

コウチュ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 (*cry34Ab1*, *cry35Ab1*, *pat*, *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) *Ilitis*) (59122×NK603, OECD UI : DAS-59122-7×MON-00603-6) 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1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(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.....	4
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	5
(1) 供与核酸に関する情報	7
(2) ベクターに関する情報.....	10
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	11
(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 ...	16
(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	19
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	20
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	24
(1) 使用等の内容.....	24
(2) 使用等の方法.....	24
(3) 承認を受けようとするものによる第一種使用等の開始後における情報収集の方法.....	24
(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.....	24
(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.....	25
第2 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	26
1 競合における優位性	26
2 有害物質の産生性	28
3 交雑性.....	31
4 その他の性質	31
第3 生物多様性影響の総合的評価.....	32

参考文献	34
緊急措置計画書 (栽培目的の場合)	37
緊急措置計画書 (食用、飼料用に供する場合).....	39

第一種使用規程承認申請書

平成 17 年 6 月 21 日

農林水産大臣 島村 宜 伸 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

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	コウチュ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>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i> , <i>pat</i> , <i>cp4 epsps</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (59122×NK603, OECD UI : DAS-59122-7×MON-00603-6)
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1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 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

コウチュ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 (*cry34Ab1, cry35Ab1, pat, cp4 epsps, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (59122×NK603, OECD UI : DAS-59122-7×MON-00603-6) (以下、スタック系統 59122×NK603 と表記)は、コウチュ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 (*cry34Ab1, cry35Ab1, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (*B.t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7, OECD UI : DAS-59122-7) (以下、Event DAS-59122-7 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-00603-6) (以下、NK603 と表記) の自殖系統同士を、従来の交雑育種法により交配させた品種である。親系統である Event DAS-59122-7 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

トウモロコシは、その起源が古く、長い栽培化の歴史の中で人類によって最も強い選択を受けている作物であり、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。また、近縁種であるテオシント (*Zea mays* L. ssp. *mexicana* (Schrad.) Iltis) は、メキシコ、グアテマラ、ホンジュラスに自生しているが、米国のコーンベルト地帯、ヨーロッパ、アフリカ、オーストラリア、アジアには自生していない (農学大辞典, 1994)。

(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、近縁種であるテオシントを祖先野生種とする説が有力である（菊池, 1987）。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（農学大事典, 1994）。

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（菊池, 1987）。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

我が国における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（農学大事典, 1994）。

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（菊池, 1987）。

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。2004 年の世界総生産量は約 7 億 529 万トンである。最大の生産国は米国で、全世界の生産量の 42% を占めている（FAO Statistical Database, <http://apps.fao.org/page/collections>）。2004 年の統計によれば、我が国は約 1,648 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 95% にあたる約 1,568 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（財務省貿易統計, <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>）。

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（菊池, 1987）。2004 年に我が国に輸入されたトウモロコシのうち、約 1,204 万トンが飼料として用いられ（財務省貿易統計, <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>）、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（農学大事典, 1994）。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（農学大事典, 1994）。

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（OECD, 2003）。

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（農学大事典, 1994）。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、土壌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（農学大事典, 1994）。

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 (OECD, 2003)。花粉は球形で、直径はおよそ 90~100 μm である。受粉は風媒によって行われる。花粉の飛散距離は、最大で 200~800m とされている (第 2 回「第 1 種使用規程承認組換え作物栽培実験指針」検討会資料 5-1: 栽培実験対象作物別の隔離距離の考え方 3. トウモロコシ)。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 (Kawashima *et al.*, 2004)。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 (平成 15 年度 (2003) 農業環境調査研究成績・計画概要集)。

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 (菊池, 1987)。

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を整えば、30 分以上と言われている (CFIA, 1994)。

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

スタック系統 59122×NK603 は、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開発された。親系統である Event DAS-59122-7 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、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 59122×NK603 は、Event DAS-59122-7 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品種である。

スタック系統 59122×NK603 には、Event DAS-59122-7 由来のコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与するための *cry34/35Ab1* 遺伝子、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* 遺伝子が導入されている。

なお、親系統 Event DAS-59122-7 及び NK603 について、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いる。Event DAS-59122-7、NK603 共に、生物多様性影響評価検討会において、本スタック系統 59122×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おり、Event DAS-59122-7 は 2005 年 2 月 21 日にパブリックコメントの募集を終了しており、NK603 は 2004 年 11 月 22 日に承認されている。

本評価書の作成にあたっては、環境省バイオセーフティクリアリングハウス (J-BCH) のウェブサイト公開されている Event DAS-59122-7 及び NK603 の概要書、並びにカナダの agbios 社の GM database に公開されている NK603 の概要書に基づいて記載した (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DAS59122-7ap.pdf、http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/NK603ap.pdf、<http://www.agbios.com/docroot/decdocs/02-269-007.pdf>.)。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

Event DAS-59122-7 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 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 (8 ページ) に、それぞれ示したとおりである。

表 1 Event DAS-59122-7 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>cry34Ab1</i> 遺伝子発現カセット		
<i>UBIZM1(2) PRO</i>	1.98	トウモロコシ由来のユビキチン構成的プロモーター ¹⁾ (イントロン及び 5'非翻訳領域を含む (Christensen, <i>et al.</i> , 1992).))
<i>cry34Ab1</i>	0.37	<i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry34Ab1 蛋白質をコードする遺伝子
<i>PINII TERM</i>	0.32	ジャガイモ由来の 転写を停止するためのプロテアーゼインヒビター II ターミネーター
<i>cry35Ab1</i> 遺伝子発現カセット		
<i>TA Peroxidase PRO</i>	1.30	根における発現が知られているコムギ由来のペルオキシダーゼプロモーター (GenBank X53675 の 45-1342 塩基配列)。
<i>cry35Ab1</i>	1.15	<i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry35Ab1 蛋白質をコードする遺伝子
<i>PINII TERM</i>	0.32	ジャガイモ由来の 転写を停止するためのプロテアーゼインヒビター II ターミネーター
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
<i>CAMV 35S PRO</i>	0.53	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S 構成的プロモーター ¹⁾ (Hohn, <i>et al.</i> , 1995)
<i>Pat</i>	0.55	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィン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 (植物における発現を高めるため、最適化されている ²⁾ (Eckes, <i>et al.</i> , 1989).)
<i>CAMV 35S TERM</i>	0.21	カリフラワーモザイクウイルス由来の転写を停止するための 35S ターミネーター (Hohn, <i>et al.</i> , 1995)

1) 構成的プロモーター：植物体の全体において、目的遺伝子を発現させるプロモーター。2) 産生されるタンパク質のアミノ酸配列は変化していない。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

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		
<i>P-ract 1</i>	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。
<i>ract 1</i> 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、ポリアダニル化を誘導する。
<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	0.2	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、ポリアダニル化を誘導する。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン株にある)

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

Event DAS-59122-7 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 (7 ページ) 及び表 2 (8 ページ) のとおりである。

- 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. Cry34Ab1 蛋白質 及び Cry35Ab1 蛋白質

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株に由来する *B.t.*蛋白質の一種で、コーンルートワーム (corn rootworm: *Diabrotica spp.*) に対して活性を持ち、協調して働くことから併せてバイナリー蛋白質と称される (Ellis *et al.*, 2002)。

