

<p>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) 申請書等の概要</p>

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	3
① 和名、英名及び学名.....	3
② 宿主の品種名又は系統名.....	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域.....	3
(2) 使用等の歴史及び現状.....	4
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	4
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
イ 基本的特性	5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	5
ハ 捕食性又は寄生性	6
ニ 繁殖又は増殖の様式.....	6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	6
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.....	6
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.....	6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	6
ホ 病原性	7
ヘ 有害物質の産生性	7
ト その他の情報	7
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	8
(1) 供与核酸に関する情報.....	8
イ 構成及び構成要素の由来	8
ロ 構成要素の機能	10
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.....	10
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.....	14
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	26
(2) ベクターに関する情報.....	26
イ 名称及び由来.....	26
ロ 特性.....	26
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....	26
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	26
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.....	27
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	27
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	27
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	27
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	27
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	27
② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリ ウム菌体の残存の有無.....	27
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.....	28
(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.....	30
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....	30
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.....	32
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.....	36
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.....	36
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.....	38
(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.....	38
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	38

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.....	38
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.....	38
	a 形態及び生育の特性.....	39
	b 生育初期における低温耐性.....	39
	c 成体の越冬性.....	40
	d 花粉の稔性及びサイズ.....	40
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	40
	f 交雑率.....	41
	g 有害物質の産生性.....	41
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	42
(1)	使用等の内容.....	42
(2)	使用等の方法.....	42
(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.....	42
(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.....	42
(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.....	42
(6)	国外における使用等に関する情報.....	42
第二項目	ごとの生物多様性影響の評価.....	44
1	競合における優位性.....	44
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	44
(2)	影響の具体的な内容の評価.....	45
(3)	影響の生じやすさの評価.....	45
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	45
2	有害物質の産生性.....	46
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	46
(2)	影響の具体的な内容の評価.....	57
(3)	影響の生じやすさの評価.....	57
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	58
3	交雑性.....	58
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	58
(2)	影響の具体的な内容の評価.....	58

(3) 影響の生じやすさの評価.....	58
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	58
4 その他の性質	58
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	59
参考文献.....	62
緊急措置計画書	71
別添資料リスト	73

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 30 年 6 月 20 日

5 農林水産大臣 齋藤 健 殿
環境大臣 中川 雅治 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役 ダビッド・ブランコ 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	食用又は飼料用に供するための使用、加工、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	—

生物多様性影響評価書の概要

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

① 和名、英名及び学名

10

和名：アオイ科 ワタ属 ワタ (陸地棉)

英名：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。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

アオイ科の *Gossypium* 属 (以下、「ワタ属」という。) は、熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯から半乾燥地帯にかけて世界におよそ 50 種が分布している (OECD, 2008)。そのうちのおよそ 45 種は二倍体種であり、その地理的分布からアフリカ・アラビア群 (*Gossypium* 亜属)、オーストラリア群 (*Sturtia* 亜属)、
25 アメリカ群 (*Houzingenia* 亜属) に分類される。また、5 種は四倍体種 (複二倍体) であり、中南米およびガラパゴス諸島、ハワイ諸島に分布し、アメリカ・太平洋群 (*Karpas* 亜属) に分類される (OECD, 2008)。

25

G. hirsutum (以下、「ワタ」という。) は四倍体種であり、中南米地域で A ゲノムを持つ旧大陸のアジア綿と D ゲノムを持つ新大陸の *G. raimondi* との交雑で生じたと考えられている (堀田, 1989; 巽, 2000)。自生個体は世界的に広く見られるが、群生していることは希で、海岸沿いや小島に分散して生育している (Lee, 1984)。

30

また、ワタ属の栽培種にはワタ (*G. hirsutum*) の他に、海島棉とも呼ばれる四倍体種のピマ綿 (*G. barbadense*) と、二倍体種のアジア綿 (*G. herbaceum*、
35 *G. arboreum*) がある。*G. barbadense* は南米の北西部が原産で、南米のペルーやエクアドル、ブラジル、またカリブ海沿岸各国、アメリカ南部で自生して

いる。*G. herbaceum* (シロバナワタ) は南アフリカのサバンナ地帯で生じ、野生化した系統がアフリカに分布しており、また、*G. arboreum* (キダチワタ) はインド原産でアジア地域に自生している (堀田, 1989; OECD, 2008)。

5 わが国の自然界において、ワタ及びワタと交雑可能な他のワタ属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

10 ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ワタは世界におけるワタ属栽培種4種全体の作付面積のうち90%以上を占めている (OECD, 2008)。メキシコおよびグアテマラを中心とする地域で古くから栽培され、18世紀にはアメリカに導入、その後世界各地に広まった (巽, 2000)。

15 わが国では古来、ワタ属はなく、16世紀から18世紀にかけて二倍体品種である *G. arboreum* が全国的に栽培されたが、19世紀に入り急速に減少し、現在は地域振興や観賞の用途としてわずかに栽培されているのみとなっている (原田, 1981; 堀田, 1989)。

20

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

ワタは、工芸作物の中では最大の栽培面積を持ち、世界で広く栽培されている。2016/17年における全世界のワタの栽培面積は2,928万haであり、上位25国はインド1,085万ha、米国385万ha、中国290万ha、パキスタン240万haとなっている (USDA-FAS, 2018)。わが国では、現在、商業用栽培は行われていない。

ワタの栽培には排水性・保水性が高く有機質を多く含んだ土壌が適している。温度はワタの成長や収量を左右する重要な因子であり、深さ10cmにおける地温が14℃以上の日が少なくとも3日続く時期に播種を行う (OECD, 2008)。生育初期における地上部の成長は極めて緩やかである (Robertson et al., 2007)。主要産地での大規模栽培の畑では機械による収穫が行われるが、葉片などの混入を防ぐために、収穫に先立って薬剤により落葉させる。また、落葉させることによりさく果が日光にさらされ、さく果の裂開が促進される (巽, 2000)。

35 わが国では綿実が搾油用及び飼料用として輸入されており、2017年の綿実

の輸入量は 99,482t である。主な輸入相手国は米国 (51,830t)、オーストラリア (27,509t)、及びブラジル (16,319t) であった (財務省, 2018)。なお、搾油用として、わが国では、大阪府内の製油会社が唯一種子を海外から輸入し、搾油している。

5 また、2017 年の綿実油の輸入量は 1,978t であり、主な輸入相手国はオーストラリア(1,111t)、トルコ (617t) 及びブラジル (128t)、同年の綿実油粕の輸入量は 1,914t で輸入相手国はインド (1,072t)、中国 (820t) 及び米国 (22t) であった (財務省, 2018)。

10 ワタの主な用途は繊維であり、綿花は糸に紡がれる。また、地毛は短いためセルロースや紙の原料とされる。種子は 18~24%の油脂と 16~20%の蛋白質を含み、直接飼料としても用いられる他、抽出した油 (綿実油) は食用油として、また、搾油粕 (綿実油粕) 及び種子は家畜の飼料として重要であり、肥料としての需要も高い (巽, 2000)。

15

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

20 ワタは潜在的には多年生で高さ 1.5~2.0m まで成長するが、通常栽培においては一年生作物として栽培され、高さは 1.0~1.5m に抑えられる。主茎から単軸性の発育枝と双軸性の結果枝が生じ、結果枝にはそれぞれ 6~8 個の花が形成される (堀田, 1989; OECD, 2008)。さく果は内部が 3~5 室に分かれており、完熟すると裂開する (巽, 2000)。種子は成熟するにつれて種皮細胞の一部を伸長させ、1 つの細胞からなる綿毛を形成する。綿毛は、リントと呼ばれる長いものと、リントと呼ばれる粗く短いものの 2 種類に分けられる (OECD, 2008)。

25

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

30

ワタの生育の最適温度は 30~35℃であり (OECD, 2008)、生育のためには 15℃以上の年平均気温および 180~200 日以上は無霜期間が必要である (巽, 2000)。通常、年降水量が 1,000~1,500mm のところで栽培されるが、灌漑ができれば降雨は少ない方がよい (原田, 1981)。

