

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(改変 *cry1Ab*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt10) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	3
第1 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) 分類学上の位置付及び自然環境における分布状況	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	6
(1) 供与核酸に関する情報	6
(2) ベクターに関する情報	9
(3) 遺伝子組換え生物などの調製方法	9
(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	10
(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	11
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	11
3. 遺伝子組換え生物等の使用に関する情報	13
(1) 使用等の内容	13
(2) 使用等の方法	13
(3) 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	14
(4) 国外における使用等に関する情報	14
第2 項目ごとの生物多様性影響評価	15
1. 競合における優位性	15
2. 有害物質の産生性	16
3. 交雑性	17
4. その他の性質	18
第3 生物多様性影響の総合的評価	19
緊急措置計画書	20

第一種使用規程承認申請書

平成 18 年 1 月 10 日

農林水産大臣 中川 昭一 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名 シンジェンタ ジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 マイケル・ケスター 印
住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
オフィスタワーX

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (<i>cry1Ab</i> , <i>pat</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Bt10)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	所在地：静岡県島田市神座 138 番地 名称：シンジェンタ ジャパン株式会社 開発本部 中央研究所 神座試験センター 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 20 年 3 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。 (3) 土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場外への流出を防止するための設備を、排水系統に設置している。

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるために防風網を設置している。

2 隔離ほ場での作業要領

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

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

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

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

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

(6) (1)から(5)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

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

生物多様性影響評価書の概要

第1 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) 分類学上の位置付及び自然環境における分布状況

イ、和名、英名及び学名

和名：イネ科トウモロコシ属トウモロコシ

英名：maize、corn

学名：*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis

ロ、宿主の品種又は系統名

デント種 (var. *indentata*) に属する黄色デント種である。

ハ、国内及び国外の自然環境における自生地域

現在、トウモロコシの原産地についての決定的な説はないが、一般的には紀元前 5000 年頃のメキシコあるいはグアテマラが原産地と考えられている。その耕種作物的起源について、育種過程でテオシント (*Zea mays* subsp. *mexicana*) から派生したとする説が有力とされている。メキシコのテワカン溪谷を中心に中央アメリカ、ペルー、ボリビアには近縁野生種テオシントが自生しているが、我が国の自然環境下で近縁野生種が自生しているという報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ、国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシに関連する遺物が大量に出土した遺跡としてメキシコのテワカン溪谷がある。最初にトウモロコシが出現したのは紀元前 6800～5000 年頃であり、原始的なトウモロコシの穂が出土している。紀元前 5000 年～3000 年頃には本格的な農耕が始まったと考えられており、穂は原始的であるが大きくなっている。紀元前 1500 年～200 年頃には穂は非常に大きくなって、現在のような多条列の立派な栽培型になった。南北アメリカ大陸各地へはメキシコ、メソアメリカから伝播した。その伝播の過程でデント種 (var. *indentata*)、ポップ種 (var. *evata*)、スイート種 (var. *saccharata*)、フリント種 (var. *indurata*) 等の多数の変異種が生じたと考えられている。コロンブスの大陸発見以降、スペインを通してヨーロッパに導入され、世界に広まった。現在、トウモロコシを主食としている地域は南米とアジアの一部に見られるだけで、その他の地域では

主食とされていない。トウモロコシの90%以上は飼料として使用されている。

日本へは天正7年(1579年)にポルトガル人によって長崎か、あるいは四国にプリント種が導入されたのが最初であるとされている。さらに、明治時代にデント種とプリント種が米国から北海道に入り日本中に伝播して以来、長年にわたり栽培、使用されている。我が国ではトウモロコシの子実の大部分は飼料として、残りは食品として食用油、澱粉等に使用されている。

ロ、主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

現在、北緯58度から南緯40度に至る範囲で栽培され、主な生産国は米国、中国、メキシコ、ブラジル、アルゼンチン、フランス、ルーマニア、ロシア等で、栽培方法は栽培規模、地域によって異なっている。米国を初めとする多くの国では生産コストを下げするため、大型機械を使用して大規模栽培を行っている。2003年の全世界での生産量は6億99万トンで、その上位5カ国は米国(2億2,777万トン)、中国(1億2,130万トン)、ブラジル(4,450万トン)、メキシコ(1,928万トン)、そしてフランス(1,644万トン)である。現在、米国は世界最大のトウモロコシ生産国であり、インディアナ、オハイオ、イリノイ、アイオワ及びミズーリ州のコーンベルトと呼ばれる地域を中心に栽培されている。

