

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*cry1F*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) lltis) (1507×NK603, OECD UI : DAS-Ø15Ø7-1×MON-ØØ6Ø3-6) 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

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..... 2

(2) 使用等の歴史及び現状..... 2

(3) 生理学的及び生態学的特性..... 3

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報..... 5

(2) ベクターに関する情報..... 9

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 10

(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... 13

(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..... 15

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 15

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..... 19

(2) 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..... 19

(3) 国外における使用等に関する情報..... 19

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性..... 20

2 有害物質の産生性..... 21

3 交雑性..... 25

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 26

緊急措置計画書..... 28

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 8 月 1 7 日

農林水産大臣 亀井 善之 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名
デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生
申請者
住所
東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号
山王パークタワー

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	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (<i>cry1F</i> , <i>pat</i> , <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (1507×NK603, OECD UI : DAS-Ø15Ø7-1×MON-ØØ6Ø3-6)
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、栽培、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り収集した情報

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

イ 分類学上の位置付け

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：Corn, maize

学名：*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis

ロ 宿主の品種名又は系統名

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*cry1F*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (1507×NK603, OECD UI : DAS-Ø15Ø7-1×MON-ØØ6Ø3-6) (以下、スタック系統 1507×NK603 と表記)は、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*cry1F*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (*B.t.* Cry1F maize line 1507, OECD UI : DAS-Ø15Ø7-1) (以下、Cry1F line 1507 と表記) と除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (NK603, OECD UI : MON-ØØ6Ø3-6) (以下、NK603 と表記) を、従来の一世代雑種育種法を用いて育成し、育成された自殖系統同士を互いに交配させた雑種品種である。親系統である Cry1F line 1507 の宿主には、トウモロコシ品種 A188×B73 の Hi-II カルスを用い、NK603 の宿主にはトウモロコシ品種 AW×CW を用いた。

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

自然環境において、トウモロコシが自生している地域は、国内・国外ともに知られていない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史

現在トウモロコシの原産地について決定的な説はないが、一般的には紀元前 5,000 年頃の中南米が起源と考えられている。また、植物学的起源についても決定的な説はないが、育種過程で、メキシコ、グアテマラ、ホンジュラス地域で雑草として生育しているテオシント (*teosinte*, *Zea mays* subsp. *mexicana* (Schrader) Iltis) から派生したとする説が有力とされている。1492 年のコロンブスの新大陸発見を機に、ヨーロッパ、アフリカ大陸そしてアジアへと伝播し、現在では広く栽培され、食品、飼料等として利用されている。

トウモロコシは、我が国においても長い栽培の歴史がある。我が国への伝来は、天正年間 (1580 年頃) に、ポルトガル人が四国に伝えたのが最初であると言われてお

り、その後、九州や本州でも栽培されるようになった。明治時代に、北海道開拓使によって、近代的品種が米国から輸入されるようになり、現在では、北海道から九州まで、広く栽培されている。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

トウモロコシの主な栽培地域は北海道、岩手県、熊本県、宮崎県等である。栽培面積が最も大きいのは北海道で、全体の約40%を占める。国外においては、米国、中国、ブラジル、ロシア等を中心に、北緯55度から南緯40度に至る広い範囲で栽培されている。

トウモロコシは、米国を代表的な例とする、大規模な機械化された近代的方法から、古くから南米アンデス高地等で行なわれているような伝統的な方法まで、多種多様な方法で栽培されている。

トウモロコシはコメ、コムギと共に世界三大穀物の一つと言われている。2002年の世界総生産量は約6億441万トンである。最大の生産国は米国で、全世界の生産量の38%を占めている。2002年の統計によれば、我が国は約1,642万トンのトウモロコシを輸入しており、ほぼ100%がデント種である。輸入量の92%にあたる約1,518万トンが米国からの輸入である。輸入されたトウモロコシは、そのほとんどが、ベルトコンベアでそのまま港に隣接している食品・飼料の加工工場に運ばれる。

トウモロコシは、大きく分けてスイートコーンとデント種トウモロコシに分類することができる。スイートコーンは、生食用及び缶詰用として利用されている。デント種トウモロコシは、大きく分けて飼料用及び加工用として利用されている。2002年に我が国に輸入されたトウモロコシのうち、約1,230万トンが飼料として用いられ、残りが澱粉や油等の原料に加工されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシは、温暖で適度な降水量があり、日射量の多い気候に適する。生育最適温度は20～30℃とされている。気温が10℃に下がるとほとんど生長せず、生育後期に零下3℃以下になると枯死する。出穂前後の1ヶ月間は最も水分の消費量が多く、干ばつによる害を受けやすい。

基本的に、どのような土壌でも栽培が可能であるが、肥沃で、透水性、通気性に優れた土壌を最も好む。最適土壌pHは6.0～6.5で、pHの調整のために炭酸カルシウムが施肥されている。

ロ 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

トウモロコシの雌穂は苞皮で覆われているため、自然に種子が脱粒し、拡散する可能性は極めて低い。

トウモロコシ種子には休眠性はない。発芽の最低温度は6~11℃で、最高は42~43℃、最適温度は33℃とされている。上述のように、自然に種子が脱粒する可能性は極めて低く、仮に脱粒した場合でも、土壤中での種子の寿命は短く、翌年の春に発芽する可能性は極めて低い。

- 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

トウモロコシには、これらの特性は知られていない。

- ③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無及び近縁野生種との交雑性

トウモロコシは種子繁殖を行い、98~99%が他家受粉である。自家不和合性は知られていない。また、我が国ではトウモロコシと交雑可能な近縁野生種（テオシント）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

雄穂あたりの花粉の生産量は、およそ1,800万粒と推定されている。花粉は球形で、直径はおよそ90~100 μ mである。受粉は風媒によって行なわれる。花粉の飛散距離は、最大で200~800mとされている。トウモロコシ花粉の堆積密度を調べたいくつかの研究によれば、トウモロコシの開花期間中、同一方向に絶えず秒速3mの風が吹き続けたと仮定した時の風下における、最大堆積花粉数の累積値は、ほ場から10m離れた場所では約4,000粒/cm²と推計され、畑端の約15,000粒/cm²の約1/4となる。この値は、ほ場からの距離別に堆積する花粉密度の推定最大値で、調査対象地域において、確率的に20年に一度の頻度でしか起こり得ないような風速条件下での推定値であり、これ以上の堆積はないという限界値を示している。実際に、野外において花粉の飛散・堆積程度を調べた実験では、Hansen&Obrycki(2000)は葉上に堆積した花粉密度は、ほ場から3m離れると最大35粒/cm²(累積)になり、Pleasantsら(2001)は2m離れると14.2粒/cm²になると報告している。さらに、トウモロコシ畑から10m離れると、花粉のヒマワリ葉上における堆積密度は、畑内の81.7粒/cm²から0.3粒/cm²(約1/272)へと激減することが示されている。

花粉は通常、乾燥、高温に弱く、水分を失うと稔性に影響するため、開花後は速やかに受粉する必要がある。晴天の場合、午前10時~11時頃が花粉の放出が最も盛んとなり、午後になると激減する。

トウモロコシの花粉の寿命は、通常10分~30分程度であるが、気温及び湿度の条件が整えば、30分以上と言われている。

ハ 有害物質の産生性

自然条件下で、周囲の野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすような有害物質の産生は知られていない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

親系統である Cry1F line 1507 は、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社によって共同開発された。一方、NK603 は米国モンサント社によって開発された。スタック系統 1507×NK603 は、従来の一世代雑種育種法を用いて育成された Cry1F line 1507 と NK603 の自殖系統同士を、従来の交雑育種法により交配させた雑種品種である。

