

除草剤プロモキシニル耐性セイヨウナタネ (<i>oxy</i> , <i>Brassica napus</i> L.) (OXY-235, OECD UI: ACS-BN011-5) の生物多様性影響評価書の概要
--

第一種使用規程申請書.....	1
第一 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.....	9
(1) 供与核酸に関する情報.....	9
(2) ベクターに関する情報.....	14
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	16
(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.....	17
(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.....	19
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	23
(1) 使用等の内容.....	23
(2) 使用等の方法.....	23
(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.....	23
(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.....	23
(5) 実験室等での使用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.....	23
(6) 国外における使用等に関する情報.....	23
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	25
1 競合における優位性.....	25
2 有害物質の産生性.....	26
3 交雑性.....	28
4 その他の性質.....	29
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	32
参考文献.....	35
別添資料の内容.....	35
緊急措置計画書の概要.....	36

第一種使用規程承認申請書

平成16年8月18日

農林水産大臣 亀井 善之 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 ローレンス ユー 印
住所 東京都港区高輪4-10-8

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	除草剤プロモキシニル耐性セイヨウナタネ (oxy, <i>Brassica napus</i> L.) (OXY-235, OECD UI: ACS-BN011-5)
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	—

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 和名、英名及び学名

和名： セイヨウナタネ

英名： Oilseed Rape

学名： *Brassica napus* L.

ロ 宿主の品種名

宿主品種は、油糧用の春播きセイヨウナタネ Westar である。Westar は、Agriculture Canada Research Station Saskatoon, Saskatchewan において油及び油粕の品質、早熟性、種子収量と倒伏抵抗性を基準とした選抜によって育種され、1982 年にカナダで品種登録された（文献 2）。

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

セイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) は、アブラナ科アブラナ属の *B. rapa* (在来ナタネ、カブ、ハクサイ、コマツナ等) とキャベツなどが属する *B. oleracea* との交雑の結果できた複二倍体種である（文献 78）。原産地は交雑親の *B. rapa* と *B. oleracea* の分布が重なる北ヨーロッパと考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる（文献 25）。セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている（文献 46）。

セイヨウナタネは、肥培管理が行われなくても道路沿い、空き地等で生育が可能であることが知られており、我が国でも北海道や本州で河原や線路沿いに群生が確認されている（文献 68）。また、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。財団法人自然環境研究センター、独立行政法人農業技術研究機構及び独立行政法人食品総合研究所（現 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構）が平成 14 年 5 月から平成 16 年 3 月にかけて行った調査では、ナタネの輸入港である茨城県鹿島港周辺で運搬の途中にこぼれ落ちたと見られるセイヨウナタネの生育が観察された（文献 43）。

(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

セイヨウナタネとその近縁作物の使用等の歴史は古く、紀元前 2000～1500 年の古代インドの記述や、紀元前 500～200 年のギリシャ、ローマ及び中国の記述に記されている（文献 14）。また、ヨーロッパでのほ場規模での栽培は 13 世紀にベルギーで始まったとされている（文献 78）。

アジア及びヨーロッパにおいては、古くからセイヨウナタネや *B. rapa* 等の種子から油が搾られ、灯火用として広く使用されていた（文献 66）。また、ヨーロッパでは蒸気機関の潤滑油として使用されるようになり、このことがヨーロッパでのセイヨウナタネ栽培の進展を促したといわれている。さらに、第二次世界大戦時に、カナダは軍艦の蒸気機関の潤滑油を補給する目的で栽培を始めた（文献 78）。

元来、セイヨウナタネ種子から採られた油は、心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが報告されているエルシン酸（文献 69）や家畜の甲状腺肥大効果のあるグルコシノレートといった有害物質を含むことが知られており、食用や飼料としては不向きであると考えられていた。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートであるカノーラ品種が育成されるに至り、現在ではサラダ油、ショートニング、マーガリン等の食用油として広く利用され、また、搾油粕は家畜飼料として利用されている（文献 25、78）。

我が国においては、古くから *B. rapa* が栽培され、江戸時代には燈油や食用油の原料として大規模に栽培されていた。一方、セイヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入されて栽培されるようになり、*B. rapa* よりも耐病性に優れ、多収で油分含量も多いことから全国に広まり、*B. rapa* の栽培は少なくなっていた（文献 71）。

しかし、その後の我が国におけるセイヨウナタネ栽培は、イネ栽培の早期化による作期の重なりや農民の他業種への就労のため急速に衰退し、現在は搾油のために商業的に栽培されることはほとんどない（文献 25）。なお、近年、菜の花の景観植物としての利用や、化石燃料の代替としてナタネ油を利用しようとする動きが見られる。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

セイヨウナタネは、*B. rapa* に比べて耐寒性は劣るが耐病性及び収量性に優れており、西部・中部ヨーロッパ、日本、韓国のように寒さが極端には厳しくな

い肥沃な土地で栽培されている（文献 78）。我が国では、以前は水田裏作のために移植栽培が主流であったが、今日では労働生産性の高い直播栽培が一般的である（文献 25）。

2005 年のナタネ種子及びからし種子の世界総生産量は約 4948 万 t であり、主な生産国は、EU（19 カ国合計：1550 万 t）、中国（1307 万 t）、カナダ（986 万 t）、インド（680 万 t）であった（文献 16）。主な輸出国はカナダ（360 万 t）とオーストラリア（125 万 t）で、全輸出量の約 82%を占める。我が国には、油脂原料として 2005 年に約 230 万 t が輸入され、主な輸入先はカナダ（187 万 t）、次いでオーストラリア（43 万 t）である（文献 1）。2005 年に我が国はナタネ油を 6.3 万 t、油脂原料としてナタネ種子を 229.5 万 t、さらに、飼料用の油粕を 3.6 万 t 輸入している（文献 44）。

なお、現在世界で栽培されるカノーラ全体のうち 18%が遺伝子組換え技術により除草剤耐性が付与されたセイヨウナタネである（文献 26）。

（3）生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

セイヨウナタネは種子繁殖する一年生植物である。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは休眠の打破、抽苔の開始、花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種とに分けられる（文献 25）。春播き品種の生育適温は 12～30℃である（文献 46）。また、セイヨウナタネは他の作物に比べ酸性土に強く、耐湿性も強いが、重粘土や砂質で乾燥のはなはだしい土壌は適さない。発芽時には過湿を嫌うが、生育時には多くの水分が必要である。我が国では、品種を選ぶことによりどこでも栽培可能である（文献 66）。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

セイヨウナタネは 1 つの莢の中に多数の種子ができ、種子が成熟して乾燥した莢は莢柄の部分より裂開して種子を放出する（文献 66）。乾燥した莢は、わず

かな物理的刺激により裂開し種子を飛散させやすい（文献 25）。したがって、脱粒性は比較的高いと考えられる。

種子の休眠性は、秋播き品種、春播き品種に関わらず、比較的浅いことが知られているが、暗所での水分ストレスや酸素欠乏（文献 53）など発芽に不適な環境下では二次休眠（secondary dormancy）が誘発されることがある。二次休眠とは、発芽しうる状態になった後で発芽に不適な環境にしばらくおかれた場合、新たに誘導される休眠である（文献 40）が、その程度は品種や種子の貯蔵期間・条件などで異なる（文献 52、54）。また、二次休眠性の高い品種を用いた実験では、5°Cや 10°Cの低温に比べ、20°C程度の比較的高い温度条件で休眠が誘発されやすいことが確認されている（文献 20）。これらの獲得された休眠性は、2~4°Cの低温条件（文献 20）、変温条件（文献 54）などによって覚醒されるが、地中深く鋤込まれた種子は休眠状態のまま長期間生存し続けることが知られている。一方、地表の種子では二次休眠は誘発されないことから、収穫後の耕耘を遅らせる等の耕種方法によって、二次休眠によるセイヨウナタネの雑草化を防止することができる（文献 54）。

