チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
（*cry2A.127*, *cry1A.88*, 改変 *vip3A*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* （L.）Iltis）（33121, OECD UI: DP-Ø33121-3）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 3
第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 3
1　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 3
（1）分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 3
（2）使用等の歴史及び現状 3
（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 7
（1）供与核酸に関する情報 7
（2）ベクターに関する情報 15
（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 19
（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 20
（6）宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 21
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者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法 25
（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 25
（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
第二　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 27
3　交雑性 29
4　その他の性質 30
第三　生物多様性影響の総合的評価 31
参考文献 33
緊急措置計画書 40
デュポン株式会社 宇都宮事業所 隔離ほ場 受容環境 42
添付資料リスト 58

第一種使用規程承認申請書

平成 25 年 10 月 9 日

農林水産大臣　林　芳正　　殿
環境大臣　　石原　伸晃　殿

氏名
デュポン株式会社
代表取締役社長　田中　能之
申請者
住所
東京都千代田区永田町二丁目 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	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（*cry2A.127, cry1A.88,* 改変 *vip3A, pat, Zea mays* subsp. *mays* （L.） Iltis）（33121, OECD UI: DP-Ø33121-3）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、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	所　在　地：栃木県宇都宮市清原工業団地 19 番地 2 名　　称：デュポン株式会社　宇都宮事業所　隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 29 年 3 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 本遺伝子組換えトウモロコシの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、播種時及び成熟期から収穫期には防鳥網を設置する。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えトウモロコシ及び比較対照の非遺伝子組換えトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照の非遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。 (5) 本遺伝子組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。 (6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。 (7) (1)から(6)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。 (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

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

①　和名、英名及び学名

和名：トウモロコシ
英名：corn, maize
学名：*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis

②　宿主の品種名又は系統名

宿主は、イネ科（*Poaceae*）トウモロコシ属（*Zea*）のトウモロコシ（*Z. mays*）のデント種で、系統名は PHWWE である。

③　国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの原産地は、メキシコ、中米又は南米等と考えられている（OECD, 2003）。また、トウモロコシの近縁野生種であるテオシントはメキシコ及びグァテマラに、同じくトウモロコシの近縁野生種である *Tripsacum* 属は米国、中米及び南米に自生している（OECD, 2003）。

我が国において、自然環境下でトウモロコシ、テオシント及び *Tripsacum* 属が自生している地域は知られていない。

（2）使用等の歴史及び現状

①　国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシは、9000 年前にメキシコ南部で栽培植物化したと考えられている。その後、コロンブスの新大陸発見を機に、ヨーロッパ、世界へと伝播し、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（OECD, 2003）。

トウモロコシの栽培には、我が国においても長い栽培の歴史がある。我が国へは、天正年間（1580 年頃）にポルトガル人が伝えたのが最初であるとされており、九州、四国や本州で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、デント種及びフリント種が米国より導入され、現在では北海道から九州まで広く栽培されている（戸澤, 2005; 農林水産省, 2013）。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

栽培地域：

我が国における 2012 年の青刈りトウモロコシ（デント種又はフリント種）の栽培面積は 9 万 2,600ha で、主な栽培地域は北海道である（農林水産省, 2013）。国外では主に温暖地域で栽培され（OECD, 2003）、主要生産国は、米国、中国及びブラジルである（FAO, 2013）。

栽培方法：

米国を代表とする大規模な機械化された近代的方法から、古くより南米アンデス高地等で行われている種子を手で播くような伝統的な方法まで、様々な方法で栽培されている。我が国では、平均気温が 10～14℃に達する 4 月上中旬～5 月中下旬に、栽植密度 6,500～9,000 株/10 アール、播種深度約 3cm で播種し、発芽後に中耕、除草、培土等の管理を行う（菊池, 1987）。子実用トウモロコシは水分含量が 15～20%になった時期に収穫するのが理想的であり（Iowa State University, 2010）、サイレージ用（青刈り）トウモロコシは、黄熟期に茎葉全体を収穫する（菊池, 1987）。

流通実態：

コメ、コムギとともに世界三大穀物の一つとされている。2011 年の世界総生産量は約 8 億 8,350 万トンであり、最大の生産国は米国で、世界総生産量の 36%を占めている（FAO, 2013）。デント種が生産の主流である（戸澤, 2005）。

2012 年に我が国は約 1,490 万トンを輸入しており、その 75%にあたる約 1,110 万トンは米国からである（財務省, 2013）。

用途：

子実は主に飼料として利用され、食品、工業分野では、デンプン、コーングリッツ、コーンオイル及びエタノールの原料として利用される。青刈りした茎葉は飼料として利用される。なお、スイート種は生食用又は缶詰用となる（菊池, 1987）。

（3）生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

―

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシの発芽最低温度は10～11℃、最適温度は33℃である（中村, 2001）。トウモロコシは栽培植物化されるようになった後、自然環境で生存する能力を失った。種子が越冬し翌年に発芽することもあるが、植物体は自然環境中では定着

しない。成長点が地上に出た5～7葉期に6～8時間以上、0℃以下の外気にさらされると生存できない。また、遅霜により葉やけを起こすが、致命的な損傷には至らない。温帯域で、適度な湿度と霜の降りない日数等の条件が揃えば良く生育する（OECD, 2003）。

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

雌穂は苞皮で覆われているため、種子が自然に雌穂から脱粒し散布される可能性は低く、種子の散布には人間の仲介が必要である（OECD, 2003）。また、種子の休眠性は極めて低い（CFIA, 2013）。種子の寿命は、水分含量 12%、温度 10℃、相対湿度 55%以下の条件で 6～8 年である（中村, 2001）。

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

自然条件下で種子以外に植物体を再生しうる組織又は器官は知られていない。

③　自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、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

典型的な風媒花で、他殖率は 95～99%である（千藤, 2001）。デント種及びフリント種は一般に自家不和合性を有しない（Kermicle, 1997）。交雑可能な近縁野生種として、テオシント及び *Tripsacum* 属がある。テオシントはトウモロコシと近接する場合、自然環境下で交雑する。*Tripsacum* 属はトウモロコシと非常に希に交雑できるが、雑種は高い確率で生殖不能で、遺伝学的にも不安定である（OECD, 2003）。なお、テオシント及び *Tripsacum* 属が我が国において自生することは報告されていない。
アポミクシスの特性を有するとの報告はない。

④　花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

一雄穂当たりの花粉の生産量は、約 1,800 万粒とされている（OECD, 2003）。晴天の場合、午前 10 時～11 時頃に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）。花粉の寿命は通常 10～30 分で、好適条件下では更に長い（CFIA, 2013）。花粉は球形で、直径は約 90～100 µm である（Pleasants *et al.*, 2001）。受粉は主に風媒によって行われる（OECD, 2003）。

我が国において、トウモロコシほ場周辺のヒマワリ（*Helianthus annuus*）とイヌホオズキ（*Solanum nigrum*）葉上に堆積する花粉量を測定した結果、ほ場端から 1m で約 160 粒/cm^2、5m で 20 粒/cm^2、10m では 10 粒/cm^{2}以下であった（Shirai and Takahashi, 2005）。北米における試験では、トウワタ（*Asclepias syriaca*）葉上に堆積した花粉密度は、ほ場端から 1m で 35.4 粒/cm^2、2m で 14.2 粒/cm^2、3m で 5～20 粒/cm^2、4～5m で 8.1 粒/cm^2、10m は 1 粒/cm^{2}であった（Hansen-Jesse and Obrycki, 2000 ; Pleasants *et al.*, 2001）。また、交雑を防止するために必要な隔離距離は、周囲の林や高層建築物等の遮蔽物の有無によって異なり、200～400m とされている（千藤, 2001）。

ホ　病原性

―

へ　有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質の産生は知られていない。

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

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（*cry2A.127*, *cry1A.88*, 改変 *vip3A*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* （L.） Iltis）（33121, OECD UI: DP-Ø33121-3）（以下「本組換えトウモロコシ」という。）における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1（8 ページ）に示した。また、その供与核酸の塩基配列を添付資料 1 の Appendix1（社外秘情報につき非開示）に示した。

なお、これら *cry2A.127* 遺伝子、*cry1A.88* 遺伝子、改変 *vip3A* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入されている同様の遺伝子組換えトウモロコシ 186165 系統（OECD UI: DP-186165-2）、186169 系統（OECD UI: DP-186169-6）及び 187156 系統（OECD UI: DP-187156-3）は、既に 2013 年 3 月 27 日付けで第一種使用規程（隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為）について承認されている。

ロ　構成要素の機能

①　目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

供与核酸の構成要素それぞれの機能を表 1（8 ページ）に示した。

表 1　本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素		サイズ（bp）	由来及び機能
T-DNA領域			
その他	Right Border（RB）	25	アグロバクテリウム（*Rhizobium radiobacter*（*Agrobacterium tumefaciens*）C58株）由来のTiプラスミド（pTi）のT-DNA領域の右側境界領域。
	Ti Plasmid Region	152	アグロバクテリウム（*R. radiobacter*（*A. tumefaciens*）C58株）由来のpTiの機能を有しない配列。
	*lox*P	34	バクテリオファージ P1由来のCreリコンビナーゼ認識組換え部位（Dale and Ow, 1990）。
	*att*B3	21	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 （Cheo *et al.*, 2004）。
cry2A.127 遺伝子発現カセット	CYMV プロモーター	1,153	Citrus yellow mosaic virus（CYMV）由来のプロモーター領域（Huang and Hartung, 2001; Genbank accession NC_003382.1) 。植物体内での構成的発現を誘導する。
	Adh1 イントロン	543	トウモロコシ（*Zea mays*）由来のアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン 1 領域（Dennis *et al.*, 1984)。
	CTP	162	葉緑体移行ペプチド（Chloroplast Transit Peptide）をコードする遺伝子。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する（米国 Patent No. US 7,563,863, B2)。
	Peptide Linker	18	6 アミノ酸からなるリンカー配列。
	cry2A.127	1,905	Cry2A.127 蛋白質をコードする遺伝子。*Bacillus thuringiensis* subsp.*kurstaki*由来の遺伝子を基に DNA シャッフリング法により得た（第一.2.（1）．ロ.②.a、12 ページ)。
	UBQ3 ターミネーター	1,089	シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来のユビキチン3遺伝子のターミネーター領域（Callis *et al.*, 1995)。転写を停止する。
その他	RPG 3'UTR	2,228	シロイヌナズナ（*A. thaliana*）由来のリボソーム蛋白質遺伝子の3'非翻訳領域（UTR）（Salanoubat *et al.*,2000; TAIR accession AT3G28500）。
	*att*B2	24	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 （Hartley *et al.*, 2000）。

