に対して殺虫活性を示
し (de Maagd et al., 2001; van Frankenhuyzen, 2009)、Cry3Aa 蛋白質はコウチ
20 ュウ目、カメムシ目及びハチ目に対して殺虫活性を示すことが知られてい
る (van Frankenhuyzen, 2009)。

20 しかしながら、複数の昆虫目にまたがって活性を示す Cry 蛋白質のほ
とんどは、1つ又はその近縁の目に対して低い濃度で高い殺虫活性を示す
が (主要殺虫活性範囲)、遠縁の昆虫目に対する殺虫活性は主要殺虫活性範
25 囲と比べて弱く、活性を示すのに高い濃度が必要である傾向にあることが
報告されている (van Frankenhuyzen, 2009)。改変 Cry51Aa2 蛋白質におい
ても同様の傾向が示されており、主要殺虫活性範囲である近縁のカメムシ目
昆虫 (LC₅₀ : 3.009 µg/mL diet) には高い活性を示すが、遠縁のコウチュウ
目昆虫 (LC₅₀ : 400 µg/mL diet 又は 200 µg/mL diet) に対しては弱い活性を示
すことが確認されている (表 2, p20)。

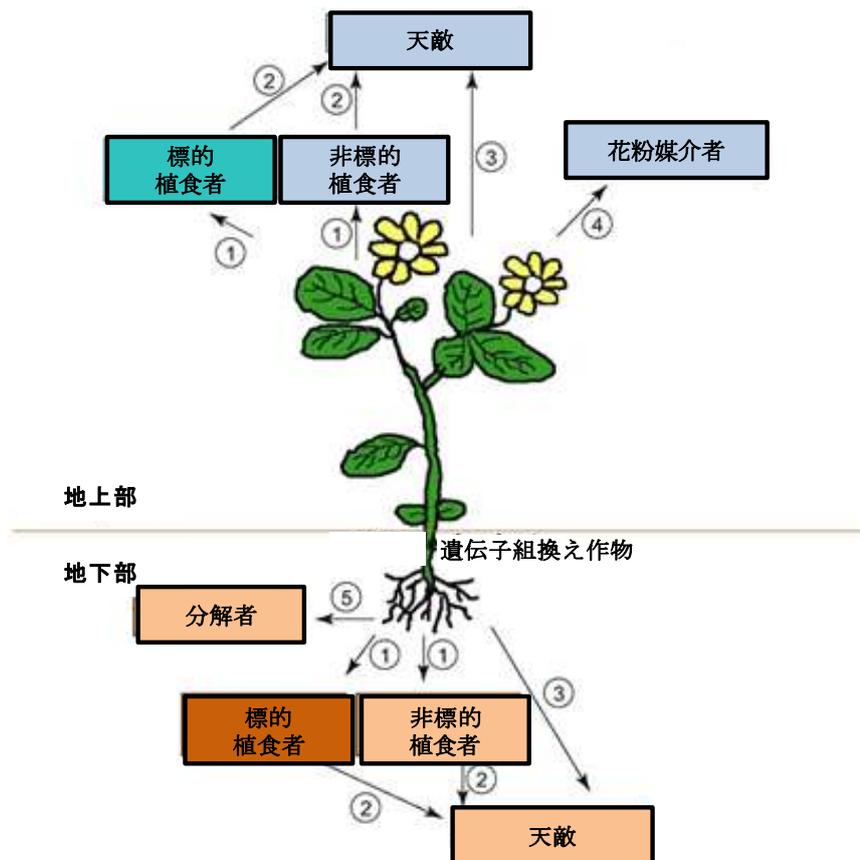


図2 栽培作物周辺に生息する生物の機能群とその暴露経路 (Kos et al., (2009)より改変)*

今回調査した昆虫種が属する機能群は下記のとおりである。

5

- ① 作物を直接食餌する植食者

ウェスタンターニッシュドプラントバグ (標的昆虫) コットンフリーホッパー (標的昆虫) アザミウマ目昆虫(標的昆虫) コロラドポテトビートル ウェスタンコーンルートワーム	サザンコーンルートワーム インゲンテントウ フォールアーミーワーム コーンイヤールーム ヨーロピアンコーンボーラー コナガ
---	--
- ② 植食者を捕食又は植食者に寄生する天敵
 - インディアスフラワーバグ
 - ピンクスポッテッドレディビートル
 - ユーロフィドワスプ
- ③ 蜜や花粉などの植物組織の摂食を介した影響(地上部)、又は植物体周辺の土壌との接触を介した影響を受ける天敵(地下部)
 - インディアスフラワーバグ
 - ピンクスポッテッドレディビートル
- ④ 作物の花粉を運んで受粉させる花粉媒介者
 - セイヨウミツバチ
- ⑤ 有機物の分解及びそれを補助する分解者
 - オオフォルソムトビムシ
 - アースワーム

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表2 複数種の無脊椎動物の改変 Cry51Aa2 蛋白質に対する感受性⁷

目	科	和名/英名 (学名)	機能群	LC ₅₀ の平均値又は 最大投与濃度 (µg/mL diet)	活性
カメムシ目 Hemiptera	カスミカメムシ科 Miridae	ウエスタンターニッシュドプラントバグ (<i>Lygus hesperus</i>)	標的害虫	3,009	有
カメムシ目 Hemiptera	カスミカメムシ科 Miridae	コットンフリーホッパー (<i>Pseudaatomoscelis seriatus</i>)	標的害虫	本組換えワタの 発現量	有
アザミウマ目 Thysanoptera	アザミウマ科 Thripidae	<i>Frankliniella</i> 属	標的害虫	本組換えワタの 発現量	有
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	コロラドポテトビートル (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	植食者	400	有 ¹
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	ウエスタンコーンルートワーム (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>)	植食者	1,000	無
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	サザンコーンルートワーム (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>)	植食者	200	有 ²
コウチュウ目 Coleoptera	テントウムシ科 Coccinellidae	インゲンテントウ (<i>Epilachna varivestis</i>)	植食者	400	無
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	フォールアーミーワーム (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	植食者	400	無
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	コーンイヤールーム (<i>Helicoverpa zea</i>)	植食者	400	無
チョウ目 Lepidoptera	ツトガ科 Crambidae	ヨーロッパコーンボラー (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	植食者	400	無
チョウ目 Lepidoptera	コナガ科 Plutellidae	コナガ (<i>Plutella xylostella</i>)	植食者	400	無
カメムシ目 Hemiptera	ハナカメムシ科 Anthocoridae	インシディアスフラワーバグ (<i>Orius insidiosus</i>)	捕食者	400	有 ³
コウチュウ目 Coleoptera	テントウムシ科 Coccinellidae	ピンクスポットドレディビートル (テ ントウムシの一種) (<i>Coleomegilla maculata</i>)	捕食者	400	無
ハチ目 Hymenoptera	ミツバチ科 Apidae	セイヨウミツバチ (<i>Apis mellifera</i>)	花粉媒介者	2,000	無

⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

ハチ目 Hymenoptera	ヒメコバチ科 Eulophidae	ユーロフィドワスプ (<i>Pediobius foveolatus</i>)	寄生者	400	無
トビムシ目 Collembola	ツチトビムシ科 Isotomidae	オオフォルソムトビムシ <i>Folsomia candida</i>)	分解者	400	無
ナガミミズ目 Haplotaxida	ツリミミズ科 Lumbricidae	アースワーム(ミミズの種類) (<i>Eisenia andrei</i>)	分解者	400	無

¹ 投与量 50 から最大投与濃度 400µg/mL diet における生存率は約 50%であった。また、生存個体の平均体重を基に推定した EC₅₀ (半数効果濃度) は 134.1 µg/mL diet であった。

² 最大投与濃度である 200µg/mL diet における生存率は 64%であった。また、生存個体の平均体重を基に推定した EC₅₀ は 7.82 µg/mL diet であった。

³ 最大投与濃度である 400µg/mL diet における生存率は 67%であった。

表 3 2014 年の試験における本組換えワタ及び対照の非組換えワタ (DP393) に対するアザミウマ目昆虫による平均食害程度⁸

アザミウマ目昆虫の発生量	ほ場の場所	平均値 ± SE		p-値
		本組換えワタ	非組換えワタ (DP393)	
高度	ミシシッピ州	1.3 ± 0.1*	4.0 ± 0.0	p < 0.0001
中度	テネシー州	0.9 ± 0.1*	3 ± 0.0	p < 0.0001
中度	バージニア州	0.3 ± 0.04*	2.7 ± 0.5	p < 0.0001

*有意差あり (p < 0.05)

ミシシッピ州及びテネシー州については、それぞれ 9 反復で 1 回測定を行い (n=9)、二元配置分散分析により統計処理を行った。

バージニア州については、4 反復で 3 回測定を行い (n=12)、混合線形モデルを用いた分散分析によって統計処理を行った。

⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

5 改変 Cry51Aa2 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否か、AD_2015⁹を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸によって比較したが、既知のアレルゲンと類似の配列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

10 —

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

15

本組換えワタの作出に用いられた PV-GHIR508523 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p9~11) に記載した。

20 ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

25 本組換えワタの作出に用いられた PV-GHIR508523 の全塩基数は 14,620bp である。なお、PV-GHIR508523 の塩基配列は別添資料 3 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

30 *E. coli* における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、ネオマイシンやカナマイシンに対する耐性を付与する *neo* 遺伝子、及びスペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA I 領域外に存在している。

⁹FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2015) から得られた配列をもとに作成したデータベースで、2015年1月の時点で、1,897件のアミノ酸配列が含まれる。

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

本ベクターの感染性は知られていない。

5

(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

10 宿主内に移入された PV-GHIR508523 の構成要素は表 1 (p9~11) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置に関しては、図 1 (p8) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

15

PV-GHIR508523 中の T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域をアグロバクテリウム法により、非組換えワタ品種 DP393 の種子から採取した分裂組織に導入した。

20 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

25 非組換えワタ品種 DP393 の種子から採取した分裂組織と PV-GHIR508523 を含む *Agrobacterium tumefaciens* AB33 株を共置培養した後、スペクチノマイシンを添加した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の菌体の残存の有無

30

カルベニシリン及びセフトキシムを添加した組織培養培地に形質転換した茎頂分裂組織を移植することにより、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。さらに、本組換えワタの R7 世代の種子において形質転換に用いた PV-GHIR508523 の外側骨格領域が残存していないことを

Taqman PCR¹⁰によって確認した(別添資料4のTable 1, p11)。このことから、本組換えワタには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