日本においては、東北地方、長野では早くから機械化栽培されており、北海道では戦後すぐに機械化されている。現在、我が国でのトウモロコシの栽培は、青刈りのサイレージ用トウモロコシ(デント種)として9万ha、未成熟トウモロコシ(スイート種)として2万8千haで、トウモロコシの種子の生産はほとんど行われていない。

2004年、日本は1,648万トンのトウモロコシ穀粒を輸入しており、最大の輸入先である米国からの輸入量は1,568万トンであった。飼料用として輸入された穀粒は1,204万トン、そのほとんどは配合・混合飼料の原料として利用されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ、生息又は生息可能な環境の条件

トウモロコシの種子の発芽適温は、32~36℃で、最低発芽温度及び最低生育温度は6~10℃である。トウモロコシは、温暖な気温と適度な降水量のある場所での栽培に適しており、発芽から生育に適した温度はおよそ10℃~30℃である。

トウモロコシは、生育期には十分な降雨を必要とする作物である。米国のコーンベルト地帯では、生育期には月間100mm以上の降雨が望ましいとされている。

トウモロコシは、熱帯サバンナ気候地帯が原産地とされているが、過度の高温と低水分の地帯はトウモロコシの栽培には適さない。すなわち、土壌が水を吸収しやすい状態であることが重要であり、有機質を含み、十分湿っていて、空気が十分に含まれて、トウモロコシの根が良好に土壌に接触できるように十分に細かくなっている状態が望ましい。

ロ、繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、自然の脱粒性はないことから、自然条件下では広範囲に種子が散布されることはない。

種子の休眠性は極めて浅く、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が 10℃に達するまで発芽しないため、多くの場合、発芽する前に腐敗し枯死する。

② 栄養繁殖の様式

トウモロコシは種子繁殖性で、夏作一年生植物である。トウモロコシには、自然条件において植物体を再生しうる組織等があるという報告はこれまで行われていない。

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

トウモロコシは他殖率 95%程度であるが、自家和合性のため、自家受粉も行う。トウモロコシは近縁野生種のテオシントと交雑することが報告されているが、我が国にはトウモロコシと交雑可能な野生種が自生しているという報告はない。また、トウモロコシはアポミクシスを生ずる特性を有さない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシは雌雄異花序で、稈の頂部に雄穂を 1 本、中央側部に雌穂を 1~3 本着生する。雄穂には 1,200~2,000 個の小穂があり、1,600 万~3,000 万個の花粉粒を形成する。

トウモロコシの花粉の稔性は、花粉の充実度より観察される。トウモロコシは雄雌同株植物で、典型的な風媒花であり、ほとんどは他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性がないため自家受粉も可能である。その受精能力によって、種子の生産量に影響がある。

花粉の形状は楕円~円形で、直径は約 100 μm である。

雄穂は出穂後 1 日~5 日すると開花し、開花開始後 2 日目~4 日目頃が開花盛期となる。同じ時

期に播種した同一品種の場合には開花期が長くても10日前後である。雌穂は雄穂の出穂後に絹糸を抽出する。花粉は開葯後、風によって飛散し、大部分はほ場内に落下する。花粉の飛散距離は300～500mである。

花粉の寿命は、一般に乾燥条件下では長いとされるが、地面への落下や降雨で不活性化され、盛夏のほ場条件下では24時間以内である。

ハ、有害物質の産生性

これまでのところ、トウモロコシによる、他の野生動植物等の生育または生息に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

ニ、その他の情報

これまでのところ、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外に生育したという報告はない。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ、構成及び構成要素の由来

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（改変 *cry1Ab*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis）(Bt10)（以下、「本組換え体」という。）の作出に用いた供与核酸の構成とその由来は表1に示した。