スタック系統 1507×NK603 は、Cry1F line 1507 由来のチョウ目害虫に対する抵抗性を付与するための *cry1F* 遺伝子及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与するための *pat* 遺伝子、並びに、NK603 由来の除草剤グリホサートに対する耐性を付与するための *cp4 epsps* 遺伝子によって付与される特性を併せ持つ。

なお、我が国において、Cry1F line 1507 は 2002 年 6 月に「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」（以下「指針」）に基づき、開放系における利用計画が指針に適合していることが確認されている。同様に NK603 も、2001 年 5 月に開放系における利用計画が指針に適合していることが確認されている。また親系統 Cry1F line 1507 及び NK603 については、2004 年 2 月に施行された「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 2 項の規定に基づく第一種使用の承認申請が既に行なわれており、生物多様性影響評価検討会において、個別に、本スタック系統 1507×NK603 の申請と同一の第一種使用等をした場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。そのため、本評価書の作成にあたっては、Cry1F line 1507 に関する個別情報は 2004 年 6 月 11 日付けで申請された生物多様性影響評価書から、また、NK603 に関する個別情報は、モンサント社により作成された情報であることから、公開されている検討結果及び資料に基づいて、それらの概要を記載した。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

Cry1F line 1507 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表 1（6 ページ）に、NK603 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表 2（7 ページ）に、それぞれ示したとおりである。

表 1 Cry1F line 1507 の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット		
<i>UBIZM1(2) Promoter</i>	1.98	トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター (イントロン及び 5'非翻訳領域を含む)。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>cry1F</i>	1.82	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 由来の Cry1F 蛋白質をコードする遺伝子。
<i>ORF25PolyA Terminator</i>	0.72	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> pTi5955 由来のターミネーター領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
<i>CAMV35S Promoter</i>	0.53	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター領域。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>pat</i>	0.55	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT 蛋白質) をコードする遺伝子。
<i>CAMV35S Terminator</i>	0.21	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S ターミネーター領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

表 2 NK603 の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来

構成要素	サイズ(kbp)	由来及び機能
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット①		
P-ract 1	0.9	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子を発現させる。
ract 1 intron	0.5	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。スプライシングの効率を高めることによって、目的遺伝子を発現させる。
CTP 2	0.2	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	1.4	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。
NOS 3'	0.3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット②		
E35S	0.6	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
ZmHsp70 intron	0.8	トウモロコシの熱ストレス蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。ZmHsp70 イントロンは植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる。
CTP 2	0.22	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
<i>cp4 epsps</i>	1.36	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。
NOS 3'	0.26	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

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

Cry1F line 1507 及び NK603 の目的遺伝子、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は、表 1（6 ページ）及び表 2（7 ページ）の通りである。

- 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

a. Cry1F 蛋白質

Cry1F 蛋白質は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis*（以下 *B.t.*）が産生する、 δ -エンドトキシンとして知られる殺虫性結晶蛋白質（*B.t.*蛋白質）の一種である。*B.t.*蛋白質は、その殺虫活性に基づいて分類されており、Cry1F 蛋白質は、European corn borer（ヨーロッパアワノメイガ、*Ostrinia nubilalis*）等のチョウ目害虫に対して殺虫効果を示す。Cry1F 蛋白質は、他の *B.t.* 蛋白質と同様に、標的害虫が経口摂取すると、害虫の中腸細胞に存在する特異的受容体に結合し、細胞に小孔を形成することでイオンチャンネルを破壊し、結果的に中腸細胞を破壊し、殺虫効果を示す。一方、Cry1F 蛋白質はチョウ目昆虫以外の非標的生物に対し毒性を持たないことが確認されている。なお、Cry1F 蛋白質に既知のアレルゲン蛋白質との構造相同性は認められていない。

b. PAT 蛋白質

PAT 蛋白質（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）は、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。除草剤グルホシネートは、その活性成分である *L*-グルホシネートにより、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成するグルタミン合成酵素を阻害し、その結果、植物体内にアンモニアが蓄積して植物を枯死させる。PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。PAT 蛋白質により *L*-グルホシネートがアセチル化され、*N*-アセチルグルホシネートになると、グルタミン合成酵素は阻害されなくなり、アンモニアが蓄積されず、植物は成長を続けることができる。PAT 蛋白質は、*D*、*L*、-グルホシネートのうち、*L*-グルホシネートのみを基質とすることが報告されており、既知のアレルゲン蛋白質との構造相同性は認められていない。

c. CP4 EPSPS 蛋白質

除草剤グリホサートは、芳香族アミノ酸の合成過程に位置するシキミ酸経路中の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)の活性を阻害し、植物は生育に必要なアミノ酸を合成できなくなって枯死する。*cp4 epsps* 遺伝子により産生される CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも影響を受けずにシキミ酸経路中で酵素として機能することで、グリホサートに対する耐性を植物に付与する。また、EPSPS

蛋白質はホスホエノールピルビル酸及びシキミ酸-3-リン酸と特異的に反応する酵素で、芳香族アミノ酸の合成経路中で律速酵素ではないことが示唆されている。なお、CP4 EPSPS 蛋白質が既知のアレルゲン蛋白質と構造相同性を持つとの報告はない。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

Cry1F 蛋白質は他の Cry 蛋白質と同様に、植物体内で酵素として働くことは報告されていない。また、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分である *L*-グルホシネートに対して、極めて高い基質特異性を有し、*L*-グルホシネートの光学異性体である *D*-グルホシネートをも基質としないことが報告されている。一方、CP4 EPSPS 蛋白質は除草剤グリホサートによって活性阻害される植物内在性 EPSPS に代わって、グリホサート存在下でも影響を受けずにシキミ酸経路中で酵素として機能することで、グリホサートに対する耐性を植物に付与する。EPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビル酸及びシキミ酸-3-リン酸と特異的に反応する酵素で、芳香族アミノ酸の合成経路中で律速酵素ではないことが示唆されており、植物代謝に影響を及ぼすとは考えられていない。

以上、Cry1F 蛋白質に酵素活性がないと考えられること、PAT 蛋白質及び CP4 EPSPS 蛋白質とも高い基質特異性を有し、作用機作及び基質が異なっていることから、スタック系統 1507×NK603 において、導入遺伝子による宿主の代謝系への影響や相互作用はないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

Cry1F line 1507 の作出に用いられたベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*) プラスミド pUC19 由来のプラスミド PHP8999 である (図 1、11 ページ)。一方、NK603 の作出に用いられたベクターは、大腸菌プラスミド pUC119 由来のプラスミド PV-ZMGT32 である (図 2、12 ページ)。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

Cry1F line 1507 の作出に用いられたベクターの塩基数は 9,504bp であり、NK603 の作出に用いられたベクターの塩基数は 9,308bp である。両ベクターの構成要素の塩基配列は明らかにされている。

② 特定の機能を有する塩基配列の種類

両ベクターとも、その供与核酸以外の領域には微生物中でベクターを増殖する際に、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するための抗生物質(カナマイシン)耐性マーカー遺伝子 (*nptII* 遺伝子) が含まれている。なお、Cry1F line 1507 の作出における遺伝子導入には、プラスミド PHP8999 を制限酵素 *PmeI* で処理して、供与核酸以外の領域 (*nptII* 遺伝子を含む) を除いた直鎖状 DNA 断片 (PHI8999A) が、同様に NK603 の作出における遺伝子導入でも、PV-ZMGT32 を制限酵素 *MluI* で処理し、供与核酸以外の領域 (*nptII* 遺伝子を含む) を除いた、直鎖状 DNA 断片 (PV-ZMGT32L) が、