- 5 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

10 形質転換された再分化個体(R0)を自殖し、R1世代を作出した。R1世代において、End Point TaqMan PCRにより、T-DNA II領域を持たずT-DNA I領域をホモで有する個体を選抜した。選抜された個体の後代を導入遺伝子解析及び生態特性調査の対象とした。その結果、最終的に商品化系統として本組換えワタを選抜した。

15 本組換えワタの育成図を、図3(p25)に示した。なお、本申請の対象は、R4世代及びR4世代から派生する全ての交雑後代系統である。

¹⁰ 収穫種子からランダムに選んだ20粒の種子からゲノムDNAを抽出し、PCRを行った。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

図3 本組換えワタの育成図

20

25

【社外秘につき非開示】

30

(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

5

本組換えワタの T-DNA I 領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えワタの BC1F1、BC2F2 及び BC3F1 世代 (図 3, p25) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 5)。

10 試験に供試する BC1F1、BC2F2 及び BC3F1 世代を作出するために、まず形質転換された再分化個体 (R0) を自殖し、その後代である R1 世代において End Point TaqMan PCR により、T-DNA I 領域をホモで有する個体を選抜した。その後、3 回の自殖により、R4 世代を作出した。T-DNA I 領域をホモで有する本組換えワタの R4 世代を、改変 *cry51Aa2* 遺伝子を持たない反復親 (12R241) と交配し、T-DNA I 領域をヘテロで有する R4F1 世代を作出した。

15 さらに、R4F1 世代に反復親を戻し交配して BC1F1 世代を作出し、この世代において、End Point TaqMan PCR により T-DNA I 領域の有無を確認した。そして、T-DNA I 領域をヘテロで有する BC1F1 世代を反復親と戻し交配して BC2F1 世代を作出し、さらに T-DNA I 領域をヘテロで有する BC2F1 世代を反復親と戻し交配して BC3F1 世代を作出した。この BC3F1 世代においても、

20 End Point TaqMan PCR により T-DNA I 領域の有無を確認した。また、BC2F1 世代で T-DNA I 領域をヘテロで有する個体を自殖し、BC2F2 世代を作出した。この BC2F2 世代においても、End Point TaqMan PCR¹¹により T-DNA I 領域の有無を確認した。

その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せず遺伝していることが確認された (表 4, p27)。したがって、本組換えワタの T-DNA I 領域は染色体上に存在していると考えられた。

30

¹¹ 本組換えワタ (T-DNA I 領域) に特異的に結合可能なプライマーセット及び反復親に特異的に結合可能なプライマーセットを用いることにより、T-DNA I 領域をホモ又はヘテロで有するかを確認した。

表 4 本組換えワタの育成過程における T-DNA I 領域の分離様式¹²

世代 ¹	供試 個体数	実測値 陽性 個体数	実測値 陰性 個体数	1:1 の分離			
				期待値 陽性 個体数	期待値 陰性 個体数	χ^2	p 値 ²
BC1F1	267	138	129	133.50	133.50	0.30	0.582
BC3F1	176	86	90	88.00	88.00	0.09	0.763

世代 ¹	供試 個体数	実測値 陽性・ホモ 個体数	実測値 陽性・ヘテロ 個体数	実測値 陰性・ホモ 個体数	1:2:1 の分離			χ^2	p 値 ²
					期待値 陽性・ホモ 個体数	期待値 陽性・ヘテロ 個体数	期待値 陰性・ホモ 個体数		
BC2F2	155	38	75	42	38.75	77.50	38.75	0.37	0.832

¹ T-DNA I 領域の分離比は End Point TaqMan PCR により確認した。

5 ² BC1F1、BC3F1 及び BC2F2 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (p < 0.05)。

¹²本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

- 5 本組換えワタに導入された導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、T-DNA II 領域及び外側骨格配列の有無並びに導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性を調べるために、次世代シーケンス技術¹³及びバイオインフォマティクスによる導入遺伝子を含む接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)¹⁴ 並びに導入遺伝子領域の
10 PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 6)。以下に、本解析の手法及び本組換えワタを用いて行った解析の結果を述べる。

NGS では、フラグメント化したゲノム配列から約 125bp の塩基配列を次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) を用いて解析することで、植物ゲノムの塩基配列を解析することができる (図 4 の①, p30)。なお、導入遺伝子の全配列を検出するため、平均冗長度¹⁵ 75 以上¹⁶で解析を行った。次に、全ての DNA フラグメントの塩基配列を導入用プラスミドの全塩基配列と照合¹⁷する (図 4 の②, p30)。この結果において導入用プラスミドとの相同性がある DNA フラグメントを選び出し、この選び出された DNA フラグメントにおいて、
20 外側骨格領域と相同性がある配列の有無を確認する (図 4 の②, p30)。さらに、JSA において、DNA フラグメントの塩基配列の一部のみが連続して導入用プラスミドと一致するものを、導入遺伝子と宿主植物ゲノムとの接合配列 (ジャンクション配列) として選抜し、このジャンクション配列の重複性を比較解析することで、導入遺伝子と宿主植物ゲノムとの接合領域を特定する (図

¹³ 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。

¹⁴ 次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いることにより、従来のサザンブロット分析と同程度の分子生物学的評価を行うものである。NGS/JSAでは、まず、NGSにより本組換えワタのゲノムの全領域に相当する配列をフラグメントとして増幅し、これらのフラグメントにおいて得られた125 bpの配列情報を用い、JSAによってT-DNA領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA領域の導入箇所数及びコピー数を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

¹⁵ 冗長度: 特定の DNA (ゲノム DNA 又は遺伝子) に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。

¹⁶ 冗長度75以上のNGS/JSAによって遺伝子組換えサイズの導入遺伝子を十分に検出でき、参照として供試された0.1ゲノム等量のプラスミドについても、その配列の100%を正しく検出できたことが報告されている (Kovalic et al., 2012)。

¹⁷ FASTA型アルゴリズムにより、30bp以上の領域で96.6%以上の相同性が認められた配列を選抜した。

4の③, p30)。仮に1コピーの導入遺伝子がゲノムの1ヵ所に存在する場合には、2つの接合領域が特定される (Kovalic et al., 2012)。さらに接合領域の間に存在する導入遺伝子の塩基配列を PCR 及び塩基配列解析により調べること
5
で、導入遺伝子の実際の DNA 配列を確定することができる。

5

本組換えワタ及び対照の非組換えワタから抽出したゲノムを NGS/JSA に
供試した結果、本組換えワタの R4 世代で 255.3Gb (平均冗長度¹⁸82)、対照の
非組換えワタで 321.8Gb (平均冗長度 80) の塩基配列が得られた (別添資料 6
の Appendix Table 3, p35) ことから、本解析において十分な冗長度¹⁹が確保さ
10
れていることが確認された。本組換えワタでは 2 つの接合領域が特定され
(図 5, p31; 別添資料 6 の p22)、これらはそれぞれ T-DNA I 領域の 5'末端及び
3'末端を含む配列であった (別添資料 6 の Appendix Figure 4, p40~44)。対照の
非組換えワタでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 6, p22)。さらに、
本組換えワタから得られた全ての DNA フラグメントについて、PV-
15
GHIR508523 の全配列との相同性を調べた結果、T-DNA I 領域以外の配列と
の相同性は認められなかったことから、T-DNA II 領域及び外側骨格領域が含
まれていないことが示された (別添資料 6 の補足資料の Figure 1, p1)。

また、本組換えワタにおいて検出された接合領域及び T-DNA I 領域を含
む配列を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA I 領
20
域のみが導入されていることが確認された (別添資料 6 の Appendix Figure 5,
p45、Appendix Figure 6, p46~48 及び Appendix Figure 7, p49~52)。

以上をまとめると、NGS/JSA において検出された接合領域は、T-DNA I 領
域に起因する接合領域のみであり、PV-GHIR508523 の T-DNA II 領域及び外
側骨格領域との相同性を持つ接合領域は認められなかったことから、T-DNA
25
I 領域以外の T-DNA II 領域及び外側骨格領域は挿入されていないことが確認
された。また、PCR 及び塩基配列解析により、導入された T-DNA I 領域の塩
基配列は PV-GHIR508523 の T-DNA I 領域と同一であることが確認された。

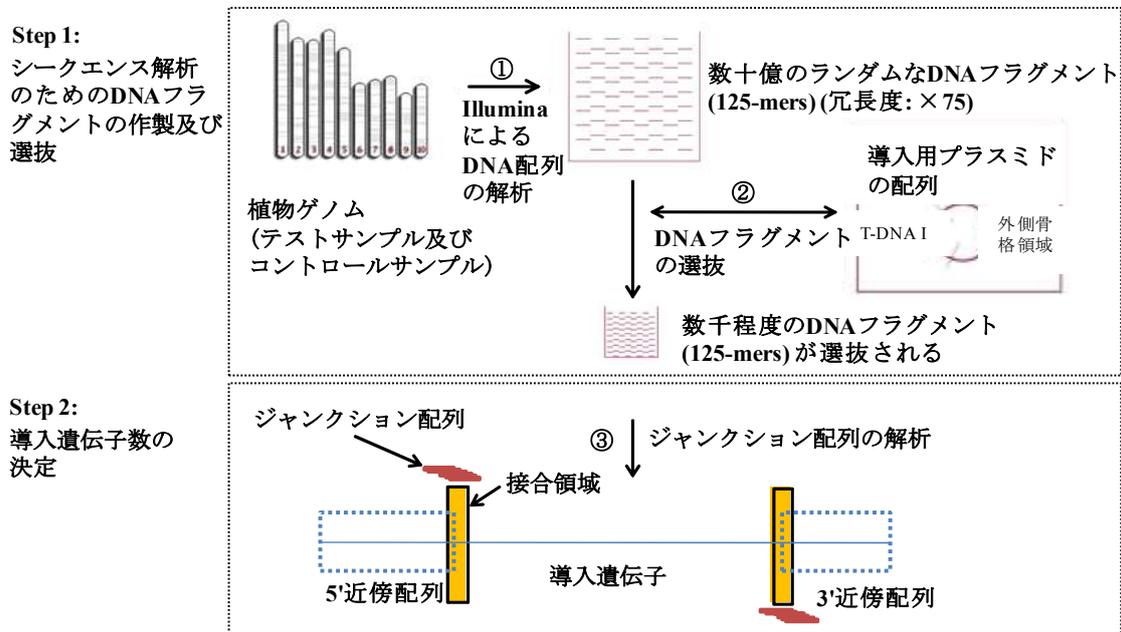
よって、本組換えワタのゲノム中 1ヵ所に 1コピーの T-DNA I 領域が導入
30
遺伝子として組み込まれており、T-DNA II 領域及び外側骨格領域は挿入され
ていないことが確認された。