セイヨウナタネの種子の寿命は比較的長いが、採種条件や保存条件によって異なることが知られている。後熟後に乾燥状態で貯蔵した場合には 6 年を経過しても 80%以上の発芽率を示すが、未熟種子では発芽力の低下が早く、室内に放置すると 3 年目には発芽力がなくなる（文献 49、67）。また、貯蔵中の種子の寿命には特に相対湿度が影響し、相対湿度 70~80%のときは 100~120 日で発芽力を失うが、20%程度の乾燥状態では 30°Cの高温でも約 4 年を経過しても 80%以上の発芽率を保っている（文献 67）。

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

セイヨウナタネは種子繁殖を行い、自然条件下において他の器官からの繁殖は観察されない。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

セイヨウナタネは自家不和合性を持たず、自家受粉によって種子を作ることが多い。風媒や虫媒による他殖率は 5~30%と報告されている（文献 24、46、55）。我が国での試験結果でも、栽植状況や距離で異なるが、平均して 27%程度 of 他殖率が認められている（文献 73）。

我が国に分布する近縁種のうち、セイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea* (カラシナ、タカナ、ザーツァイ等)、*B. nigra* (クロカラシ) 及び *Raphanus raphanistrum* (セイヨウノダイコン) が挙げられる。*B. rapa* は栽培由来の外来種で、我が国では古くから栽培種として利用されており (文献 32)、雑草性の亜種あるいは変種の形成は報告されていない (文献 72)。現在では、耕作地の周囲などに比較的小さな群落が見られるほか、景観作物としても利用され、河川敷の公園などには大きな群落の形成が見られる (文献 37)。*B. juncea* も外来種であり、我が国では古くから栽培種として利用されてきた (文献 32)。しかし、戦後広まったものはそれとは別に、ヨーロッパや北アメリカから入ったものと推測されている (文献 42)。*B. nigra* は明治時代以降に我が国に帰化した外来種 (文献 41) で、北海道から九州に分布し、ハーブとして栽培されているが、ときに野生化している (文献 42、68)。*R. raphanistrum* も近年になって我が国に帰化した外来種で、昭和初期には横浜市で確認され (文献 22)、現在では北海道から九州まで全国に分布している (文献 42)。

セイヨウナタネと *B. rapa* については、種間雑種が形成されるという報告がある (文献 5、67)。英国で行われたモニタリング調査において、商業用セイヨウナタネ栽培ほ場付近に自生する *B. rapa* から採種した結果、芽生えた苗のうち、雑種は 0.4~1.5% (文献 64) 又は 0.2% (文献 80) であった。また、除草剤耐性セイヨウナタネの商業栽培ほ場付近で採取した *B. rapa* の集団から 13.6% の雑種が、また、*B. rapa* とセイヨウナタネを混在して栽培した場合、6.5~7.1% の雑種が報告されている (文献 79)。我が国で両者の交互畦栽培を行い同時開花部分に結実した種子を調査したところ、*B. rapa* では 2%、他方、セイヨウナタネでは 10% の雑種を生じたと報告されている (文献 50)。

セイヨウナタネと *B. juncea* は交雑親和性があり、栽培条件下で種間雑種を生ずることが報告されている (文献 5、6、17、29)。栽培条件下での交雑率に関して、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1:1 の割合で栽培した場合は 0.3~1.1% (文献 6)、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を植えた場合には 3% (文献 28) の雑種形成が報告されている。

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった (文献 6)。さらに、人工交配によってもほとんど雑種は得られないか (文献 5)、又は全く得られなかったことが報告されている (文献 8、30)。

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、*R. raphanistrum* とセイヨウナタネを 1:600 の割合で栽培した場合、0.05% (95%信頼限界: 0.006~0.2%) の雑種形成が報告がされている (文献 11)。しかし、実際のは場における自然交雑は極めて稀 (文献 60、79) であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのは場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群から、セイヨウナタネとの雑種は確認されなかった (文献 74)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

セイヨウナタネは1花あたり約6~7万粒の花粉を生産する。花粉は黄色で、三つに縦にくびれた楕円形をしている。大きさはおよそ長径39~36 μm 、短径22~20 μm である (文献19、67)。また、セイヨウナタネの花粉は重く粘性がある (文献46)。

セイヨウナタネの花粉は風又は主にミツバチなどの昆虫により媒介される (文献46、51、75、76、81)。風媒による花粉の移動距離については、花粉トラップを用いた調査において、花粉源となる作物から3m以内で花粉量はおよそ半減し (文献34)、10m以上では90%減少する (文献39) と報告されている。また、ミツバチは通常巣の周辺の植物間を移動するが (文献59)、巣から2km離れた地点までミツバチの集団を確認している (文献56) ことや、除草剤耐性セイヨウナタネを用いて行った調査において、1~2km地点で0.2%、2.5~3km地点で0.15%の交雑率が報告されている (文献61) ことから、セイヨウナタネの商業栽培が大規模に行われているような地域においては、虫媒による花粉の拡散は広範囲に及ぶ可能性が示唆される。

セイヨウナタネの花粉は長期間発芽力を有することが知られている。花粉の寿命は相対湿度など貯蔵条件によって変わるが、室内に1週間放置したものでも寒天培地上で70%程度の発芽率を示し、その後急激に減少することが観察されており (文献49、67)、自然条件下では4~5日間で徐々に減少するとされる (文献57)。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

セイヨウナタネの種子中にはエルシン酸とグルコシノレートが比較的高い濃度で含まれている。エルシン酸は13位にシス二重結合を持つ不飽和脂肪酸で実験動物において心筋の脂肪症や繊維症を引き起こすことが知られている（文献69）。また、グルコシノレートは甲状腺肥大を引き起こすことが知られている（文献78）。しかし、カナダにおける品種改良により低エルシン酸で低グルコシノレートである品種が育成された結果、食用油として、また、搾油粕は飼料用として用いられるようになった（文献25、78）。なお、精油中のエルシン酸含量が2%未満でグルコシノレート含量が油粕1g当たり30 μ mol未満の品種は一般にカノーラ品種と呼ばれており（文献47）、Westarもカノーラ品種の一つである。

ト その他の情報

—

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

除草剤プロモキシニル耐性セイヨウナタネ (*oxy*, *Brassica napus* L.) (OXY-235, OECD UI: ACS-BN011-5) (以下、「OXY-235」とする。)の作出に用いられた供与核酸の構成要素の由来及び機能を表1に示した。また、*oxy* 遺伝子の塩基配列を別添資料1に示した。

表1 構成要素の名称、サイズ、由来及び機能

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>oxy</i> 遺伝子発現カセット		
P35S	1.13	カリフラワーモザイクウイルス由来の35S RNAプロモーターで転写を開始させる (文献45)。
5'ssuZm	0.04	トウモロコシ由来のリブローズビスリン酸カルボキシラーゼオキシゲナーゼ (RuBisCO) の小サブユニット遺伝子の非翻訳領域で転写量を増加させる (文献35)。
<i>oxy</i>	1.00	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> 由来のニトリラーゼをコードする遺伝子 (文献70) で、オキシニル系除草剤に対する耐性を付与する。
3'nos	0.68	Tiプラスミド (pTiT37) 由来のノパリンシンセターゼ遺伝子の3'非翻訳領域で、転写終結及び3'ポリアダニル化を生じさせる (文献12)。
その他		
RB	0.02	アグロバクテリウムのTiプラスミド pTiA6 (文献3) 由来の右境界配列でT-DNA領域を植物に形質転換する。
LB	0.02	アグロバクテリウムのTiプラスミド pTiA6 (文献3) 由来の左境界配列でT-DNA領域を植物に形質転換する。

(注：本表に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

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

OXY-235 に移入された供与核酸それぞれの機能は表 1 (p. 9) 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