それぞれ用いられている。したがって、本抗生物質耐性遺伝子は、Cry1F line 1507 と NK603 の両組換えトウモロコシに導入されていない。

- ③ ベクターの感染性の有無
両ベクターに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

Cry1F line 1507 の作出に用いた直鎖状 DNA 断片(PHI8999A)は、[UBIZM1(2) Promoter]-[cry1F]-[ORF25PolyA Terminator]-[CAMV35S Promoter]-[pat]-[CAMV35S Terminator]で構成されている。一方、NK603 の作出に用いられた直鎖状 DNA 断片(PV-ZMGT32L)は、2 つの *cp4 epsps* 遺伝子カセット ([P-ract1]-[ract1 intron]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3']及び [e35S]-[Zm*hsp70*]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3']) で構成されている。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への移入は、Cry1F line 1507 及び NK603 共にパーティクルガン法によって行われ、Cry1F line 1507 の場合はトウモロコシ品種 A188×B73 の Hi-II カルスへ、一方、NK603 の場合はトウモロコシ品種 AW×CW に導入された。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

スタック系統 1507×NK603 は、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社によって、従来の交雑育種法を用いて育成がなされている。

我が国において、Cry1F line 1507 は 2002 年 6 月に「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」（以下「指針」）に基づき、開放系における利用計画が指針に適合していることが確認されている。また、2002 年 7 月に食品として、2002 年 5 月に飼料としての安全性の確認がなされている(飼料に関しては 2003 年 3 月に審査の法制化に伴って再認可された)。一方、NK603 は 2001 年 5 月に開放系における利用計画が指針に適合していることが確認されている。また、2001 年 3 月に食品及び飼料としての安全性の確認がなされている(飼料に関しては 2003 年 3 月に審査の法制化に伴って再認可された)。なお、スタック系統 1507×NK603 についても、我が国において 2004 年 3 月に食品として、また、2003 年 7 月に飼料としての安全性の確認がなされている。

なお、Cry1F line 1507 及び NK603 共に、2004 年 2 月に施行された「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 2 項の規定に基づき、第一種使用規程の承認申請が既に行なわれており、生物多様性影響評価検討会において、個別に、本スタック系統 1507×NK603 の申請と同一の第一種使用等をした場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。

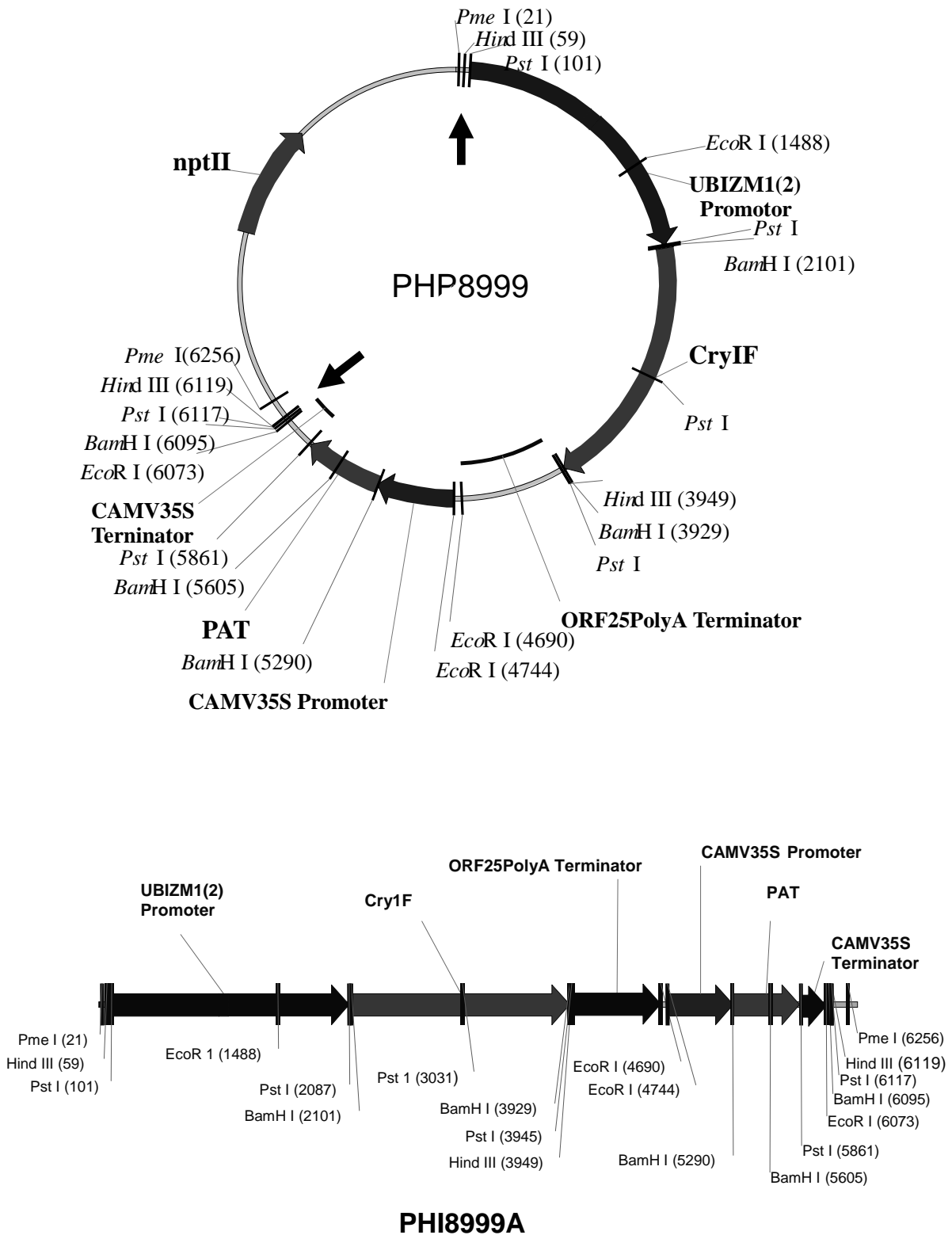


図 1 プラスミド PHP8999 (上図) 及び挿入 DNA 領域 PHI8999A (下図) の構成

プラスミド PHP8999 を制限酵素 *Pme*I で処理し(上図 2 箇所の矢印の位置で切断)、直鎖状 DNA 断片である PHI8999A (下図) を調製し、宿主への遺伝子導入に用いた。