さらに複数世代 (R3、R4、R5、R6 及び R7 世代) の本組換えワタを対象に
した NGS/JSA において、T-DNA I 領域が安定して後代に遺伝していること

¹⁸ ワタゲノムに1コピーで存在する*acpI*遺伝子について調べた冗長度の平均値を指標として、本解析が冗長度75以上で行われていることを確認している。

¹⁹本解析は、0.1ゲノム等量(冗長度8)のPV-GHIR508523が存在する場合に、そのプラスミド配列の100%を検出する感度を有することが示されている(別添資料6のAppendix Table 4, p36)。

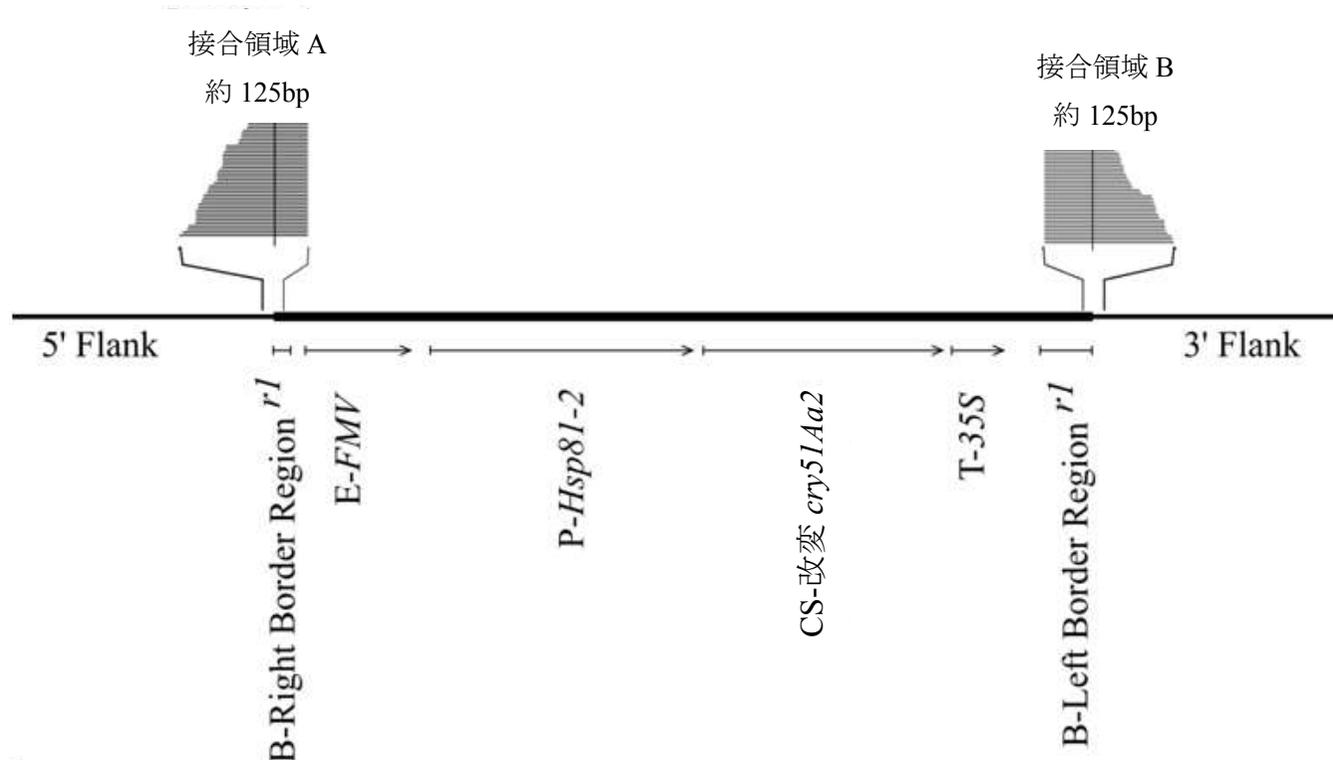
が確認された (別添資料 6, p26)。なお、本組換えワタにおける導入遺伝子の模式図を図 5 (p31) に示した。



5

図 4 NGS/JSA の解析手法の概念図 (Kovalic et al., (2012)より改変)²⁰

²⁰本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。



5 図5 本組換えワタの導入遺伝子図²¹
 本組換えワタ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図は本組換えワタ中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示している。図の上部に、NGS/JSA において検出された接合領域 A 及び B の模式図を示した。なお、本組換えワタにおいて目的の T-DNA I 領域が PV-GHIR508523 と一致した配列で導入されており、B-Right Border Region¹及び B-Left Border Region¹はが本組換えワタにおいて PV-GHIR508523 と比較して短くなっている。

²¹本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 6 の p22)。

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

10 ウェスタンブロット分析により、本組換えワタの複数世代 (R3~R7 世代) にわたり、改変 Cry51Aa2 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 7 の Figure 2, p16)。

15 また、2015 年に米国で行った温室試験において、本組換えワタの種子、葉、根及び花粉のサンプルを採取し、改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 5, p33; 別添資料 8)。その結果、本組換えワタの種子、葉、根及び花粉における改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現が確認された (表 5, p33)。

表5 本組換えワタの組織中における改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量 (2015 年、米国)²²

組織	生育段階 ¹	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g DW}$) ²	LOQ/LOD ³ ($\mu\text{g/g DW}$)
種子		120 (7.8) 110-130	0.078/0.021
葉	50%開花期	1300 (200) 1000-1400	0.078/0.010
根	50%開花期	390 (73) 310-460	0.078/0.028
花粉	開花期	4.3 (6.1) 0.57-11	0.078/0.016

¹各組織を採取した生育段階。

²蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの μg で表されている。平均値、標準偏差及び範囲 (最小値-最大値) は採取されたそれぞれの組織で計算されている (n=3)。SD=標準偏差, DW=乾燥重

³ limit of quantitation (LOQ) = 定量限界; limit of detection (LOD) = 検出限界

5

²²本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの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

10 本組換えワタは、本組換えワタに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、End Point TaqMan PCRによる検出及び識別が可能である(別添資料9)。検定に用いるDNAの濃度は、PCRの1反応当たり5~20 ngであることが推奨されており、葉の一部を用いて検定できる。

15 本法の再現精度については、40サンプルの本組換えワタ及び80サンプルの非組換えワタを用いて確認試験を行った(別添資料9のp5)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20 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又は生態学的特性の具体的な内容

本組換えワタは改変 *cry51Aa2* 遺伝子が導入されており、改変 Cry51Aa2 蛋白質を発現することで、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与されている。

25

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作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

30 本組換えワタの宿主は非組換えワタ品種 DP393 であり、導入遺伝子は改変 *cry51Aa2* 遺伝子である。

宿主であるワタについて、わが国に交雑可能な近縁野生種は存在しない。

35 現在、わが国では、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。また、これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後

に、わが国の自然条件下で自生化したという報告はされていない。

本組換えワタ中では、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目に殺虫活性を示す改変 Cry51Aa2 蛋白質が産生される。

5 Cry 蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなく、改変 Cry51Aa2 蛋白質は宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられることから、改変 Cry51Aa2 蛋白質は植物の代謝系に影響を及ぼすものではないと考えられる。

よって、導入遺伝子である改変 *cry51Aa2* 遺伝子による影響が、宿主の生理学的又は生態学的特性であるカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する活性以外に及ぶとは予想されない。

したがって、本組換えワタの隔離ほ場試験を行うに当たっては、生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いずに生物多様性影響評価が可能であると考えられた。

15 なお、本組換えワタの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。

①形態及び生育の特性 (開花始め (月日)、葉形、地上部の乾燥重 (g)、開じよ前のさく (ワタの果実) の形状、成熟期 (月日)、主茎長 (cm)、主茎節数、繊維の色 (綿毛の色)、種皮の色) ②成体の越冬性 ③花粉の稔性及びサイズ ④種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 ⑤有害物質の産生性 (土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験)

25 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。

30

(2) 使用等の方法

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場

35 使用期間：承認日から平成 33 年 5 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。
- 5 (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、本組換えワタ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、当該ワタ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。
- 10 (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。また、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

2. 隔離ほ場での作業要領

- 15 (1) 本組換えワタ及び比較対照のワタ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本組換えワタを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ワタ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、本組換えワタの栽培終了後は、当該ワタ及び比較対照のワタを隔離ほ場内にすき込む等により、
20 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ワタ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。
25
- (6) (1) から (5) までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (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。
30

なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を試験計画書の図 6 (p74) 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

—

5

(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。

10

(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と類似の環境での使用等の結果

—

15

(6) 国外における使用等に関する情報

これまで本組換えワタについて 2011~2015 年間に米国において延べ 162 カ所のは場試験が行われているが (表 6, p38)、対照の非組換えワタと比較して生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。

20

なお、本組換えワタの諸外国における申請状況は表 7 (p38) のとおりである。

表 6 国外において本組換えワタのほ場試験を行ったほ場の数及び国²³

年	ほ場の数	国
2011	1	米国
2012	36	米国
2013	35	米国
2014	49	米国
2015	41	米国

5 表 7 本組換えワタの諸外国における申請状況²⁴

2016年11月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	■■■■■	—
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	■■■■■	—
米国農務省 (USDA)	環境	■■■■■	
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	■■■■■	—
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	■■■■■	—

²³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

²⁴本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一-2-(6)-② (p34~35) に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性、導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えワタを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

1 競合における優位性

10 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 第一-1-(3)-ニ-① (p4) の項目に記載したように、近年のワタ品種は、雑草種特有の特性 (長い種子休眠期間、埋土種子の長い寿命、伝播を促す種子散布機構) を失っており (OECD, 2008; OGTR, 2008; d'Eeckenbrugge and Lacape, 2014)、雑草性や侵略性がないことが知られている。実際に、オーストラリアでは、3年間 (2002, 2004, 2005) にわたり毎年約 6,000 トンの綿実が輸送されるルートでモニタリング調査が行われており、人の手が入らない自然条件下でワタが世代交代を繰り返し、自生・雑草化することがないことが報告されている (Addison et al., 2007)。現在、わが国では、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。また、これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、自然条件下で世代交代を繰り返し、自生化したという報告はされていない。このことから、本組換えワタがカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を獲得することにより、25 その生存率が既存のワタに比べ一時的に高まることがあったとしても、この形質のみによって栽培作物であるワタが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得するとは考えにくい。