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は揃って機能し、他の *B.t.*蛋白質と同様に、標的昆虫の中腸細胞膜を破壊することが示唆されている (Masson *et al.*, 2004)。一般的に、*B.t.*蛋白質の殺虫効果は非常に特異性が高いことが知られているが (白井, 2003)、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の殺虫効果も特異性が高く、生物検定の結果、コウチュウ目害虫である northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*) と western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) の 2 種の幼虫のみに殺虫活性を示すことが確認されている (Poletika, 2003)。

なお、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 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 (Song, 2003)。

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活性を阻害する。その結果、植物体内にアンモニアが蓄積して植物は枯死する。PAT 蛋白質は、*L*-グルホシネートをアセチル化し、無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。PAT 蛋白質は *L*-グルホシネートに対する基質特異性が非常に高く、他の *L*-アミノ酸や

D-グルホシネートを基質としないことが報告されている (OECD, 1999)。

なお、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 (Meyer, 1999)。

c. CP4 EPSPS 蛋白質

CP4 EPSPS 蛋白質は、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。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)の活性を阻害する。その結果、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 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体に付与する。また、EPSPS 蛋白質はホスホエノールピルビン酸及びシキミ酸-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

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 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。PAT 蛋白質は基質特異性が高いことが報告されている (OECD, 1999)。また、前述のように、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、植物代謝に非意図的に影響を及ぼすとは考えられない。

以上、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質に酵素活性がないと考えられること、並びに PAT 蛋白質及び CP4 EPSPS 蛋白質とも高い基質特異性を有し、両蛋白質の作用機作が異なっていることから、スタック系統 59122×NK603 において、導入遺伝子による宿主の代謝系への意図しない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

Event DAS-59122-7 の作出に用いられたベクターは、大腸菌プラスミド pSB1 由来のプラスミド PHP17662 である (図 1、13 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、14 ページ)。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

Event DAS-59122-7 の作出に用いられたベクターの塩基数は 50,321bp 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。両ベクター共、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

プラスミド PHP17662 の T-DNA 領域外の外骨格領域には、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、抗生物質耐性マーカー (*tet* 遺伝子及び *spc* 遺伝子) が含まれている。*tet* 遺伝子は、テトラサイクリン (tetracycline) 抗生物質に対する耐性を、*spc* 遺伝子は、スペクチノマイシン (spectinomycin) 抗生物質に対する耐性を付与する。

一方、プラスミド PV-ZMGT32 の供与核酸以外の領域には、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するため、抗生物質耐性マーカー (*nptII* 遺伝子) が含まれている。*nptII* 遺伝子は、カナマイシン (kanamycin) 抗生物質に対する耐性を付与する。

これらの抗生物質耐性遺伝子は、宿主には導入されていない。

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

Event DAS-59122-7 の作出に用いられたプラスミド PHP17662 の T-DNA 領域は、 [UBIZM1(2) Promoter]-[cry34Ab1]-[PINII Terminator]-[TA Peroxidase Promoter]-[cry35Ab1]-[PINII 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*]-[*Zmhsp70*]-[*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

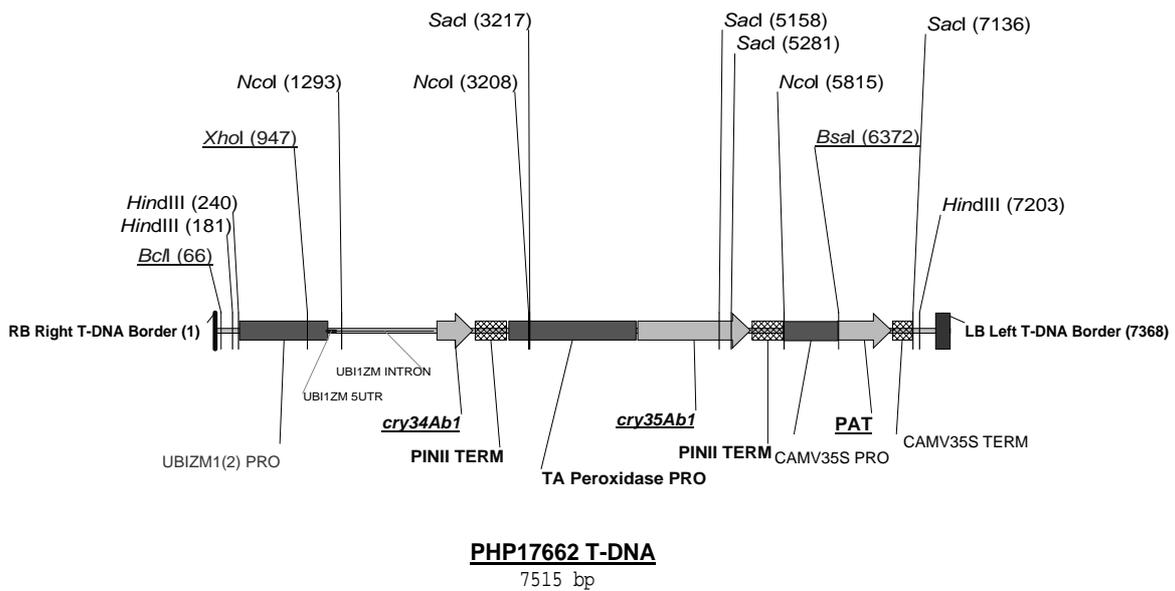
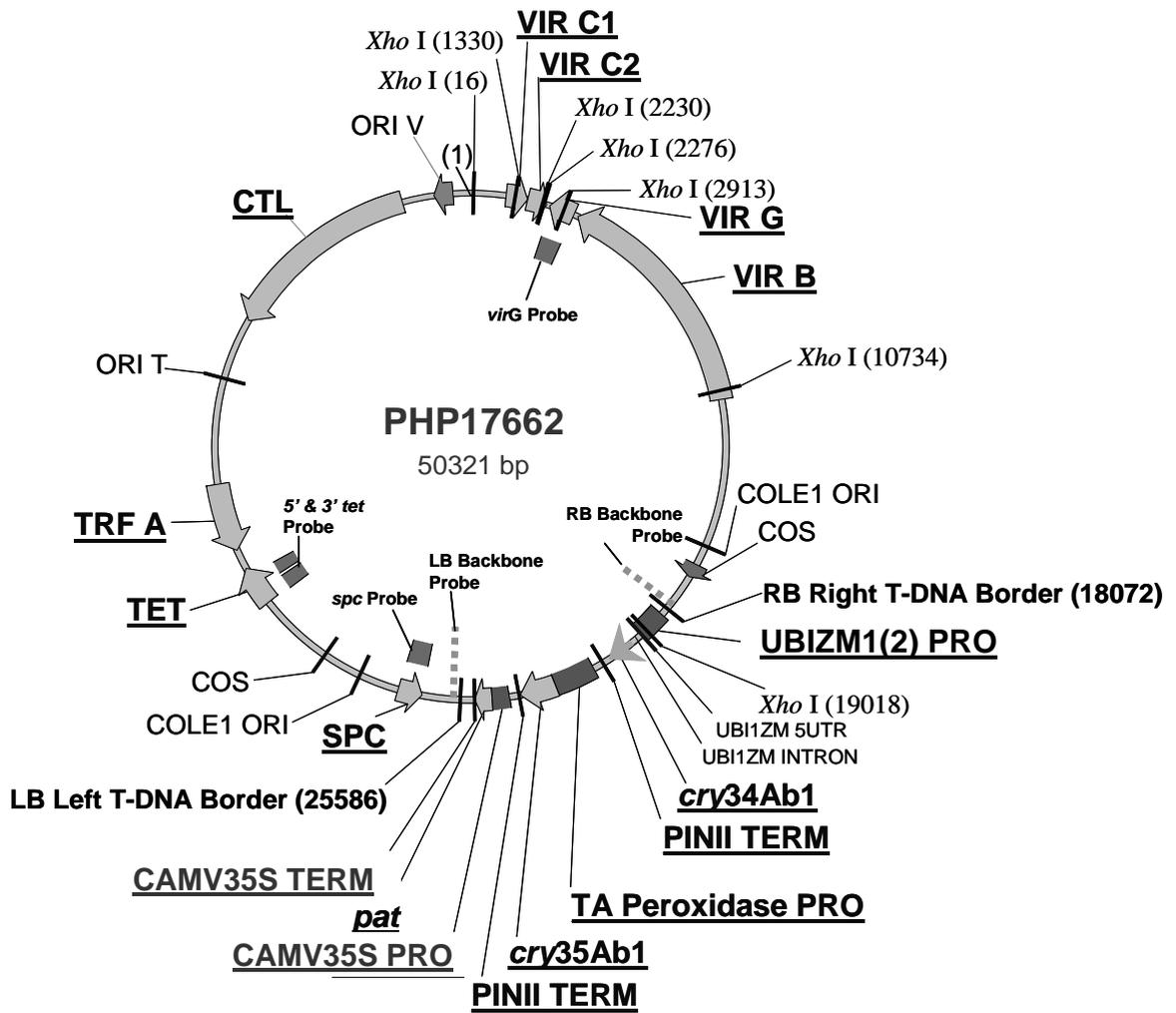
核酸の宿主への移入は、Event DAS-59122-7 ではアグロバクテリウム法によって、トウモロコシ品種 A188×B73 の Hi-II カルスに、また、NK603 ではパーティクルガン法によって、トウモロコシ品種 AW×CW に行った。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