表1：本組換え体作出のための供与核酸の構成要素のサイズ、由来、機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
チョウ目害虫抵抗性遺伝子カセット		
35S promoter	-	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) CM1841 株由来で、 <i>Dde</i> I - <i>Dde</i> I 断片として得られた。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子（改変 <i>cry1Ab</i> ）を発現させる。
IVS6-ADH1	-	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1S (Adh1-S) 遺伝子由来のイントロンである。Adh1-S イントロンは植物における目的遺伝子（改変 <i>cry1Ab</i> ）の発現量を高めるために用いられた。
改変 <i>cry1Ab</i>	-	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株の Cry1Ab 蛋白質をコードする <i>cry1Ab</i> 遺伝子の、Cry1Ab 蛋白質の有する殺虫活性に関与しない C 末端コード領域を一部欠失させ、また、植物における発現量を高めるよ

		うに塩基配列を改変した。但し、この改変によるコア蛋白質のアミノ酸配列に変更はない。
NOS term	-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域で、転写ターミネーター及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。この配列により目的遺伝子 (改変 <i>cry1Ab</i>) の転写が終結される。
除草剤グルホシネート耐性遺伝子カセット		
35S promoter	-	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) Cabb-s 株由来で、 <i>AluI-DdeI</i> 断片として得た。このプロモーターは全組織中で目的遺伝子 (<i>pat</i>) を発現させる。
IVS2-ADH1	-	トウモロコシのアルコールデヒドロゲナーゼ 1S (Adh1-S) 遺伝子由来のイントロンである。Adh1-S イントロンは植物中において目的遺伝子 (<i>pat</i>) の発現量を高めるために用いられた。
<i>pat</i>	-	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> の PAT 蛋白質をコードする遺伝子である。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネート耐性を植物に付与することから、遺伝子導入の際、組換え体を選抜するためのマーカーとして使用された。 <i>pat</i> 遺伝子は植物における発現量を高めるために一部の塩基配列が改変された。但し、この改変により発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列は変更されていない。
NOS term	-	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域で転写ターミネーター、及び mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。この配列により、目的遺伝子 (<i>pat</i>) の転写が終結される。

ロ、構成要素の機能

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

本組換え体作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表1に示した。

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

改変Cry1Ab蛋白質；

土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* から単離された殺虫活性蛋白質 (=Bt 蛋白質) は、それぞれ限定的な昆虫種に対して殺虫活性を示す。感受性昆虫種が Bt 蛋白質を摂取して消化すると、特異な蛋白質消化によって活性ポリペプチド (=コア蛋白質) となり、昆虫の中腸表面の特異的な受容体に結合し、イオンチャネルが形成されて消化器官が損傷を受け、そして、死に至ることが知られている。この作用機作は *Bacillus thuringiensis kurstaki* 由来の Cry1Ab 蛋白質でも同様である。Cry1Ab 蛋白質の殺虫活性については、カナダ政府のデータベースに詳細な調査結果が掲載されており、トウモロコシ栽培における主要害虫であるチョウ目昆虫のヨー

ロピアンコーンボローラー (*Ostrinia nubilalis*)、Corn earworm (*Helicoverpa zea*)、Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) 等に殺虫活性を示す。一方、Cry1Ab 蛋白質は他のチョウ目以外の昆虫には殺虫活性がないか、極めて低い。Cry1Ab 蛋白質は哺乳類の消化器系に存在するプロテアーゼによる消化に非常に敏感であることが知られている。このため、人間を含めた哺乳類がこの蛋白質を摂取してもコア蛋白質を含めて消化が行われ、また、コア蛋白質の受容体を腸管に持たないため、影響を受ける可能性は極めて低い。

本組換え体作出に用いられた改変 *cry1Ab* 遺伝子には、アミノ酸配列の一部欠失及び塩基配列の改変がなされているが、Cry1Ab 蛋白質の殺虫活性を示すコア蛋白質のアミノ酸配列は保持されている。

なお、*Bacillus thuringiensis* が産出する蛋白質を有効成分とする微生物農薬は、1961 年から米国やヨーロッパで、トウモロコシ、ワタ、リンゴ、キャベツ、トマト、アボガド等の農作物、貯蔵穀物及び森林の害虫防除の為に使用されている。日本においても、1980 年代前半から野菜や果樹のチョウ目害虫防除に *Bacillus thuringiensis kurstaki* HD-1 株が産出する Cry1Ab 蛋白質を有効成分とする微生物農薬が使用されている。

改変 Cry1Ab 蛋白質について、データベースを用いてアミノ酸配列の相同性を検索した結果、既知のアレルゲンや毒素と、構造的に関連類似性のある配列を有さないことが確認されている。