表 1　本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能（続き）

構成要素		サイズ（bp）	由 来 及 び 機 能
T-DNA領域			
cry1A.88 遺伝子発現カセット	BSV（AV）プロモーター	470	Banana Streak Virus の Acuminata Vietnam 株由来のプロモーター領域（Lheureux *et al.*, 2007；Genbank accession NC_007003.1）。植物体内での構成的発現を誘導する。
	Adh1 イントロン	543	トウモロコシ（*Z. mays*）由来のアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン 1 領域（Dennis *et al.*, 1984）。
	cry1A.88	3,549	Cry1A.88 蛋白質をコードする遺伝子。*B. thuringiensis* subsp.*kurstaki*由来の遺伝子を基に DNA シャッフリング法により得た（第一.2.（1）．ロ.②.a、12 ページ）。
	SB-アクチン ターミネーター	1,043	ソルガム（*Sorghum bicolor*）由来のアクチン遺伝子のターミネーター領域（Genbank accession XM_002441128.1）。転写を停止する。
その他	Z-W64A ターミネーター	480	トウモロコシ（*Z. mays*）W64系統由来の27 kDa 貯蔵蛋白質遺伝子のターミネーター領域（Das *et al.*, 1991）。転写を停止する。
	UBQ14 ターミネーター	902	シロイヌナズナ（*A. thaliana*）由来のユビキチン14遺伝子のターミネーター領域（Callis *et al.*, 1995）。転写を停止する。
	In2-1 ターミネーター	494	トウモロコシ（*Z. mays*）由来の *In2-1*遺伝子のターミネーター領域（Hershey and Stoner, 1991）。転写を停止する。
	*att*B1	24	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼの認識組換え部位 （Hartley *et al.*, 2000）。
改変 *vip3A* 遺伝子発現カセット	*ubi*ZM1 プロモーター	900	トウモロコシ（*Z. mays*）由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域（Christensen *et al.*, 1992）。植物体内での構成的発現を誘導する。
	*ubi*ZM1 5'UTR	83	トウモロコシ（*Z. mays*）由来のポリユビキチン遺伝子の5' 非翻訳領域（UTR）（Christensen *et al.*, 1992）。
	*ubi*ZM1 イントロン	1,013	トウモロコシ（*Z. mays*）由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域（Christensen *et al.*, 1992）。
	改変 *vip3A*	2,370	*B. thuringiensis* AB88株由来の *vip3A*遺伝子（Estruch *et al.*, 1996）をトウモロコシでの発現を最適化するため改変した遺伝子。改変Vip3A蛋白質は、野生型Vip3A蛋白質における129番目のメチオニンがイソロイシンに、284番目のリシンがグルタミンに置換されている。
	pin II ターミネーター	310	ジャガイモ（*Solanum tuberosum*）由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子（*pin* II）のターミネーター領域（Keil *et al.*, 1986; An *et al.*, 1989）。転写を停止する。

表 1　本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能（続き）

構成要素		サイズ（bp）	由 来 及 び 機 能
T-DNA領域			
その他	*att*B4	21	バクテリオファージλ由来のインテグラーゼ認識組換え部位 （Cheo *et al.*, 2004）。
	*lox*P	34	バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼ認識組換え部位（Dale and Ow, 1990）。
pat 遺伝子発現カセット	*ubi*ZM1 プロモーター	900	トウモロコシ（*Z. mays*）由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域（Christensen *et al.*, 1992）。植物体内での構成的発現を誘導する。
	*ubi*ZM1 5'UTR	83	トウモロコシ（*Z. mays*）由来のポリユビキチン遺伝子の5'非翻訳領域（UTR）（Christensen *et al.*, 1992）。
	*ubi*ZM1 イントロン	1,013	トウモロコシ（*Z. mays*）由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域（Christensen *et al.*, 1992）。
	FRT1	48	出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）由来のFlpリコンビナーゼDNA 結合部位（Proteau *et al.*, 1986）。
	pat	552	*Streptomyces viridochromogenes*由来のホスフィノス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 （Wohlleben *et al.*, 1988）。トウモロコシでの発現を最適化するため、塩基配列中のGC含量を高めるよう改変されているが、産生されるPAT蛋白質のアミノ酸配列に変化はない。
	pin II ターミネーター	310	ジャガイモ（*S. tuberosum*）由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子（*pin* II）のターミネーター領域（Keil *et al.*, 1986; An *et al.*, 1989）。転写を停止する。
その他	FRT87	48	出芽酵母（*S. cerevisiae*）由来の改変型Flpリコンビナーゼ DNA 結合部位（Tao *et al.*, 2007）。
	Ti Plasmid Region	57	アグロバクテリウム（*R. radiobacter*（*A. tumefaciens*）C58株）由来のpTiの機能を有しない配列。
	Left Border （LB）	25	アグロバクテリウム（*R. radiobacter*（*A.tumefaciens* ）C58株）由来のpTiのT-DNA領域の左側境界領域。

表 1　本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸の構成並びにその構成要素の由来及び機能（続き）

構成要素	サイズ（bp）	由 来 及 び 機 能
プラスミド外側骨格領域（本組換えトウモロコシには存在しない）		
spc	789	細菌由来のスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子（Fling *et al.*, 1985）。
colE1 *ori*	370	大腸菌由来のDNA複製起点（Tomizawa *et al.*, 1977）。
cos	14	バクテリオファージλ由来の付着末端。
tetR	651	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の調節遺伝子。
tetA	1,200	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子。
trfA	1,149	細菌由来のトランス作用複製因子の遺伝子。
*ori*T	112	細菌由来のDNA伝達起点。
ctl	6,271	細菌由来のセントラルコントロールオペロン領域。
*ori*V	711	細菌由来のDNA複製起点。
*vir*C1	695	*R. radiobacter*（*A. tumefaciens*）由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子。
*vir*C2	609	*R. radiobacter*（*A. tumefaciens*）由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子。
*vir*G	804	*R. radiobacter*（*A. tumefaciens*）由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子。
*vir*B	9,436	*R. radiobacter*（*A. tumefaciens*）由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子。
colE1 *ori*	370	大腸菌由来の DNA 複製起点（Tomizawa *et al.*, 1977）。
cos	14	バクテリオファージλ由来の付着末端。

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. 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

Bt 蛋白質

本組換えトウモロコシには、*cry2A.127* 遺伝子、*cry1A.88* 遺伝子及び改変 *vip3A* 遺伝子により Bt 蛋白質（殺虫性蛋白質）の Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質が産生される。Bt 蛋白質は一般にチョウ目等の害虫の中腸細胞にある特異的な受容体に結合して細胞に小孔を形成し、中腸細胞を破壊することにより殺虫活性を示す（Schnepf *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; OECD, 2007）。以下に各 Bt 蛋白質の機能を記載した。

Cry2A.127 蛋白質：

Cry2A.127 蛋白質をコードする *cry2A.127*遺伝子は、コーンイヤーワーム（Corn earworm、*Helicoverpa zea*）に対する殺虫活性を高めるため、*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *cry2Ab** [1] 遺伝子及び *cry2Ax* [2]遺伝子の塩基配列を基に、DNA シャッフリング法 [3] により得た遺伝子である。

本遺伝子は、634 個のアミノ酸からなる Cry2A.127 蛋白質をコードする。Cry2A.127 蛋白質のアミノ酸配列を添付資料 2（社外秘情報につき非開示）の 1 ページに示した。Cry2A.127 蛋白質は Cry2Ab*蛋白質及び Cry2Ax 蛋白質とそれぞれ 98.7%及び 92.3%の相同性を持つ。いずれの蛋白質も、これまでに生物多様性影響評価を経ている Cry2A ファミリーの Bt 蛋白質である。

Cry2A.127 蛋白質は、トウモロコシ栽培におけるチョウ目主要害虫であるコーンイヤーワーム、ヨーロッパアワノメイガ（European corn borer、*Ostrinia nubilalis*）等に殺虫活性を示す。コーンイヤーワーム及びヨーロッパアワノメイガに対する LC_{50} 値（半数致死濃度）を表 2（13 ページ）に示した。チョウ目昆虫以外のコウチュウ目の *Coleomegilla maculata*、ハチ目の *Apis mellifera* 及びアミメカゲロウ目の *Chrysoperla rufilabris* には活性を示さない（表 3、14 ページ）。

---

[1] *cry2Ab**遺伝子がコードする Cry2Ab*蛋白質は、野生型 Cry2Ab 蛋白質における 36 番目のリシンがアルギニンに、241 番目のメチオニンがトレオニンに置換されている。

[2] *cry2Ax* 遺伝子は、パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社が保有する *B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* からチョウ目昆虫に対する殺虫活性を基に新たに選別されたもので、Cry2Ax 蛋白質をコードする。

[3] DNA シャッフリング法；クローニングした遺伝子を DNA 消化酵素で断片化し、プライマーを添加しない PCR により断片同士を結合させる。その後、基となった遺伝子の両端部分をプライマーに用いて PCR を行い、完全長の再構築された遺伝子を得る技術である（Stemmer, 1994; Crameri *et al.*, 1998）。

Cry1A.88 蛋白質：

Cry1A.88 蛋白質をコードする *cry1A.88* 遺伝子は、コーンイヤーワームに対する殺虫活性を高めるため、*B.thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *cry1Ab* 遺伝子の塩基配列を基に、DNA シャッフリング法により得た遺伝子である。

本遺伝子は、1,182 個のアミノ酸からなる Cry1A.88 蛋白質をコードする。Cry1A.88 蛋白質のアミノ酸配列を添付資料 2（社外秘情報につき非開示）の 3 ページに示した。Cry1A.88 蛋白質は Cry1Ab 蛋白質と 93.7%のアミノ酸配列相同性を持つ。いずれの蛋白質も、これまでに生物多様性影響評価を経ている Cry1A ファミリーの Bt 蛋白質である。

Cry1A.88 蛋白質は、トウモロコシ栽培におけるチョウ目主要害虫であるコーンイヤーワーム、ヨーロッパアワノメイガ等に殺虫活性を示す。コーンイヤーワーム及びヨーロッパアワノメイガに対する LC_{50} 値を表 2（13 ページ）に示した。チョウ目昆虫以外のコウチュウ目の *Coleomegilla maculata*、ハチ目の *Apis mellifera* 及びアミメカゲロウ目の *Chrysoperla rufilabris* には活性を示さない（表 3、14 ページ）。

改変 Vip3A 蛋白質：

改変Vip3A蛋白質をコードする改変*vip3A*遺伝子は、トウモロコシでの発現を最適化するため、*B.thuringiensis* AB88株由来の*vip3A*遺伝子の塩基配列を改変して得た。改変Vip3A蛋白質は、野生型Vip3A蛋白質におけるN末端から129番目のメチオニンがイソロイシンに、N末端から284番目のリシンがグルタミンに置換されている。

改変Vip3A蛋白質は、トウモロコシ栽培におけるチョウ目主要害虫であるコーンイヤーワーム、フォールアーミーワーム（Fall armyworm、*Spodoptera frugiperda*）等に殺虫活性を示す（Lee *et al.*, 2003）。コーンイヤーワームに対するLC_{50}値を表 2（13ページ）に示した。チョウ目以外の昆虫には殺虫活性を示さないことが報告されている（Raybould *et al.*, 2011）。

