

青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (*HC-Sirius*、*Bombyx mori*) (GN13、GCS13、GN13×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支 146 号、日 137 号×GCS13) の申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	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
イ 和名、英名及び学名	3
ロ 宿主の品種名又は系統名	3
ハ 国内及び国外の自然環境における生息状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	4
イ 国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
ロ 主たる生産地域、生産方法、流通実態及び用途	4
ハ 国内における養蚕を目的とした飼育の現状	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	6
イ 基本的特性	6
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	8
ハ 捕食性又は寄生性	10
ニ 繁殖又は増殖の様式	10
ホ 病原性	11
ヘ 有害物質の産生性	11
ト その他の情報	11
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	12
(1) 供与核酸に関する情報	14
イ 構成及び構成要素の由来	14
ロ 構成要素の機能	20
(2) ベクターに関する情報	22
イ 名称及び由来	22
ロ 特性	22
② ベクターの塩基数及び塩基配列	22
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	22
③ ベクターの伝染性・病原性の有無及び伝染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報	23
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	23

イ	宿主内に移入された核酸全体の構成	23
ロ	宿主内に移入された核酸の移入方法	23
ハ	遺伝子組換え生物等の育成の経過	24
①	核酸が移入された個体の選抜方法	24
②	ドナープラスミドにおいて <i>piggyBac</i> 転移酵素遺伝子が欠落していることの確認	28
③	ドナープラスミドにおける核多角体病ウイルスゲノムの断片の有無	28
④	ヘルパープラスミドの残存性	28
⑤	生物多様性影響評価に必要な情報を収集するまでに用いられた系統の育成の経過	28
(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	29
イ	移入された核酸の複製物が存在する場所及びコピー数	29
ロ	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	29
ハ	移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での形質発現の安定性	29
(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	30
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	30
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	30
ロ	生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との間の相違	30
①	形態の特性	31
②	生育の特性	32
③	生存能力	33
④	運動力	34
⑤	繁殖様式	34
⑥	脱皮・変態・休眠等	35
⑦	クワコとの交雑の可能性	35
⑧	病原性	38
⑨	有害物質の産生性	39
ハ	遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との識別の方法	39
3.	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	40
(1)	使用等の内容	40
(2)	使用等の方法	40
(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	40
(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	40
(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	40

(6) 国外における使用等に関する情報	40
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	41
1. 競合における優位性	41
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	41
(2) 影響の具体的内容の評価	43
(3) 影響の生じやすさの評価	43
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	43
2. 捕食性	43
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	43
(2) 影響の具体的内容の評価	43
(3) 影響の生じやすさの評価	43
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	43
3. 有害物質の産生性	43
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	44
(2) 影響の具体的内容の評価	44
(3) 影響の生じやすさの評価	44
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	44
4. 交雑性	45
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	45
(2) 影響の具体的内容の評価	45
(3) 影響の生じやすさの評価	45
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	47
第三 生物多様性影響の総合的評価	48
引用文献リスト	51
緊急措置計画書	55
モニタリング計画書	60
第一種使用等による飼育等要領	68
別添資料リスト	73
別添資料	74

第一種使用規程承認申請書

令和2年1月17日

農林水産大臣 江藤 拓 殿
環境大臣 小泉 進次郎 殿

氏名 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
申請者 理事長 久間 和生 印
住所 茨城県つくば市観音台3丁目1番地1

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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (<i>HC-Sirius</i>、<i>Bombyx mori</i>) (GN13、GCS13、GN13×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支 146 号、日 137 号×GCS13)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>カイコの繭糸の生産を目的とした、①幼虫（3 齢幼虫期以降のものに限る。以下同じ。）の飼育、②繭の生産及び加工、③幼虫及び繭の保管、運搬及び廃棄並びに①から③までに付随する行為</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>使用に当たっては、別に定める第一使用等による飼育等要領に従う。また、別に定めるモニタリング計画書に基づき、申請者によるモニタリングを実施する。</p>

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

- 5 和名：カイコガ科 カイコガ属 カイコガ（カイコ）（江崎ら, 1971; 小池ら, 2002）
英名：silkworm
学名：*Bombyx mori* (Linnæus, 1758)

ロ 宿主の品種名又は系統名

10 ① MCS4

休眠性で白卵及び白眼の実験系統である白/C と支 146 号との交配後代を兄妹交配し、得られた白卵及び白眼の個体と支 146 号との交配後代から白卵及び白眼の個体を選抜した。支 146 号への戻し交配及び兄妹交配を 6 回以上繰り返し、繭形質等を支 146 号と同等で白卵性を持つ系統を MCS4 として樹立した。幼虫体色は白色、斑紋はメスで着色し、オスでは着色しない。繭は白色で楕円形である。現在は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）において維持・保存されている。MCS4 に遺伝子を導入して遺伝子組換えカイコ（GCS13）を作出した。

20 ② 日 137 号

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所が育成した二化性の実用品種であり、幼虫体色は白色、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で浅縊短俵形である。現在は、農研機構で維持・保存されている。日 137 号を支 146 号と交配した F₁ が実用蚕品種として開発されており（農林水産省農蚕園芸局, 1989）、繭が大きく繰糸が容易で安定した品質の繭を作る。遺伝子組換えカイコ（GN13）の育成過程で使用している。

③ 支 146 号

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所が育成した二化性の実用品種であり、幼虫体色は白色、斑紋はメスで着色し、オスでは着色しない。繭は白色で楕円形である。現在は、農研機構で維持・保存されている。日 137 号を支 146 号と交配した F₁ が実用蚕品種として開発されており（農林水産省農蚕園芸局, 1989）、繭が大きく繰糸が容易で安定した品質の繭を作る。遺伝子組換えカイコ [GN13×支 146 号] の育成過程で使用している。

35 ハ 国内及び国外の自然環境における生息状況

カイコガ科 *Bombyx* 属は、カイコ¹ (*B. mori*)、クワコ (*B. mandarina*、カイコと祖先を共有すると考えられている野生種)、インドクワコ (*B. huttoni*) など数種が含まれる (吉武, 1988; 河原畑, 1998; Xia *et al.*, 2009)。カイコは、我が国に伝播した時代には、すでに自然環境下での生息能力を欠如していたとされており、我が国において野外に逃げ出して野生化したり、自然環境下で生息したりしている例は報告されていない。なお、カイコと交雑可能なクワコは、自然環境下で生息し、極東ロシア、中国、台湾及び朝鮮半島に分布している。我が国では各地に分布するが、薩南諸島の小宝島以南、沖縄諸島、及び先島諸島には分布しない (河原畑, 1998; 廣森, 2001; 金井ら, 2013)。クワコの幼虫は、カイコと同様に、クワ科のクワ (*Morus spp.*) の葉を食べるため、桑園または野生桑樹に生息していると考えられる (大門, 2014)。

(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

人類がカイコの繭を利用し始めたのは中国において新石器時代 (紀元前 7000~6000 年頃) からと言われ、養蚕の起源と考えられている。養蚕技術とカイコは、中国から西方、東方、南方へと伝えられ、日本には弥生時代 (紀元前 300~紀元 300 年) に伝来したと考えられている (日本蚕糸学会, 2002)。中国から東西の交易に伴い、東南アジア、ヨーロッパ、日本等世界各地に広がったカイコは、それぞれの地域に適応した固有の品種へと分化し、多くの中国種、日本種、欧州種、熱帯種等地理的蚕品種が形成された (吉武, 1988)。

明治時代以降、我が国の基幹産業として生糸輸出が順調な伸びを示し、養蚕業の最盛期となった 1930 年には、国内農家の 40% で養蚕が行われ、収繭量は史上最大の 40 万トンに達した。しかし近年は、生糸価格の低迷、養蚕農家の後継者不足等により養蚕が衰退し、2018 年の収繭量は 110 トンにまで減少している (大日本蚕糸会, 2007, 2020; 農林水産省生産局生産流通振興課, 2009; 鶴井ら, 2010)。

ロ 主たる生産地域、生産方法、流通実態及び用途

世界の生糸生産は長期的には増加傾向にあるが、近年は安定的に推移している。流通実態としては、カイコの繭の生産と生糸の消費地は少数の国に集中している (范, 2013)。

2015 年の世界全体のカイコの繭生産量は、84 万トンであり、このうち中国で 63 万トン、インドで 16 万トン、ウズベキスタンで 3 万トン、イランで 1 万トン及びタイで 5 千トンが生産され、我が国は 135 トンの生産量であった (大日本蚕糸会, 2018)。近年の我が国の主な繭の生産地は、群馬県、福島県、栃木県等である (大日本蚕糸会, 2019)。

¹ 標準和名は「カイコガ」とされ、「カイコ」は幼虫の名称であるが、一般的には「カイコ」が種全般を指すことから、本情報では変態後も含めこの種全般を「カイコ」と表す。

絹織物及び絹製品の消費は、アメリカ、日本、インド、西欧、中東等の先進国や主要貿易国に集中している（范, 2013）。

ハ 国内における養蚕を目的とした飼育の現状

5 カイコは桑葉のみを摂食する狭食性の昆虫であり、桑（もしくは桑を原料とした人工飼料）以外の植物では十分に成長できない。良質の繭を多く生産するためには、新鮮な桑葉を給与する必要があることから、桑葉の貯蔵は 1 日程度が普通である。したがって、養蚕では通常、大量の桑葉の入手可能な時期で、かつカイコが正常に発育できる 20℃から 30℃の気温で推移する 5 月中旬～10 月中旬までが飼育期間とされている（鶴井ら, 2010; 日本蚕糸学会, 2002）。

10 糸繭生産用のカイコの飼育には、強健に生育し、繭も均一な「一代雑種（単交雑）」や、4 種類の原種から 2 段階の交配を経て得られる「四元雑種（複交雑）」等が用いられる。それら実用品種の育種のための遺伝資源として、国内では、農業生物資源ジーンバンク（農研機構）及びナショナルバイオリソースプロジェクトにおいて、それぞれ 650
15 以上及び 450 以上の品種・系統が保存されている（農業生物資源ジーンバンク, 2018; ナショナルバイオリソースプロジェクト, 2018）。

カイコは必ず屋内で飼育される。カイコの飼育には目的は 2 つあり、1 つは飼育したカイコの成虫から卵を得て、それを販売するための蚕種製造である。もう 1 つは、カイコが繭になるまで飼育し、得られる繭を販売する養蚕業である。近年の日本での養蚕は、
20 共同飼育所で人工飼料により 1 齢から 3 齢の幼虫（稚蚕）のみを飼育する稚蚕飼育と、そこから幼虫の分譲を受けて農家で 4 齢から 5 齢の幼虫（壮蚕）のみを飼育する壮蚕飼育とに分業化している。さらに、養蚕農家から繭を買い取って生糸を製造する製糸業者がある（日本製糸技術経営指導協会, 1993; 加藤, 1994）。

25 ・蚕種製造

養蚕に用いられるカイコの卵（蚕種）は、通常、専門の蚕種製造業者が生産する。特定の品種を交配し、産卵させ、浸酸などの人工孵化処理を経た交雑種の蚕種を養蚕農家等に販売する。蚕種製造業者は、微粒子病¹を引き起こす微胞子虫 *Nosema bombycis* の経卵伝達を防ぐため、産卵後のカイコのメス成虫が微胞子虫の胞子を保有していない
30 かどうかを調べるための「母蛾（ぼが）検査」を行い、合格した蚕種のみを販売している（日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。

・稚蚕飼育

¹ 母蛾が感染すると体内卵に伝染し、胞子を発芽させ、カイコの消化管から分裂、カイコの体内組織で増殖し、カイコを死滅させる。

1 齢から 3 齢の幼虫を稚蚕と呼ぶ。病原体への感受性が高い稚蚕期に、温度・湿度が管理され、清浄な飼育環境を維持できる稚蚕共同飼育所で飼育する。専従の技術者の指導の下で、複数の農家への配蚕を目的にして共同飼育を行うことが一般的である。多くの稚蚕共同飼育には桑葉育ではなく人工飼料育が導入されており、多くの養蚕農家が稚蚕共同飼育を利用している（日本蚕糸学会, 2002）。

・壮蚕飼育

4 齢から 5 齢の幼虫を壮蚕と呼ぶ。壮蚕飼育は繭質と収繭量の向上を目的とし、大部分が個別の養蚕農家の飼育施設において行われている。壮蚕は成長が盛んで食欲旺盛のため食桑量が多く、新鮮な桑葉を大量に必要とする。壮蚕は 11～14 日間程度の飼育で、食桑を止め、吐糸を開始する。吐糸直前のカイコを熟蚕という。農家は熟蚕を見極め、蔴¹（まぶし）へ移す作業（上蔴、じょうぞく）を行う。上蔴から 7～8 日間程度経ったら収繭（蔴から繭を回収し毛羽²（けば）を取る作業）を行い、品種ごとに繭を区別して袋に入れ、製糸業者に出荷する（日本蚕糸学会, 2002）。

・製糸

繭から生糸を繰製する作業は製糸業者が行う。出荷された生繭を原料として生糸を作るための、乾燥（乾繭、かんけん）、保管（貯繭）、原料調整、煮繭（しゃけん）、繰糸³（そうし）等の一連の工程を経る（日本蚕糸学会, 2002）。

（3）生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

カイコは完全変態をする昆虫であり、卵→幼虫→蛹→成虫の発育段階を経て生活環が回る（図 1）。卵には休眠卵と非休眠卵とがあり、休眠卵の状態越冬する。孵化後、成虫になるまでに 6 回の脱皮を行う。孵化後、通常のカイコ（四眠蚕）では、1 齢幼虫～5 齢幼虫までに 4 回の脱皮を行ってから熟蚕となり、やがて繭を作り始める。なお、遺伝的要因と環境要因によっては幼虫脱皮を 3 回経て熟蚕になる場合があり、これを三眠蚕と呼ぶ。実用品種を養蚕農家等が飼育する場合には、三眠蚕が生じることは稀である（日本蚕糸学会, 2002; 竹内, 1954）。

カイコは吐糸開始からおよそ 2 日で営繭を完了し、さらに 2～3 日経つと繭の中で脱皮して蛹となる。養蚕農家では繭は出荷されるが、蚕種製造業者などで、そのまま放置すれば、蛹は約 10～15 日程度経過後、早朝に脱皮（羽化）し、繭から出て成虫（蛾）となる。その後、成虫は交尾する。メス成虫は夕方から翌朝の間に 500 個前後の卵を産

¹ カイコが繭を作るための足場にする器具。

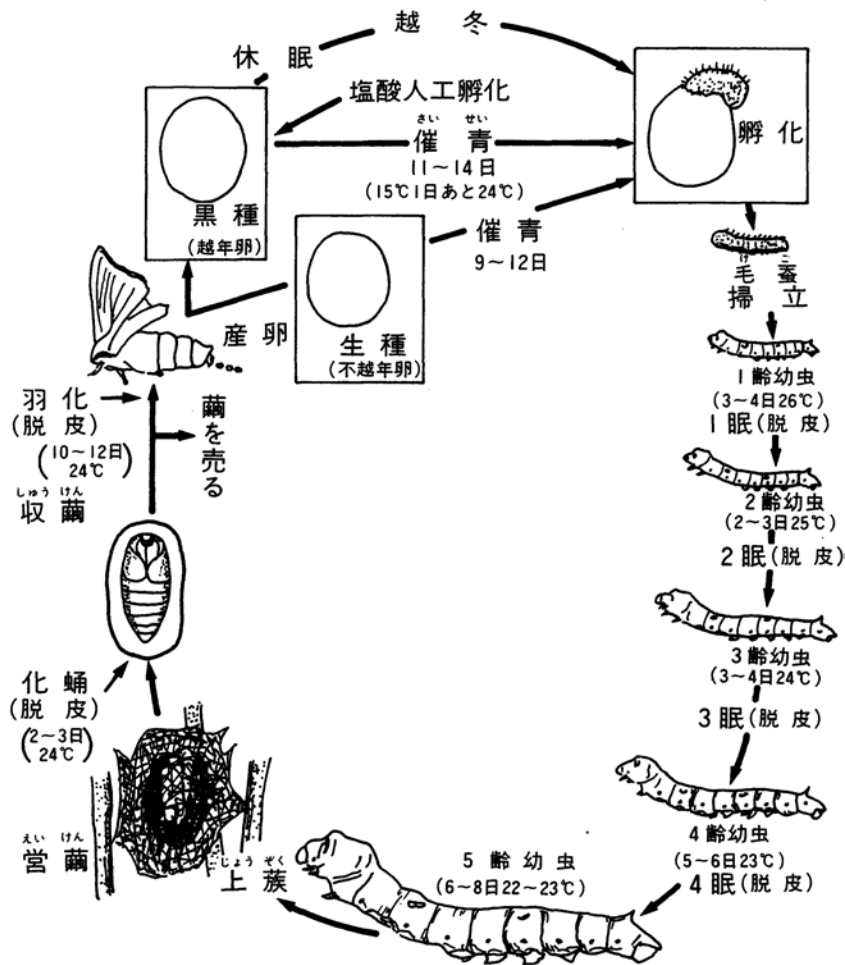
² 繭の外側を覆っている真綿のようなものをいう。

³ 繭から糸を引出し、数本をそろえて 1 本の糸にする工程をいう。

み、その後、何も食わずに数日で死滅する（鶴井ら,2010）。一般の品種で通常の管理を行えば、カイコの卵は休眠する。

休眠卵¹を一定期間以上冷蔵保存した後に 25℃に保護するか、もしくは非休眠卵を 25℃に保護すれば、9～12 日程度で孵化する（鶴井ら,2010）。

- 5 MCS4 の元となった系統である支 146 号は、上蔕から羽化までの日数が 19～20 日程度、メス成虫 1 頭あたりの産卵数が 578 個となっている（中島・富樫,1984）。日 137 号は、上蔕から羽化までの日数が 21 日程度、メス成虫 1 頭あたりの産卵数が 534 個となっている（中島・富樫,1984）。



10

図 1. カイコの生活環

カイコの形態

- 卵：長径 1.3 mm、短径 1 mm、厚さ 0.5 mm くらいの平たい楕円形で、外側は固い卵殻で包まれている（森,1995）。
- 15
- 幼虫：体長は 3 mm～85 mm。幼虫期は単眼（明暗を区別できる程度の機能を有す

¹ 休眠卵は、産卵後自然温度で保護されると、約 2 日後に発生が停止する。その後は越冬して冬の低温に一定期間晒されてから、春にならなければ孵化しない。人工越冬や産卵 1 日後の塩酸への浸漬（即時浸酸法）等の人為的処理で人工孵化できる。

る)が左右に6個ずつある。体は細長い円筒形をしており、頭部、胸部及び腹部に区別される。胸部には3対の胸脚、腹部には4対の腹脚と1対の尾脚、1個の尾角がある。

- 5 • **成虫**：翅を広げた時の幅はオスで約40mm、メスで約45mm。複眼(視界がはっきり見える機能を有する)が左右に1個ずつある。全身が鱗毛で覆われ、メスは特に腹部がオスより大きい。

楕形(くしがた)の触角があり、オスの触角はメスより大きい。また、翅はあるが、飛翔筋が弱く体が大型化していること等により羽ばたきはするが飛ぶことができないため、胸脚を用いて歩行することで移動する。

- 10 体色は白色のものが多く、桑の幹のような褐色を呈するクワコとは異なる。

• **骨格等**：カイコは外骨格の構造を持ち、体温が周囲の温度にともなって変化する変温動物である。

- 15 • **繭**：繭の形は系統により様々で、楕円型・俵型・くびれ型などがあるほか、2頭以上で1つの繭を作る玉繭もある。繭の色は白色が多いが、系統によって黄色・紅色・黄色・緑色・薄緑色などがある。繭の大きさは短径が約20mm、長径が約30~35mm(日本蚕糸学会, 2002; 池田ら, 2009; 鶴井ら, 2010)。

- 20 MCS4は、幼虫体色が白色で、斑紋はメスで着色しオスでは着色しない。繭は白色で楕円形である。日137号は、幼虫体色が白色で、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で浅縊短俵形である(農林水産省農蚕園芸局, 1989)。支146号は、幼虫体色は白色、斑紋はメスで着色し、オスでは着色しない。繭は白色で楕円形である。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

- 25 カイコは高度に人間に馴化された生物であり、自然環境下における生息能力をほぼ完全に欠如したほぼ唯一の動物であるとされている(森, 1995; 河原畑, 1998)。また、全齢を通じたカイコ幼虫の移動距離の調査や野外の桑園におけるカイコの各齢の放飼試験及び飼育残渣に紛れ野外の穴に放置されたカイコを想定した放飼試験の結果等から、カイコの運動能力は低く、鳥や昆虫に捕食されるため、野外での生存の可能性は極めて低いとされている(河本ら, 2014; 下田・金勝, 2016)¹。

- 30 カイコは屋内で飼育され、多くの養蚕農家では、1~2段の給桑台車が付いた広い飼育容器を使用する。カイコ幼虫を動かさないで給桑や除沙²(じょさ)等を行う平飼い

¹ カイコ幼虫の移動距離の調査結果では、孵化当日の幼虫の約70%が50cm円周上まで到達できず死亡したことから孵化した幼虫が自力で桑樹へたどり着く可能性は低いと報告され、野外における放飼試験結果では、鳥や他の昆虫等に捕食され、卵から孵化した1齢幼虫は3齢まで生き残れず、4~5齢の各幼虫は営繭まで生き残れなかった。また、野外の穴に桑とともに放置した数百頭のカイコについて成虫の発生は認められなかった。

² カイコの糞や食べ残しの桑葉などを取り除いて清潔にすること。

飼育法が広く用いられている（鶴井ら, 2010）（図 2）。



図 2. 給桑台車付条桑飼育装置による飼育

5

飼育環境下での温度、湿度、気流等の条件は以下のとおり。

・飼育温度

カイコは変温動物であるので、体温は周囲の気温によって上下し、温度が高くなるにつれて、一般に生理機能は盛んとなり、発育・成長が早くなる。カイコが発育する温度の範囲は 7～40℃位であるが、正常な発育ができる温度は、おおむね 20～28℃位の範囲である（福田, 1979; 日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。

10

・飼育湿度

湿度が 60%以下と低い場合は、桑葉が早くしおれて飼料価値が落ちる。90%以上と高い場合は、病原菌が繁殖しやすくなり、カイコの健康を害しやすい。

15

室温 20～28℃位の範囲では、湿度は、1～2 齢ではおおむね 85～90%が適当であり、齢が進むに連れてこれより 4～5%程度低くなり、5 齢では 70%程度が適している。

また、高温（27℃以上）・低温（20℃以下）、通風の不良、栄養条件の不良などの場合は、湿度は低いほうが良いとされている（福田, 1979; 日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。

20

・光条件

飼育の光条件は、常に明条件または暗条件で飼うより、16 時間程度の明期と 8 時間程度の暗期を繰り返すほうが、幼虫の発育が揃うとされている（福田, 1979; 鶴井ら, 2010）。

・気流

25

4 齢～5 齢期では、気温が 30℃以上になった場合は、秒速 0.1～0.5m の速さで通風し、気化熱によりカイコの体温を下げる必要がある。しかし、稚蚕期には極端な高温または多湿でない限り、通風を速めて気流を強めることは桑葉が早くしおれるため望ましくない（鶴井ら, 2010）。

カイコは熟蚕期に食桑を止めて、糸を吐き始める。熟蚕は繭をつくるための容器に移され（上簇）、容器の角など繭を作ることができる足場に到達すると、そこで移動をやめて繭を形成する。養蚕農家では、繭1個分に区切られた区画を多数連結した繭を作るための足場（簇）（図3）を用い、熟蚕をそこに入れて繭を作らせる方法が一般的である（鶴井ら, 2010）。

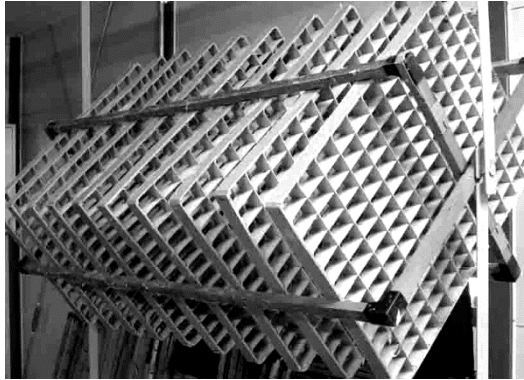


図3. 上簇容器（回転簇）

上簇容器に熟蚕期のカイコを登らせると、カイコが全体に均等に分布し、1区画に1頭ずつ繭を作る。

養蚕農家は繭の段階で出荷するため、成虫を生じさせることはなく、また養蚕農家等から出荷された繭は、品質を維持して長期保存するために製糸工場等で速やかに乾繭（熱風等で繭を乾燥させること）されるため、繭中の蛹は成虫になる前にすべて死滅する。乾繭においては、通常120℃から60℃に次第に下げて5～6時間で処理される（日本蚕糸学会, 2002）。

MCS4及び日137号はともに強健で飼育取り扱いが容易であり、生息又は生育可能な環境の条件について特記する事項はないが、桑不足にならないようにすることが必要である（農林水産省農蚕園芸局, 1989）。

ハ 捕食性又は寄生性

（カイコの幼虫は、人為的に与えられた桑葉又は人工飼料を摂食して成長し、桑葉以外の植物や昆虫等を捕食することはない。成虫は、摂食や飲水は一切しないことが知られている（日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。）

ニ 繁殖又は増殖の様式

カイコは有性生殖を行う生物である。交尾後、メス成虫が産卵する際、オス成虫由来

の精子と卵がメス体内で受精し、胚発生が開始する。

蛹からの成虫の羽化は早朝、日の出の後に一斉に起きる（普後,1982）。成虫はメス・オスともに飛ぶことができないが、歩行はできる。メス成虫が静止したまま、腹部末端にある誘引腺から性フェロモン（ボンピコール）を発散すると、オス成虫は触角によって性フェロモンを感知してメス成虫の位置を知り、飛ばずに羽ばたきながらメス成虫に向かって歩いて接近し、交尾に至る。放置すれば、交尾は長時間継続するため、通常は人手により約3時間程度でメスとオスを離す（「割愛」作業）。メス成虫を産卵台紙等の上に置くと、一般に夕方から翌朝にかけて産卵を行う。1頭の産卵数はおおよそ500個前後である（小泉ら,1962; 鶴井ら,2010）。室内での成虫の生存期間は、おおむね7～10日間で、最も長い系統で15日間との報告がある（村上ら,2010）。

カイコの卵（蚕種）の休眠性（胚子が休眠するか否か）は、遺伝的要因と環境要因で決定する。「1化性品種」は環境要因に関係なく必ず休眠する品種を指す。2化性品種は催青（さいせい）条件（胚子発生後期の温度と光条件）によって成虫が産下する卵の休眠性が変化する品種群を指す。多化性品種は、催青条件に関係なく非休眠卵を産む品種である。1化性及び2化性品種は、催青条件の調節、卵の低温処理、塩酸浸漬などによって、孵化時期を人為的に制御することが可能である（日本蚕糸学会,2002; 柳沼,2015）。

なお、未交尾のメス成虫が産卵した不受精卵が、人為的刺激を与えなくても、自然単為発生によって胚発育を始めることがあるが、孵化まで達することは極めて少ない（高見,1969）。

MCS4と日137号はともに2化性であり、どちらも休眠卵の塩酸浸漬によって人為的に孵化させることができる（農林水産省農蚕園芸局,1989）。

ホ 病原性

（カイコは、自然条件下で周囲の野生動植物の生息に影響を及ぼす病原性の発現は報告されていない。）

へ 有害物質の産生性

（カイコについては、自然条件下で周囲の野生動植物等の生息に影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。）

