

## 生物多様性影響評価検討会における検討の結果

名称：緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ(*HC-EGFP, Bombyx mori*) (HC-EGFP ぐんま, HC-EGFP200, HC-EGFP ぐんま × HC-EGFP200)

第一種使用等の内容：カイコの繭糸の生産を目的とした、①幼虫（3齢幼虫期以降のものに限る。以下同じ。）の飼育、②繭の生産及び加工、③幼虫及び繭の保管、運搬及び廃棄並びに①から③までに付随する行為

申請者：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

生物多様性影響評価検討会は、申請者から提出された生物多様性影響評価書に基づき、第一種使用規程に従って本遺伝子組換えカイコの第一種使用等をする場合の生物多様性影響に関する申請者による評価の内容について検討を行った。主に確認した事項は以下のとおりである。

### (1) 生物多様性影響評価の結果について

本組換えカイコは、

(ア) 緑色蛍光絹繊維蛋白質を産生する *HC-EGFP* 遺伝子(オワンクラゲ *Aequorea victoria* 由来の緑色蛍光蛋白質及びカイコ由来のフィブロインH鎖蛋白質との融合蛋白質をコード) 及び選抜マーカーとしてイソギンチャクモドキ *Discosoma* sp.由来の *DsRed2* 遺伝子(赤色蛍光蛋白質をコード) が組み込まれたドナープラスミド (pBac[3×P3-DsRed2afm]\_HC-EGFP)

(イ) *piggyBac* 転移酵素遺伝子が組み込まれたヘルパープラスミド(pHA3PIG) をそれぞれカイコの受精卵(胚)に顕微注入することにより、*HC-EGFP* 遺伝子及び *DsRed2* 遺伝子(以下「目的遺伝子」という。)が染色体上に1コピー組み込まれている。

目的遺伝子の伝達の安定性については、サザンハイブリダイゼーション法により確認されている。また、目的遺伝子の発現の安定性については、RT-PCR法及び繭の外観形質により確認されている。ただし、*piggyBac* 転移酵素遺伝子については、本組換えカイコの染色体上に組み込まれていないことがPCR法により確認されている。

#### ① 競合における優位性

カイコは、我が国では長年飼育されてきた歴史があるが、これまでにカイコが野外に逸出して自然環境下で繁殖したとの報告はない。

また、万一、カイコが自然環境下に意図的に放出されたとしても、

(ア) 幼虫はほとんど移動できないため、餌となる桑に到達することができず、生存できないこと

(イ) カイコの体色は白色を呈し、外敵となる野鳥や昆虫に容易に発見され捕食されてしまうこと

から自然環境下で生息又は繁殖することは想定し難い。

本組換えカイコは、絹糸腺でHC-EGFP蛋白質、眼で赤色蛍光蛋白質が発現するが、これら蛋白質がカイコ幼虫の運動性を高めたり、カイコ成虫に飛翔能力を付与するとは考えられない。

実際、我が国の隔離飼育区画等において、本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコを飼育し、競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生存能力、繁殖様式

等)について調査したが、孵化歩合、幼虫の行動範囲及び営繭率については、本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコとの間に統計学的有意差は認められなかった。幼虫の体重、繭重及び繭層重、産卵数及び産卵範囲について統計学的有意差は認められたが、いずれも本組換えカイコが劣る結果となっていることから、競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

以上のことから、本組換えカイコの競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

## ② 捕食性

カイコの幼虫は与えられた桑葉のみを摂食し、桑葉以外の植物や昆虫等を摂食することはない。成虫は摂食や飲水は一切行わない。

本組換えカイコは、幼虫期に絹糸腺でHC-EGFP蛋白質、眼で赤色蛍光蛋白質が発現するが、これら蛋白質は昆虫の捕食性を高めるものではない。

以上のことから、本組換えカイコの捕食性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

## ③ 有害物質の産生性

カイコは、我が国では長年飼育されてきた歴史を有するが、これまでカイコが野生動植物等の生息又は生育に悪影響を及ぼす有害物質を産生したとの報告はない。

通常、養蚕農家では飼育中に生じた残渣等を桑畑等に廃棄しているが、これら飼育残渣等が野生動植物等に有害性をもたらしたとの報告はない。

本組換えカイコが産生するHC-EGFP蛋白質及び赤色蛍光蛋白質は、既知の有毒蛋白質やアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有さないことが確認されている。また、これら蛋白質は酵素活性を有しないため、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想定しがたい。

実際、本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコの糞又は死体をそれぞれ土壌に混合し、ブロッコリーの発芽・生育及び土壌微生物に与える影響を比較試験したところ、いずれも本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコとの間に統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本組換えカイコの有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

## ④ 交雑性

我が国には、カイコと交雑可能な近縁野生種としてクワコが生息しており、影響を受ける可能性のある野生動植物等としてクワコが特定された。

すなわち、本組換えカイコと野生のクワコの交雑によって、その後、当該雑種が繁殖して、本組換えカイコに導入したHC-EGFP遺伝子及びDsRed2遺伝子がクワコ集団に浸透・定着する可能性が考えられる。その場合、カイコとクワコはいずれもメス成虫が放出する性フェロモンが同一であるため、自然環境下でカイコメス成虫が放出した性フェロモンにクワコオス成虫が誘引されて交尾する可能性が考えられる。一方、カイコオス成虫は移動能力が極めて乏しく、飛翔能力もないため、野生のクワコメス成虫が放出した性フェロモンを感知したとしても、自由に移動・飛翔するクワコメス成虫を捕捉することはできず、交尾の可能性は低いと考えられる。このため、カイコメス成虫とクワコオス成虫の交