30 以上のこと及び本組換えワタが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、競合における優位性に起因する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。

35 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10 以上のことから、本組換えワタは、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、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15

本組換えワタには既存のワタと同様に、哺乳動物に対して毒性を示すゴシポール及び鶏卵の変色及びふ化率の低下などを起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、現在、わが国ではワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。さらに、ワタがわが国で自生化したという報告はされていない。したがって、ワタを主要な食餌植物とする野生動物等がわが国に生息するとは考えがたい。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を来すような有害物質を産生するという報告はない。

20

25

本組換えワタ中ではカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す改変 Cry51Aa2 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していないことが確認されている (第一-2-(1)-ロ-②, p22)。また、改変 Cry51Aa2 蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなく、改変 Cry51Aa2 蛋白質は宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられることから、宿主の代謝系に作用して新たな有害物質を産生することはないと考えられた。

30

本組換えワタで発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質は、第一-2-(1)-ロ-② (p12~20) に記載のとおり、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。このことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等として、わが国に生息するカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ

35

目昆虫が考えられた。

5 カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫のうち、環境省第4次レッドリスト(環境省, 2012a)に掲載された絶滅危惧種・準絶滅危惧種について、種の食性・生息場所から、本組換えワタから飛散した花粉又は鋤き込んだ本組換えワタの植物体を食餌することにより影響を受ける可能性を検討した。なお、Cry 蛋白質に感受性のない昆虫種では Cry 蛋白質は他の蛋白質と同様に消化され、生物濃縮は起こらないため、肉食性の昆虫種については影響を受ける可能性のある種の対象から外した。同様に、生息域が地下浅層や湿地等
10 等に限定される昆虫種及び寄主が農耕地帯周辺に生息しない特定の植物等に限定される昆虫種については影響を受ける可能性のある種の対象から外した。その結果、本組換えワタにより影響を受ける可能性が否定できないカメムシ目昆虫として4種が特定された(表 8, p42)。さらに、13種については、食性又は生息地に関する情報が不足していた(表 9, p43~44)。また、本組換えワタ
15 により影響を受ける可能性が否定できないコウチュウ目昆虫として7種が特定された(表 10, p45~46)。さらに、33種については、食性又は生息地に関する情報が不足していた(表 11, p47~50)。なお、アザミウマ目昆虫については、環境省第4次レッドリスト(環境省, 2012a)に掲載がなかった。

表 8 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているカメムシ目昆虫²⁵

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
絶滅危惧 II 類 (VU)			
ツツジコブアブラムシ (アブラムシ科)	<i>Elatobium itoe</i>	台湾、日本 (兵庫県、香川県、栃木県) に分布。	秋～春に寄生するいわゆる冬寄主は、庭などに栽植されたツツジ類。
ケヤキワタムシ (アブラムシ科)	<i>Hemipodaphis persimilis</i>	北海道札幌市の 1 ヶ所、栃木県大田原市の 1 ヶ所から知られてきた。しかし、2011 年長野県松本市の公園より、本種が新たに記録された。 公園のような、人為的な開けた環境のケヤキから見出されている。自然度の高い森林地域のケヤキからは見出されていない。	1 次寄主はケヤキ。2 次寄主は不明。
ハウチワウンカ (ゲンバイウンカ科)	<i>Trypetimorpha japonica</i>	本州と九州 (北部) に分布。 低地の湿地地帯のチガヤに生息。	チガヤ
ブチヒゲツノヘリカメムシ (ツノヘリカメムシ科)	<i>Dicranocephalus medius</i>	ヨーロッパから日本 (本州) にかけて、旧北区に広く分布。 林縁や乾燥した草原に生息。産地はごく局所的で、栃木県、山梨県、長野県などに数ヶ所知られるにすぎない。	トウダイグサ科のタカトウダイ

*環境省第 4 次レッドリスト昆虫類 (環境省, 2012a) に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているカメムシ目昆虫について、安永ら (1993); 石井ら (1996); 環境省 (2006; 2015); 林ら (2012b) を用い、1) 生息域が農耕地帯周辺で、2) ワタの花粉又は鋤き込んだ植物体を食餌する可能性がある種、の 2 点から絞込みを行った。

²⁵本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表9 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているカメムシ目昆虫²⁶

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
絶滅危惧 II 類 (VU)			
ハハジマハナカメムシ (ハナカメムシ科)	<i>Kitocoris hahajima</i>	小笠原諸島の母島だけに生息。 耕作地周辺のオガサワラモクマオやその他草本植物の花穂上で つかることが多い。	各種草本類の花穂上でア ザミウマなどの微小節足 動物を捕食する。
準絶滅危惧 (NT)			
フクロクヨコバイ (ヨコバイ科)	<i>Glossocratus fukuroki</i>	本州、四国、九州に分布するが、産地は極めて局限される。 広葉樹林の周辺および林床に生育するススキに生息。	不明
クヌギヒイロカスミカメ (カスミカメムシ科)	<i>Pseudoloxops miyamotoi</i>	本州と九州に分布する。クヌギの平地林。	不明
リンゴクロカスミカメ (カスミカメムシ科)	<i>Pseudophylus flavipes</i>	北海道と本州中部以北から知られる。	バラ科樹木に依存する 種だがフジ類にもつ く。
ツماغロマキバサシガメ (マキバサシガメ科)	<i>Stenonabis extremus</i>	北海道、本州の北部、ロシア極東部の沿海州南部のみから知ら れる。	不明
ズイムシハナカメムシ (ハナカメムシ科)	<i>Lyctocoris beneficus</i>	里山環境依存種。	不明
クロアシブトハナカメムシ (ハナカメムシ科)	<i>Xylocoris hiurai</i>	本州から南西諸島まで広く分布。農地における積みわら中で普 通に見られた。	不明
オオムラハナカメムシ (ハナカメムシ科)	<i>Kitocoris omura</i>	小笠原諸島父島と聳島に固有である。	花穂上でアザミウマな どを捕食する。

²⁶本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 9 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているカメムシ目昆虫 (続き)

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
準絶滅危惧 (NT)			
アシナガナガカメムシ (ヒョウタンナガカメムシ科)	<i>Poantius lineatus</i>	本州と九州から記録されている。海岸などの草地に生息するといわれている。	不明
シロヘリツチカメムシ (ツチカメムシ科)	<i>Canthophorus niveimarginatus</i>	本州、四国、九州から記録される。ススキに半寄生するカナビキソウ (ビャクダン科) に依存。	不明
ツシマキボシカメムシ (カメムシ科)	<i>Dalpada cinctipes</i>	対馬だけに分布。 コナラ、クリなどからなる明るい森林環境に見られる。	不明
ルリカメムシ (カメムシ科)	<i>Plautia cyanoviridis</i>	不明	海浜性植物のハマゴウを含む、複数種の植物の実から吸汁。
ミカントゲカメムシ (カメムシ科)	<i>Rhynchochoris humeralis</i>	琉球列島の沖縄島、石垣島、西表島から記録されている。	ミカン類の果実から吸汁。

*環境省第4次レッドリスト昆虫類 (環境省, 2012a) に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているカメムシ目昆虫について、安永ら (1993); 石井ら (1996); 環境省 (2006; 2015); 林ら (2012b) を用い、1) 生息域が農耕地帯周辺で、2) ワタの花粉又は鋤き込んだ植物体を食餌する可能性がある種、の2点から絞込みを行った。

表 10 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫²⁷

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
絶滅危惧 IA 類 (CR)			
アオノネクイハムシ (ハムシ科)	<i>Donacia frontalis</i>	本州 (兵庫県)。発見地の青野ヶ原では絶滅した可能性がある。 また、これ以外の産地も記録されていない。生息環境は丘陵地の 湿地。	カヤツリグサ科ハリイ 類
絶滅危惧 IB 類 (EN)			
ヨツボシカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Stenyrinum quadrinotatum</i>	北海道から奄美諸島にかけて平地から山地にかけて広く分布。落 葉広葉樹から常緑広葉樹の自然林から二次林まで、また農山村か ら緑の多い住宅地まで広範に生息。	好んでクリの花を訪れ るほか、ブナ科の薪に 集まる。幼虫は各種の 広葉樹、とくにブナ科 の枯れた材を食べる。
絶滅危惧 II 類 (VU)			
アカムネハナカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Macropidonia ruficollis</i>	本州中央部と四国の山地ないし高原にごく局所的に分布。	幼虫の寄主植物である クロツバラが生育する 場所に限定。幼虫はク ロツバラの根を食べる らしい。
チョウセンゴモクムシ (オサムシ科)	<i>Harpalus crates</i>	本州、九州、屋久島に分布。平野部の河川敷や荒れ地、造成地の 日当たりのよい草地。	兵庫県下の観察では、 成虫は秋季にメドハギ の種子を好んで摂食す る。

²⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 10 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫 (続き)

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
準絶滅危惧 (NT)			
アカガネネクイハムシ (ハムシ科)	<i>Donacia hirtihumeralis</i>	本州 (青森県、岩手県、栃木県、茨城県)。本州固有種。 生息環境はため池。	カヤツリグサ科フトイ
キンイロネクイハムシ (ハムシ科)	<i>Donacia japana</i>	北海道、本州、九州。生息環境はため池、水路。	ミクリ科ミクリ類。成虫はスゲ類に訪花する。
コトラカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Plagionotus pulcher</i>	北海道、本州、四国	成虫は広葉樹の薪に集まり、幼虫はそれらを食べる。

5 *環境省第4次レッドリスト昆虫類 (環境省, 2012a) に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫について、小島ら(1969); 上野ら (1984); 林ら (1984); 野尻湖昆虫グループ (1985); 福井県 (2002); 島根県 (2004); 栃木県 (2005); 日外アソシエーツ (2005); 林ら (2005); 環境省 (2006); 大林ら (2007); 中根ら (2007); 環境省 (2010); 日外アソシエーツ (2011); 環境省 (2012b); 林ら (2012a) を用い、1) 生息域が農耕地帯周辺で、2) ワタの花粉又は鋤き込んだ植物体を食餌する可能性がある種、の2点から絞込みを行った。