親系統である Event DAS-59122-7 及び NK603 は、従来の一世代雑種育種法を用いて育成された。また、本スタック系統 59122×NK603 は、図 3 (15 ページ) の育成経過に示したように、米国パイオニア・ハイブレッッド・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された。

我が国において、Event DAS-59122-7 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われ、2005 年 2 月 21 日にパブリックコメントの募集が終了している。また、2004 年 5 月に食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、2004 年 6 月に飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行っている。

一方、NK603 については 2001 年 5 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。その後、Event DAS-59122-7 と同様に、「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行われ、2004 年 11 月 22 日に承認されている。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)。



PHP17662 T-DNA
7515 bp

図 1 プラスミド PHP17662*及び T-DNA 領域の構成

*Event DAS-59122-7 の作出に用いられたベクター
(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

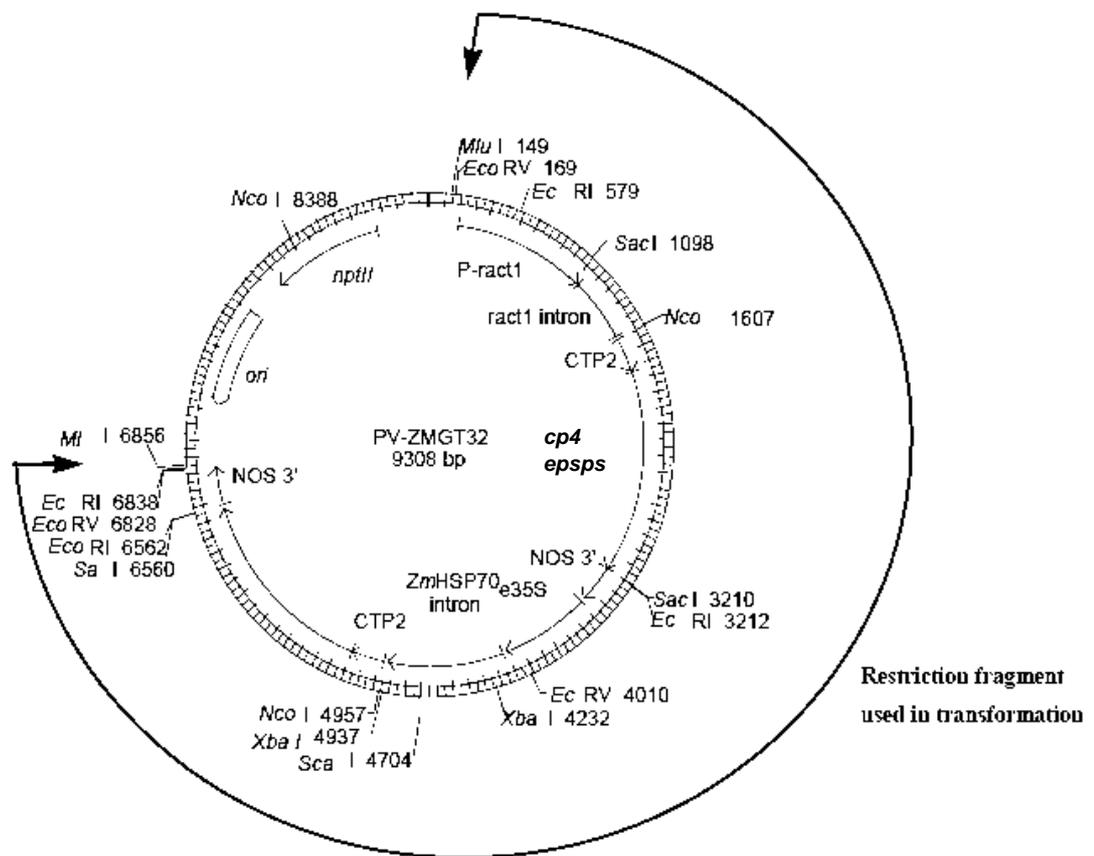


図 2 プラスミド PV-ZMGT32*の構成

* NK603 の作出に用いられたベクター

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。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