尾を前提とした交雑可能性を検討することとした。

我が国では、過去、全国各地で養蚕が行われていたが、これまで自然環境下でカイコとクワコの雑種が見つかったとの報告はない。また、全国 34 都道府県で捕獲したクワコ (4,192 個体) について、母系遺伝するミトコンドリア遺伝子 (COI) を解析 (遺伝子多型解析) することにより、過去にクワコとカイコとの交雑が生じた可能性の有無を確かめたが、野生のクワコ中にはカイコ型の遺伝子多型が見つかっていない。さらに、カイコとクワコの遺伝子型が異なる核ゲノム上の遺伝子 (CAD) について遺伝子多型解析を行ったが、クワコ (1,019 個体) のゲノム上にカイコ型の遺伝子多型を有する個体は見つかっていない。このことから、カイコとクワコの交雑個体又はその雑種後代が我が国の自然環境下において生息又は繁殖する可能性は極めて低いことが示唆された。

これは、

- (ア) 通常、養蚕農家では、カイコ幼虫のみを飼育し、成虫が生じうる繭は製糸工場に運ばれて速やかに熱乾燥処理・不活化されるため、飼育過程において交尾能力を有するカイコ成虫を取り扱うことはないこと
- (イ) また、カイコ幼虫又は繭が飼育残渣等に紛れ、野外でカイコ成虫が生じたとしても、カイコ成虫は移動能力が極めて乏しく、飛翔能力もないため、外敵となる鳥や昆虫に容易に発見・捕食され、生き残ることは困難であること
- (ウ) 仮に、カイコメス成虫が野生のクワコオス成虫と遭遇し、交尾・産卵に至ったとしても、当該交雑卵のふ化は翌年の早春になり、その周辺に餌となる桑に恵まれうる可能性は低く、また、近傍に桑が存在したとしても、移動能力の劣るふ化幼虫が餌 (桑) を得ることはできず、生存は難しいことがその原因と考えられる。

実際、こうした原因を実験的に確認するため、

- (ア) 平成 26 年から 28 年まで国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構及び群馬県蚕糸技術センターの限定された環境で一定の作業要領を踏まえた隔離飼育区画において、本組換えカイコ (約 50 万頭) 及び対照の非組換えカイコ (約 10 万頭) を飼育したが、いずれも本使用等の範囲において成虫に至った個体は認められていない。
- (イ) また、カイコ幼虫 (1,300 頭) 及び成虫 (200 頭) をそれぞれ野外に放置し、野生の鳥や昆虫による捕食の程度を調査したが、鳥や昆虫に速やかに捕食され、生き残ることのできた個体は認められていない。
- (ウ) さらに、野外でカイコとクワコとの雑種 (ふ化幼虫) が生じた場合を想定し、人為的にカイコ (非組換え) とクワコとの交雑ふ化幼虫 (1 齢幼虫約 3,000 頭) を桑樹周辺 (2m) に放置し、その後 20 日間にわたり桑樹への移動を調査したが、桑樹をよじ登り桑葉にたどりついた個体や桑樹周辺に生存し続けている個体は 1 頭も確認されず、交雑個体が発生しない原因として考えられる内容に沿う結果であった。

また、本組換えカイコが産生する HC-EGFP 蛋白質及び赤色蛍光蛋白質はカイコの移動性を高めたり飛翔能力を付与することはないため、対照の非組換えカイコと比べて、交雑性が高まることはないと考えられる。

これらのことから、野外で本組換えカイコの成虫が生じる可能性は低く、また、仮に、

野生のクワコとの交雑が生じたとしても、当該雑種が生存し続けることは困難であると考えられることから、野生のクワコ集団中に本組換えカイコを導入した *HC-EGFP* 遺伝子及び *DsRed2* 遺伝子が浸透・定着する可能性は極めて低いと考えられた。

本申請では、別に定める飼育等要領において、本組換えカイコの使用等の期間を 3 齢幼虫期以降から繭の収穫までとし、その後、収穫した繭は速やかに熱乾燥又は冷凍処理して不活化することとしている。また、飼育室の窓等の開口部には 4mm 目以下の網を設け、野外から侵入するクワコとの交雑を防止する措置を講じることとしている。さらに、飼育残渣については、4mm 目以下の網で 30 日間覆う、若しくは粉砕機によって残渣等を粉砕処理することにより、残渣等に紛れ込むカイコを確実に不活化することとしている。加えて、実際、交雑個体が生じていないことを確認するため、本組換えカイコを飼育する農家等に対してはフェロモントラップを用いたモニタリングを課すこととしている。

以上のことから、本組換えカイコの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の申請者による結論は妥当であると判断した。

## (2) 生物多様性影響評価を踏まえた結論

以上より、本組換えカイコを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価の結論は妥当であると判断した。