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 種子は綿毛で覆われているため、脱粒性は低い。ワタ属の原種では 2~3
カ月の休眠性をもつが、栽培種は育種によって休眠性は最小限に抑えられて
いる、ないしは完全に失っている (OECD, 2008)。ほ場に散布された種子は、
多湿の環境下においては、通常次のシーズンまで生存しない (Jenkins, 2003)。
また、国内で実施した遺伝子組換えワタの隔離ほ場試験においては、越冬性
15 試験において非遺伝子組換えワタ、遺伝子組換えワタともに全て枯死するこ
とが確認されている。

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 ワタは基本的に栄養繁殖せず、種子繁殖する。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があるという報告はない (OGTR,
2008)。

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 25 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

ワタは、主に自家受粉を行う植物であるが、媒介昆虫により他家受粉し、
他家受粉率は 5~30%とされている (Kerkhoven and Mutsaers, 2003)。

30 ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ワタの花粉の生産量は 1 花当たり約 45,000 粒である。ワタの花粉は直径
100~140 μm と大きく、重い。また、粘性があるため風により飛散する可能性
は低く、自然交雑はマルハナバチ (*Bombus* 属) やミツバチ (*Apis* 属) 等の媒
介により起きる (McGregor, 1976; OECD, 2008)。オーストラリアで行われた野
35 外試験では、ワタ畑から 1m 離れた場合の同ワタとの交雑率は 0.4%以下であ

り、16m 離れると 0.03%以下まで減少した (Llewellyn and Fitt, 1996)。一方で、ミツバチが多く存在するワタ畑において、花に蛍光粒子を付着させて蛍光粒子の飛散を追跡した結果、約 45~60m 離れた箇所において約 1.6%のワタの花から蛍光粒子が発見され、ミツバチの存在によって花粉が飛散する可能性が示唆された (Johansson, 1959)。花粉の寿命は、オーストラリアでの試験において、32時間で初期の95%から10%に低下したとの報告がある (Richards et al., 2005)。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

ワタの種子には、ヒトや動物が大量に摂取した場合に悪影響を及ぼし得るゴッシポールやシクロプロペン脂肪酸 (マルバリン酸、ステルクリン酸等) が含まれている (OECD, 2008)。そのため、ワタ種子の給餌は制限されているものの、反芻動物はこれらの物質を第一胃で消化して無毒化できるため、影響を受けにくい (Kandylis et al., 1998)。ゴッシポールは非反芻動物や鳥類、昆虫、微生物に毒性を示し、ほ乳類においては食欲減退、体重減少、呼吸困難を引き起こす (OECD, 2008)。

シクロプロペン脂肪酸は、種子の総脂質中のおよそ 0.5~1.0 %を占める。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考えられるものの、搾油工程の脱臭過程において著しく減少することが知られている (OECD, 2004; OECD, 2008)。

ワタの種子中に含まれるこれらの有害物質や、種子が大量の繊維に覆われていることなどから、鳥類や野生の哺乳動物はワタ種子の摂食を避けると考えられる。

ト その他の情報

わが国では、食品や飼料としての使用等について承認された遺伝子組換えワタが、こぼれ落ちた際に発芽可能な種子の形態で、飼料用や製油用に輸入されている。これらの輸入されたワタの種子の流通時のこぼれ落ちに由来すると考えられる個体の生育については、当該種子を使用する加工施設等の周辺で、2014年に1個体、2015年に4個体、2016年に1個体の計6個体報告さ

れている (農林水産省, 2017a; 農林水産省, 2017b)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

5

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。

10

本組換えワタは、改変 Cry51Aa2 蛋白質を発現することで、特定の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。

15

なお、第一の 2-(1)-ロ-② (p14~25) 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、特定の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セプトとなる。

20

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

25

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 (p10) 及び表 1 (p11~13) に示した。

30

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 カ所の改変がある (別添資料 1)。このうち、8 カ所¹がアミノ酸置換、1 カ所 (野生型のアミノ酸

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。

5 配列における 196-198 番) が 3 アミノ酸の欠失であり (Gowda et al., 2016)、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。

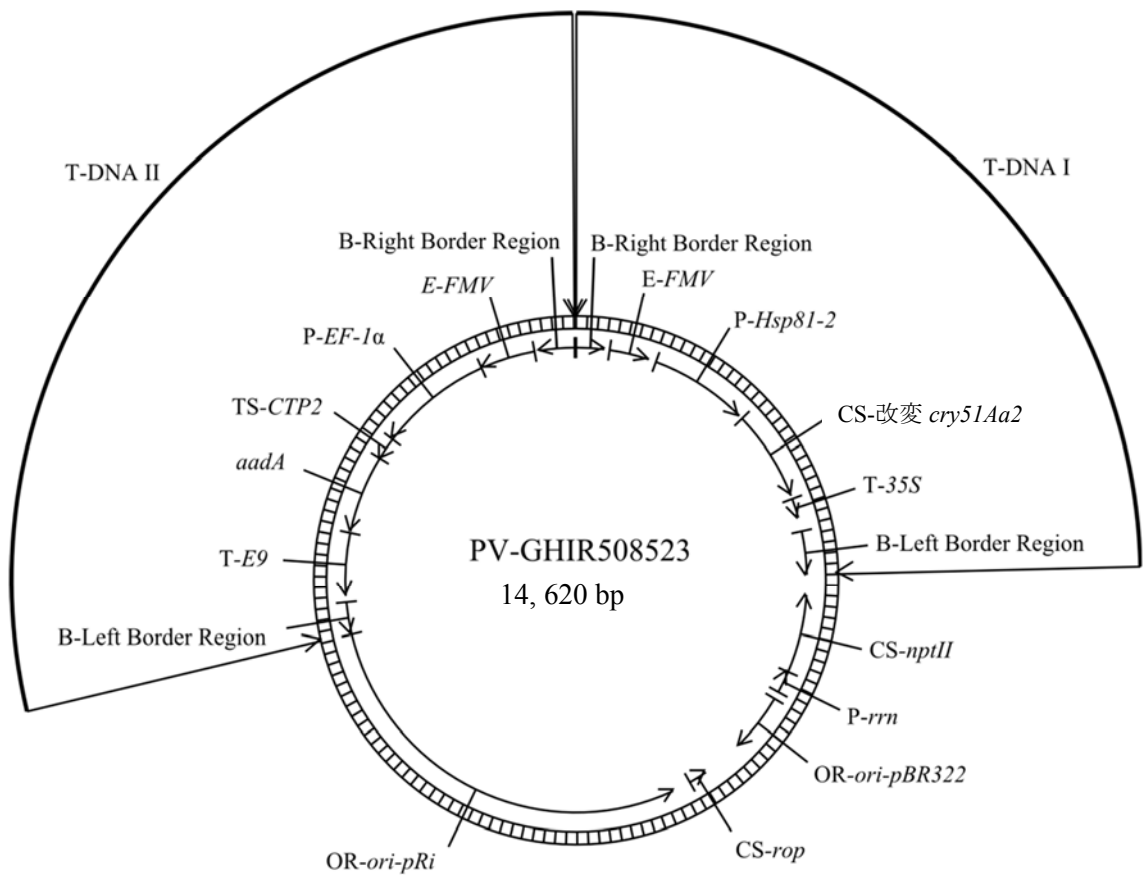
²文献ではCry51Aa2.834_16遺伝子及び蛋白質と名づけられており、別添資料ではCry51Aa2.834_16遺伝子及び蛋白質又はmCry51Aa2遺伝子及び蛋白質と記載されている。

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

5

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 (p11~13) 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。

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	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA I 領域		
B ^{注1} -Right Border Region	1-285	<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	286-338	DNA クローニングの際に利用された配列。
E ^{注2} - <i>FMV</i>	339-745	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	746-820	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注3} - <i>Hsp81-2</i>	821-1,828	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	1,829-1,865	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>	1,866-2,786	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の改変 <i>Cry51Aa2</i> 蛋白質をコードする配列で、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 (Baum et al., 2012; Anderson et al., 2015; Gowda et al., 2016)。
Intervening Sequence	2,787-2,818	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注5} -35S	2,819-3,018	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	3,019-3,156	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	3,157-3,598	<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	3,599-3,807	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>nptII</i>	3,808-4,602	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンホスト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)。

