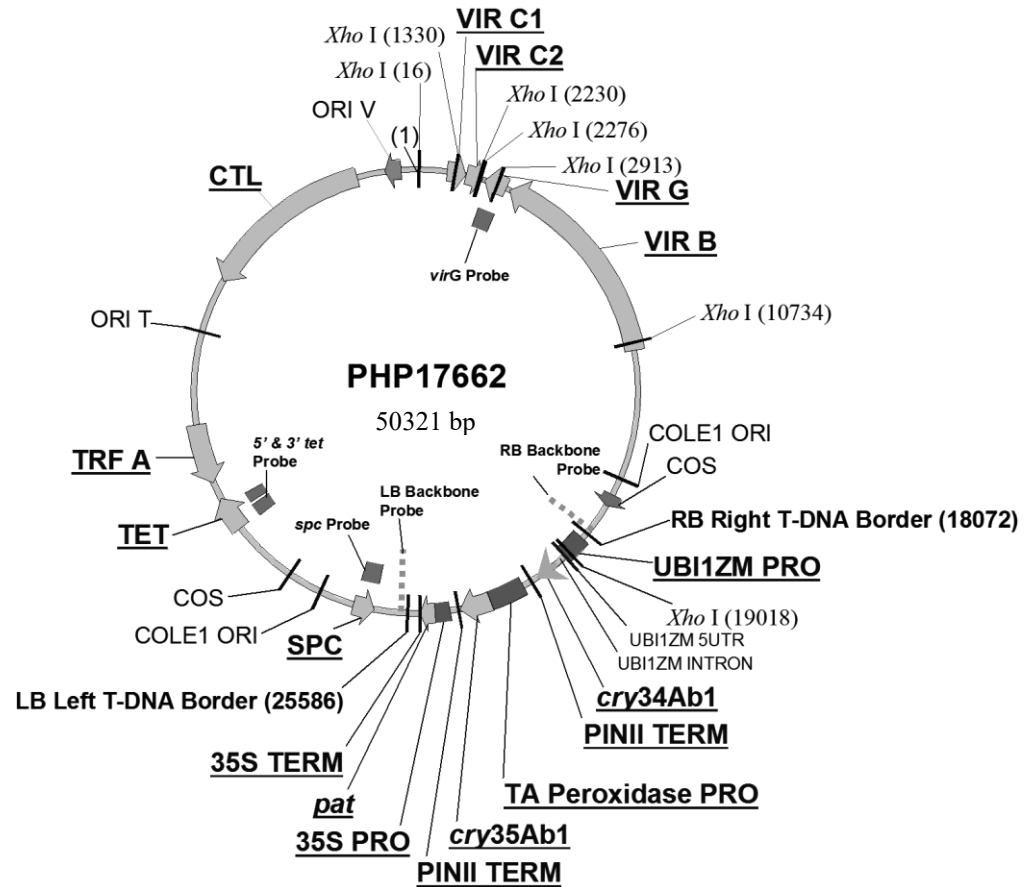


平成 29 年 12 月 20 日

生物多様性影響評価書

図 2. プラスミド PHP17662 及び T-DNA 領域の構成（11 ページ）

【上図の訂正前】



【上図の訂正後】

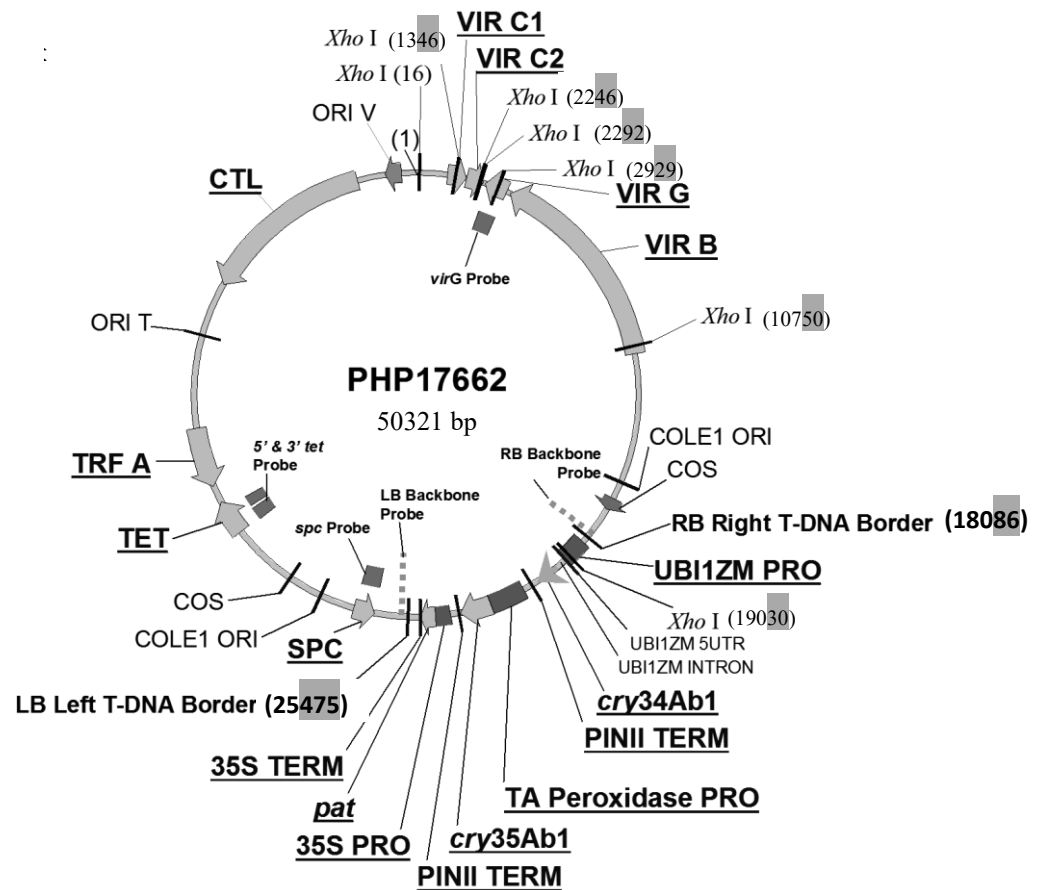
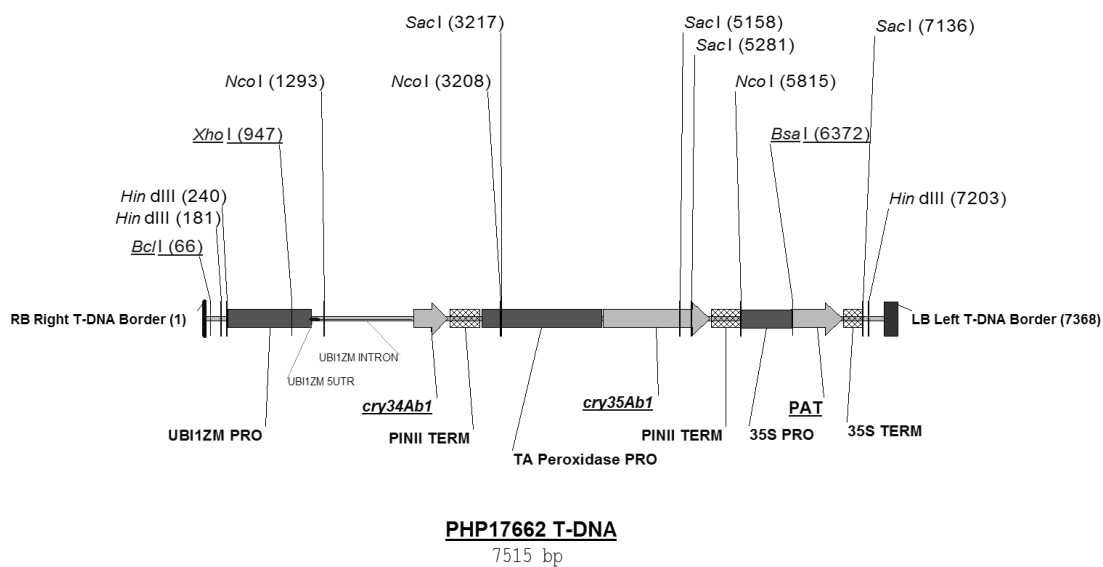
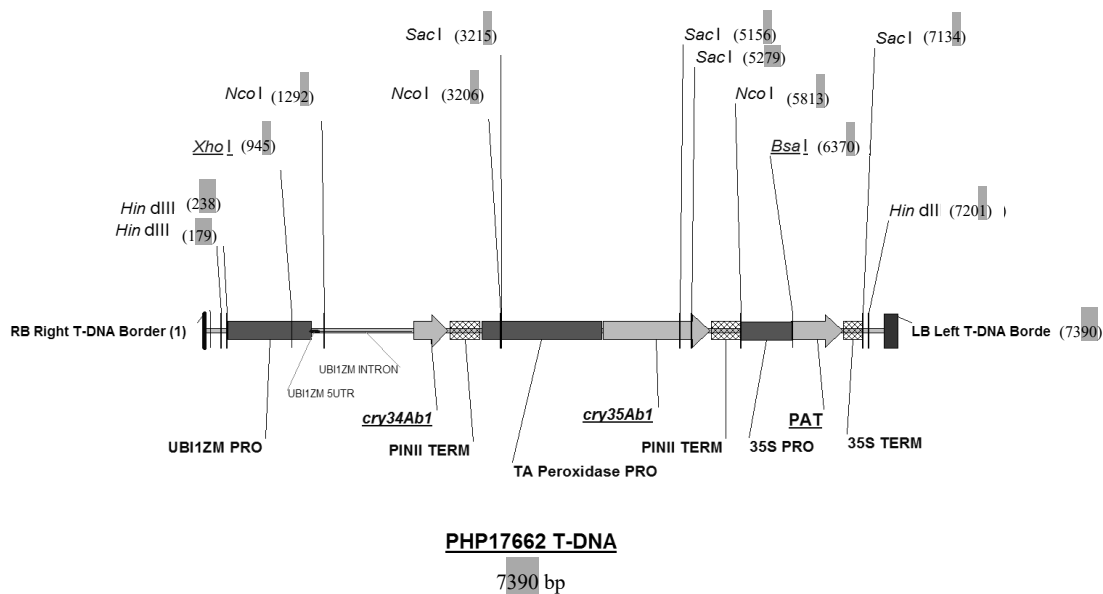


図 2. プラスミド PHP17662 及び T-DNA 領域の構成 (11 ページ)

【下図の訂正前】



【下図の訂正後】



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) 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..... 4
  - (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... 12
  - (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..... 13
  - (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 14
- 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..... 17
  - (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..... 17
  - (3) 国外における使用等に関する情報..... 17

#### 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..... 19
- 2 有害物質の産生性..... 20
- 3 交雑性..... 23

#### 第三 生物多様性影響の総合的評価..... 24

## 緊急措置計画書..... 26

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 4 月 12 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     | 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 ( <i>cry34Ab1</i> , <i>cry35Ab1</i> , <i>pat</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Ittis) (B.t. Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7, OECD UI : DAS-59122-7) |
| 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

###### 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

宿主には Hi-II カルス (A188xB73) を用いた。Hi-II はトウモロコシ A188 及び B73 に由来する。

###### 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。

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  $\mu\text{m}$  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 200～800 m 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/ $\text{cm}^2$  と推計され、畑端の約 15,000 粒/ $\text{cm}^2$  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え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、葉上に堆積した花粉密度は、ほ場から 3 m 離れると最大 35 粒/ $\text{cm}^2$ （累積）になり 2m 離れると 14.2 粒/ $\text{cm}^2$  になると報告されている。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/ $\text{cm}^2$  から 0.3 粒/ $\text{cm}^2$ （約 1/270）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

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 に示した。

表 1 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                                                                                    |
|--------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| cry34Ab1 遺伝子発現カセット |           |                                                                                           |
| UBI1ZM PRO         | 1.98      | <i>Zea mays</i> 由来のユビキチン構成的プロモーター <sup>1)</sup> (イントロン及び 5'非翻訳領域を含む)                      |
| cry34Ab1           | 0.37      | <i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry34Ab1 蛋白質をコードする遺伝子                          |
| PIN II TERM        | 0.32      | <i>Solanum tuberosum</i> 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                            |
| cry35Ab1 遺伝子発現カセット |           |                                                                                           |
| TA Peroxidase PRO  | 1.30      | 根における発現が知られている <i>Triticum aestivum</i> 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) |
| cry35Ab1           | 1.15      | <i>Bacillus thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry35Ab1 蛋白質をコードする遺伝子                          |
| PIN II TERM        | 0.32      | <i>Solanum tuberosum</i> 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                            |
| Pat 遺伝子発現カセット      |           |                                                                                           |
| 35S PRO            | 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 <sup>1)</sup>                                              |
| Pat                | 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       |
| 35S TERM           | 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                                                   |