オキシニル系除草剤にはブロモキシニル及びアイオキシニルが含まれ、ヒドロキシベンズニトリル類に分類される。これらの除草剤の主な作用は、光合成の過程で光化学系Ⅱの QB プラストキノン結合サブユニット (42kDa) と非共有結合することによって、明反応時の電子の流れを遮断することである (文献 48、77)。また、高濃度では、光リン酸化と酸化的リン酸化の脱共役剤としても作用する (文献 31、62)。

oxy 遺伝子産物であるニトリラーゼ蛋白質は、オキシニル系除草剤を植物毒性のない化合物に加水分解する酵素である。本蛋白質を有する OXY-235 にブロモキシニル又はアイオキシニルを散布すると、これらの除草剤はそれぞれ除草活性のない 3,5-ジブロモ-4-ヒドロキシ安息香酸又は 3,5-ジヨード-4-ヒドロキシ安息香酸、並びにアンモニアを生成する (図 1, p. 11)。

なお、OXY-235 にオキシニル系除草剤を散布すると、本機序によって植物体中でアンモニアが生成される。しかし、OXY-235 におけるオキシニル系除草剤の薬害について、濃度の異なる除草剤 (ブロモキシニル : 450 及び 1200g/ha、アイオキシニル : 375g/ha) を散布して調査した結果、高濃度の除草剤を散布された場合でも薬害は認められなかった (別添資料 7, p. 10, Figure B-1)。また、除草剤ブロモキシニル処理 (450g/ha) を施して栽培した OXY-235 と対照の非組換えセイヨウナタネの種子におけるアミノ酸組成を比較した結果、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 7, p. 18)。以上から、本機序により生成されるアンモニアが植物体に悪影響を及ぼすことはないと考えられる。

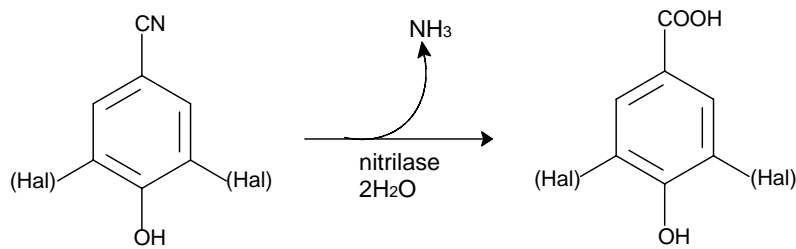


図1 ニトリラーゼ蛋白質によるオキシニル系除草剤の分解

(Hal) は、ハロゲンを示し臭素 (Br) の場合はプロモキシニル、
ヨウ素 (I) の場合はアイオキシニルを示す。

(注：本図に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

oxy 遺伝子産物であるニトリラーゼの酵素的諸性質を以下に示した(文献 37、70)。

- 活性の最適 pH は pH9.2 である。pH7.0 での活性は最適 pH の約 15% であるが、pH9.2 までその活性は急激に増加し、pH10.6 までは徐々に減少する。
- 活性の最適温度は 35°C であり、10°C 及び 55°C での活性はそれぞれ最適温度の約 15% であった。
- 数種類のニトリル系化合物を用いて試験したところ、*oxy* 遺伝子産物のニトリラーゼ蛋白質は 3,5-ジプロモ-4-ヒドロキシベンズニトリル (プロモキシニル) に高い基質特異性を示した。一方、放線菌の *Nocardia* 属由来のニトリラーゼは、ベンズニトリルに対して高い基質特異性を示し、プロモキシニルに対してほとんど作用しなかった(表 2、p.12)。
- 各種基質を用いてニトリラーゼ蛋白質の加水分解の反応速度と K_m 値を測定した結果を表 3 (p.12) に示した。ヒドロキシベンズニトリルでは酵素活性が検出されなかったが、ハロゲン化したヒドロキシベンズニトリルに対して活性を示し、特に 3,5 位にハロゲン化したヒドロキシベンズニトリルに対して高い活性を示したことから、活性にはハロゲン化したヒドロキシニルを要求するものと考えられる。3,5 位にヒドロキシベンズニトリルに置換されたハロゲンの種類によって異なる K_m 値が認められ、ハロゲンの種類が臭素であるプロモキシニルに対しては最も低い K_m 値を示し親和性が高く、次にヨウ素であるアイオキシニル、次に塩素であるクロロキシニルの順であった。反応速度に関しては、クロロキシニルが最も速く、プロモキシニル、アイオキシニルの順であった。

以上のことから、oxy 遺伝子産物であるニトリラーゼ蛋白質はハロゲン化した4-ヒドロベンズニトリルに対して基質特異性を有し、ブロモキシニルに対して最も高い親和性を有すると考えられる。

表2 ニトリラーゼ蛋白質の基質特異性

基質	NH ₃ 生成量* (μmol)	
	oxy 遺伝子産物 ニトリラーゼ	<i>Nocardia</i> 属 由来のニト リラーゼ
3,5-ジブロモ-4-ヒドロキシベンズニトリル (ブロモキシニル)	1.490	<0.005
3-ブロモ-4-ヒドロキシベンズニトリル	0.250	0.045
4-ヒドロキシベンズニトリル	0.021	0.166
ベンズニトリル	<0.005	1.460
3,5-ジブロモ-4-ヒドロキシベンズアミド	<0.005	<0.005

*: 各検定には、3mM の各基質と約 400μg のニトリラーゼを用いて 1ml のリン酸緩衝液中 (pH7.5) で 30℃、1 時間酵素反応した後、生成されたアンモニア量 (μmol) を測定した。

(注: 本表に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

表3 各種基質を用いた反応速度の解析

基質	<i>K_m</i> (mM)	<i>V_{max}</i> *
3,5-ジブロモ-4-ヒドロキシベンズニトリル (ブロモキシニル)	0.31	15.0
3,5-ジヨード-4-ヒドロキシベンズニトリル (アイオキシニル)	0.55	12.0
3,5-ジクロロ-4-ヒドロキシベンズニトリル (クロロキシニル)	0.83	18.0
5-ブロモ-4-ヒドロキシベンズニトリル	0.91	1.5
4-ヒドロキシベンズニトリル	ND	0.23

*: NH₃ 生成量 μmol/min/mg で表示、ND: 測定できなかった。

(注: 本表に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

また、oxy 遺伝子産物のアミノ酸配列に基づき、Genbank データベースに登録されている既知のアレルゲン蛋白質の配列と比較した結果、最も高い相同性を示したアレルゲン蛋白質は PPPHLP5A {チモシーグラス (*Phleum pratense*) の花粉中の蛋白質 ph1pVa であり、主要な花粉アレルギー誘発性物質である。} と PPPHLPVB {チモシーグラス (*Phleum pratense*) 花粉中の蛋白質 ph1pVb で PPPHLP5A

に高い相同性がある。} で、それぞれ 15%と 14%の相同性であった。

しかし、植物の極めて一般的な酵素でありアレルゲン蛋白質に分類されていないイネのリブローズ-ビス-ホスフェートカルボキシラーゼ オキシゲナーゼ小サブユニット (RuBisCO SSU) を用いて既知のアレルゲン蛋白質の配列と比較しても、DEPMAG29 {皮膚病菌 (*Dermatophagoides farinae*) の Mag29 蛋白質} が 14%を示し、また CHCLAH5 {(*Cladosporium herberum*) の菌糸中のアレルゲン} が 16%の相同性を示した。このように、アレルゲン蛋白質に分類されていない蛋白質でも既知のアレルゲン蛋白質と 14~15%程度の相同性は示すものと考えられることから、*oxy* 遺伝子産物と PPPHLP5A 又は PPPHLPVB との 14~15%程度の相同性では、アレルゲンとしての活性があるとは考え難い。また、マウスを用いた亜急性経口毒性試験において、ニトリラーゼ蛋白質の毒性は認められなかった (別添資料 9)。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

oxy 遺伝子産物であるニトリラーゼ蛋白質はハロゲン化したヒドロキシベンゾニトリルに高い基質特異性を有しており、基質であるハロゲン化したヒドロキシベンゾニトリル以外の化合物のシアノ基を加水分解することは考えられない。したがって、ニトリラーゼ蛋白質が植物体の代謝経路に影響すること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