ト その他の情報

【寄生バエやハチ、ネズミ等の野生生物からの捕食の可能性】

カイコに寄生する主な動物としては、寄生性のカイコノウジバエ (*Blepharipa zebina*)、

クワコヤドリバエ (*Exorista sorbillans*)、カイコノシラミダニ (*Pediculoides ventricosus*)
がある (日本蚕糸学会, 2002)。その他にも、ブランコヤドリバエ (*Exorista japonica*)、
カイコノクロウジバエ (*Pales pavidus*) による寄生や、ハサミムシ類、カマドウマ類、ウ
マオイ類、ハネカクシ類、ゴミムシ類、アシナガバチ類、スズメバチ類、アリ類、鳥類
5 による捕食も報告されている (横山, 1929; 河本ら, 2014)。

【各種病原微生物による感染の可能性】

カイコに感染する微生物等としては、カイコ核多角体病ウイルス *Bombyx mori*
nucleopolyhedrovirus、カイコ細胞質多角体病ウイルス *B. mori cypovirus*、カイコ伝染性
10 軟化病ウイルス *B. mori infectious flacherie virus*、カイコ濃核病ウイルス 1 型 *B. mori*
densovirus type 1、カイコ濃核病ウイルス 2 型 *B. mori densovirus type 2* 等のウイルスや、
白きょう病菌・黄きょう病菌 *Beauveria bassiana*、緑きょう病菌 *Nomuraea rileyi*、黒きよ
う病菌 *Metarhizium anisopliae*、コウジカビ病菌 *Aspergillus spp.*等の糸状菌、細菌性軟化
病の病原菌 *Enterococcus faecalis*、卒倒病の病原菌 *Bacillus thuringiensis* 等の細菌、そし
15 て微粒子病の病原体 *Nosema bombycis* 等の微胞子虫が挙げられる (日本蚕糸学会, 2002)。

【非感染性物質による中毒症発生の可能性】

タバコや種々の農薬、工場から排出される煤煙中の有毒物質に対して感受性があり、
これによって発生するカイコの中毒症が挙げられる (福田, 1979)。
20 MCS4 及び日 137 号はともに強健で飼育取り扱いは容易であり、特に留意すべき病害
等は報告されていない。

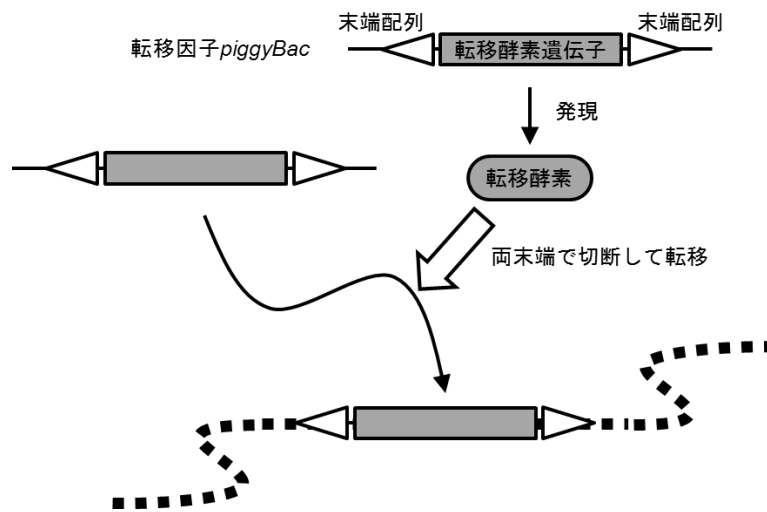
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

ここでは、本遺伝子組換えカイコの作出のために用いた供与核酸等について記載す
25 る。それに先立ち、構成要素等の機能等に関連して、遺伝子導入法の全体像について記
載する。

本遺伝子組換えカイコの作出には、転移因子(トランスポゾン)の一つである *piggyBac*
による遺伝子導入法を用いた。*piggyBac* は、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*、昆虫
綱:チョウ目)の培養細胞 TN-368 に由来する転移因子であり、DNA 上で切り出されたり
30 挿入されたりする性質を利用して、様々な昆虫種で遺伝子導入に用いられている
(Cary *et al.*, 1989; Handler, 2002)。*piggyBac* は、転移酵素遺伝子が 2 つの末端配列に挟
まれた構造を持っている。*piggyBac* の転移酵素を発現させると、この転移酵素が末端配
列に特異的に結合して切断し、切り出された *piggyBac* が宿主ゲノム中にランダムに挿
入される (図 4)。ただし、このままでは *piggyBac* 自体から発現する転移酵素の働きに
35 よって、ゲノム中の他の場所に転移したり失われたりする可能性がある。そこで、

piggyBac を改変した遺伝子導入系が必要となる。

5 カイコに安定的に遺伝子を導入するために、*piggyBac* を改変した 2 種類のプラスミドを組み合わせる (図 5)。一つは、転移酵素遺伝子の代わりに、導入したい目的遺伝子を挿入したドナープラスミドで、もう一つは、*piggyBac* の末端配列のうちの 1 つを欠損させたヘルパープラスミドである。転移酵素を供給するヘルパープラスミドは、片方の末端配列が欠損しているため、それ自体はカイコゲノム中に挿入されず、同時に導入したドナープラスミド中の末端配列に挟まれた領域を切り出してカイコゲノム中に挿入させることができる。



10

図 4. 転移因子 *piggyBac* の働き

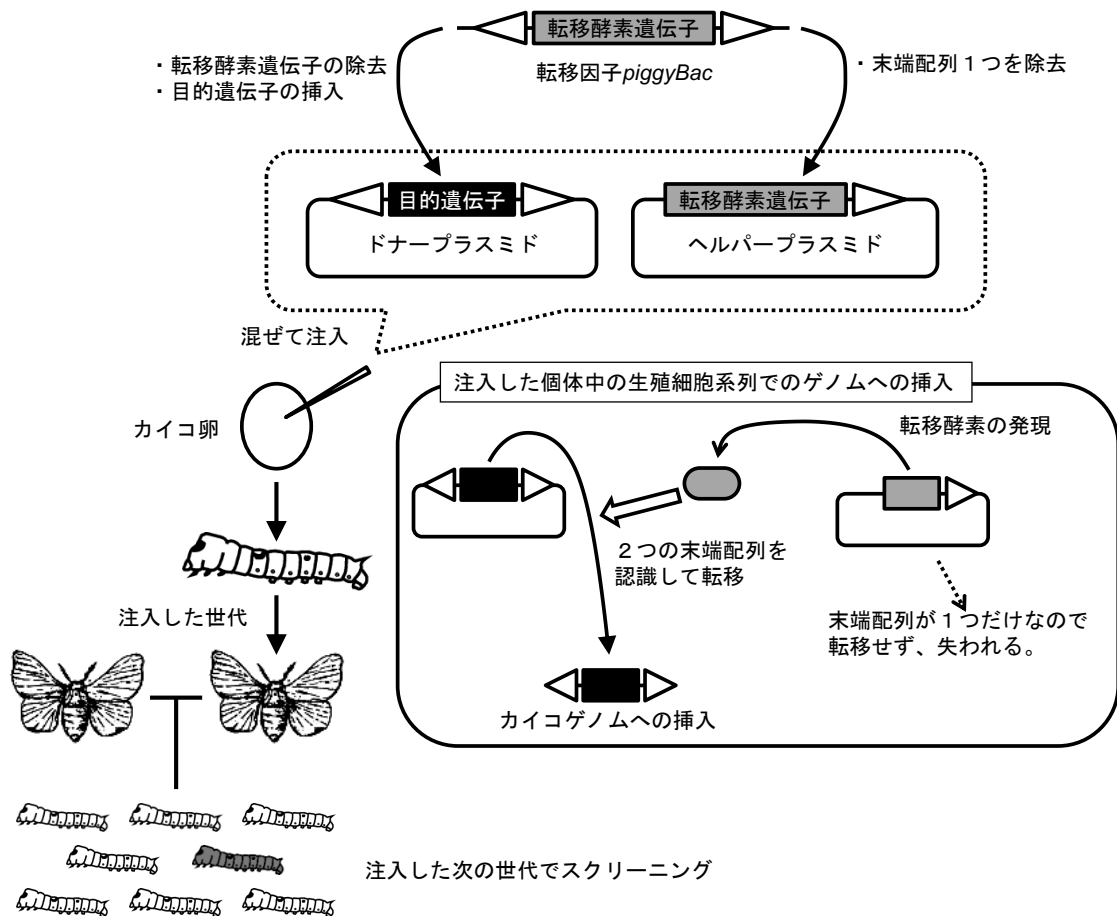


図 5. 遺伝子組換えカイコの作出法

ドナープラスミドとヘルパープラスミドをカイコに導入するには、2つのプラスミド

5 を混ぜてカイコ受精卵に顕微注入する方法を執る。これにより、ヘルパープラスミドから供給された転移酵素の働きで、目的遺伝子がカイコゲノム中に挿入される。顕微注入した個体の中では一部の細胞だけがこの目的遺伝子を持つこととなり、もし、卵や精子になる生殖細胞系列でこの挿入が起きると、注入した次の世代の中に、遺伝子組換え個体が生じる。一方、ヘルパープラスミド自体はカイコ細胞中では増幅しないので、発生が進んで細胞数が増えるにしたがって、細胞 1 つあたりに含まれる分子の数が減少したり分解されたりして、最終的には失われる。その結果、安定的に目的遺伝子を持つ遺

10 伝子組換えカイコを作出することができる。

(1) 供与核酸に関する情報

15 イ 構成及び構成要素の由来

ドナープラスミド

本遺伝子組換えカイコの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 に示す。また、構成の模式図を図 6 に、目的遺伝子の塩基配列を別添 10 に示す。

表 1 供与核酸のサイズと、由来、機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
青色蛍光タンパク質—フィブロインH鎖融合タンパク質遺伝子発現カセット (<i>HC-Sirius</i> 遺伝子発現カセット)		
<i>Fibroin H</i> promoter (フィブロイン H 鎖遺伝子プロモーター)	1.1 kb	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のプロモーター。フィブロイン H 鎖遺伝子が発現する後部絹糸腺での <i>HC-Sirius</i> 遺伝子の転写を規定する (Kojima <i>et al.</i> , 2007)。
<i>HC-Sirius</i> (目的遺伝子である青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子)	2.4 kb	オワンクラゲ (<i>Aequorea victoria</i>) 由来緑色蛍光タンパク質にアミノ酸置換を導入して改変した青色蛍光タンパク質 <i>Sirius2</i> (Tomosugi <i>et al.</i> , 2009; 別添 10) を、カイコ由来フィブロイン H 鎖タンパク質の中央部に置換した融合タンパク質をコードする遺伝子 (別添 10)。青色蛍光を持つフィブロイン (絹繊維タンパク質) を作らせる。C 末にはヒスチジンの 6 回繰り返し配列をコードする 6xHis が付加されている。
<i>Fibroin H</i> polyA (フィブロイン H 鎖遺伝子ターミネーター)	0.8 kb	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のターミネーター。転写終結を規定する (Kojima <i>et al.</i> , 2007)。
キヌレニン酸化酵素遺伝子 (マーカー遺伝子) 発現カセット		
<i>A3</i> promoter (細胞質アクチン <i>A3</i> 遺伝子プロモーター)	0.7 kb	カイコ由来の細胞質アクチン <i>A3</i> 遺伝子のプロモーター。様々な組織でのキヌレニン酸化酵素 (<i>KMO</i>) 遺伝子の転写を規定する (Mounier and Prudhomme, 1991)。
<i>KMO</i> (キヌレニン酸化酵素遺伝子)	0.7 kb	カイコ由来のキヌレニン酸化酵素遺伝子 (Quan <i>et al.</i> , 2002)。 <i>A3</i> promoter の制御下で発現させると 1 齢幼虫の皮膚が褐色を呈することから、1 齢幼虫で遺伝子組換えカイコを選抜するためのマーカー遺伝子として用いる。
SV40 polyA (SV40 ターミネーター)	0.3 kb	シミアンウイルス 40 (Simian virus 40) ゲノム由来のターミネーター。転写終結を規定する。

その他（アクセッション番号 AB713995 の一部）		
<i>piggyBac R</i>	1.1 kb	イラクサギンウワバ (<i>Trichoplusia ni</i>) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
<i>piggyBac L</i>	0.7 kb	イラクサギンウワバ (<i>T. ni</i>) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
外骨格領域（本遺伝子組換えカイコゲノム中には存在しない）		
pUC ori	0.7 kb	大腸菌由来のプラスミド ColE1 の複製開始点。本プラスミドを大腸菌中で増幅するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。
<i>AmpR</i>	0.9 kb	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。

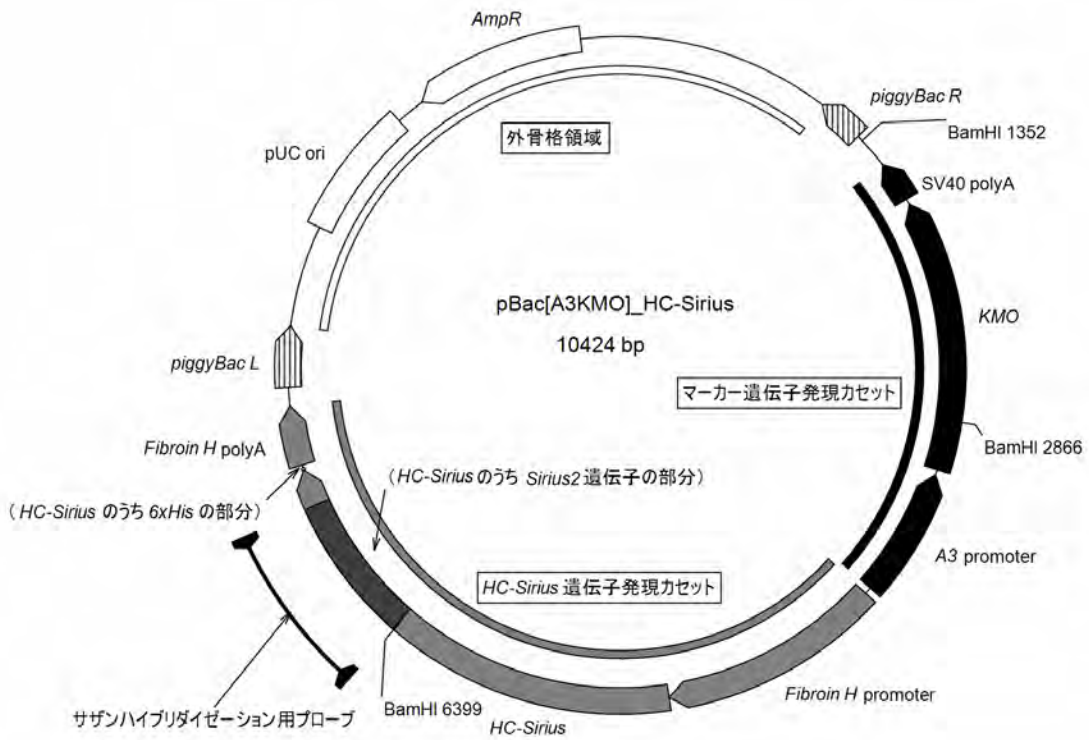


図 6. *HC-Sirius* 遺伝子導入に用いたプラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius の構造
構成要素の由来及び機能については表 1 を参照。サザンハイブリダイゼーション用プローブの
範囲を示す。

5

当該構成を得るまでにとられた過程を図 7 に示す。まず、転移因子 *piggyBac* を pUC18
に挿入して得られた p3E1.2 (Cary *et al.*, 1989) に、キヌレニン酸化酵素遺伝子発現カセ
ット (A3KMO) を挿入してするとともに、*piggyBac* 転移酵素遺伝子の一部を除去して
pBac[A3KMO, MCS]を作製した (Kobayashi *et al.*, 2007)。これに、青色蛍光タンパク質
10 ーフィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子発現カセット (*HC-Sirius* 遺伝子発現カセ
ット) を挿入して pBac[A3KMO]_HC-Sirius を作製した。

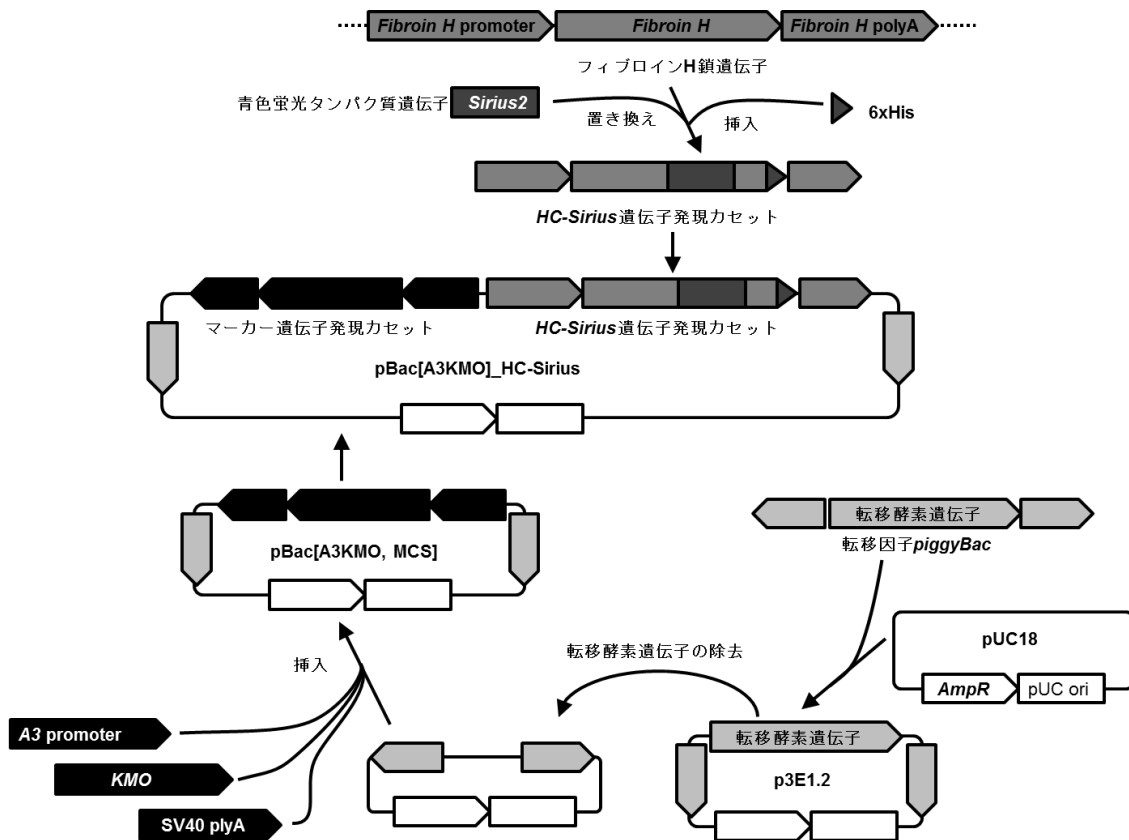


図 7. HC-Sirius 遺伝子の導入に用いたプラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius の作製方法

ヘルパープラスミド

- 5 ドナープラスミドの *piggyBac R* と *piggyBac L* にはさまれた目的領域をカイコゲノム中に挿入するためには、転移酵素の働きが必要となる (図 5)。この転移酵素を供給するために、ヘルパープラスミド pHA3PIG を作製して、ドナープラスミドと混ぜてカイコ卵に注入した。このヘルパープラスミド pHA3PIG の構成及び構成要素の由来を表 2 に示す。また、塩基配列を別添 11 に、構成の模式図を図 8 に示す (Tamura *et al.*, 2000)。

表2 ヘルパープラスミド pHA3PIG の構成要素と、由来、機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
<i>A3 promoter</i> (細胞質アクチン遺伝子プロモーター)	0.7 kb	カイコ由来の細胞質アクチン <i>A3</i> 遺伝子のプロモーター。様々な組織で遺伝子を発現させることができる (Mounier and Prudhomme, 1991)。
<i>piggyBac transposase</i> (<i>piggyBac</i> 転移酵素遺伝子)	1.8 kb	イラクサギンウワバ (<i>T. ni</i>) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の転移酵素 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。 <i>piggyBac</i> の2つの末端配列の間に挟まれた領域を切り出して、他の DNA 中に挿入する機能を持つ。
<i>piggyBac R</i>	1.1 kb	イラクサギンウワバ (<i>T. ni</i>) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
<i>AmpR</i>	0.9 kb	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコゲノム中には挿入されない。
pUC ori	0.7 kb	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のプラスミド ColE1 の複製開始点。本プラスミドを大腸菌中で増幅するための配列であり、本遺伝子組換えカイコゲノム中には挿入されない。

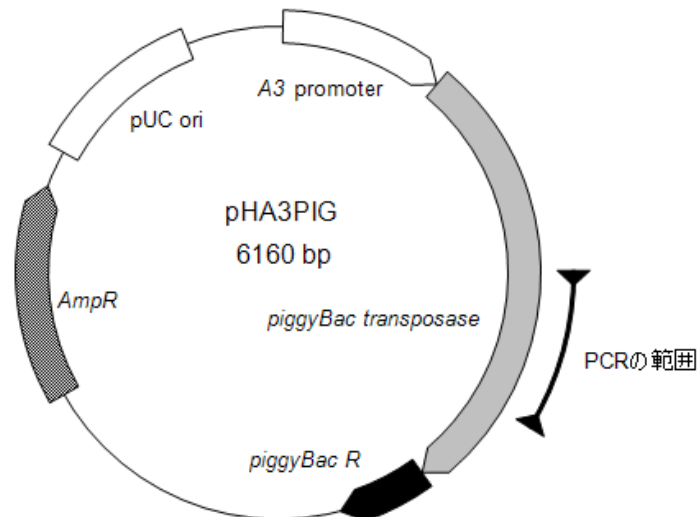


図 8. ヘルパープラスミド pHA3PIG の構造

構成要素の由来及び機能については表 2 を参照。ヘルパープラスミドの残存性を確認するための PCR の範囲を示す。

5

ロ 構成要素の機能

① 供与核酸の構成要素の機能

【*HC-Sirius* 遺伝子】

目的遺伝子である *HC-Sirius* 遺伝子は、カイコ由来フィブロイン H 鎖タンパク質、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来緑色蛍光タンパク質にアミノ酸置換を導入して改変した青色蛍光タンパク質 *Sirius2* (Tomosugi *et al.*, 2009; 別添 10)、及びヒスチジンの 6 回繰返し配列の融合タンパク質をコードしている。

フィブロイン H 鎖は、絹糸を構成する主要な繊維タンパク質である。今回移入する遺伝子には、フィブロイン H 鎖遺伝子の発現を調節する上流領域から、mRNA への転写を停止させるターミネーターを含む下流領域までの全体を用いている (Takiya *et al.*, 1990; Kojima *et al.*, 2007)。

青色蛍光タンパク質 *Sirius2* は紫外線で励起されて青色蛍光を発するタンパク質で、遺伝子発現マーカー等として用いられている。

6xHis は、ヒスチジンが 6 個つながった人工的なポリペプチドであり、発現させるタンパク質の N 末または C 末に付加することにより、ニッケル等によるアフィニティ精製するために用いられる。

目的遺伝子とした *HC-Sirius* 遺伝子は、フィブロイン H 鎖遺伝子の中央部を除去し、代わりに *Sirius2* 遺伝子を挿入し、6xHis が C 末に付加されるように作製した。

Sirius2 タンパク質及び 6xHis が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうか、アレルゲンデータベース (Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)、ver. 13、<http://www.allergenonline.org/>) に対して E 値の閾値を 0.1 として

FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと 8 アミノ酸残基連続で一致する配列は認められなかった。

この発現カセットは、宿主の持つ代謝系を変化させる機能は有していない。

5 【キヌレニン酸化酵素遺伝子】

本遺伝子組換えカイコの選抜には、キヌレニン酸化酵素（KMO、kynurenine 3 monooxygenase）の全身での発現を利用した。

10 マーカーであるキヌレニン酸化酵素は、カイコ由来のタンパク質であり、キヌレニンから 3-ヒドロキシキヌレニンへの酸化反応を触媒する。この反応は、トリプトファンからオモクローム色素に至る生合成経路の一部を構成する（図 9）。細胞質アクチン *A3* 遺伝子のプロモーターの制御下でキヌレニン酸化酵素を全身で発現させると、オモクローム色素の蓄積によりカイコの 1 齢幼虫の皮膚が褐色を呈することが知られており、
15 遺伝子組換えカイコの選抜マーカーとして用いられている（Kobayashi *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007）。なお、2 齢以降の幼虫では皮膚が褐色を呈することはなく、非遺伝子組換えカイコとの区別はできなくなる（Kobayashi *et al.*, 2007）。

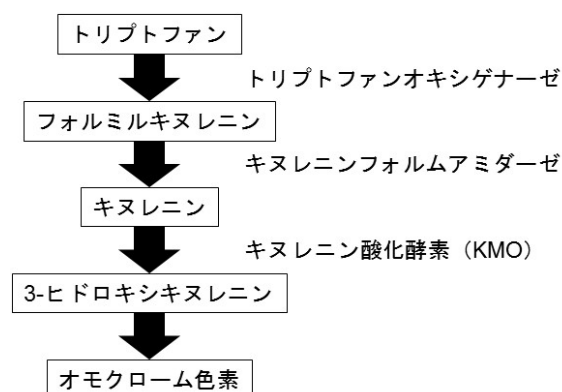


図 9. キヌレニン酸化酵素（KMO）の機能

20 *A3* プロモーターは、カイコ由来の細胞質アクチン *A3* 遺伝子のプロモーターであり、カイコの様々な組織で遺伝子を発現させる（Tamura *et al.*, 2000）。

SV40 ターミネーターは、シミアンウイルス 40 ゲノム由来のターミネーターで、mRNA への転写を停止させる。

25 キヌレニン酸化酵素が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうか、アレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)、ver. 13、<http://www.allergenonline.org/>）に対して E 値の閾値を 0.1 として FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと 8 アミノ酸残基連続で一致する配列は認められなかった。

【ヘルパープラスミド】

ヘルパープラスミドの作製にあたっては、2つの末端配列のうちの1つを削除して、カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーターを挿入した。これにより、カイコ
5 5
の細胞中で *piggyBac* 転移酵素が発現し、同時に注入したドナープラスミドの *piggyBac*
末端配列の間にある目的遺伝子がカイコのゲノム中に挿入される。一方、ヘルパープラスミド
10 5
自体は末端配列を1つ欠損しているため、カイコのゲノム中に挿入されない（図5）。

(2) ベクターに関する情報

10 イ 名称及び由来

本遺伝子組換えカイコの作出に用いたベクターは大腸菌 *Escherichia coli* 由来の pUC18 である。

転移因子 *piggyBac* を pUC18 に挿入して p3E1.2 が得られる (Cary *et al.*, 1989; 図7)。
ドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius は、p3E1.2 にキヌレニン酸化酵素遺伝子発
15 15
現カセットと青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子発現カセ
ットを挿入して得られた（図7）。

ドナープラスミドの2つの転写因子 *piggyBac* 末端配列及びその内側を含む領域をカイコゲノムに挿入するため、この末端配列を認識してカイコゲノム中に挿入する
20 20
piggyBac 転移酵素を供給するヘルパープラスミド pHA3PIG を用いている (Tamura *et al.*, 2000; 図8)。pHA3PIG は細胞質アクチン A3 遺伝子プロモーターの働きで *piggyBac*
転移酵素を発現させるが、末端配列の一つを欠損させているため、それ自体はカイコゲ
ノム中には挿入されない（図5）。