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。

## 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  
供与核酸の各構成要素の機能を表 1 に示した。
- 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、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、 $\delta$ -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、昆虫が経口摂取した場合にのみ殺虫活性を示す。また、その殺虫活性に基づいて分類されており、Cry34Ab1 蛋白質 及び Cry35Ab1 蛋白質は、コーンルートワーム (corn rootworm: *Diabrotica spp.*) に対する活性を基に、いずれも *B.t.* PS149B1 株より新たに発見された。

コーンルートワームは、米国のトウモロコシ栽培において最も防除が必要とされる害虫の一種で、幼虫はトウモロコシ根を、成虫になると絹糸を加害する。米国のトウモロコシ畑のおよそ 950 万 ha がコーンルートワームの被害を受けており、防除にかかる費用及び被害の総額は、毎年約 10 億ドルにものぼると考えられている。

コーンルートワームの防除には、これまで、ダイズとの輪作及び殺虫剤散布が有効とされていた。しかしながら、近年ダイズ畑中でも生存するコーンルートワームの分化型が発生し、トウモロコシの主要栽培地域で急速に拡大する傾向にあり、輪作は防除手段としての有効性を失いつつある。また、一部の殺虫剤に対して抵抗性を持つコーンルートワームの出現も報告されている。

本組換えトウモロコシの栽培により、コーンルートワームを効果的に防除することが可能となり、農家に対して、大豆との輪作や殺虫剤散布以外の本害虫防除の選択肢を提供するものと期待されている。

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の機能を調べるために行なった試験において、Cry34Ab1 蛋白質はリン脂質膜に対する細孔形成蛋白質として働き、Cry35Ab1 蛋白質は細孔を拡大し、膜の透過性を増大させることが示唆されている。*in vivo* 試験で、Cry34Ab1 蛋白質は、単独でもコーンルートワームに対して活性を持つが、Cry35Ab1 蛋白質と一緒に存在すると相乗効果があることが示されており、Cry34Ab1 蛋白質を単独で用いた際の効果と比較し、最大でおよそ 8 倍の効果を示すことが確認されている。なお、Cry35Ab1 蛋白質単独では、コーンルートワームに対して活性を示さない。

Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質を産生している組換えトウモロコシをコーンルートワーム幼虫に摂食させ、免疫組織化学的手法により中腸組織の形態変化を観察したところ、非組換え体を摂食した幼虫においては何ら異常は観察されなかったが、組換え体を摂食した幼虫では、中腸細胞に腫大、空胞化、細胞膜の泡状化及び溶解などの細胞死を示す現象が観察された。この結果は、他の *B.t.* 蛋白質と同様に、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の標的器官が中腸であることを示している。

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おり、実際に、Cry34Ab1 蛋白質及びCry35Ab1 蛋白質の混合物を供試して行なわれた、米国のトウモロコシ栽培における 6 種の害虫に対する殺虫効果を調べた試験において、当該蛋白質も特定の害虫に対してのみ殺虫効果を持つことが示されている。表 2 に示すように、試験を行なった 6 種の害虫の中で特に効果が高かったのは、

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種の幼虫について (LC<sub>50</sub>は、それぞれ 5.56 及び 44.5  $\mu\text{g ai/cm}^2$ )、同じコーンルートワームの仲間である southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) に対する LC<sub>50</sub> 値は 343  $\mu\text{g ai/cm}^2$  であった。チョウ目害虫である European corn borer (ヨーロッパアワノメイガ)、corn earworm、black cutworm、さらにコウチュウ目害虫の western corn rootworm の成虫については、試験を行なった最高濃度である 400  $\mu\text{g ai/cm}^2$  でも死亡した個体は認められなかった。

表 2 Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の混合物のトウモロコシ栽培における害虫に対する殺虫効果

| トウモロコシ栽培における害虫            |    | LC <sub>50</sub> (値) <sup>1)</sup>      |
|---------------------------|----|-----------------------------------------|
|                           |    | ( $\mu\text{g ai/cm}^2$ ) <sup>2)</sup> |
| northern corn rootworm 幼虫 | 3) | 5.56 (1.76 - 19.6)                      |
| western corn rootworm 幼虫  | 3) | 44.5 (18.5 - 165)                       |
| southern corn rootworm 幼虫 | 3) | 343 (190 - 796)                         |
| European corn borer 幼虫    | 4) | >400                                    |
| corn earworm 幼虫           | 4) | >400                                    |
| black cutworm 幼虫          | 4) | >400                                    |
| western corn rootworm 成虫  | 3) | >400                                    |

1) Cry34Ab1蛋白質及びCry35Ab1蛋白質の混合物(Cry34Ab1蛋白質:Cry35Ab1蛋白質=1:3)を混餌投与し、投与開始3日から6日後に死亡率を調べた。

2) 1cm<sup>2</sup>あたりの有効成分換算量

3) コウチュウ目害虫

4) チョウ目害虫

コーンルートワーム以外の非標的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なった。供試した2種のテントウムシのうち、*Hippodamia convergens* は、我が国にも生息するジュウサンホシテントウ (*Hippodamia tredecimpunctata timberlakei Capra*) の近縁種である。*Coleomegilla maculata* は北米に広く生息する益虫で、トウモロコシの花粉も食べることが知られているが、近縁種が我が国に生息していることは知られていない。

生物検定の結果、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。

コウチュウ目昆虫以外にも、哺乳類、鳥類、魚類、チョウ目昆虫、ハチ目昆虫、アミメカゲロウ目、カメムシ目等について試験を行なったが、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、試験を行なったすべての非標的生物に対し毒性を持たないことが確認された。

なお、当該蛋白質が、既知のアレルゲン蛋白質と相同性を有さないことを確認するために、公開データベースに登録されている配列情報を基にデータベースを構築し、本構築データベースに含まれる 2,228 のアレルゲン及びグルテン過敏性腸疾患に関する配列との間の構造相同性を調べた。Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質共に、既知のアレルゲン蛋白質に対して構造相同性は認められなかった。

#### 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、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（図 1）。除草剤グルホシネートは非選択性の除草剤で、1 剤で幅広い雑草に対して防除効果を示す。日本、米国を始め、世界中で安全に使用されている。*pat* 遺伝子の導入により、トウモロコシ畑でも本除草剤を雑草防除に使用することが可能となり、農家に雑草防除のための選択肢を提供することが期待されている。なお、PAT 蛋白質がヒトにアレルギー誘発性を示す可能性は、極めて低いと結論されている。