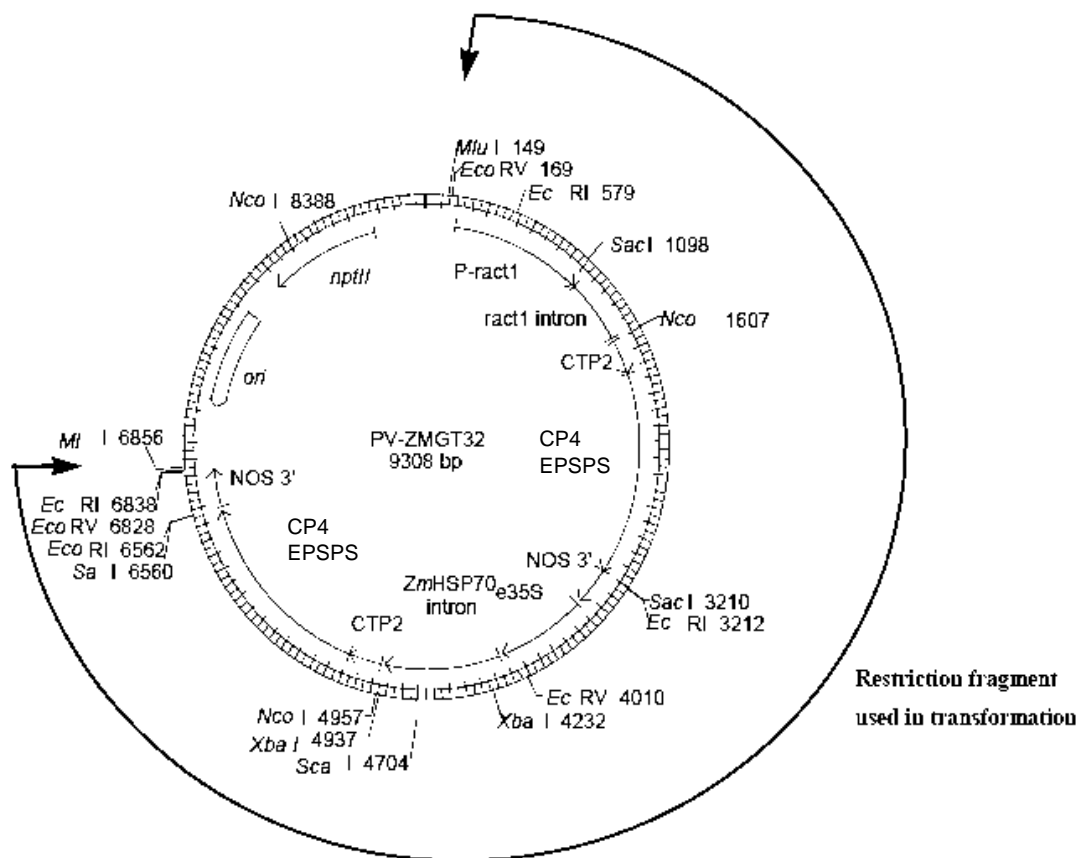


図 2 プラスミド PV-ZMGT32 の構成

プラスミド PV-ZMGT32 を制限酵素 *Mlu*I で処理し (図中の 2 箇所の矢印の位置で切断)、直鎖状 DNA 断片である PV-ZMGT32L を調製し、宿主への遺伝子導入に用いた。

(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

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

Cry1F line 1507 及び NK603 共に、トウモロコシゲノムに組み込まれていることが確認されている。

ロ 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

Cry1F line 1507 においては、アワノメイガ等の害虫に抵抗性を付与するための *cry1F* 遺伝子発現カセットと除草剤グルホシネートに対し耐性を付与するための *pat* 遺伝子発現カセットが、ともに 1 コピーずつ、インタクトな形でトウモロコシゲノム上に挿入され、後代に安定して遺伝していることがサザンブロット分析によって確認されている。なお、導入 DNA の塩基配列解析により、導入 DNA の 5'末端領域に *cry1F* 遺伝子配列の一部が、5'末端及び 3'末端領域に *pat* 遺伝子配列の一部が、そして、3'末端領域に *ORF25PolyA Terminator* 配列の一部が含まれていることが確認されたが、ノーザンブロット解析により、mRNA への転写は行なわれておらず、これらの遺伝子断片は機能していないことが確認されている。

一方、NK603 においては、除草剤グリホサートに対する耐性を付与するための直鎖状 DNA 断片(PV-ZMGT32L、2 つの *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットから成る)が 1 コピー、トウモロコシゲノム上に挿入され、後代に安定して遺伝していることが確認されている。なお、挿入遺伝子の 3'末端近傍に *P-ract1* の 217bp の断片が逆方向に移入されているが、この断片が新たな蛋白質の産生に関与していないことが確認されている。また、*E35S* により誘導される *cp4 epsps* 遺伝子の塩基が本組換え体作出時に変化し、その結果、CP4 EPSPS 蛋白質を構成するアミノ酸の 1 つが変化しているが、CP4 EPSPS 蛋白質の機能は変化していないことが確認されている。

Cry1F line 1507 と NK603 由来の導入遺伝子が、スタック系統 1507×NK603 中に安定的に伝達されることを、サザンブロット分析で確認した。温室で栽培したスタック系統 1507×NK603 及び Cry1F line 1507、NK603 の各 4 個体から、個体ごとに葉を採取してゲノム DNA を抽出し、制限酵素 *EcoR V* で消化して、それぞれ *cry1F*、*pat* 及び *cp4 epsps* をプローブとしたサザンブロット分析を行った。その結果、本スタック系統は、Cry1F line 1507 及び NK603 に対して同一のバンドパターンを示し、Cry1F line 1507 と NK603 に導入された遺伝子が、スタック系統 1507×NK603 中に安定して遺伝することが確認された。

なお、*cry1F* をプローブとしたサザンブロット分析において、スタック系統 1507×NK603 と Cry1F line 1507 では、期待された 1 つのバンドの他に、2 つのマイナーバンドが検出された。この 2 つのマイナーバンドは、Cry1F line 1507 の導入遺伝子の解析結果から予想されていたことであり、Cry1F line 1507 の導入 DNA の 5'末端領域に *cry1F* 遺伝子配列の一部が含まれていること、また、この 5'末端領域が高い反復配列と GC リッチ配列であるために生じた *EcoR V* サイトの部分消化のためである。

ハ 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

スタック系統 1507×NK603 における、Cry1F line 1507 と NK603 由来の発現する獲得形質について、ELISA 法によって確認した。米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社が、2002 年から 2003 年にかけて、チリの 6 箇所のは場で栽培した本スタック系統の、V4 ステージ（本葉 4 葉抽出期）に除草剤グリホサート（グリホサートを 1 ヘクタール当たり 1.14 kg、製剤名ラウンドアップ・ウルトラ・マックス）、を、V7 ステージ（本葉 7 葉抽出期）に除草剤グルホシネート（グルホシネートを 1 ヘクタール当たり 0.51 kg、製剤名バスタ）を、それぞれの製剤の使用方法に基づき散布した区から R4 ステージ（開花受粉期）に茎葉サンプルを採取して、それぞれのサンプルにおける Cry1F 蛋白質、PAT 蛋白質及び CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。除草剤散布後に観察を行なったが、枯死もしくは薬害が生じた植物体は認められず、スタック系統 1507×NK603 が、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートの双方に対して、親系統と同等の除草剤耐性を有することが確認された。また、ELISA 法による分析の結果、茎葉における Cry1F 蛋白質の平均発現量は、スタック系統で 5.57ng/mg 乾物重（分析値の最小-最大値：4.31 - 6.77ng/mg 乾物重）、親系統である Cry1F line 1507 で 4.14ng/mg 乾物重（3.22 - 4.94ng/mg 乾物重）であり、PAT 蛋白質の平均発現量は、スタック系統で 0.58ng/mg 乾物重（0.48 - 0.64ng/mg 乾物重）、Cry1F line 1507 で 0.17ng/mg 乾物重（<0.045 - 0.44ng/mg 乾物重）であった。さらに、CP4 EPSPS 蛋白質の平均発現量は、スタック系統で 62.0ng/mg 乾物重（49.9 - 71.6ng/mg 乾物重）、親系統である NK603 で 76.5ng/mg 乾物重（54.0 - 93.6ng/mg 乾物重）であり、スタック系統 1507×NK603 における Cry1F 蛋白質及び CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質の発現量は、親系統における発現量と、ほぼ同等であることが示された。

さらに、スタック系統 1507×NK603 と親系統 Cry1F line 1507 及び親系統 NK603 の除草剤に対する耐性レベルが同等であることの確認のため、温室試験において、農薬登録で認められている薬量を上回る高薬量での散布を行なった。除草剤グルホシネートを散布した Cry1F line 1507 及びスタック系統 1507×NK603 においては、いずれも、通常の 16 倍量の散布でも、非散布対照区と比較して有意な薬害は認められなかった。通常の 32 倍量を散布した Cry1F line 1507 では、非散布の対照区と統計学的に有意な薬害(22.0%)が認められた。同様の結果がスタック系統 1507×NK603 においても示され、32 倍量を散布した植物体で非散布の対照区と統計学的に有意な薬害(26.5%)が認められた。Cry1F line 1507 及びスタック系統 1507×NK603 の 32 倍量散布時の薬害程度に統計学的有意差は認められなかった。