ロ 特性

25 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

pUC18 の塩基数は 2,686 bp。塩基配列はアクセッション番号 L08752 を参照。

pUC18 に転移因子 *piggyBac* を挿入した p3E1.2 の塩基数は 5,958 bp。塩基配列は
piggyBac Website (<http://piggybac.bio.nd.edu/>) は閉鎖されています。

ドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius の塩基数は 10,424 bp。目的遺伝子の塩基
30 30
配列は別添 10 を参照。

ヘルパープラスミド pHA3PIG の塩基数は 6,160 bp。塩基配列は別添 11 を参照。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pUC18 には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、アンピシリン耐性を発現する遺伝子が含まれるものの、外骨格領域に位置しているため、本遺伝子
35 35

組換えカイコのゲノム中にこの遺伝子は導入されていない。

p3E1.2 には、*piggyBac* 転移酵素遺伝子及びその両側の末端配列からなる転移因子 *piggyBac* の全体が含まれる。

5 ドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius においては、p3E1.2 から *piggyBac* 転移酵素遺伝子が除去されている。

ヘルパープラスミド pHA3PIG には、カイコの細胞での遺伝子発現を規定する細胞質アクチン A3 遺伝子プロモーターと、その下流に接続された *piggyBac* 転移酵素遺伝子が含まれる (図 8)。作製にあたっては、2つの末端配列のうちの1つを削除して、カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーターを挿入した。これにより、カイコ
10 細胞中で *piggyBac* 転移酵素が発現し、同時に注入したドナープラスミドの *piggyBac* 末端配列の間にある目的遺伝子がカイコのゲノム中に挿入される。一方、ヘルパープラスミド自体は末端配列を1つ欠損しているため、カイコのゲノム中に挿入されない (図 5)。

15 ③ ベクターの伝染性・病原性の有無及び伝染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報

ベクターの伝染性・病原性はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

20 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

ドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius で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を図 6 に示す。2つの *piggyBac* 末端配列の間に、選抜マーカーであるキヌレニン酸化酵素遺伝子発現カセットと、蛍光絹糸の生産を目的とした青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子の発現カセットが挿入され
25 ている。

ベクターへの供与核酸の挿入方法の要点を図 7 に示す。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

ドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius (図 6) をヘルパープラスミド pHA3PIG (図
30 8) とともに受精卵 (胚) へ顕微注入することで移入した (図 10)。ヘルパープラスミドは *piggyBac* の 2つの末端配列のうち1つを欠損しているために、それ自体がカイコゲノム中に転移することはない。プラスミドを注入された胚の中の生殖細胞系列で *piggyBac* 転移酵素が働いて供与核酸がカイコゲノム中に挿入されると、その次の世代で遺伝子組換えカイコを選抜することができる (図 10)。

35

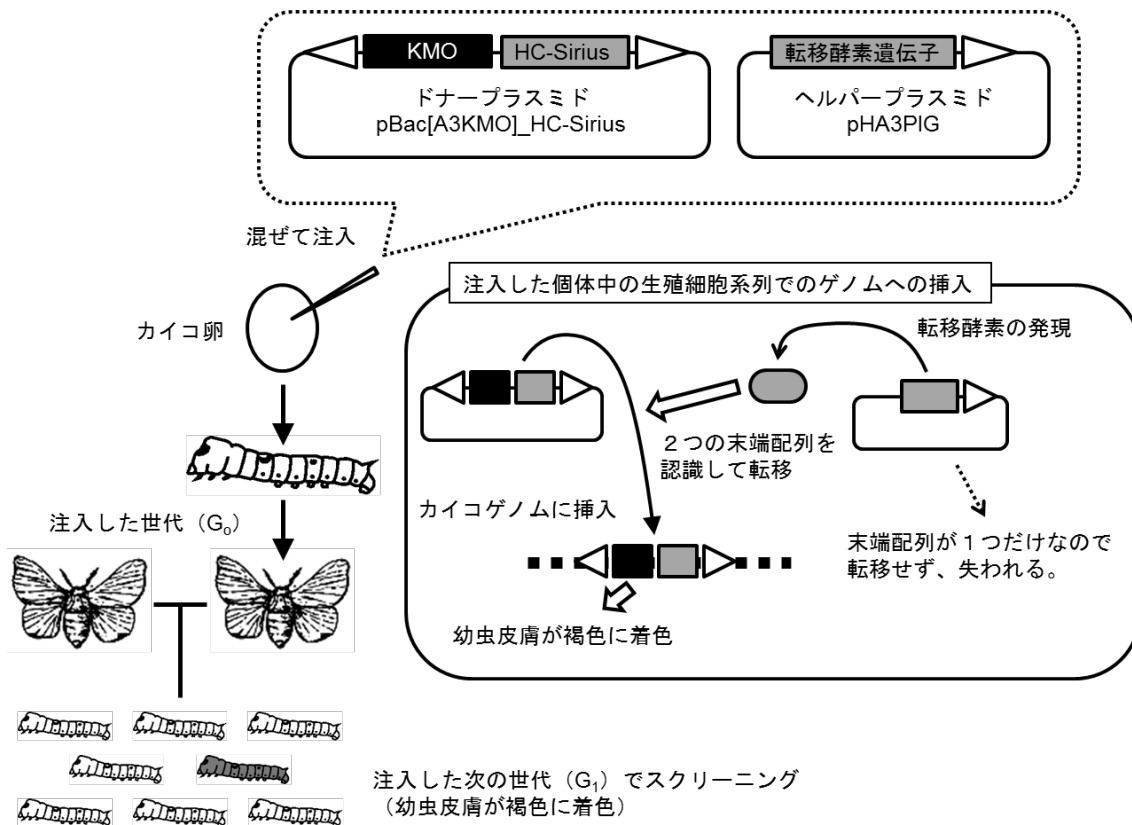


図 10. 本遺伝子組換えカイコの作製方法

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

5 ① 核酸が移入された個体の選抜の方法

ドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius とヘルパープラスミド pHA3PIG を顕微注入された受精卵から孵化した幼虫 (G₀、図 10 及び 11) を成虫まで飼育し、兄妹交配を行って産卵させた。遺伝子組換え個体は 1 齢幼虫の皮膚が褐色を呈することから、1 齢幼虫の体色を観察し、褐色を呈している個体を選抜した。合わせて、繭糸での青色蛍光の発現も確認した。

10

* 生物多様性影響評価に必要な情報収集での供試系統 (表3を参照)

○ 兄妹交配

┌───┐
└───┘
本申請の範囲

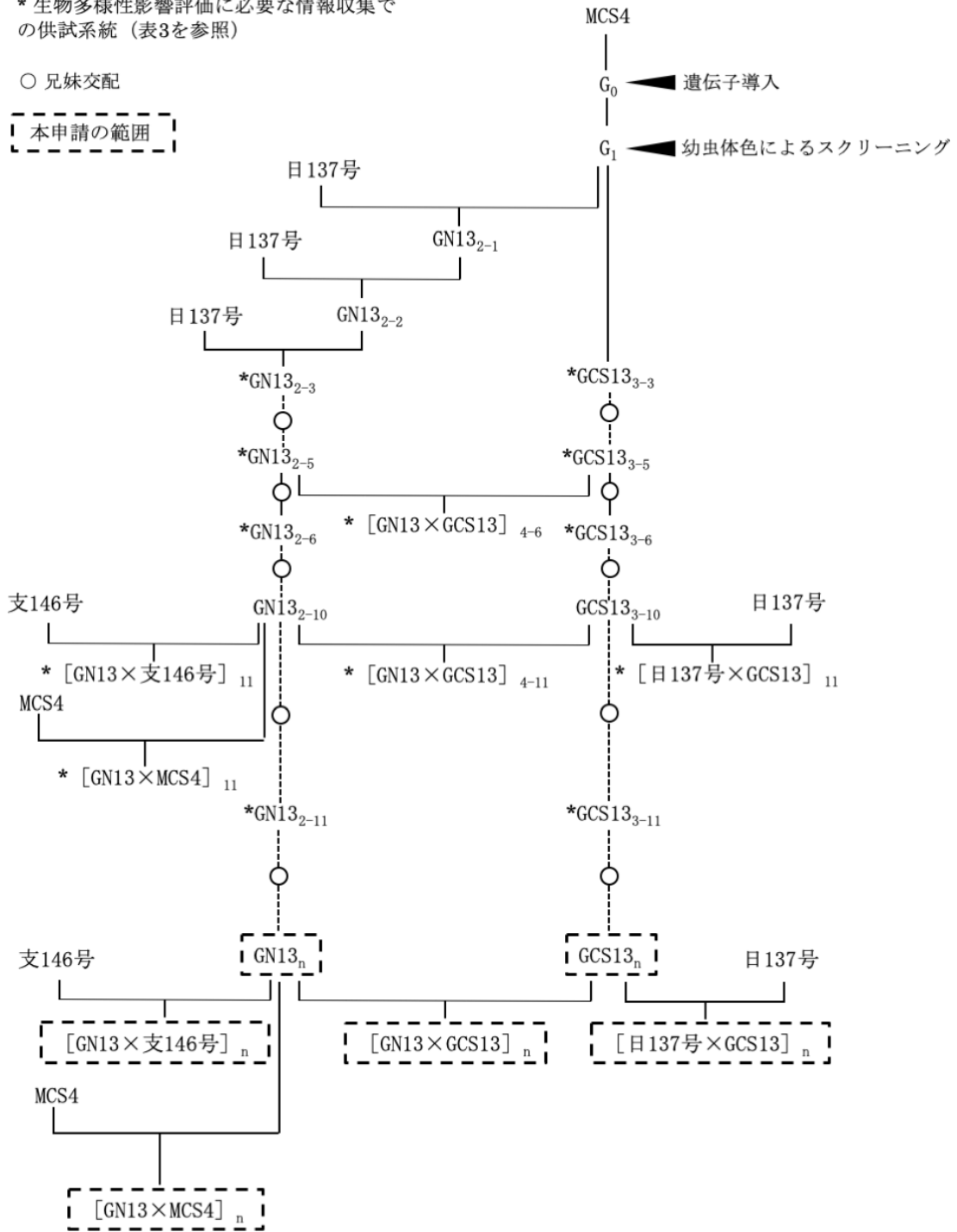


図 11. 本遺伝子組換えカイコの育成経過と世代番号

表3 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために行った試験

(世代番号は図11を参照)

試験項目	飼育世代と飼育年次							
	GN13 _{2,3}	GCS13 _{3,3}	GN13 _{2,5}	GCS13 _{3,5}	GN13 _{2,6}		GCS13 _{3,6}	
	2012	2012	2014	2014	2014	2015	2014	2015
導入した遺伝子の安定性 (サザン解析)			○	○	○		○	
ヘルパーの残存 (PCR)	○	○						
コピー数の確認	○	○						
遺伝子の発現状態 (繭蛍光)			○	○		○		○
生理学的特性 (幼虫の体重) (産卵数) (孵化率) (幼虫期間) (営繭率) (繭重) (繭層重) (幼虫の行動) (産卵行動)								
有害物質の発生性								

試験項目	飼育世代と飼育年次				
	[GN13×GCS13] _{4,6}		GN13 _{2,11}	GCS13 _{3,11}	[GN13×GCS13] _{4,11}
	2013	2014	2019	2019	2019
導入した遺伝子の安定性 (サザン解析)		○			

ヘルパーの 残存 (PCR)					
コピー数の確認					
遺伝子の発現状 態 (蘭蛍光)					
生理学的特性					
(幼虫の体重)		○			
(産卵数)		○	○	○	○
(孵化率)	○		○	○	○
(幼虫期間)		○	○	○	○
(営蘭率)		○	○	○	○
(蘭重)		○	○	○	○
(蘭層重)		○	○	○	○
(幼虫の行動)		○			
(産卵行動)		○			
有害物質の 産生性		○			

試験項目	飼育世代と飼育年次		
	[GN13×MCS4] Ⅱ	[GN13×支 146 号] Ⅱ	[日 137 号×GCS13] Ⅱ
	2019	2019	2019
導入した遺伝子 の安定性 (サザン解析)			
ヘルパーの 残存 (PCR)			
コピー数の確認			
遺伝子の発現状 態 (蘭蛍光)			
生理学的特性			
(幼虫の体重)			

(産卵数)	○	○	○
(孵化率)	○	○	○
(幼虫期間)	○	○	○
(営繭率)	○	○	○
(繭重)	○	○	○
(繭層重)	○	○	○
(幼虫の行動)			
(産卵行動)			
有害物質の 産生性			

② ドナープラスミドにおいて *piggyBac* 転移酵素遺伝子が欠落していることの確認

作製したドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius において *piggyBac* 転移酵素遺伝子が存在していないことを、当該プラスミドの塩基配列解読により確認した。

5

③ ドナープラスミドにおける核多角体病ウイルスゲノムの断片の有無

作製したドナープラスミド pBac[A3KMO]_HC-Sirius において、転移因子 *piggyBac* のクローニングの過程で、AcNPV (*Autographa californica nucleopolyhedrovirus*) のゲノムに由来する *FP* 遺伝子 (全長 642 bp) の 5' 側断片 (340 bp) と *lef9* 遺伝子 (全長 1,548 bp) の 5' 側断片 (469 bp) が残っている。いずれの断片も、*piggyBac* 末端配列の外側にあり、カイコゲノム中には挿入されない。

10

④ ヘルパープラスミドの残存性

遺伝子組換えカイコ (GN13₂₋₃ 及び GCS13₃₋₃、図 11) の 5 齢幼虫の後部絹糸腺から抽出したゲノム DNA を鋳型として、転移酵素遺伝子の一部を PCR により増幅した。PCR に用いたプライマーと増幅する断片の位置を図 8 に示す。試験の結果、GN13₂₋₃ 及び GCS13₃₋₃ の遺伝子組換えカイコのゲノム DNA から *piggyBac* 転移酵素遺伝子の増幅は認められなかった (別添 12)。このことから、遺伝子組換えカイコにはヘルパープラスミドの配列が残存していないことが確認できた。

20

⑤ 生物多様性影響評価に必要な情報を収集するまでに用いられた系統の育成の経過

遺伝子組換えカイコは、旧・農業生物資源研究所 (現・農研機構) において MCS4 への遺伝子導入により作出した。幼虫皮膚の着色及び繭糸での青色蛍光の発現が認めら

れる G₁ 世代を選抜して兄妹交配した後代から、目的遺伝子を持つように選抜し、GCS13 とした。一方、G₁ 世代を実用系統の日 137 号と交配し、目的遺伝子を持つように選抜して GN13 を樹立した。雑種強勢の特性を発揮するように、GN13 と GCS13 を交配し、[GN13×GCS13] を育成した。また、GN13 を支 146 号又は MCS4 と交配し、[GN13×支 146 号] と [GN13×MCS4] を育成した。さらに、GCS13 を日 137 号と交配した [日 137 号×GCS13] を育成した。試験には、GN13、GCS13 及び [GN13×GCS13] の他に、GN13 を支 146 号又は MCS4 と交配した [GN13×支 146 号] 又は [GN13×MCS4]、日 137 号を GCS13 と交配して作出した [日 137 号×GCS13] を用いた。育成経過を図 11 に、試験を実施した世代を表 3 に示す。

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

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所及びコピー数

遺伝子組換えカイコ (GN13₂₋₃) と非遺伝子組換えカイコ (白/C) との F₁ に、非遺伝子組換えカイコ (白/C) を戻し交配して、次代での分離を繭糸での Sirius2 による青色蛍光の発現により調査したところ、陽性個体と陰性個体が 1:1 に分離したことから、移入された遺伝子は染色体上に 1 コピー挿入されていると判断した (別添 13)。

遺伝子組換えカイコ (GCS13₃₋₃) についても同様に非遺伝子組換えカイコ (白/C) との F₁ に、非遺伝子組換えカイコ (白/C) を戻し交配して、次代での分離を繭糸での Sirius2 による青色蛍光の発現により調査したところ、陽性個体と陰性個体が 1:1 に分離したことから、移入された遺伝子は染色体上に 1 コピー挿入されていると判断した (別添 13)。

20

ロ 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

移入された核酸の複製物が安定的に伝達されることを確認するため、遺伝子組換えカイコの複数の世代 (GN13₂₋₅、GCS13₃₋₅、GN13₂₋₆、GCS13₃₋₆、[GN13×GCS13]₄₋₆) 及び非遺伝子組換えカイコについて、5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、遺伝子組換えカイコのすべての個体からすべて同じサイズのバンドが 1 本だけ検出されたことから、導入した遺伝子はカイコゲノムに安定的に維持されていると判断した (別添 14)。

25

なお、カイコゲノム中に、*piggyBac* を転移させる活性を持つ転移酵素をコードする遺伝子の存在は報告されていない。

30

ハ 移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での形質発現の安定性

移入された核酸の複製物から目的遺伝子が安定的に発現されることを確認するため、遺伝子組換えカイコの複数の世代 (GN13₂₋₅、GCS13₃₋₅、GN13₂₋₆、GCS13₃₋₆) 及び非遺伝子組換えカイコについて繭の青色蛍光を確認したところ、遺伝子組換えカイコの繭はすべ

35

て青色蛍光を発現し、一方、非遺伝子組換え個体の繭はいずれも青色蛍光を発現しなかったことから（別添 15）、遺伝子組換えカイコの後代において目的遺伝子がゲノム中に安定的に維持され、目的遺伝子が発現していることを確認した。

5 (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

別添 14 に示したサザンハイブリダイゼーションにより、遺伝子組換えカイコの複数の世代（GN13₂₋₅、GN13₂₋₆、GCS13₃₋₅、GCS13₃₋₆ 及び [GN13×GCS13]₄₋₆）で同等のシグナルを得ることができる。非遺伝子組換えカイコでは常にシグナルが得られなかったことから、2 μg のゲノム DNA を用いることにより、感度良く、かつ、科学的に信頼性の高いゲノムサザンハイブリダイゼーション法により、非遺伝子組換え個体と区別して、遺伝子組換えカイコを検出することが可能である。

(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

15 本遺伝子組換えカイコでは、導入された青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子を、フィブロイン H 鎖遺伝子プロモーターの制御下で幼虫の後部絹糸腺で発現させる。産生された青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質は内在性のフィブロイン H 鎖と会合することから、この導入遺伝子を持つ本遺伝子組換えカイコは青色蛍光を発するタンパク質を含む絹糸を産生する。

20 また、選抜マーカーとして、A3 プロモーターの制御下でキヌレニン酸化酵素の遺伝子を発現させることにより、1 齢幼虫の皮膚が褐色を呈する。

青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質は、繊維タンパク質であるフィブロイン H 鎖と青色蛍光タンパク質である Sirius2 タンパク質の融合タンパク質であり、いずれのタンパク質も他の物質を変化させるような酵素活性を有していないことから、宿主の持つ代謝系を変化させる機能を有していないと考えられる。キヌレニン酸化酵素はカイコに内在する酵素であり、オモクローム色素の生合成系において、キヌレニンから 3-ヒドロキシキヌレニンを生成する酸化反応を触媒することから、A3 プロモーターの制御下の全身で発現させることにより、オモクローム色素の生成を促進していると考えられる。

30

ロ 生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との間の相違

35 生理学的及び生態学的特性を調査するために、農家で主に飼育する交雑種を想定して、遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] 及び非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4] の形質を調査・比較した（図 12）。幼虫の体重、繭重及び繭層重、幼虫期間、幼虫の行動、

産卵行動及び産卵数の調査においては、稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育した。それ以外の調査においては、全齢を桑葉で飼育した。調査は、拡散防止措置を執った第二種使用等として、制御された条件で飼育して詳細に実施したほか、隔離飼育区画での第一種使用等として、群馬県蚕糸技術センターで 3 年（計 7 回）、養蚕農家の蚕室と同様に外気温等の影響を受ける施設で養蚕農家と同様の手順で飼育して、幼虫の生育や行動、繭を形成する割合などを調査した（図 12, 別添 26）。

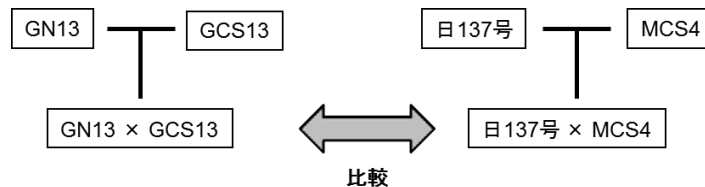


図 12. 隔離飼育区画での試験における生理学的・生態学的特性を比較する対象

10 加えて、遺伝子組換えカイコ（GN13₂₋₁₁、GCS13₃₋₁₁、[GN13×GCS13]₄₋₁₁、[GN13×MCS4]₁₁、[GN13×支 146 号]₁₁、[日 137 号×GCS13]₁₁）及び非遺伝子組換えカイコ（日 137 号、支 146 号、MCS4、[日 137 号×支 146 号]、[日 137 号×MCS4]）の生理学的及び生態学的特性を研究における第二種使用等として制御された条件下で飼育して、追加試験を行った（別添 27）。産卵数、孵化率、幼虫期間、営繭率、繭重及び繭層重の調査では、
15 全齢にわたり桑葉で飼育した。追加試験に用いた非遺伝子組換えカイコの 5 系統は、遺伝子組換えカイコの 6 系統と同様に実用品種であり、また、当該試験に用いた遺伝子組換えカイコと遺伝的背景が近いため、比較対象として用いた。[GN13×GCS13]₄₋₁₁ は、隔離飼育区画で用いた系統と世代が異なること並びに飼育条件が異なることから、追加試験に用いた。

20

① 形態の特性

遺伝子組換えカイコ：[GN13×GCS13] の場合

幼虫の各齢期の初めの摂食前に体重を調査したところ、2 齢及び 3 齢では遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコより体重が軽く、統計学的な有意差が認められたが（別添 16、 $P < 0.01$ ）、1 齢、4 齢及び 5 齢では遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった（別添 16、 $P > 0.40$ ）。[GN13×GCS13] 及び [日 137 号×MCS4] の遺伝的背景は、互いに非常に近いが、GN13 の作成過程に MCS4 を用いており、全く同一というわけではない。このことから、この差異は遺伝的背景の小さな差に由来すると考えられた。

30 蛹を含む繭の重さ（繭重）及び蛹と脱皮殻を除いた繭だけの重さ（繭層重）を比較するため、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて雌雄ごとに計測したところ、繭重も繭層重も遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で統

計学的な有意差は認められなかった (別添 17、 $P > 0.25$)。

繭色は、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコともに自然光の下では白色であるが、遺伝子組換えカイコの繭は紫外線を励起光として青色蛍光を発した (別添 15)。繭形はどちらも楕円であった。

5

遺伝子組換えカイコ：(GN13、GCS13、[GN13×GCS13]、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) の場合

10 遺伝子組換えカイコ系統の幼虫の体重は測定していないが、飼育中に観察した遺伝子組換えカイコのすべての系統の幼虫の大きさは、非遺伝子組換えカイコと大きな違いは見られなかった。

15 繭重では、[GN13×GCS13] が雌雄ともに一番高い値を示したが、非遺伝子組換えカイコ系統と比較したところ、系統や雌雄によって統計学的な有意差の有無が混在することから、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であると考えられた (別添 27)。その他の遺伝子組換えカイコ系統 (GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) の繭重についても非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であると考えられ、その他の遺伝子組換えカイコ系統の繭重は増加していないことから、導入した遺伝子の発現に起因するものではないと考えられた。

20 繭層重では、遺伝子組換えカイコ系統と非遺伝子組換えカイコ系統との統計学的な有意差を調べたが、系統や雌雄によって統計学的な有意差の有無が混在することから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であると考えられた。(別添 27)。

25 繭の青色蛍光を調べたところ、すべての遺伝子組換えカイコ系統で紫外線を励起光として青色蛍光を発した。遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコの繭形はどれも楕円であった。

25

② 生育の特性

遺伝子組換えカイコ：[GN13×GCS13] の場合

30 受精卵のうち幼虫が孵化する割合である孵化歩合 (孵化率) を調査したところ、遺伝子組換えカイコは 98.6%、非遺伝子組換えカイコは 98.5%となり、統計学的な有意差は認められなかった (別添 18、 $P = 0.66$)。

35 幼虫期間として、孵化幼虫に最初の給餌を行ってから、繭形成開始に伴って給餌を停止するまでの期間を調査したところ、メスでは、遺伝子組換えカイコは 23.5 日、非遺伝子組換えカイコは 23.1 日、オスでは、遺伝子組換えカイコは 23.2 日、非遺伝子組換えカイコは 23.0 日であり、遺伝子組換えカイコのほうが 0.2~0.4 日長かった (別添 19、メスで $P < 0.01$ 、オスで $P = 0.033$)。なお、遺伝子組換えカイコ及び非遺

伝子組換えカイコはいずれも完全変態を行い、卵・幼虫・蛹・成虫の各段階を経る。

5 遺伝子組換えカイコは、非遺伝子組換えカイコと同様、桑葉又は桑葉を含む人工飼料を幼虫期に摂食して成長する。4 齢幼虫からは、繭質や収繭量の向上及び飼料のコスト低減のために桑葉を摂食させることが有効であり、特に、枝に付いたままの桑葉
5 を与える条桑育により労力も低減できる。なお、成虫は摂食も飲水も行わない。

遺伝子組換えカイコ：(GN13、GCS13、[GN13×GCS13]、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) の場合

10 GCS13、[GN13×GCS13] 及び [日 137 号×GCS13] の孵化歩合はそれぞれ 98.1%、97.2%及び 97.9%であり（別添 27）、すべての非遺伝子組換えカイコ系統より少し高かったが、統計学的な有意差の有無を調べたところ、系統や雌雄によって統計学的な有意差の有無が混在することから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、
15 非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であると考えられた。その他の遺伝子組換えカイコ系統（GN13、[GN13×MCS4] 及び [GN13×支 146 号]）の孵化歩合も非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であると考えられた。

[GN13×GCS13] の幼虫期間は 22.96 日であり、非遺伝子組換えカイコとの差は小さく、その他の遺伝子組換えカイコ系統（GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]）では非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であった（別添 27）。

20

③ 生存能力

遺伝子組換えカイコ：[GN13×GCS13] の場合

25 4 齢幼虫の最初から繭を作るまでに至った個体数の割合である営繭率を見ると、遺伝子組換えカイコが 89.5%、非遺伝子組換えカイコが 96.5%であり、2 試料間で統計学的な有意差が認められた（別添 20、 $P=0.012$ ）。このことから、遺伝子組換えカイコの生存能力は、導入した遺伝子の発現によって高まるものではないと考えられた。

遺伝子組換えカイコ：(GN13、GCS13、[GN13×GCS13]、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) の場合

30 [日 137 号×GCS13] の営繭率は 98.5%であり、非遺伝子組換えカイコよりも高かったが、その差はわずか 0.5%であった（別添 27）。その他の遺伝子組換えカイコ系統（GN13、GCS13、[GN13×GCS13]、[GN13×MCS4] 及び [GN13×支 146 号]）の営繭率は上昇していないことから、導入した遺伝子の発現に起因するものではないと考えられた。

35

④ 運動能力

遺伝子組換えカイコ：[GN13×GCS13] の場合

5 幼虫が移動する範囲を比較するため、半径 18 cm の円形の枠の中心に 5 齢幼虫を 1 頭ずつ置き、12 時間後に元の位置からの距離を計測した。遺伝子組換えカイコの平均は 2.2 cm、非遺伝子組換えカイコの平均は 3.4 cm となって、統計学的な有意差が認められた (別添 21、 $P=0.037$)。このことから、遺伝子組換えカイコの運動能力は、導入した遺伝子の発現によって高まるものではないと考えられた。