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	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
P- <i>rrn</i>	4,603-4,827	<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	4,828-4,903	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注6} - <i>ori-pBR322</i>	4,904-5,492	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	5,493-5,919	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>rop</i>	5,920-6,111	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 (<i>rop</i>)) 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	6,112-6,299	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR- <i>ori-pRi</i>	6,300-10,413	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	10,414-10,420	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	10,421-10,739	<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	10,740-10,803	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>E9</i>	10,804-11,446	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブ羅斯-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 のポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	11,447-11,461	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	11,462-12,253	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)- <i>O</i> -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) のコード配列 (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。

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	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
TS ^{注7} -CTP2	12,254-12,481	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	12,482-12,490	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>EF-1α</i>	12,491-13,638	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-1α</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンであり、目的遺伝子の植物体内での恒常発現に参与する (Axelos et al., 1989)。
Intervening Sequence	13,639-13,661	DNA クローニングの際に利用された配列。
E- <i>FMV</i>	13,662-14,198	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	14,199-14,248	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	14,249-14,605	<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	14,606-14,620	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)

5 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

本組換えワタは、*B. thuringiensis* 由来の改変 Cry51Aa2 蛋白質をコードする改変 *cry51Aa2* 遺伝子を持つ。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に属する特定の昆虫に対して殺虫活性を示す。

10 改変 Cry51Aa2 蛋白質の作用機作

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)。

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)。

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) (Moar et al., 2017) 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ハムシ (*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ハムシ (*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)。

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

本評価書内では、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 条件を満たしている昆虫を指す。本組換えワタが発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質の標的昆虫は、カメムシ目及びアザミウマ目の特定の昆虫種である。

カメムシ目昆虫については、上述のとおり、改変 Cry51Aa2 蛋白質と約 96%の相同性を有する野生型の Cry51Aa2 蛋白質が、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)。また、本組換えワタが、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*) に抵抗性を示すことが本組換えワタの開発過程において確認されている。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。

アザミウマ目昆虫については、本組換えワタがアザミウマ目昆虫 (アザミウマ科 *Frankliniella* 属) に抵抗性を示すことが、本組換えワタの開発過程において確認されている。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*)、ミカンキイロアザミウマ (*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。

そこで、米国でのワタの主要吸汁害虫であるウエスタンターニッシュド
プラントバグ (*L. hesperus*)、コットンフリーホッパー (*P. seriatus*) 及びア
ザミウマ目昆虫 (*Frankliniella* 属) を標的昆虫とし、改変 Cry51Aa2 蛋白質
5 の殺虫活性を調査した (別添資料 2)。

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、摂餌
試験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かったため、
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
10 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にした。
コットンフリーホッパーの生活環 (Breene et al., 1989) をもとに、飼育開始
直後に産卵された卵が成虫まで成育することが可能な期間である 30 日間
15 飼育した後、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 ヶ所の
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
20 施した。米国の 3 ヶ所のほ場において、アザミウマ目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目昆虫を採取
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
25 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, p23~24)。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.*
30 *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 (表 3, p25; 別添資料 2 の 10.4,
p44)。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*)

⁵ アザミウマ目昆虫は、口器によって葉の細胞に穴をあけ、吸汁する。アザミウマ目昆虫による食害の典型的な症状として、葉の縮れ、子葉及び葉の背軸面が銀色になることが観察される。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。

の成虫の数は、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*) の成虫の数の4分の1程度であり、両者の間には統計学的有意差が認められた (表 3, p25)。一方、幼虫における平均生存個体数はいずれの成育ステージにおいても統計学的有意差が認められなかった理由としては、産卵時期のばらつきに伴う成育期間の差によって、後期に産卵された個体は影響を受けるほど本組換えワタに暴露されていないためと考えられた。以上の結果から、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おり、次世代の成虫の個体数の減少はさらに次の世代以降の個体数へも影響すると考えられる。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, p23~24;表 3, p25)。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 4, p25)。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 4.0、3.0 及び 2.7 であり、本組換えワタの方が低かった (表 4, p25)。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。よって、ア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対照の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いことが示された。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*)、ミカンキイロアザミウマ (*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*)、ミカンキイロアザミウマ (*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目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大きく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、ワタを食害していたアザミウマ目昆虫は、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、本組換えワタを含む栽培作物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, p22) に基づいて、以下のように 14 種選定し、摂餌試験による生物検定を行った (別添資料 2)。

各機能群から指標生物を選定する際には、ワタを含む栽培作物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及び文献情報により殺虫活性を示すことが確認されている昆虫目に属する種であること (Romeis et al., 2013; Wach et al., 2016)を考慮した。

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活性から非標的生物への影響を調査する手法は、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、過去に第一種使用等の承認がなされているチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) 等の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。

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ハムシ (*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 (捕食者) 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>

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

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、害虫抵抗性作物の環境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)。

コロラドハムシ (*L. decemlineata*)、ウエスタンコーンルートワーム (*D. 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。

摂餌試験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ハムシ (*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。これら2種 (コロラドハムシ (*L. decemlineata*): 最大投与濃度 400 µg/mL diet, サザンコーンルートワーム (*D. u. howardi*): 最大投与濃度 200 µg/mL diet) に対する活性は、標的昆虫であるウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*: LC₅₀ 3.009 µg/mL diet) で測定された活性に比べて低い (表 2, p23~24)。なお、これらの昆虫種はいずれもワタの害虫ではない。加えて、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, p23~24)。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, p23~24)。

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ハムシ (*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ズプ (*Pediobius foveolatus*) の3種を選定した。

摂餌試験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, p23~24)。インシディアスフラワーバグ (*O. insidiosus*: 最大投与濃度 400 µg/g diet) に対する活性は、標的

昆虫であるウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*: LC₅₀ 3.009 µg/mL diet) で測定された活性に比べて低い (表 2, p23~24)。

一方、改変 Cry51Aa2 蛋白質は、コウチュウ目のピンクスポットドレ
5 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,
p23~24)。

<花粉媒介者>

10 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 (*A. mellifera*) を選定した。

 摂餌試験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, p23~24)。

15 <分解者>

 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種を選定した。

20 摂餌試験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
存及び生育に対して影響を及ぼさないことが確認された (表 2, p23~24)。

25 3. 改変 Cry51Aa2 蛋白質の殺虫スペクトラムのまとめ

 上述したように、改変 Cry51Aa2 蛋白質の標的昆虫及び非標的生物種に
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
ウマ目及びコウチュウ目の3つの目に属する特定の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
30 つの科に属する2種 (ミツバチ科のセイヨウミツバチ (*A. mellifera*) 及びヒ
メコバチ科のユーロフィドワスプ (*P. foveolatus*)) に対して殺虫活性を示
さないことが確認された。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。

35 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)。

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より低い濃度で殺虫活性を示すが (主要殺虫活性範囲)、主要殺虫活性範囲外の昆虫に対する活性はより低く、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特定のカメムシ目昆虫及びアザミウマ目昆虫 (主要殺虫活性範囲) において示されている。主要殺虫活性範囲内のカメムシ目昆虫 (LC₅₀ 3.009 µg/mL diet) には高い活性を示すが、主要殺虫活性範囲外のコウチュウ目及びカメムシ目昆虫 (最大投与濃度 : 400 µg/mL diet (コロラドハムシ (*L. decemlineata*)), 200 µg/mL diet (サザンコーンルートワーム (*D. u. howardi*)) 又は 400 µg/g diet (インシディアスフラワーバグ (*O. insidiosus*))) に対しては、ウエスタンターニッシュドプラントバグ (*L. hesperus*: LC₅₀ 3.009 µg/mL diet) の殺虫活性に比べてより低い活性を示すことが確認されている (表 2, p23~24)。