表 11 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫²⁸

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
絶滅危惧 IA 類 (CR)			
ニセキボシハナノミ小笠原亜種 (ハナノミ科)	<i>Hoshihananomia katoi boninensis</i>	小笠原諸島の父島と母島のみで生息する。 常緑広葉樹 (湿性高木林) の自然林。	不明
クスイキボシハナノミ (ハナノミ科)	<i>Hoshihananomia kusuii</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島) と母島のみで生息する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林。	不明
ミイロトラカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Xylotrechus takakuwai</i>	小笠原諸島の母島のみで知られる。 常緑広葉樹の自然林と推定される。	不明
ヒメオガサワラカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Boninella igai</i>	小笠原諸島の父島だけに分布する。 常緑広葉樹の自然林。	不明
アオヘリアオゴムシ (オサムシ科)	<i>Chlaenius praefectus</i>	本州、四国、九州 良好な湿地草原に生息し、スゲ類やイネ科草本の根際から観察される。	不明
オオヒラタトックリゴムシ (オサムシ科)	<i>Oodes virens</i>	本州中部以南、四国、九州に分布。近縁種の記録から、湿地環境に依存していることはほぼ間違いない。	不明
絶滅危惧 IB 類 (EN)			
オガサワラモンハナノミ (ハナノミ科)	<i>Tomoxia relictata</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島・弟島) と母島のみで生息する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林。	不明
ムコジマトラカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Chlorophorus kusamai</i>	小笠原諸島の鴛島だけに分布する。 樹林環境に生息。	不明
ムコジマキイロトラカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Chlorophorus masatakai</i>	小笠原諸島の鴛島列島 (鴛島・媒島) だけに分布する。 樹林環境に生息。	不明
フタモンアメイロカミキリ母島 列島亜種 (カミキリムシ科)	<i>Pseudiphra bicolor nigripennis</i>	小笠原諸島の母島列島 (母島・向島) だけに分布する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林。	幼虫の寄主植物はコブガシとムニンネズミモチが知られている。

²⁸本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 11 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫 (続き)

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
絶滅危惧 II 類 (VU)			
ズグロヒメハナノミ (ハナノミ科)	<i>Ermischiella nigriceps</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島・弟島 (未発表)・西島) と母島に知られる。 常緑広葉樹の自然林を主にすると思われるが、外来種樹林にも見つか。乾燥にも強いと推定される。	不明
ボニンヒメハナノミ (ハナノミ科)	<i>Falsomordellistena formosana boninensis</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島・西島) と母島に分布する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林を好むが、外来種樹林でも生息する。	不明
ニセミヤマヒメハナノミ (ハナノミ科)	<i>Falsomordellistena pseudalpigena</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島) と母島に分布する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林と推定される。	不明
ニセチャイロヒメハナノミ (ハナノミ科)	<i>Falsomordellistena rosseoloides</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島・西島) に知られる。 常緑広葉樹の自然林を主にすると思われるが、乾燥にも強いと推定される。	不明
ワタナベヒメハナノミ (ハナノミ科)	<i>Falsomordellistena watanabei</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島・西島) と母島に分布する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林を好むが、外来種樹林でも採取される。	不明
キムネキボシハナノミ (ハナノミ科)	<i>Hoshihananomia ochrothorax</i>	小笠原諸島の聳島と父島列島 (父島・兄島)、母島列島 (母島・向島) に知られる。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林。	不明
オガサワラキボシハナノミ (ハナノミ科)	<i>Hoshihananomia trichopalpis</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島・弟島) と母島のみ生息する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林。	不明
チャイロヒメカミキリ小笠原亜種 (カミキリムシ科)	<i>Ceresium simile</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・弟島) と母島に分布する。 常緑広葉樹林。	寄主植物としてギンネム (マメ科)、シマシャリンバイ (バラ科) が知られる。

表 11 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫 (続き)

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
フタモンアメイロカミキリ父島 列島亜種 (カミキリムシ科)	<i>Pseudiphra bicolor bicolor</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島・弟島) に分布する。 常緑広葉樹 (とくに湿性高木林) の自然林。	成虫はオオバシマムラ サキなどの花から確認 されている。
ケブカオガサワラカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Boninella takakuwai</i>	小笠原諸島の母島列島 (母島・向島) だけに分布。	不明
準絶滅危惧 (NT)			
ヨツモンハナノミ小笠原亜種 (ハナノミ科)	<i>Variimorda boninensis ihai</i>	小笠原諸島の父島列島 (父島・兄島)、母島列島 (母島・向島) に分 布する。	不明
オガサワラコバネカミキリ父島 亜種 (カミキリムシ科)	<i>Psephactus scabripennis chichijimensis</i>	小笠原諸島父島だけに分布する。 湿性高木林に生息する。	幼虫の寄主植物は未確 認だが各種広葉樹と推 定される。
オガサワラコバネカミキリ母島 亜種 (カミキリムシ科)	<i>Psephactus scabripennis scabripennis</i>	小笠原諸島母島だけに分布する。 湿性高木林に生息する。	幼虫の寄主植物はホル トノキやモクタチバナ など各種広葉樹が確認 されている。
クロモンヒメカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Ceresium signaticolle</i>	小笠原諸島父島と母島のみから知られる。	コヤブニッケイ、ヒメ ツバキなど各種広葉樹 (外来種を含む) を寄主 植物とする。
オガサワラトラカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Chlorophorus boninensis</i>	小笠原諸島父島列島 (父島・兄島・西島・南島)、母島列島 (母 島・向島・姉島・姪島) に分布する。 おもに湿性高木林に生息する。	幼虫の寄主植物として は各種の広葉樹 (ギン ネムなどの外来種を含 む) が確認され、成虫 は各種の枯れ木や花か ら確認されている。

表 11 影響評価のための情報が不足している絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫 (続き)

和名 (科名及び亜科名)	学名	生息地、生息環境	食餌
オガサワラキイロトラカミ キリ (カミキリムシ科)	<i>Chlorophorus kobayashii</i>	小笠原諸島父島列島 (父島・兄島・弟島・東島)、母島列島 (母島・向島・姪島) に知られる。	ギンネム、ヒメツバキ、ヒメシャリンバイなど各種広葉樹を寄主植物としている。
オガサワラモモプトコバネ カミキリ (カミキリムシ科)	<i>Merionoeda tosayai</i>	小笠原諸島聳島、父島列島 (父島・兄島・弟島)、母島列島 (母島・向島・姪島) に知られる。	おもにコヤブニッケイなどクスノキ科を寄主植物としている。
オガサワライカリモントラ カミキリ (カミキリムシ科)	<i>Xylotrechus ogasawarensis</i>	小笠原諸島聳島、父島列島 (父島・兄島・弟島)、母島に知られる。	ギンネム、ヒメツバキなど各種広葉樹を寄主植物としている。
ヒメビロウドカミキリ (カミキリムシ科)	<i>Acalolepta degener</i>	東アジアと日本 (本州・九州・対馬) から知られる。 広い草地や大河川の中・下流域の河原に大きな個体群が認められる。	ヨモギ類、とくにオトコヨモギを寄主植物とする。
エチゴトックリゴミムシ (オサムシ科)	<i>Oodes echigonus</i>	北海道、本州。 周囲に湿性草地が広がる規模の大きなため池や湿原に生息。	不明
オオトックリゴミムシ (オサムシ科)	<i>Oodes vicarius</i>	本州、九州、池畔の土中で越冬。 平野部から低山地の河川敷やため池、ダム湖、湿原の水辺に生息。	不明
ヒトツメアオゴミムシ (オサムシ科)	<i>Chlaenius deliciolus</i>	本州、四国、九州。 平地から低山地の草地や河川敷、河畔林、林縁などに生息。	不明
ヤマトオサムシダマシ (ゴミムシダマシ科)	<i>Blaps japonensis</i>	本州、四国、九州。古い木造家屋の床下や納屋の藁屑。 平地性の種。	不明

5 *環境省第4次レッドリスト昆虫類 (環境省, 2012a) に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫について、小島ら (1969); 上野ら (1984); 林ら (1984); 野尻湖昆虫グループ (1985); 福井県 (2002); 島根県 (2004); 栃木県 (2005); 日外アソシエーツ (2005); 林ら (2005); 環境省 (2006); 大林ら (2007); 中根ら (2007); 環境省 (2010); 日外アソシエーツ (2011); 環境省 (2012b); 林ら (2012a) を用い、1) 生息域が農耕地帯周辺で、2) ワタの花粉又は鋤き込んだ植物体を食餌する可能性がある種、の2点から絞込みを行った。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 改変 Cry51Aa2 蛋白質は、カメムシ目、アザミウマ目、コウチュウ目昆虫
に対して殺虫活性を発揮するが、LC₅₀ (半数致死濃度) 及びほ場試験の結果から
も明らかなように、その活性は種によって異なる (表 2~表 3, p20~21)。

10 本組換えワタの標的昆虫であるカメムシ目カスミカメムシ科のウエスタン
ターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*) に対する改変 Cry51Aa2 蛋白質の
LC₅₀ は、3.009 µg/mL diet であった。また、同じ標的昆虫であるカメムシ目
カスミカメムシ科のコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) 及びアザミウマ目
昆虫については、本組換えワタを用いたほ場での抵抗性試験により、改変
Cry51Aa2 蛋白質に対する感受性を示すことが確認された (表 2~表 3, p20~21)。

15 また、コウチュウ目ハムシ科に属するコロラドポテトビートル (*L.
decemlineata*) 及びサザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata
howardi*) に対する改変 Cry51Aa2 蛋白質の LC₅₀ は、それぞれ 400 µg/mL diet
及び 200 µg/mL diet であった (表 2, p20)。

(3) 影響の生じやすさの評価

20

(1)で特定されたカメムシ目及びコウチュウ目昆虫 (表 8~表 11, p42~50) が
本組換えワタから飛散した花粉又は鋤込んだ植物体を食餌することにより影
響を受ける可能性について、下記のように検討した。

25

ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから飛散する可能性は少ない
(OECD, 2008)。さらに、放飼昆虫を用いた交雑試験でも、花粉源からの距離
が 12m を超えると明らかな花粉移動は見られないという報告がある (Umbeck
et al., 1991)。よって、仮にワタの花粉が飛散したとしても、その範囲は極め
て限定されたものである。さらに、本組換えワタの花粉における改変
30 Cry51Aa2 蛋白質の発現量 (4.3 µg/g DW) は、他の組織における改変 Cry51Aa2
蛋白質の発現量 (種子 : 120 µg/g DW、葉 : 1,300 µg/g DW、根 : 390 µg/g DW)
より極めて低いことが確認されている (表 5, p33)。

また、(1)で特定されたカメムシ目及びコウチュウ目昆虫の中に、土壤中
も含めて隔離ほ場周辺に局所的に分布する種は認められなかった。

35

以上のことから、(1)で特定されたカメムシ目及びコウチュウ目昆虫が、
本組換えワタから飛散した花粉又は鋤込んだ植物体を食餌することにより個

体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

5 以上のことから、本組換えワタは、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、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