表 2　Bt 蛋白質のコーンイヤーワーム及びヨーロッパアワノメイガに対する殺虫活性

LC_{50} 値（ng/mg）

チョウ目害虫	Cry2A.127 蛋白質	Cry1A.88 蛋白質	改変 Vip3A 蛋白質
コーンイヤーワーム	3.5 1)	9.7 3)	11 5)
ヨーロッパアワノメイガ	0.37 2)	0.45 4)	― 6)

1）添付資料 3（社外秘情報につき非開示）、2）添付資料 4（社外秘情報につき非開示）、3）添付資料 5（社外秘情報につき非開示）、4）添付資料 6（社外秘情報につき非開示）、5）添付資料 7（社外秘情報につき非開示）。

6）ヨーロッパアワノメイガには殺虫活性を示さない（Raybould *et al.*, 2011）。

表 3　Cry2A.127 蛋白質及び Cry1A.88 蛋白質のチョウ目以外の昆虫に対する影響評価

生　物　種	観察期間	評価項目	無影響濃度*	
			Cry2A.127 蛋白質	Cry1A.88 蛋白質
Coleomegilla maculata（コウチュウ目テントウムシ科）	幼虫から羽化まで	死亡率、羽化、体重	220 ng/mg	60 ng/mg
Apis mellifera（ハチ目ミツバチ科）	幼虫から羽化まで	死亡率	20 µg/mL	20 µg/mL
Chrysoperla rufilabris（アミメカゲロウ目クサカゲロウ科）	幼虫から蛹化まで	死亡率	220 ng/mg	60 ng/mg

試験方法はEPAのテストガイドライン（US EPA,1996）を参照した。

*ELISA法により定量した濃縮蛋白質溶液を飼料に添加した後の濃度。

PAT 蛋白質

PAT 蛋白質をコードする *pat* 遺伝子は、トウモロコシでの発現を最適化するため、*Streptomyces viridochromogenes* 由来 *pat* 遺伝子の塩基配列を改変した遺伝子である。産生される PAT 蛋白質のアミノ酸配列に変化はない。

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合成酵素活性を阻害するため、基質であるアンモニアが植物体内に蓄積し植物は枯死する。PAT 蛋白質は、L-グルホシネートをアセチル化し、*N*-アセチル- L-グルホシネートに変え無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する（OECD, 2002）。

b. 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の相同性

ネブラスカ大学 Food Allergy Research and Resource Program（FARRP）の既知アレルゲンデータベース（Release 13‐2013 年 2 月版）を用いてアミノ酸配列相同性検索を行った（2013 年 2 月検索）。その結果、Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び PAT 蛋白質と相同性を示すアレルゲンは認められなかった。

③　宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

Bt 蛋白質：

Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質はいずれも Bt 蛋白質である。Bt 蛋白質の機能についてはこれまでに多くの研究がなされており、標的昆虫の中腸細胞にある特異的な受容体に結合して細胞に小孔を形成し、中腸細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられているが（Schnepf *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; OECD, 2007）、酵素活性を有するとの報告はない。

PAT 蛋白質：

PAT 蛋白質は高い基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない（OECD, 1999）。

以上のことから、これら蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させる可能性は低い。

（2）ベクターに関する情報

イ　名称及び由来

本組換えトウモロコシの作出に用いたベクターはプラスミド PHP36676 であり（図 1、16 ページ）、アグロバクテリウム（*Rhizobium radiobacter*（*Agrobacterium tumefaciens*））LBA4404 株由来のプラスミド pSB1 から作製された。

ロ　特性

①　ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド PHP36676 の塩基数は 67,197bp であり、T-DNA 領域の塩基数は 24,266bp で、その塩基配列は添付資料 1 の Appendix1（社外秘情報につき非開示）に示したとおりである。

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 PHP36676 の外側骨格領域には、選抜マーカーとして抗生物質スペクチノマイシン耐性（*spc*）遺伝子及びテトラサイクリン耐性（*tetA*）遺伝子が含まれる。これら遺伝子は、微生物中でベクターを増殖させる際、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するために必要なマーカーとして機能する。しかしながら、これら抗生物質耐性遺伝子は、T-DNA 領域の外側に位置するため、宿主には導入されない。実際に、T0 世代（図 3、18 ページ）の葉から抽出したゲノム DNA を用い、外側骨格 5 領域（LB、*spc*、*tetA*、*vir*G、RB）を対象とした PCR 法により抗生物質耐性遺伝子を含むこれらの領域が本組換えトウモロコシに導入されていないことを確認した（添付資料 1 の Appendix2：社外秘情報につき非開示）。

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

宿主に導入された T-DNA 領域に感染を可能とする配列は含まれておらず、感染性はない。

（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

本組換えトウモロコシの作出に用いたプラスミド PHP36676 における供与核酸の構成を図 1（16 ページ）に、制限酵素による切断部位を図 2（17 ページ）に示した。