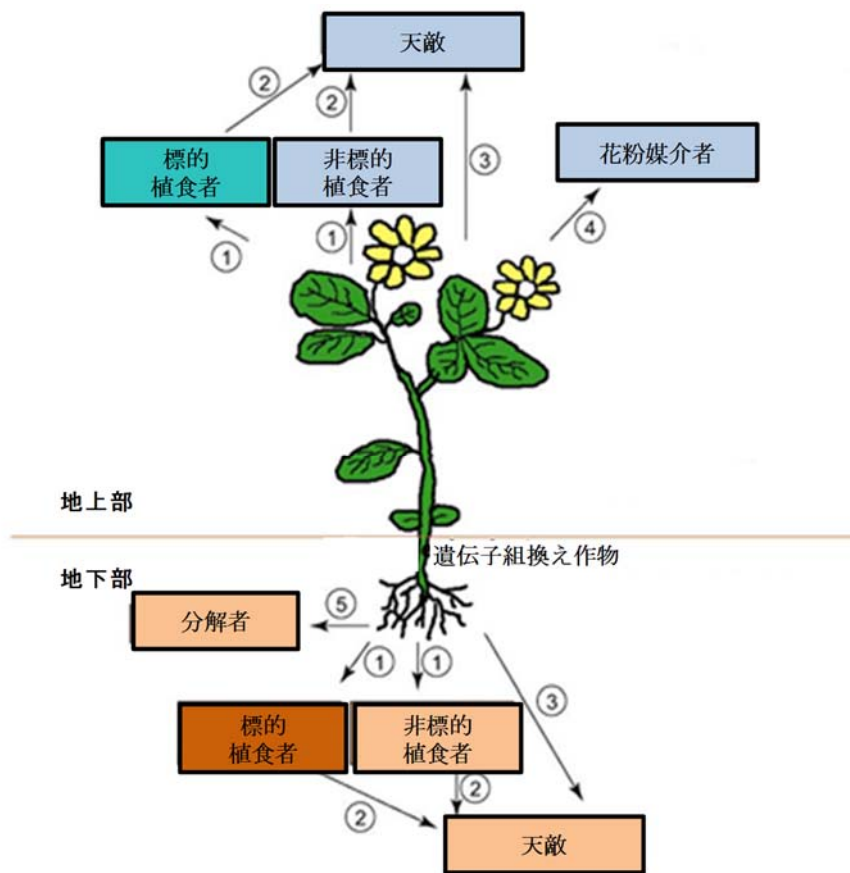


図 2 栽培作物周辺に生息する生物の機能群とその暴露経路 (Kos et al., (2009)より改変)⁷

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

<ul style="list-style-type: none"> ウエ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 (Frankliniella 属) (標的昆虫) コロラドハムシ ウエスタンコーンルートワーム サザンコーンルートワーム 	<ul style="list-style-type: none"> 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 ヨーロッパ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
 - インシ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)
 - インシ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

⁷ 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⁸

目	科	和名/英名 (学名)	機能群	LC ₅₀ の平均値	最大投与濃度	感受性
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>)	植食者 (標的昆虫)	3,009 µg/mL diet	N/A	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>Pseudatomoscelis seriatus</i>)	植食者 (標的昆虫)	N/A	本組換えワタの 発現量 ¹	有
アザミウマ目 Thysanoptera	アザミウマ科 Thripidae	<i>Frankliniella</i> 属	植食者 (標的昆虫)	N/A	本組換えワタの 発現量 ¹	有
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	コロラドハムシ (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	植食者	N/A	400 µg/mL diet	有 ²
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	N/A	1,000 µg/mL diet	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	N/A	200 µg/mL diet	有 ³
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	N/A	400 µg/mL diet	無
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	フォールアーマーワーム (<i>Spodoptera frugiperda</i>)	植食者	N/A	400 µg/mL diet	無
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	コーンイヤールワーム (<i>Helicoverpa zea</i>)	植食者	N/A	400 µg/mL diet	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	N/A	400 µg/mL diet	無
チョウ目 Lepidoptera	コナガ科 Plutellidae	コナガ (<i>Plutella xylostella</i>)	植食者	N/A	400 µg/mL diet	無
カメムシ目 Hemiptera	ハナカメムシ科 Anthoridae	インシディアスフラワーバグ (<i>Orius insidiosus</i>)	捕食者	N/A	400 µg/g diet	有 ⁴
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	N/A	400 µg/mL diet	無

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。

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	N/A	2,000 µg/mL diet	無
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	N/A	400 µg/mL diet	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	N/A	400 µg/g diet	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	N/A	400 µg/g soil DW	無

¹ コットンフリーホッパー (*P. seriatus*) 及び *Frankliniella* 属の感受性試験に関しては植物体を供試しているため、最大投与濃度として「本組換えワタの発現量」と表記しているが、供試した植物体における改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量は測定していない。なお、本組換えワタの葉を含む各組織における改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量を測定した結果は表 6 (p37) に示した。

² 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。

³ 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。

⁴ 最大投与濃度である 400µg/g diet における生存率は 67%であった。

DW= 乾燥重、N/A= 該当なし

表 3 防虫網で覆われた本組換えワタ栽培区及び対照の非組換えワタ (DP393) 栽培区に放したコットンフリーホッパー (*P. seriatus*) における次世代の生存個体数 (2014 年、米国)⁹

5

成育ステージ	平均値 ± SE		p 値 ¹
	本組換えワタ	対照の非組換えワタ (DP393)	
3 齢以下幼虫	4.50 ± 4.08	6.43 ± 2.42	0.7091
4~5 齢幼虫	2.50 ± 1.57	1.43 ± 0.72	0.4766
全幼虫	7.00 ± 5.61	7.86 ± 3.07	0.8909
成虫	3.50 ± 0.89	13.00 ± 3.79	0.0025*
全個体	10.50 ± 5.59	20.86 ± 5.23	0.1610

¹本組換えワタ8個体 (n=8) 及び対照の非組換えワタ7個体 (n=7) について、次世代の生存個体数に関して、成育ステージごとに線形モデルを用いた分散分析により統計処理を行った。

*有意差あり (p<0.05)

SE = 標準誤差

10

表 4 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⁹

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	対照の非組換えワタ (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 ± 0.0	p < 0.0001
中度	バージニア州	0.3 ± 0.04*	2.7 ± 0.5	p < 0.0001

15

*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。

20

SE = 標準誤差

⁹ 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を判断するため、AD_2017¹⁰に登録されている既知のアレルゲンについて、FASTA型アルゴリズム及び連続する8アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、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 (p11~13) 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 *nptII* 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。

¹⁰ AD_2017: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource、2017年2月9日) に登録されている配列から構成されるデータベースで、1,970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

5 本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

10

宿主内に移入された PV-GHIR508523 の構成要素は表 1 (p11~13) 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 (p10) に示した。

15 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

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。この選抜では、T-DNA II 領域の選抜マーカー遺伝子である *aadA* 遺伝子を利用し、スペクチノマイシン耐性を指標とした。

30

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

35 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 PCR¹¹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 (p29) 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。

¹¹ 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

20 図 3 本組換えワタの育成図

(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

5 ① 移入された核酸の複製物が存在する場所

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, p29) 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)

15 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。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、End Point TaqMan PCR

20 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 PCR¹²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

25 に遺伝していることが確認された (表 5, p31)。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

¹² 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 5 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¹³

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
BC ₁ F ₁	267	138	129	133.50	133.50	0.30	0.582
BC ₃ F ₁	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 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 個体数		
BC ₂ F ₂	155	38	75	42	38.75	77.50	38.75	0.37	0.832

¹ 実測値は End Point TaqMan PCR 法により、T-DNA I 領域の有無を確認した。

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)。

¹³ 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製数世代における伝達の安定性

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製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 (NGS (Next Generation Sequencing)) 解析¹⁴ 並びに導入遺伝子領域の 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 解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約 125bp ずつの塩基配列を冗長度¹⁵ 75 以上になるような条件で解析している (図 4 の①, p34)。次に、解析した約 125bp の塩基配列 (リード) 全てを導入用プラスミドの塩基配列と照合¹⁶する (図 4 の②, p34)。この結果において導入用プラスミドと相同性があるリードを選び出し、この選び出されたリードにおいて、T-DNA II 領域及び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, p34)。さらに、導入用プラスミドと相同性を持つリードを選抜し、導入用プラスミド配列に対してアライメントすることで、導入遺伝子と植物ゲノムとの接合領域を特定する (図 4 の③, p34)。仮に 1 コピーの導入遺伝子がゲノムの 1 ヶ所に存在する場合には、導入遺伝子の配列の一部とこれに隣接する植物ゲノム配列の両方を含む接合領域が 2 つ (導入遺伝子の両端) 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で、導入遺伝子の実際の塩基配列及びコピー数を確定することができる。