一方、除草剤グリホサートの散布においては、NK603 及びスタック系統 1507×NK603 ともに、すべての散布処理で非散布対照区と比較して有意な薬害は認められなかった。通常の 32 倍量の散布では、両者とも 5%程度の薬害が認められた。

なお、通常の散布薬量で十分な雑草防除効果を得ることができることから、実際の農家のほ場では、本試験で散布されたような高薬量で除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートが散布されることはなく、本試験用に特別に散布したものである。

以上のことから、Cry1F line 1507とNK603由来の獲得形質が、スタック系統1507×NK603でそれぞれ安定的に発現していること、除草剤グルホシネート耐性及び除草剤グリホサート耐性を併せ持つことによっても、それぞれの形質は相互に影響を受けないことが確認された。

ニ 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達されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された核酸に他の野生動植物等への伝達を可能とする配列は含まれておらず、したがって、伝達性はない。

(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

Cry1F 蛋白質及び PAT 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質のそれぞれに対するポリクローナル抗体を用いた ELISA 法キットが販売されている。

Cry1F 蛋白質検出キットは、トウモロコシ穀粒 600 粒中、Cry1F 蛋白質を含む 1 粒を検出する。PAT 蛋白質検出キットは、トウモロコシ穀粒 500 粒中、PAT 蛋白質を含む 1 粒を検出する。CP4 EPSPS 蛋白質検出キットは、トウモロコシ穀粒 800 粒中、CP4 EPSPS 蛋白質を含む 1 粒を検出する。

すべての検出キットについて、各種試験により、信頼性が確認されている。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ 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内容

① チョウ目害虫抵抗性

スタック系統 1507×NK603 には、Cry1F line 1507 に導入された *Bacillus thuringiensis* (以下 *B.t.*) var. *aizawai* 由来の *cry1F* 遺伝子により、Cry1F 蛋白質が産生されており、その結果、European corn borer (ヨーロッパアワノメイガ、*Ostrinia nubilalis*) 等のトウモロコシを食害するチョウ目害虫に対して抵抗性が付与されている。ヨーロッパアワノメイガは、米国のトウモロコシ栽培において、最も被害を与えている害虫の一つである。ふ化した幼虫は葉を食べて成長し、やがて葉のつけ根から茎に入る。いったん茎の中に入ると、通常散布する薬剤が届きにくいために駆除が難しく、雄穂を中から食害して空洞にし、また、雌花に侵入した幼虫は、生育中の雌穂を食害する。本害虫の防除にかかる費用の総額は、毎年約 10 億ドルにもものぼると考えられている。

② 除草剤グルホシネートに対する耐性

スタック系統 1507×NK603 には、Cry1F line 1507 に導入された *Streptomyces*

viridochromogenes 由来の *pat* 遺伝子によって、除草剤グルホシネートに対する耐性も付与されている。*pat* 遺伝子の発現により産生される PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。

③ 除草剤グリホサートに対する耐性

スタック系統 1507×NK603 には、NK603 に導入された *Agrobacterium* CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子により、除草剤グリホサートに対する耐性も付与されている。除草剤グリホサートは、芳香族アミノ酸の合成過程に位置するシキミ酸経路中の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)の活性を阻害し、植物は生育に必要なアミノ酸を合成できなくなると枯死する。*cp4 epsps* 遺伝子により産生される CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも影響を受けずにシキミ酸経路中で酵素として機能することで、グリホサートに対する耐性を植物に付与する。

ロ 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

スタック系統 1507×NK603 は Cry1F line 1507 と NK603 の戻し交配自殖系統同士を掛け合わせた雑種品種であり、両者の交配により雑種強勢が起こることが予想される。Cry1F 蛋白質に酵素活性がないと考えられること、PAT 蛋白質と CP4 EPSPS 蛋白質とも高い基質特異性を有し、作用機作及び基質が異なっていることから、本スタック系統において、導入遺伝子による宿主の代謝系への影響や相互作用はないと考えられる。実際に、ELISA 法による分析の結果、Cry1F 蛋白質及び CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質の発現量は、親系統における発現量と、ほぼ同等であることが示された。したがって、本スタック系統で雑種強勢によって生ずる諸形質への影響は、従来の非組換えトウモロコシ同士の雑種品種や、組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの掛け合わせによる雑種品種で生ずる変動の範囲を超えるものではないと判断される。

以上のことから、本スタック系統と宿主の属する分類学上の種との間の相違については、Cry1F line 1507 については 2001 年に、NK603 については 2000 年に我が国において実施された隔離ほ場試験における、諸形質に関する個別調査の結果に基づいて記載した。

① 形態及び生育の特性

Cry1F line 1507 の形態及び生育の特性として、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、開花始期、開花終期、開花期間、成熟期、草型、分けつ数、雌穂総数、有効雌穂数、粒色及び粒形、稈長、着雌穂高、雌穂長、雌穂径及び収穫時の地上部生体重量について評価した。発芽率及び雌穂径を除くすべての項目については、Cry1F line 1507 と非組換えトウモロコシとの間で差は認められなかった。有意差の認められた発芽率と雌穂径についても、有意差が認められたのは、供試した 2 品種の組換え体品種のうち 1 品種についてのみであり、平均値の差はわずかであった。

NK603 についても形態及び生育の特性として、発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草姿または草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、収穫期の植物重の評価が行われているが、全ての項目で対照の非組換えトウモロコシとの統計学的有意差は認められていない。

実際に、本スタック系統を供試し、米国にて行なわれた発芽試験の結果、本スタック系統の発芽率は 98%で、Cry1F line 1507 の 98%及 NK603 の 98%、非組換えトウモロコシの 97%と同等であった。

以上の結果より、形態及び生育の特性において、本スタック系統と宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

② 生育初期における低温耐性

Cry1F line 1507 において幼苗の低温耐性が評価されたが、いずれも低温遭遇後約 3 週間で、すべての展開葉が全面的に葉緑素を失い萎縮した。萎縮の進行について Cry1F line 1507 と非組換えトウモロコシの間で差は認められなかった。

NK603 についても幼苗の低温耐性が評価されているが、低温遭遇後 14 日目にはほぼ完全に枯死し、対照の非組換えトウモロコシとの間で差異は認められていない。

したがって、本スタック系統 1507×NK603 においても、低温耐性については宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

③ 成体の越冬性又は越夏性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、結実後、冬季には通常自然に枯死し、越冬することは知られていない。また、収穫後に再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に、米国で行なった Cry1F line 1507 の栽培試験に用いたほ場を、翌年に観察したところ、残存している植物体はないことが確認されている。また、NK603 についても、隔離ほ場試験の試験終了時には結実後の枯死が始まっている事が観察されている。以上のことから、Cry1F line 1507 及び NK603 共に、成体の越冬性試験は行なわれなかった。

④ 花粉の稔性及びサイズ

Cry1F line 1507 の開花期に花粉を採取し、稔性及びサイズについて観察を行なったが、両項目において Cry1F line 1507 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差は認められなかった。

一方、NK603 についても花粉の稔性及びサイズにおいて、対照の非組換えトウモロコシとの間で差は認められていない。

したがって、本スタック系統 1507×NK603 においても、花粉の稔性及びサイズについては宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に係る項目として、Cry1F line 1507 の粒列数、1 列粒数及び 100 粒重等について調査を行なったが、すべての項目において非組換えトウモロコシとの間で差は認められなかった。また、Cry1F line 1507 及び非組換えトウモロコシの双方とも、収穫種子 (F2) の発芽率は良好で休眠性は認められなかった。