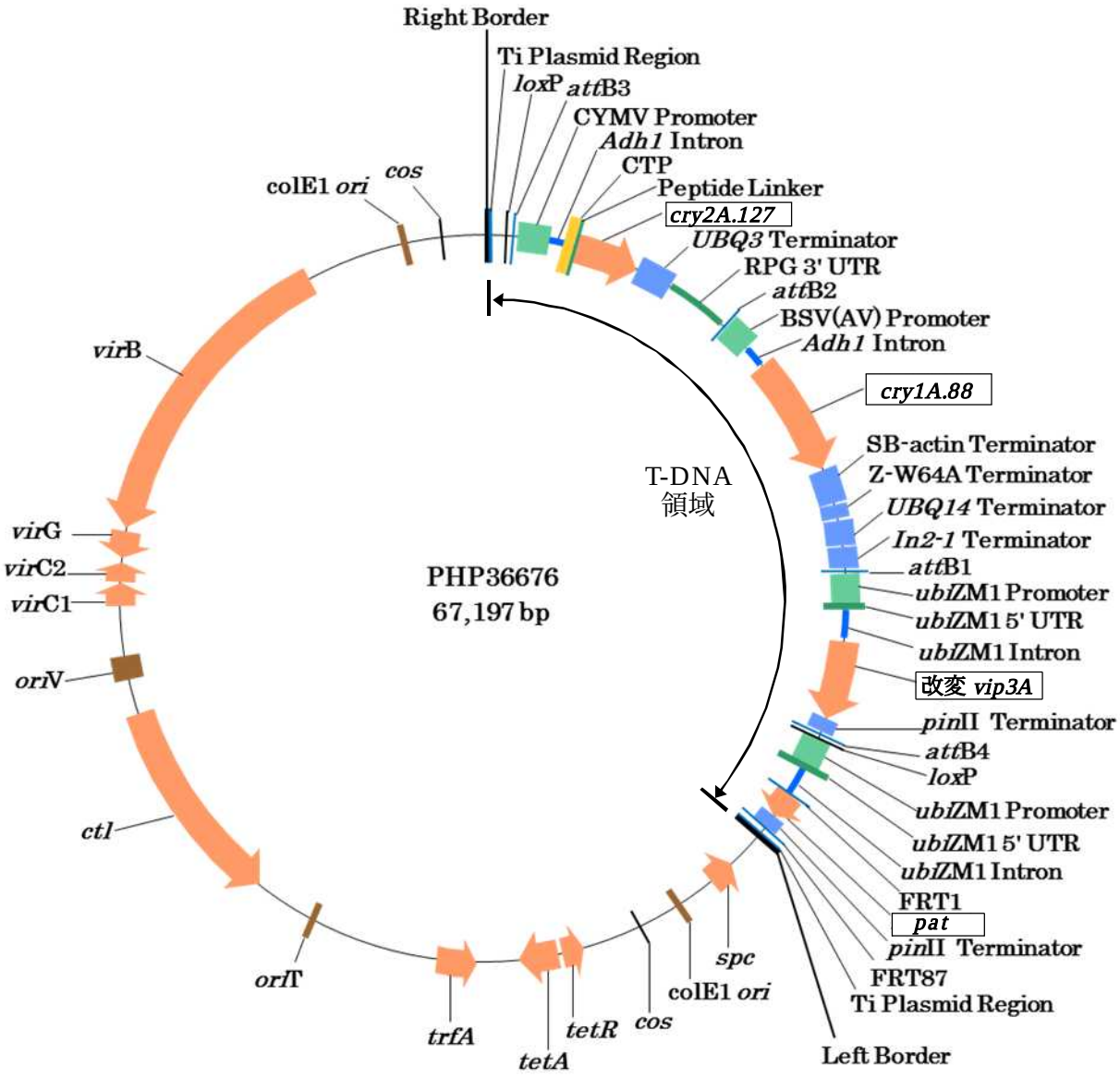

図 1　プラスミド PHP36676 における供与核酸の構成

本組換えトウモロコシに導入した遺伝子を四角囲いで示した。

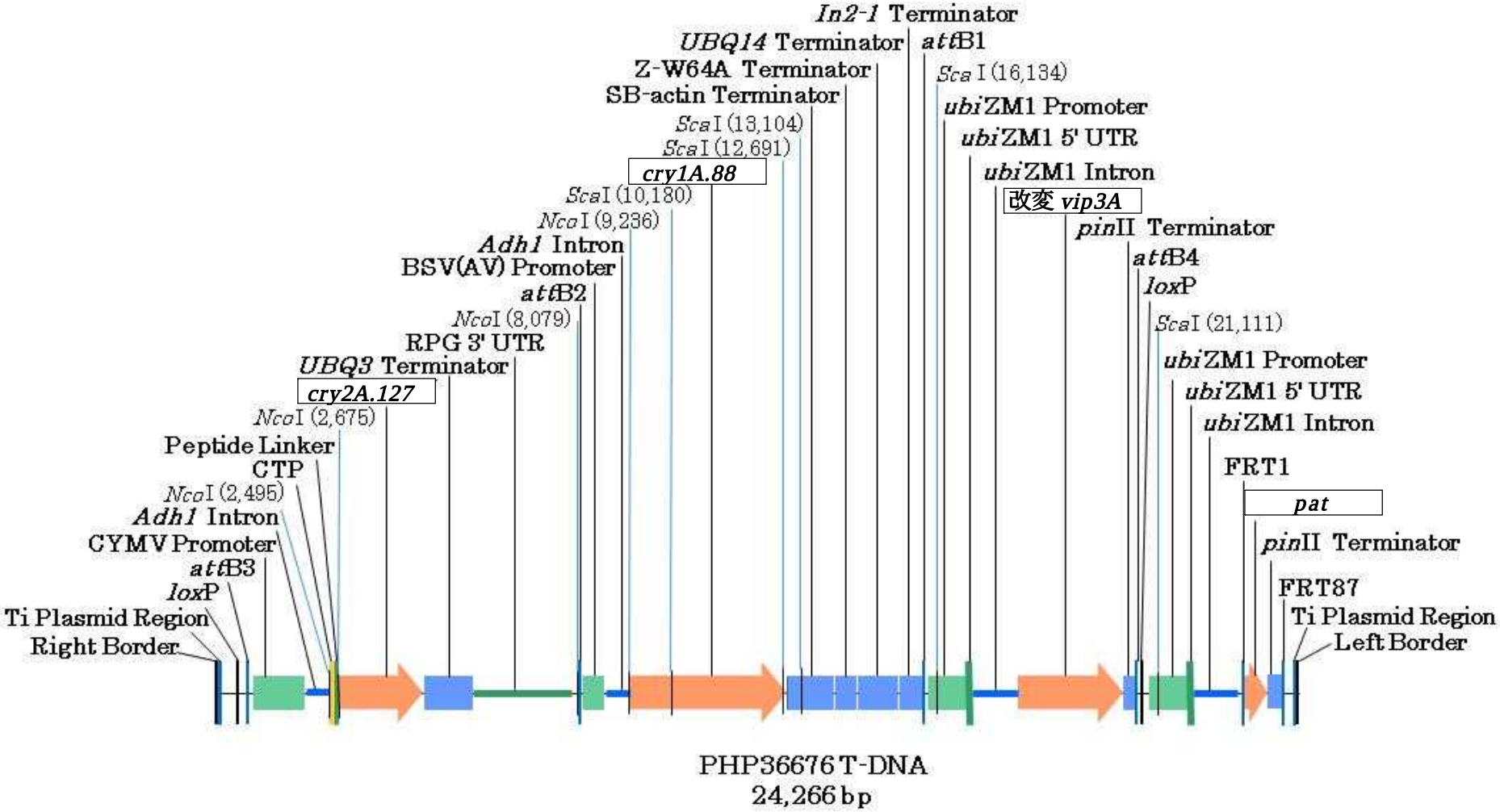

図 2　T-DNA 領域における供与核酸の構成及び制限酵素による切断部位
本組換えトウモロコシに導入した遺伝子を四角囲いで、制限酵素（*Nco*I、*Sca*I 及び *Spe*I）切断部位を括弧内に示した。

ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主内への核酸の移入には、アグロバクテリウム法を用いた。

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方法

核酸が移入された細胞は、除草剤ビアラホスを添加した培地で胚を生育させることにより選抜した。なお、PAT 蛋白質を産生する細胞の選抜には除草剤ビアラホス及びグルホシネートのいずれも利用可能であるが、除草剤ビアラホスはより効率的に目的とする細胞を選抜することができる（Dennehey *et al.,* 1994）。

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

上述①の培地にカルベニシリンを添加し、アグロバクテリウムを除去した。さらに、プラスミド PHP36676 の外側骨格領域は本組換えトウモロコシのゲノムには導入されていないことが PCR 法により確認されており（添付資料 1 の Appendix2；社外秘情報につき非開示）、アグロバクテリウムの菌体の残存はないと考えられる。

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

本組換えトウモロコシの育成経過は図 3（18 ページ）のとおりであり、本図中に、該当する系統及び本申請における承認対象の範囲を示した。承認対象の範囲は、T1 世代以降である。

（社外秘情報につき非開示）

図 3　本組換えトウモロコシの育成経過

（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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

移入した核酸は、植物染色体に取り込まれると、メンデルの法則に従い分離する。導入遺伝子の分離比を検討するため、2013 年に米国アイオワ州の温室で栽培した本組換えトウモロコシの BC1F1*1及び BC2F1*1世代（図 3、18 ページ）1～2 葉期の葉からゲノム DNA を抽出し、定性 PCR 分析を行った（添付資料 1 の Appendix3；社外秘情報につき非開示）。PCR 分析には、導入遺伝子及びその 5' 側トウモロコシゲノムの境界領域を増幅する本組換えトウモロコシ特異的プライマーペアを用いた。その結果、いずれの世代においても、遺伝子が導入されている個体（陽性個体）と遺伝子が導入されていない個体（陰性個体）の分離比は、期待される分離比 1：1 から有意に異なるものではなかった。

以上のように、導入遺伝子はメンデルの法則に矛盾することなく伝達され、移入された核酸の複製物は、トウモロコシ染色体上に存在することが確認された（表 4、19 ページ）。

表 4　PCR 分析を指標とした導入遺伝子の分離比

世代	サンプル数	分析結果*		P 値
		陽性個体	陰性個体	
BC1F1*1	75	32	43	0.204
BC2F1*1	100	51	49	0.841

統計解析：カイ二乗検定。
* 期待される分離比は 1：1。

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

S1 世代（図 3、18 ページ）におけるサザンブロット分析の結果、各遺伝子が本組換えトウモロコシ中に 1 コピー移入されていることが確認された。また、F1*2 世代（図 3、18 ページ）における上述の①と同じプライマーペアを用いた定性 PCR 分析の結果、本組換えトウモロコシ中の導入遺伝子は後代に安定して伝達されていることが確認された。なお、BC1F1*1及び BC2F1*1世代（図 3、18 ページ）における各遺伝子特異的プライマーペアを用いた PCR 分析においても、導入遺伝子が安定して伝達されていることが確認されている（添付資料 1 の Appendix4；社外秘情報につき非開示）。

③　染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

—

④　（6）の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

2013 年に米国アイオワ州の温室で栽培した本組換えトウモロコシ BC1F1*1 及び BC2F1*1 世代（図 3、18 ページ）9 葉期の葉を用いた ELISA 法による分析で、いずれの個体にも Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び PAT 蛋白質の全てが産生されていることが確認され、発現の安定性が認められた（表 5、20 ページ；添付資料 1 の Appendix5；社外秘情報につき非開示）。

表 5　各蛋白質の産生量

（ng / mg 乾物重）

世　代 1)		Cry2A.127 蛋白質 2)	Cry1A.88 蛋白質 2)	改変 Vip3A 蛋白質 3)	PAT 蛋白質 2)
BC1F1*1	平均値±標準偏差	95 ± 16	12 ± 2.6	36 ± 8.8	15 ± 2.5
	最小値 - 最大値	52 － 120	6.6－15	25 － 52	12 － 21
BC2F1*1	平均値±標準偏差	110 ± 21	12 ± 1.1	43 ± 10	17 ± 2.4
	最小値 - 最大値	78 － 150	11 －14	21 － 60	13 － 22

1)　本組換えトウモロコシ（陽性個体）n = 15。
2)　定量下限値は 0.14 ng/mg 乾物重。
3)　定量下限値は 0.54 ng/mg 乾物重。

⑤　ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝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

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

（5）遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

検出及び識別の方法：

本組換えトウモロコシの検出及び識別は、抽出した DNA を用いて PCR 分析を行う。プライマー及び分析条件は以下のとおりである（添付資料 8；社外秘情報につき非開示）。

・導入遺伝子特異的プライマーペア：*cry1A.88* 遺伝子と SB-アクチンターミネーターに特異的なプライマー。増幅産物のサイズは 270 bp。
・内在性遺伝子プライマーペア（陽性対照）：トウモロコシ内在性インベルターゼ遺伝子（Genbank accession AF171874.1）に特異的な 2 つのプライマー。増幅産物のサイズは 225 bp。

感度：

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシから抽出した DNA の混合物 50 ng を用いた PCR 分析における、混合物中の本組換えトウモロコシ由来 DNA の検出限界量は 20 pg であった（添付資料 8；社外秘情報につき非開示）。したがって、本法の感度は 0.04 %（20 pg / 50 ng）と考えられた。

信頼性：

本組換えトウモロコシ又は非組換えトウモロコシ各 5 個体を用いた PCR 分析で再現性が得られている（添付資料 8；社外秘情報につき非開示）。

なお、本組換えトウモロコシの商品化までに系統特異的な定量 PCR 法を確立する予定である。

（6）宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

本組換えトウモロコシに付与された特性は、*cry2A.127* 遺伝子、*cry1A.88* 遺伝子及び改変 *vip3A* 遺伝子によるチョウ目害虫抵抗性並びに *pat* 遺伝子による除草剤グルホシネート耐性である。

本組換えトウモロコシにチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されたことを確認するため、2011 年、米国のほ場において本組換えトウモロコシ F1*[3] 世代（図 3、18 ページ）を用い、チョウ目害虫による食害の程度を調査した。調査は、コーンイヤーワームによる穂の食害（テネシー州）、ヨーロッパアワノメイガによる茎の食害（イリノイ州）及びフォールアーミーワームによる葉の食害（アイオワ州）について実施した。

また、本組換えトウモロコシに除草剤グルホシネートに対する耐性の形質が付与されたことを確認するため、2012 年に米国アイオワ州の温室で栽培した本組換えトウモロコシ BC2F1*[1] 世代（図 3、18 ページ）について、播種 13 日後に除草

剤グルホシネート 0.45kg a.i.[4]/ha（通常量）を散布し、散布 7 日後に耐性の有無を目視により調査した。

その結果、本組換えトウモロコシは上記のチョウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グルホシネートに対する耐性を有することが確認された（表 6、22 ページ；添付資料 1 の Appendix6；社外秘情報につき非開示）。

表 6　本組換えトウモロコシに付与された特性の調査結果

調査項目		本組換えトウモロコシ	非組換えトウモロコシ
コーンイヤーワームによる穂の食害程度（cm^2）[1]	平均値±標準偏差	2.1 ± 3.2	24.4 ± 16.1
	最小値－最大値	0 － 13	0.8 － 73
	P 値	<0.001 [5]	
ヨーロッパアワノメイガによる茎の食害程度（cm）[2]	平均値±標準偏差	0.8 ± 1.6	29.6 ± 14.4
	最小値－最大値	0 － 5	8 － 55
	P 値	<0.001 [5]	
フォールアーミーワームに対する抵抗性 [3]	平均値±標準偏差	9 ± 0	5 ± 1.4
	最小値－最大値	9 － 9	3 － 9
	P 値	<0.001 [5]	
グルホシネート耐性 [4]	耐性個体数/供試個体数	49 / 49	0 / 109
	P 値	<0.001 [6]	

1) 本組換えトウモロコシ（陽性個体）n= 15、非組換えトウモロコシ n= 30。コーンイヤーワームにより食害された穂の面積を計測し、合計した（単位：cm^2）。
2) 本組換えトウモロコシ（陽性個体）n= 10、非組換えトウモロコシ n= 20。ヨーロッパアワノメイガにより食害された茎の長さを計測し、合計した（単位：cm）。
3) 本組換えトウモロコシ（陽性個体）n= 15、非組換えトウモロコシ n= 30。フォールアーミーワームによる葉の食害を、Davis ら（1992）に記載された 9 段階指標を基にパイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社が作成した判定基準（1：ほとんどの葉に食害あり～9：食害なし又は針穴程度の食害、添付資料 1 の Appendix6　Table1 参照；社外秘情報につき非公開）で調査した。
4) 本組換えトウモロコシ（陽性個体）n= 49、非組換えトウモロコシ n= 109。
5) 統計解析：t 検定。統計学的有意差あり（P 値<0.05）。
6) 統計解析：フィッシャーの直接確率検定。統計学的有意差あり（P 値<0.05）。