10 遺伝子組換えカイコ：(GN13、GCS13、[GN13×GCS13]、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) の場合

15 遺伝子組換えカイコの運動能力に関する試験は行っていないが、飼育中に観察したところ、遺伝子組換えカイコのすべての系統の幼虫は、飼育容器から這い出すことはなく、遺伝子組換えカイコの移動範囲は、非遺伝子組換えカイコとの違いが認められなかった。このことから、遺伝子組換えカイコ系統の運動能力は、導入した遺伝子の発現によって高まるものではなく、[GN13×GCS13] 及び [日 137 号×MCS4] の試験結果と大きく変わらないと推測できる。

⑤ 繁殖様式

20 遺伝子組換えカイコ：[GN13×GCS13] の場合

カイコは有性生殖により繁殖する。

25 メス成虫 1 頭当たりの産卵数を比較するため、半径 18 cm の円形の枠の中心に、交尾後のメス成虫を 1 頭ずつ 24 時間置いて産卵数を調査した。遺伝子組換えカイコの平均は 628 個、非遺伝子組換えカイコの平均は 721 個となって、統計学的な有意差が認められた (別添 22、 $P < 0.001$)。このことから、遺伝子組換えカイコの産卵数は、導入した遺伝子の発現によって高まるものではないと考えられた。

30 メス成虫の産卵行動を比較するため、産卵数の調査に合わせて、産み付けられた卵 1 個ずつの中心からの距離を計測した。半径 18 cm の枠まで到達した場合があったため、距離の平均値を出すことはできなかったが、距離の分布を比較したところ、遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコよりも狭い範囲に産卵していて、統計学的な有意差が認められた (別添 23、 $P < 0.001$)。このことから、遺伝子組換えカイコの産卵行動は、導入した遺伝子の発現によって高まるものではないと考えられた。

35 遺伝子組換えカイコ：(GN13、GCS13、[GN13×GCS13]、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) の場合

5 遺伝子組換えカイコ（GN13、GCS13、[GN13×GCS13]、[GN13×MCS4]、[GN13×支146号]及び[日137号×GCS13]）の産卵数はそれぞれ508.3、555.8、527.2、486.5、529.0、及び489.5個となり、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であり、産卵数が導入した遺伝子の発現によって高まるものではないと考えられた（別添27）。

⑥ 脱皮・変態・休眠等

10 2016年から3年にわたって隔離飼育区画において[GN13×GCS13]及び[日137号×MCS4]をそれぞれ11.7万及び6.4万頭を飼育したところ、3眠蚕（幼虫脱皮：3回）の発生率はそれぞれ0.002%（2頭）及び0.003%（2頭）であり、ほとんど3眠蚕は発生しなかった（別添26）。

15 第二種使用等の条件下で[GN13×GCS13]、GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支146号]及び[日137号×GCS13]をそれぞれ200頭飼育した際は、3眠蚕は発生しなかった。これらのことから、遺伝子組換えカイコ系統の幼虫脱皮の回数は、基本的に4回であり、非遺伝子組換えカイコと同様の脱皮・変態であった。

また、遺伝子組換えカイコ同士、非遺伝子組換えカイコ同士を交配すると休眠卵を産む。以上のことから、内分泌系ホルモンの制御機能に違いはないものと考えられる。

⑦ クワコとの交雑の可能性

20 一般的な養蚕農家の施設を模して群馬県蚕糸技術センターに設置した隔離飼育区画において、クワコ成虫の侵入を防ぐために飼育室の窓に網を設置するなど一定の交雑防止措置を講じつつ、遺伝子組換えカイコの第一種使用等の内容に沿って4齢幼虫から繭の収穫までの各過程において、遺伝子組換えカイコ[GN13×GCS13]と非遺伝子組換えカイコ[日137号×MCS4]の行動や生育等の特性を比較しながらカイコとクワコの交雑可能性を以下の通り調査した（別添26）。

a) 幼虫の飼育

30 養蚕農家の飼育段階において遺伝子組換えカイコ及び対象の非遺伝子組換えカイコの行動等の特性を詳細に調査するため、2016年7月から2018年9月にかけて群馬県蚕糸技術センター（群馬県前橋市）の隔離飼育区画において7回（1回あたり遺伝子組換えカイコ3,052～47,946頭、非遺伝子組換えカイコ2,988～11,980頭）の比較調査を実施した（別添26【調査方法】）。

35 遺伝子組換えカイコは対照の非遺伝子組換えカイコとの間で行動特性において特段の違いは見られず、幼虫が飼育容器外で見つかった個体数は、摂食期には、1回・1室あたり遺伝子組換えカイコの比較用試験区で飼育数3,052～5,987頭のうち0頭

(0%)、遺伝子組換えカイコの繭生産用試験区で飼育数 6,004~18,002 頭のうち 0~1 頭 (0~0.02%)、非遺伝子組換えカイコで 2,988~5,992 頭のうち 0 頭 (0%) であった (別添 26【結果】(1))。また、熟蚕期には、遺伝子組換えカイコの繭生産用試験区で飼育数 6,004~18,002 頭のうち 0~1 頭 (0~0.006%) のほかは、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコの比較用試験区でどちらも 0 頭であった (別添 26【結果】(1))。

いずれの場合も、飼育容器外で見つかった幼虫はきわめて少数であり、それも、桑葉を与えるなどの作業中に落ちたことが主な原因だと考えられた。なお、すべての試験において、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコが飼育室の外に這い出るような現象は認められなかった。

また、カイコ幼虫が通常より 1 回少ない 3 回の脱皮の後に蛹になる、いわゆる三眠蚕が生じる程度を調査したところ、飼育試験 1 回・1 室あたり、遺伝子組換えカイコの比較用試験区で飼育数 3,052~5,987 頭のうち 0~2 頭 (0~0.03%)、遺伝子組換えカイコの繭生産用試験区で飼育数 6,004~18,002 頭のうち 0 頭 (0%)、非遺伝子組換えカイコで 2,988~5,992 頭のうち 0~1 頭 (0~0.02%) であった (別添 26【結果】(1))。幼虫の飼育中に早期に繭を形成する三眠蚕が生じる可能性は一般的なカイコ系統と同様に極めて低いという結果が得られた。また、いずれの場合も、成虫の発生には至らなかった (別添 26【結果】(3))。

なお、上述の隔離飼育区画での飼育試験中に飼育室内にクワコ成虫が侵入する可能性についても、毎回の飼育作業時に飼育室内や飼育容器内を目視で確認して調査したが、飼育試験 1 回・1 室あたり、クワコの幼虫が 0~8 頭、クワコの繭が 0~7 個、いずれも餌の桑葉とともに持ち込まれているのが認められたほか、クワコの成虫が 0~3 頭存在しているのが認められたが、毎回の作業の出入りの際にクワコの成虫が出入りしていないことは確認しており、桑葉とともに持ち込まれた繭から羽化したものであると考えられた (別添 26【結果】(1))。本飼育試験においては、飼育室内で見つかったクワコの幼虫や繭、成虫はすべてその場で殺虫処理しているが、養蚕農家等の飼育室内で仮にクワコの成虫が羽化したとしても、餌を与えている時期の飼育室にはカイコの幼虫しかいないためカイコの成虫と交尾することは考えにくい。また、万一飼育室内でカイコのメス成虫とクワコのオス成虫が交尾したとしても、飼育室内で産卵するにすぎず、産下された卵から孵化した幼虫が飼育室外に出て生育することはおよそ考えられない。

b) 繭の形成

上述の隔離飼育区画で飼育されたカイコ幼虫については、幼虫期の最後に摂食を停止して繭を作る段階になったところで、同じ飼育室内において、繭を作らせるため

の容器である蔭（まぶし）に幼虫を移して天井から懸垂し、そのまま飼育室内で繭を作らせる上蔭を行った。その際、蔭から落下した幼虫や蔭を吊るす器具を上がっている幼虫を毎日回収して健全な幼虫は蔭に戻し、生育不良の幼虫は廃棄するという方法で繭を作らせた。蔭の中に繭を形成したのは、飼育試験 1 回・1 室あたり、遺伝子組換えカイコの比較用試験区で飼育数 3,052～5,987 頭のうち 2,541～5,987 頭 (42.6～86.3%)、非遺伝子組換えカイコで 2,988～5,992 頭のうち 1,024～5,300 頭 (27.4～87.7%) であった (別添 26【結果】(2))。2017 年 9 月には非遺伝子組換えカイコで飼育中に死亡した個体や上蔭時に蔭から落下して廃棄した死亡個体や生育不良の個体が多くなった。この飼育期に飼育試験では、対照として使用するために用意された非遺伝子組換えカイコの卵の数が少なく、飼育個体数を確保するため、通常は使用しないような産卵数や受精率が低い蛾区 (1 頭のメス成虫が産んだ卵の集団) も使用した。以上のことから、生育不良の個体が多く含まれることとなった可能性がある。2018 年 7 月には上蔭後に蔭内で死亡した個体や、蔭から落下して廃棄した死亡個体や生育不良の個体が多くなった。これは、2018 年夏に日中の室温が 37℃を超えるなど、例年になく気温が高かったためと考えられ、上蔭の前までの飼育中に死亡して繭収穫時の調査に残らなかった遺伝子組換えカイコがパイプハウス蚕室で 35%、プレハブ蚕室で 28%に達した。

また、これら上蔭の過程において、飼育室内で遺伝子組換えカイコも非遺伝子組換えカイコも成虫が生じるようなことはなかった。

20 c) 飼育残渣

飼育後に残るクワの枝などの飼育残渣には、カイコの繭が残り、飼育残渣が野外に廃棄される際に当該繭が羽化して野外でカイコ成虫が生じる可能性があるため、カイコ成虫が生存可能な期間を考慮して少なくとも 30 日以上は 4 mm 目以下の網で覆うか、飼育後に飼育残渣を粉碎処理することによって、カイコの不活化を図ることとしている。このため、これら飼育残渣の不活化処理の効果を確認するため、飼育残渣の繭等の混入率や生存状況を調査した。

飼育室に隣接する残渣処理室に飼育残渣を運び、粉碎機で飼育残渣を粉碎する前に飼育残渣の中のクワの枝を 1 本ずつ確認したところ、見つかった繭は、1 回・1 室あたり遺伝子組換えカイコで飼育数 3,052～5,987 頭のうち 0～20 頭 (0～0.3%)、非遺伝子組換えカイコで 2,988～5,992 頭のうち 0～17 頭 (0～0.05%) であり、幼虫は、死亡個体も含めて、遺伝子組換えカイコで 5～146 頭 (0.08～2.4%)、非遺伝子組換えカイコで 0～43 頭 (0～1.2%) であった (別添 26【結果】(4))。

なお、粉碎機による不活化の程度を確認するため、別に、非遺伝子組換えカイコの繭や幼虫を飼育残渣に意図的に混入させて粉碎機による不活化試験を実施した。具

体的には、クワの枝 2 kg または食べ残しの葉と糞 2.5 kg に 4 齢幼虫 200 頭を混入させた場合、クワの枝 2 kg または食べ残しの葉と糞 2 kg に 5 齢幼虫 20 頭を混入させた場合、クワの枝 2 kg または食べ残しの葉と糞 2 kg に繭 10 個を混入させた場合について、カイコの不活化の程度を確認したが、いずれも、幼虫や繭は確実に裁断又は
5 圧殺されて生存個体は認められなかった。

d) モニタリング

10 隔離飼育区画 (1,700 m²) の外側 4 カ所で、カイコとクワコの性フェロモン (ボンピコール) を誘引源とするフェロモントラップを 6 月から 12 月まで継続的に設置し、クワコのオス成虫を捕獲して、遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] との交雑個体の有無を調査し、2016 年からの 4 年間で計 1,399 頭が捕獲された (別添 26 【結果】 (5))。

15 遺伝子検査の結果、*Sirius2* 遺伝子を保有する個体は検出されなかった (別添 26 【結果】 (5))。

「⑦ クワコとの交雑の可能性」に関する隔離飼育区画における飼育試験では、遺伝子組換えカイコ GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13] を用いていないが、「① 形態の特性、② 生育の特性、③ 生存能力、④ 運動能力、⑤ 繁殖様式、⑥ 脱皮・変態・休眠等」について調査・比較した。GCS13 及び [日 137 号×GCS13] の孵化歩合が少し高かったが、非遺伝子組換えカイコとの統計学的な有意差を調べたところ、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であることから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、非遺伝子組換えカイコの能力を超える生理学的又は生態学的特性を持ち合わせていないことが考えられた。
20 [日 137 号×GCS13] の営繭率が少し高かったが、その他の遺伝子組換えカイコでは、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であることから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、非遺伝子組換えカイコの能力を超える生理学的又は生態学的特性を持ち合わせていないことが考えられた。
25

30 以上のことから、GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13] は、「⑦ クワコとの交雑の可能性」の「a) 幼虫の飼育、b) 繭の形成、c) 飼育残渣、d) モニタリング」について、[GN13×GCS13] と同様の作業手順で試験飼育した場合、当該試験結果とそれほど変わらない結果であると推測できる。

35 ⑧ 病原性

カイコが、他の生物に対して病原性を有するという報告はない。また、本遺伝子組

換えカイコが産生する青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質及びキヌレニン酸化酵素が病原性を有するという報告もない。したがって、本遺伝子組換えカイコが他の生物に対して病原性を有するとは考えられない。

5

⑨ 有害物質の産生性

飼育残渣を屋外に廃棄した場合に、そこに含まれる本遺伝子組換えカイコの糞や死体が植物に影響を与える可能性があるかどうか、ブロッコリーの発芽・生育に与える影響を調査したところ、遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] と非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4] との間に差は認められなかった (別添 24)。同様に、土壌微生物に与える影響についても調査したところ、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に差は認められなかった (別添 25)。

また、青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質及びキヌレニン酸化酵素が有害物質であるとの報告はなく、生態系に対し問題を起こすタンパク質とは認識されていない。既知の有毒タンパク質と類似のアミノ酸配列を有するかどうか、Toxin and Toxin Target Database (<http://www.t3db.org/>) で FASTA 検索を行ったところ、既知の有毒タンパク質と類似の配列は認められなかった。また、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうかを、アレルゲンデータベース (Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)、ver. 13、<http://www.allergenonline.org/>) に対して FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと類似の配列は認められなかった。

さらに、養蚕農家においては飼育残渣を廃棄する際はカイコの繭を取り除くなどしていることから、飼育残渣に含まれて屋外に廃棄される可能性のある本遺伝子組換えカイコはきわめて少量であると考えられ、脊椎動物等が捕食することによる有害物質の影響は想定されない。

遺伝子組換えカイコ (GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) について、有害物質の産生性に関する試験は行っていないが、GN13 及び GCS13 は [GN13×GCS13] の親系統であり、[GN13×MCS4] は GN13 と宿主系統 MCS4 との交配後代、[GN13×支 146 号] は GN13 と実用品種の支 146 号との交配後代、[日 137 号×GCS13] は実用品種の日 137 号と GCS13 との交配後代であり、これらの系統は同じイベント由来の遺伝子組換えカイコであることから、新たな有害物質を産生するとは考えられない。

ハ 遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との識別の方法

本遺伝子組換えカイコは絹糸腺や繭に青色蛍光タンパク質を発現することから、非遺

伝子組換えカイコとの区別は容易である。また、別添 14 に示したサザンハイブリダイゼーションにより、非遺伝子組換えカイコと区別して、本遺伝子組換えカイコを感度良く検出及び識別することが可能である。

5 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

カイコの繭糸の生産を目的とした、①幼虫(3 齢幼虫期以降のものに限る。以下同じ。)の飼育、②繭の生産及び加工、③幼虫及び繭の保管、運搬及び廃棄並びに①から③までに付随する行為。

(2) 使用等の方法

使用に当たっては、別に定める第一使用等による飼育等要領に従う。また、別に定めるモニタリング計画書に基づき、申請者によるモニタリングを実施する。

15

(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

モニタリング計画書を参照。

(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

20

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

25

—

(6) 国外における使用等に関する情報

—

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

- カイコは、日本国内においても長期間使用等の歴史があるが、これまでに日本を含めて
- 5 カイコが野外に逸出して自然条件下で繁殖している例は報告されていない。カイコは、人間の管理が行き届かない野外に放置されると、
- ①幼虫は、歩き回ることがなく、食草であるクワに到達することができない(森, 1995)。
- ②野生種であるクワコとは異なり、擬態のための体色や斑紋を欠いており、桑樹に登って隠れることもできず、頭部・胸部を持ち上げて静止することで枝に擬態する行動も
- 10 執らないことなどから、鳥や昆虫に速やかに捕食される(河本ら, 2014; 別添 1)。
- ③オス成虫が生じて、飛ぶことができないため、離れた場所にいるメス成虫に到達することができず、交尾する機会がほとんどない。
- ④メス成虫が生じて、速やかにアリ等に捕食されること等、交尾・産卵する機会がほとんどない(河本ら, 2014)。
- 15 以上のことから、カイコが自然条件下で生存・繁殖する可能性は低い。
- また、食草を同じくする近縁野生種であるクワコと比べても、カイコは、幼虫時の移動能力が低く、成虫は飛翔できない。さらに、クワコとの交尾率が低い(中村ら, 1997; 飯塚・行弘, 2007)など、自然条件下での生育・繁殖においては不利な性質を有していることから、野生のクワコに対する競合において優位性を示すことはない。
- 20
- 本遺伝子組換えカイコは、青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質を絹糸に含むが、このタンパク質は絹糸腺及び繭糸に青色蛍光を付与するにすぎず、幼虫の運動性を高めたり成虫に飛翔能力を付与したりすることもないことから、カイコの競合における優位性を高めることはない。また、遺伝子組換え個体の選抜マーカーであるキヌレニン酸化酵素も、1 齢幼虫の皮膚を褐色にさせるにすぎず、2 齢以降の幼虫の皮膚は白色で非遺伝子組換えカイコと区別できない(Kobayashi *et al.*, 2007)。したがって、本遺伝子組換えカイコも非遺伝子組換えカイコと同様に屋外では他の昆虫等によって容易に捕食されると考えられる(別添 4) こと等から、自然条件下で生存・繁殖する可能性は低く、競合における優位性が高まることはない。
- 25
- 30 遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] 及び非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4] との間で生理学的特性について検討したところ、幼虫体重(2 齢及び 3 齢、別添 16)・幼虫の行動範囲(別添 21)・営繭率(別添 20)・産卵範囲(別添 23)・産卵数(別添 22)については遺伝子組換えカイコのほうが非遺伝子組換えカイコに比べて統計学的に有意に小さく、幼虫体重(1 齢、4 齢、5 齢、別添 16)・繭重と繭層重(別添 17)・孵化歩合(別
- 35 添 18)については遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で有意差は認めら

れなかった。幼虫期間については遺伝子組換えカイコのほうが非遺伝子組換えカイコに比べて雌雄ともに統計学的に有意に長かった（別添 19）が、その差は 0.2～0.4 日程度であり、このことが本遺伝子組換えカイコの競合における優位性を高めるとは考えられない。

- 5 その他の遺伝子組換えカイコ系統（GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]）については、研究における第二種使用等として制御された条件で飼育し、非遺伝子組換えカイコ系統（日 137 号、支 146 号、MCS4、[日 137 号×MCS4]、[日 137 号×支 146 号]）との間で生理学的特性について検討した（別添 27）。[日 137 号×GCS13] の営繭率が少し高かったが、その他の遺伝子組換えカイコ系統（GN13、
10 GCS13、[GN13×MCS4] 及び [GN13×支 146 号]）では、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であることから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、非遺伝子組換えカイコの能力を超える生理学的又は生態学的特性を持ち合わせていないことが考えられた。その他の試験項目（孵化歩合・幼虫期間・繭重・繭層重及び産卵数）では、遺
15 伝子組換えカイコのすべての系統は、どれも非遺伝子組換えカイコ系統の品種間差の範囲内であると考えられた。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの競合における優位性を高めるとは考えられない。

- また、隔離飼育区画において、遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] と非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4] との間で生理学的特性について調査したところ、繭重・繭
20 層重については遺伝子組換えカイコのほうが非遺伝子組換えカイコに比べて小さい場合が多く、幼虫期間は遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で差は認められなかった（別添 26）。幼虫期間を個体別に調査した結果（別添 19）では、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとでは幼虫期間に 0.2～0.4 日の違いがあったが、これは各
25 個体が実際に繭を作り始めた日を調査したものであり、隔離飼育試験において、翌日までに繭を作り始めると考えられる個体の割合を飼育容器ごとに目視で確認した上でまとめて簇に移す場合には影響が生じなかったと考えられた。

- なお、GN13 及び GCS13 は [GN13×GCS13] の親系統であり、[GN13×MCS4] は GN13 と宿主系統 MCS4 との交配後代、[GN13×支 146 号] は GN13 と実用品種の支 146 号との交配後代、[日 137 号×GCS13] は実用品種の日 137 号と GCS13 との交配後代であり、
30 これらの系統は同じイベント由来の遺伝子組換えカイコであることから、[GN13×GCS13] の生理学的特性と大きく変わらないと考えられた。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの使用により、競合における優位性に起因する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

5 —

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10 以上のことから、本遺伝子組換えカイコの使用により、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

2. 捕食性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 カイコは幼虫期に人為的に与えられた桑葉又は人工飼料のみを摂食して成長し、桑葉以外の植物や昆虫等を捕食することはない。また、カイコ幼虫の運動能力は著しく低く、野外に逸出して桑樹を登り、野外で桑葉を摂食して生育した例はこれまで報告されていない。さらに、成虫は摂食や飲水は一切しない。

20 本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質を絹糸腺及び繭糸で発現するほか、選抜マーカーとして全身でキヌレニン酸化酵素を発現するが、これらのタンパク質がカイコ幼虫の食性を変化させたり捕食能力を高めたりするとは考えられない。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの使用により、捕食性に起因する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。

25 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

30

(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、本遺伝子組換えカイコの使用により、捕食性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

35

3. 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

カイコは、弥生時代から日本国内で飼育されているが、これまで野生動植物等の生育に悪影響を及ぼすような有害物質が産生されているとの報告はない。また、養蚕農家においては、飼育中に生じる桑葉等の残渣やカイコの糞・死体などを、敷地内に掘った穴や桑畑に廃棄することが一般的に行われているが、それらの排泄物等が野生動植物等に有害性をもたらすととの報告もない。

本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質として青色蛍光タンパク質 Sirius2 を絹糸腺で発現するが、多くの生物の遺伝子組換えにおいて選抜マーカーなどとして用いられている緑色蛍光タンパク質 GFP にアミノ酸置換を導入したものであり、タンパク質としての特性から考えても、土壤中に混入した場合に他の生物に影響を与えるとは想定されない。また、選抜マーカーとして全身でキヌレニン酸化酵素を発現するが、カイコを始め多くの動物に内在する酵素であり、これも土壤中に混入した場合に他の生物に影響を与えるとは想定されない。また、遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] と非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4] の糞や死体を土壤中に混合し、植物の発芽・生育や土壤微生物に与える影響を比較検討したところ、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった（別添 24 及び 25）。さらに、本遺伝子組換えカイコが発現する青色蛍光タンパク質及びキヌレニン酸化酵素は、既知の有毒タンパク質やアレルゲンと特異的に相同性のあるアミノ酸配列を持たないこと、並びに飼育残渣に含まれて屋外に廃棄される本遺伝子組換えカイコがあったとしてもきわめて少量であると考えられることから、捕食動物への影響も考えられない。

以上のことから本遺伝子組換えカイコの使用により、有害物質の産生性に起因する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。

25 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

30

(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、本遺伝子組換えカイコの利用により、有害物質の産生性に起因する影響を受ける野生動植物等は特定されなかったことから、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

35

4. 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

カイコと交雑可能な近縁野生種としてはクワコとインドクワコが報告されているが、日本国内に分布している昆虫は、北海道から悪石島まで生息しているクワコのみである
5 (吉武, 1988; 河原畑, 1998; 廣森, 2001; Xia et al., 2009; 金井ら, 2013; 別添 1 及び 2)。したがって、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコが特定された。

(2) 影響の具体的内容の評価

10 カイコとその近縁野生種であるクワコとの間では、人為的に交尾させれば交雑個体が生じ (河原畑, 1998)、後代において妊性も確認されている (児玉, 1927; 見波・大場, 1939; 別添 7)。したがって、交雑性に関する具体的な影響としては、本遺伝子組換えカイコ由来の青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子及びキヌレニン酸化酵素遺伝子が当該交雑個体からクワコの集団に浸透し、定着する可能性が考えられた。

15

(3) 影響の生じやすさの評価

日本では、養蚕が弥生時代に中国から伝えられて以降、日本各地でカイコが飼育されてきた (日本蚕糸学会, 1992; 森, 1995; 河原畑, 1998)。特に 20 世紀前半には生糸が重要な輸出産品となり、1930 年には全国の農家の約 4 割が養蚕業に従事し、蚕室へのクワコの
20 侵入などを特に防止することなくカイコの飼育が行われてきたが、これまでにカイコとクワコの交雑個体が自然環境下で見つかったとの報告はない。

また、現在カイコを飼育している養蚕農家 5 戸 (群馬県前橋市) の周辺で 3 年間に渡ってフェロモントラップを用いて捕獲したクワコ 3,750 頭を調査した結果でも、カイコとクワコの交雑個体は見つかっておらず (Kômoto et al., 2016; 別添 6)、実際に、以前に養蚕が行われていた地域を中心として全国各地で捕獲したクワコのオス成虫のミトコンドリア
25 *cox1* 遺伝子型 (7,708 頭) や核ゲノム *CAD* 遺伝子型 (1,019 頭) などを解析した結果においても、カイコからクワコへの遺伝子流入は見つからなかった (Yukhiro et al., 2012a, b, 2017; 別添 5)。

なお、自然環境下において、仮に、クワコとカイコとの交雑を想定した場合であったとしても、カイコ成虫は雌雄ともに飛翔できないほか、カイコのオス成虫がクワコのメス成虫の性フェロモンを感知して交尾行動を起こしたとしても、カイコのオス成虫はフェロモン源にむかって小刻みにジグザグ歩行をしながら進む (神崎, 1993) こととなるため、
30 野外の桑樹の幹を歩いて登り、樹上のクワコのメス成虫と交尾することはおよそできないと考えられる。このため、自然環境下で仮にそのような交尾を想定する場合には、クワコのオス成虫がカイコのメス成虫の放出する性フェロモンに誘引され、交尾が成立する
35

可能性を念頭に置くことが適当である。

自然環境下でカイコからクワコへの遺伝子流入が見つからない要因は以下のように考えられる。

- ① これまでの一般的な農家でのカイコの飼育が3~4 齢幼虫から繭の形成までの幼虫及び蛹の段階に限定されるほか、収穫された繭（蛹を含む。）は製糸工場で熱乾燥処理されて不活化されるため、通常の農家では、開放的な飼育環境下で交尾可能な成虫を取り扱うことがない。
- ② カイコ幼虫の運動性はきわめて低く、餌（桑葉）がなくても移動しないことから、飼育室の外に逃亡することはなく、仮に野外に出たとしても桑樹に到達して生育することもなく、鳥や昆虫等にも容易に捕食されて生き残ることがきわめて難しい。
- ③ 仮に、飼育室内や飼育残渣の中に幼虫や繭が残されて成虫が羽化したとしても、カイコ成虫は飛翔能力が全くなく歩行能力もきわめて低いため、鳥や昆虫等に容易に捕食されて生き残ることがきわめて難しい。
- ④ その上で、仮に、それら野生動物の捕食を免れてカイコのオス成虫が野外に生じたとしても、飛翔能力が全くなく、樹上にいるクワコのメス成虫が発する性フェロモンを感知して、その方向に移動しようとしても到達できないため交尾は不可能である。
- ⑤ また、万一、野生動物の捕食を免れてカイコのメス成虫が野外に生じたとしても、飛翔能力が全くなく歩行能力もきわめて低いため、飼育室内や飼育残渣の中に休眠卵を産下するに過ぎず、万一そこから交雑第一代の幼虫が孵化しても、周囲に新鮮な桑葉はなく、また、周辺の桑樹に到達して生存することもできない可能性が高い。