一方、NK603 においても、粒列数、1 列粒数及び 100 粒重等の調査が行なわれており、供試された 2 つの組換えトウモロコシ NK603 の内、NK603-B で 100 粒重に对照の非組換えトウモロコシと統計的有意差が認められた以外、NK603 と非組換えトウモロコシの間で差異は認められなかった。なお、100 粒重で認められた差はわずかであり、また、もう一方の NK603-A では 100 粒重に差異は認められなかった。NK603 及び非組換えトウモロコシの双方とも収穫種子 (F2) の発芽率は良好で、休眠性は認められなかった。

なお、収穫時のトウモロコシ雌穂はいずれも苞皮に覆われており、Cry1F line 1507 と NK603 とともに、それらの对照の非組換えトウモロコシと同様に、自然条件での脱粒性は観察されていない。

以上の結果より、本スタック系統における種子の生産量等の特性に関して、宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

⑥ 交雑率

宿主であるトウモロコシと交雑可能な近縁野生種 (テオシント) は、我が国においては生育していないため、本項目についての調査は行なわれていない。

⑦ 有害物質の産生性

トウモロコシについて、周辺の植物や土壤微生物に影響を与えるような有害物質を、根から分泌することは知られていない。また、枯死した後に他の植物に影響を与えるような他感物質が産生されることも知られていない。

Cry1F line 1507 中には、*cry1F* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の導入により、新たに Cry1F 蛋白質及び PAT 蛋白質が産生されている。Cry1F 蛋白質については、他の *B.t.* の Cry 蛋白質と同様に、植物体内で酵素として働くことは示されておらず、また PAT 蛋白質については基質特異性が極めて高いことが報告されている。

Cry1F line 1507 については、隔離ほ場試験において、後作試験、土壤微生物相試験、鋤込み試験を行なった。さらに米国において、Cry1F line 1507 及び非組換え体の根及び葉、茎を用いたサンドイッチ法による有害物質の産生性の評価、及び 46 の野外試験において後作物への影響の目視観察を行なった。これらの結果より、供試組換えトウモロコシと对照の非組換えトウモロコシとの間に、有害物質産生性について差は認められないと結論された。

NK603 には、*cp4 epsps* 遺伝子の導入により、新たに CP4 EPSPS 蛋白質が産生されている。CP4 EPSPS 蛋白質については、PAT 蛋白質と同様に高い基質特異性を有

し、植物代謝に影響を及ぼすとは考えられていない。

NK603 についても隔離ほ場試験において、後作試験、土壌微生物の評価、鋤込み試験が行なわれているが、全ての評価で供試組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で、統計学的有意差は認められなかった。

したがって、スタック系統 1507×NK603 においても、有害物質の産生性については、宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

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

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

(2) 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

緊急措置計画書を参照。

(3) 国外における使用等に関する情報

米国及びカナダ、オーストラリア、ニュージーランドでは、親系統である Cry1F line 1507 及び NK603 共に承認を得ている。これらの国々ではスタック系統については新たな申請・承認を求めているが、各国政府に対して、スタック系統 1507×NK603 の商品化を計画していることの報告を行なっている。また、韓国において、スタック系統 1507×NK603 の食品としての安全性が、2004 年 3 月に承認されている。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

トウモロコシ(*Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis) は、長年にわたり食品・飼料への加工用として海外より輸入されてきた。また、生食用やサイレージ用として我が国でも栽培されている。我が国における長い栽培の歴史の中で、トウモロコシが雑草化し、野生動植物の生育に支障を及ぼしたという報告はない。

スタック系統 1507×NK603 は Cry1F line 1507 と NK603 の戻し交配自殖系統同士を掛け合わせた雑種品種であり、両者の交配により雑種強勢が起こることが予想される。しかしながら、本スタック系統で発現する Cry1F 蛋白質には他の Cry 蛋白質と同様に酵素活性がないと考えられること、PAT 蛋白質と CP4 EPSPS 蛋白質とも高い基質特異性を有し、作用機作及び基質が異なっていることから、本スタック系統において、導入遺伝子による宿主の代謝系への影響や相互作用はないと考えられる。したがって、本スタック系統における雑種強勢で生ずる諸形質への影響は、従来の非組換えトウモロコシ同士の雑種品種や、これまでの組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの掛け合わせによる雑種品種で生ずる変動の範囲を超えるものではないと判断される。

以上のことから、本スタック系統における項目ごとの生物多様性影響の評価については、Cry1F line 1507 と NK603 の生物多様性影響評価結果に基づいて行なった。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシについては、これまで我が国において栽培等がなされてきているが、我が国において雑草化したという報告はされていない。我が国で行なわれた Cry1F line 1507 と NK603 の隔離ほ場試験結果において、野生植物との競合における優位性に寄与すると考えられる雑草性に関する特性（種子の生産量及び脱粒性、発芽率及び発芽揃い期、休眠性、生育初期の低温耐性、花粉の稔性）について調査を行なった。いずれの項目についても、組換え体と非組換えトウモロコシの間で、導入遺伝子により生じたと考えられる差は認められなかった。

以上の結果より、Cry1F line 1507 及び NK603 と、従来のトウモロコシには、競合における優位性に影響を与える差はないと判断された。

スタック系統 1507×NK603 は、Cry1F line 1507 由来の *cry1F* 遺伝子により、European corn borer (ヨーロッパアワノメイガ、*Ostrinia nubilalis*) 等のトウモロコシを食害するチョウ目害虫に対して抵抗性を示す。これらの昆虫は、トウモロコシ栽培の際には殺虫剤等により駆除される。したがって、本特性により競合における優位性が高まるとは考えられない。また、スタック系統 1507×NK603 には Cry1F line 1507 由来の除草剤グルホシネート耐性と NK603 由来の除草剤グリホサート耐性が付与されているが、自然環境下でこれらの除草剤が使用されることはなく、これらの除草剤耐性が選択圧とはならないので、除草剤グルホシネート及びグリホサートに対する耐性がスタック系統 1507×NK603 に野生植物との競合における優位性を与える

こともない。以上のことより、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断された。

したがって、スタック系統 1507×NK603 においても、競合における優位性について、影響を及ぼす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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(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、本スタック系統は、競合における優位性に関して、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

トウモロコシには、野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。Cry1F line 1507 と NK603 において、導入遺伝子により、意図しない有害物質が産生されていないことを、後作試験、サンドイッチ法、土壌微生物の評価、鋤込み試験等を行なって検討した。Cry1F line 1507 と NK603 のいずれの試験においても、組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に、導入遺伝子により生じたと考えられる差は認められなかった。

また、スタック系統 1507×NK603 で発現する Cry1F 蛋白質には、他の Cry 蛋白質と同様に酵素活性がないと考えられること、PAT 蛋白質と CP4 EPSPS 蛋白質とも高い基質特異性を有し、作用機作及び基質が異なっていることから、本スタック系統において、導入遺伝子による宿主の代謝系への影響や相互作用はないと考えられる。以上のことから、スタック系統 1507×NK603 において、Cry1F line 1507 と NK603 由来の導入遺伝子に関連して、野生動植物等に影響を及ぼす可能性のある有害物質は産生されないと判断された。

スタック系統 1507×NK603 には Cry1F line 1507 由来のチョウ目害虫抵抗性を付与するための Cry1F 蛋白質が産生されている。Cry1F 蛋白質は *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* に由来し、他の *B.t.*蛋白質と同様に、その殺虫効果は特異性が高く、ヨーロッパアワノメイガ等、トウモロコシを食害するチョウ目害虫に対して殺虫効果を持つが、コウチュウ目及びハチ目、アミメカゲロウ目、トビムシ目の昆虫に対しては、試験を行なった最高投与量でも、死亡した個体は認められなかった。また、哺乳類及び鳥類、魚類に対しても評価を行なったが、試験を行なったすべての非標的生物に対し毒性は示さなかった。したがって、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、我が国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。