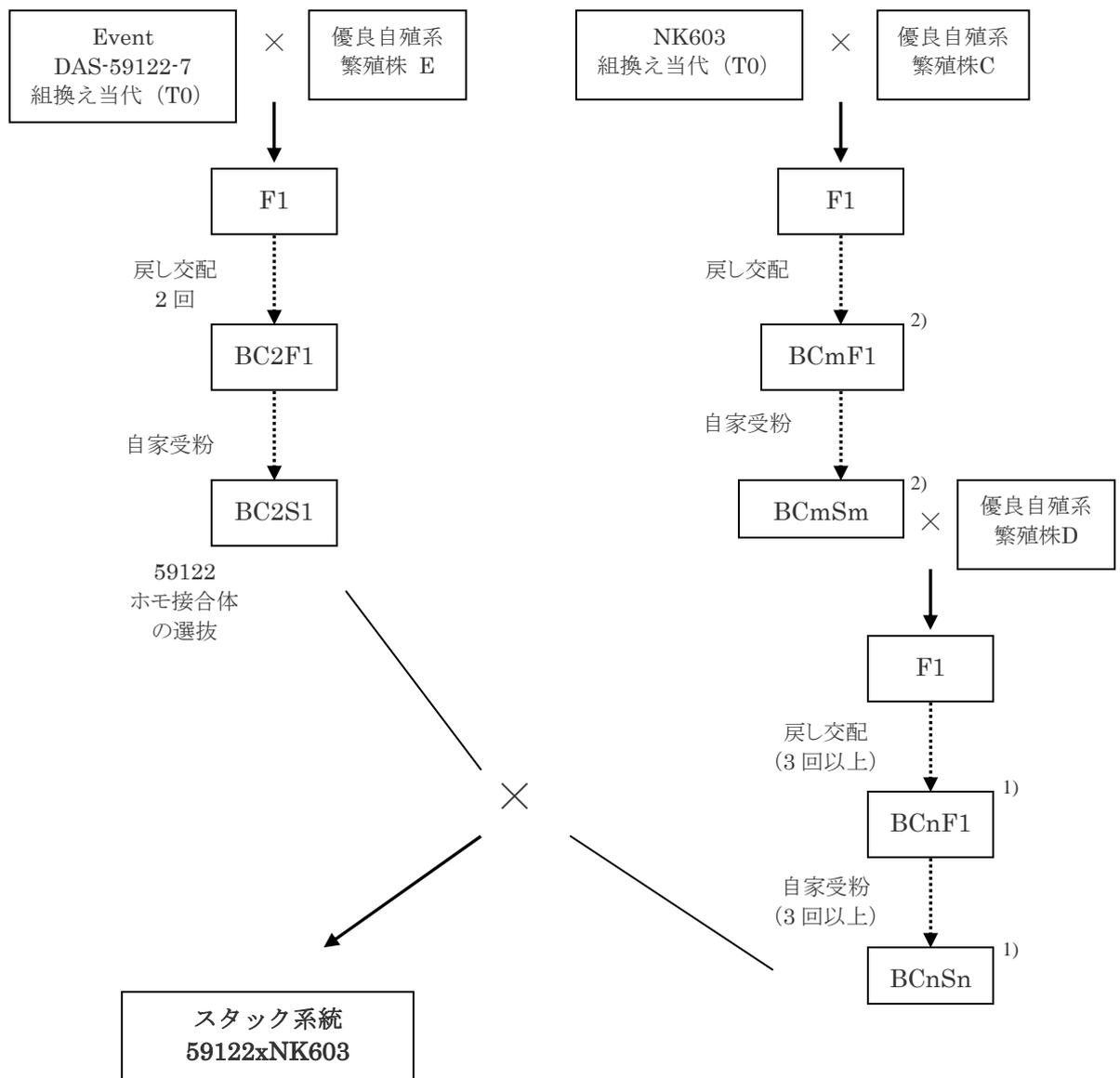


図 3 スタック系統 59122×NK603 の育成概要図

- 1) $n \geq 3$ であり、3 回以上戻し交配(BC)又は自家受粉(S)を行ったことを示す。
- 2) BCmSm は、米国モンサント社より米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社に対して提供されたもので、米国モンサント社の育種プログラムにより交配された品種である。なお、BCmF1 及び BCmSm の m は、戻し交配又は自家受粉の回数を示す。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン㈱にある)

(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

Event DAS-59122-7 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、サザンブロット分析の結果確認されている。

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

Event DAS-59122-7 においては、コーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に抵抗性を付与するための *cry34Ab1* 遺伝子発現カセット及び *cry35Ab1* 遺伝子発現カセットと、除草剤グリ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、各々1コピーずつ、完全な形でトウモロコシゲノム上に挿入され、後代品種に安定的に伝達していることがサザンブロット分析の結果確認されている。

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サザンブロット分析の結果確認されている。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。

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 59122×NK603 における、Event DAS-59122-7 及び NK603 由来の獲得形質が安定的に発現していることを、除草剤散布試験、並びに標的昆虫を用いた生物検定によって確認したので、以下に結果を記載する。

除草剤散布試験

スタック系統 59122×NK603 の除草剤グリホシネート及び除草剤グリホサートに対する耐性が、親系統 Event DAS-59122-7 及び NK603 と同等であるかどうかを確認するため、2005年3月に、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社の温室において散布試験を行った(別紙1)。

スタック系統 59122×NK603 及び親系統 Event DAS-59122-7、NK603、非組換えトウモロコシの種子を各バット（バットサイズ：縦×横×高さ＝約 35 cm×50 cm×10 cm）に 15 粒ずつ播種した。播種後 8 日目に間引きを行い各バット 10 本立てとし、除草剤グルホシネートのみ、除草剤グリホサートのみ、又は除草剤グリホサートに続けて除草剤グルホシネートを散布する 3 種類の処理区を設けた。表 3（18 ページ）に示すように、除草剤グルホシネートのみを散布する処理区にはスタック系統 59122×NK603 及び Event DAS-59122-7、非組換えトウモロコシを、除草剤グリホサートのみを散布する処理区にはスタック系統 59122×NK603 及び NK603、非組換えトウモロコシを、除草剤グリホサートに続けて除草剤グルホシネートを散布する処理区にはスタック系統 59122×NK603 及び非組換えトウモロコシを供試した。除草剤の散布は、農薬登録で認められている薬量（通常量）に加えて、通常量の 16 倍及び 32 倍の薬量でも行い、農家が通常散布する時期である播種後 12 日目に除草剤グリホサートを、播種後 15 日目に除草剤グルホシネートを散布した。播種後 23 日目に薬害の程度（生育阻害、退色、斑点等）をバットごとに目視にて調査し、0%から 100%のスコアで評価した（0%＝薬害なし、100%＝枯死）。試験は 3 反復で行った。

その結果、スタック系統 59122×NK603 と親系統 Event DAS-59122-7 及び NK603 の間で、除草剤グルホシネート散布処理及び除草剤グリホサート散布処理による薬害程度に統計学的有意差は認められなかった（表 3、18 ページ）。以上のことから、スタック系統 59122×NK603 の除草剤グルホシネート及び除草剤グリホサートに対する耐性は、親系統 Event DAS-59122-7 及び NK603 と同等であることが確認された。

なお、通常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、通常量の 16 倍及び 32 倍の薬量は本試験用に特別に散布したものであり、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い。また、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートを続けて散布処理したグループがあるが、本使用法は農薬登録では認められていないため、本試験用に特別に散布したものである。

表 3 除草剤散布による薬害程度

除草剤グルホシネート散布処理による薬害程度				
供試植物	薬害程度 (%)			
	非散布	通常量 (0.5kg ai/ha)	16 倍 (8.0kg ai/ha)	32 倍 (16.0kg ai/ha)
スタック系統 59122×NK603	0.0±0.0 b	10.0±5.8 ab	10.0±0.0 ab	20.0±0.0 a
Event DAS-59122-7	0.0±0.0 b	6.7±3.3 b	6.7±3.3 b	10.0±0.0 ab
非組換え体	0.0±0.0 b	40.0±0.0 c		
除草剤グリホサート散布処理による薬害程度				
供試植物	薬害程度 (%)			
	非散布	通常量 (1.1kg ai/ha)	16 倍 (17.6kg ai/ha)	32 倍 (35.2kg ai/ha)
スタック系統 59122×NK603	0.0±0.0 b	3.3±3.3 b	10.0±5.8 b	10.0±5.8 b
NK603	0.0±0.0 b	0.0±0.0 b	3.3±3.3 b	3.3±3.3 b
非組換え体	0.0±0.0 b	63.3±3.3 a		
除草剤グルホシネート+除草剤グリホサート散布処理による薬害程度				
供試植物	薬害程度 (%)			
	非散布	通常量 (0.5kg ai/ha, 1.1kg ai/ha)	16 倍 (8.0kg ai/ha, 17.6kg ai/ha)	32 倍 (16.0kg ai/ha, 35.2kg ai/ha)
スタック系統 59122×NK603	0.0±0.0 b	3.3±3.3 ab	6.7±3.3 ab	23.3±6.7 a
非組換え体	0.0±0.0 b	73.3±3.3 c		