形質転換に用いたベクターは、pBR322 由来の複製起点 (ORI ColE1) を含むプラスミド pRPA-BL-235 である (図 2)。

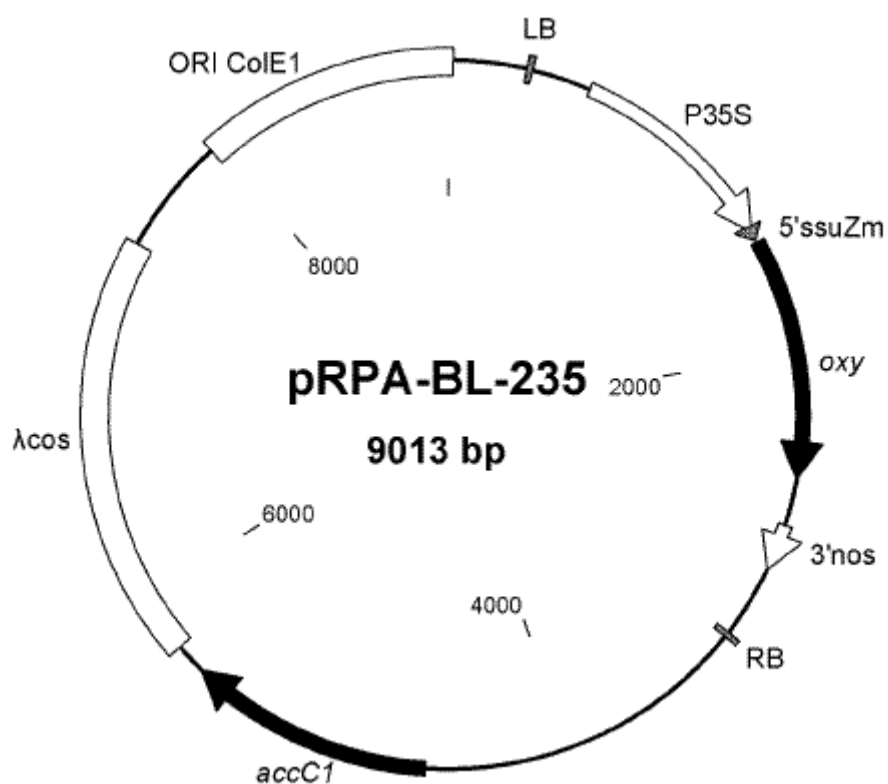


図 2 pRPA-BL-235 プラスミド地図

(注：本図に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド pRPA-BL-235 の塩基数は 9,013bp である。また、塩基配列は別添資料 2 に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

プラスミド pRPA-BL-235 は、T-DNA の外側にプラスミド pPH1J1 由来のゲンタマイシン耐性遺伝子 (*accCI*) (文献 82) を持つ。本遺伝子は大腸菌及びアグロバクテリウムでの選抜マーカーとして用いられた。また、 λ ファージ由来で λ ファージ粒子へのパッケージング能を付与する COS サイト (λ cos) (文献 23) 及び pBR322 由来の複製起点 (ORI Co1E1) (文献 7) を含む。これらの配列はいずれも T-DNA 領域の外側に位置しており、OXY-235 には導入されていない。なお、OXY-235 から抽出したゲノム DNA について、ORI Co1E1 を含む領域をプローブとしたサザンブロット分析を行った結果、当該領域は導入されていないことが確認されている (図 3)。

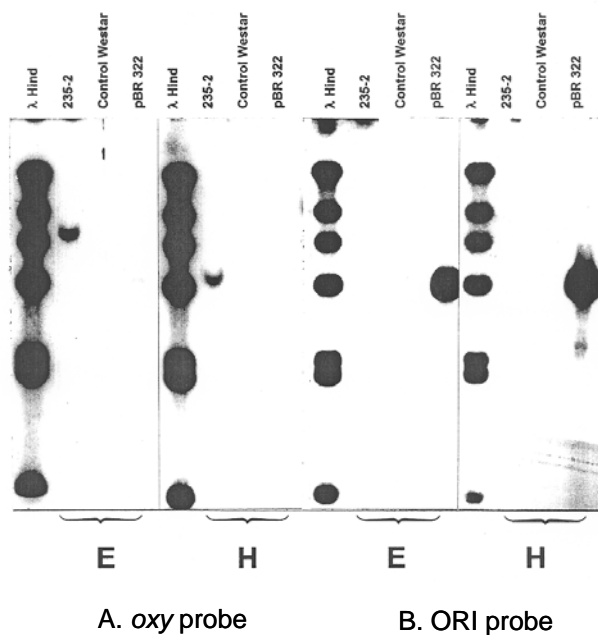


図 3 OXY-235 における T-DNA 領域外配列の確認

235-2=OXY-235, E=EcoR I, H=HindIII

A: 850bp の oxy プローブ

(235-2 において検出されたバンドサイズ E: 7.2kbp, H: 5.1kbp)

B: 820bp の pBR322 の ORI Co1E1 プローブ

(pBR322 において検出されたバンドサイズ E: 4.3kbp, H: 4.4kbp)

(注: 本図に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

プラスミド pRPA-BL-235 の宿主域は *Escherichia coli* 及び *Agrobacterium tumefaciens* に限られており、植物体では伝達性を持たない。

(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

OXY-235 に移入された T-DNA 領域はプラスミド pRPA-BL-235 の LB と RB に挟まれた領域である (図 2, p. 14)。本領域における制限酵素切断部位を別添資料 3 (p. 14, Figure 2) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の移入は、アグロバクテリウム法を用いて行なわれた。プラスミド pRPA-BL-235 を持つ大腸菌から、そのプラスミドを pTVK291 コスミド (文献 33) を持つ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 の非腫瘍形成株に導入した (文献 13)。宿主品種 Westar (以下、「Westar」とする。) への形質転換は、pRPA-BL-235 を含む *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 株と茎片を混合培養することにより行われた (文献 36)。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

Westar の茎片を、pRPA-BL-235 を含む *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 株と 72 時間混合培養した後、再生培地上で培養した。再生培地には細菌増殖を妨害するための抗生物質 (Augmentin) と、形質転換細胞を選抜するためのブロモキシニルを添加した (文献 18)。

② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウム菌体の残存の有無

抗生物質 (Augmentin) を含む再生培地で培養しており、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。

③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過及び系統樹

再生培地から発生した幼苗を生育培地に移し、ブロモキシニルを含む培地上で培養し、ブロモキシニルに対して耐性を示した幼苗をホルモンフリーの生育培地に移植した。次いで植物を温室のポットに移植し、除草剤ブロモキシニルを散布して耐性個体を選抜した。なお、商業系統は T3 以降の世代を選抜育種して作出した。OXY-235 の系統樹を図 4 に示した。

また、我が国における許可状況は以下のとおりである。

- 1997年4月に農林水産省より農林水産分野等における組換え体利用のための指針に基づき、隔離ほ場試験の承認を得た。また、1998年7月に農林水産省より我が国への輸入（加工用及び飼料用としての利用）について、同指針への適合性が確認された。
- 1999年11月に厚生省（現 厚生労働省）より組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、2001年3月に組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続きを経て、食品利用としての安全性が確認された。
- 1999年12月に農林水産省より組換え体利用飼料の安全性評価指針への適合性が確認された。また、法制化に伴い、2003年3月に組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する手続きを経て、飼料利用としての安全性が確認された。

社外秘情報につき非開示

図 4 OXY-235 の系統樹

(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

OXY-235 の遺伝子導入当代 (T0) は挿入遺伝子座に関してヘテロ接合体であることが想定されるため、その自殖によって得られる T1 世代では、除草剤ブロモキシニルに対する耐性：感受性の理論上の分離比は 3 : 1 となることが想定される。1991 年にフランスのほ場において、組換え当代 (T0) の自殖によって得ら