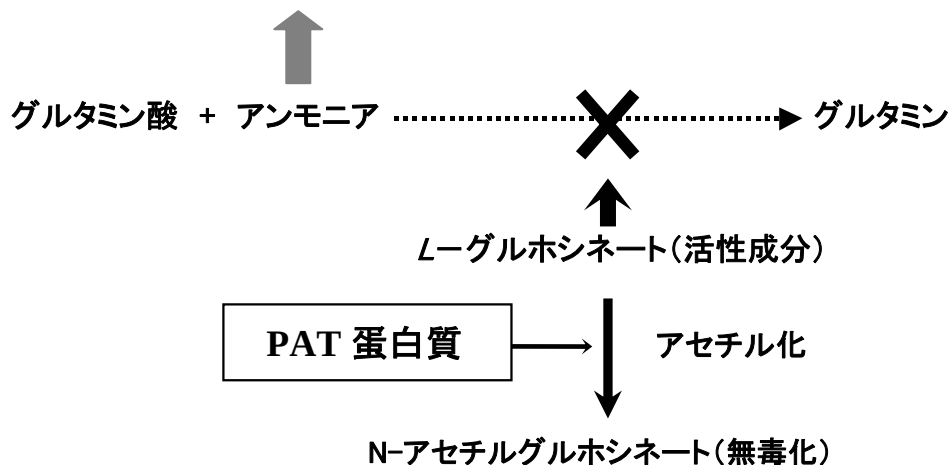


図 1 PAT 蛋白質の作用機作

除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートにより、グルタミン合成酵素が阻害されると、アンモニアが蓄積し、植物は枯死する。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いようになり、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いる。

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、Cry35Ab1 蛋白質、PAT 蛋白質ともに、宿主の代謝系には関与しない。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

各遺伝子発現カセットが導入されたプラスミド PHP17662 の基となったベクターの名称及び由来は以下の通りである。

名称：pSB1

由来： *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド PHP17662 の塩基数は 50,321 bp である。

② 特定の機能を有する塩基配列の種類

プラスミド PHP17662 の挿入遺伝子領域外には、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付与し、*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。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

プラスミド PHP17662 の基となった、pSB1 ベクターの T-DNA 領域は、表 1 に示した 3 つの遺伝子発現カセットで置き換えられている。したがって、プラスミド PHP17662 には、アグロバクテリウムの感染を可能とする配列は含まれていない。

(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

ベクター内の供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位は図 2 に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主内への導入は、アグロバクテリウム法により行なった。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

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) 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によって共同開発された。

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

詳細を図 3 に示した。

② アグロバクテリウムの菌体の残存の有無

アグロバクテリウムの除去は、 $\beta$ -ラクタム系抗生物質であるカルベニシリンの添加により行なった。詳細を図 3 に示した。

③ 育成の経過及び系統樹

Event DAS-59122-7 とデント種に分類されるトウモロコシの優良自殖系繁殖株を交配し、選抜育種を行なった。

なお、我が国においては、2004 年 4 月に食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に行なう予定である。