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

本組換えトウモロコシの宿主は非組換えトウモロコシ系統 PHWWE であり、導入遺伝子は *cry2A.127* 遺伝子、*cry1A.88* 遺伝子、改変 *vip3A* 遺伝子及び *pat*

[4] active ingredient （活性主成分）

遺伝子である。本組換えトウモロコシには、Bt 蛋白質である Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質が産生されることにより、コーンイヤーワーム等のチョウ目害虫に対する抵抗性が付与され、PAT 蛋白質が産生されることにより、除草剤グルホシネート耐性が付与されている。

Bt 蛋白質の機能について数多くの研究がなされているが（OECD, 2007）、Bt 蛋白質が酵素活性を有することを示す報告はない。一方、PAT 蛋白質は酵素活性を有し、L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化するが、高い基質特異性を有し、他のアミノ酸や D-グルホシネートは基質としない（第一.2.（1）.ロ.③、14 ページ）。

以上のことから、本組換えトウモロコシ中に産生されるこれら Bt 蛋白質及び PAT 蛋白質が、宿主の代謝経路を変化させることは考え難く、このため宿主の形態及び生育の特性等に影響を与える可能性は低いと考えられる。また、これら Bt 蛋白質及び PAT 蛋白質はそれぞれ機能が異なるため、相互に影響する可能性も考え難い。したがって、意図したチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性の特性を除き、本組換えトウモロコシは従来のトウモロコシの種としての範囲を超えるものではないと考えられる。

このため、隔離ほ場試験を行うに当たっては、本組換えトウモロコシの生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いなくても、生物多様性影響評価を行うことが可能であると考えられる。

本組換えトウモロコシの隔離ほ場試験では、以下の生理学的又は生態学的特性に関する項目を調査する予定である。我が国には、宿主であるトウモロコシと交雑可能な野生種及び雑草性のある交雑可能な植物種は存在しないため、交雑性に関する調査は実施しない。

・形態及び生育の特性
・生育初期における低温耐性
・成体の越冬性
・花粉の稔性及びサイズ
・種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
・有害物質の産生性

なお、隔離ほ場における栽培では、除雄又は雄穂の袋がけを行うことにより花粉をほ場外に飛散させない措置をとり、播種時及び成熟期から収穫期には防鳥網を設置し、栽培終了後には鋤込みを行う。

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

隔離ほ場における栽培、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

所 在 地：栃木県宇都宮市清原工業団地 19 番地 2
名　　称：デュポン株式会社　宇都宮事業所　隔離ほ場
使用期間：承認日から平成 29 年 3 月 31 日まで

隔離ほ場の施設

① 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
② 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
③ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
④ 本組換えトウモロコシの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、播種時及び成熟期から収穫期には防鳥網を設置する。

隔離ほ場での作業要領

① 本組換えトウモロコシ及び比較対照の非組換えトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
② 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。
③ ②により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照の非組換えトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
④ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
⑤ 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。
⑥ 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理

を行う。

⑦　①から⑥までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

⑧　生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

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

―

（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

米国では 2009 年から 2013 年の間に 345 箇所、カナダでは 2012 年から 2013 年に 2 箇所、チリでは 2010 年から 2012 年の間に 31 箇所及び南アフリカ共和国では 2012 年に 3 箇所のほ場において栽培を行ったが、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に、生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。ほ場試験実施に当たっては、米国農務省（USDA）、カナダ食品検査庁（CFIA）、チリ農業牧畜局（SAG）及び南アフリカ共和国農務省（DAFF）にそれぞれ通知を行った。

なお、我が国においては、隔離ほ場試験終了後に「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」における第一種使用等の申請を行う予定である。その他、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う予定である。

第二　項目ごとの生物多様性影響の評価

第一.2.（6）.②（22 ページ）に記載したとおり、宿主及び導入遺伝子由来蛋白質の特性を考慮し、隔離ほ場試験を行うに当たっては、本組換えトウモロコシの生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いなくても、生物多様性影響評価を行うことが可能であると考えた。

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

我が国においてトウモロコシが自生することは報告されていない。

本組換えトウモロコシに付与された特性は、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性である。これまでにもチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性を有するトウモロコシは生物多様性影響評価を経ており、Bt 蛋白質及び PAT 蛋白質が宿主の代謝経路を変化させるとの報告はない。また、これら Bt 蛋白質及び PAT 蛋白質はそれぞれ機能が異なるため、相互に影響する可能性も考え難い。このことより、本組換えトウモロコシ中に産生される Bt 蛋白質（Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）及び PAT 蛋白質が生理学的又は生態学的特性（形態及び生育の特性、生育初期における低温又は高温耐性、成体の越冬性又は越夏性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、並びに休眠性及び発芽率）に影響を及ぼすことはないと考えられる。したがって、本組換えトウモロコシの上記生理学的及び生態学的特性は、従来のトウモロコシの種としての範囲を超えるものではないと考えられる。

本組換えトウモロコシにはチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているが、チョウ目昆虫による食害はトウモロコシが我が国の自然環境下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、本特性の付与が本組換えトウモロコシを自然環境で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考え難い。また、除草剤グルホシネートに対する耐性も付与されているが、自然環境下では本除草剤が散布されることは想定され難い。したがって、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性の特性を有することにより、本組換えトウモロコシの競合における優位性が高まるとは考えられない。

以上のことから、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因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。

（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、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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

トウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

本組換えトウモロコシ中には、Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質及び PAT 蛋白質が産生される。これら蛋白質と既知アレルゲンとの間でアミノ酸配列の相同性は認められていない（第一.2.（1）.ロ.②、12 ページ）。

PAT 蛋白質が野生動植物に対して有害性を示すとの報告はない（OECD, 1999; ILSI, 2011）。また、除草剤グルホシネート散布時、本組換えトウモロコシ中の PAT 蛋白質により *N*-アセチルグルホシネートが産生されるが、*N*-アセチルグルホシネートの動物に対する毒性はグルホシネートより低いことが確認されている（食品安全委員会, 2012）。さらに、*N*-アセチルグルホシネートは農薬取締法の下、グルホシネートの分析対象化合物の一つとして含まれており、トウモロコシにおけるグルホシネートとしての残留基準値が定められ、既に安全性は評価されている（日本食品化学研究振興財団, 2013）。

本組換えトウモロコシ中に産生される Bt 蛋白質により影響を受ける可能性の

ある野生動植物等として、チョウ目昆虫が特定された。チョウ目昆虫のうち、環境省第 4 次レッドリスト（2012）に絶滅危惧種及び準絶滅危惧種として掲載されているものは 196 種である。このうち、本組換えトウモロコシの花粉を幼虫期に摂取して影響を受ける可能性がある種を特定するため、山本ほか（2003）の評価手法を参考に、農耕地帯周辺で幼虫期に植物を摂取し、かつ幼虫の活動期がトウモロコシの開花期（5 月下旬から 10 月下旬）と重複する可能性がある種を検討した。その結果、これらの条件を満たすチョウ目昆虫として、30 種が特定された。残りの 166 種中 69 種については生息域又は幼虫の活動期に関する情報が不足していた。したがって、これらを合わせ、影響を受ける可能性のあるチョウ目昆虫として 99 種が特定された（添付資料 9）。

（2）影響の具体的内容の評価

Cry2A.127 蛋白質の標的害虫であるコーンイヤーワーム及びヨーロッパアワノメイガに対する LC_{50} 値は、それぞれ 3.5ng/mg 及び 0.37ng/mg である。Cry1A.88 蛋白質の標的害虫であるコーンイヤーワーム及びヨーロッパアワノメイガに対する LC_{50} 値は、それぞれ 9.7ng/mg 及び 0.45ng/mg である。改変 Vip3A 蛋白質の標的害虫であるコーンイヤーワームに対する LC_{50} 値は、11ng/mg である。本蛋白質はヨーロッパアワノメイガに対しては殺虫活性を示さない（第一.2.（1）.ロ.②、12 ページ）。

（3）影響の生じやすさの評価

（1）で特定されたチョウ目昆虫 99 種が、本組換えトウモロコシの花粉を幼虫期に摂取して影響を受ける可能性について評価した。

本隔離ほ場は清原工業団地（南北 3.1km、東西 1.6km）の中央に位置しており、絶滅危惧種及び準絶滅危惧種のチョウ目昆虫種が本工業団地近辺に局所的に生息するとの報告はない。

該当チョウ目の幼虫が飛散した本組換えトウモロコシの花粉に暴露される条件として、トウモロコシ栽培ほ場周辺に分布している当該幼虫の食草に付着した花粉を当該幼虫が摂食した場合が想定される。トウモロコシ栽培ほ場周辺に堆積する花粉量は、ほ場から 10m 離れると低い値となることが報告されている（$\leq$10 粒/cm^2；Hansen-Jesse and Obrycki, 2000； Shirai and Takahashi, 2005）。さらに、本隔離ほ場における栽培では、除雄又は雄穂の袋がけを行うことにより花粉をほ場外に飛散させない措置をとるため、本組換えトウモロコシの花粉がほ場周辺に生息する可能性のあるチョウ目昆虫種に接触する可能性は低いと考えられた。

したがって、上述のチョウ目昆虫 99 種が、本組換えトウモロコシの花粉を幼虫期に摂取し個体群レベルで影響を受けることは考え難い。

なお、播種時及び成熟期から収穫期には防鳥網を設置し、栽培後には鋤込みを行うため、植物体及び種子がほ場外に漏出することも考え難い。

（4）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

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

宿主であるトウモロコシが、我が国において野生化した事例はなく、また交雑可能な近縁野生種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の自生も報告されていない。このため、本組換えトウモロコシの交雑性に起因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。

（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、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

4　その他の性質

—

5

第三　生物多様性影響の総合的評価

第一.2.（6）.②（22 ページ）に記載したとおり、宿主及び導入遺伝子由来蛋白質の特性を考慮し、隔離ほ場試験を行うに当たっては、本組換えトウモロコシの生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いなくても、生物多様性影響評価を行うことが可能であると考えた。

トウモロコシは、我が国において長年にわたり使用されてきたが、これまでに我が国において野生化し、野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼしたという報告はない。

本組換えトウモロコシ中に産生される Bt 蛋白質（Cry2A.127 蛋白質、Cry1A.88 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）及び PAT 蛋白質が、宿主の代謝経路を変化させる可能性は低く、また、これら Bt 蛋白質及び PAT 蛋白質はそれぞれ機能が異なるため、相互に影響する可能性も考え難い。このことより、害虫抵抗性及び除草剤耐性の特性が形態及び生育の特性、生育初期における低温又は高温耐性、成体の越冬性又は越夏性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、並びに休眠性及び発芽率の生理学的又は生態学的特性に影響を及ぼすことはないと考えられる。

本組換えトウモロコシには、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているが、この特性の付与が本組換えトウモロコシを自然環境中で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考え難い。また、除草剤グルホシネートに対する耐性も付与されているが、自然環境下でこれら除草剤が散布されることは想定され難い。