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン㈱にある)

統計処理は各除草剤の散布処理ごとに行い、薬害程度は各々の非散布対照区と比較した。薬害程度に付記されている記号は、同一グループ内 (a/b/c) で、薬害程度に統計学的な有意差が認められなかったことを示す (Tukey 多重検定、 $P<0.05$)。±に続く数値は標準誤差。なお、除草剤散布量は 1 ヘクタール当たりの有効成分 (active ingredient) 量 (kg ai/ha) で示した。

western corn rootworm を供試した生物検定

スタック系統 59122×NK603 のコウチュウ目害虫抵抗性が、親系統 Event DAS-59122-7 のコウチュウ目害虫抵抗性と同等であるかどうかを確認するため、2005 年 3 月に、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社の温室において、標的昆虫である western corn rootworm を用いて生物検定を行った (別紙 2)。

スタック系統 59122×NK603 及び親系統 Event DAS-59122-7、非組換えトウモロコシを栽培し (トウモロコシ 1 個体/ポット、ポットサイズ: 直径 24cm、高さ 22cm、容量 6.4L)、V4 ステージ (本葉 4 葉抽出期) において、各々の根元に western corn rootworm の卵を 100 個ずつ、一日おきに計 4 回 (合計 400

個) 接種した。その後、孵化した幼虫が蛹になった時点(接種後約 2 週間目)で、根の食害程度を観察した。検定は 1 反復につきトウモロコシ 4 個体とし、計 5 反復行った。

その結果、スタック系統 59122×NK603 と Event DAS-59122-7 の間で、western corn rootworm に対する食害程度に、統計学的有意差は認められず、スタック系統 59122×NK603 においても、親系統 Event DAS-59122-7 と同様に、コウチュウ目害虫抵抗性が安定的に発現していることが確認された(表 4)(別紙 2)。

表 4 western corn rootworm に対する抵抗性

供試植物	根部食害 スコア*
スタック系統 59122×NK603	0.10±0.02
Event DAS-59122-7	0.09±0.01
非組換え体	2.64±0.08

* アイオワ州立大学の Node-Injury Scale

(0-3: スケール 0 は被害なし、スケール 3 は 3 つ以上の節根が切り取られた状態)。

(<http://www.ent.iastate.edu/pest/rootworm/nodeinjury/nodeinjury.html>)。

±に続く数値は標準誤差。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はデュポン(株)にある)

結論

以上のことから、Event DAS-59122-7 及び NK603 由来の獲得形質が、スタック系統 59122×NK603 でそれぞれ安定的に発現していることが確認された。

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、従って、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

PAT 蛋白質及び 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 法が開発されており、各蛋白質の検出用キットが販売されている。Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の検出用キットは現在開発中で、2005 年 8 月には販売される予定である。本スタック系統 59122×NK603 の検出は、これら 3 つの方法をトウモロコシ種子一粒ごとに適用することで可能である。

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。いずれの検出キットも、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 コウチュウ目害虫抵抗性

スタック系統 59122×NK603 には、Event DAS-59122-7 に導入された *B.t.* PS149B1 株由来の *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子により、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質が産生されており、その結果、トウモロコシを食害するコーンルートワームに対する抵抗性が付与されている。

② 除草剤グルホシネートに対する耐性

スタック系統 59122×NK603 には、Event DAS-59122-7 に導入された *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子により、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。*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 59122×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。*cp4 epsps* 遺伝子の発現により産生される 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 59122×NK603 は、Event DAS-59122-7 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品種であり、Event DAS-59122-7 と NK603 の特性を併せ持つ。本スタック系統で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 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、並びに PAT 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質とも高い基質特異性を有し且つ両

蛋白質の作用機作が異なっていることから、本スタック系統において、これらの蛋白質が発現する形質が相互に作用することはないと考えられる。実際に、本評価書の第 1-2 (4)「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」(16 ページ)に記述したように、除草剤散布試験及び生物検定を行った結果、双方の親系統から付与された各形質が、スタック系統 59122×NK603 内で安定的に発現していることが確認されている。

従って、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、Event DAS-59122-7 及び NK603 の諸形質に関する個別調査の結果に基づいて記載した。なお個別調査は、Event DAS-59122-7 については 2003 年に、NK603 については 2000 年に、我が国の隔離ほ場において行われた。

① 形態及び生育の特性

Event DAS-59122-7 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、有効雌穂数、粒色及び粒形、稈長、着雌穂高、雌穂長、雌穂径、地上部生体重、及び花器の形状について評価した。その結果、稈長以外は評価を行ったすべての項目について、Event DAS-59122-7 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。稈長については、供試した 2 品種の組換え体品種のうち 1 品種について有意差が認められたが (Event DAS-59122-7 : 192.0 cm、非組換え体 : 212.3 cm)、もう 1 品種については、差は認められなかった。

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、草姿又は草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、収穫期の植物重の評価を行ったが、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。

以上の結果より、本スタック系統 59122×NK603 において、形態及び生育の特性について、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。

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 99%で、Event DAS-59122-7 の 96%及びNK603 の 98%と同等であった。また、いずれの発芽率も、OECD が定めているトウモロコシの標準発芽率の 90%以上となっている (NEBRASKA OECD GUIDELINES, 1995)。

② 生育初期における低温耐性

Event DAS-59122-7 について幼苗の低温耐性が評価された。最低気温が 1.5℃ になった時期にはすべての植物体が枯死し、Event DAS-59122-7 及び非組換え トウモロコシとの間で低温感受性に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た。低温（気温 4℃）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。

以上の結果より、本スタック系統 59122×NK603 において、低温耐性について、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。

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。以上のことから、Event DAS-59122-7 及び NK603 共に、成体の越冬性試験は行わなかったが、実際に、Event DAS-59122-7 の栽培試験に用いた米国のは場を翌年に観察したところ、残存している植物体の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。

以上の結果より、本スタック系統 59122×NK603 において、越冬性について、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。

④ 花粉の稔性及びサイズ

Event DAS-59122-7 について、ヨウ素ヨウ化カリウム溶液で花粉を染色し、顕微鏡下で観察したところ、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。

一方、NK603 についても、花粉を染色し、顕微鏡下で観察したところ、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。

以上の結果より、本スタック系統 59122×NK603 において、花粉の稔性及びサイズについて、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。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、及び収穫種子の休眠性、発芽率

種子の生産量に係る項目として、Event DAS-59122-7 の粒列数、1 列粒数及び 100 粒重等について調査を行ったが、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、Event DAS-59122-7 及び非組換えトウモロコシの双方とも休眠性は認められず、収穫種子 (F2) の発芽率に差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 粒重等の調査が行ったが、100 粒重以外 NK603 と非組換えトウモロコシの間で差は認められなかった。100 粒重については、供試した 2 品種の組換え体品種のうち 1 品種について有意差が認められたが (NK603 : 33.6g、非組換え体 : 35.1g)、もう 1 品種については、差が認められなかった。また、NK603 と非組換えトウモロコシの収穫種子 (F2) の発芽率に差はなく、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、Event DAS-59122-7、NK603 とも、それらの対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 59122×NK603 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。