PAT 蛋白質；

pat 遺伝子は植物中における発現を高めるために塩基配列の一部が改変されているが、発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列に変更はない。除草剤グルホシネートは植物のグルタミン酸合成酵素を阻害するため、植物は細胞内のアンモニアの蓄積によって枯死するが、PAT 蛋白質が発現するとグルホシネートをアセチル化し、不活性化するためにグルタミン合成酵素の阻害が起らないので、植物はグルホシネートの影響を受けない。このように、PAT 蛋白質を発現する植物は除草剤グルホシネート耐性を示すことから、組換え体を選抜する為のマーカーとして利用されている。

PAT 蛋白質について、データベースを用いてアミノ酸配列の相同性を検索した結果、既知のアレルゲンや毒素と構造的に関連類似性のある配列を有さないことが確認されている。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変 Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立に機能しており、改変 Cry1Ab 蛋白質は宿主の代謝系に影響を及ぼさないと考えられた。また、PAT 蛋白質は極めて基質特異性が高いので、グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移する可能性は低く、PAT 蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

(2) ベクターに関する情報

イ、名称及び由来

本組換え体の作出に用いた基本ベクターは、大腸菌 *Escherichia coli* 由来のプラスミドである。

ロ、特性

ベクター-pZ01502 の塩基数は 7,240bp である。

pZ01502は、大腸菌中で β -ラクタマーゼをコードしてアンピシリン耐性を発現するために使用されるアンピシリン耐性遺伝子 (*amp^r*) を有する。 β -ラクタマーゼは抗生物質アンピシリンの β -ラクタム環を開裂することにより抗生物質を不活性化する加水分解酵素である。pZ01502には伝達性に関与するColE1 *ori*が含まれるものの、自律増殖可能な宿主域は大腸菌及び数種のグラム陰性菌に限られている。

(3) 遺伝子組換え生物などの調製方法

イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換え体の作出には、害虫抵抗性遺伝子発現カセット、および、除草剤耐性遺伝子発現カセットを連結したプラスミド pZ01502 を構築し、エレクトロポレーション法により核酸を宿主に移入した。

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

エレクトロポレーション法により、供与核酸をプロトプラストに移入した。

ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

pat 遺伝子が除草剤グルホシネート耐性の形質を付与することを利用して、グルホシネートを含む培地上でカルスを選抜し植物体に再分化させた。

②アグロバクテリウム菌体の残存の有無

アグロバクテリウム法ではないため該当しない。

③育成の経過及び系統樹

再分化させた幼植物体を育成した初代親株に、デント種の優良品種を交配し、本組換え体を作

出した。その後、ほ場育種過程で除草剤グルホシネートを散布し、グルホシネート耐性品種を選抜した。

(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、細胞内に移入した核酸の存在する場所（染色体上、細胞小器官内、原形質内の別）

BC1世代について除草剤グルホシネート散布耐性試験を行った結果、試験に供した706個体のうち、362個体が除草剤耐性を示し、344個体が除草剤に感受性を示した。この結果はメンデルの法則により期待される分離比（1:1）に適合することから、細胞内に移入された核酸は染色体上に存在していると考えられた。

また、本組換え体中への遺伝子の挿入部位は、塩基配列解析等によりトウモロコシの染色体上に27kbに渡って存在することが推定されている。さらに、DNAマーカーを用いた解析により、この挿入部位はトウモロコシ第1染色体のBin1.07であることが推定されている。

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

サザンブロット解析の結果、染色体上の挿入遺伝子のコピー数は、改変 *cry1Ab* 遺伝子が2以上、*pat* 遺伝子が2以上、*ColE1 ori* が2以上、*amp^r* 遺伝子が2以上、35Sプロモーター領域が3以上存在することを確認した。

米国ほ場における栽培試験の結果、本組換え体のヨーロッパンコーンボーラー及び Corn ear worm に対する防除効果は複数年にわたって観察されたことから、改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセットは安定して伝達されていると推測される。また、除草剤グルホシネート耐性についても、米国でのほ場育種過程でグルホシネート散布を実施し、耐性品種を選抜してきたことから、*pat* 遺伝子発現カセットは安定して伝達されていると推測される。