実際、これら要因を確認するため、2016 年から 3 年間行った隔離飼育試験等の結果では、

- ① 飼育中の成虫発生の可能性については、隔離飼育試験において飼育室内で成虫が生じたことはなく、飼育残渣についても粉碎処理することにより、成虫が生じることはなかった（別添 26）。
- ② 野生動物による捕食の可能性については、カイコの 4 齢幼虫 500 頭と 5 齢幼虫 800 頭を屋外で飼育したところすべて鳥や昆虫に捕食されて成虫が生じることがなく、カイコのメス成虫 200 頭を屋外に置いた場合も、アリ類による攻撃を受けて体が分断されることなどによりすべてが死亡した（河本ら, 2014）。
- ③ 仮にカイコのメス成虫とクワコのオス成虫の偶発的な交尾が生じ、カイコのメス成虫が飼育室内又は野外に置かれた飼育残渣内で産卵したとしても、カイコのメス成虫はまったく飛翔できず、歩行能力も弱いなど、きわめて狭い範囲に産卵することから、それら交雑卵から幼虫が孵化することを想定して、実際に野外の桑樹から 2 m の地面に交雑個体の孵化幼虫 2,964 頭を置き、その後の生存調査を行ったが、桑樹まで到達し

桑葉を摂食して生育した個体はまったく観察されなかった (Kômoto *et al.*, 2016; 別添 8)。

5 加えて、本遺伝子組換えカイコに導入した遺伝子は、絹糸腺や繭糸に青色蛍光タンパク質-フィブロイン H 鎖融合タンパク質を発現させたり、全身でキヌレニン酸化酵素を発現させたりするものであり宿主の繁殖能力を高めることはない。実際、遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] と非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4] の繁殖特性を調査したところ、産卵数・産卵範囲について遺伝子組換えカイコのほうが非遺伝子組換えカイコに比べて統計学的に有意に小さく、繁殖能力が劣る可能性が示唆された (別添 22、23)。

10 さらに、本遺伝子組換えカイコの飼育にあたっては、別に定める第一種使用等による飼育等要領 (以下「飼育等要領」という。) にしたがってクワコとの交雑防止に万全を期すため、飼育室は窓等に 4 mm 目以下の網を張れる構造とし、繭を収穫した後は飼育室を閉め切るか網で覆うことにより、野外からのクワコ成虫の侵入を防止する措置を執ることとしてい

15 ては、4 mm 目以下の網で覆って管理するか粉砕機によって粉砕すること等により、確実に不活化してクワコとの交雑を防止する措置を執ることとしている。さらに、飼育等要領を守って適切に飼育管理できる生産者 (別途定める基準により選定した者) に限って使用を許可することとしている。

また、交雑個体が生じていないかを確認するための方法として、本遺伝子組換えカイコ

20 の飼育開始後には、別に定めるモニタリング計画書に基づいて、学識経験者の助言等を踏まえ毎年モニタリング実施要領を作成し、実際の飼育規模等に応じた適切なモニタリングを実施することとしている。

以上のことから、別に定める飼育等要領に従って本遺伝子組換えカイコを飼育した場合に、交雑性に起因する生物多様性影響の生じやすさはきわめて低いと考えられる。

25

(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、本遺伝子組換えカイコの使用により、交雑性に起因する生物多様性影

30 響が生ずるおそれはないと考えられた。

第三 生物多様性影響の総合的評価

宿主の属する分類学上の種であるカイコ (*Bombyx mori*) は、日本において弥生時代以降、長期にわたる飼育経験がある中で、自然環境下への定着や有害物質の産生性は認められない。

5

競合における優位性：

宿主であるカイコは、人間の管理が行われない野外に放置されると、速やかに捕食されて死亡することや、擬態に必要な斑紋・行動を欠いていること、移動能力が低いことなどから、生存・繁殖することがない。また、食草を同じくする近縁野生種であるクワコと比べても幼虫や成虫の移動能力が低いことなど、自然条件下で生育・繁殖に不利な性質を有していること

10

から、野生のクワコに対して競合における優位性を示すことはない。

本遺伝子組換えカイコは、青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質を絹糸に含み、キヌレニン酸化酵素を全身で発現するが、これらのタンパク質が競合における優

15 [日 137 号×MCS4] との間で生理学的・生態学的特性について検討したところ、幼虫体重 (2 齢及び 3 齢)・幼虫の行動範囲・営繭率・産卵範囲・産卵数については遺伝子組換えカイコのほうが統計学的に有意に小さいほか、幼虫体重 (1 齢、4 齢、5 齢)・繭重・繭層重・孵化歩合については統計学的に有意な差がなかった。その他の遺伝子組換えカイコ系統 (GN13、GCS13、[GN13×MCS4]、[GN13×支 146 号] 及び [日 137 号×GCS13]) では、

20 [日 137 号×GCS13] の営繭率が非遺伝子組換えカイコ系統より少し高かったが、孵化歩合・幼虫期間・繭重・繭層重・産卵数については、非遺伝子組換えカイコ系統の品種間差の範囲内であると考えられた。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの使用により、競合における優位性による生物多様性影響が生じるおそれはないと考えられた。

25

捕食性：

宿主であるカイコは幼虫期に人為的に与えられた桑葉のみを摂食する。また、カイコ幼虫が野外で桑葉を摂食している例はこれまで報告されていない。さらに、成虫は摂食及び飲水は一切しない。

30 本遺伝子組換えカイコは、青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質を絹糸に含み、キヌレニン酸化酵素を全身で発現するが、これらのタンパク質がカイコ幼虫の捕食性を高めることはない。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの使用により、捕食性による生物多様性影響が生じるおそれはないと考えられた。

35

有害物質の産生性：

宿主であるカイコは、弥生時代から日本国内で飼育され、養蚕農家で生じるカイコの糞や死体を含む残渣を、敷地内や桑畑に廃棄することが一般的に行なわれているが、これまで野生動植物等の生育に悪影響を及ぼすような有害物質を産生しているとの報告はない。

- 5 本遺伝子組換えカイコは、青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タンパク質を絹糸に含み、キヌレニン酸化酵素を全身で発現するが、どちらのタンパク質も、その特性から考えても、土壤中に混入した場合に他の生物に影響を与えるとは想定されない。また、糞や死体を土壤中に混合したところ、植物の発芽・生育や土壤微生物に与える影響は、遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13] と非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4] との間で統計学的に有意な差は認められなかった。

10 以上のことから、本遺伝子組換えカイコの使用により、有害物質の産生性による生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

交雑性：

- 15 カイコと交雑可能な近縁野生種として日本国内に分布している昆虫はクワコのみであり、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコが特定された。

カイコとクワコは、メス成虫が放出する性フェロモンが同一であるため、カイコのメス成虫とクワコのオス成虫を人為的に出会わせれば交尾して交雑個体を生じることができるが、一般的な養蚕農家の周辺でクワコとカイコの交雑第一代は認められなかったことや、日本各地のクワコにカイコからの遺伝子流入は見つかっていないことから、現在行われている養蚕の現場において、交雑が起きていないか、きわめてまれであると考えられる。

一般的な養蚕農家では、3～4 齢幼虫から繭（蛹）までしかカイコを飼育しないほか、収穫した繭は製糸工場で熱乾燥処理により不活化するため、成虫を生じさせることがない。もし成虫が生じたとしても、屋外では鳥や昆虫類に速やかに捕食されることから生存することは難しい。その上で、カイコのメス成虫が生き残ってクワコのオス成虫と交尾して産卵したとしても、交雑第一代の幼虫が孵化するのは屋外に廃棄した飼育残渣等の中であり、そこから周辺の桑樹に到達して生存することは考えられない。

本遺伝子組換えカイコの幼虫の行動範囲は非遺伝子組換えカイコより狭いほか、メス成虫は運動能力が低く、非遺伝子組換えカイコに比べて産卵範囲が狭いこと等から、本遺伝子組換えカイコがクワコと交尾する可能性が高まることはない。また、本申請における飼育等要領に従って飼育室や飼育残渣を管理することにより、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交尾を防止し、さらに、適切な管理が可能な生産者（別途定める基準により選定した者）に限って使用を許可することとしている。

35 その上で、本遺伝子組換えカイコのメス成虫と野生のクワコのオス成虫が交尾して交雑個体が生じたとしても、絹糸腺や繭糸での青色蛍光タンパク質—フィブロイン H 鎖融合タ

ンパク質の発現や、全身でのキヌレニン酸化酵素の発現が、自然環境下での競合における優位性を高めるとは考え難く、その交雑個体が野生のクワコ集団において優占化する可能性は低いと考えられた。

5 以上のことから、本遺伝子組換えカイコの使用により、交雑性による生物多様性に影響が生ずるおそれはないと考えられた。

よって、総合評価として、本遺伝子組換えカイコの使用により、日本国内の生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

引用文献リスト

- Cary L. C., Goebel M., Corsaro B. G., Wang H.-G., Rosen E., and Fraser M. J. (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 172, 156-169.
- 5 Handler A. M. (2002) Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 1211-1220.
- Kobayashi I., Uchino K., Sezutsu H., Iizuka T., and Tamura T. (2007) Development of a new *piggyBac* vector for generating transgenic silkworms using the kynurenine 3-mono oxygenase gene. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 76, 145-148.
- 10 Kojima K., Kuwana Y., Sezutsu H., Kobayashi I., Uchino K., Tamura T., and Tamada Y. (2007) A new method for the modification of fibroin heavy chain in the transgenic silkworm. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 2943-2951.
- Kômoto N., Kuwabara N., and Yukuhiro K. (2016) Absence of hybrids between the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild mulberry silkworm, *B. mandarina*, in natural populations around sericulture farms. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 85, 67-71.
- 15 Linnæus C. (1758) Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. - pp. [1-4], 1-824. Holmiæ. (Salvius).
- Mounier N. and Prudhomme J. C. (1991) Differential expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 21, 523-533.
- 20 Quan G. X., Kim I., Kômoto N., Sezutsu H., Ote M., Shimada T., Kanda T., Mita K., Kobayashi M., and Tamura T. (2002) Characterization of the kynurenine 3-monooxygenase gene corresponding to the *white egg 1* mutant in the silkworm *Bombyx mori*. *Mol. Genet. Genomics*, 267, 1-9.
- Quan G.-X., Kobayashi I., Kojima K., Uchino K., Kanda T., Sezutsu H., Shimada T., and Tamura T. (2007) Rescue of *white egg 1* mutant by introduction of the wild-type *Bombyx* kynurenine 3-monooxygenase gene. *Insect Sci.* 14, 85-92.
- 25 Takiya S., Hui C.-c., and Suzuki Y. (1990) A contribution of the core-promoter and its surrounding regions to the preferential transcription of the fibroin gene in posterior silk gland extracts. *EMBO J.* 9, 489-496.
- 30 Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Kômoto N., Thomas J.-L., Mauchamp B., Chavancy G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme, J.-C., and Couple P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nature Biotechnol.*, 18, 81-84.
- Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K., and Nagai T. (2009) An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Nature Methods* 6, 351-353.
- 35 Xia Q., Guo Y., Zhang Z., Li D., Xuan Z., Li Z., Dai F., Li Y., Cheng D., Li R., Cheng T., Jiang T., Becquet C., Xu X., Liu C., Zha X., Fan W., Lin Y., Shen Y., Jiang L., Jensen J., Hellmann I., Tang S., Zhao P., Xu H., Yu C., Zhang G., Li J., Cao J., Liu S., He N., Zhou Y., Liu H., Zhao J., Ye C.,

- Du Z., Pan G., Zhao A., Shao H., Zeng W., Wu P., Li C., Pan M., Li J., Yin X., Li D., Wang J., Zheng H., Wang W., Zhang X., Li S., Yang H., Lu C., Nielsen R., Zhou Z., Wang J., Xiang Z., Wang J. (2009) Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 326, 433-436.
- 5 Yukuhiro K., Iwata K., Kômoto N., Tomita S., Itoh M., and Kiuchi M. (2012a) Nucleotide sequences of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene show clear differences between the domesticated silkworm *Bombyx mori* and the wild mulberry silkworm *Bombyx mandarina* from Japan. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 81, 29-35.
- Yukuhiro K., Sezutsu H., Tamura T., Kosegawa E., Iwata K., Ajimura M., Gu S.-H., Wang M., Xia Q., Mita K., Kiuchi M. (2012b) Little gene flow between domestic silkworm *Bombyx mori* and its wild relative *Bombyx mandarina* in Japan, and possible artificial selection on the CAD gene of *B. mori*. *Genes Genet. Syst.*, 87, 331-340.
- 10 Yukuhiro K., Sakaguchi H., Kômoto N., Tomita S., and Itoh M. (2017) Three single nucleotide polymorphisms indicate four distinctive distributions of Japanese *Bombyx mandarina* populations. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 86, 77-84.
- 15 飯塚哲也・行弘研司 (2007) 野外におけるカイコ遺伝子拡散の可能性評価手法の開発。 遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究 (プロジェクト研究成果シリーズ 447) , 100-102.
- 20 池田真琴・白井孝治・金勝廉介・三浦幹彦・Edwards J.・木口憲爾 (2009) カイコの繭形成行動：幼虫体節の運動制約が吐糸営繭行動に及ぼす影響。 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー 78, 141-149.
- 江崎悌三・一色周知・六浦晃・井上寛・岡垣弘・緒方正美・黒子浩 (1971) 原色日本蛾類図鑑 (下巻) 12-13、保育社
- 25 加藤幸三郎 (1994) 蚕糸業。 日本大百科全書 10 巻 394、小学館
- 金井賢一・守山泰司・中村京平 (2013) 2011 年 10 月悪石島における昆虫記録。 鹿児島県立博物館研究報告 32, 17-22.
- 河原畑勇 (1998) クワコとカイコ。 文部省科学研究費補助金基盤研究(A)(2)研究成果報告書 (別冊) 課題番号：07406004.
- 30 神崎亮平 (1993) 性フェロモン源への雄蛾の定位行動。 植物防疫 47, 19-24.
- 小池啓一・町田龍一郎・森上信夫・小野展嗣・田辺力・筒井学 (2002) 小学館の図鑑 NEO 昆虫 132、小学館
- 小泉二郎・塩見昭男・小針洋子 (1962) 家蚕における羽化の早晚と産卵速度。 蚕糸研究 40, 7-10.
- 35 河本夏雄・津田麻衣・岡田英二・飯塚哲也・桑原伸夫・瀬筒秀樹・田部井豊 (2014) 遺伝子組換えカイコの飼育における生物多様性影響の評価手法の構築。 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー 83, 171-179.

- 児玉彌曾衛 (1927) 家蚕と野蚕の交配. 佐久良会雑誌 21, 59-64.
- 下田みさと・金勝廉介 (2016) カイコ幼虫の歩行距離と野外での生存の可能性. 蚕糸・昆虫バイオテック 85, 145-151.
- 大日本蚕糸会 (2007) カイコからのおくりもの カイコとあそぼう・シルクでつくろう、
5 財団法人大日本蚕糸会
- 大日本蚕糸会 (2018) シルクレポート No.58
- 大日本蚕糸会 (2019) シルクレポート No.61
- 大日本蚕糸会 (2020) シルクレポート No.64
- 大門高明 (2014) カイコガ亜科のバイオロジーと性フェロモン. 蚕糸・昆虫バイオテック 83, 105-114.
10
- 高見丈夫 (1969) 蚕種総論、全国蚕種協会
- 竹内孝三 (1954) 四眠交雑種から発現した三眠蚕について. 日本蚕糸学雑誌 23, 83-88.
- 鶴井裕治・飯田のり子・常楽千恵子・常山泉 (2010) 養蚕、財団法人大日本蚕糸会 蚕業技術研究所
- 15 中島晴海・富樫きん (1984) 日 137 号, 日 145 号, 支 146 号の産卵性状及び人工孵化に関する試験. 蚕糸研究 129, 35-44.
- 中村隆・伴野豊・河口豊 (1997) カイコとクワコとの間における生殖隔離の程度. 九州蚕糸 28, 30.
- ナショナルバイオリソースプロジェクト (2018) <http://silkworm.nbrp.jp/>
- 20 日本蚕糸学会編 (2002) 改訂蚕糸学入門、財団法人大日本蚕糸会
- 日本製糸技術経営指導協会編 (1993) 蚕糸業のあらまし ―シルク産業の姿―. はじめてシルクを作る人のほん ―製糸技術の基礎知識―、日本製糸技術経営指導協会
- 農業生物資源ジーンバンク (2018) <http://www.gene.affrc.go.jp/>
- 農林水産省生産局生産流通振興課 (2009) 平成 20 年度 蚕業に関する参考統計
- 25 農林水産省農蚕園芸局 (1989) 蚕の新品種―春蚕用「日 137 号×支 146 号」、技術資料 118, 5-6.
- 范作冰 (2013) 蚕糸絹業の国際比較分析、農林水産政策研究所セミナー資料 (2013 年 8 月 20 日)、http://www.maff.go.jp/primaff/koho/seminar/2013/attach/pdf/130820_01.pdf
- 廣森敏昭 (2001) トカラ列島 宝島・小宝島, 2000 年 6 月の昆虫. 鹿児島県立博物館
30 研究報告 20, 49-54.
- 福田紀文 (1979) 総合蚕糸学、日本蚕糸新聞社
- 普後一 (1982) カイコガの羽化行動とそのホルモン制御. 日本蚕糸学雑誌 51, 523-527.
- 森精編著 (1995) カイコと教育・研究、サイエンスハウス
- 見波定治・大場治男 (1939) 桑蚕と家蚕との交雑種に就て. 衣笠蚕報 394, 71-82.
- 35 村上聡・岩松琢磨・北村優・北澤裕太・片田美幸・藤森遼・横山岳・蜷木理 (2010) カイ

- コノ成虫生存期間の分布に関する系統間差異. 蚕糸・昆虫バイオテック 79, 53-59.
- 柳沼利信 (2015) カイコ胚休眠の研究 —特に筆者の見聞を中心に—. 蚕糸・昆虫バイオテック 84, 99-118.
- 横山桐郎 (1929) 最新日本蚕業害虫全書、明文堂
- 5 吉武成美 (1988) 家蚕の起源と分化に関する研究序説、東京大学農学部養蚕学研究室

緊急措置計画書

令和 2 年 1 月 17 日

- 5 氏名 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
理事長 久間 和生
住所 茨城県つくば市観音台3丁目1番地1

10 第一種使用規程の承認を申請している青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-Sirius*、*Bombyx mori*）（GN13、GCS13、GN13×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支146号、日137号×GCS13）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置を執ることとする。

15 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

20 本遺伝子組換えカイコの第一種使用等において緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下の通りである。なお、緊急措置を講ずる際は、必要に応じて国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門カイコ業務安全委員会（以下「業務安全委員会」という。構成は本緊急措置計画書の末尾に掲載）による検討を踏まえるほか、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（以下「農林水産省及び環境省」という。）と協議することとする。また、第一種使用規程において定める第一種使用等による飼育等要領（以下「飼育等要領」という。）に基づいて本遺伝子組換えカイコを飼育するすべての生産者（以下「生産者」という。）を把握して連絡体制を構築し、緊急措置を講ずるための実施体制を整備する。

25 (令和 2 年 1 月現在)

(個人名・所属は個人情報のため非開示)

氏名	所属・役職
(管理責任者)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域長
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 新特性シルク開発ユニット長
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 カイコ機能改変技術開発ユニット
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室

2 第一種使用等の状況の把握の方法

(1) 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体の意図しない発生

5 本遺伝子組換えカイコの飼育状況については、飼育等要領に基づいて把握する生産者を通じて把握する。また、モニタリング計画書に基づいて捕獲した個体が本遺伝子組換えカイコの供与核酸を保有していることを確認した場合には、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）はその旨をすみやかに農林水産省及び環境省に報告する。

10 (2) 気象災害等による飼育施設等の被害状況

気象災害等が発生した場合は、生産者は速やかに本遺伝子組換えカイコの飼育施設等被害状況及び本遺伝子組換えカイコの状況を確認し、その結果を農研機構に報告する。

15 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

科学的根拠に基づき、本遺伝子組換えカイコの使用に伴い、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合、業務安全委員会において内容について確認を行い、農林水産省及び環境省と協議した上で、生産者及び飼育施設等のある自治体に電話、ファクシミリ、電子メール、文書等により連絡する。また、農研機構のウェブサイト等で広く周知するとともに、問い合わせ窓口を設置する。

4 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が意図せず生じた場合の具体的な措置の内容

25 モニタリング計画書に基づいて実施するモニタリングの結果、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交雑個体が観察された場合は、農研機構は、業務安全委員会での検討を踏まえて、その周辺の生産者に指示して本遺伝子組換えカイコの飼育をすみやかに中断させ、本遺伝子組換えカイコについて以下の(1)及び(2)の措置を執らせるとともに、その結果を農研機構に報告させる。また、農研機構は(3)、(4)及び(5)に従ってモニタリングを強化して実施するほか、生産者が執った措置を必要に応じて確認する。

30

(1) 本遺伝子組換えカイコ及びこれと同時に同じ飼育室で飼育している他のカイコの幼虫、繭（蛹）、飼育残渣等は、以下のように処理することで死滅させる。また、管理中は、取扱に注意を要する旨を見やすい箇所に表示する。

35 1) 幼虫及びその飼育残渣については、逸失を可能な限り防ぐために、飼育室の戸や窓等を閉じるか4mm目以下の網を設置して封じ込めて管理する。その際、隔離飼育区画における第一種使用等による本遺伝子組換えカイコの飼育試験及びモニタリング（以下

「隔離飼育試験」という。)の結果から上蔭後 30 日間の管理でクワコとの交雑は防止できると考えられること、及び、5 齢幼虫が上蔭するまで 1 週間程度の期間を要すると考えられることから、管理する期間は 40 日間とした上で、管理終了後に生存個体がないことを確認する。

- 5 2) 飼育室で形成中の繭については、そのまま放置して成虫が大量に発生することを防ぐために、すべて集めたうえで、二重のビニール袋に密封して飼育室内で管理する。その際、隔離飼育試験の結果から上蔭後 30 日間の管理でクワコとの交雑は防止できると考えられることから、管理する期間は 30 日間とした上で、管理終了後に生存個体がないことを確認する。

10

- (2) 交雑個体と野生のクワコの交雑を防止するため、交雑個体が捕獲された地点の周囲の桑樹にフェロモントラップを継続的に設置する。設置する期間は、(3) に従って強化したモニタリングを実施している期間とする。また、クワコ以外の野生生物の生物多様性への影響を抑えつつ、野生のクワコ集団への供与核酸の浸透を防止するため、害虫防除の専門家の助言を受けながら、実施可能なあらゆる措置を排除せずに計画を策定し、農林水産省及び環境省と協議する。

15

(3) モニタリングは以下の通り強化して実施する。

- 1) 交雑個体が捕獲されたフェロモントラップの設置場所の近くに桑畑があれば、その桑畑の周囲に 10 m 以下の間隔でフェロモントラップを設置する。近くに桑畑がなければ、そこから半径 30 m の範囲に生育する桑樹にトラップを設置する。
- 2) モニタリングの実施時期、実施頻度、方法等はモニタリング計画書の 6 に定める通りとする。
- 3) モニタリング結果の公表はモニタリング計画書の 9 に定める通りとする。

25

(4) 最初に交雑個体が観察されてから 30 日以内に観察された交雑個体については、最初の観察と同一の事象とし、30 日後以降に新たに交雑個体が観察された場合は、交雑個体が継続的に観察されたとして、次の (5) に移行する。30 日後から 1 年後までに新たな交雑個体が観察されない場合は、通常のモニタリングに移行する。

30

- (5) 強化して実施したモニタリングの結果、本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が最初に観察されてから 30 日後から 1 年後までに新たな交雑個体が観察され、交雑個体が継続的に観察されたと考えられた場合は、それまでのモニタリングで得られた調査結果などを元に、農林水産省及び環境省と協議の上、さらに数年継続してモニタリングを実施する。また、クワコ以外の野生生物の生物多様性への影響を抑えつつ、野生のクワコ集

35

団への導入遺伝子の浸透を防止するため、(2)で害虫防除の専門家の助言を受けながら実施可能なあらゆる手段を排除せずに策定した計画を実施する。

5 気象災害等が発生した場合の具体的な措置の内容

- 5 気象災害等が発生した場合は、農研機構は、業務安全委員会での検討を踏まえて、以下の措置を執って結果を農研機構に報告するよう生産者に対し指示するほか、生産者が執った措置を必要に応じて確認する。

(1) 飼育室が倒壊するなどの被害が生じた場合

- 10 本遺伝子組換えカイコを飼育している際に、気象災害等により飼育室が倒壊するなどの被害が発生して、本遺伝子組換えカイコの飼育が困難な場合は、本遺伝子組換えカイコの飼育を直ちに中止し、本遺伝子組換えカイコを2重のビニール袋に密封し、取り扱いに注意を要する旨を見やすい箇所に表示して、管理し得る屋内で40日間保管することによって死滅させる。

15

(2) 飼育室が敷地外に飛散するなどの被害が生じた場合

- 20 本遺伝子組換えカイコを飼育している際に、気象災害等により飼育室が敷地外に飛散するなどの被害が発生した場合は、飼育室の断片等が確認された場所を中心に探索し、カイコがいればその場で捕殺するか、回収して2重のビニール袋に密封し、取り扱いに注意を要する旨を見やすい箇所に表示して、管理し得る屋内で40日間保管することによって死滅させる。その際、飼育室の断片が広範囲に飛散する場合も想定し、実際の被害状況に応じて必要な範囲を探索してカイコを捕殺又は回収する。

6 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

- 25 緊急措置を執るべき状況が生じた場合は、業務安全委員会による検討を踏まえて緊急措置を講じたのち、速やかに農林水産省及び環境省へ報告するとともに緊密な連絡体制を構築するため、1で規定する管理責任者は、農研機構リスク管理部実験管理室を通じて、常に最新の情報を把握した上で、農林水産省及び環境省からの問い合わせに対応可能となるよう体制を構築する。

30

生物多様性影響の防止に関する事項について検討するための委員会の委員名簿

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門カイコ業務安全委員会は、以下の委員で構成される。

5

(令和 2 年 1 月現在)

(個人名・所属は個人情報のため非開示)

委員長	
(業務管理責任者)	生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域長
委員	
(業務管理主任者)	生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域 先進昆虫ゲノム改変ユニット
	生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 新特性シルク開発ユニット長
	生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 新素材開発ユニット
	生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室
	生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室 医農工連携調整役
	本部 管理本部 藤本・大わし管理部安全衛生管理室
	本部 リスク管理部 実験管理室長
	生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域 組換え作物技術開発ユニット
	本部 広報部広報課
	遺伝資源センター 保存技術・情報チーム
	本部 管理本部 技術支援部 中央技術支援センター つくば第6業務科長
	群馬県蚕糸技術センター 主席研究員
	群馬県蚕糸技術センター 蚕糸研究係長
	本部 企画戦略本部 新技術対策室
	生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域長
	生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室

モニタリング計画書

令和 2 年 1 月 17 日

- 5 氏名 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
理事長 久間 和生
住所 茨城県つくば市観音台3丁目1番地1