標的及び非標的チョウ目昆虫が当該蛋白質に曝露される経路としては、トウモロコシ植物体を直接食餌する場合と、トウモロコシ花粉の飛散により曝露される場合が考えられる。このうち、トウモロコシを食害するチョウ目昆虫については、トウモロコシ栽培の際に殺虫剤等により駆除されるので、ここでは考察の対象にはしない。上述のように、Cry1F 蛋白質の殺虫効果は特異性が高いことが示されているが、非標的チョウ目昆虫が、スタック系統 1507×NK603 から飛散した花粉を食餌植物と共に摂食した場合には、何らかの影響を受ける可能性を完全に否定することはできない。そこで、今日、種としての存続が危惧されている非標的チョウ目昆虫について、花粉の飛散により当該蛋白質に曝露される可能性を以下に考察した。

「環境省レッドリスト、2000 年改訂版」に記載された絶滅危惧種のチョウ目昆虫 74 種のうち、トウモロコシの栽培が可能な低地から山地にかけて生育し、トウモロコシの開花時期に幼虫生育期間が重なるのは、以下の 12 種である。

絶滅危惧 I 類：タイワンツバメシジミ、シルビアシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、ミツモンケンモン

絶滅危惧 II 類：ヒメシロチョウ、ツマグロキチョウ、ミヤマシジミ、コヒョウモンモドキ、ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ

準絶滅危惧：ヒョウモンチョウ

これら 12 種の中で、産卵が年に 1 回のみで、その幼虫の生育期間がトウモロコシの開花時期と重なる種は、7 種（タイワンツバメシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、コヒョウモンモドキ、ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ、ヒョウモンチョウ）である。このうち 4 種（タイワンツバメシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、コヒョウモンモドキ）は、食草がそれぞれマメ科やオミナエシ科、キク科、ゴマハノグサ科で、さらに幼虫が主に蕾の内部や葉の裏面を摂食するか、あるいは集団でネット状の巣を作りその中の葉しか食べないため、スタック系統 1507×NK603 の花粉に感受性が高いと考えられる若齢幼虫が、その生存に影響する量の花粉を摂食する可能性はほとんど無い。残り 3 種（ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ、ヒョウモンチョウ）については、幼虫が食餌植物の葉の表面を摂食するが、ヒメヒカゲとウラナミジャノメについては、食草がカヤツリグサ科やイネ科で、葉が細くほぼ直立しており、花粉が葉上に堆積しにくいため、その生存に影響するような量の花粉を摂食する可能性はほとんどないと考えられる。またヒョウモンチョウは、食草がバラ科で、主な生息地がトウモロコシ栽培に適さない湿原であることから、トウモロコシ畑周辺に生息する可能性はほとんどないと考えられる。

以上のことから、スタック系統 1507×NK603 の栽培がこれら絶滅危惧種の種としての存続に影響を与える可能性は無視できるほど低いと考えられた。しかしながら、我が国に生息するチョウ目昆虫の中には、当該蛋白質に曝露された場合、何らかの影響を受けるものがある可能性を完全に否定することはできないため、チョウ目昆虫が影響を受ける濃度で当該蛋白質に曝露される可能性が、現実的にどの程度想定されるのかについて、検討を行なった。

(2) 影響の具体的内容の評価

Cry1F蛋白質を産生するCry1F line 1507 を用いた隔離ほ場試験において、その花粉を用いて、ヤマトシジミ (*Zizeeria maha argia*) を供試し生物検定を行なった。ヤマトシジミは、*B.t.*蛋白質に対して感受性であることに加えて、集団飼育がし易く採集や継代飼育が容易である等の理由により検定に用いられた。Cry1F line 1507 の花粉と非組換えトウモロコシの花粉をヤマトシジミ 1 齢幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、LC₅₀値 (半数致死花粉密度) は 100 粒/cm²であることが示された。

Cry1F蛋白質の殺虫効果を調べるため、蛍光菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 中で産生させたCry1F蛋白質を人工飼料に混合し、米国において農業上の害虫と見なされている 15 種類のチョウ目昆虫に混餌投与した。15 種類のチョウ目昆虫のうち、6 種は米国でのトウモロコシ栽培において、9 種はワタ、ダイズ、カノーラ等、その他の作物栽培において害虫と見なされている。上記 6 種のトウモロコシ栽培における害虫のうち、Cry1F line 1507 の標的害虫であるEuropean corn borer (ヨーロッパアワノメイガ) 及びFall armyworm、Beet armywormに対するLC₅₀値 (半数致死濃度) は、それぞれ 0.58 μg/g 及び 2.49 μg/g、7.8 μg/gであったが、残り 3 種の害虫 (Southwestern corn borer及びBlack cutworm、Bollworm) に対するLC₅₀値は 50 μg/gを超えていた。一方、農業上の害虫とはされていないオオカバマダラ (*Danaus plexippus*) についても試験を行なったが、LC₅₀値は試験を行なった最高濃度である 30 μg/gより大きかった。これらの結果から、他の*B.t.*蛋白質と同様に、Cry1F 蛋白質の殺虫効果は特異性が高く、一部の昆虫にのみ効果を持つことが示された。

(3) 影響の生じやすさの評価

前述のように、トウモロコシを食害するチョウ目昆虫については、トウモロコシ栽培の際には、殺虫剤等により防除が行なわれるので、ここでは評価の対象とはしない。したがって、非標的チョウ目昆虫がトウモロコシ花粉の飛散により当該蛋白質に曝露される可能性についてのみ、評価を行なうこととする。

食品・飼料加工としての加工用に輸入されたトウモロコシは、こぼれ落ちによるロスの防止のため及び風雨にあたらぬように、周囲を覆われたベルトコンベアで、パナマックス船から直接港に隣接している食品・飼料加工工場に運ばれるか、あるいは四方を完全に覆われたトラックで山間の工場まで輸送されている。このため、運搬途中で道路際等にこぼれ落ちが生ずる可能性は極めて低い。トウモロコシは、長年ヒトの手により改良された作物で、ヒトが手をかけなければ育つことはできない。実際に、港やその隣接する工場内、道路端でトウモロコシが雑草化したという報告はなく、チョウ目昆虫が、こぼれ落ちにより生育したトウモロコシの花粉に曝露される可能性はないと考えられた。

以下に、我が国において Cry1F line 1507 を栽培した際にトウモロコシ畑の周辺にチョウ目昆虫がいた場合を想定し、実際にどの程度花粉に曝露される可能性があるのかを、野外において花粉の飛散・堆積密度を調べた実験の結果に基づき考察した。

表 3 (25 ページ) に示すように、ヒマワリの葉を用いて、トウモロコシ畑周辺での

花粉の飛散・堆積程度を調べた実験によると、トウモロコシ畑内での花粉の堆積密度は 81.7 粒/cm²であった。畑から 5m 離れると堆積密度は 5.2 粒/cm²と大きく減少し、10m 離れた場合の堆積密度は、畑内の 270 分の 1 の 0.3 粒/cm²まで減少した（平成 15 年度（2003）農業環境調査研究成績・計画概要集）。5m 地点における花粉堆積密度は、ヤマトシジミを用いた生物検定の結果得られた LC₅₀ 値（100 粒/cm²）の約 20 分の 1、10m 地点では約 334 分の 1 である。また、5m 地点での予想 Cry1F 蛋白質濃度は、高めに見積もって 0.000111 μg/cm²、10m 地点では 0.000006 μg/cm²となる。5m 地点における蛋白質濃度は、オオカバマダラに対する LC₅₀ 値（>27.7 μg/cm²）の約 25 万分の 1、10m 地点では約 460 万分の 1 となる。

表 3 ほ場端からの距離と花粉蓄積数

ほ場端からの距離	花粉密度 (粒/cm ²)	予想蛋白質量 ¹⁾ (Cry1F μ g/cm ²)
0m	81.7	0.001743
1m	136.5	0.002912
2m	33.5	0.000715
5m	5.2	0.000111
10m	0.3	0.000006
20m	0.3	0.000006
50m	0.1	0.000002