10 3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 わが国では、本組換えワタが属する *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属の近縁野生種は自生していない。よって、交雑性に起因する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。

(2) 影響の具体的内容の評価

20 —

(3) 影響の生じやすさの評価

25 —

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

30 以上のことから、本組換えワタは、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された。

30

4 その他の性質

—

35

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 第一-2-(6)-② (p34~35) に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性、導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えワタを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

競合における優位性：

10 近年のワタ品種は、雑草種特有の特性 (長い種子休眠期間、埋土種子の長い寿命、伝播を促す種子散布機構) を失っており、雑草性や侵略性がないことが知られている。実際に、オーストラリアでは、3年間 (2002, 2004, 2005) にわたり毎年約 6,000 トンの綿実が輸送されるルートでモニタリング調査が行われており、人の手が入らない自然条件下でワタが世代交代を繰り返し、自生・雑草化することがないことが報告されている。これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、自然条件下で世代交代を繰り返し、自生化したという報告はされていない。このことから、本組換えワタがカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を獲得することにより、その生存率が既存のワタに比べ一時的に高まる

15 ことがあったとしても、この形質のみによって栽培作物であるワタが、わが国の自然環境下で複数世代にわたり安定して自生できるほどの競合における優位性を獲得するとは考えにくい。

20 以上のことから、本組換えワタ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、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

25

有害物質の産生性：

30 本組換えワタには既存のワタと同様に、哺乳動物に対して毒性を示すゴシポール及び鶏卵の変色及びふ化率の低下などを起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、現在、わが国ではワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。さらに、ワタがわが国で自生化したという報告はされていない。したがって、ワタを主要な食餌植物とする野生動物等がわが国に生息するとは考えがたい。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を来すような有害物質を産生

35 するという報告はない。

本組換えワタ中では改変 Cry51Aa2 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していないことが確認されている。また、改変 Cry51Aa2 蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなく、改変 Cry51Aa2 蛋白質は宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられることから、宿主の代謝系
5 に作用して新たな有害物質を産生することはないと考えられた。

本組換えワタで発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質は、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。このことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等として、わが国に生息するカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫が考えられた。
10

カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫のうち、環境省第 4 次レッドリストに掲載された絶滅危惧種・準絶滅危惧種について、種の食性・生息場所から、本組換えワタから飛散した花粉又は鋤き込んだ本組換えワタの植物体を食餌することにより影響を受ける可能性を検討した。その結果、本組換えワタにより影響を受ける可能性が否定できないカメムシ目昆虫として 4 種が特定された。さらに、13 種については、食性又は生息地に関する情報が不足していた。また、本組換えワタにより影響を受ける可能性が否定できないコウチュウ目昆虫として 7 種が特定された。さらに、33 種については、食性又は生息地に関する情報が不足していた。なお、アザミウマ目昆虫については、環境省第 4 次レッドリストに掲載がなかった。
15
20

ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから飛散する可能性は少ない。さらに、放飼昆虫を用いた交雑試験でも花粉源からの距離が 12m を超えると明らかな花粉移動は見られないという報告がある。よって、仮に飛散したとしても、その範囲は極めて限定されたものである。さらに、本組換えワタの花粉における改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量 (4.3 µg/g DW) は、他の組織における改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量 (種子：120 µg/g DW、葉：1,300 µg/g DW、根：390 µg/g DW) より極めて低いことが確認されている。
25

また、第二-2-(1) で特定されたカメムシ目及びコウチュウ目昆虫の中で、土壌中も含めて隔離ほ場周辺に局所的に分布する種は認められなかった。
30

したがって、第二-2-(1) で特定されたカメムシ目及びコウチュウ目昆虫が、本組換えワタの花粉又は鋤込んだ植物体を食餌することにより個体群で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。
35

以上のことから、本組換えワタを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、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

5 交雑性：

わが国では、本組換えワタが属する *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属に属する近縁野生種は自生していない。したがって、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のあるわが国在来の野生動植物等は特定されなかった。このことから、本組換えワタは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるお

10 それはないと判断された。

以上のことから、本組換えワタは、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、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の

15 範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

Addison, S.J., T. Farrell, G.N. Roberts and D.J. Rogers. 2007. Roadside surveys support predictions of negligible naturalisation potential for cotton (*Gossypium hirsutum*) in north-east Australia. *Weed Research* 47: 192-201.

Albeldaño, W.A., J.E. Slosser and M.N. Parajulee. 2008. Identification of thrips species on cotton on the Texas Rolling Plains. *Southwestern Entomologist* 33: 43-51.

Anderson, H.M., D.J. Bowen, C.A. Chay, S. Flasiniski, U.R. Kesanapalli, J.S. Milligan, R.N. Slightom and Y. Yin. 2015. Pesticidal toxin active against Coleopteran and/or Hemipteran insects. Patent 20150047076, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α : Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219: 106-112.

Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.

Baum, J.A., U.R. Sukuru, S.R. Penn, S.E. Meyer, S. Subbarao, X. Shi, S. Flasiniski, G.R. Heck, R.S. Brown and T.L. Clark. 2012. Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. *Journal of Economic Entomology* 105: 616-624.

Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Nucleic Acids Research* S2: 91-92.

Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.

Brubaker, C.L., F.M. Bourland and J.F. Wendel. 1999. The origin and domestication of cotton. Pages 3-31 in Cotton: Origin, History, Technology, and Production. C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.

Cook, D., A. Herbert, D.S. Akin and J. Reed. 2011. Biology, crop injury, and management of thrips (Thysanoptera: Thripidae) infesting cotton seedlings in the United States. *Journal of Integrated Pest Management* 2: B1-B9.

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.

d'Eeckenbrugge, G.C. and J.-M. Lacape. 2014. Distribution and differentiation of wild, feral, and cultivated populations of perennial upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Mesoamerica and the Caribbean. *PLoS One* 9: e107458.

de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.

Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.

EPA. 1998. Guidelines for ecological risk assessment. EPA/630/R-95/002F, April 1998 Final. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

Fryxell, P.A. 1984. Taxonomy and germplasm resources. Pages 27-57 in Cotton. R.J.

Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.

Harris, W.D. 1981. Cottonseed. Pages 375-391 in *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*. Volume 12. J.J. McKetta and W.A. Cunningham (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.

Jenkins, J.N. 2003. Cotton. Pages 61-70 in *Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role of Modern Biotechnology*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

Jerga, A., D. Chen, C. Zhang, J. Fu, J.-L.K. Kouadio, Y. Wang, S.M.G. Duff, J.E. Howard, T.J. Rydel, A.G. Evdokimov, P. Ramaseshadri, A. Evans, R. Bolognesi, Y. Park and J.A. Haas. 2016. Mechanistic insights into the first Lygus-active β -pore forming protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 600: 1-11.

Kakani, A., S. Saha, V.T. Sapra, A. Zipf and D.M. Stelly. 1999. Genetic mechanism and chromosomal location of pollen-specific gene(s) in *Gossypium*. *Crop Science* 39: 668-673.

Kerkhoven, G.J. and H.J.W. Mutsaers. 2003. *Gossypium* L. Pages 139-150 in *Plant Resources of South-East Asia No 17: Fibre Plants*. M. Brink and R.P. Escobin (eds.). Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

Kos, M., J.J.A. van Loon, M. Dicke and L.E.M. Vet. 2009. Transgenic plants as vital components of integrated pest management. *Trends in Biotechnology* 27: 621-627.

Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

Lee, J.A. 1984. Cotton as a world crop. Pages 1-25 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Leigh, T., S. Roach, T. Watson, E. King, J. Phillips and R. Coleman. 1996. Biology and ecology of important insect and mite pests of cotton. *Cotton insects and mites: Characterization and management*: 17-85.

Llewellyn, D. and G. Fitt. 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. *Molecular Breeding* 2: 157-166.

McGregor, S.E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. *Agricultural Handbook No. 496*. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, D.C.

Mogen, B.D., M.H. MacDonald, R. Graybosch and A.G. Hunt. 1990. Upstream sequences other than AAUAAA are required for efficient messenger RNA 3'-end formation in plants. *The Plant Cell* 2: 1261-1272.

Mound, L., D. Paris and N. Fisher. 2009. *World Thysanoptera*. CSIRO, Black Mountain.

Mound, L.A. and D.A. Teulon. 1995. Thysanoptera as phytophagous opportunists. Pages 3-19 in *Thrips biology and management*. Springer.

NCPA. 1993. Cottonseed oil. L.A. Jones and C.C. King (eds.). National Cottonseed Products Association, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis, Tennessee.

Niles, G.A. and C.V. Feaster. 1984. Breeding. Pages 201-231 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2008. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2009. Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO(2004)16. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). Australian Government, Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, Australia.

Richards, J.S., J.N. Stanley and P.C. Gregg. 2005. Viability of cotton and canola pollen on the proboscis of *Helicoverpa armigera*: Implications for spread of transgenes and pollination ecology. Ecological Entomology 30: 327-333.

Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). Nucleic Acids Research 15: 8451-8466.

Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Romeis, J., A. Raybould, F. Bigler, M.P. Candolfi, R.L. Hellmich, J.E. Huesing and

A.M. Shelton. 2013. Deriving criteria to select arthropod species for laboratory tests to assess the ecological risks from cultivating arthropod-resistant genetically engineered crops. *Chemosphere* 90: 901-909.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.

Soberón, M., S.S. Gill and A. Bravo. 2009. Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 1337-1349.

Stewart, S.D., D.S. Akin, J. Reed, J. Bacheler, A. Catchot, D. Cook, J. Gore, J. Greene, A. Herbert and R.E. Jackson. 2013. ARTHROPOD MANAGEMENT & APPLIED ECOLOGY.

Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 43: 77-90.

Umbeck, P.F., K.A. Barton, E.V. Nordheim, J.C. McCarty, W.L. Parrot and J.N. Jenkins. 1991. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology* 84: 1943-1950.

USDA-FAS. 2010. World agricultural production. U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Washington, D.C.

Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 1-12.

van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 101: 1-16.

Wach, M., R.L. Hellmich, R. Layton, J. Romeis and P.G. Gadaleta. 2016. Dynamic role and importance of surrogate species for assessing potential adverse environmental impacts of genetically engineered insect-resistant plants on non-target organisms.

Transgenic Research.