れた T1 世代の種子を栽培し、除草剤ブロモキシニルを散布した結果、理論上の分離比に適合する分離を示した（別添資料 4、p.1 表）。このことから、除草剤ブロモキシニル耐性は染色体上の一ヶ所に挿入されていると考えられる。

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

OXY-235 の自殖後代から抽出したゲノム DNA について、5'ssuZm、oxy 遺伝子、3'nos 及び全 T-DNA 領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、1 コピーの T-DNA 領域が挿入されていることが確認された（別添資料 3、p.15 Figure 3～p.18 Figure 6）。

また、OXY-235 の T3 及び BC3F1 のゲノム DNA について、制限酵素 EcoR I、Hind III 及びその両方で切断し、サザンブロット分析を行った。その結果、同一のバンドパターンが認められ、移入された核酸が安定して伝達していることが確認された（図 5）。

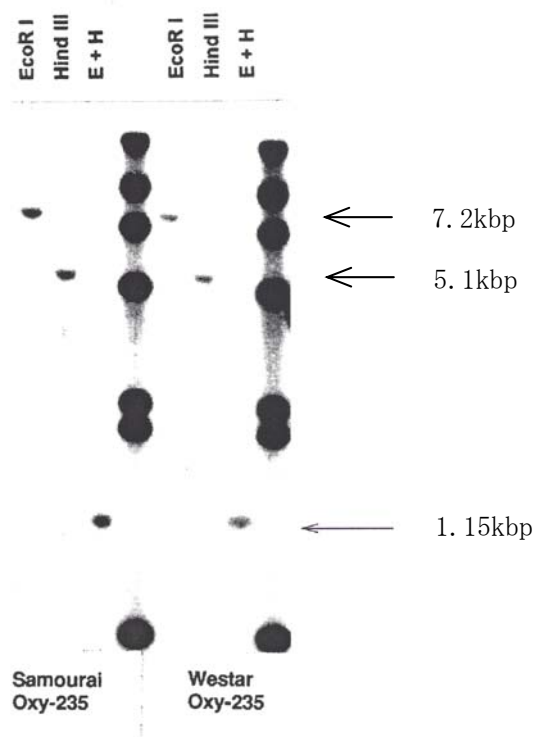


図 5 移入された核酸の伝達の安定性を示すサザンブロット分析

左：BC3F1 世代、右：T3 世代

(注：本図に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

ハ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

—

ニ (6)のイにおいて具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

平成9年度に農林水産省 北海道農業試験場での隔離ほ場試験において、隔離温室内でバットに OXY-235 及び Westar の種子を播種し、100 株以上を栽培し、除草剤プロモキシニルを散布した結果、OXY-235 は全て生存し、Westar は全て枯死した(別添資料 5, p. 3)。さらに、平成 19 年の特定網室試験において、OXY-235 の自殖後代の種子及び非組換えセイヨウナタネ品種 Drakkar (以下、「Drakkar」とする。)を播種し、オキシニル系除草剤の一つである除草剤アイオキシニルを散布した結果、Drakkar は全て枯死したのに対し、OXY-235 は全個体が耐性を示した(別添資料 6, p. 15, 表 18)。以上のことから、OXY-235 において、オキシニル系除草剤に対する耐性は世代間で安定して発現していることが確認された。

また、OXY-235 の葉、種子及び根から抽出された RNA を用いて、*oxy* 遺伝子をプローブとしてノーザンブロット分析を行った。その結果、いずれの組織においても 1.3kb のバンドが検出され、これらの組織において、*oxy* 遺伝子が発現していることが確認された(別添資料 7, p. 19, Figure II-3)。

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のある場合は、当該伝達性の有無及び程度

OXY-235 は伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然条件下において移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

OXY-235 に挿入された DNA の周辺配列を利用したプライマーを用いた PCR 法により、本組換え体の特異的に識別することができる。20~50ng の DNA を用いると高感度で識別できる。なお、本 PCR 法は OXY-235 の栽培管理に有効に利用されている(別添資料 8)。

(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

性の具体的な内容

OXY-235は移入された *oxy* 遺伝子の発現によりニトリラーゼ蛋白質が産生され、オキシニル系除草剤であるブロモキシニル及びアイオキシニルに耐性を示す。

ロ 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

平成 9 年度に農林水産省 北海道農業試験場において隔離ほ場試験を行い、OXY-235 と Westar を比較・検討した（別添資料 5）。また、参考品種として樺太（セイヨウナタネ）と黄カラシナ (*B. juncea*) を同時に栽培した。さらに、平成 19 年に我が国の特定網室において、生育初期における高温耐性、花粉の稔性及びサイズ、休眠性及び発芽率、有害物質の産生性について、OXY-235 と Drakkar を比較した（別添資料 6）。なお、Drakkar は宿主品種である Westar と同じく春播きセイヨウナタネ品種である。

① 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性に関わる項目として、草丈、一次分枝数、茎葉重（乾燥）、草型、葉色、抽だい期、開花期、成熟日、着莢率、莢長、結実粒数、裂莢性、粒色、子実収量及び千粒重について比較した。その結果、草丈、莢長、結実粒数、子実収量及び千粒重において、OXY-235 と Westar の間に有意差は認められなかった。また、茎葉重及び着莢率については、統計処理は行っていないが、OXY-235 の平均値はいずれもセイヨウナタネの Westar 及び樺太の平均値の範囲内であったことから、品種間差の範囲内であると考えられる。さらに、その他の項目について相違は認められなかった（別添資料 5, p. 4）。

② 生育初期における低温又は高温耐性

隔離ほ場試験において、OXY-235 及び Westar の生育初期にあたる 5 月から 6 月上旬の平均気温は 12℃前後、最低気温は 5～8℃程度と低温に曝されたが（別添資料 5, p. 10, 気象経過）、OXY-235 は Westar と同様に生育し、相違は認められなかった。

また、幼植物体の高温耐性に関して、特定網室試験において、35℃・12 時間明暗条件下での黄化程度について経時的な達観評価を行った。その結果、高温条件下で栽培を開始してから 5 週間までは両系統とも急速に黄化が進み、ほとんど黄化した状態になった。その後は両系統ともに緩やかに黄化が進み、5 週間から 11 週間にかけて系統間に統計学的有意差が認められたものの、いずれも回復傾向は示さず、12 週間には全個体の枯死が確認された（別添資料 6, p. 13, 表

17)。

なお、生育初期における低温耐性については、一般に我が国の秋期に播種されたセイヨウナタネは、生育速度は異なるものの、暖地及び寒地いずれの冬期においても生育することが知られている（文献 67）。

③ 成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場試験における越夏性の観察結果から、春播きした OXY-235 と Westar の間に相違は認められなかった（別添資料 5、p. 3）。

なお、セイヨウナタネは一般に高い耐寒性、耐雪性を示すことが知られている（文献 67）。

④ 花粉の稔性及びサイズ

特定網室内において採種した OXY-235 及び Drakkar の花粉を酢酸カーミン溶液で染色した結果、それぞれ 97.3%及び 96.9%の花粉が染色されており、高い稔性が認められた（別添資料 6、p. 4）。また、花粉のサイズについて、系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 6、p. 5、表 2）。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関わる形質である着莢率、結実粒数、子実収量及び千粒重について、OXY-235 と Westar を比較した結果、結実粒数、子実収量及び千粒重において有意差は認められなかった。また、着莢率については、OXY-235 は 60.6%、Westar は 59.0%であり、同等であると考えられる（別添資料 5、p. 4、表 2）。

裂莢性について OXY-235 と Westar を 5 段階評価（難 1－5 易）で比較した結果、いずれも 4 のやや易であり、同等であった（別添資料 5、p. 4、表 2）。