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

サザンブロット解析の結果、染色体上の挿入遺伝子のコピー数は、改変 *cry1Ab* 遺伝子が2以上、*pat* 遺伝子が2以上、*ColE1* 遺伝子が2以上、*amp^r* 遺伝子が2以上、35Sプロモーター領域が3以上存在することが確認され、これらは全て、第1染色体上の27kbの領域に隣接して存在していると推定される。

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

本組換え体におけるチョウ目害虫抵抗性について、ヨーロッパンコーンボーラー及び Corn ear worm に対する防除効果試験を2002年～2004年の米国ほ場での栽培時に行い、葉、穂軸、穀粒、

茎の食害率を比較した。その結果、非組換え体では調査した全ての部位で損傷が観察されたのに対して、本組換え体の損傷は軽微もしくは全く観察されなかった。

また、2000年～2003年の米国ほ場での収量と倒伏性について調査した結果、2000年、2001年、2003年の本組換え体の収量は非組換え体に比べて有意に高く、本組換え体の倒伏率は非組換え体に比べて有意に低かった。この収量、倒伏率の傾向は、チョウ目害虫の発生量と相関性を示した。

以上のように、本組換え体のチョウ目害虫抵抗性は、複数年、複数箇所における栽培で観察されたことから、個体間及び世代間で安定した発現を示すと考えられる。

除草剤グルホシネート耐性についても、米国でのほ場育種過程でグルホシネート散布を実施し、耐性品種を選抜してきたことから、その発現は安定していると推測される。

ホ、ウイルス感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された供与核酸は伝達を可能とする配列を含まない。よって、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(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

本組換え体の挿入遺伝子の近傍配列及び挿入遺伝子領域のプライマーを用いた系統特異的検出法が開発されており、厚生労働省のウェブサイト上に公開されている

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/kensa/050517.html>)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ、移入された核酸又はその複製物の発現により宿主に新たに付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

本組換え体には改変 *cry1Ab* 遺伝子と *pat* 遺伝子が導入されたことにより、改変 Cry1Ab 蛋白質と PAT 蛋白質が発現しており、ヨーロッパアンコーンボラー (*Ostrinia nubilalis*) 等へのチョウ目害虫抵抗性と除草剤グルホシネート耐性を示す。

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

① 形態及び生育の特性

2005年米国の温室で本組換え体及び非組換え体を栽培し、形態及び生育の特性を比較した。そ

の結果、発芽までの日数、発芽率、開花期、雄穂枝数、花粉重量、葯の形状、絹糸形状、成熟期、花粉稔性、雌穂長、雌穂径、粒列数、1列粒、百粒重、収穫期には差異が認められなかった。唯一有意差が見られた項目は雌穂数であるが、これは本組換え体の大部分は第一雌穂及びそれより小さい第二雌穂を産生したのに対し、非組換え体は大部分が第二雌穂を産生しなかったためと考えられる。仮に、雌穂数に有意差が存在したとしても、自然状態ではトウモロコシの雌穂は苞皮に覆われており脱粒性は認められないことから、自然環境に影響を与えることはないと考えられた。

② 生育初期における低温耐性

米国の温室内で2~3葉期にまで育てた本組換え体及び非組換え体幼苗を、照明下14℃で12時間、暗黒下-5℃で12時間の条件下で栽培して低温耐性を比較した。その結果、本組換え体と非組換え体のどちらも2日後には葉の褐変や萎縮が現れ始め、さらに4日以内に枯死しており、両者間に差異は認められなかった。

③ 成体の越冬性

トウモロコシは夏型一年生作物であり、成熟後自然に枯死する。成熟後にさらに栄養繁殖したり、再度結実して種子を生産したりするという報告はなされていない。

④ 花粉の稔性及びサイズ

米国の温室内で栽培した本組換え体及び非組換え体の花粉のサイズ、形状及び稔性（充実度）を比較した結果、差異は認められなかった。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

2005年米国の温室で本組換え体及び非組換え体を栽培し、形態及び生育の特性を比較した結果、雌穂長、雌穂径、粒列数、1列粒、百粒重に有意差は認められなかった。従って、種子の生産量に関して、本組換え体と対照となるとなる非組換え体との間に差はないと考えられる。