1 実施体制及び責任者

- 10 実施体制及び責任者は以下の通りである。

実施体制

(1) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

- 15 本モニタリング計画書に基づいて実施するモニタリングの統括、マニュアルの作成、
生産者へのフェロモントラップの送付、捕獲したクワコの検査等を担当する。

(令和 2 年 1 月現在)

(個人名・所属は個人情報のため非開示)

氏名	所属・役職
(責任者)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域長
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 新特性シルク開発ユニット長
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 カイコ機能改変技術開発ユニット
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室

(2) 生産者

- 20 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）の
指示の下、フェロモントラップの交換と農研機構への送付を担当する。なお、毎年、本
モニタリング計画書に基づき農林水産省消費・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（以下「農林水産省及び環境省」という。）にモニタリング開始前に
提出するモニタリング実施要領において、該当する生産者の氏名を報告する。

25

2 モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称及び項目

- (1) 名称：カイコ (*Bombyx mori*) 及びクワコ (*Bombyx mandarina*)

(2) 項目：青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (*HC-Sirius*, *Bombyx mori*) (GN13、GCS13、GN13×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支 146 号、日 137 号×GCS13) (以下「本遺伝子組換えカイコ」という。) とクワコとの交雑個体 (交雑個体の可能性を有する個体を含む。)

5

3 モニタリングを実施する場所

本遺伝子組換えカイコと野生のクワコとの交雑第一代が生じる可能性があるとするれば、飼育後の飼育残渣とともに繭等が屋外に出てメス成虫が生じ、野生のクワコのオス成虫と交尾した上で、飼育残渣中に産み付けられた卵から孵化した交雑第一代の孵化幼虫が
10 近くの桑樹に到達した場合が考えられる。このことから、本遺伝子組換えカイコの飼育に係るクワコとの交雑個体の発生をモニタリングする場所としては、本遺伝子組換えカイコを飼育した後の飼育残渣が屋外に堆積される場所 (以下「飼育残渣堆積場所」という。) に隣接する桑畑又は桑樹が適している。なお、本遺伝子組換えカイコの飼育にあたっては、第一種使用等による飼育等要領 (以下「飼育等要領」という。) において、飼育残渣の管理
15 を課して、飼育残渣中でのクワコとの交尾を防ぐこととしている。

農研機構は、毎年の飼育開始前に、本遺伝子組換えカイコの利用について契約を交わした者を通じて、本遺伝子組換えカイコを飼育しようとする場所を毎年の飼育開始前に把握し、そのすべての場所においてモニタリングを実施する。ただし、クワコの生息調査等の科学的な知見に基づき、クワコが生息していないと考えられる地域で飼育する場合は、
20 本モニタリング計画書の9の(1)に定めるモニタリング実施要領の作成の際に、学識経験者の助言等を踏まえ、農林水産省及び環境省と協議の上、モニタリングを実施する場所には設定しない。

4 モニタリングを実施する場所における対象となる野生動植物等の生息又は生育の状況

25 (1) カイコ

カイコの自然環境における生息の報告はない。

(2) クワコ

クワコは、日本国内では北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島までで、奄美大島以南での生息記録はない。幼虫はクワの葉を摂食し、桑園だけではなく、山林に
30 クワが自生していれば生息する可能性がある。冬季はクワが落葉するため、幼虫が生存できるのは春から秋にかけてであり、卵で越冬する。成虫の発生時期は地域によって違いはあるものの、最長で5月下旬から12月中旬までで、寒冷地ではこれより短い期間となる。

(3) カイコとクワコの交雑個体

野生のクワコ集団において、カイコとクワコの交雑個体の生息の報告はない。

35

5 モニタリングの期間

- 本遺伝子組換えカイコと野生のクワコとの交雑第一代の成虫が生じる可能性があるとなれば、本遺伝子組換えカイコのメス成虫が屋外で生じ、野生のクワコのオス成虫と交尾した上で、産み付けられた卵が冬を越して、翌春に孵化した交雑第一代の孵化幼虫が成長した場合は考えられる。このことから、本遺伝子組換えカイコの飼育に係るクワコとの交雑個体の発生をモニタリングする期間としては、本遺伝子組換えカイコを飼育した翌年から開始し、本遺伝子組換えカイコの飼育を終了した翌年までとする。

6 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法^(注)

10 (1) 実施時期

モニタリングの実施期間は、モニタリングを実施する場所またはその周辺でのクワコの発生時期の調査結果に基づいて、原則として、春に孵化した野生のクワコが成虫になる時期の2週間程度前から2か月間程度とし、クワの生育等も勘案して、本モニタリング計画書の9の(1)で農研機構が作成するモニタリング実施要領において定める。

15

(2) 実施頻度

原則として、1週間に1回の頻度でフェロモントラップを交換し、捕獲した個体の調査を行う。

20 (3) モニタリングの方法

1) フェロモントラップの仕様は以下の通りとする。

①フェロモントラップの構造

フェロモントラップの構造は、昆虫の発生予察等に一般的に用いられる粘着式トラップ(サンケイ化学、SEトラップなど)とする。

25 ②誘引源

原則として、合成した性フェロモン(ボンビコール)1mgを添加したゴムキャップを用いる(Yukuhiro *et al.*, 2016)。

2) フェロモントラップを設置する場所の設定

フェロモントラップを設置する場所は、本遺伝子組換えカイコを飼育する生産者と協議の上で、以下の基準に基づいて農研機構が設定し、モニタリング実施要領に記載する。

30

①フェロモントラップの設置高

フェロモントラップを設置する高さは0.3～2.3mの範囲とする(Yukuhiro *et al.*,

(注) モニタリングの方法の詳細については、別添の参考資料(平成29年2月14日生物多様性影響評価検討会昆虫分科会資料)に基づいて定めた。

2016)。

②フェロモントラップの設置場所

野生のクワコ（オス成虫）との交雑の可能性は、遺伝子組換えカイコ（メス成虫）の飼育残渣に当該繭が紛れ込み、羽化した場合に想定される。しかしながら、クワコと交尾し産卵が行われ当該卵がふ化し幼虫が生じたとしても、移動能力が乏しいため、エサとなる桑樹にたどりつき、生存し続けることは難しい。そこで、念のため、交雑個体が発生するとすればその可能性があるのは飼育残渣に最も近い桑樹に孵化幼虫が到達した場合であると考えられることから、フェロモントラップを設置する場所は、原則として、飼育残渣堆積場所すべてについて、その飼育残渣堆積場所ごとに最も近い桑樹を囲むように、半径 30 m 以内に 4 か所とし、もし飼育残渣堆積場所の敷地内に桑樹がない場合は、当該飼育残渣堆積場所を囲むように、半径 30 m 以内に 4 か所とする。詳細は、モニタリングを実施する場所ごとにモニタリング実施要領において定める。ただし、飼育残渣堆積場所同士の距離が 30 m 以下である場合は 1 つの飼育残渣堆積場所とする。なお、モニタリング実施要領において定める期間内に、気象災害等によりフェロモントラップの継続的な設置が困難となった場合、またはフェロモントラップが安全に交換できなくなった場合は、その近くに新しく設置場所を変更してモニタリングを継続する。

3) フェロモントラップの交換

フェロモントラップは農研機構が必要数を用意し、モニタリングを実施する生産者に送付する。フェロモントラップを受け取った生産者はフェロモントラップを交換し、回収したフェロモントラップを農研機構に送付する。

4) 回収したフェロモントラップの調査

生産者から送付されたフェロモントラップを受け取った農研機構は、捕獲されたクワコの頭数を記録した上で、外部形態からカイコとの交雑第一代であると考えられた個体について、別紙のとおりゲノム DNA を用いた PCR 又はゲノムサザンハイブリダイゼーションを行うことで、本遺伝子組換えカイコとの交雑個体であるかどうかを判定する。

7 モニタリング結果の解析方法

捕獲した交雑第一代の個体数と、そのうち供与核酸の保有が確認された個体数から、本遺伝子組換えカイコの第一種使用等によるクワコとの交雑の程度を分析する。

8 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法

モニタリングを実施した翌年 1 月末までに、別表の様式に従い、農林水産省及び環境省に対し報告を行う。

9 その他必要な事項

(1) モニタリング実施要領の作成

- 5 モニタリング実施要領には、モニタリング実施者、モニタリング実施場所、フェロモン
トラップの設置場所、実施時期及び手順等を詳細に記載するものとする。

モニタリング実施要領の作成に当たり、クワコの生息調査の結果、最新の科学的知見及び生物多様性影響評価検討会昆虫分科会の学識経験者の助言等を踏まえ、農林水産省及び環境省と協議の上、毎年のモニタリング開始前に作成するものとする。

10 (2) モニタリングを実施する生産者への指導

農研機構は、モニタリング実施者に対し、フェロモントラップの交換や農研機構への送付の方法について、手順書を示して、モニタリング開始前に指導する。

(3) モニタリング計画の見直し

- 15 調査結果を踏まえ、農林水産省及び環境省と協議の上、必要に応じて本モニタリング計画書を見直すものとする。

(4) モニタリング結果の公表

- 20 特定の者に不当な利益又は不利益をもたらす可能性があると考えられる情報を除き、モニタリングの結果を公開する。

(参考文献)

- 25 Yukuhiro K., Kuwabara N., and Kômoto N. (2016) Pheromone dose and set height of pheromone traps for efficient collection of wild mulberry silkmoths, *Bombyx mandarina*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* in press.

(参考)

- カイコとクワコの交雑第一代及びクワコのオス成虫
交雑第一代のオス成虫（体長 18mm 程度）はクワコのオス成虫（体長 14mm 程度）に比べて全体的に大きいこと、腹部が太いこと、体色が薄いこと等から、外部形態から容易に区別することができる。



供与核酸の有無の調査の方法

5 1. PCR による調査

PCR により、*Sirius2* 遺伝子の有無を調査する。対照として、細胞質アクチン *A3* 遺伝子を対象とした PCR を実施する。また、いずれの遺伝子についても、対照として、本遺伝子組換えカイコから抽出したゲノム DNA を用いた PCR を実施する。

10 2. ゲノムサザンハイブリダイゼーションによる調査

供与核酸を検出するためのプローブは *Sirius2* 遺伝子に設定し、PCR により作成する。ゲノムサザンハイブリダイゼーションの対照として、本遺伝子組換えカイコから抽出したゲノム DNA を用いる。

モニタリング結果報告書

5

年 月 日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長
環境省自然環境局野生生物課長

10

氏名（名称）

住所

青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (*HC-Sirius*, *Bombyx mori*) (GN13、GCS13、GN13
×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支 146 号、日 137 号×GCS13) (以下「本遺伝子組換えカ
15 イコ」という。) の第一種使用規程に基づくモニタリングの結果を以下に報告します。

項目	内容
1. 実施体制	
2. 調査時期	
3. 実施場所	
4. 調査方法	
5. 調査結果	
(1) カイコとクワコの交雑第一代 (成虫) の捕獲頭数	
(2) 本遺伝子組換えカイコとクワ コの交雑個体 (成虫) の捕獲頭 数	
(3) クワコ (成虫) の捕獲頭数	
(4) モニタリング結果の解析結果	
6. その他	

備考

・フェロモントラップの設置位置や、フェロモントラップの交換の記録等、関連資料を添付する。

20 ・記載項目が多数ある場合には、別紙を用いて整理する。

参考資料（平成 29 年 2 月 14 日生物多様性影響評価検討会昆虫分科会資料）
（未発表データを含むため部外秘）

第一種使用等による飼育等要領

青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (*HC-Sirius*、*Bombyx mori*) (GN13、GCS13、GN13×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支 146 号、日 137 号×GCS13) (以下「本遺伝子組換えカイコ」という。) の第一種使用等による飼育について、以下の通り要領 (以下「本飼育等要領」という。) を定める。

1 飼育にあたっての要件

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (以下「農研機構」という。) は、本
10 遺伝子組換えカイコを適切に管理するため、本遺伝子組換えカイコの利用について契約等
を交わした者を通じて、本遺伝子組換えカイコの幼虫の飼育や繭からの繰糸を行おうとする
者等についての情報を収集し、本飼育等要領に従って適切に管理できる者に限って飼育
や繰糸等をさせる。その選定にあたっては、飼育や繰糸等を行う施設や設備が本飼育等要領
15 に規定される通りであること及び飼育や繰糸等を行う者が 8 に定める研修を受けているこ
とを確認する。また、飼育や繰糸等の実施状況について、飼育や繰糸等を行う者から、契約
を交わした者を通じて農研機構に報告させ、管理が不適切な者に対しては、農研機構は、本
遺伝子組換えカイコの利用について契約等を交わした者に指示して幼虫や繭の提供を停止
させる。

また、農研機構は、クワコの発生時期に関する情報がない地域については、本遺伝子組換
20 えカイコの飼育初年度に 7 の通りクワコの発生時期の調査を行う。

2 運搬

(1) 幼虫の運搬

本遺伝子組換えカイコの幼虫を運搬する際は、途中でこぼれ落ちることがないように、蓋
25 を固定すること等により本遺伝子組換えカイコが逸出しない容器を用いる。なお、上蒔時
等、飼育室のある敷地内又は隣接する敷地内にある他の飼育室等に幼虫を運搬する際は、
途中でこぼれ落ちることがない容器を用い、運搬の後にその経路を目視で確認し、カイコ
が落ちていた場合は回収する。

(2) 繭の運搬

本遺伝子組換えカイコの繭を運搬する際は、途中でこぼれ落ちることがないように、口を
30 縛ることができる布製の繭袋等を用い、繭を入れる前に破れ目がないことを確認する。繭
を繭袋等に入れる作業は繭を収穫した部屋で行い、繭を繭袋等に入れた後は口を固く縛
り、周囲を確認して、こぼれ落ちた繭を回収する。繭袋等には取扱注意の表示を行う。製
糸工場に繭が到着した際は、不活化のための乾燥機や冷凍庫に繭を入れるまで繭袋等の
35 口は縛ったままとする。

3 3 齢幼虫から繭の収穫までの飼育

5 (1) 飼育室及び幼虫の飼育や繭の形成のための容器

本遺伝子組換えカイコの飼育室及び幼虫の飼育や繭の形成のための容器は以下の通りとする。なお、本遺伝子組換えカイコを飼育している間は、飼育室の出入り口に、関係者以外の立ち入りを禁止する旨を表示する。また、本遺伝子組換えカイコを他のカイコ系統と区別して管理するため、他のカイコ系統と同じ時期に同じ飼育室では本遺伝子組換えカイコを飼育しない。

1) 飼育室

本遺伝子組換えカイコの 3 齢幼虫から繭の収穫まで飼育する飼育室（一般的な養蚕農家の飼育室がこれにあたる。）は、外部からのクワコ成虫の侵入を防止できるようにするため、窓等の開口部に 4 mm 目以下の網を張ること又は網戸を設置すること等が可能な構造とする。

2) 幼虫を飼育する容器

本遺伝子組換えカイコの幼虫を飼育する容器は、底部が 4 mm 目以下の網で覆われるなど、幼虫を適切に保持できる構造とする（一般的な養蚕農家を使用する飼育容器がこれにあたる。）。

3) 繭を形成させる容器

本遺伝子組換えカイコの繭を形成させる容器としては原則として回転簇を用いる。ただし、少数のカイコ幼虫に繭を形成させる場合等は、4 mm 目以下の網で覆った容器の中で繭を形成させることもできる。

(2) 飼育中の管理

飼育容器中の桑の枝を動かす際などは、カイコの幼虫が飼育容器から出ないように注意する。本遺伝子組換えカイコを飼育している飼育室から退出する際は、生産者の体や衣服にカイコが付着していないことを鏡もしくは他の生産者等とともに確認する。ただし、幼虫の飼育中で、飼育容器中のカイコの幼虫や桑葉に触れていない場合はカイコの付着を確認せず退出することができる。幼虫の飼育中は三眠蚕が発生していないか注意し、三眠蚕は廃棄する。繭を形成させるために幼虫を回転簇に移す際は時期を適切に判断する。幼虫の飼育中及び繭の形成中に生育不良の幼虫や三眠蚕等を廃棄する場合は、飼育室内で捕殺するか、飼育室内の容器に入れて蓋をするかビニール袋に入れて密封し上簇から 30 日間管理する。また、飼育室の外でカイコの幼虫や蛹、繭を見つけた場合はその場でただちに捕殺する。

35

4 繭を収穫した後の飼育室の管理

本遺伝子組換えカイコの繭を収穫した後の飼育室には繭が残る可能性を完全には否定できない。隔離飼育区画における第一種使用等による本遺伝子組換えカイコの飼育試験及びモニタリング（以下「隔離飼育試験」という。）の結果から、飼育室の窓等に網を設置して管理することにより、野生のクワコとの交雑を防止できると考えられた。このことから、繭から生じるメス成虫が野外のクワコのオス成虫と交尾することを防止するため、繭を収穫した後の飼育室については、飼育残渣を飼育室外で管理する場合は、まず飼育残渣を搬出した上で、飼育室の床、壁及び天井に残された繭をできるだけ取り除き、入退室以外は窓等を閉め切るか、窓等の開口部に4mm目以下の網又は網戸を設置した状態で、繭が残

5 10 15 20 25 30 35

5 飼育残渣の管理

本遺伝子組換えカイコに係る飼育残渣については、繭が残っている可能性に配慮し、以下のいずれかの方法により管理する。

(1) 飼育残渣を網で覆うことによる管理

飼育残渣を網で覆って管理することにより、飼育残渣中に本遺伝子組換えカイコの成虫が発生してもクワコ成虫と交尾することを防ぐ。隔離飼育試験の結果から、上蔟後の飼育残渣を飼育室外に搬出して4mm目以下の網で覆って30日間管理することにより、野生のクワコとの交雑を防止できると考えられた。本飼育等要領において飼育残渣を網で覆うことによって管理する場合は、4mm目以下の網で覆って上蔟から30日後まで管理することとし、網の設置は以下のいずれかの方法による。

20 25

1) 飼育残渣を飼育室内に残したまま、飼育室の開放している窓等を網で覆い、入退室以外は出入り口を閉め切る。

2) 飼育残渣を飼育室外に搬出して網で覆う。飼育残渣を運搬した後は、その経路を目視で確認し、繭及びカイコ（幼虫及び蛹）が落ちていた場合はただちに捕殺する。

(2) 飼育残渣を粉砕することによる管理

飼育残渣を粉砕処理することにより、飼育残渣中の本遺伝子組換えカイコを殺虫し、クワコ成虫と交尾することを防ぐ。隔離飼育試験の結果から、上蔟から9日後までの繭の収穫まで成虫が生じることはなく、それまでに飼育残渣を粉砕機で粉砕することにより、野生のクワコとの交雑を防止できると考えられた。本飼育等要領において飼育残渣を粉砕処理する場合は、上蔟から9日後までに完了させることとする。粉砕処理は飼育室内で行うか、飼育残渣を飼育室外に搬出して行うこととする。飼育室外に搬出して行

30 35

う場合は、搬出後ただちに粉碎処理を行い、粉碎処理の後で運搬の経路を目視で確認して繭及びカイコ（幼虫及び蛹）が落ちていた場合はただちに捕殺する。

6 繰糸用の繭の管理

5 (1) 繭（蛹）の不活化

繰糸に用いる本遺伝子組換えカイコの繭は収穫の当日又は翌日に製糸工場に運搬し、その日のうちに熱乾燥（115℃から60℃まで6時間程度かけて乾燥するなど、一般的な方法）または冷凍（-20℃、24時間以上）にかけて、内部の蛹を死滅させる。乾燥機や冷凍庫に繭を入れた後は、周囲を確認してこぼれ落ちた繭を回収する。なお、本遺伝子組換えカイコの繭は非遺伝子組換えカイコの繭とは分けて処理し、本遺伝子組換えカイコの繭が非遺伝子組換えカイコの繭に混入した場合は、すべてを本遺伝子組換えカイコの繭として処理する。

(2) 繰糸時の繭の管理

本遺伝子組換えカイコの繭から繰糸する場合は、非遺伝子組換えカイコの繭とは別の繰糸機を用いることにより、繰糸後に残る不活化済みの本遺伝子組換えカイコの蛹が非遺伝子組換えカイコの蛹に混入することを防止する。

(3) 繰糸後の蛹の管理

繰糸後に残る不活化済みの本遺伝子組換えカイコの蛹は飼料等として流通しないように、非遺伝子組換えカイコの蛹とは分けて管理した上で、産業廃棄物処理業者に委託して産業廃棄物として焼却処理する。不活化済みの本遺伝子組換えカイコの蛹が非遺伝子組換えカイコの蛹に混入した場合は、すべてを同様に産業廃棄物として焼却処理する。産業廃棄物として廃棄する際には、産業廃棄物管理票(マニフェスト)を取り交わし保管する。

7 クワコの発生時期の調査

モニタリング計画書に基づいて本遺伝子組換えカイコを飼育した翌年に実施するモニタリングに資するため、本遺伝子組換えカイコの飼育が予定されている地域において、本遺伝子組換えカイコを飼育する年の5月から7月まで、フェロモントラップを1週間に1回交換しながら設置し、クワコのオス成虫が発生する時期を特定する。ただし、周辺地域でクワコのオス成虫の発生時期がすでに調査されている場合は、その情報を用いることができる。

30

8 本遺伝子組換えカイコの使用に関する研修

農研機構は、本遺伝子組換えカイコを適切に管理するため、本遺伝子組換えカイコの利用について契約等を交わした者に対して、本遺伝子組換えカイコの幼虫を第一種使用等として飼育する者及び本遺伝子組換えカイコの繭からの繰糸を行う者を対象として、本遺伝子組換えカイコの飼育を開始する前に、法令や本飼育等要領を遵守させるための研修を行わ

35

せるとともに、その結果を報告させる。また、当該研修が実施される際は、農研機構から講師を派遣する。研修においては、別途マニュアルを作成した上で、(1) 法令、(2) 本遺伝子組換えカイコの第一種使用規程、(3) 本飼育等要領に基づくクワコとの交雑防止措置や蛹の廃棄手順などの管理手法、(4) 飼育や繰糸等の実施状況の報告手続き、などについて

5 解説する。

別添資料リスト

- 別添 1 カイコとクワコの生理学的及び生態学的特性の比較
- 別添 2 日本国内におけるクワコの分布に関する調査
- 5 別添 3 クワコ成虫の発生時期に関する調査
- 別添 4 鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生する可能性のある鳥類・昆虫類
- 別添 5 カイコから日本各地の野生のクワコ集団とカイコとの間の遺伝的多型の比較
- 別添 6 養蚕農家周辺でのカイコとクワコの交雑第一代の発生に関する調査
- 別添 7 カイコとクワコの交雑後代の妊性に関する調査
- 10 別添 8 自然界におけるカイコとクワコの交雑第一代の生存能力に関する調査
- 別添 9 カイコとクワコの交雑第一代のオス成虫の放飼再捕獲試験
- 別添 10 目的遺伝子の塩基配列
- 別添 11 ヘルパープラスミドの塩基配列
- 別添 12 遺伝子導入に用いたヘルパープラスミドが残存していないことの確認
- 15 別添 13 移入された核酸の複製物が染色体に1コピー存在することの確認
- 別添 14 移入された核酸の複製物の複数の子孫系統における伝達の安定性
- 別添 15 移入された核酸の複製物の個体間及び子孫系統間での発現の安定性
- 別添 16 幼虫体重の比較
- 別添 17 繭重及び繭層重の比較
- 20 別添 18 孵化歩合の比較
- 別添 19 幼虫期間の比較
- 別添 20 営繭率の比較
- 別添 21 幼虫の行動の比較
- 別添 22 産卵数の比較
- 25 別添 23 産卵行動の比較
- 別添 24 植物の発芽や生育に与える影響の比較
- 別添 25 土壌微生物に与える影響の比較
- 別添 26 隔離飼育区画における飼育試験
- 別添 27 本遺伝子組換えカイコの生理学的特性に関する追加試験

別添1 カイコとクワコの生理学的及び生態学的特性の比較

- 生物多様性影響評価書の第一の「1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報」に関連する情報について、クワコの生理学的及び生態学的特性についての情報をとり
- 5 まとめるとともに、カイコとクワコの比較を以下の表のとおりとりまとめた。

表. カイコとクワコの比較表

	カイコ	クワコ
学名	<i>Bombyx mori</i> (Linnaeus)	<i>Bombyx mandarina</i> (Moore)
国内の自然環境における生息状況	自然環境における生息の報告はない。	北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島の悪石島までで、小宝島以南でのクワコの生息記録はない（河原畑, 1998; 廣森, 2001; 金井ら 2013; 別添2）。
国外の自然環境における生息状況	自然環境における生息の報告はない。	日本のほか、中国本土、朝鮮半島、台湾及び極東ロシア沿海州に生息記録がある（河原畑, 1998）。
食草	幼虫はクワを摂食する。成虫は口器がなく飲水も摂食もしない。	幼虫はクワを摂食する。成虫は口器がなく飲水も摂食もしない。
幼虫の生育時季	自然環境では生育できない。	クワが葉をつけている期間（5月から11月頃）。
化性（1年間に発生する回数）	系統により、1化性、2化性、多化性がある。	主として2化性又は3化性で、標高が高い地域等では1化性になる場合もある（橋本・佐藤, 1958; 別添3）。
幼虫の脱皮回数	通常は4回で、3回になることもある。	3回が多いが4回もある（大村, 1950; 蛭木・竹田, 1982）。
幼虫の運動性	餌がなくなっても飼育容器から外に出ない。	餌があっても動き回る。

成虫の運動性	翅はあり羽ばたくことはできるが飛ぶことは全くできない。	飛ぶことができる。
幼虫の体色	白色が多い。	灰褐色や黒褐色（名和, 1936）。
幼虫の擬態行動	しない。	腹部第2体節から先を持ち上げて静止し、枝に擬態する。
繁殖様式	有性生殖	有性生殖
交尾	メス成虫がボンビコールを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は歩いてメス成虫に接近する。	メス成虫がボンビコールを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は飛んでメス成虫に接近する。
産卵	歩きながら 500 個前後を産卵する。	1 個ずつ又は数個～10 数個程度ずつまとめて産卵し、1 頭のメス成虫の産卵数は 250～300 個程度（名和, 1936; 大場, 1939b）。

【カイコとクワコの関係】

カイコと同じ *Bombyx* 属には、野生種としてクワコ *Bombyx mandarina* が含まれ、形態学的、遺伝学的及び分子生物学的知見から、カイコの祖先は中国のクワコであると考えられている（河原畑, 1998）。中国のクワコを家畜化してカイコが作られたのが数千年前で、中国のクワコ（カイコ）と日本のクワコが分化したのは、それよりはるか以前の数百万年前であるとされている（河原畑, 1998; Yukuhiro *et al.*, 2002）。染色体数については、カイコと中国のクワコが $2n = 56$ 、日本のクワコが $2n = 54$ という違いがあるが、カイコと日本のクワコを人為的に交尾させると妊性を持つ交雑個体が生じる（河原畑, 1998）。

10

【クワコの国内及び国外の自然環境における生息状況】

クワコは、日本、中国本土、朝鮮半島、台湾及び極東ロシア沿海州に分布する（河原畑, 1998）。日本においては、北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島の悪石島までで、小宝島以南でのクワコの生息記録はない（河原畑, 1998; 廣森, 2001; 金井ら 2013; 別添 2）。クワコの幼虫はクワの葉を摂食し、桑園だけではなく、山林にクワが自生していれば生息する可能性がある。しかし、養蚕用に管理された桑園ではクワが定期的に株元ま