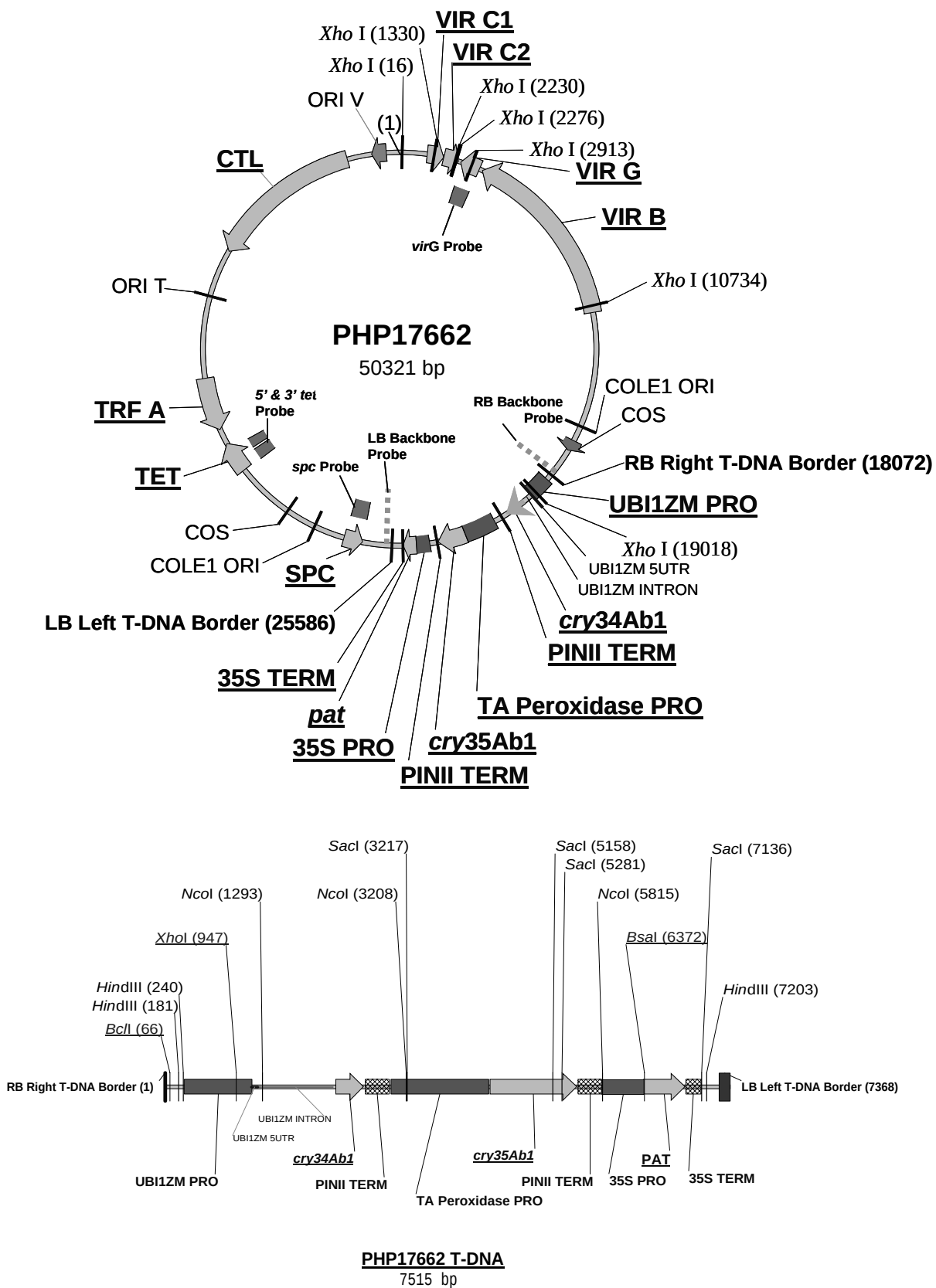


図 2 プラスミド PHP17662 及び T-DNA 領域の構成

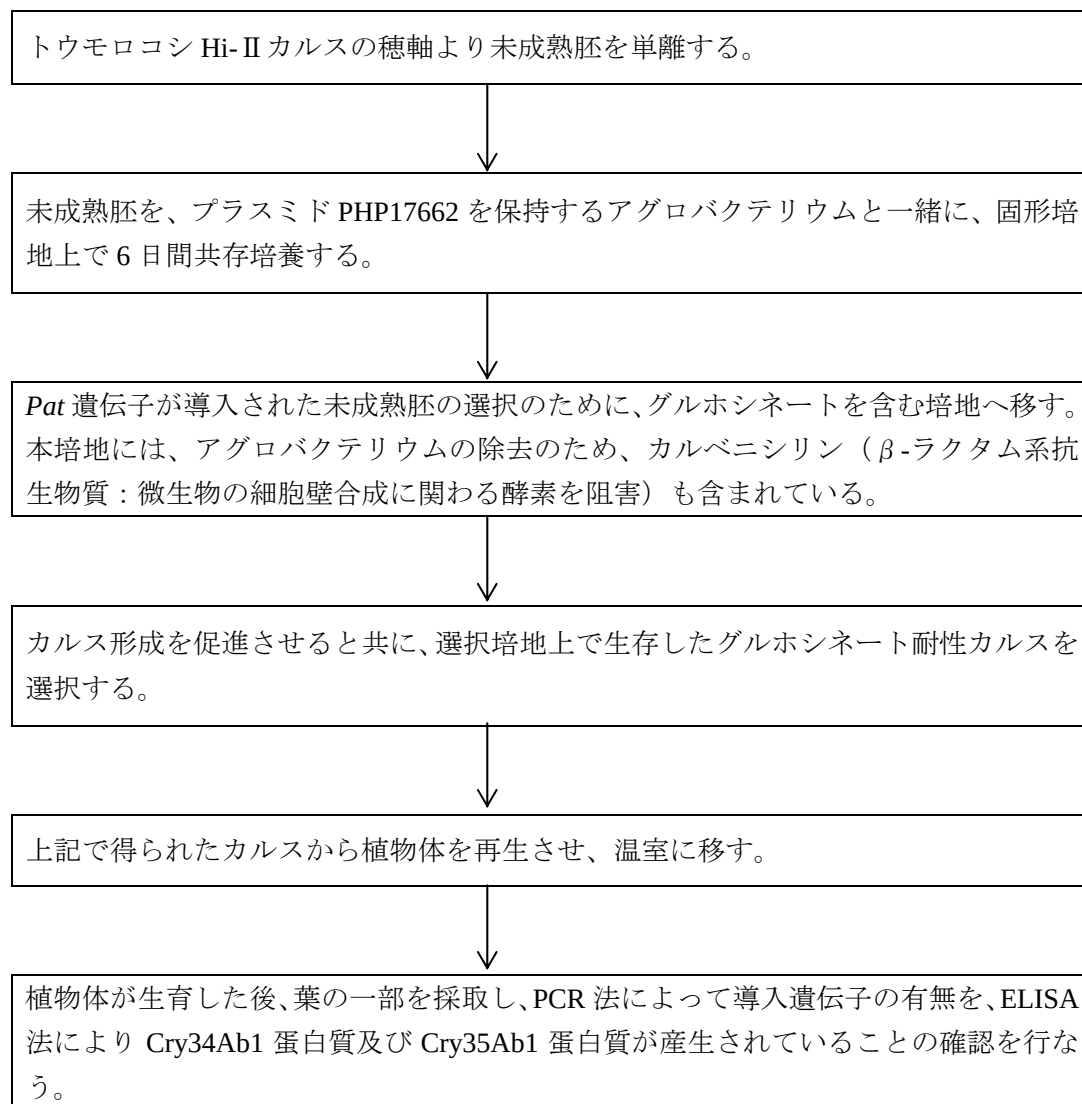


図 3 プラスミド PHP17662 の宿主への導入手順

#### (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

導入された核酸はトウモロコシゲノム上に導入されている。

##### 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 に導入された核酸のコピー数と完全性を、Event DAS-59122-7 の葉から抽出した DNA サンプルを供試し、サザンブロット分析により調べた。分析の結果、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセットともに、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た

ことが確認された。

導入されたすべての遺伝子が、後代品種に安定的に伝達されることを確認するために、複数世代の Event DAS-59122-7 の葉から抽出した DNA サンプルを供試して、サザンブロット分析を行なった。その結果、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセットともに、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ていることが示され、当該遺伝子が、安定的に伝達されることが確認された。

- 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

Event DAS-59122-7 中に導入された各遺伝子の発現により、本組換えトウモロコシ中に産生される Cry34Ab1 蛋白質、Cry35Ab1 蛋白質、PAT 蛋白質が、後代品種中でも安定して産生されることを ELISA 法により確認した。分析には、Event DAS-59122-7 の複数世代の植物体、穀粒、花粉、葉、茎、根等から抽出したサンプルを供試した。

分析を行なったすべての供試試料中に、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質が検出された。PAT 蛋白質は全般に産生量が低く、花粉及び穀粒等、一部の試料からは検出されなかったが、供試世代間で産生量に大きな差は認められなかった。以上の結果より、本組換えトウモロコシ中に産生される Cry34Ab1 蛋白質、Cry35Ab1 蛋白質、PAT 蛋白質が、後代品種中でも安定して産生されることが確認された。

Event DAS-59122-7 中に産生される各蛋白質により付与された特性を、生物検定により確認した。Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、米国のトウモロコシ栽培において最も防除が必要とされている害虫の一種であるコーンルートワームへの抵抗性を付与する。米国において、3 世代の種子を供試し、western corn rootworm を用いた生物検定を行なった結果、いずれの世代においても、本組換え体トウモロコシの根はコーンルートワームに食害されず、本害虫に対して十分な抵抗性を示すことが確認された。

一方、PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。Event DAS-59122-7 の育成過程において、組換え体を選抜する際に、除草剤グルホシネートに対する耐性の有無の確認を行なった（図 3 参照）。さらに、後代トウモロコシが除草剤グルホシネートに対して耐性を有することを、グルホシネートを散布した試験により確認した。以上のことから、複数世代において耐性を有することが示された。