脱粒性については、自然状態ではトウモロコシの雌穂は苞皮に覆われていることから、脱粒性は認められない。

種子の発芽率を調査した結果、組換え体と非組換え体共に発芽率は高く、また両者に差異は認められなかったことから、種子の休眠性はないと考えられる。

⑥ 交雑率

我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生しているという報告は行われていない

ことから、試験は実施していない。

⑦ 有害物質の産生性

2005年、米国の温室内で本組換え体及び対照の非組換え体を栽培して、後作試験、鋤き込み試験を行いレタスの発芽率と初期生育を比較した。その結果、後作試験の発芽率に有意差が見られたものの、鋤き込み試験の発芽率には有意差が見られなかった。また、後作試験及び鋤き込み試験において発芽したレタスの乾燥重量には有意差が見られず、初期生育に影響は見られなかった。

さらに、本組換え体と非組換え体の土壌微生物に対する影響を比較した結果、嫌気性細菌、シュードモナス、窒素固定細菌等の土壌微生物では差は認められなかった。放線菌類で有意差が見られたものの、これは、滅菌した温室内での試験であったため放線菌数が平衡に達していなかったためと考えられた。

なお、今回の隔離ほ場試験でこれら後作、鋤き込み、土壌微生物相の各試験を実施し、我が国の自然環境における影響を調べる予定である。

3. 遺伝子組換え生物等の使用に関する情報

(1) 使用等の内容

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

(2) 使用等の方法

所在地：静岡県島田市神座138番地

名称： シンジェンタ ジャパン株式会社

開発本部 中央研究所 神座試験センター 隔離ほ場

使用期間：承認日～平成20年3月31日まで

隔離ほ場の施設：

- 1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むように、フェンスを設置している。
- 2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を、見やすい所に掲げている。
- 3) 土、本遺伝子組換えトウモロコシの種子等が付着した隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等を洗浄するための洗い場を設置しているとともに、当該トウモロコシの隔離ほ場外への流出を防止するための設備を、排水系統に設置している。
- 4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるために防風網を設置している。

隔離ほ場の作業要領：

- 1) 本遺伝子組換えトウモロコシ及び比較対照のトウモロコシ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- 2) 本遺伝子組換えトウモロコシを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該トウモロコシが漏出しない構造の容器に入れる。
- 3) 2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対照のトウモロコシを隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- 4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えトウモロコシが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 6) 1)から5)に掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- 7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画に基づき、速やかに対処する。

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

別添の「緊急措置計画書」を参照。

(4) 国外における使用等に関する情報

本組換え体は、現在のところ、世界各国において認可は得られていない。

海外における本遺伝子組換えトウモロコシの栽培面積[社外秘につき非公開]

なお、今後本組換え体は我が国も含めていずれの国においても意図的に生育されることはない。

第2 項目ごとの生物多様性影響評価

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の特定

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシについては長期の使用経験があり、我が国の自然環境下で自生することは知られていない。

2005年の米国の温室試験の結果では、発芽までの日数、発芽率、開花期、雄穂枝数、花粉重量、葯の形状、絹糸形状、成熟期、花粉稔性、雌穂長、雌穂径、粒列数、1列粒、百粒重、収穫期には本組換え体と非組換え体との間で差異が認められず、唯一有意差が見られた項目は雌穂数であった。

休眠性に関しては、種子の発芽率を調査した結果、組換え体と非組換え体共に発芽率は高く、また両者に差異は認められなかったことから、種子の休眠性はないと考えられる。生育初期の低温耐性は非組換え体と同様に低いことが確認されており、ほ場にこぼれ落ちた種子が生育に適した条件で発芽しても越冬して自生化するとは考え難い。従って、競合における優位性が高まることはないと判断された。

本組換え体には、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性の性質が付与されている。チョウ目昆虫による食害は、トウモロコシが我が国の自然条件下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、チョウ目害虫抵抗性を持つことにより自然条件下で自生させ、競合における優位性を高めるとは考えられない。

除草剤グルホシネート耐性については、通常、我が国の自然環境下においてグルホシネートが散布されることは想定しにくいため、この性質により競合における優位性が高まるとは考えられない。

以上のことから、本組換え体を第一種使用規程に従い隔離ほ場で第一種使用等を行う限りにおいては、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されないと考えられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換え体を第一種使用規程に従って第一種使用等を行う限りにおいて、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

2. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシについては長期の使用経験があり、野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