Xu, C., U. Chinte, L. Chen, Q. Yao, Y. Meng, D. Zhou, L.-J. Bi, J. Rose, M.J. Adang, B.-C. Wang, Z. Yu and M. Sun. 2015. Crystal structure of Cry51Aa1: A potential novel insecticidal aerolysin-type β -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 462: 184-189.

Yabe, N., T. Takahashi and Y. Komeda. 1994. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene *HSP81*. *Plant and Cell Physiology* 35: 1207-1219.

Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* 20: 773-786.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

上野俊一・野澤良彦・佐藤正孝 1984 原色日本甲虫図鑑 (II) 保育社

大林延夫・新里達也 編著 2007 日本産カミキリムシ 東海大学出版会

環境省 2006 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物-レッドデータブック-5 昆虫類 自然環境局野生生物課 自然環境研究センター 東京

環境省 2010 改訂レッドリスト付属説明資料昆虫類平成 22 年 3 月
http://www.biodic.go.jp/rdb/explanatory_pdf/21insect.pdf [Accessed Sep, 2012]

環境省 2012a 第 4 次レッドリスト昆虫類
http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=20554&hou_id=15619 [Accessed Sep, 2012]

環境省 2012b 生物多様性情報システム絶滅危惧種情報検索
http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html [Accessed Sep, 2012]

環境省 2015 レッドデータブック 2014 - 日本の絶滅のおそれのある野生生物
- 5 昆虫類 自然環境局野生生物課希少種保全推進室 株式会社ぎょうせい
東京

小島圭三・林匡夫 1969 原色日本昆虫生態図鑑 I 保育社 大阪

財務省 2016 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
[Accessed March 10, 2016]

島根県 2004 しまねレッドデータブック
<http://www1.pref.shimane.lg.jp/contents/rdb/rdb2/cnt/cnt99b.html> [Accessed Oct, 2012]

生化学辞典 1990 生化学辞典 第2版 今堀和友・山川民夫(編) 株式会社
東京化学同人 東京 p. 497

栃木県 2005 レッドデータブックとちぎ
<http://www.pref.tochigi.lg.jp/shizen/sonota/rdb/index.html> [Accessed Sep, 2012]

中根猛彦・大林一夫・野村鎮・黒沢良彦 2007 新訂・原色昆虫大図鑑 II 甲虫
編 北隆館 東京

日外アソシエーツ編 2005 昆虫レファレンス事典 I 日外アソシエーツ

日外アソシエーツ編 2011 昆虫レファレンス事典 II 日外アソシエーツ

野尻湖昆虫グループ 1985 アトラス・日本のネクイハムシー化石同定への手
引きー 野尻湖昆虫グループ

原田重雄 1981 II 繊維料 ワタ. 工芸作物学 栗原浩(編) 社団法人 農
山漁村文化協会 東京 pp. 26-42

林匡夫・木元新作・森本桂 1984 原色日本甲虫図鑑 (IV) 保育社 大阪

林成多 2005 日本産ネクイハムシ図鑑ー全種の解説ー 月刊むし 408 pp2-18

林成多 2012 日本のネクイハムシ むし社

林正美・井村仁平・菊原勇作・河野勝行・宮本正一・長島聖大・中谷至伸・庄野
美德・友国雅章・山田量崇・山本亜生・山下泉 2012b 日本原色カメムシ図鑑
ー陸生カメムシ類 第3巻 石川忠・安永智秀・高井幹夫 (編) 全国農村教育協
会 東京

石井実・常喜豊・大谷剛 (編) 1996 日本動物大百科 第8巻 昆虫I 日高
敏隆 (監修) 平凡社 東京

平野寿助 1987 15 工芸作物 繊維料作物 ワタ. 農学大事典 第2次増訂
改版 農学大事典編集委員会 (編) 株式会社 養賢堂 東京 pp. 709-711

福井県 2002 福井県レッドデータブック (動物編)

<http://www.erc.pref.fukui.jp/gbank/rdb/rdbindex.html> [Accessed Sep, 2012]

安永智秀・高井幹夫・山下泉・川村満・川澤哲夫 1993 日本原色カメムシ図
鑑 友国雅章 (監修) 全国農村教育協会 東京

緊急措置計画書

平成 28 年 6 月 9 日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎
住所 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号

第一種使用規程の承認を申請しているカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ (改変 *cry51Aa2*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88702, OECD UI : MON-88702-4) (以下「本組換えワタ」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、科学的に判断された場合、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とおりである。

平成28年 6 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号 (電話番号 03-6264-4790)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 申請業務管理・運営課 課長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農場実験従事者から得られた情報により把握する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ず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

実験従事者に直接口頭で伝える。

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

具体的措置として、本組換えワタを隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換えワタの放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換えワタが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 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信頼性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが見出された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・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。

カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 の
隔離ほ場試験計画書

第一部 隔離ほ場試験における受容環境

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

日本モンサント株式会社河内研究農場隔離ほ場

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板 4717 番地

3. 電話番号

0297-60-4011

4. 地図

図 6 (p74)参照

II. 責任者等

1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】(日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部)

2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】(日本モンサント株式会社 代表取締役社長)

III. 試験期間

承認日から平成 33 年 5 月 31 日まで

IV. 施設概要

部外者の立ち入りを禁止するためのフェンス(高さ 1.6 m)、立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識、洗い場を設置している(図 7, p75)。

V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m²

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

3. 試験区の配置図

図 8 (p76) 参照

VI. 隔離ほ場の周辺環境

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する (図 9, p77)。

2. 周辺の土地利用状況

隔離ほ場の周辺は、水田・畑・民家・道路・用水路(隔離ほ場のフェンスから約 2.5 m の距離)として利用されている。

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

隔離ほ場境界より半径 1 km 圏内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等）はない。なお、上記の自然保護地域のうち、隔離ほ場に最も近いのは水郷筑波国定公園であり、隔離ほ場からの距離は約 15 km である。

4. 気象条件

隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である茨城県龍ヶ崎アメダス観測所（龍ヶ崎市大徳町）における気象データの平年値を表 12 (p69) に示した(気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス 2016 年 2 月 8 日：

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=2015&month=01&day=&view=pl

表 12 茨城県龍ヶ崎アメダス観測所（龍ヶ崎市大徳町）における気象データの平年値²⁹

要素	降水量	平均気温	最高気温	最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(°C)	(°C)	(°C)	(m/s)	(時間)
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1988～2010
資料年数	30	30	30	30	30	23
1 月	54.2	3.1	9.2	-2.4	2.2	183.9
2 月	54.9	4	9.9	-1.4	2.5	167.4
3 月	110.1	7.3	13.0	1.9	2.9	166.8
4 月	110.9	12.7	18.5	7.3	3.2	171.6
5 月	119.9	17.4	22.5	13.0	3.2	164.0
6 月	145.4	20.5	25.1	16.9	2.7	119.1
7 月	117.1	24.1	28.9	20.6	2.6	147.6
8 月	118.7	25.6	30.8	22.0	2.5	177.0
9 月	185.3	22.1	26.9	18.5	2.6	129.4
10 月	185.0	16.4	21.6	12.0	2.2	134.3
11 月	88.5	10.5	16.5	5.2	1.9	147.1
12 月	49.2	5.4	11.8	-0.3	2.0	175.5
年	1343.9	14.1	19.6	9.5	2.5	1887.7

²⁹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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接近数^{注30}の平年値は、3.1回である（気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2016年1月22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台風の接近回数

関東甲信地方に台風が接近し^{注1}、かつ隔離ほ場最寄の観測地点(茨城県龍ヶ崎アメダス観測所)において日ごとの最大風速が15m/sを超えた回数^{注31}を隔離ほ場周辺への台風の接近回数とした。過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近回数は、合計4回(2007年9月、2011年9月、2012年6月、2013年10月)^{注32}であった(気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2016年1月21日：

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

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

<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>)。

台風の襲来が予想された場合には、以下の強風対策を行う。

- ・ 強風時には、必要に応じて補助支柱を入れる。
- ・ 補強支柱などの資材は常に準備しておき、気象情報により取り付ける。

また、施設の周囲は、風による物の飛来を防止するため、周囲の片付け・清掃を常に行い、隔離ほ場施設内の資材等が風により飛散することのないよう留意する。

^{注30} 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「関東甲信地方に接近した台風」としている。

(台風の統計資料(気象庁): <http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/index.html>)

^{注31} 台風の強風域の定義が平均風速15m/sであることによる。

(気圧配置 台風に関する用語(気象庁): http://www.jma.go.jp/jma/kishou/now/yougo_hp/haichi2.html)

^{注32} 過去の気象データ検索(気象庁): <http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>から、地点として龍ヶ崎を選択し、さらに関東甲信地方に台風が接近した年月を選択。該当年月における日ごとの最大風速が15m/sを超えた日の有無を確認した。該当年月において、日ごとの最大風速が15m/sを超える日が認められた場合、隔離ほ場周辺に台風が接近したと判断した。

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にほ場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・頻度

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け（策定されている場合）

隔離ほ場は、河内町の洪水ハザードマップによると、100年～200年に1回程度起こる大雨により洪水が生じた場合に、水深 1.0～2.0 m となると想定されている。

<http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/kurashi/iza/tebiki/kouzui/index.html>

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

鳥獣害の被害報告はない。

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え農作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等

なし

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等

わが国には交雑可能な野生種は存在しない。

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は図 10 (p78~79) に示したとおりである。

2. 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験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従って速やかに対策を講ずる。

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に鋤込む等の適切な手段で処分する。なお、本組換えワタの栽培終了後も本隔離ほ場では遺伝子組換え作物の隔離ほ場試験等を実施する予定である。

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)の設備を備えている。

- (1) 部外者の立入りを防止するために、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、靴などに付着した土、本組換えワタ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、本組換えワタ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) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網(高さ 3 m)を設置している。また、播種時には防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。

5. 作業要領

- (1) 試験実施中の組換え作物及び比較対照の作物以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 組換え作物を隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該作物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、組換え作物の栽培終了後は、当

該作物及び比較対照の作物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、意図せずに組換え作物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)までに掲げる事項について第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (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。