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 解析に供試した結果、本組換えワタの R₄ 世代で 255.3Gb (冗長度 82)、対照の非組換えワタで 321.8Gb (冗長度 80) の塩基配列を解析することができた (別添資料 6 の Appendix Table 3, p40)。本組換えワタでは 2 つの接合領域が特定され (別

¹⁴ NGS解析は、Illumina社のHiSeq 4000システムを用い、ペアエンド法にて行った。まず、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化し、各フラグメントの両端から125bpずつの塩基配列を決定する (別添資料 6)。次に、これらのフラグメントの塩基配列情報を用い、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領域の導入箇所数と非意図的断片の有無を決定する (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。本試験では、1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標として、その中央値が 75 以上になる条件で解析を行っている。

¹⁶ 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。

添資料 6 の p27)、これらはそれぞれ導入遺伝子の 5'及び 3'末端を含む配列であった (別添資料 6 の Appendix Figure 25, p71~73)。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, p27)。さらに、本組換えワタから得られたリードについて、PV-GHIR508523 の配列と同一であることを 1 塩基ごとに調べた。その結果、T-DNA I 領域では、冗長さの中央値が 79、最低冗長度が 42 で全領域にわたってリードが検出されていた (別添資料 6 の Appendix Figure 4, p45)。また、T-DNA II 領域及び外側骨格領域と相同性をもつリードが含まれていないこと¹⁷が示された (別添資料 6 の Appendix Figure 4, p45)。このことから、本組換えワタの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が組み込まれており、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。

また、本組換えワタにおいて検出された接合領域及び導入遺伝子を含む領域を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、目的の T-DNA I 領域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, p46、Appendix Figure 6, p47~49 及び Appendix Figure 7, p50~53)。

以上をまとめると、本組換えワタの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA I 領域が組み込まれており、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示された。NGS 解析において検出された接合領域は、導入遺伝子に起因する接合領域のみであり、PV-GHIR508523 の外側骨格領域との相同性を持つジャンクション配列は認められなかったことから、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、導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列は PV-GHIR508523 の T-DNA I 領域と同一であることが確認された。

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 解析において、T-DNA I 領域が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 6, p31)。なお、本組換えワタにおける導入遺伝子の模式図を図 5 (p35) に示した。

¹⁷ PV-GHIR508523 の外側骨格領域のうち、OR-ori-pBR322 及び CS-rop にアラインメントされたリードがわずかに存在した (別添資料 6 の Appendix Figure 4, p45) が、このようなリードは、ゲノム DNA の抽出に用いる組織に付着した細菌により生じることが報告されている (Yang et al., 2013; Zastrow-Hayes et al., 2015)。

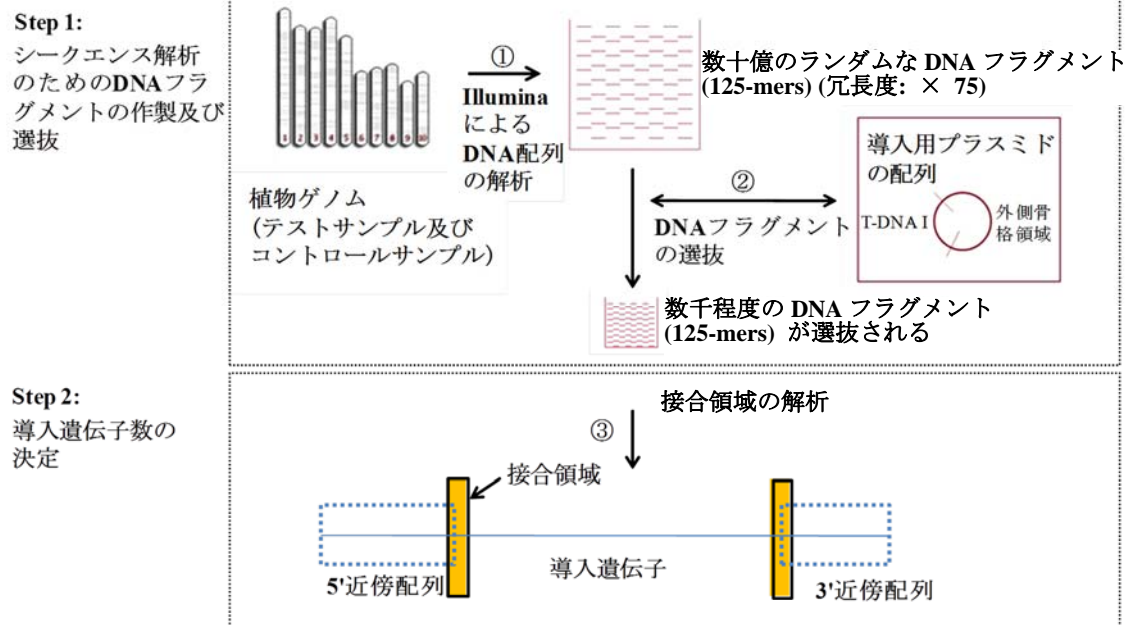


図 4 NGS 解析の解析手法の概念図 (Kovalic et al. (2012)より改変)¹⁸

¹⁸ 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。

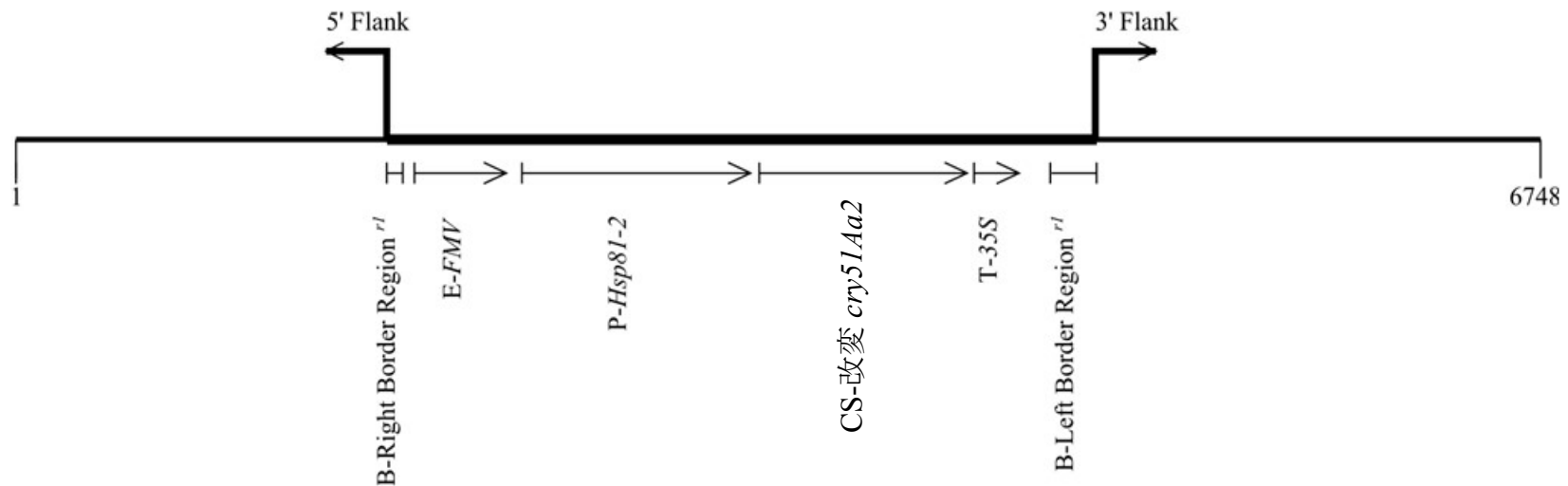


図 5 本組換えワタの導入遺伝子図¹⁹

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。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いる。図中の「rl」の表記は、本組換えワタに導入された T-DNA I 領域における B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が PV-GHIR508523 と比較して短くなっていることを意味する。

5

¹⁹ 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 p27)。

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 年に米国の 5 ヶ所 (アリゾナ州、ルイジアナ州、ミシシッピ州、ノースカロライナ州及びテキサス州) において、4 反復で栽培した本組換えワタの葉、根、花粉及び種子での改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 6, p37; 別添資料 8)。

20 その結果、本組換えワタにおける改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量は 2.0 µg/g DW から 1,700 µg/g DW までの範囲であった (表 6, p37; 別添資料 8)。改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量の平均値は葉 (OSL1) で最も高く、1,200 µg/g DW であった。次いで、葉 (OSL4) の 1,000 µg/g DW、根の 190 µg/g DW、種子の 130 µg/g DW、花粉の 2.6 µg/g DW の順であった。