本組換え体は、チョウ目害虫抵抗性と除草剤グルホシネート耐性を発現する、改変 Cry1Ab 蛋白質と PAT 蛋白質を産生する性質が付与されている。どちらのアミノ酸配列にも、既知の毒素やアレルギーとの相同性はない。

PAT 蛋白質は有害物質ではなく、野生動植物等に影響を及ぼすおそれはない。また、高い基質特異性を有することから、基質である L-グルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移するとは考えられない。したがって、本組換え体中において PAT 蛋白質がトウモロコシの代謝経路に影響して野生動植物等に対する有害物質を産生する可能性はないと考えられる。

改変 Cry1Ab 蛋白質は、ヨーロッパアンコンボラー、Corn earworm、Fall armyworm 等のチョウ目昆虫に対して、特異的に高い殺虫活性を示す。よって本組換え体を摂食することで影響を受ける野生動植物等としては、トウモロコシの植物体を摂食するアワノメイガ等のチョウ目昆虫が想定されるが、これらはトウモロコシ栽培期間中において、害虫として防除される対象であることから、ここでは影響を受ける野生動物として特定されない。一方、Cry1Ab 蛋白質やこの蛋白質を有する組換え体植物に関しては、これまでに非標的生物（コリンウズラ、ミツバチ、テントウムシ、ミミズ等）への投与試験が実施されており、米国環境保護庁（EPA）によりこれらの結果が公開されている。結論として EPA は、Cry 蛋白質（Cry1Ab 蛋白質を含む）を発現した組換え体植物（トウモロコシ、ジャガイモ、ワタ）が、非標的生物に有害となる環境影響を与えないという見解を示している。なお、改変 Cry1Ab 蛋白質の半減期は、シンジェンタ社による 3 種類の農耕用土壌（2 種類の埴土及び 1 種類の砂質埴土）を用いた調査では、8～12 日であった。また、Zwahlen

らにより、Cry1Ab 蛋白質の 40 日後の土壌中での残存率は、ほ場中では約 1/3 程度、実験室では約 1/10 以下であるとの報告もなされている。

また本組換え体の改変 Cry1Ab 蛋白質の発現量を、各組織及び生育期別に ELISA 法により測定した結果、発現量が高いのは葉であった。本組換え体の葉を直接食餌するチョウ目昆虫は、トウモロコシにとって害虫であるため、ここでは対象としない。また、花粉における改変 Cry1Ab 蛋白質の発現は、定量限界以下であった。花粉における改変 Cry1Ab 蛋白質の発現量は極めて低いことから、チョウ目昆虫が飛散した花粉を食餌植物と共に摂食することで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられる。

これらのことから、本組換え体の影響を受ける野生動物等は特定されなかった。

以上のことから、有害物質の産生性について、本組換え体を我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないが、非組換え体との間に大きな差異はないと考えられ、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場内で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと考えられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換え体を限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場内で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは近縁野生種のアオシロと自然交雑することが報告されているが、我が国では交雑可能な近縁野生種が自生していることは報告されていないことから、影響を受ける可能性の

ある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

我が国には交雑可能な近縁野生種は自生していることは報告されていないので、交雑性において影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されず、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。以上のことから、交雑性について、本組換え体を我が国の自然条件下で生育した場合の特性は明らかにされていないが、非組換え体との間に大きな差異はないと考えられ、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場内で使用する範囲内では、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性はないと考えられた。

4. その他の性質

上記の他に生物多様性影響評価を行うことが適切であると考えられる本組換え体の性質はないと判断された。

第3 生物多様性影響の総合的評価

本組換え体には、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性の性質が付与されている。チョウ目昆虫による食害は、トウモロコシが我が国の自然条件下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、チョウ目害虫抵抗性を持つことにより自然条件下で自生させ、競合における優位性を高めるとは考えられない。種子の発芽率が高いことから休眠性は低いと考えられ、本組換え体が自生する可能性は極めて低いと考えられる。除草剤グルホシネート耐性については、通常、我が国の自然環境下においてグルホシネートが散布されることは想定しにくいいため、この性質により競合における優位性が高まるとは考えられない。

以上から、本組換え体を第一種使用規程に従って隔離ほ場で第一種使用等を行う限りにおいて、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性に関して、トウモロコシについては長期の使用経験があり、野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