⑦ 有害物質の産生性

トウモロコシについて、周辺の植物や土壌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。

Event DAS-59122-7 中には、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子、*pat* 遺伝子の導入により、新たに Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質、PAT 蛋白質が産生されている。一方、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。しかし、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 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いない。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 (OECD, 1999)。CP4 EPSPS 蛋白質についても、PAT 蛋白質と同様に高い基質特異性を有することが知られている。従って、これらの蛋白質が宿主トウモロコシの代謝経路に関与して、意図しない有害

物質を新たに産生するとは考えられない。

Event DAS-59122-7 については、隔離ほ場試験において試験区内に発生する雑草を調査し、種組成 (DCA スコア)、総個体数、乾燥重について解析を、また、特定網室試験において土壌微生物相試験及び鋤込み試験を行った。さらに米国ハワイ州の試験圃場 (火山灰土壌) において、土壌微生物相試験を行った。これらの結果より、意図しない有害物質の産生性について、Event DAS-59122-7 と対照の非組換えトウモロコシの間に、差異がないことが確認された。

NK603 については、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に、差異がないことが確認された。

以上のことから、スタック系統 59122×NK603 において、意図しない有害物質の産生性について、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。

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) 使用等の方法

—

(3) 承認を受けようとするものによる第一種使用等の開始後における情報収集の方法

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

申請書の別添資料「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

—

(6) 国外における使用等に関する情報

親系統である Event DAS-59122-7 について、2004 年に米国食品医薬品局 (FDA) から食品及び飼料としての安全性を承認されている。また、米国環境保護庁 (EPA) による審査は、その諮問機関である Scientific Advisory Panel (SAP) による安全性の確認が 2005 年 3 月に終了している。

一方、NK603 については、2000 年に、米国食品医薬品局 (FDA) から食品及び飼料としての安全性を、米国農務省 (USDA) の動植物検疫局 (APHIS) から無規制裁培許可を承認されている。

本スタック系統 59122×NK603 については、2005 年 6 月に米国 FDA に対して、商品化する旨を報告する予定である。

なお、国内においては、Event DAS-59122-7 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われ、2005 年 2 月 21 日にパブリックコメントの募集が終了している。また、2004 年 5 月に食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、2004 年 6 月に飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行っている。

一方、国内における NK603 については 2001 年 5 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。その後、Event DAS-59122-7 と同様に、「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行われ、2004 年 11 月 22 日に承認されている。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)。

第2 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影響を及ぼしたという報告はない。

スタック系統 59122×NK603 は、Event DAS-59122-7 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品種であり、Event DAS-59122-7 と NK603 の特性を併せ持つ。しかし、本スタック系統で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 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、並びに PAT 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質とも高い基質特異性を有し且つ両蛋白質の作用機作が異なっていることから、本スタック系統において、これらの蛋白質が発現する形質が相互に作用することはないと考えられる。実際に、本評価書の第 1-2 (4)「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」(16 ページ) に記述したように、除草剤散布試験及び生物検定を行った。その結果、散布を行ったいずれの薬量においても、スタック系統 59122×NK603 と親系統 Event DAS-59122-7 及び NK603 の薬害程度に統計学的有意差は認められず、スタック系統 59122×NK603 の除草剤グルホシネート及び除草剤グリホサートに対する耐性は、親系統 Event DAS-59122-7 及び NK603 と同等であることが確認された。また、western corn rootworm を用いた生物検定では、スタック系統 59122×NK603 と Event DAS-59122-7 の間で、western corn rootworm に対する食害程度に、統計学的有意差は認められず、スタック系統 59122×NK603 においても、親系統 Event DAS-59122-7 と同様に、コウチュウ目害虫抵抗性が安定的に発現していることが確認された。以上のことから、Event DAS-59122-7 及び NK603 由来の獲得形質が、スタック系統 59122×NK603 でそれぞれ安定的に発現していることが確認された。

従って、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、Event DAS-59122-7 と NK603 の生物多様性影響評価結果に基づいて行った。

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 Event DAS-59122-7 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、花粉の稔性等)について調査を行った。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との間で差異は認められなかった。

以上の結果より、Event DAS-59122-7 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 59122×NK603 は、Event DAS-59122-7 由来の *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の導入により、コウチュウ目害虫であるコーンルートワームに対して抵抗性を示す。このことから、同種間では競合における優位性がある程度高まることが予想される。しかしながら、前述のように、親系統である Event DAS-59122-7 及び NK603 と宿主の属する分類学上の種との間で、雑草性に関する特性について差異は認められなかったことから、当該形質が付与されたことによって、栽培作物であるスタック系統 59122×NK603 が自然条件下で自生することが可能となり、競合において優位になるとは考えられない。

また、スタック系統 59122×NK603 には Event DAS-59122-7 由来の除草剤グリホシネート耐性と 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、これらの除草剤に対する耐性の付与が本スタック系統 59122×NK603 に野生植物との競合における優位性を高めるとは考えられない。

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。

従って、スタック系統 59122×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 59122×NK603 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

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。Event DAS-59122-7 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、土壌微生物の評価、鋤込み試験等を行って検討したが、いずれの試験においても、Event DAS-59122-7 又は NK603 と非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。

また、スタック系統 59122×NK603 で発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質には、他の Cry 蛋白質と同様に酵素活性がないことから、代謝に影響を及ぼすことによって意図しない有害物質が産生されることはないと考えられる。PAT 蛋白質は、植物の生長に悪影響を及ぼさないこと及び動物に対して毒性を持たないことが報告されている (OECD, 1999)。また、CP4 EPSPS 蛋白質が有害物質であるという報告はない。従って、本スタック系統 59122×NK603 において、意図しない有害物質の産生はないと考えられる。

以上のことから、スタック系統 59122×NK603 において、Event DAS-59122-7 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非意図的な有害物質は産生されないと判断された。そこで、以下に Event DAS-59122-7 由来の Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質が、我が国の野生動植物等に影響を及ぼす可能性について検討を行った。

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の産生

スタック系統 59122×NK603 には、Event DAS-59122-7 由来のコウチュウ目害虫抵抗性を付与するため Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質が産生されている。Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、トウモロコシを食害するコーンルートワームに対して殺虫効果を持つが、他の *B.t.*蛋白質 (白井, 2003) と同様に、その殺虫効果は特異性が高い。また、我が国にコーンルートワームが生息していることは報告されていない。

Event DAS-59122-7 由来の Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質について、絶滅危惧種であるコウチュウ目昆虫 84 種を例にして考察したが、これら絶滅危惧種が、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及び土壌中に鋤込まれたトウモロコシの腐植質と一緒に当該蛋白質を食餌する可能性はないと考えられた。

以上のことから、スタック系統 59122×NK603 の栽培が絶滅危惧種であるコ

ウチュ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考えられた。

しかしながら、我が国に生息するコウチュウ目昆虫の中には、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 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、コウチュ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、検討を行った。

(2) 影響の具体的内容の評価

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質について

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の混合物を供試して、3 種のコーンルートワーム幼虫に対する殺虫効果を調べた。その結果、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*) 及び western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) に対して高い殺虫効果 (LC₅₀ は、それぞれ 5.56 $\mu\text{g ai/cm}^2$ 及び 44.5 $\mu\text{g ai/cm}^2$) を示したが、southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) に対する LC₅₀ は 343 $\mu\text{g ai/cm}^2$ であった (Herman, 2000)。