特定網室において収穫された OXY-235 及び Drakkar の種子を各 40 粒播種し、播種後 2 日目から 8 日目までの発芽率を経時的に調査した。その結果、いずれの調査日においても系統間に統計学的有意差は認められず、両系統ともに播種 4 日目には 95%以上の高い発芽率を示した。また、播種 8 日目には両系統ともに各 1 粒の種子について発芽が認められなかったが、これらはいずれも死滅しており、不発芽は休眠によるものではないことが確認された。よって、OXY-235 の種子の休眠性は、非組換え体と同様に極めて浅いと考えられる（別添資料 6、p. 17、表 19）。

⑥ 交雑率

隔離ほ場試験において OXY-235 から畦間 80cm で隣接して栽培されたセイヨウナタネの Westar 及び樺太への交雑について調査した。なお、開花期間中には約 3000 匹のミツバチが放飼された。Westar 及び樺太の各 2 個体から収穫した種子由来の幼苗に除草剤プロモキシニルを散布した結果、Westar において 10.6 及び 13.8% の個体が耐性を示し、樺太において耐性を示す幼苗は認められなかった（別添資料 5, p. 11）。

セイヨウナタネの他殖率は一般的に 5~30%（文献 24、46、55）であることが知られているが、OXY-235 から隣接のセイヨウナタネへの交雑率はこれを上回るものではないことが確認された。

⑦ 有害物質の産生性

特定網室において、根から分泌され他の植物に影響を及ぼすものについては後作試験、植物体内に有し、枯死した後に他の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験、根から分泌され土壤微生物に影響を及ぼすものについては土壤微生物相試験を行なった。

後作試験： OXY-235 と Drakkar の栽培後土壤に、検定植物としてダイコンを播種し、ダイコンの発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重について比較した。その結果、発芽率、草丈、根長及び生重について、系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料 6, p. 7~8, 表 4, 6, 8）。他方、OXY-235 の栽培後土壤におけるダイコンの乾物重は、Drakkar 栽培後土壤のものに比べて重く統計学的有意差が認められた（別添資料 6, p. 8, 表 8）。

鋤込み試験： OXY-235 及び Drakkar の植物体試料をそれぞれ 1% 混和した土壤にダイコンを播種し、発芽率、草丈、根長、生重及び乾物重について比較した。その結果、いずれの項目においても統計学的有意差は認められなかった（別添資料 6, p. 9~10, 表 10, 12, 14）。

土壤微生物相試験： OXY-235 及び Drakkar の栽培後の土壤を採取し、滅菌したリン酸緩衝液で適宜希釈後、細菌及び放線菌については PTYG 培地、糸状菌についてはローズベンガル培地を用いて培養し、それぞれの菌数を比較した。その結果、いずれにおいても統計学的有意差は認められなかった（別添資料 6, p. 12, 表 16）。

また、国外での調査において、OXY-235 種子中のエルシン酸及びグルコシノレート含有量は、カノーラ品種として規定される範囲内であることが確認されて

いる（別添資料 7, p. 16 表 2.3.2.1, p. 17 表 2.3.2.2）。

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

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

国外における承認に関する情報を表 4 に、また我が国における承認状況を表 5 (p. 24) に示した。

表 4 国外における使用等に関する情報

国名	承認機関	承認時期	承認内容
米国	米国農務省 (USDA)	1999 年 10 月	輸入承認
	米国食品医薬品庁 (FDA)	1999 年 10 月	食品・飼料安全
カナダ	カナダ食品検査庁 (CFIA)	1997 年 2 月	規制外確認
		1997 年 6 月	飼料安全
	カナダ保健省 (Health Canada)	1997 年 7 月	食品安全
オーストラリア ニュージーランド	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	2002 年 9 月	食品安全

(注：本表に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

表 5 我が国における承認状況

承認機関	承認時期	承認内容
農林水産省	1997 年 4 月	隔離ほ場試験
農林水産省	1998 年 7 月	環境安全 (旧指針)
厚生省	1999 年 11 月	食品安全 (旧指針)
厚生労働省	2001 年 3 月	食品安全 (食品衛生法)
農林水産省	1999 年 12 月	飼料安全 (旧指針)
	2003 年 3 月	飼料安全 (飼料安全法)

(注：本表に記載された情報に関わる権利及び内容の責任は申請者にある。)

OXY-235 の商業栽培は 2000 年及び 2001 年の 2 年間のみ行われ、2001 年に売れ残った種子は小売店から回収・廃棄された。2002 年以降、カナダ及びその他のいずれの国においても OXY-235 の商業栽培は行なわれておらず、将来においても行なわれることはない。したがって、今後 OXY-235 が意図せず混入して我が国に輸入される可能性は極めて低いと考えられる。

表 6 カナダにおけるカノーラの総生産量と OXY-235 生産量 (推計) の推移

社外秘情報につき非開示

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

宿主が属する分類学上の種であるセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) は、我が国において長期にわたる使用等の実績があることから、生物多様性影響評価実施要項の別表第三に基づき、宿主と比較して影響が高まっているか否かを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

我が国では北海道や本州の河原や線路沿いでのセイヨウナタネの群生（文献 68）や、主なナタネの輸入港やその周辺でセイヨウナタネの生育が報告されている。しかし、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があり、これまでも運搬の途中で種子のこぼれ落ちは起こっていたと考えられるが、セイヨウナタネが我が国の野生動植物等の個体や個体群の維持に影響を及ぼしたとする報告はない。また、セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている（文献 46）。実際に、大規模にセイヨウナタネが商業栽培されている英国で行なわれた調査において、人為的攪乱のない自然条件下では、野生化したセイヨウナタネは 2~4 年で消滅すると報告されている（文献 10）。また、同じく英国で行なわれた 3 年間にわたるモニタリング調査において、ほ場から逸出して群生したと考えられるセイヨウナタネの個体群は 3 年目にはほぼ消滅したことが報告されている（文献 65）。

競合における優位性に関わる形質として、我が国の隔離ほ場試験において、形態及び生育の特性、成体の越夏性、種子の生産量及び脱粒性について、OXY-235 と宿主品種である Westar を比較した。その結果、いずれの形質についても、OXY-235 と Westar の間に統計学的有意差、又は相違は認められなかった（別添資料 5, p. 3~4）。また、我が国の特定網室試験において、幼植物体の高温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の発芽率及び休眠性について、Westar と同じく春播きセイヨウナタネ品種である Drakkar と比較した。幼植物体の高温耐性については、高温条件下で数週間にわたる経時的達観評価を行った結果、OXY-235 及び Drakkar とともに高温条件下での栽培開始 5 週間までにほとんど黄化した状態になった。その後はいずれも緩やかに黄化が進み、5 週間から 11 週間にかけては、系統間で黄化程度に統計学的有意差が認められたものの、いずれも回復傾

向は示さず、12 週後には全個体の枯死が確認された。よって、OXY-235 の幼植物体は、Drakkar と同様に高温条件下において生育を続けることは困難であると考えられる（別添資料 6, p. 13, 表 17）。また、花粉については、いずれも約 97% の稔性を示し、サイズについても統計学的有意差は認められなかった（別添資料 6, p. 4; p. 5, 表 2）。さらに、OXY-235 と Drakkar の種子はいずれも播種後 4 日には 95%以上の高い発芽率を示し、8 日目には発芽能力のある全ての種子の発芽が確認されたことから、OXY-235 種子の休眠性は Drakkar と同様に極めて浅いと考えられる（別添資料 6, p. 17, 表 19）。

OXY-235 はプロモキシニル及びアイオキシニル等のオキシニル系除草剤に耐性を示す。しかし、本形質は、これらの除草剤の存在下においてのみ生存に優位に作用するが、自然環境下ではそのような環境は想定され難く、本形質が競合において優位に作用することはないと考えられる。