- ホ 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  
移入された核酸は、伝達を可能とする配列を含まない。よって伝達性はない。

#### (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

Event DAS-59122-7 の検出及び識別の方法として、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白



質、PAT 蛋白質に対するポリクローナル抗体を用いた定量 ELISA 法が開発されている。本組換えトウモロコシ穀粒中の、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質の検出感度は、それぞれ 0.072 ng/mg 乾燥重量 (tissue dry weight) 及び 0.06 ng/mg 乾燥重量 (tissue dry weight) である。また PAT 蛋白質の検出感度は、0.025 ng/mg 乾燥重量 (tissue dry weight) である。なお、定量 PCR 法による検出及び識別の方法については現在開発中であり、Event DAS-59122-7 が商品化される前には完成の予定である。

#### (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 コーンルートワーム抵抗性

Event DAS-59122-7 には、*Bacillus thuringiensis* (以下 *B. t.*) PS149B1 株由来の *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の導入により、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質が産生されており、その結果、コーンルートワームに対する抵抗性が付与されていることを確認した (写真 1)。



写真 1 コーンルートワーム抵抗性トウモロコシ

- 左 : 農薬を散布せずに栽培した非組換えトウモロコシ。コーンルートワームの食害を受けている。
- 中央 : コーンルートワーム防除のために Terbufos (有機リン系殺虫剤) を散布した非組換えトウモロコシ。農薬無散布区で観察されるような食害は受けていないが、コーンルートワームの食害を完全に防ぐことはできない。
- 右 : 農薬を散布せずに栽培した組換えトウモロコシ。コーンルートワームの食害を受けない。

##### ② 除草剤グルホシネートに対する耐性

Event DAS-59122-7 には、*Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子の導入により、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（図 1）。実際に、隔離ほ場試験において、除草剤グルホシネートを散布した非組換えトウモロコシが完全に枯死したのに対し、Event DAS-59122-7 はグルホシネートに対して耐性を示すことが確認された。

- 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

① 形態及び生育の特性

Event DAS-59122-7 について、我が国の自然条件の下で生育した場合の特性を評価するために、2003 年に独立行政法人 農業環境技術研究所（茨城県、つくば市）において隔離ほ場試験を実施し、非組換えトウモロコシと比較して観察を行なった。

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、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、地上部生体重、雌穂長、雌穂径、花器の形状、開花始期、開花終期及び開花期間について評価した。稈長について、供試した Event DAS-59122-7 の 2 品種のうち、1 品種で非組換え体との間に統計学的有意差が認められたが（ $p=0.04$ ）、平均値の差はわずかであり（Event DAS-59122-7：192.0 cm、非組換え体：212.3 cm）、他の 1 品種においては有意差は認められず、また稈長以外は、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。

② 生育初期における低温耐性

隔離ほ場試験において、最低気温が 10℃を下回った冬期に、4 葉期、草丈 16～19cm の植物体を戸外に移し、生育状態を観察した。最低気温が、1.5℃になった時点で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。

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。実際に米国において行なった Event DAS-59122-7 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。

④ 花粉の稔性及びサイズ

隔離ほ場試験において、開花期に花粉を採取し、花粉の形状及び大きさ、稔性、生産量について調査を行なった。すべての項目において 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。

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、隔離ほ場試験において、粒列数、1 列粒数及び 100 粒重について調査を行なった結果、すべての項目において 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。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、雑種第2世代（F2）種子の発芽率及び脱粒性にも差は認められなかった。

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、本項目については調査を行なわなかった。

⑦ 有害物質の産生性

トウモロコシについては、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分泌することは知られていない。また、枯死した後にそ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 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質が新たに産生されているが、他の *B. t.* の Cry 蛋白質と同様に、当該蛋白質が植物体内で酵素として働くことは報告されていない。Event DAS-59122-7 中には、PAT 蛋白質も産生されているが、当該蛋白質が植物の生長に有害な影響を与えることは報告されておらず、また PAT 蛋白質は基質特異性が高いことが報告されている。このため、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かった。実際に、形態・生育・繁殖特性を調べた隔離ほ場試験、並びに主要及び微量構成成分の分析試験結果においても、評価を行なった全ての項目において、Event DAS-59122-7 と非組換えトウモロコシの間に意図しない有意な差は認められず、当該遺伝子の導入及び発現蛋白質が、宿主トウモロコシの代謝経路に関与して非意図的な変化を起こした可能性は示唆されなかった。

念のため、Event DAS-59122-7 中に、根から分泌されて周辺の植物に影響を与えるような他感物質が新たに産生されていないことを確認するために、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、総個体数、乾燥重について解析を行なったが、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。

Event DAS-59122-7 中に、根から分泌されて土壤微生物に影響を与えるような他感物質が新たに産生されていないことを確認するために、特定網室において、Event DAS-59122-7 と非組換えトウモロコシを出穂前期まで栽培し、収穫後の土壤を供試して細菌数及び放線菌数、糸状菌数を調べた。いずれの菌についても、DAS-59122-7 と非組換えトウモロコシの間に統計学的に有意な差は認められなかった。また、同様の試験を米国ハワイ州にて行なったが、細菌数及び放線菌数、糸状菌数のいずれについても、DAS-59122-7 と非組換えトウモロコシの間に統計学的に有意な差は認められなかった。なお、本項目に関連し、米国における野外試験において、試験ほ場から土壤を採取し、土壤中に生息する生物の調査を行なった。土壤微生物は、土壤中の植物体及び動物の残骸を分解することによって、土壤中に生息する昆虫等の無脊椎動物の栄養に寄与する。したがって、土壤微生物相に変化があった場合には、これらの土壤中に生息する生物は、その影響を直接的に受けると考えられる。調査の結果、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壤中と、非組換えトウモロコシのほ場から採取した土壤中に生

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。

Event DAS-59122-7 植物体中に、枯死した後に他の植物の生育に影響を与えるような物質が新たに産生されていないことを確認するために、特定網室において栽培した Event DAS-59122-7 と非組換えトウモロコシの残渣を鋤き込んだ土壌を用いて二十日ダイコンを栽培した。発芽率及び草丈、生体重、乾燥重の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の間で統計学的に有意な差は認められなかった。また、Event DAS-59122-7 については、これまで、米国において数多くの野外試験が行なっており、研究者が栽培の翌年には場を訪れて観察を行なっているが、Event DAS-59122-7 及び非組換えトウモロコシの栽培を行なったいかなるほ場においても、後作物に本組換えトウモロコシの栽培に起因すると考えられる明らかな影響は認められなかった。