表 6 本組換えワタの各組織における改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現量 (2015 年、米国)²⁰

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SD) 範囲 (µg/g DW) ³	LOQ/LOD (µg/g DW) ⁴
葉 (OSL1)	2 ~ 6 葉期	1200 (380) 550-1700	0.078/0.010
葉 (OSL4)	開花期	1000 (160) 700-1300	0.078/0.010
根	開花期	190 (41) 150-290	0.078/0.028
花粉	開花期	2.6 (0.41) 2.0-2.9	0.078/0.016
種子	成熟期	130 (17) 91-170	0.078/0.021

¹OSL = over season leaf (葉)

5 ²採取した各組織の生育段階

³蛋白質の発現量は、平均値及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は、組織の乾燥重 1g 当たりの µg で表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (最小値 - 最大値) は、全てのは場で採取されたそれぞれの組織の値を基に計算されている (花粉以外は n = 20、花粉は各ほ場 4 反復のサンプルをまとめたため n = 5)。SD = 標準偏差, DW = 乾燥重

10 ⁴ LOQ = limit of quantitation (定量限界) ; LOD = limit of detection (検出限界)

²⁰ 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なプライマーを用いて、Real-Time TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 9; 別添資料 10, p8)。

15

本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.006 % である (別添資料 10, p13)。

本 PCR 法の信頼性については米国モンサント・カンパニーと米国 Eurofins BioDiagnostics 社において検証され、確認されている (別添資料 10 の p18~21)。

(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

25

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。

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²¹

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。

²¹ 本項目中の以下に続く a~g 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 。

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。

5 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
10 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。実際に、
農林水産省により 2014~2016 年に実施された、輸入されたワタ種子の管理状
況や流通時のこぼれ落ちに起因すると考えられるワタの生育実態等調査の結
15 果、流通時にワタの種子がこぼれ落ち、当該種子が発芽・生育することはあ
りうるが、これまでの知見のとおり、ワタはわが国の自然条件下における自
生は難しいと結論されている (農林水産省, 2017a; 農林水産省, 2017b)。

2017 年から 2018 年にかけて、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔
15 離ほ場 (以下、「本隔離ほ場」という。) において本組換えワタの隔離ほ場試
験を行った。隔離ほ場試験には、本組換えワタの R₇ 世代を供試した (図 3,
p29)。対照の非組換えワタとしては、本組換えワタと同様の遺伝的背景を持
つ品種 DP393 を用いた。なお、生育初期における低温耐性試験 (第一の 2-(6)-
②-b, p39~40) は、2015 年に米国の人工気象室において実施した。

20 a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を評価するため、9 項目 (開花始め (月日)、葉形、地
上部の乾燥重 (g)、開じよ前のさく (果実) の形状、成熟期 (月日)、主茎長
(cm)、主茎節数、繊維 (綿毛) の色、種皮の色) について調査した。

25 統計処理を地上部の乾燥重 (g)、主茎長 (cm) 及び主茎節数に関して行い、
開花始め (月日)、葉形、開じよ前のさくの形状、成熟期 (月日)、繊維の色、
種皮の色に関しては量的なばらつきがない項目であるため、統計処理を行わ
なかった。

30 その結果、いずれの項目においても、本組換えワタ及び対照の非組換えワ
タとの間に統計学的有意差及び違いは認められなかった (別添資料 11の表
3, p11)。

b 生育初期における低温耐性

35 生育初期における低温耐性試験は、米国のモンサント・カンパニーの人工
気象室において実施した。生育初期における低温耐性を比較するために、3

5 葉期の本組換えワタ、対照の非組換えワタ DP393 及び従来商業品種 4 品種の
幼苗を日中 10°C/夜間 5°C に設定した人工気象室で栽培した。低温条件で 10
日目及び 20 日目に生育段階及び主茎長を調査した。また、低温処理 20 日目
の個体は、乾燥重の測定も行った。統計処理を主茎長及び乾燥重に関して行
い、生育段階に関しては、供試個体の生育状況を把握するための指標である
ため、結果の記載にとどめた。

その結果、統計処理を行った項目については、低温処理 20 日目の乾燥重に
10 において本組換えワタと対照の非組換えワタの間に統計学的有意差が認められ
た (別添資料 12 の Table 2, p6)。

乾燥重の平均値は、本組換えワタが 1.1 g、対照の非組換えワタが 1.7 g で
あり、本組換えワタのほうが低かった (別添資料 12 の Table 2, p6)。

また、本組換えワタと対照の非組換えワタの生育段階は、低温処理 10 日目
ではともに 4 葉期、20 日目では本組換えワタは 4 葉期、対照の非組換えワタ
は 4~5 葉期であったので違いはないと考えられた (別添資料 12 の Table 2, p6)。

15 c 成体の越冬性

本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタを成熟期の後
も引き続き生育させ、わが国の冬期における生育状況を観察した。2018 年 1
20 月 9 日に越冬性調査区において栽培された個体を観察した結果、本組換えワ
タ及び対照の非組換えワタのいずれも枯死していた (別添資料 11 の図 8,
p14)。

25 d 花粉の稔性及びサイズ

本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタから採取した
花粉を Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを調査した。
これらの項目について統計処理を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及びサイ
ズのいずれの項目においても、本組換えワタ及び対照の非組換えワタとの間
30 に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の図 9 及び表 4, p15)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

生産量 :

35 本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタについて、種
子の生産量に関する項目 (1 個体当たりのさく数、さく当たりの種子数、さ

く当たりの種子重及び 100 粒重) を調査した。これらの項目について統計処理を行った結果、すべての項目において本組換えワタと対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の表 5, p16)。

5 脱粒性 :

本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタを成熟期に脱粒の有無やその程度を目視で観察した。その結果、本組換えワタ及び対照の非組換えワタのいずれも、収穫時の種子はともに繊維に絡み合っ分離しにくく、自然条件下での脱粒は確認されなかった。

10

休眠性及び発芽率 :

本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタの収穫種子を発芽試験に用いるため、種子から手で出来るだけ綿毛を取り除いた後、表面に残っている短い繊維 (リンター) を硫酸で取り除き、乾燥後に常温保存した。その後、水で湿らせた発芽シート上に種子を並べて置き、発芽シートをロール状に巻いて、30°C に設定した恒温器内で 8 日間保管した。8 日後に発芽種子数を数えた。その結果、本組換えワタと対照の非組換えワタの発芽率は 85.3%、89.5% であり、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の表 5, p16)。

15

20

f 交雑率

日本には本組換えワタが属する *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属の近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

25

g 有害物質の産生性

本組換えワタから土壤微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、土壤微生物相試験の糸状菌数においてのみ本組換えワタ区と対照の非組換えワタ区の間で統計学的有意差が認められた。糸状菌数の平均値は本組換えワタ区が 9.40×10^4 CFU/g、対照の非組換えワタ区が 7.45×10^4 CFU/g であり、本組換えワタの方が多かった (別添資料 11 の表 6, p17)。

30

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

5 食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

10 —

(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

15 —

(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

20 申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

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

25 —

(6) 国外における使用等に関する情報

30 本組換えワタの海外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は以下のとおりである (表 7, p43)。

35

表 7 本組換えワタの海外における申請予定²²

2018年9月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2017年3月	審査中
米国農務省 (USDA)	環境	■ ²³	■ ²³
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2017年7月	審査中
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2017年7月	審査中
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2017年9月	2018年8月

5

なお、本組換えワタのわが国における申請状況は以下のとおりである (表 8, p43)。

表 8 本組換えワタのわが国における申請及び認可状況²⁴

10

2018年9月現在

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ²⁵	2018年3月	—
農林水産省	飼料 ²⁶	2018年3月	—
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 ²⁷ : 隔離ほ場)	2016年6月	2017年5月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程: 一般使用)	2018年6月	—

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。

²³ 社外秘につき非開示。

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。

²⁵ 食品衛生法に基づく。

²⁶ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

²⁷ 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に基づく。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²⁸