1) 花粉飛散期に昆虫が曝露されると予想される蛋白質濃度の幅の中で、高い方の値 (HEEE: High End Exposure Estimate) を示した。
(花粉粒数 / cm²) x (g / 1,500,000 粒) x (花粉中発現量 32.0 μ g/g) として計算した。

以上の結果より、仮にトウモロコシ畑の周辺にチョウ目昆虫の幼虫が生息している場合でも、影響を受ける濃度で Cry1F line 1507 の花粉に暴露される可能性はほとんどないと考えられた。したがって、Cry1F line 1507 由来の Cry1F 蛋白質を発現するスタック系統 1507×NK603 の栽培においても、我が国に生息するチョウ目昆虫の、種としての存続に影響を与える可能性は極めて低いと結論された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上の検討結果に基づき、スタック系統 1507×NK603 を輸入または栽培した場合に、有害物質の産生性に関して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

3 交雑性

宿主であるトウモロコシは、我が国において雑草化した事例がなく、また交雑可能な近縁野生種 (テオシント) が自生していることは知られていない。このため、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断した。

以上のことより、スタック系統 1507×NK603 の交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

スタック系統 1507×NK603 は、従来の一代雑種育種法を用いて育成し、育成された自殖系統同士を互いに交配させた雑種品種であり、親系統である Cry1F line 1507 由来の *cry1F* 遺伝子及び *pat* 遺伝子、並びに NK603 由来の *cp4 epsps* 遺伝子を併せ持つ。*cry1F* 遺伝子が発現する Cry1F 蛋白質は、ヨーロッパアワノメイガ等のトウモロコシを食害するチョウ目昆虫に対する抵抗性を、*pat* 遺伝子が発現する PAT 蛋白質は除草剤グルホシネート耐性を、*cp4 epsps* 遺伝子が発現する CP4 EPSPS 蛋白質は除草剤グリホサート耐性をそれぞれ付与する。

Cry1F 蛋白質に酵素活性がないと考えられること、並びに PAT 蛋白質と CP4 EPSPS 蛋白質ともに高い基質特異性を有し、作用機作がそれぞれ独立していること、及び基質が異なっていることから、スタック系統 1507×NK603 において、導入遺伝子が宿主の代謝系に影響したり、相互に作用することはないと考えられた。実際に、ELISA 法により分析を行なったところ、スタック系統 1507×NK603 中の Cry1F 蛋白質、PAT 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質の産生量は、親系統における発現量と同等であった。したがって、スタック系統 1507×NK603 の生物多様性影響の評価は、Cry1F line 1507 と NK603 の個別の生物多様性影響評価結果に基づいて行なわれた。

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシには、我が国において輸入や栽培等を通じた長期間の使用経験を持つ。親系統である Cry1F line 1507 及び NK603 について、競合における優位性に関わる諸形質について比較を行なったところ、それぞれの非組換え体との間で、導入遺伝子の影響と考えられる有意差は認められなかった。また、親系統の個別の評価において、導入遺伝子によって付与されたヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目害虫にする抵抗性、除草剤グルホシネート及びグリホサートに対する耐性は、野生種との競合における優位性を与えることはないと判断された。また、上述のように、スタック系統 1507×NK603 において、導入遺伝子が宿主の代謝系に影響したり、相互に作用することはないと考えられることから、スタック系統 1507×NK603 においても、それぞれの親系統と同様に、競合における優位性に関して、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

トウモロコシには、これまでの長期間の使用経験を通じて野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。Cry1F line 1507 と NK603 における有害物質の産生性について、それぞれ、後作試験、土壌微生物の評価、鋤込み試験等の結果から検討が行なわれたが、親系統中に、意図しない新たな有害物質は産生されていないことが確認された。スタック系統 1507×NK603 において、導入遺伝子が宿主の代謝系に影響したり、相互に作用することはないと考えられることから、親系統と同様に、本スタック系統において、意図しない有害物質が産生される可能性は無視できるほど低いと判断された。

スタック系統 1507×NK603 は、ヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目害虫に対する抵抗性を付与するための Cry1F 蛋白質を産生する。Cry1F line 1507 の個別の評価において、本蛋白質が我が国に生息する非標的生物の種としての存続に与える影響について評価が行なわれており、その結果、影響を受ける可能性のあるチョウ目昆虫が、

影響を受ける可能性のある濃度で、Cry1F 蛋白質に暴露される可能性は無視できるほど低いと結論された。ELISA 法による分析の結果、スタック系統 1507×NK603 中の Cry1F 蛋白質の産生量は、親系統である Cry1F line 1507 と同等であることが示されたことから、スタック系統 1507×NK603 についても、有害物質の産生性に関して、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

宿主であるトウモロコシは、我が国において雑草化した事例がなく、また交雑可能な近縁野生種が自生していることは知られていない。したがって、交雑性に関して、スタック系統 1507×NK603 によって生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

以上の結果より、スタック系統 1507×NK603 を第一種使用規程にしたがって使用した場合に、本スタック系統の競合における優位性及び有害物質の産生性、交雑性に起因して、我が国において生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合）

平成 16 年 8 月 17 日

氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生

住所 東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号
山王パークタワー

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシの掛け合わせ品種(*cry1F*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) *Iltis*) (1507×NK603, OECD UI : DAS-Ø15Ø7-1×MON-ØØ6Ø3-6) (以下、スタック系統 1507×NK603 と表記)について、我が国において生物多様性影響が生ずるおそれはないとして、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、生物多様性影響が生ずるおそれがあると立証された場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

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

デュポン株式会社内に、緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部）の部門長から構成される。同時に、当該管理部門（農業製品事業部）内に、本措置に適切に対応するための組織を設置し、危機対策本部並びに、スタック系統 1507×NK603 の開発者である米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。本組織は、農業製品事業部長が責任者となる。

2. 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、スタック系統 1507×NK603 の開発者である米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、米国におけるスタック系統 1507×NK603 種子の購入者及び穀物取扱い業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有

している。したがって、今後、スタック系統 1507×NK603 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

また必要に応じて、デュポン株式会社のホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

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

今後、スタック系統 1507×NK603 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社とともに、日本向けに輸出している穀物取扱い業者及び種子取扱い業者に対して本件を通知する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的正当性のある根拠に基づき、スタック系統 1507×NK603 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成 16 年 8 月 17 日

氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生

住所 東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号
山王パークタワー

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (*cry1F*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (1507×NK603, OECD UI : DAS-01507-1×MON-00603-6) (以下、スタック系統 1507×NK603 と表記)について、我が国において生物多様性影響が生ずるおそれはないとして、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、スタック系統 1507×NK603 については、我が国で商業栽培を行なう予定は当面ない。商業栽培を行なうことを決定し、今後、科学的根拠に基づき、スタック系統 1507×NK603 の栽培によって生物多様性影響が生ずるおそれがあると立証された場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

2. 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

デュポン株式会社内に、緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部）の部門長から構成される。同時に、当該管理部門（農業製品事業部）内に、本措置に適切に対応するための組織を設置し、危機対策本部並びに、スタック系統 1507×NK603 の開発者である米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。本組織は、農業製品事業部長が責任者となる。

2. 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、スタック系統 1507×NK603 の開発者である米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、販売した種子の購入者及び穀物取扱い業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、スタック系統 1507×NK603 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

また必要に応じて、デュポン株式会社のホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

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

今後、スタック系統 1507×NK603 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、弊社は、種子取扱い業者及び国内のスタック系統 1507×NK603 の栽培者に対して本件を通知する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的正当性のある根拠に基づき、スタック系統 1507×NK603 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。