本組換え体は、チョウ目害虫抵抗性と除草剤グルホシネート耐性を発現する、改変 Cry1Ab 蛋白質と PAT 蛋白質を産生する性質が付与されている。PAT 蛋白質のアミノ酸配列には、既知の毒素やアレルゲンとの相同性はなく、PAT 蛋白質は有害物質ではない。

また、本組換え体が産生する改変 Cry1Ab 蛋白質は、ヨーロッパアンコーラー、Corn earworm、Fall armyworm 等のチョウ目昆虫に対して、特異的に高い殺虫活性を示すが、本組換え体の改変 Cry1Ab 蛋白質の発現量を調査した結果、花粉における改変 Cry1Ab 蛋白質の発現量は極めて低いことから、チョウ目昆虫が飛散した花粉を食餌植物と共に摂食することで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられる。

以上から、本組換え体を第一種使用規程に従い隔離ほ場で使用する限りにおいては、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

交雑性に関しては、我が国にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種が自生していることは報告されていないことから、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

上記の評価結果を踏まえ、本組換え体を第一種使用規程に従って、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場内で使用する範囲内では、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断された。

引用文献

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成 18 年 1 月 10 日

氏名 シンジェンタ ジャパン株式会社
申請者 代表取締役社長 マイケル・ケスター
住所 東京都中央区晴海一丁目 8 番 10 号
オフィスタワーX

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*cryIAb*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt10) (以下、本組換え体という) 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、以下の措置を講ずる。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

栽培実験管理責任者は、本組換え体が生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断した場合に、生物多様性影響管理委員会に報告し、同委員会は、緊急措置対応のための社内体制及び連絡窓口を通じて栽培実験管理責任者とともに緊急措置を講ずる。同委員会は、生物多様性影響を防止するため、遺伝子組換え体等の管理の方法について各方面からの意見を検討するための委員会であり、各分野の専門家が選ばれている。

2 第一種使用等の状況の把握方法

第一種使用等の状況の把握方法は、シンジェンタ ジャパン株式会社開発本部中央研究所神座試験センター隔離ほ場の実験従事者から得た情報により把握する。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

栽培実験管理責任者は、本組換え体が生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断した場合には、生物多様性影響管理委員会に報告し、同委員会は、農林水産省消費・安全局農産安全管理課、環境省自然環境局野生生物課、農業者団体、島田市役所及び静岡県に対して、本組換え体が生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断されたこと、さらに緊急措置を講ずる必要のあることを連絡する。また、シンジェンタ ジャパン社のホームページにおいても、かかる予見される影響について告知し、一般からの問い合わせに対応する専用窓口を設置する。

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

栽培実験作業管理主任者は、本組換え体が生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断した場合には、直ちに栽培試験を中止し、前述の管理委員会の承認のもとに本組換え体を鋤き込み、もしくは抜き取り、焼却等の不活化処分をする。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断した場合に、遅滞なく農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に通知するとともに、あわせて緊急措置対応のための社内組織体制及び連絡窓口等について報告する。

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(改変 *cry1Ab*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (Bt10)

生物多様性影響評価書 添付資料

- | | |
|--------|---|
| 別紙 1 | 隔離ほ場管理者名簿 (平成 18 年度) |
| 別紙 2-1 | 生物多様性影響管理委員会委員名簿 (平成 18 年度) |
| 別紙 2-2 | 生物多様性影響を管理する委員会の設置要領 |
| 別紙 3-1 | 生物多様性影響評価項目 |
| 別紙 3-2 | 隔離ほ場における生物多様性影響評価計画 |
| 別紙 3-3 | 生物多様性影響 評価項目とその定義 |
| 別紙 4-1 | 隔離ほ場周辺図 |
| 別紙 4-2 | 隔離ほ場配置図 |
| 別紙 4-3 | 隔離ほ場試験区配置図 |
| 別紙 5 | チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(改変 <i>cry1Ab</i> , <i>pat</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Bt10) の安全
性評価試験 (生物検定試験) の要約 |
| 別紙 6 | チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(改変 <i>cry1Ab</i> , <i>pat</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (Bt10) の安全
性評価試験 (分子生物学的試験) の要約 |

社外秘情報につき非開示

シンジェンタ ジャパン株式会社