以上のことから、競合における優位性に関して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。

(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の判断

以上のことから、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した。

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

OXY-235 は、*oxy* 遺伝子によりニトリラーゼ蛋白質を産生し、オキシニル系除草剤であるプロモキシニル及びアイオキシニルを除草活性の無い化合物に加水

分解することにより、これらの除草剤に耐性を示す。ニトリラーゼ蛋白質はハロゲン化したヒドロキシベンゾニトリルに高い基質特異性を有しており、基質であるハロゲン化したヒドロキシベンゾニトリル以外の化合物のシアノ基を加水分解することは考えられない。なお、ニトリラーゼ蛋白質によりオキシニル系除草剤が加水分解される過程でアンモニアを生成するが、オキシニル系除草剤の散布が想定されない自然環境下において、本機序によりアンモニアを生成することはない。また、ニトリラーゼ蛋白質のアミノ酸配列に基づき、既知のアレルゲン蛋白質と相同性検索を行った結果、既知のアレルゲン蛋白質との相同性は認められなかった。

以上から、ニトリラーゼ蛋白質が植物体の代謝経路に影響する可能性はないと考えられる。

また、我が国の特定網室試験において、OXY-235の根から分泌され他の植物に影響を及ぼすものについては後作試験、植物体内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験、根から分泌され土壤微生物相に影響を及ぼすものについては土壤微生物相試験を行ない、OXY-235とDrakkarを比較した。その結果、後作試験において、OXY-235栽培後の土壌におけるダイコンの乾物重は、Drakkar栽培後の土壌に比べて重く、統計学的有意差が認められた（別添資料6, p.8, 表8）。しかし、この結果は、OXY-235の栽培後土壌はダイコンの生育を抑制していないことを示している。また、後作試験のその他の調査項目（別添資料6, p.7~8, 表4, 6, 8）、鋤込み試験（別添資料6, p.9~10, 表10, 12, 14）及び土壤微生物相試験（別添資料6, p.12, 表16）の全ての調査項目において統計学的有意差は認められなかった。以上のことから、OXY-235は有害物質の産生性を新たに獲得していないと考えられる。

さらに、国外での調査において、OXY-235種子中のエルシン酸及びグルコシノレート含有量は、カノーラ品種として規定される範囲内であることが確認されている（別添資料7, p.16 表2.3.2.1, p.17 表2.3.2.2）。また、マウスを用いた亜急性経口毒性試験において、ニトリラーゼ蛋白質の毒性は認められなかった（別添資料9）。

以上から、OXY-235は有害物質の産生性を新たに獲得したとは考えられず、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。

(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の判断

以上のことから、有害物質の産生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した。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国に自生するセイヨウナタネとその近縁種のうち交雑可能なものとして、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*及び*R. raphanistrum*が挙げられる。セイヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入された栽培種である。また、*B. rapa*及び*B. juncea*は我が国において栽培種として古くから利用されているが、栽培由来の外来種である（文献32）。なお、現在全国的に分布している*B. juncea*は第二次世界大戦後に帰化したものが広まったものと考えられている（文献42）。さらに、*B. nigra*及び*R. raphanistrum*は明治以降に人為的影響により我が国に侵入した外来種である。このように、いずれも栽培等に由来する帰化植物と考えられ、生物多様性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。

(2) 影響の具体的な内容の評価

—

(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の判断

以上のことから、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した。

4 その他の性質

第二、3（交雑性）に挙げた我が国に自生するセイヨウナタネ及びその近縁種はいずれも外来種であり、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等としては特定されない。しかし、OXY-235 と近縁種が交雑した場合、①雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、②導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられる。

OXY-235 に導入された *oxy* 遺伝子には交雑性を高めるような性質を付与する特性はなく、隔離ほ場において、OXY-235 の交雑性を宿主品種の Westar 及びセイヨウナタネ品種の樺太を対象に調査した結果、セイヨウナタネの他殖率に関する既往の知見（5～30%；文献 24、46、55）を上回るような交雑性を獲得していないことが確認されている（別添資料 5, p. 11）。これを踏まえ、セイヨウナタネと近縁種の交雑性及び雑種の稔性等に関して、既往の知見に基づき検討した。

1) セイヨウナタネと *B. rapa* の交雑性

セイヨウナタネと *B. rapa* の交雑率については、0.4～1.5%（文献 64）、0.2%（文献 80）、6.5～7.1%（文献 71）等の報告がある。また、F1 の生存率は平均で 2%以下であり（文献 64）、*B. rapa* とセイヨウナタネの雑種の花粉の稔性が平均で 41～53%に減少することが報告されている（文献 27）。さらに、F2 及び BC 世代での適応度についても、品種・集団間に差があるものの、全体的に低くなると報告されている（文献 21）。

2) セイヨウナタネと *B. juncea* の交雑性

セイヨウナタネと *B. juncea* の交雑性については、*B. juncea* とセイヨウナタネを 1:1 の割合で栽培した場合 0.3～1.1%（文献 6）、セイヨウナタネのほ場内に 12 個体の *B. juncea* を植えた場合 3%（文献 28）の雑種形成率が報告されている。

また、雑種の花粉稔性は 0～28%であり、種子の生産量も少ない（文献 17）。さらに、セイヨウナタネを雌株として得られた雑種は弱く生育遅延が認められ、生育段階で死に至り（文献 9）、BC 世代でも同様に初期生育遅延や個体数の減少が報告されている（文献 58）。他方、*B. juncea* を雄株として得られた雑種の栄

養生は旺盛であるが、着莢率、結実粒数、千粒重や子実収量などは劣り、減数分裂に異常がみられ、花粉稔性も 20%程度に低下することが報告されている（文献 9）。

3) セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑性

セイヨウナタネと *B. nigra* の交雑和合性は極めて低く、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかったと報告されている（文献 6）。また、人工交配によっても、ほとんど雑種は得られないか（文献 5）、又は全く得られなかったことが報告されている（文献 8、30）。また、雑種が形成されたとしても花粉の稔性は高くても 3.1%であり、完全に不稔になるものも報告されている。さらに、F1 をセイヨウナタネによって戻し交配した場合の結実率（結実数/受粉した花）は 0.9%であり、*B. nigra* によって戻し交配した場合の結実率は 0.06%であった。また、これらの種子は萎縮しており、室温下においても発芽は認められなかった（文献 5）。このように、得られた雑種の稔性は低く、F2 や BC 世代を得ることは難しいと考えられる（文献 63）。

4) セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑性

セイヨウナタネと *R. raphanistrum* の交雑和合性に関しては、セイヨウナタネと *R. raphanistrum* を 600 : 1 の割合で栽培した場合、0.05%の雑種形成が報告されている（文献 11）。しかし、実際のほ場における自然交雑は極めて稀（文献 60、79）であり、また、*R. raphanistrum* がごくありふれた雑草となっているスイスにおける調査でも、セイヨウナタネのほ場近くに自生する *R. raphanistrum* の個体群からセイヨウナタネとの雑種は確認されなかった（文献 74）。他方、人工交配や胚培養（文献 30）、あるいは細胞質雄性不稔系統（文献 4、15）を用いてセイヨウナタネと *R. raphanistrum* の雑種を作出することができる。しかし、得られた雑種の稔性は著しく低かったことが報告されている（文献 4）。

以上から、セイヨウナタネとこれらの近縁種との交雑性は低く、比較的交雑し易い *B. rapa* や *B. juncea* についても、雑種が戻し交配を繰り返し、自然環境下で優占種となる可能性は極めて低いと考えられる。OXY-235 の交雑性は既往の知見を上回るものではないと考えられることから、OXY-235 と近縁種が交雑した場合も、雑種が優占種となる可能性は低いと考えられる。

また、導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、*oxy* 遺伝子を有する OXY-235 の競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性について、従来のセイヨウナタネと比較して相違は認められな

かったことから、*oxy* 遺伝子が個体又は個体群の維持に関する形質に影響を及ぼすことは考え難い。よって、仮に *oxy* 遺伝子が近縁種の個体群中に浸透しても、その個体群の維持に影響を及ぼすことはないと考えられる。