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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 (OECD, 2008; OGTR, 2008)。実際に、オーストラリアでは、
10 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いるが、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
15 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。実際に、農林水産省により 2014~2016 年に実施された、輸入されたワタ種子の管理状況や流通時のこぼれ落ちに起因すると考えられるワタ
20 の生育実態等調査の結果、流通時にワタの種子がこぼれ落ち、当該種子が発芽・生育することはありうるが、これまでの知見のとおり、ワタはわが国の自然条件下における自生は難しいと結論されている (農林水産省, 2017a; 農林水産省, 2017b)。

競合における優位性に関する項目として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国の隔離ほ場において調査した (第一の 2-(6)-②-a, c~e, p39~41)。その結果、全ての項目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及び違いは認められなかった。一方、生育初期における低温耐性 (第一の 2-(6)-②-b, p39~40) を米国において調査した結果、乾燥重において本組換えワタと対照の非組換えワタの間に統計学的有意差が認められた。

30

²⁸ 本項目中で、第一の2-(6)-②のa~gに記載された試験結果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 生育初期における低温耐性試験で低温処理 20 日目の乾燥重の平均値は、本組換えワタが 1.1 g、対照の非組換えワタが 1.7g であり、本組換えワタのほうが低かった (別添資料 12 の Table 2, p6)。よって、本試験で認められた生育初期における低温耐性の違いが本組換えワタの競合における優位性を高めることはないと考えられた。

10 本組換えワタには、改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現によりカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性が付与されている。しかし、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫による食害のみがわが国の自然条件下においてワタの生育を困難にさせる要因ではない。また、本組換えワタの隔離ほ場及び米国の人工気象室における試験において、第一の 2-(6)-②-b、c、e (p39~41) の項目に記載した本組換えワタの自然環境下における生存に関する形質 (b. 生育初期における低温耐性、c. 成体の越冬性、e. 種子の脱粒性、休眠性及び発芽率) に本組換えワタの競合における優位性を高めるような違いは認められていない。よって、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が付与された要因のみで、これまで栽培種として品種改良されてきたワタが、わが国の自然条件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、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。

25 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

30 —

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

35 以上のことから、本組換えワタは、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。

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

5

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ッ
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。また、
10 ワタがわが国で自生化したという報告はされていない。実際に、農林水産省
による3年間のワタの生育実態等調査の結果、流通時にこぼれ落ちたワタの
種子が自生する可能性は低いことが示され、わが国の自然条件下における自
生は難しいと結論されている(農林水産省, 2017a; 農林水産省, 2017b)。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
15 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。

本組換えワタ及び対照の非組換えワタについて、有害物質の産生性の有無
を比較検討するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験(第一の
20 2-(6)-②-g, p41)を行った。その結果、土壤微生物相試験の糸状菌数において
のみ統計学的有意差が認められた(別添資料11の表6, p17)。糸状菌数の平均
値は本組換えワタ区が 9.40×10^4 CFU/g、対照の非組換えワタ区が $7.45 \times$
 10^4 CFU/g であり、本組換えワタ区の方が多かった(別添資料11の表6, p17)。
このことから、本組換えワタの有害物質の産生性が高まっていることを示す
25 ような違いではないと考えられた。また、糸状菌数以外の有害物質の産生性
における項目では、本組換えワタ区と対照の非組換えワタ区との間に統計学
的有意差は認められなかった(別添資料11の表6~表8, p17~18)。

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
30 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(第一の
2-(1)-ロ-②, p26)。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
35 と考えられた。

本組換えワタで発現する改変 Cry51Aa2 蛋白質は、第一-2-(1)-ロ-② (p14~26) 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、環境省レッドリスト 2018 (環境省, 2018) 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込まれた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も影響を受ける可能性のある種の対象から外した。

10

15

その結果、カメムシ目昆虫において、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昆虫種として4種が特定された (表 9, p48)。また、カメムシ目昆虫の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 10, p49~50)。コウチュウ目昆虫については、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昆虫種として8種が特定された (表 11, p51~52)。また、コウチュウ目昆虫の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 12, p53~56)。なお、アザミウマ目昆虫については、環境省レッドリスト 2018 (環境省, 2018) に掲載がなかった。

20

表 9 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²⁹

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 ヲ所、栃木県大田原市の 1 ヲ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 (グンバイウンカ科)	<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

*環境省レッドリスト 2018 昆虫類 (環境省, 2018) 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。

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。

表 10 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³⁰

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。
ツマグロマキバサシガメ (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。

³⁰ 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 キノウ (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>Rhynchocoris 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。

*環境省レッドリスト 2018 昆虫類 (環境省, 2018)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 11 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³¹

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)			
ヒサマツサイカブト (コガネムシ科)	<i>Oryctes hisamatsui</i>	南大東島のみから知られる。南大東島において細くベルト状に残された防風林で発生していた。	幼虫はビロウヤシを利用しているものと推測される。ビロウは本種の食樹と推定される。
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>Stenygrinum 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。

³¹ 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 *環境省レッドリスト 2018 昆虫類 (環境省, 2018) 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; 2011) 林ら (2005; 2012a); 環境省 (2006; 2010; 2012); 大林ら (2007); 中根ら (2007) 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 12 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³²

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上に生息する。 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) と母島の上に生息する。 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上に知られる。 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
アオヘリアオゴミムシ (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ミムシ (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) と母島の上に生息する。 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>	小笠原諸島の聳島だけに分布する。 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>	小笠原諸島の聳島列島 (聳島・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。

³² 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 12 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る。乾燥にも強いと推定される。	不明
ボンヒメハナノミ (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) と母島のみが生息する。 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 12 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</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 12 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 tosawai</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。 周囲に湿性草地在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

*環境省レッドリスト 2018 昆虫類 (環境省, 2018) 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; 2011) 林ら (2005; 2012a); 環境省 (2006; 2010; 2012); 大林ら (2007); 中根ら (2007) 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。

5

(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、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を発揮するが、殺虫活性の感受性試験の結果からも明らか
かなように、その活性は種によって異なる (表 2~表 4, p23~25)。

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 4, p23~25)。

15 また、主要殺虫活性範囲外の昆虫であるコウチュウ目ハムシ科に属するコロラドハムシ (*L. decemlineata*)、サザンコーンルートワーム (*D. u. howardi*)
及びカメムシ目ハナカメムシ科のインシディアスフラワーバグ (*O. insidiosus*) に対する改変 Cry51Aa2 蛋白質の最大投与濃度は、それぞれ 400
µg/mL diet、200 µg/mL diet 及び 400 µg/g diet であった (表 2, p23~24)。

(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 9~表 12, p48~56) が本組換えワタから飛散した花粉又は鋤込まれた植物体を食餌することにより
集団で影響を受ける可能性について、下記のように検討した。

25

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。実際に、
農林水産省によるワタの生育実態等調査の結果、流通時にこぼれ落ちたワタ
30 の種子が、自生する可能性は低いことが示され、わが国の自然条件下にお
ける自生は難しいと結論されている (農林水産省, 2017a; 農林水産省, 2017b)。

35

さらに、第二の 1-(1) (p44~p45) では、わが国の隔離ほ場における競合にお
ける優位性に関する調査及び米国の人工気象室における生育初期における低
温耐性試験の結果から、本組換えワタの競合における優位性が高まっている
ことを示す結果は得られなかったことから、他のワタ品種と同様に、本組換
えワタがわが国の自然条件下で自生する可能性は低いと考えられる。

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まれた植物体を食餌することにより集団で影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

5

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えワタは、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。

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。

20

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(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を生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

35

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

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
5 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（OECD, 2008; OGTR, 2008）。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いるが、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.,
10 2007）。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。実際に、農林水産省により 2014~2016 年に実施
された、輸入されたワタの種子の管理状況や流通時のこぼれ落ちに起因すると
考えられるワタの生育実態等調査の結果、流通時にワタの種子がこぼれ落ち、
15 当該種子が発芽・生育することはありうるが、これまでの知見のとおり、ワタ
はわが国の自然条件下における自生は難しいと結論されている（農林水産省、
2017a; 農林水産省, 2017b）。

本組換えワタ及び対照の非組換えワタとの間で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、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉
20 の稔性（充実度）及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）を比
較検討した結果、生育初期における低温耐性試験の乾燥重において統計学的有
意差が認められた。