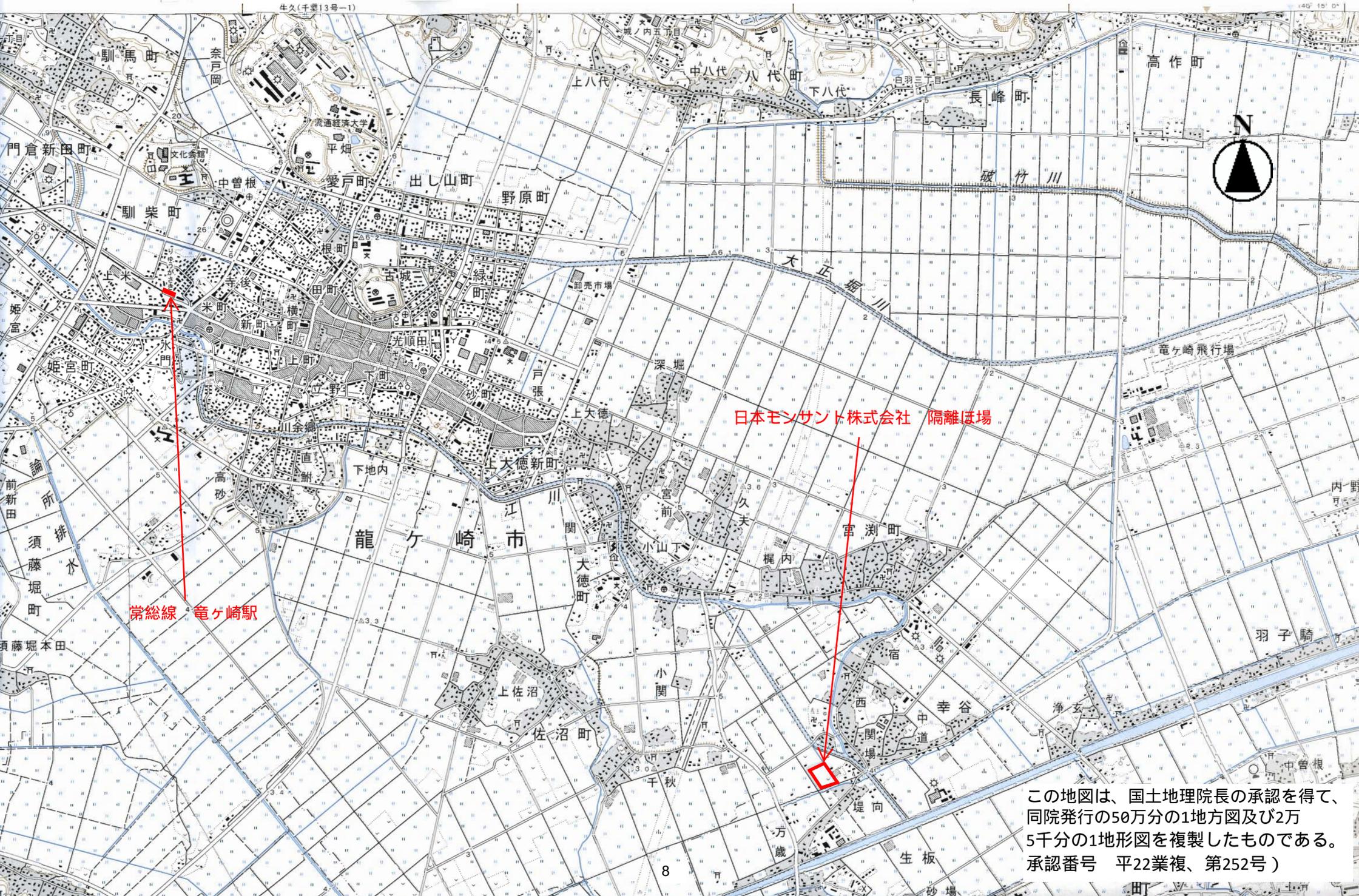
以上

図6 日本モンサント株式会社隔離ほ場の位置 (赤線で示した箇所)

1:25,000

龍ヶ崎

500m 1000 1500



この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の50万分の1地方図及び2万5千分の1地形図を複製したものである。承認番号 平22業複、第252号)

図7 隔離ほ場の設備³⁴

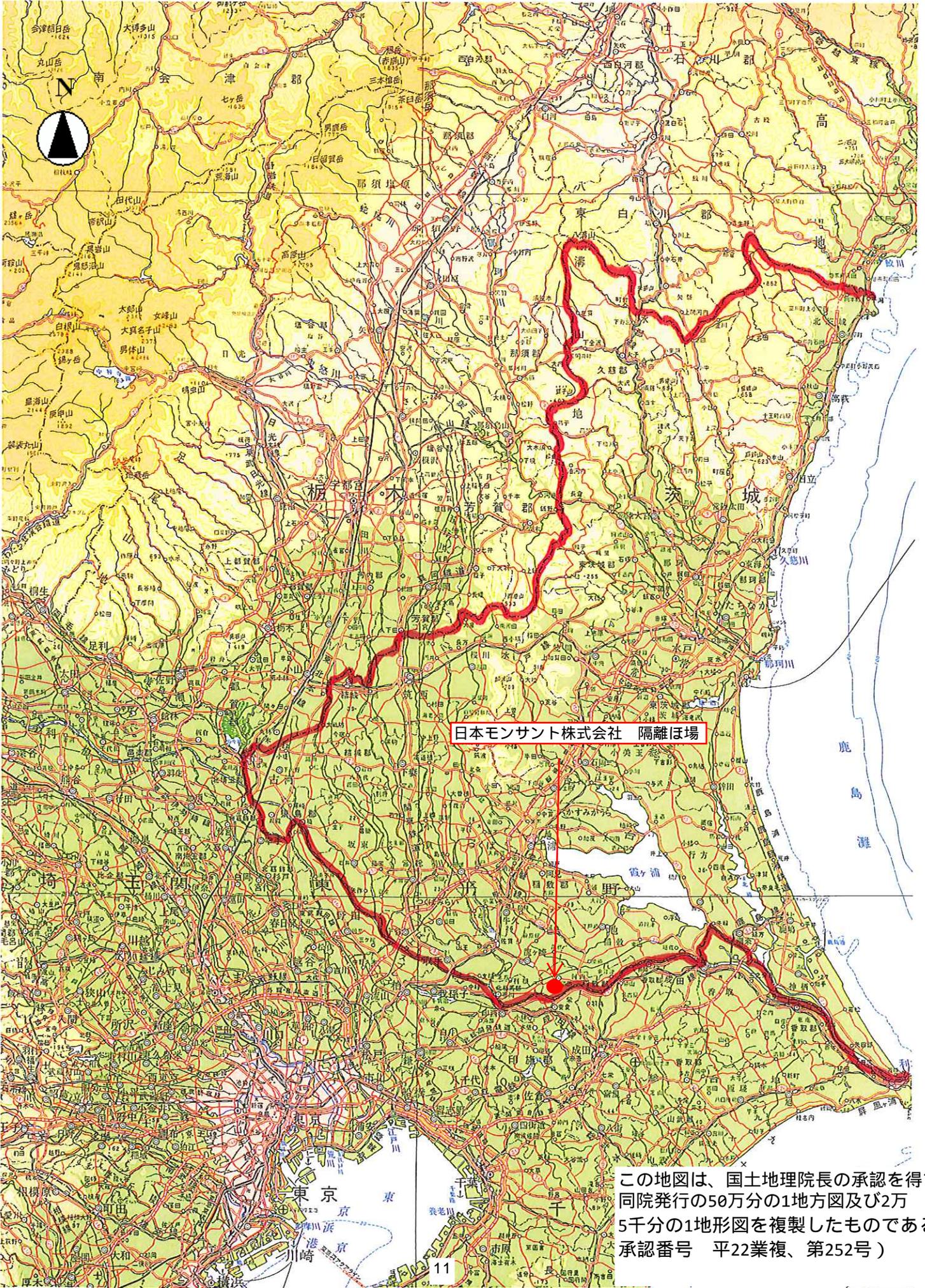
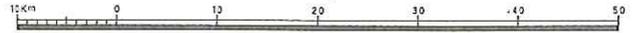


① 立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識

② 洗い場

³⁴本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

図9 日本モンサント株式会社 隔離ほ場の位置



日本モンサント株式会社 隔離ほ場

この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の50万分の1地方図及び2万5千分の1地形図を複製したものである。(承認番号 平22業複、第252号)

図 10 隔離ほ場における栽培履歴³⁷

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2013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
No.1	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.2	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←				
No.3	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え ワタ				→	→							
	非遺伝子組換え ワタ				→	→							
	非遺伝子組換え ソルゴー					←	←	←	←				
No.4	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←				
No.5	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え ソルゴー					←	←	←	←				

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2014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
No.1	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←	←	←	←			
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.2	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え ソルゴー					←	←	←	←				
No.3	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	非遺伝子組換え ソルゴー					←	←	←	←				
No.4	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え トウモロコシ					←	←	←	←				
No.5	非遺伝子組換え ライムギ				→								←
	遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
No.5	非遺伝子組換え ダイズ						←	←	←	←			
	非遺伝子組換え ソルゴー						←	←	←	←			

³⁷本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

図 10 隔離ほ場における栽培履歴(つづき)

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2015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
No.1	非遺伝子組換え ライムギ				→								
No.2	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	遺伝子組換え トウモロコシ							←	←	←	←	←	←
	非遺伝子組換え トウモロコシ							←	←	←	←	←	←
No.3	非遺伝子組換え ライムギ				→								
No.4	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	非遺伝子組換え トウモロコシ	→											
No.5	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ダイズ	→											

第二部 隔離ほ場での試験計画

【社外秘につき非開示】

カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ
(改変 *cry51Aa2*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88702, OECD UI : MON-88702-4) の
別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えワタの作出に用いられた改変 *cry51Aa2* 遺伝子から推定した改変 Cry51Aa2 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of the Cry51Aa2.834_16 Protein Against a Range of Invertebrate Taxa (MSL0027357) (社外秘)
- 別添資料 3 Sequence of Genetic Elements in Plasmid Vector PV-GHIR508523 (社外秘)
- 別添資料 4 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used to Produce MON88702 (MSL0027099) (社外秘)
- 別添資料 5 Amended Report for MSL0026822: Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Insect-protected Cotton MON88702 Across Three Generations (MSL0027485) (社外秘)
- 別添資料 6 Molecular Characterization of Insect Protected Cotton MON 88702 for Japanese Stage III Field Trial (RAR-2016-0182) (社外秘)
- 別添資料 7 Demonstration of the Presence of Cry51Aa2.834_16 Protein in Lygus Cotton Leaf Samples across Multiple Generations of MON 88702 (MSL0027352) (社外秘)
- 別添資料 8 Assessment of Cry51Aa2.834_16 Protein Levels in Cotton Tissues Collected from MON 88702 Produced in a Greenhouse During 2015 (MSL0027427) (社外秘)
- 別添資料 9 Summary of Method for Detecting the Presence of the Cotton MON 88702 Transformation Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue (Detection Summary Report) (社外秘)