また、コーンルートワーム以外のコウチュウ目昆虫に対する影響の有無を調べるために、テントウムシ 2 種 (*Hippodamia convergens* 及び *Coleomegilla maculata*) を供試して生物検定を行った。その結果、検定を行なった最高濃度 (Cry34Ab1 蛋白質 160 $\mu\text{g/mL}$ 及び Cry35Ab1 蛋白質 120 $\mu\text{g/mL}$ 、いずれも砂糖水中) でも、*Hippodamia convergens* の成虫に対して何ら影響は観察されなかった。*Coleomegilla maculata* の幼虫に対しては、生体重の減少が認められたものの、検定を行なった最高濃度 (Cry34Ab1 蛋白質 900 $\mu\text{g/g}$ 及び Cry35Ab1 蛋白質 2 $\mu\text{g/g}$ 、いずれも人工飼料中) でも死亡した個体は認められなかった (Poletika, 2003)。これらの試験濃度は、Cry34Ab1 蛋白質でみるとトウモロコシ花粉飛散期における当該蛋白質の予想蛋白質濃度 (75.29 $\mu\text{g/g}$ 花粉乾物重) のそれぞれ 2.1 倍と 12.0 倍に相当する。この値は、本生物検定における Cry34Ab1 蛋白質の最高濃度に基づいて計算されたものであり、実際の安全幅はさらに広い値であると考えられる。

さらに、チョウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目、カメムシ目等の昆虫についても影響の有無を調べるため生物検定を行ったが、試験を行った最高投与量でも、これらの昆虫に死亡した個体は認められなかった (Poletika, 2003)。また、哺乳類 (Brooks and DeWidt, 2000a, b, c) 及び鳥類 (Smith, *et al.*, 2003)、魚類 (Marino and Yaroch, 2002) に対しても評価を行ったが、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、試験を行ったすべての非標的生物に対し毒性を示さなかつ

た。

また、米国における野外試験において、トウモロコシ栽培期間中に試験ほ場から土壌を採取し、土壌中に生息する生物の調査を行った結果、トビムシ類、ハネカクシ類、オサムシ類、ヤスデ類、クモ類、ムカデ類、ササラダニ類等が採取された。ANOVAによる統計解析の結果、Event DAS-59122-7のほ場から採取した土壌中と、非組換えトウモロコシのほ場から採取した土壌中に生息している生物の種組成に差異のないことが確認された(Higgins and Wright, 2003)。

以上の結果より、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の殺虫効果は非常に特異性が高く、効果を示すのは northern corn rootworm 及び western corn rootworm の 2 種のコーンルートワーム幼虫についてのみで、それ以外は、コウチュウ目昆虫も含めて、試験を行ったすべての非標的生物に対して毒性を持たないことが確認された。

(3) 影響の生じやすさの評価

食品・飼料としての加工用に輸入されたトウモロコシは、こぼれ落ちによる損失を防止するため及び風雨を避けるために、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じる可能性は極めて低い。トウモロコシは、長年人の手により改良された作物で、人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野生化したという報告はなく、コウチュウ目昆虫が、こぼれ落ちにより生育したトウモロコシの花粉や植物体の腐植質に曝露される可能性はないと考えられた。

前述のように、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の殺虫効果は非常に特異性が高く、種々の生物を供試して行った試験の結果、当該蛋白質に感受性を示したのは、標的昆虫であるコーンルートワームのみであった。さらに、現在絶滅が危惧されているコウチュウ目昆虫は、水辺や湿地帯など、トウモロコシの生育に適さない場所に生育していることが多く、トウモロコシ畑やその周辺にこれらの絶滅のおそれのあるコウチュウ目昆虫が生息し、トウモロコシ花粉や土壌中に鋤き込まれたトウモロコシ根や茎の基部の腐植質に暴露される可能性は低いと考えられた。しかしながら、念のため、以下に、トウモロコシ畑の周辺にコウチュウ目昆虫がいた場合を想定し、実際にどの程度当該蛋白質に曝露される可能性があるのかを考察した。

非標的コウチュウ目昆虫がトウモロコシ花粉の飛散により Event DAS-59122-7 由来の Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質に曝露される可能性について、野外における花粉の飛散・堆積密度を調べた実験の結果（平成 15

年度（2003）農業環境調査研究成績・計画概要集）に基づき考察した。その結果、5m 地点での予想 Cry34Ab1 蛋白質濃度は、高めに見積もって $0.000261 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、10m 地点では $0.000015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となり、10m 地点の場合の予想蛋白質量は、標的害虫である northern corn rootworm に対する LC_{50} 値 ($5.56 \mu\text{g ai}/\text{cm}^2$) を基に計算すると約 37 万分の 1 となった。このことから、トウモロコシ畑やその周辺に生息するコウチュウ目昆虫が、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の影響を受ける可能性は低いと判断された。

また、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の土壌中における活性の半減期を southern corn rootworm に対する活性を基に調べたところ、当該蛋白質の活性の半減期は 3.2 日であることが示された。本結果は、当該蛋白質が土壌中に遊離された場合の土壌中残存量が、1 ヶ月以内に初期濃度の 1000 分の 1 に、2 ヶ月以内には 1 万分の 1 に減少することを示している。

従って、Event DAS-59122-7 由来の Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質を発現するスタック系統 59122×NK603 の栽培においても、我が国に生息するコウチュウ目昆虫の、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 59122×NK603 を輸入又は栽培した場合に、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 59122×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。

4 その他の性質

スタック系統 59122×NK603 については、これらの他に生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる性質はないと判断された。

第3 生物多様性影響の総合的評価

スタック系統 59122×NK603 は、Event DAS-59122-7 と NK603 を、従来の交雑育種法により交配させた品種であり、親系統である Event DAS-59122-7 由来の *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子、*pat* 遺伝子、並びに NK603 由来の *cp4 epsps* 遺伝子を併せ持つ。*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子が発現する Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、コーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に抵抗性を、*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。

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 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、CP4 EPSPS 蛋白質ともに高い基質特異性を有し且つ両蛋白質の作用機作が異なっていることから、本スタック系統において、これらの蛋白質が発現する形質が相互に作用することはないと考えられる。実際に、除草剤散布試験及び生物検定を行った結果、双方の親系統から付与された各形質が、スタック系統 59122×NK603 内で安定的に発現していることが確認されている。従って、スタック系統 59122×NK603 の生物多様性影響の評価は、Event DAS-59122-7 と NK603 の個別の生物多様性影響評価結果に基づいて行われた。

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 Event DAS-59122-7 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コーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に対する抵抗性、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、野生植物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 59122×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 59122×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。Event DAS-59122-7 及び 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、土壤微生物の評価、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 59122×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極めて低いと判断された。

スタック系統 59122×NK603 は、コーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与するための Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質を産生する。Event DAS-59122-7 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われており、その結果、トウモロコシ畑やその周辺に生息するコウチュウ目昆虫が、当該蛋白質の影響を受ける可能性はきわめて低いと考えられた。以上のことから、スタック系統 59122×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。従って、交雑性に関して、スタック系統 59122×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 59122×NK603 を第一種使用規程に従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。

参考文献

Brooks, K. J. and DeWidt, P. M. 2000a. PS149B1 14 KDA and 44 KDA Proteins: Acute Oral Toxicity study in CD-1 Mice. The Dow Chemical Company unpublished report. Study ID: 001128.