検討の結果、生育初期における低温耐性試験での乾燥重については、本組換
えワタの平均値が対照の非組換えワタと比べて低かったことから、本組換えワ
タの生育初期における低温耐性は、対照の非組換えワタを上回るものではない
25 と考えられた。よって、この認められた有意差により、本組換えワタの競合に
おける優位性が高まることはないと考えられた。

本組換えワタには、改変 Cry51Aa2 蛋白質の発現によるカメムシ目、アザミウ
マ目及びコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、これら特定の害
30 虫に対する抵抗性付与の要因のみによって、これまで栽培種として品種改良さ
れてきたワタが、わが国の自然条件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。

したがって、本組換えワタ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。

35

有害物質の産生性：

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ッシ
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
5 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。

10

本組換えワタと対照の非組換えワタとの間において、有害物質の産生性の有
無を土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討した。その結
果、土壤微生物相試験の糸状菌数において統計学的有意差が認められたが、糸
状菌数の平均値は本組換えワタ区の方が対照の非組換えワタ区よりも多かった
15 ことから、本組換えワタの有害物質の産生性が高まっていることを示すような
違いではないと考えられた。

20

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しているため、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ないと考えられた。

25

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のうち絶滅危惧種・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込まれた本組換えワタの
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
30 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 8 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
35 省レッドリスト 2018 (環境省, 2018) に掲載がなかった。

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。さらに、農林水産省によるワタの生育実態等調査の結果、流通時にこぼれ落ちたワタの種子が、自生する可能性は低いことが示され、わが国の自然条件下における自生は難しいと結論されている (農林水産省, 2017a; 農林水産省, 2017b)。

わが国の隔離ほ場における競合における優位性に関する調査及び米国の人工気象室における生育初期における低温耐性試験の結果から、本組換えワタの競合における優位性が高まっていることを示す結果は得られなかったことから、他のワタ品種と同様に、本組換えワタがわが国の自然条件下で自生する可能性は低いと考えられた。

上記のことから、第二の 2-(1) (p46~56) で特定されたカメムシ目及びコウチュウ目昆虫が、集団で本組換えワタから飛散する花粉又は鋤込まれた植物体を食餌することにより影響を受ける可能性は極めて低いと判断された。

以上のことから、本組換えワタは、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。

20

交雑性：

わが国において、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無いため、影響を受ける可能性のある野生植物は特定されない。したがって、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それはないと判断された。

25

以上のことから、本組換えワタを第一種使用規程に従って使用した場合に、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。

30

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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35

- Breene, R.G., W.R. Martin, D.A. Dean and W.L. Sterling. 1989. Rearing methods for the cotton fleahopper. *Southwestern Entomologist* 14: 249-253.
- 5 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.
- 10 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.
- 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.
- 15 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
20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 Gowda, A., T.J. Rydel, A.M. Wollacott, R.S. Brown, W. Akbar, T.L. Clark, S. Flasiniski, J.R. Nageotte, A.C. Read, X. Shi, B.J. Werner, M.J. Pleau and J.A. Baum. 2016. A transgenic approach for controlling *Lygus* in cotton. *Nature Communications* 7: 12213.

- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 Johansson, T.S.K. 1959. Tracking honey bees in cotton fields with fluorescent pigments. *Journal of Economic Entomology* 52: 572-577.
- Kandyliis, K., P.N. Nikokyris and K. Deligiannis. 1998. Performance of growing-fattening lambs fed whole cotton seed. *Journal of the Science of Food and*
 20 *Agriculture* 78: 281-289.
- 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 Moar, W.J., A.J. Evans, C.R. Kessenich, J.A. Baum, D.J. Bowen, T.C. Edrington, J.A. Haas, J.-L.K. Kouadio, J.K. Roberts, A. Silvanovich, Y. Yin, B.E. Weiner, K.C. Glenn and M.L. Odegaard. 2017. The sequence, structural, and functional diversity within a protein family and implications for specificity and safety: The case for ETX_MTX2 insecticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 142: 50-59.

25 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.

30 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.

35 OECD. 2004. 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.

5 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.

10

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.

15

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.

20 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.

25 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.

Robertson, B., C. Bednarz and C. Burmester. 2007. Growth and development – First 60 days. *Cotton Physiology Today*. Newsletter of the Cotton Physiology Education Program. Volume 13. National Cotton Council, Memphis, Tennessee.

30

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

35 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.

USDA-FAS. 2018. Cotton area, yield, and production. U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Washington, D.C. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/home> [Accessed February 19, 2018].

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 25: 499-505.

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.
- 5 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.
- 10 Yang, L., C. Wang, A. Holst-Jensen, D. Morisset, Y. Lin and D. Zhang. 2013.
Characterization of GM events by insert knowledge adapted re-sequencing approaches.
Scientific Reports 3: 2839.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes,
T.A. Richmond, J.A. Jeddloh, G.D. May and M.K. Beatty. 2015.
Southern-by-sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of
genetically modified crops. Plant Genome 8: 1-15.
- 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
- 30 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 大阪
- 大林延夫・新里達也 (編) 2007 日本産カミキリムシ 東海大学出版会 神奈
川
- 35 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 2012 生物多様性情報システム絶滅危惧種情報検索
5 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
10
- 環境省 2018 環境省レッドリスト 2018
<http://www.env.go.jp/press/files/jp/109278.pdf> [Accessed June, 2018]
- 小島圭三・林匡夫 1969 原色日本昆虫生態図鑑 I 保育社 大阪
15
- 財務省 2018 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
[Accessed Mar 6, 2018]
- 島根県 2004 しまねレッドデータブック
20 <http://www1.pref.shimane.lg.jp/contents/rdb/rdb2/cnt/cnt99b.html> [Accessed Oct, 2012]
- 巽二郎・石井龍一 (編) 2000 ワタ 作物学 (II) - 工芸・飼料作物 - 文永堂
出版 東京
- 25 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
30
- 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 東
京
- 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 東
35 京

- 農林水産省 2017a 「平成 26 年度及び平成 27 年度ワタの生育実態等調査」の結果について <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/170214-1.pdf> [Accessed Mar, 2018]
- 5 農林水産省 2017b 「平成 28 年度ワタの生育実態等調査」の結果について <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/171129-1.pdf> [Accessed Mar, 2018]
- 10 野尻湖昆虫グループ 1985 アトラス・日本のネクイハムシ—化石同定への手引き— 野尻湖昆虫グループ 大阪
- 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
- 15 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—全種の解説— 月刊むし 408 pp. 2-18
- 20 林成多 2012a 日本のネクイハムシ むし社 東京
- 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—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
- 25 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]
- 30 堀田満 1989 世界有用植物事典 平凡社 東京
- 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 30 年 6 月 20 日

5

氏名 日本モンサント株式会社
 代表取締役 ダビッド・ブランコ
 住所 東京都中央区京橋二丁目 5 番 18 号

10 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。

15

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。

20 平成30年 6 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 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 バイオ規制・環境部 業務調整課 課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 規制調整課 課長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 申請・登録課 課長

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性がある関係各者から情報収集を行う。

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

10

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換えワタの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

15 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

20 生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換えワタが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えワタに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25

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示唆された場合、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。

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)
5
- 別添資料 2 Amended Report for MSL0027357: Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of the Cry51Aa2.834_16 Protein Against a Range of Invertebrate Taxa (MSL0029129) (社外秘)
- 10 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 MON 88702 (MSL0027099) (社外秘)
15
- 別添資料 5 Amended Report for MSL0026822: Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Insect-protected Cotton MON 88702 Across Three Generations (MSL0027485) (社外秘)
- 20 別添資料 6 Amended Report for MSL0028391: Molecular Characterization of Insect Protected Cotton MON 88702 (MSL0029612) (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)
25
- 別添資料 8 Assessment of Cry51Aa2.834_16 Protein Levels in Cotton Tissues Collected from MON 88702 Produced in United States Field Trials During 2015 (MSL0027766) (社外秘)
30
- 別添資料 9 A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 88702 (社外秘)
- 別添資料 10 In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan® PCR for MON 88702” for Global Submissions (VOP-2016-0003) (社外秘)
35

- 別添資料 11 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) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)
- 5
- 別添資料 12 Assessment of the Effect of Cold Stress on the Growth of MON 88702 Cotton under Controlled Environmental Conditions (MSL0027799) (社外秘)
- 10