なお、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。当該蛋白質の混合物を米国の中西部トウモロコシ栽培地帯の畑土壌（モンモリロナイトを含む微細土壌）に、両蛋白質共に初期濃度が土壌 1g あたり活性成分換算で 5mg となるように混和し、その懸濁液を餌に混ぜて southern corn rootworm に与えたところ、当該蛋白質の活性の半減期は 3.2 日であった本結果は、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。

以上の結果より、有害物質の産生性について、Event DAS-59122-7 と非組換えトウモロコシの間で有意な差のないことが確認された。

### 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

別添の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

##### ① 米国

2001 年から 2003 年にかけて、米国農務省（USDA）の試験栽培許可のもと、米国、プエルトリコ及びチリのトウモロコシ栽培地帯において、本組換えトウモロコシのほ場試験が実施された。2003 年 10 月 31 日に米国環境庁（EPA）に植物農薬登録申請を行なった。2003 年 12 月 11 日に米国食品医薬品局（FDA）と食品及び飼料とし

ての安全性に関する協議を開始した。さらに、2003 年 12 月 18 日に USDA の動植物検疫局（APHIS）に無規制裁培許可の申請を行なった。

② カナダ

2004 年に新規食品としての安全性確認の申請をカナダ保健省（Health Canada）に行う予定である。また、飼料としての安全性確認及び環境放出許可の申請をカナダ食品検査庁（Canadian Food Inspection Agency）に行なう予定である。

③ その他の諸外国

2004 年から 2005 年にかけて、大韓民国、中華民国（台湾）、欧州連合（EU）、オーストラリア/ニュージーランド、南アフリカ、ブラジル及びメキシコにおいて本組換えトウモロコシの安全性に係る申請を行なう予定である。

## 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、トウモロコシが野生化し、野生動植物の生育に支障を及ぼしたという報告はないことから、本生物多様性影響評価においては、生物多様性影響評価実施要領の別表第三に基づき、Event DAS-59122-7 と非組換え体において相違が見られた点について考慮することとする。

### 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

平成 15 年に、茨城県つくば市の独立行政法人農業環境技術研究所内で行なった隔離ほ場試験において、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、周辺植物相への影響）について調査を行なったが、Event DAS-59122-7 と非組換え体との間で、有意な差は認められなかった。なお、稈長について、供試した Event DAS-59122-7 の 2 品種のうち 1 品種で、非組換え体との間に統計学的有意差が認められたが ( $p=0.04$ )、平均値の差はわずかであり (Event DAS-59122-7 : 192.0 cm、非組換え体 : 212.3 cm)、また他の 1 品種については有意差が認められなかったことから、遺伝子導入による影響ではないと結論された。

Event DAS-59122-7 は、*Bacillus thuringiensis* PS149B1 株由来の *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し、*pat* 遺伝子の導入により除草剤グルホシネートに耐性を示す。我が国には標的害虫であるコーンルートワームが生息していることは報告されておらず、本害虫に対する抵抗性の付与が本トウモロコシに野生植物との競合性における優位性を与えることはない。また、本組換えトウモロコシは除草剤グルホシネートに耐性を持つが、自然環境下で本除草剤が使用されることはなく、除草剤グルホシネートに対する耐性の付与が本トウモロコシに野生植物との競合性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。

#### (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

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ため、Event DAS-59122-7 の競合における優位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。

## 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。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、周辺植物相の調査、土壤微生物の評価、及び鋤きこみ試験等を行なって検討した。いずれの試験においても、Event DAS-59122-7 と非組換えトウモロコシとの間に差は認められなかった。以上の結果に基づき、Event DAS-59122-7 中には、意図しない有害物質は産生されていないと結論された。

Event DAS-59122-7 中には、Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 蛋白質、並びに PAT 蛋白質が産生されている。このうち、PAT 蛋白質については、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。したがって、Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 蛋白質について、以下に検討を行なった。

Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 蛋白質は *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株に由来し、コウチュウ目害虫であるコーンルートワームに対して殺虫効果を示す。コーンルートワームは、米国のトウモロコシ栽培において最も防除が必要とされる害虫の一種で、幼虫はトウモロコシ根を、成虫になると絹糸を加害する。

標的及び非標的生物が当該蛋白質に曝露される経路としては、トウモロコシの生育期に植物体を直接食餌する可能性、トウモロコシ花粉の飛散により曝露される可能性、並びにサイレージ用に刈り取られた後に鋤き込まれたトウモロコシ根や茎の基部が腐食する過程で遊離された当該蛋白質を、腐植質と一緒に食餌する可能性が考えられる。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おらず、花粉も含めてトウモロコシ植物体を摂食するコウチュウ目昆虫は知られていない。トウモロコシ花粉の飛散より曝露される可能性及び腐植質と一緒に食餌する可能性について、絶滅危惧種を例にして考察した。

「環境省レッドデータブック 2000 年改訂版」には、絶滅危惧 I 類として 27 種、絶滅危惧 II 類として 20 種類、準絶滅危惧として 37 種、合計 84 種のコウチュウ目昆虫が記載されている。これら 84 種類のうち、オサムシ科、コガネムシ科、ゴミムシ科、カミキリムシ科、ホタル科等の 77 種類は、幼虫が肉食性ないし腐食性（枯木・朽木内を摂食）か、植食性でも茎内を穿孔摂食するため、葉上に飛散・堆積したトウモロコシ花粉を摂食する可能性、すなわち当該蛋白質に曝露される可能性はない。ヒメドロムシ科の 3 種は、水棲昆虫で幼虫は水藻を摂食するため、当該蛋白質に曝露される可能性はない。また、ハムシ科、ミツギリゾウムシ科に属する 4 種についても、生息場所が池沼・湿地帯あるいは広葉樹林内で、スゲやイグサ属植物の根部や朽木内を摂食するため、花粉に曝露される可能性はない。

また、腐植質と一緒に食餌する可能性について、上述の 84 種について検討した結果、いずれの昆虫についても、その生息場所及び食性から考えて、トウモロコシ畑内及び畑周辺に生息し、畑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を食餌する可能性はない。

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、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、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、検討を行なった。

## (2) 影響の具体的内容の評価

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。実際に、「第1 評価に当たり収集した情報、2-(1)-ロ」に記載したとおり、3 種のコーンルートワームに対する殺虫効果を調べた試験において、Cry34Ab1 蛋白質及びCry35Ab1 蛋白質は、northern corn rootworm (*Diabrotica barberi*) 及びwestern corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) に対しては特に高い殺虫効果 (LC<sub>50</sub>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、同じコーンルートワームの仲間である southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) に対するLC<sub>50</sub>は 343  $\mu\text{g ai/cm}^2$ であった。