Brooks, K. J. and DeWidt, P. M. 2000b. PS149B1 44 KDA Protein: Acute Oral Toxicity Study in CD-1 Mice. The Dow Chemical Company unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

Brooks, K. J. and DeWidt, P. M. 2000c. PS149B1 14 KDA Protein: Acute Oral Toxicity Study in CD-1 Mice. The Dow Chemical Company unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

CFIA (Canadian Food Inspection Agency). 1994.

(<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9411e.shtml#A12>).

独立行政法人 農業環境技術研究所. 平成 15 年度 (2003) 農業環境調査研究成績・計画概要集 (研究課題: 鱗翅目昆虫に対する害虫抵抗性遺伝子導入トウモロコシの安全性評価) .

Ellis, R.T., Stockhoff, B.A., Stamp, L., Schnepf, H.E., Schwab, G.E., Knuth, M., Russell, J., Cardineau, G.A. and Narva, K.E. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* Binary Insecticidal Crystal Protein Active on Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Applied Environmental Microbiology* 68: 1137-1145. (<http://aem.asm.org/cgi/content/full/68/3/1137>).

EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2001a. Biopesticide Registration Action Document. (http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/tech_docs/brad_006481.pdf).

EPA. 2001b. Pesticide Fact Sheet for Cry1F protein. (http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006481.pdf).

FAO Statistical Database. 2004. (<http://apps.fao.org/page/collections>).

Hansen-Jesse, L., and J.J. Obrycki. 2000. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125:241-248.

Herman, R.A. 2000. Microbial PS149B1 Binary Delta-Endotoxin: Maize-Insect-Pest Susceptibility Study. Dow AgroSciences LLC unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

Herman, R. A., Scherer, P. N. and Wolt, J. D. 2002. Rapid Degradation of a Binary, PS149B1, δ -Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in Soil, and a Novel Mathematical Model for Fitting Curve-Linear Decay. *Environ. Entomol.* 31: 208-214.

Higgins, L. S., and D. Wright. 2003. Impact of corm rootworm control strategie on non-target arthropods. Pioneer Hi-Bred International, Inc. unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

環境省レッドリスト (日本の絶滅のおそれのある野生生物)、2000年改訂版.
(http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.htm) .

Kawashima, S., K. Matsuo, M. Du, Y. Takahashi, S. Inoue, and S. Yonemura. 2004. An algorithm for estimating potential deposition of corn pollen for environmental assessment. *Environ. Biosafety Res.* 3: 197-207.

菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用: 227-243. 株式会社 光琳.

Marino, T. A. and Yaroch, A. M. 2002. PS149B1 Binary Insecticidal Crystal Protein: An 8-Day Dietary Study with the Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, Waldbaum. The Dow Chemical Company unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

Masson, L., G. Schwab, A. Mazza, R. Brousseau, L. Potvin, and J.-L. Schwartz. 2004. A novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1) containing a Cry34Ab1/Cry35Ab1 binary toxin specific for the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte forms ion channels in lipid membranes. *Biochem.* 43(38):12349-57.

Meyer, T. 1999. Comparison of Amino Acid Sequence Similarity of Cry1F and PAT Proteins to Known Allergen Proteins. Pioneer Hi-Bred International, Inc. unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

NEBRASKA OECD GUIDELINES. 1995. HYBRID CORN. Seed Certification Standards.

農学大事典 第2次増訂改版 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 1994: 537-541.
株式会社 養賢堂発行.

OECD. 1999. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. ([http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(99\)13](http://www.olis.oecd.org/olis/1999doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(99)13)).

OECD. 2003. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27: Consensus Document of the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ([http://www.olis.oecd.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2003\)11](http://www.olis.oecd.org/olis/2003doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2003)11)).

Pleasants, J. M., R. L. Hellmich, G. P. Dively, M. K. Sears, D. E. Stanley-Horn, H. R. Mattila, J. E. Foster, T. L. Clark, and G. D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. PNAS, 98(21):11919-24.

Poletika, N. N. 2003. Non-target Invertebrate Ecological Risk Assessment for Field Corn Expressing Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Insecticidal Crystal Proteins in Event DAS-59122-7. Dow AgroScience LLC. unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

白井 洋一. 2003. 害虫抵抗性遺伝子組換え作物が非標的昆虫に及ぼす影響 : 現在までの研究事例. 日本応用動物昆虫学会誌 47: 1-11.

Smith, B., McNaughton, J. and Hinds, M. 2003. Nutritional Equivalency Study of Maize Containing Cry34Ab1 and Cry35AB1: Poultry Feeding Study. Solution BioSciences, Inc. unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

Song, P. 2003. Comparison of the Amino Acid Sequences of *Bacillus thuringiensis* Strain PS149B1 Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Insecticidal Crystal Proteins as Expressed in Maize to Known Proteins. Dow AgroScience LLC. unpublished report. (社外秘資料につき非公開)

The International Plant Names Index. 2004. (<http://www.ipni.org/index.html>).

財務省貿易統計. 2002. (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成 17 年 6 月 21 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

コウチュ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(cry34Ab1, cry35Ab1, pat, cp4 epsps, Zea mays subsp. mays (L.) Iltis) (59122×NK603, OECD UI : DAS-59122-7×MON-00603-6)について、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 59122×NK603 については、我が国で商業栽培を行う予定は当面ない。商業栽培を行うことを決定し、今後、科学的根拠に基づき、スタック系統 59122×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。

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

弊社内に、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、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 59122×NK603 の開発者である米国パイオニア・ハイブレット・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 59122×NK603 の開発者である米国パイオニア・

ハイブレット・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

米国パイオニア・ハイブレット・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 59122×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、米国パイオニア・ハイブレット・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、弊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 59122×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 59122×NK603 の栽培者に対して不活化または拡散防止に適切な措置をとるよう通知する。

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 59122×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（食用、飼料用に供する場合）

平成 17 年 6 月 21 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

コウチュ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(cry34Ab1, cry35Ab1, pat, cp4 epsps, Zea mays subsp. mays (L.) Iltis) (59122×NK603, OECD UI : DAS-59122-7×MON-00603-6)(以下スタック系統 59122×NK603 と表記)、について、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、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 59122×NK603 の開発者である米国パイオニア・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 59122×NK603 の開発者である米国パイオニア・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

米国パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社は、米国におけるスタック系統 59122×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 59122×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、米国パイオニア・ハイブレット・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 59122×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、米国パイオニア・ハイブレット・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 59122×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。

別添資料一覧

別紙 1 参考資料：試験報告書 PHI-2005-027.

Report summary adapted from study: PHI-2005-027. 2005. Evaluation of herbicide tolerance of hybrid maize lines containing events DAS-59122-7, MON-00603-6, and the combined trait product DAS-59122-7x MON-00603-6. Pioneer Hi-Bred International, Inc. Confidential Report.

社外秘資料につき非公開

別紙 2 参考資料：試験報告書 PHI-2005-035.

Pascual, M. A. 2005. Insect efficacy evaluation of maize expressing the Cry34Ab1, Cry35Ab1, and Cry1F proteins. Pioneer Hi-Bred International, Inc. Confidential Report.

社外秘資料につき非公開