15

で剪定され、クワコの卵も枝とともに除去される可能性が高まることから、生息数が少なくなることが推測される。

冬季はクワが落葉するため、クワコ幼虫が生存できるのは春から秋にかけてであり、卵で越冬する（名和, 1936; 大村, 1950）。

- 5 クワコの成虫の発生時期については、長野県松本市では7月中旬と10月中旬の年2回程度（橋本・佐藤, 1958）、茨城県つくば市大わし（標高 20m）と群馬県下仁田町下小坂（標高 280m）では6月頃、8月頃及び11月～12月頃の年3回程度（別添3）、長野県佐久市内山峠（標高 1,000m）では7月頃及び9～10月頃の年2回程度である（別添3）。以上のことから、地域による違いはあるものの、日本国内のクワコは主に、1年に2回世代を繰り返す2化性または、3回世代を繰り返す3化性である。

10 微粒子病を引き起こす微孢子虫 *Nosema bombycis* の野生のクワコにおける感染率は、1941年秋に1.4%（216頭中3頭）、1942年春に0%（156頭中0頭）であったとの報告がある（大村, 1950）。

15 【中国産クワコ及び韓国産クワコ】

- 幼虫皮膚の斑紋と成虫の翅の形態について、中国産・韓国産・日本産それぞれのクワコ集団の間で明瞭な違いは認められないが、染色体数については、中国産クワコがカイコと同じ $2n = 56$ 、韓国産クワコと日本産クワコでは $2n = 54$ である（河原畑, 1998; Nakamura *et al.*, 1999; Kawanishi *et al.*, 2008）。中国産クワコを飼育した結果では、日本産クワコよりも成虫や蛹が小さく、高温時でも飼育しやすいことなどが報告されている（河原畑, 1998）。中国産クワコとカイコを人為的に交尾させると、妊性のある交雑個体が生じるが、交雑個体同士を交配した場合に次代の孵化率が低下するとの報告がある（中村ら, 1996）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：基本的特性】

- 25 クワコの卵は長径 1.2～1.3 mm、短径 1 mm くらいの平たい楕円形で、外側は堅い卵殻で包まれている（名和, 1936; 大村, 1950; 河原畑, 1998）。1年に繰り返す世代の回数は主に2回又は3回（2化性又は3化性）である（橋本・佐藤, 1958; 別添3）。

- 飼育条件下での調査では、孵化してから繭を作るまでの幼虫期間は20日～30日程度だった（大村, 1950）。1齢～2齢頃の間は昼間に摂食するが、成長するに従って夜間のみ摂食するようになる（名和, 1936; 大村, 1950）。幼虫脱皮の回数は3回（三眠蚕）が多いが、4回もある（大村, 1950; 蜷木・竹田, 1982）。

- 35 幼虫の体色は地域や個体ごとの変異が大きいですが、灰褐色ないし黒褐色で、胸部第2体節と腹部第2体節、腹部第5体節に明瞭な斑紋がある（名和, 1936; 森, 1995）。このような体色が桑樹の枝に似ている他、摂食時以外は腹部第2体節から先を持ち上げて静止することで枝に擬態する。

繭は葉を巻き込むようにしてその間に作るが、その際、枝から葉柄を通して糸で足場を作り、葉が落ちないようにする（名和, 1936; 大村, 1950）。羽化するまでの蛹の期間は個体による違いが大きく、20日から1か月程度から、長い場合は100日以上という例もある（大場, 1939a; 大村, 1950）。

- 5 成虫はオス・メスともに飛翔することができる（河原畑, 1998）。メス成虫は交尾が終了するまで静止し、日中に性フェロモンを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は午前中を中心に日中に飛んだり休んだりを繰り返しながらメス成虫を探索すると考えられる（Sasaki and Jibiki, 1984）。オス成虫の生存期間として最も長い記録は21日間である（村上ら, 2010）。

10

【クワコの生理学的及び生態学的特性：生息又は生育可能な環境の条件】

クワコは幼虫期に桑葉を摂食して成長するため、生息場所はクワが生えている場所に限り、クワが落葉する冬季は幼虫が生存することができず、卵で越冬する（名和, 1936）。地域や気候によって時期は異なるが、冬を越した卵から、クワが芽吹く5月頃に幼虫が孵化し、11月から12月にはその年の最後の成虫が発生する（橋本・佐藤, 1958; 別添3）。

15

幼虫は、腹脚を用いてクワの葉や枝を確実に把握することができ、カイコに比べて移動性が高く活発に動き回る。1齢～2齢頃の間は昼間に摂食するが、成長するに従って夜間のみ摂食するようになる（名和, 1936; 大村, 1950）。飼育に際しては、餌があっても動き回るため、容器の蓋を閉めて、逃亡を防止する必要がある。

- 20 繭は葉を巻き込むようにしてその間に作るが、その際、枝から葉柄を通して糸で足場を作り、葉が落ちないようにする（名和, 1936; 大村, 1950）。成虫はオス・メスともに飛翔することができる（河原畑, 1998）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：繁殖又は増殖の様式】

- 25 クワコは受精によって生じた卵から発生する有性生殖を行う。

蛹からの羽化（成虫の発生）は、午前中に起きるという報告（大村, 1950）や、オスの羽化が午前中を中心に、メスの羽化が午後を中心に起きるという報告（Kuwahara, 1984）がある。

- メス成虫は羽化後もその場にとどまり、尾部のフェロモン腺から性フェロモン（ボンビコール）を大気中に放出してオス成虫を誘引して交尾する（Kuwahara *et al.*, 1984; Daimon *et al.*, 2012）。オス成虫は昼行性で、日中に飛翔するため、ボンビコールを用いたフェロモントラップでのオス成虫の捕獲は午前中が中心となる（Sasaki and Jibiki, 1984; Kuwahara, 1984）。成虫はオス・メスともに夜間に灯火に誘引される例が報告されているが、クワの害虫としてのクワコの防除として、灯火誘殺は必ずしも効果的ではないとされている（名和, 1936; 大場, 1939b）。
- 35

メス成虫は、1個ずつ、又は数個～10数個程度ずつまとめて卵を産みつけ、1頭のメス成虫が産む卵の総数は250個～300個程度である(名和, 1936; 大村, 1950)。自然条件下では、クワの葉や樹皮に産み付けることが一般的であるが、クワの近くに生えているサクラやケヤキに産み付けた例もある(大村, 1950)。飼育条件下では、メス成虫を入れている紙袋やプラスチック籠などにも産卵する(中村ら, 1999)。交尾したメス成虫は、1夜のうちに産卵を終えると考えられる(大村, 1950)。

冬を越して春に孵化する越冬卵では、卵から幼虫が出てくる孵化は一斉に起きるのではなく、4月頃から始まって2か月以上にわたって徐々に起きる(大場, 1939a; 大村, 1950)。孵化率は、自然条件下では寄生蜂による被害を受けるため一定しない。飼育条件下での孵化率は変異が大きいですが、概ね80%程度と報告されている(大村, 1950)。春に生まれた個体が産卵すると、休眠しないで胚発生が進む不越冬卵となり、この場合は、産卵から10日程度で一斉に孵化する(大村, 1950)。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：捕食・寄生される可能性】

野生のクワコは、卵の時期には、寄生蜂による寄生を受ける(名和, 1936)。その寄生率は年や場所によって大きく異なるが、最大で90%を超えることがある(大村, 1950)。幼虫期には、カイコノウジバエとクワコヤドリバエが寄生するほか、アシナガバチによって捕食され、蛹期には、ヒラタヒメバチとアシプトコバチが寄生することが報告されている(名和, 1936)。

20

Daimon T., Fujii T., Fujii T., Yokoyama T., Katsuma S., Shinoda T., Shimada T. and Ishikawa Y. (2012) Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkmoth *Bombyx mandarina*: the effects of bombykol and bombykol acetate. *J. Chem. Ecol.*, 38, 1031-1035.

Kawanishi Y., Banno Y., Fujimoto H., Nho S. K., Tu Z., Mita K., Tsuchida K., Takada N., Maekawa H., and Nakajima Y. (2008) Method for rapid distinction of *Bombyx mandarina* (Japan) from *B. mandarina* (China) based on rDNA sequence differences. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* 77, 79-85.

Kuwahara Y. (1984) Flight time of *Bombyx mandarina* males to a pheromone trap baited with bombykol. *Appl. Entomol. Zool.*, 19, 400-401.

Kuwahara Y., Mori N., Yamada S., and Nemoto T. (1984) Evaluation of bombykol as the sex pheromone of *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 19, 265-267.

Nakamura T., Banno Y., Nakada T., Nho S. K., Xü M. K., Ueda K., Kawarabata T., Kawaguchi Y., and Koga K. (1999) Geographic dimorphism of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, in the chromosome number and the occurrence of a retroposon-like insertion in the arylphorin gene. *Genome*, 42, 1117-1120.

Sasaki M. and Jibiki F. (1984) Timing of the sexual behavior of wild and domestic silk moths. *Appl. Entomol. Zool.*, 20, 99-101.

Yukuhiro K., Sezutsu H., Itoh M., Shimizu K., and Banno Y. (2002) Significant levels of sequence

divergence and gene rearrangement have occurred between the mitochondrial genome of the wild mulberry silkworm, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1385-2389.

- 5 大場治男 (1939a) 桑蚕に関する調査 一、越年卵に於ける孵化並第一世代羽化期の不齊一に就て. 衣笠蚕報 396, 115-123.
- 大場治男 (1939b) 桑蚕蛾の飛来すること. 衣笠蚕報 397, 201-202.
- 大村清之助 (1950) 桑蚕の生態習性及び繭に関する調査. 蚕糸試験場報告 13, 79-130.
- 金井賢一・守山泰司・中村京平 (2013) 2011年10月悪石島における昆虫記録. 鹿児島県立博物館研究報告 32, 17-22.
- 10 河原畑勇 (1998) クワコとカイコ. 文部省科学研究費補助金基盤研究(A)(2)研究成果報告書 (別冊) 課題番号: 07406004.
- 中村隆・伴野豊・徐孟奎・中田徹・河口豊・古賀克己 (1996) 中国産クワコとカイコとの雑種後代個体における染色体構成. 九州蚕糸 27, 31.
- 15 中村隆・伴野豊・河口豊・古賀克己 (1999) 効率的なクワコの採卵方法. 日本蚕糸学雑誌 68, 165-166.
- 名和梅吉 (1936) 桑樹害虫クワゴに就いて. 昆虫世界 40, 2-5.
- 蜷木理・竹田敏 (1982) クワコの全齢人工飼料育. 日本蚕糸学雑誌 51, 237-238.
- 橋本春雄・佐藤京二 (1958) 松本市におけるクワコの羽化時期. 日本蚕糸学会中部支部講演集 14, 9.
- 20 廣森敏昭 (2001) トカラ列島 宝島・小宝島, 2000年6月の昆虫. 鹿児島県立博物館研究報告 20, 49-54.
- 村上聡・岩松琢磨・北村優・北澤裕太・片田美幸・藤森遼・横山岳・蜷木理 (2010) カイコの成虫生存期間の分布に関する系統間差異. 蚕糸・昆虫バイオテック 79, 53-59.
- 25 森精 編著 (1995) カイコと教育・研究、サイエンスハウス

別添2 日本国内におけるクワコの分布に関する調査
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)

別添3 クワコ成虫の発生時期に関する調査

(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)

別添4 鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生する可能性のある鳥類・昆虫類

野外におけるカイコの潜在的な捕食動物として、群馬県前橋市において鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生することが考えられる野生の鳥類・昆虫類を以下に挙げる。

5

鳥類

ムクドリ（観察による）

カラス類（観察による）

10 昆虫類

カイコノウジバエ（横山, 1929）

クワコヤドリバエ（横山, 1929）

ブランコヤドリバエ（横山, 1929）

ハサミムシ類（横山, 1929）

15 カマドウマ類（横山, 1929）

ウマオイ類（横山, 1929）

ハネカクシ類（横山, 1929）

ゴミムシ類（横山, 1929）

アシナガバチ類（横山, 1929）

20 スズメバチ類（飯塚・行弘, 2007）

アリ類（横山, 1929）

飯塚哲也・行弘研司（2007）野外におけるカイコ遺伝子拡散の可能性評価手法の開発． 遺

伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究（プロジェクト研究成果シリー

25 ズ 447）, 100-102.

横山桐郎（1929）最新日本蚕業害虫全書、明文堂

別添5 カイコから日本各地の野生のクワコ集団とカイコとの間の遺伝的多型の比較
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)

別添 6 養蚕農家周辺でのカイコとクワコの交雑第一代の発生についての調査

養蚕の過程でのカイコとクワコの交雑の可能性を直接的に検証する実験として、養蚕農家において特段の交雑防止措置を講じない慣行的な手法でカイコ幼虫を飼育し、その周辺
5 で採集したクワコの遺伝子型を解析した (Kômoto *et al.*, 2016)。カイコとクワコの交雑は、カイコのメス成虫とクワコのオス成虫の組合せに限られる (中村ら, 1997) ことから、カイコとクワコとの第一代はカイコ由来のミトコンドリアを持ち、ミトコンドリア *coxI* 遺伝子の遺伝子型を解析することにより、クワコ集団内の交雑第一代の割合を直接的に明らかにすることができる。

10

【調査方法】

(1) クワコを採集するフェロモントラップの設置

フェロモントラップとして、害虫発生予察用の粘着板を使用し、誘引源として、平成 25
15 年はカイコのメス成虫 1~3 頭ずつ、平成 26 年と平成 27 年は合成フェロモン (ボンビコー
ル) 1 mg を添加したゴムキャップ 1 個ずつを用いた。調査期間は、平成 25 年は 6 月 12 日
から 12 月 24 日まで、平成 26 年は 5 月 26 日から 12 月 23 日まで、平成 27 年は 6 月 2 日か
ら 12 月 14 日までであった。おおむね 2 週間に 1 回、粘着板と誘引源とともにフェロモン
トラップを交換して、捕獲されたクワコのオス成虫を回収した。

20 (2) 調査地

調査地とした群馬県前橋市の養蚕農家の飼育規模は表 1 のとおりであり、実際にフェロ
モントラップを設置した調査地の状況は表 2 のとおりである。

表 1. 調査地とした養蚕農家の飼育規模 (平成 26 年)

農家	年間飼育頭数	年間飼育回数	飼育時期
A	99 万頭	5 回	5 月中旬から 10 月中旬
B	57 万頭	4 回	5 月中旬から 10 月下旬
C	24 万頭	2 回	5 月中旬から 10 月上旬
D	60 万頭	5 回	5 月中旬から 10 月下旬
E	7 万 5 千頭	1 回	5 月中旬から 6 月中旬

25

表 2. 調査地の状況

調査地	農家	調査年	調査地の環境
A1	A	平成 25～27 年	蚕室に隣接して飼育残渣を堆積している場所で桑畑にも隣接
A2	A	平成 25・26 年	調査地 A1 から約 2 km 離れた桑畑
A3	A	平成 25・26 年	調査地 A2 から約 400 m 離れた桑畑
B	B	平成 26・27 年	蚕室に隣接して飼育残渣を堆積している場所で桑畑にも隣接
C	C	平成 26・27 年	蚕室に隣接した桑畑
D	D	平成 26・27 年	蚕室に隣接した場所（農家 D は蚕室、桑畑、残渣廃棄場所がそれぞれ離れている。）
E	E	平成 26・27 年	畦間に残渣を廃棄している桑畑と蚕室に隣接

(3) 遺伝子型の解析

採集したクワコのオス成虫から抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR でミトコンドリア *cox1* 遺伝子の一部を増幅した。その一部をとってアガロースゲル電気泳動で確認した後、残りの一部を制限酵素 *Ssp I* で消化してアガロースゲル電気泳動を行い、断片長多型からカイコ型とクワコ型を区別した。必要に応じて PCR 産物の塩基配列を決定してカイコ型とクワコ型を区別した。

10 【結果】

平成 25～27 年に捕獲したクワコのオス成虫のうち、PCR 産物が得られた 3,750 個体すべてがクワコ型であった (表 3)。

表 3. 調査地ごとの調査結果

調査地	解析数			解析の結果
	平成 25 年	平成 26 年	平成 27 年	
A1	75 頭	253 頭	188 頭	すべてクワコ型
A2	119 頭	542 頭	—	すべてクワコ型
A3	128 頭	814 頭	—	すべてクワコ型
B	—	187 頭	179 頭	すべてクワコ型
C	—	168 頭	111 頭	すべてクワコ型
D	—	226 頭	112 頭	すべてクワコ型
E	—	426 頭	222 頭	すべてクワコ型

【考察】

本試験では、野生のクワコ集団に現に交雑第一代が生じているかどうかを検証している
5 ものであり、ミトコンドリアゲノムを調べることで確実に検出できる。

特段の交雑防止措置を講じることなく、桑畑の中や隣接地に残渣を廃棄・堆積するな
ど、カイコとクワコの交雑が起きやすい状況を作り出しても、野生のクワコ集団中に交雑
個体の成虫は認められなかったことから、実際の養蚕農家及びその周辺で交雑第一代が生
じることはないか、または極めてまれであると考えられた。

10

Kômoto N., Kuwabara N., and Yukuhiro K. (2016) Absence of hybrids between the domesticated
silkmoth, *Bombyx mori*, and the wild mulberry silkmoth, *B. mandarina*, in natural populations
around sericulture farms. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 85, 67-71.

15 中村隆・伴野豊・河口豊 (1997) カイコとクワコとの間における生殖隔離の程度. 九州
蚕糸 28, 30.

別添7 カイコとクワコの交雑後代の妊性に関する調査

カイコとクワコの交雑個体及びその後代が妊性を持つかどうかを調査した。

5 【方法】

カイコ（中 145 号×日 140 号）のメスとクワコのオスとを野外で交尾させ、得られた受精卵から孵化した交雑第 1 代の幼虫を 3 齢幼虫まで室内で飼育した後、約 250 頭を網室（図 1、2）内の桑樹に放飼した。



図 1. 網室の外観。

全体が 3 つの区画に分かれていて、中央の灰色に塗った部分が今回用いた区画。

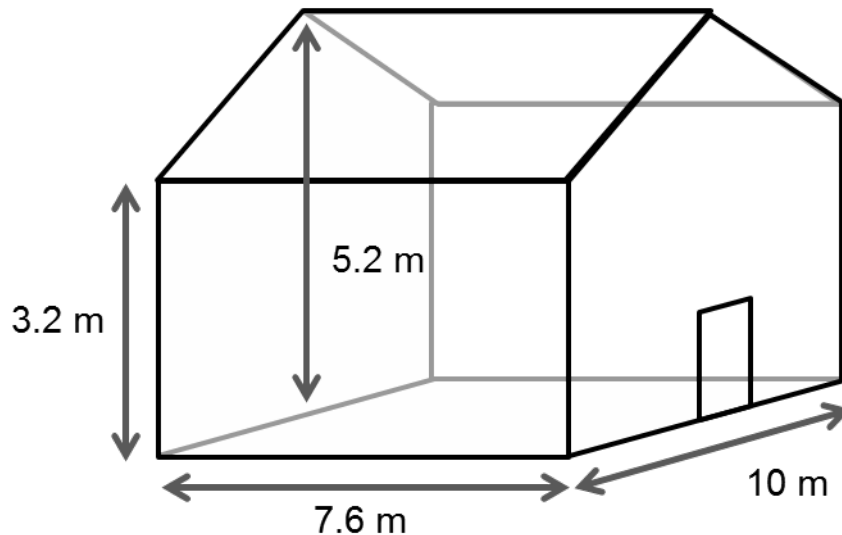


図 2. 使用した区画の大きさ

網室内には、桑樹が 5 本ある。下草の除草や桑樹の剪定等の管理を 1 年に 1 回以上行い、その際に、交雑個体の後代が生存していることを確認した。

【結果】

2008年夏に網室内に交雑第1代の幼虫を放飼した後、成虫の発生が確認された。その後、2012年夏に繭を回収して試験を終了するまで、網室の中で交雑個体の後代が継続的に生存していることは、年に1回以上確認された。なお、網室内には、主要な捕食者である

5 鳥類及びハチ類は生息しておらず、交雑個体が捕食される様子も観察されていない。

【考察】

本試験で得られた結果は、カイコとクワコの交雑個体及びその後代に妊性があり、捕食や競合がない条件で野外でも生存できることを示している。室内での飼育としては、児玉

10 (1927)がF₃まで、見波・大場(1939)がF₄まで、それぞれ経代飼育の結果を報告している。このことから、カイコとクワコの交雑個体及びその後代には妊性があることが確認できる。

15 児玉彌曾衛(1929)家蚕と野蚕の交配. 佐久良会雑誌, 21, 59-64.

見波定治・大場治男(1939)桑蚕と家蚕との交雑種に就て. 衣笠蚕報, 394, 71-82.

別添 8 自然界におけるカイコとクワコの交雑第一代の生存能力に関する調査

カイコのメス成虫が屋外に生じてクワコのオス成虫と交尾し、交雑第一代の幼虫が孵化した場合の生存の可能性について、網室内での観察では、捕食者がいないことから自然条件が再現されていないという課題があった。そこで、網室外の桑樹を調査地として交雑第一代の孵化幼虫を放飼し、その生存の可能性を検証した。

【調査方法】

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の敷地内に、他の桑樹から離れて生育している桑樹の葉上または桑樹から 2 m 離れた地面に、カイコ（日 137 号×支 146 号）とクワコ（群馬県由来の飼育系統）との交雑第一代の孵化幼虫を放飼した。20 日程度後に当該桑樹の枝を剪定しながら葉を 1 枚ずつ観察して幼虫や繭の有無を調査した。

【結果】

2014 年 5 月に 3 日間で合計 150 頭の交雑第一代の孵化幼虫を桑樹の葉上に放飼した。7 日後には生存個体が観察されなくなり、最終的に 23 日後に確認した際には、幼虫も繭も認められなかった。

2015 年 6 月に 3 日間で合計 626 頭、2015 年 8 月に 3 日間で合計 2,338 頭の交雑第一代の孵化幼虫を桑樹から 2 m 離れた地面に放飼した。その後の観察では生存個体は観察されず、最終的に 19～21 日後に確認した際にも、幼虫・繭ともに認められなかった。

【考察】

カイコのメス成虫が屋外でクワコのオス成虫と交尾して産卵する場所として可能性があるのは飼育残渣の中であり、孵化幼虫を地面に放飼した調査はそれを再現している。カイコのメス成虫 5 頭が実験室内で産卵するのとほぼ同数の孵化幼虫を放飼しても蛹まで生存することがなく、生存の可能性を高めるためにあえて葉上に放飼しても残らなかったことから、飼育残渣に紛れてカイコのメスが屋外に出て、仮に捕食等により死亡することなく羽化してクワコのオス成虫と交尾したとしても、交雑第一代が生存する可能性は極めて低いと考えられる。

なお、網室での調査（別添 7）で交雑第一代が生存可能であったことから、今回の網室外での調査で生存できなかったのは、網室内に存在していない鳥類等の捕食者による影響によるものと推定される。

Kômoto N., Kuwabara N., and Yukuhiro K. (2016) Absence of hybrids between the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*, and the wild mulberry silkmoth, *B. mandarina*, in natural populations around sericulture farms. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 85, 67-71.

別添9 カイコとクワコの交雑第一代のオス成虫の放飼再捕獲試験
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)

別添 10 目的遺伝子の塩基配列
(知的財産保護の観点から部外秘)

別添 11 ヘルパープラスミドの塩基配列

(知的財産保護の観点から部外秘)

別添 12 遺伝子導入に用いたヘルパープラスミドが残存していないことの確認

【方法】

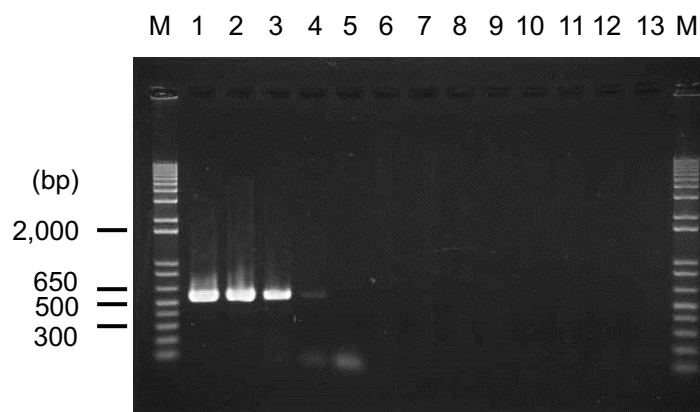
遺伝子組換えカイコ (GN13₂₋₃ 及び GCS₃₋₃) の 5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、0.5 μ g を鋳型として、KOD-plus を用いて 30 サイクルの PCR を行い、転移酵素遺伝子の一部を増幅した。検出限界を示すため、ヘルパープラスミドを段階希釈して鋳型とした PCR も行った。PCR は 50 μ l の反応系で行い、そのうち 5 μ l を 1%アガロースゲルで電気泳動した。

プライマーの塩基配列は以下のとおり。

- 10 pig-TP4868U25: 5'-TATATCCCAAACAAGCCAAGTAAGT-3'
 pig-TP5394L23: 5'-CCACCTATTCGTCTTCCTACTGC-3'

【結果】

仮にカイコゲノム中に 1 コピーの *piggyBac* 転移酵素遺伝子が挿入されているとすると、
 15 カイコゲノム 0.5 μ g に相当するヘルパープラスミドの量は約 6 pg となる。PCR の結果、
 図のとおり、予想されるサイズ (550bp) のバンドが、ヘルパープラスミド 0.4 pg から検出できた一方、遺伝子組換えカイコのゲノム DNA 0.5 μ g からは検出されなかったことから、遺伝子組換えカイコにはヘルパープラスミドの配列が残存していないことが確認できた。



20

- M : 分子量マーカー
 1 : ヘルパーDNA 4 ng (カイコゲノム DNA 0.5 μ g での 700 コピー分に相当)
 2 : ヘルパーDNA 40 pg (7 コピー分)
 3 : ヘルパーDNA 0.4 pg (0.07 コピー分)
 25 4 : ヘルパーDNA 4×10^{-3} pg (7×10^{-4} コピー分)
 5 : ヘルパーDNA 4×10^{-5} pg (7×10^{-6} コピー分)
 6-9 : GN13 ゲノム DNA 0.5 μ g (それぞれ別個体)
 10-13 : GCS13 ゲノム DNA 0.5 μ g (それぞれ別個体)

別添 13 移入された核酸の複製物が染色体に 1 コピー存在することの確認

【方法】

5 遺伝子組換えカイコ (GN13₂₋₃) と非遺伝子組換えカイコ (白/C) との F₁ に、白/C を戻し交配して、次代での分離を解析した。1 ペア (蛾区) の卵から孵化した幼虫を飼育して繭を作らせ、繭の蛍光を蛍光実体顕微鏡で観察し、導入遺伝子である Sirius2 タンパク質の発現の有無を確認した。

また、同様に、遺伝子組換えカイコ (GCS13₃₋₃) と非遺伝子組換えカイコ (白/C) との F₁ に白/C 系統を戻し交配して、次代での分離を解析した。

10

【結果】

GN13₂₋₃ 系統と白/C の F₁ に白/C を戻し交配して得られた繭 220 個のうち、青色蛍光を持つものが 111 個 (50.5%)、蛍光を持たないものが 109 個 (49.5%) であった。戻し交配世代で、優性マーカーである青色蛍光を発現している個体が約半数であったことから、導入遺伝子
15 子は GN13₂₋₃ のゲノム中に 1 コピー挿入されていると考えられる (二項検定で $P = 0.89$)。