以上から、OXY-235 とセイヨウナタネを含む近縁種が交雑した場合、①雑種が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、②導入遺伝子の影響により近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性はいずれも極めて低く、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

我が国では、セイヨウナタネは河原や線路沿いでの群生が報告されている。また、我が国では長期にわたるセイヨウナタネ種子の輸入経験があり、運搬の途中での種子のこぼれ落ちはこれまでも起こっていたと考えられるが、こぼれ落ちたセイヨウナタネが我が国の野生動植物等の個体や個体群の維持に影響を及ぼしたとする報告はなされていない。また、セイヨウナタネは、路傍、崖、河川敷などのように攪乱が定期的に起こる立地条件でなければ、やがて多年生草本や灌木に置き換わることが知られている。

競合における優位性に関わる形質として、我が国の隔離ほ場試験において、形態及び生育の特性、成体の越冬性、種子の生産量及び脱粒性について、OXY-235 と Westar を比較した。また、我が国の特定網室試験において、生育初期の高温耐性、花粉の稔性及びサイズ、種子の発芽率及び休眠性について、Drakkar と比較した。その結果、生育初期の高温耐性を除くいずれの調査においても、OXY-235 と対照品種との間に統計学的有意差又は相違は認められなかった。また、生育初期の高温耐性については、経時的調査の途中で OXY-235 と Drakkar の黄化程度に関して統計学的有意差が認められたものの、いずれも回復傾向は示さず、12 週間後には全個体の枯死が確認されたことから、高温条件下において生育を続けることは困難であると考えられた。以上から、OXY-235 は、競合における優位性を高める形質を新たに獲得していないと考えられた。

また、OXY-235 はプロモキシニル及びアイオキシニル等のオキシニル系除草剤に耐性を示す。しかし、本形質は、これらの除草剤の存在下においてのみ生存に優位に作用するが、自然環境下ではそのような環境は想定され難く、本形質が競合において優位に作用することはないと考えられる。

以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

OXY-235 は *oxy* 遺伝子によりニトリラーゼ蛋白質を産生するが、ニトリラーゼ蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるハロゲン化したヒドロキシベンズニトリル以外の化合物のシアノ基を加水分解することは考え難い。なお、ニトリラーゼ蛋白質によりオキシニル系除草剤が加水分解される過程でアンモニアを生成するが、オキシニル系除草剤が散布されない自然環境下において、本機序によりアンモニアを生成することはない。以上から、ニトリラーゼ蛋白質が宿主の代謝経路に影響する可能性はないと考えられる。また、ニトリラーゼ蛋白質のアミノ酸配列に基づき、既知のアレルゲン蛋白質との相同性検索を

行った結果、既知のアレルゲン蛋白質との相同性は認められなかった。

また、我が国の特定網室試験において、OXY-235 の有害物質の産生性について後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行なった結果、OXY-235 が新たに有害物質の産生性を獲得したことを示唆する結果は認められなかった。

さらに、国外での調査において、OXY-235 種子中のエルシン酸及びグルコシノレート含有量は、カノーラ品種として規定される範囲内であることが確認されている。また、マウスを用いた亜急性経口毒性試験において、ニトリラーゼ蛋白質の毒性は認められなかった。

以上から、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

我が国に自生するセイヨウナタネとその近縁種のうち交雑可能なものとして、セイヨウナタネ、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra* 及び *R. raphanistrum* が挙げられるが、いずれも外来種であり、交雑性に関して生物多様性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。よって、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

しかし、OXY-235 とセイヨウナタネを含む近縁種が交雑した場合、①雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、②導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられた。

OXY-235 に移入された *oxy* 遺伝子には交雑性を高めるような性質を付与する特性はなく、我が国の隔離ほ場における交雑性試験で、セイヨウナタネの他殖率に関する既知の知見を上回らないことが確認された。よって、その他の近縁種に対しても交雑性が大幅に高まることはないと推察し、既往の知見に基づき、セイヨウナタネと近縁種の交雑性及び雑種が優占化する可能性について検討した。その結果、第二、4 に詳述したように、種々の生殖的隔離障壁が存在することから、自然条件下で OXY-235 と近縁種の雑種後代が優占化して野生植物種の個体群を駆逐する可能性は低いと考えられた。

また、導入遺伝子が負担となり近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、*oxy* 遺伝子を有する OXY-235 の競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性について調査した結果、非組換えセイヨウナタネと比較して相違は認められなかったことから、*oxy* 遺伝子が個体又は個体群の維持に関わる形質に影響を及ぼすことはないと考えられた。よって、仮に *oxy* 遺伝子が近縁種

の個体群中に浸透しても、その個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

以上から、OXY-235 とセイヨウナタネを含む近縁種が交雑した場合、①雑種が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、②導入遺伝子の影響により近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性はいずれも極めて低く、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

以上を総合的に評価し、OXY-235 を第一種使用規程に従って使用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した。

参考文献

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

別添資料 1 : *oxy* 遺伝子の塩基配列

社外秘情報につき非開示

別添資料 2 : プラスミド pRPA-BL-235 の塩基配列

社外秘情報につき非開示

別添資料 3 : OXY-235 における挿入遺伝子の確認

社外秘情報につき非開示

別添資料 4 : OXY-235 (T1 世代) における分離比に関する資料

社外秘情報につき非開示

別添資料 5 : 平成 9 年度 隔離ほ場試験報告書

社外秘情報につき非開示

別添資料 6 : 平成 19 年 特定網室試験報告書

社外秘情報につき非開示

別添資料 7 : OXY-235 の生物学的特性及び影響の評価

社外秘情報につき非開示

別添資料 8 : イベント識別法

社外秘情報につき非開示

別添資料 9 : マウスを用いた亜急性経口毒性試験

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成 16 年 8 月 18 日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪 4-10-8

第一種使用規定の承認を申請している除草剤プロモキシニル耐性セイヨウナタネ (*oxy*, *Brassica napus* L.) (OXY-235, OECD UI: ACS-BN011-5) (以下、「OXY-235」とする。)の第一種使用において、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、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

弊社は社内に緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、研究開発本部長を本部長とし、バイオサイエンスグループリーダーを事務局として、広報担当者を含む各部門から構成される。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は我が国への OXY-235 種子の輸出者、OXY-235 種子を配給した我が国の種苗会社、その種子を買った我が国の農家や栽培者、配給した種子の量及び時期を可能な限り特定する。

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

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記 2 で明らかにした我が国への OXY-235 種子の輸出者、我が国の種苗会社、農家や栽培者に生物多様性影響に関して情報提供を行い、当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいて OXY-235 種子を我が国に配給している、またはその可能性のある国の種苗会社及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれがあると確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記 2 及び 3 で明らかにした個人や団体に、OXY-235 を不活性化する措置か、さもなくば OXY-235 の環境への放出を防止するための措置、及びすでに環境に放出された T45 の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

OXY-235 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、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社内における組織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 16 年 8 月 18 日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー

住所 東京都港区高輪 4-10-8

第一種使用規程の承認を申請している除草剤プロモキシニル耐性セイヨウナタネ (*oxy*, *Brassica napus* L.) (OXY-235, OECD UI: ACS-BN011-5) (以下、「OXY-235」とする。)の第一種使用において、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、研究開発本部長を本部長とし、バイオサイエンスグループリーダーを事務局として、広報担当者を含む各部門から構成される。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は OXY-235 穀粒の我が国への輸入業者、我が国において OXY-235 穀粒を配給した業者、輸入した OXY-235 穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

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

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記 2 で明らかにした OXY-235 穀粒の我が国への輸入業者及び我が国における配給業者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいて OXY-235 穀粒を我が国に配給している、又はその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記 2 及び 3 で明らかにした個人や団体に、OXY-235 を不活性化する措置か、さもなくば OXY-235 の環境への放出を防止するための措置、及びすでに環境に放出された OXY-235 の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

OXY-235 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、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社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。