したがって、これらの特性が付与されていても、本組換えトウモロコシ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。

従来、トウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

本組換えトウモロコシ中に産生されるこれら Bt 蛋白質は、コーンイヤーワーム等のチョウ目害虫に対して殺虫活性を示す。一方、PAT 蛋白質は、野生動植物に対する有害性は報告されていない。チョウ目昆虫のうち、本組換えトウモロコシの花粉を幼虫期に摂取することにより影響を受ける可能性のある野生動植物等を検討したところ、我が国に生息する絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫 99 種が特定された。しかしながら、本隔離ほ場は清原工業団地（南北 3.1km、東西 1.6km）の中央に位置しており、絶滅危惧種及び準絶滅危惧種のチョウ目昆虫種が本工業団地近辺に局所的に生息するとの報告はない。また、トウモロコシのほ場周辺に堆積する花粉量は、ほ場から 10m 離れると低くなる（≦10

粒/cm²)。さらに、本隔離ほ場における栽培では、除雄又は雄穂の袋がけを行うことにより、花粉をほ場外に飛散させない措置をとるため、本組換えトウモロコシの花粉がほ場周辺に生息する可能性のあるチョウ目昆虫種に接触する可能性は低いと考えられた。したがって、上述のチョウ目昆虫 99 種が、本組換えトウモロコシの花粉を幼虫期に摂取し、個体群レベルで影響を受けることは低いと考えられた。

なお、播種時及び成熟期から収穫期には防鳥網を設置し、栽培後には鋤込みを行うため、植物体及び種子がほ場外に漏出する可能性も考え難い。

これらのことから、本組換えトウモロコシは有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

我が国において、トウモロコシと交雑可能な野生植物はなく、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、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された。

以上のことから、本組換えトウモロコシは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、我が国における生物多様性影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. (1989). Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. The Plant Cell 1: 115-122.

Anilkumar, K.J., Rodrigo-Simon, A., Ferre, J., Pusztai-Carey, M., Sivasupramaniam, S. and Moar, W.J. (2008). Production and characterization of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac-resistant cotton bollworm *Helicoverpa zea* (Boddie). Applied and Environmental Microbiology. 74(2): 462-469.

Callis, J., Carpenter, T., Sun, C-W. and Vierstra, R.D. (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. Genetics. 139(2): 921-939.

CFIA. (2013). The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency.
(http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818367)
Accessed on February 20th, 2013.

Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2004). Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones. Genome Research. 14: 2111-2120.

Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Molecular Biology. 18: 675-689.

Crameri, A., Raillard, S-A., Bermudez, E. and Stemmer, W.P.C. (1998). DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Nature. 391: 288-291.

Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. Gene. 91: 79-85.

Das, O.P., Ward, K., Ray, S. and Messing, J. (1991). Sequence variation between alleles reveals two types of copy correction at the 27-kDa zein locus of maize. Genomics. 11: 849-856.

Davis, F.M., Ng, S.S. and Williams, W.P. (1992). Visual rating scales for screening whorl-stage corn for resistance to fall armyworm. Mississippi. Agricultural And Forestry Experiment Station. Technical Bulletin 186.

Dennehey, B. K., Petersen, W. L., Ford-Santino, C., Pajeau, M. and Armstrong, C. L. (1994). Comparison of selective agents for use with the selectable marker gene bar in maize transformation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 36: 1-7.

Dennis, E.S., Gerlach, W.L., Pryor, A.J., Bennetzen, J.L., Inglis, A., Llewellyn, D., Sachs, M.M., Ferl, R.J. and Peacock, W.J. (1984). Molecular analysis of the alcohol dehydrogenase (adh1) gene of maize. Nucleic Acids Research. 12(9): 3983-4000.

Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. and Koziel, M.G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. Proceedings of the National Academy of Sciences. 93(11): 5389-5394.

FAO. (2013). FAOSTAT. (http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor) Accessed on April 22nd, 2013.

Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3" (9)-*O*-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research. 13: 7095-7106.

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

Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Research. 10: 1788-1795.

Hershey, H.P. and Stoner, T.D. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for RNA species induced by substituted benzenesulfonamides in corn. Plant Molecular Biology. 17: 679-690.

Huang, Q. and Hartung, J.S. (2001). Cloning and sequence analysis of an infectious clone of *Citrus yellow mosaic virus* that can infect sweet orange via *Agrobacterium*-mediated inoculation. Journal of General Virology. 82: 2549-2558.

ILSI. (2011). A review of the environmental safety of the PAT protein: Center for environmental risk assessment. ILSI Research Foundation. (http://cera-gmc.org/docs/cera_publications/pub_05_2011.pdf) Accessed on July 1st, 2013.

Iowa State University. (2010). In-field drydown rates and harvest. (http://www.extension.iastate.edu/CropNews/2010/0928elmoreabendroth.htm) Accessed on March 11th, 2013.

Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). Nucleic Acids Research. 14(14): 5641-5650.

Kermicle, J. (1997). "Cross compatibility within the genus *Zea*". Proceedings of a forum: Gene flow among maize landraces, improved maize varieties, and teosinte: implications for transgenic maize. Serratos, J.A., Willcox, M.C. and Castillo-González, F. (eds). CIMMYT. Mexico, D.F. pp.40-43.

Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. and Chen J-S. (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ-endotoxin. Applied and Environmental Microbiology. 69(8): 4648-4657.

Lheureux, F., Laboureau, N., Muller, E., Lockhart, B.E. and Iskra-Caruana, M.L. (2007). Molecular characterization of banana streak acuminata Vietnam virus isolated from *Musa acuminata siamea* (banana cultivar). Archives of Virology. 152(7): 1409-1416.

OECD. (1999). Series on harmonization 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.zhb.gov.cn/download/5198.pdf)
Accessed on July 1st, 2013.

OECD. (2002). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 25: Module II: Phosphinothricin. ENV/JM/MONO(2002)14.
(http://www.oecd.org/dataoecd/17/39/46815748.pdf)
Accessed on July 1st, 2013.

OECD. (2003). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No. 27: Consensus document of the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize).
ENV/JM/MONO(2003)11.
(http://www.oecd.org/dataoecd/17/40/46815758.pdf)
Accessed on July 1st, 2013.

OECD. (2007). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No.42: Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Proteins. ENV/JM/MONO(2007)14.
(http://www.oecd.org/dataoecd/36/61/46815888.pdf)
Accessed on July 1st, 2013.

Pleasants, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E., Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, P. and Jones, G.D. (2001). Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. Proceedings of the National Academy of Sciences. 98(21): 11919-11924.

Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP protein of yeast in vitro. Nucleic Acids Research. 14(2): 4787-4802.

Raybould. A. and Vlachos. D. (2011). Non-target organism effects tests on Vip3A and their application to the ecological risk assessment for cultivation of MIR162 maize. Transgenic Research. 20: 599-611.

Salanoubat, M., Lemcke, K., Rieger, M., Ansorge, W., Unseld, M., Fartmann, B., Valle, G., Blöcker, H., Perez-Alonso, M., Obermaier, B., Delseny, M., Boutry, M., Grivell, L.A., Mache, R., Puigdomènech, P., De Simone, V., Choisne, N., Artiguenave, F., Robert, C., Brottier, P., Wincker, P., Cattolico, L., Weissenbach, J., Saurin, W., Quétier, F., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Benes, V., Wurmbach, E., Drzonek, H., Erfle, H., Jordan, N., Bangert, S., Wiedelmann, R., Kranz, H., Voss, H., Holland, R., Brandt, P., Nyakatura, G., Vezzi, A., D'Angelo, M., Pallavicini, A., Toppo, S., Simionati, B., Conrad, A., Hornischer, K., Kauer, G., Löhnert, T.-H., Nordsiek, G., Reichelt, J., Scharfe, M., Schön, O., Bargues, M., Terol, J., Climent, J., Navarro, P., Collado, C., Perez-Perez, A., Ottenwälder, B., Duchemin, D., Cooke, R., Laudie, M., Berger-Llauro, C., Purnelle, B., Masuy, D., de Haan, M., Maarse, A.C., Alcaraz, J.-P., Cottet, A., Casacuberta, E., Monfort, A., Argiriou, A., Flores, M., Liguori, R., Vitale, D., Mannhaupt, G., Haase, D., Schoof, H., Rudd, S., Zaccaria, P., Mewes, H.W., Mayer, K.F.X., Kaul, S., Town, C.D., Koo, H.L., Tallon, L.J., Jenkins, J., Rooney, T., Rizzo, M., Walts, A., Utterback, T., Fujii, C.Y., Shea, T.P., Creasy, T.H., Haas, B., Maiti, R., Wu, D., Peterson, J., Van Aken, S., Pai, G., Militscher, J., Sellers, P., Gill, J.E., Feldblyum, T.V., Preuss, D., Lin, X., Nierman, W.C., Salzberg, S.L., White, O., Venter, J.C., Fraser, C.M., Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Kato, T., Asamizu, E., Sasamoto, S., Kimura, T., Idesawa, K., Kawashima, K., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Muraki, A., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shinpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. and Tabata, S. (2000). Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. Nature. 408: 820-822.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62 (3): 775-806.

Shirai, Y. and Takahashi, M. (2005). Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. Applied Entomology and Zoology. 40(1): 151-159.

Stemmer, W.P.C. (1994). DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences. 91: 10747-10751.

Tao, Y., Bidney, D., Gordon-Kamm, W. and Lyznik, L. (2007). Modified FRT recombination sites and methods of use. World Intellectual Property Organization. Application No.PCT/US2006/027380.

Tomizawa, J-I., Ohmori, H. and Bird, R.E. (1977). Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 74: 1865-1869.

US EPA. (1996). Microbial Pesticide Test Guideline. OPPTS 885.4340. Nontarget Insect Testing, Tier 1. February 1996.
(http://www.epa.gov/ocspp/pubs/frs/publications/Test_Guidelines/series885.htm)
Accessed on November. 22, 2013.

Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Puhler, A. (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene. 70(1): 25-37.

菊池一徳. (1987). トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳. pp.16-17, p.55, p.59, pp. 66-68.

財務省. (2013). 財務省貿易統計.
(http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm)
Accessed on April. 17th, 2013.

食品安全委員会. (2012). 農薬評価書 グルホシネート.
(http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20111118277).
Accessed on March 26th, 2013.

千藤茂行. (2001). “トウモロコシ・トウモロコシの品種生態　IV 採種　3.採種栽培の実際”. 転作全書第三巻 雑穀. 農文協編. 農山漁村文化協会. 東京. pp.98-99.

戸澤英男. (2005). トウモロコシ－歴史・文化、特性・栽培、加工・利用－. 農山漁村文化協会. pp.58-59, p.88.

中村茂文. (2001). “トウモロコシ・生育のステージと生理、生態　I 種子と発芽　2. 発芽”. 転作全書第三巻. 雑穀. 農文協編. 農山漁村文化協会. 東京. pp.42-43.