GCS13₃₋₃ と白/C の F₁ に白/C を戻し交配して得られた繭 206 個のうち、青色蛍光を持つものが 101 個 (49.0%)、蛍光を持たないものが 105 個 (51.0%) であった。戻し交配世代で、優性マーカーである青色蛍光を発現している個体が約半数であったことから、導入遺伝子は GCS13₃₋₃ のゲノム中に 1 コピー挿入されていると考えられる (二項検定で $P = 0.78$)。

20

別添 14 移入された核酸の複製物の複数の子孫系統における伝達の安定性

【方法】

遺伝子組換えカイコ (GN13₂₋₅、GN13₂₋₆、GCS13₃₋₅、GCS13₃₋₆、[GN13×GCS13]₄₋₆) 及び
5 非遺伝子組換えカイコ (日 137 号と MCS4 の F₁) から 6 頭ずつについて、5 齢幼虫の後部絹
糸腺からゲノム DNA を抽出し、ゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った。

ゲノム DNA を (2 μg) を制限酵素 *Bam* HI で消化したのち、0.8 %アガロースゲルで電
気泳動を行い、ナイロンメンブレン Hybond-N+にトランスファーした。プローブは、生物多
様性影響評価書中の図 6 に示すように *Sirius2* 遺伝子に設定し、PCR で作製した (717 bp)。

10 プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

ks113: 5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT-3'

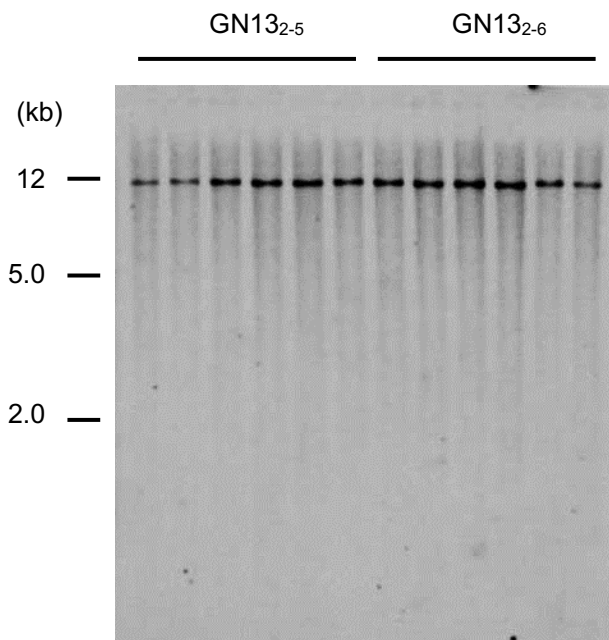
ks002: 5'-GCTAGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'

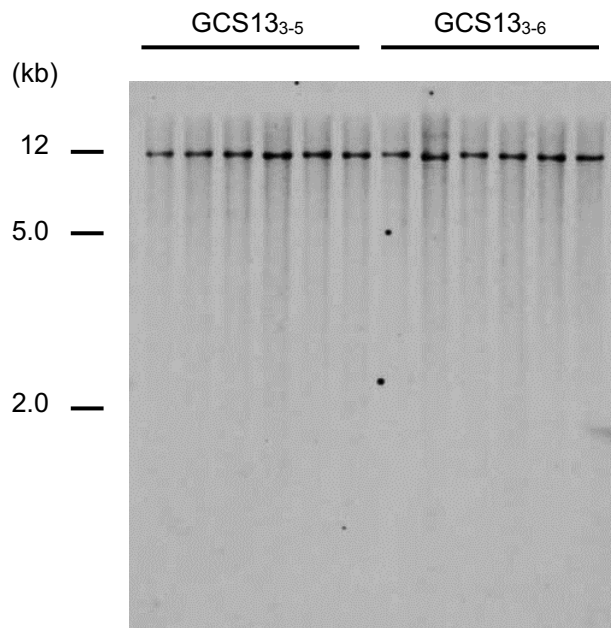
15 得られた PCR 産物を AlkPhos Direct Kit (GE ヘルスケア社製) を用いてラベルし、CDP-
Star を基質として化学発光で検出した。

【結果】

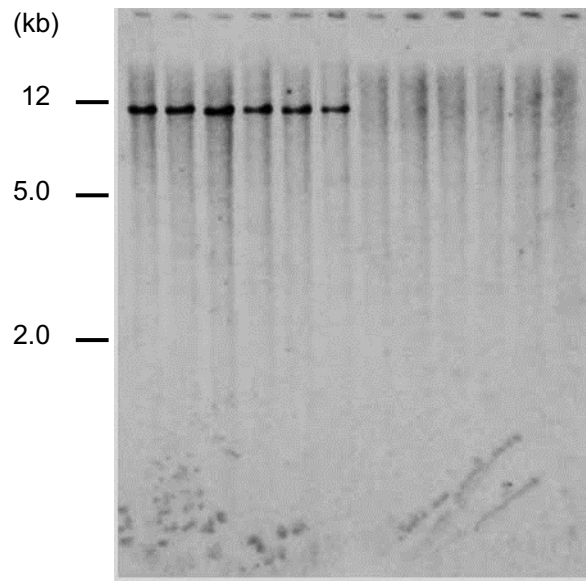
図に示すように、移入された遺伝子はカイコゲノムに安定的に維持されている。

20





日 137 号 × MCS4
 [GN13 × GCS13]₄₋₆ (非組換え)



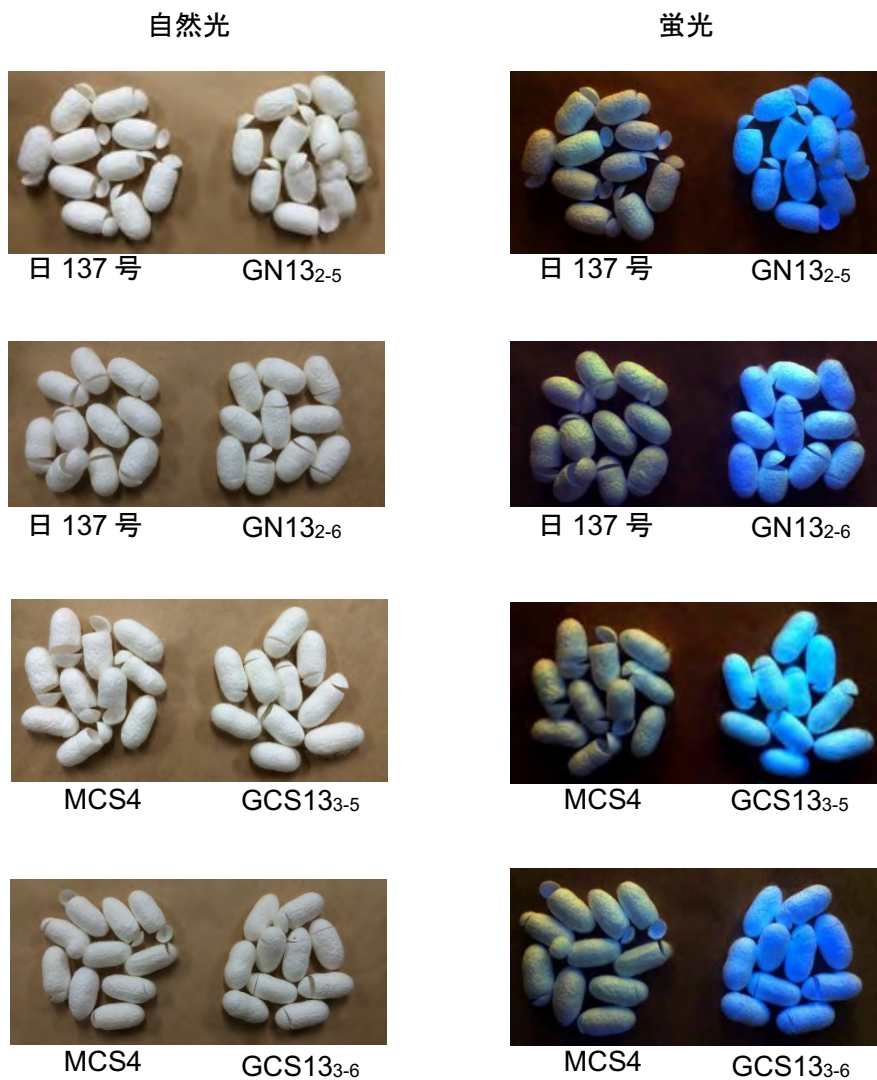
別添 15 移入された核酸の複製物の個体間及び子孫系統間での発現の安定性

【方法】

遺伝子組換えカイコ（GN13₂₋₅、GCS13₃₋₅、GN13₂₋₆、GCS13₃₋₆）及び同時期に飼育した非遺
5 伝子組換えカイコ（日 137 号及び MCS4）について、繭の青色蛍光を観察した。

【結果】

図のとおり、遺伝子組換えカイコの繭でのみ青色蛍光が観察された。このことから、今回
10 の申請に用いる遺伝子組換えカイコ系統では、導入遺伝子が安定的に発現していることが
10 確認できた。



別添 16 幼虫体重の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、孵化後及び脱皮後の給餌前の幼虫（起蚕）の体重を測定した。稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書 図 11）。

遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13]⁴⁻⁶

非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4]

10

孵化直後の幼虫については、50 頭をまとめて体重を測定した。これを、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコについて、それぞれ 6 回ずつ繰り返した。

2 齢起蚕については、10 頭をまとめて体重を測定し、1 頭あたりの体重を計算した。これを、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコについて、それぞれ 12 回ずつ繰り返した。

3 齢起蚕以降については、1 頭ずつの体重を、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 40 頭ずつ測定した。

【結果】

20

系統	孵化直後 ^{*1}	2 齢起蚕 ^{*2}	3 齢起蚕	4 齢起蚕	5 齢起蚕
GN13× GCS13	18.8±0.281	60.8±0.724	33.3±0.491	179±2.41	728±10.5
日 137 号× MCS4	18.5±0.204	66.7±1.05	35.8±0.472	179±2.18	739±9.64
(単位：mg、平均±標準誤差)					
<i>P</i> (t 検定)	0.40	0.00	0.00	1.00	0.44

*1 50 頭ずつまとめて測定した値を用いて検定を実施した。

*2 10 頭ずつまとめて測定した値を用いて検定を実施した。

別添 17 繭重及び繭層重の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの孵化幼虫 200 頭ずつについて、稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育した。得られた繭（2 頭以上が 1 つの繭を作った場合などを除いた正常な繭）について、繭重（蛹を含む繭の重さ）と繭層重（繭から蛹と脱皮殻を除いた重さ）を計測した。供試系統は以下のとおりとした。

	遺伝子組換えカイコ	[GN13×GCS13] ⁴⁻⁶
10	非遺伝子組換えカイコ	[日 137 号×MCS4]

【結果】

系統	オス			メス		
	個数	繭重	繭層重	個数	繭重	繭層重
[GN13× GCS13]	78	1.52 ±0.156	0.323 ±0.0467	74	1.99 ±0.202	0.364 ±0.0479
[日 137 号× MCS4]	84	1.49 ±0.147	0.331 ±0.0467	89	1.97 ±0.198	0.370 ±0.0492
(単位：g、平均±標準偏差)						
<i>P</i> (t 検定)		0.18	0.28		0.62	0.51

別添 18 孵化歩合の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、受精卵のうち幼虫が孵化する割合である孵化歩合を比較した。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13]⁴⁻⁶
非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4]

10 なお、不受精卵とは、受精卵特有の漿膜細胞の着色が認められない卵のこと、死卵とは、受精はしたが胚発生が進まなかった卵のことを言う。

【結果】

系統	総数	不受精卵数	死卵数	孵化卵数	孵化歩合 (%)
[GN13×GCS13]	2,187	93	29	2,065	98.6
[日 137 号×MCS4]	2,521	389	33	2,099	98.5

15

孵化歩合は (孵化卵数) / ((総数) - (不受精卵数)) として算出している。

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で、孵化歩合に有意差は認められなかった (カイ二乗検定で $P=0.66$)。

20

別添 19 幼虫期間の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの孵化幼虫 200 頭ずつについて、稚蚕期（1 5 齢から 3 齢）までは人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）は桑葉で飼育して、幼虫期間を比較した。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13]⁴⁻⁶

非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4]

10

なお、ここで幼虫期間とは、孵化した幼虫に最初の給餌を行ってから、繭形成の開始に伴って給餌を停止するまでの日数を言う。

【結果】

15

系統	オス		メス	
	繭形成数	幼虫期間（日）	繭形成数	幼虫期間（日）
[GN13×GCS13]	94	23.2±0.961	82	23.5±1.10
[日 137 号× MCS4]	89	23.0±0.237	100	23.1±0.843
(平均±標準偏差)				
<i>P</i> (t 検定)		0.033		0.005

別添 20 営繭率の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、全齢を桑葉で飼育した。4 齢起蚕 5 で頭数を 200 頭にそろえて飼育し、繭を作った個体数（結繭蚕数）を調査した。結繭蚕数を 4 齢起蚕数で割った値を営繭率とした。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13]⁴⁻⁶

対照となる非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4]

10

【結果】

系統	4 齢 起蚕数	結繭蚕数	営繭率 (%)
[GN13×GCS13]	200	179	89.5
[日 137 号×MCS4]	200	192	96.5

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で、営繭率に有意差が認められた（カイ二乗検定で $P = 0.012$ ）。

15

なお、繭を作らなかった個体については、幼虫期での死亡を確認した。

別添 21 幼虫の行動の比較

【方法】

5 齢 2 日目のカイコ幼虫を、半径 18 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 12 時間放置し、それぞれのカイコが元の場所からどのくらいの距離を移動したかを記録する。供試系統は以下のとおりとした。

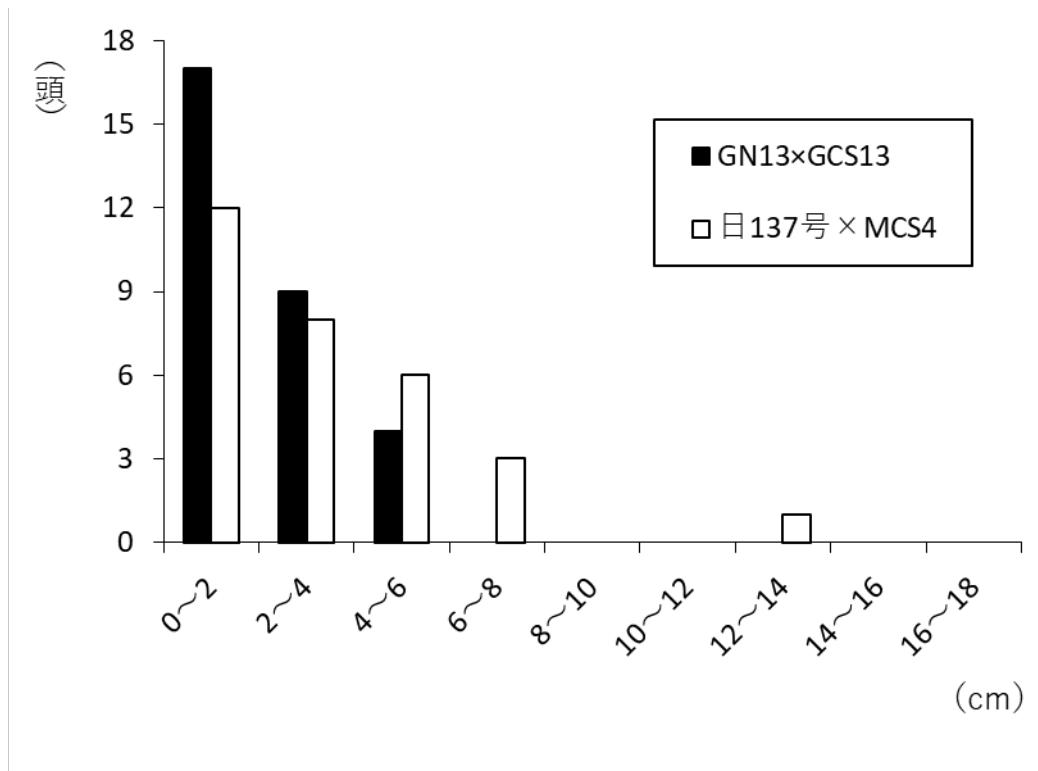
遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13]⁴⁻⁶

非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4]

10

【結果】

移動距離の平均値 (±標準偏差) は、遺伝子組換えカイコで 2.2 cm (±1.3 cm)、非遺伝子組換えカイコで 3.4 cm (±2.6 cm) であり、有意差が認められた (差がないことを帰無仮説とした Mann-Whitney の U 検定で $P = 0.037$)。また、移動距離を 2 cm ごとのヒストグラムに表すと下図のようになった。



別添 22 産卵数の比較

【方法】

- 遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 20 頭ずつのメス蛾を交尾・割愛させた後、半径 18 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 24 時間放置して産卵させ、それぞれの産卵数を調査した。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ [GN13×GCS13]⁴⁻⁶

非遺伝子組換えカイコ [日 137 号×MCS4]

10

【結果】

1 頭当たりの産卵数は以下のとおりとなった。

系統	平均±標準偏差
[GN13×GCS13]	628±68.0
[日 137 号×MCS4]	721±79.4

- 15 遺伝子組換えカイコの産卵数は非遺伝子組換えカイコの産卵数より少なかった（差がないことを帰無仮説とした t 検定で $P < 0.001$ ）。

別添 23 産卵行動の比較

【方法】

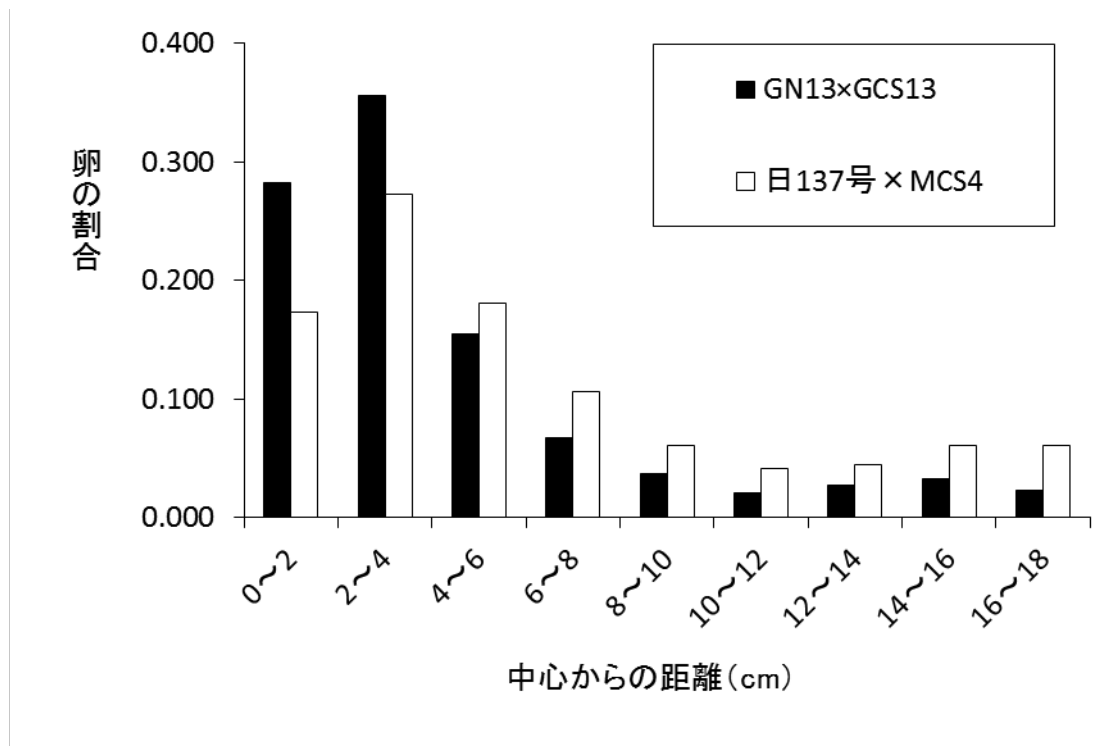
遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 20 頭ずつのメス蛾を交尾・割愛させた後、半径 18 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 24 時間放置して産卵させ、卵 1 つずつの中心からの距離を記録した。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ	[GN13×GCS13] ⁴⁻⁶
非遺伝子組換えカイコ	[日 137 号×MCS4]

10

【結果】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 20 頭ずつについて中心から 2 cm ほどの卵の数を合計して、それぞれの卵の総数に対する割合をヒストグラムに表すと下図のようになった。遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコに比べて中心に近い位置に産卵していた（差がないことを帰無仮説とした Mann-Whitney の U 検定で $P < 0.001$ ）。



別添 24 植物の発芽や生育に与える影響の比較

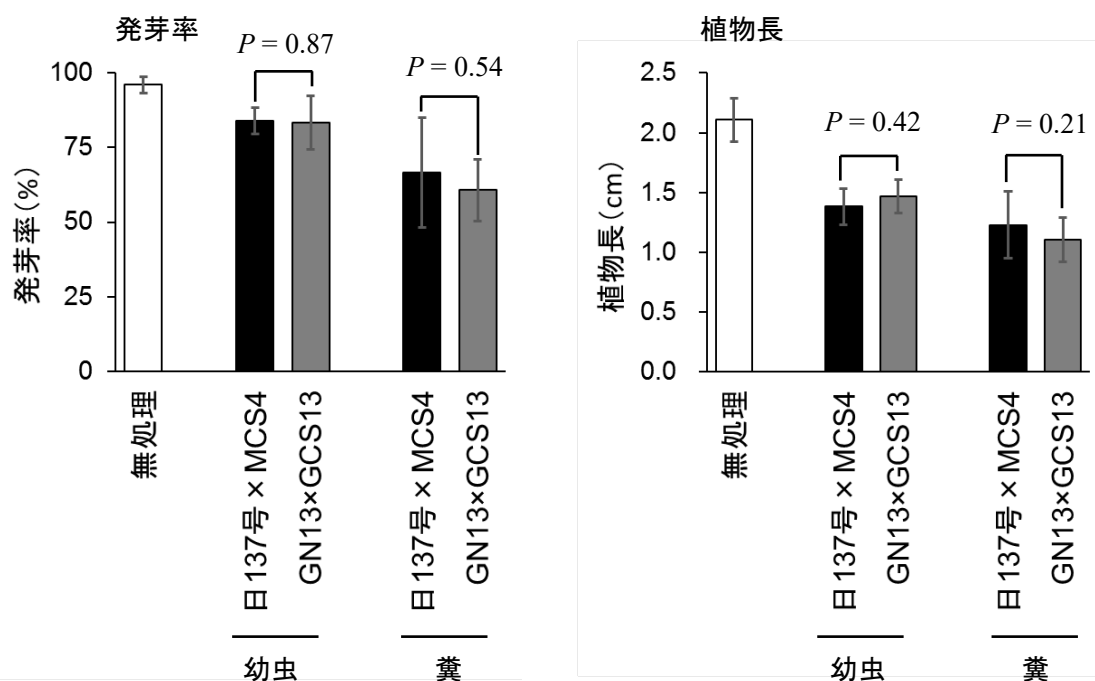
【方法】

冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、これを 1%混入した無肥 5 粒状培土を連結トレイ (7.5 cm 角) に 100 g ずつ入れ、1 穴にブロッコリー (緑嶺) 種子 30 粒を播種した (各試験区について 5 反復)。これを 20°C・自然光の条件に置き、播種後 7 日で発芽数を調査し、2 週間で地上部を回収して植物長を調査した。試験期間中に施肥は行っていない。供試系統は以下のとおりとした。

- | | | |
|----|------------|-----------------------------|
| 10 | 遺伝子組換えカイコ | [GN13×GCS13] ⁴⁻⁶ |
| | 非遺伝子組換えカイコ | [日 137 号×MCS4] |

【結果】

図に示すとおり、発芽率と地上部の植物長ともに、遺伝子組換えカイコと、対照となる非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった (t 検定、データの正規性、等分散性についてはいずれも棄却されなかった。発芽率については逆正弦変換後の t 検定も行い、P 値は幼虫で 0.99、糞で 0.50 であった。)



20

別添 25 土壤微生物に与える影響の比較

【方法】

冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、前年に麦を栽培した畑の土（土壤消毒していない）に 1%の割合で混和した。この土壤 100g に滅菌水 50 ml を加えて湿潤させ、25°C で 2 週間培養した。その後、5 g を秤量して 45 ml の滅菌水と混合した後、 $10^2 \sim 10^6$ 倍希釈液を作成した。糸状菌については、 10^2 、 10^3 、 10^4 倍希釈液 200 μ l を直径 9 cm シャーレのローズベンガル培地上に塗布し、25°C で 3 日間培養した後、コロニー数を調査した。細菌・放線菌については、 10^4 、 10^5 、 10^6 倍希釈液 200 μ l を直径 9 cm シャーレの PTYG 培地上に塗布し、25°C で 3 日間培養した後、コロニー数を調査した。

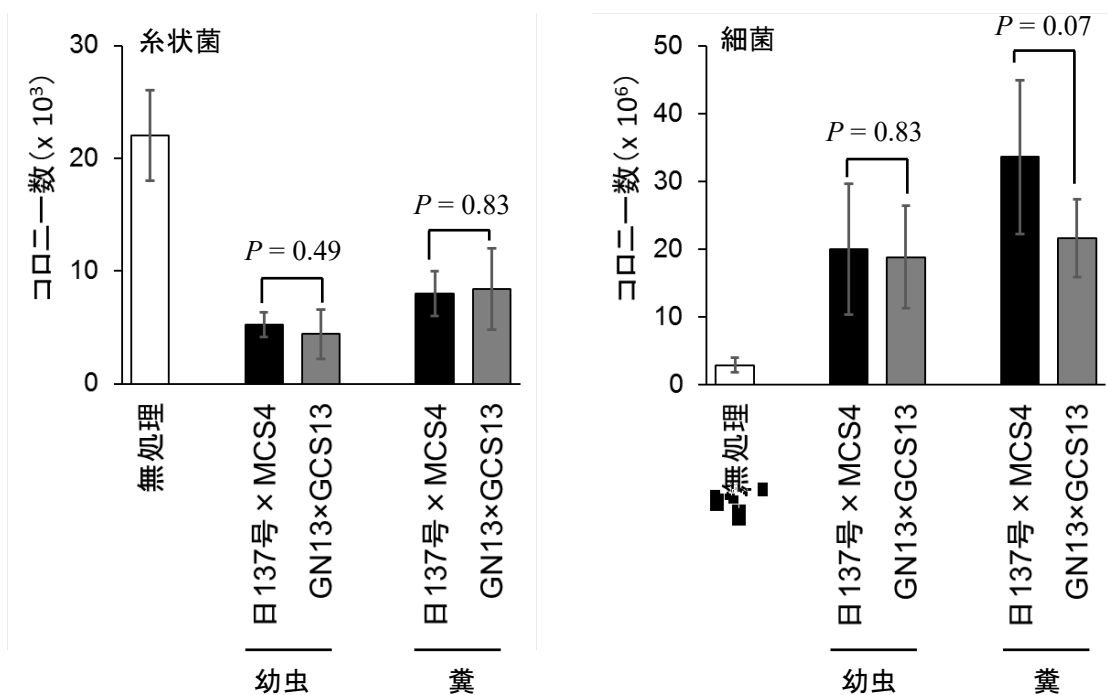
供試系統は以下のとおりとした。

	遺伝子組換えカイコ	[GN13×GCS13] ⁴⁻⁶
15	非遺伝子組換えカイコ	[日 137 号×MCS4]

【結果】

図に示すとおり、糸状菌と細菌ともに、遺伝子組換えカイコと対照の非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった（t 検定で $P > 0.05$ ）。

20



別添 26 隔離飼育区画における飼育試験

(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)

別添 27 遺伝子組換えカイコの生理学的特性に関する追加試験
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)