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なったところ、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。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の評価を行なったが、試験を行な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。また、哺乳類及び鳥類、魚類に対しても評価を行なったが、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、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。

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なった結果、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。

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、効果を示すのはコーンルートワームについてのみで、それ以外は、コウチュウ目昆虫も含めて、試験を行な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なった試験の結果、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。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。

表 5 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、畑から 5m 離れると花粉の堆積密度は  $5.2 \text{ 粒}/\text{cm}^2$  と大きく減少し、10m 離れた場合の花粉密度は、畑内の 270 分の 1 の  $0.3 \text{ 粒}/\text{cm}^2$  まで減少した。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  $0.000015 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  となる。標的害虫である northern corn rootworm 及び western corn rootworm の  $\text{LC}_{50}$  値が、それぞれ  $5.56 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  及び  $44.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  であることを考えれば、本予想蛋白質濃度は、極めて低い値となる。

このように、トウモロコシ畑から 10m 離れれば、コウチュウ目昆虫が花粉に曝露される可能性自体が、畑中の 270 分の 1 にまで減少し、またその場合の予想蛋白質量は、前述の標的害虫である northern corn rootworm に対する  $\text{LC}_{50}$  値 ( $5.56 \mu\text{g ai}/\text{cm}^2$ ) を基に計算すると約 37 万分の 1 に相当する。

表 5 ほ場端からの距離と花粉蓄積数及び予想 Cry34Ab1 蛋白質量<sup>1)</sup>

| ほ場端からの距離 | 花粉密度 (粒/ $\text{cm}^2$ ) | 予想蛋白質量 <sup>2)</sup><br>( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) |
|----------|--------------------------|-------------------------------------------------------|
| 0m       | 81.7                     | 0.004101                                              |
| 1m       | 136.5                    | 0.006851                                              |
| 2m       | 33.5                     | 0.001681                                              |
| 5m       | 5.2                      | 0.000261                                              |

|     |     |          |
|-----|-----|----------|
| 10m | 0.3 | 0.000015 |
| 20m | 0.3 | 0.000015 |
| 50m | 0.1 | 0.000005 |

- 1) 計算は Cry34Ab1 蛋白質の濃度を指標として行なった。
- 2) 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、高位値 (HEEE: High End Exposure Estimate) を示した。 $(\text{花粉粒数} / \text{cm}^2) \times (\text{g} / 1,500,000 \text{ 粒}) \times (\text{花粉中発現量 } 75.29 \mu\text{g/g})$  として計算した。

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。

前述のように、種々の生物を供試して行なった試験の結果、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質に感受性を示したのは標的害虫であるコーンルートワームのみであり、当該蛋白質の殺虫効果が非常に特異性が高いことが確認されていること、さらに、トウモロコシ花粉の飛散程度等から考え、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低いと判断された。

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上の検討結果に基づき、Event DAS-59122-7 中に産生される Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 蛋白質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。

### 3 交雑性

宿主であるトウモロコシは、我が国における定着の事例がなく、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、Event DAS-59122-7 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

Event DAS-59122-7 は、*Bacillus thuringiensis* PS149B1 株由来の *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し、*pat* 遺伝子の導入により除草剤グルホシネートに耐性を示す。項目ごとに生物多様性影響の評価を行なった。

我が国の自然環境下で行なった隔離ほ場試験の結果、Event DAS-59122-7 は、宿主であるトウモロコシと生育特性・生殖特性について有意な差のないことが示された。我が国に標的害虫は生息しておらず、また、自然環境下で除草剤グルホシネートが使用されることはないため、本除草剤に対する耐性が本トウモロコシに野生植物との競合性における優位性を与えることもない。以上のことから、Event DAS-59122-7 は、宿主トウモロコシと同様、野生植物との間の競合の優位性を示すことはないと判断された。

Event DAS-59122-7 中には、コーンルートワームに殺虫効果のある *B. t.* 蛋白質 (Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 蛋白質) が産生されている。我が国にはコーンルートワームが生息していることは報告されておらず、花粉も含めてトウモロコシを直接食餌するコウチュウ目昆虫は知られていない。さらに、現在絶滅が危惧されているコウチュウ目昆虫は肉食性か、あるいは枯木・朽木内を摂食し、生息場所も水辺や湿地帯などのトウモロコシの生育に適さない場所であることが多く、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。

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おり、実際に、3 種のコーンルートワームに対する殺虫効果を調べた試験において、Cry34Ab1 蛋白質及び Cry35Ab1 蛋白質は、コーンルートワームに対しては殺虫効果を示したが、同じコウチュウ目昆虫であるテントウムシ 2 種に対しては、検定を行なった最高濃度でも死亡した個体は認められなかった。その他、チョウ目昆虫、ハチ目昆虫、アミメカゲロウ目昆虫、カメムシ目昆虫及び、哺乳類、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当該蛋白質が毒性を持たないことが確認された。

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、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ことから、念のため、コウチュウ目昆虫が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考察を行なった。トウモロコシ畑周辺の当該蛋白質の予想曝露濃度を推定したところ、トウモロコシ畑から 10m 離れれば、コウチュウ目昆虫が花粉に曝露される可能性自体が、畑中の 270 分の 1 にまで減少し、またその場合の予想蛋白質濃度は、標的害虫である northern corn rootworm に対する  $LC_{50}$  値の約 37 万分の 1 となる。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は 3.2 日で、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。このように、トウモロコシ花粉の飛散程度等から考え、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。

宿主であるトウモロコシは、我が国における定着の事例がなく、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、Event DAS-59122-7 が我が国の環境下で野生植物と交雑することはないと判断された。

以上の考察結果より、Event DAS-59122-7 を第一種使用規程に従って使用した場合に、Event DAS-59122-7 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 4 月 12 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

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.) Ittis）（*B. t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7, OECD UI:DAS-59122-7）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、第一種使用規定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、広報部を含む管理部門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、本 LMO 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、本 LMO 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、米国における本 LMO 種子の購入者及び穀物取扱業者、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、本 LMO 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、本 LMO 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、本 LMO 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 4 月 12 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

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.) *ltis*)

(*B. t.* Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7, OECD UI : DAS-59122-7) 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、第一種使用規定に従った使用が承認された場合においても、本 LMO 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、本 LMO 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

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、広報部を含む管理部門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、本 LMO 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、本 LMO 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、本 LMO 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、本 LMO 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本 LMO 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、本 LMO 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。