日本食品化学研究振興財団. (2013). 農薬等の基準値 品目名：グルホシネート. (http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/zaidan/agrdtl.php?a_inq=18900) Accessed on April 17th, 2013.

農林水産省. (2013). 平成 24 年産飼肥料作物の作付（栽培）面積. (http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001108528) Accessed on September 17th, 2013.

山本勝利、大黒俊哉、松村雄. (2003). わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価. 独立行政法人農業環境技術研究所（編）農業環境研究叢書　第 14 号. 独立行政法人農業環境技術研究所. pp.62-81.

緊急措置計画書

平成 25 年 10 月 9 日

氏名　デュポン株式会社
代表取締役社長　田中　能之
住所　東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（*cry2A.127, cry1A.88,* 改変 *vip3A, pat, Zea mays* subsp. *mays* （L.） Iltis）（33121, OECD UI:DP-Ø33121-3）（以下「本組換えトウモロコシ」という。）について、今後、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合、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

第一種使用等を行う栽培試験責任者は、弊社内に設置されている生物多様性影響管理委員会に報告を行う。また、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、副社長を副本部長とし、各部門の部門長等から構成される。危機対策本部が、生物多様性影響管理委員会、栽培試験責任者及び本組換えトウモロコシの開発者である米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。

（個人名・所属は個人情報につき非開示）

2　第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等を行っている栽培試験者が、第一種使用等の状況に関して情報収集を行う。

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

本組換えトウモロコシ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に認められた場合、栽培試験者に伝える。

また、必要に応じて、弊社のホームページ等、国内の適切な媒体を通して一般に広く知らせる。

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

本組換えトウモロコシ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に認められた場合、直ちに栽培試験を中止し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場内において鋤込む等、不活化又は拡散防止のための必要な措置を取る。

5　農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換えトウモロコシ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に認められた場合、速やかに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

デュポン株式会社 宇都宮事業所 隔離ほ場 受容環境

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

デュポン株式会社　宇都宮事業所　隔離ほ場

2. 住所

栃木県宇都宮市清原工業団地 19 番地 2

3. 連絡先電話番号

03-5521-2485（デュポン株式会社　バイオテクノロジー事業部）
028-667-5211（デュポン株式会社　宇都宮事業所）

4. 地図

別紙 1 参照

II. 責任者等

（個人名・所属は個人情報につき非開示）

III. 試験期間

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 33121 系統（OECD UI: DP-Ø33121-3、以下「本組換えトウモロコシ」という。）の承認日から平成 29 年 3 月 31 日まで

IV. 施設概要

部外者の立入りを禁止するためのフェンス、立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識、機械、器具又は靴等に付着した遺伝子組換え農作物を洗浄するための洗い場並びに大雨による農作物の流出を防ぐための側溝を設置している。

V.　面積

1. 隔離ほ場全体の面積

1904.5m^2

2. 試験に使用する面積

244.5m^2

3. 試験区の配置図

図 4 及び図 5（44 及び 45 ページ）参照

VI.　隔離ほ場の周辺環境

1.　隔離ほ場周辺の地形

隔離ほ場の標高は約 120m である。ほ場の北東及び北西約 1km にそれぞれ刈沼川及び四ヶ字用水が、また北西約 2km に鬼怒川があり、これらの標高は約 100m である（別紙 1）。

2.　土地利用状況

隔離ほ場は、清原工業団地の中央に位置する。清原工業団地は、南北約 3.1 km、東西約 1.6km、総面積約 3.9km^2 である。

3.　周辺の環境保護区

環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等）のうち、隔離ほ場から最も近いのは、約 35 km 離れた日光国立公園である。

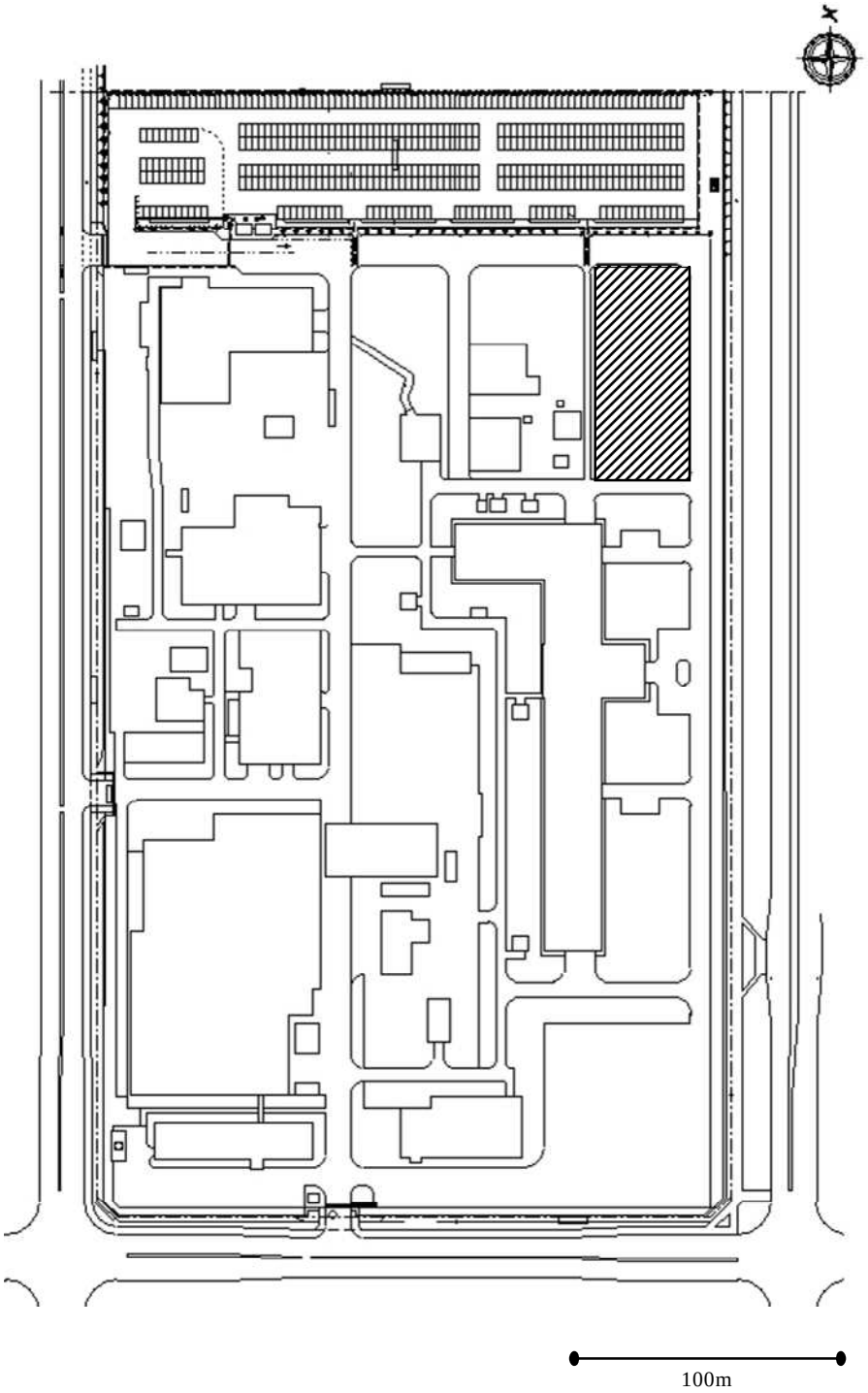

図 4　デュポン株式会社宇都宮事業所における隔離ほ場の位置
隔離ほ場の位置を斜線で示した。

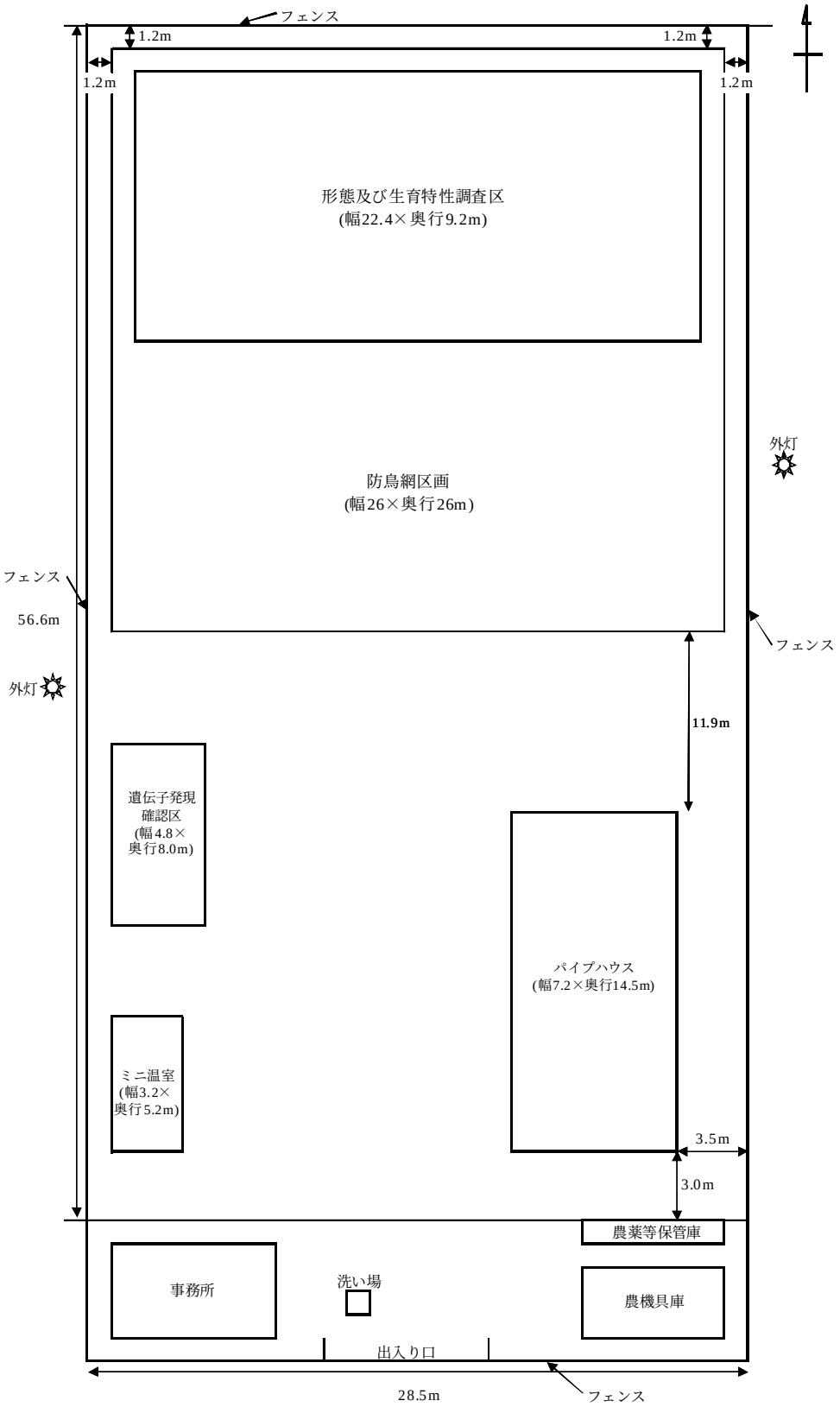

図 5　隔離ほ場施設及び栽培試験区の配置図

4. 気象条件

① 平年値

隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である宇都宮地方気象台（栃木県宇都宮市明保野町 1-4）における気象データの平年値を別紙 2 に示した。

気象庁ホームページ気象統計情報ページ
アクセス 2013 年 3 月 12 日：
http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_sfc_ym.php?prec_no=41&block_no=47615&year=2013&month=&day=&view=p1

② 過去 3 年分の気象データ

宇都宮地方気象台における過去 3 年分（2010 年～2012 年）の気象データを別紙 3 に示した。

気象庁ホームページ気象統計情報ページ
アクセス 2013 年 3 月 12 日（下記 URL は 2010 年の気象データ）：
http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_s1.php?prec_no=41&block_no=47615&year=2010&month=&day=&view=p1

5. 台風の襲来歴

① 平年値

気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信地方への台風接近数[5)]の平年値は、3.1 個である（表 7、47 ページ）。

気象庁ホームページ気象統計情報ページ
アクセス 2013 年 3 月 13 日：
http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html

表 7　関東甲信地方（伊豆諸島及び小笠原諸島を除く）への台風接近数の平年値

	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年間
接近数					0.0	0.2	0.4	0.9	1.1	0.6	0.0		3.1

平年値は、1981 年から 2010 年の 30 年平均である。

空白の月は、平年値を求める統計期間内に該当する台風が一例もなかったことを示す。

接近は 2 か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しない。

② 過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風接近数

気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信地方に、2003 年～2012 年の間に接近した台風は、計 29 個である。

気象庁ホームページ気象統計情報ページ
アクセス 2013 年 3 月 13 日：
http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

2007 年に隔離ほ場を建設して以来、冠水したことはない。

---

5) 台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方（伊豆諸島及び小笠原諸島を除く）に接近した台風」としている（気象庁による定義）。

7. 過去 10 年における強風の経験とその程度

2007 年に隔離ほ場を建設して以来、強風による設備の被害はなく、植物体がほ場外に飛ばされたこともない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け

隔離ほ場は、宇都宮市発行ハザードマップにおいて浸水想定区域や土砂災害警戒区域に指定されていない。

宇都宮市役所ホームページ、ハザードマップ（洪水・土砂災害）
アクセス 2013 年 3 月 13 日：
http://www.city.utsunomiya.tochigi.jp/25550/bosai/018220.html

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

隔離ほ場周辺にカラス、スズメ、ネズミ及びウサギが見られるが、防鳥網や侵入防止柵の設置及び殺鼠剤や忌避剤を用い、これら鳥獣による被害回避を行っている。

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

① 影響を受ける可能性のある野生動植物等

チョウ目の昆虫。

② ①の中に希少種が含まれる場合はその名称

チョウ目昆虫のうち、環境省第 4 次レッドリスト（2012）[6]に絶滅危惧種及び準絶滅危惧種として掲載されているものは 196 種である。このうち、本組換えトウモロコシの花粉を幼虫期に摂取して影響を受ける可能性があるチョウ目昆虫として 30 種が特定された。残りの 166 種中 69 種については生息域又は幼虫の活動期に関する情報が不足していた。したがって、これらを合わせ、影響を受ける可能性のあるチョウ目昆虫として 99 種が特定された（添付資料 9）。

2. 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

なし。

[6] 環境省第 4 次レッドリスト http://www.biodic.go.jp/rdb/rl2012/RL2012siryo7_1.pdf

VIII.　栽培管理等

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は以下のとおりである（2013 年 6 月現在）。

栽培年月		作　物
2007 年	3 月　－　5 月	コムギ
	5 月　－　9 月	トウモロコシ
	5 月　－　12 月	ダイズ ＊
	6 月　－　8 月	ヒマワリ
	6 月　－　12 月	ワタ
	9 月　－　12 月	ハツカダイコン
	12 月	コマツナ
2008 年	1 月　－　3 月	コマツナ
	1 月　－　3 月	ダイズ ＊
	3 月　－　12 月	セイヨウナタネ
	5 月　－　11 月	トウモロコシ
	6 月　－　11 月	ダイズ
	11 月　－　12 月	エンバク
2009 年	1 月　－　4 月	エンバク
	5 月　－　8 月	ダイズ
	5 月　－　9 月	テオシント、トウモロコシ ＊、ナルテル
	7 月　－　8 月	セイヨウナタネ
	11 月　－　12 月	コムギ
2010 年	1 月　－　4 月	コムギ
	6 月　－　9 月	アルファルファ
	7 月　－　11 月	テオシント、トウモロコシ、ナルテル
2011 年	4 月　－　12月	テオシント、トウモロコシ ＊、ナルテル
	4 月　－　12月	セイヨウナタネ ＊
	8 月　－　12月	ハツカダイコン
	9 月　－　10月	ヒマワリ
	11 月　－　12月	オオムギ
2012 年	1 月　－　3 月	オオムギ
	5 月　－　11 月	トウモロコシ ＊
	5 月　－　9 月	ダイズ*
	5 月　－　11 月	ツルマメ
	9 月　－　10月	ハツカダイコン
	12月	オオムギ
2013 年	1 月　－　4 月	オオムギ
	6 月　－	クロタラリア
	6 月　－	ツルマメ

＊ 遺伝子組換え作物を含む。

2. 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、必要に応じ回収等の拡散防止措置を行う。

3. 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

本組換えトウモロコシの栽培終了後、休閑緑肥としてアルファルファ、麦等を栽培する予定である。今後とも隔離ほ場では、遺伝子組換えトウモロコシ又はダイズ等を栽培する計画である。なお、ボランティア植物の発生を確認した場合、直ちに隔離ほ場内に鋤込む等の適切な手段で不活化する。

4. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

① 隔離ほ場の施設

(1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えトウモロコシの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

(4) 本組換えトウモロコシの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、播種時及び成熟期から収穫期には防鳥網を設置する。

② 隔離ほ場での作業要領

(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対照の非組換えトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

(2) 本組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。

(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照の非組換えトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

(5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂の袋がけを行う。

(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

(7) (1)から(6)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

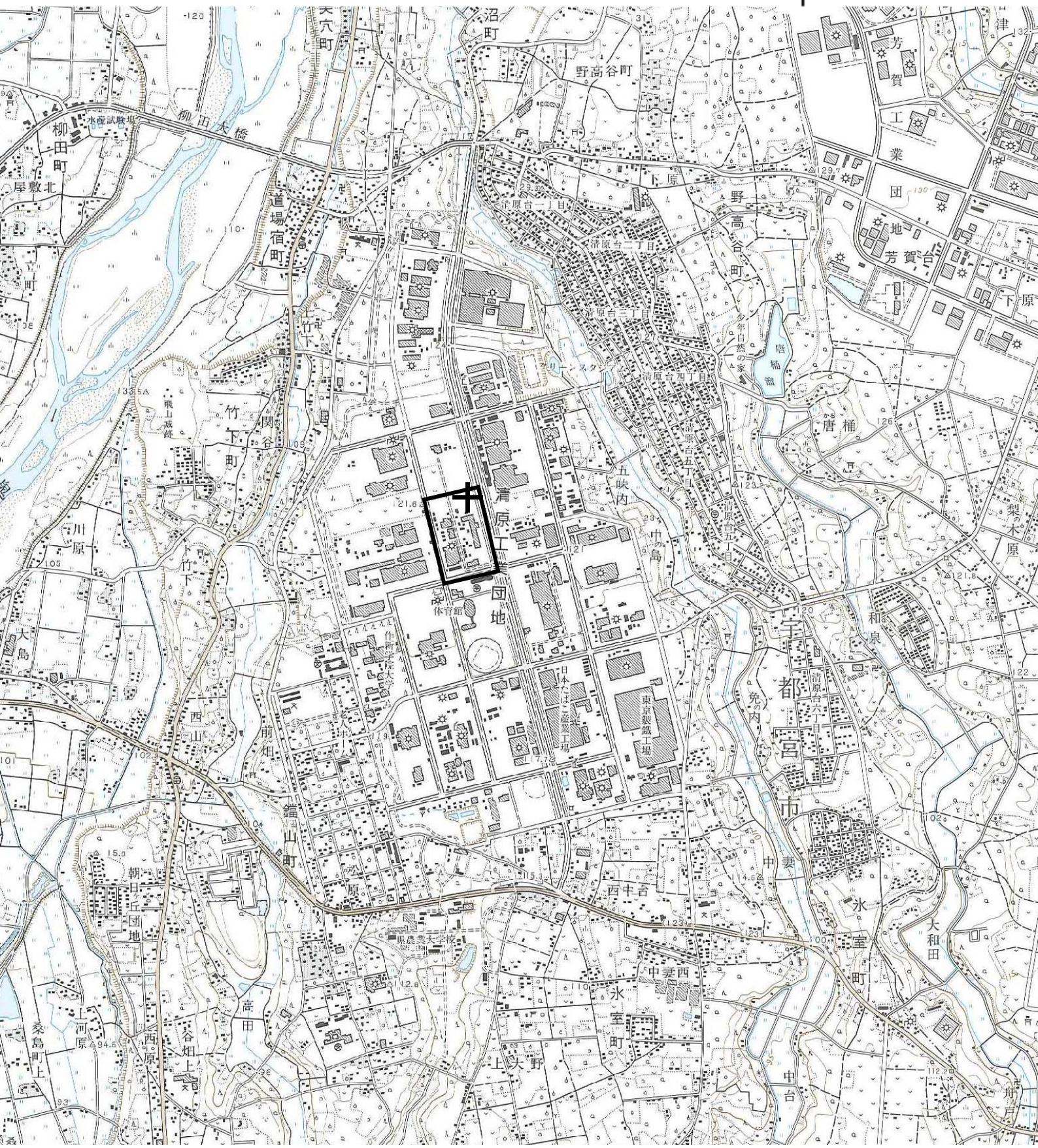

図　デュポン株式会社宇都宮事業所の周辺地図

宇都宮事業所の所在地を四角で囲み、隔離ほ場の所在地を「＋」で示した。この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の 2 万 5 千分の 1 地形図を複製したものである（承認番号　平 25 情複、第 456 号）。この地図を第三者がさらに複製する場合には、国土地理院の長の承認を得なければならない。

添付資料リスト

1. （社外秘情報につき非開示）
2. （社外秘情報につき非開示）
3. （社外秘情報につき非開示）
4. （社外秘情報につき非開示）
5. （社外秘情報につき非開示）
6. （社外秘情報につき非開示）
7. （社外秘情報につき非開示）
8. （社外秘情報につき非開示）
9. 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫.