

アрилオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ（改変 *aad-1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.)Iltis.）(DAS40278, OECD UI : DAS-40278-9) 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	2
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理学的及び生態学的特性	3
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	4
(1) 供与核酸に関する情報	4
(2) ベクターに関する情報	7
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	7
(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	9
(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等に関する情報	15
(1) 使用等の内容	15
(2) 使用等の方法	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	15
(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	15
(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	15
(6) 国外における使用等に関する情報	15
第二 項目ごと生物多様性影響の評価	16
1 競合における優位性	16
2 有害物質の産生性	16
3 交雑性	18
4 その他	18
第三 生物多様性影響の総合的評価	19
参 考 文 献	20
緊急措置計画書	22

第一種使用規程承認申請書

平成22年7月16日

5

農林水産大臣 山田 正彦 殿

環境大臣 小沢 鋭仁 殿

10

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
申請者 代表取締役 フィリップ・ファイル 印
住所 東京都品川区東品川2丁目2番24号

15

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。

20

遺伝子組換え生物等の種類の名称	アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ (改変 <i>aad-1</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (DAS40278, OECD UI : DAS-40278-9)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

5 (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

和名：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.) Ittis

10

② 宿主の品種名

宿主はイネ科 (*Gramineae*) トウモロコシ属 (*Zea*) に属するトウモロコシ (*Z. mays*) のデント種であり、品種名は Hi-II である。

15 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシの祖先はメキシコ原産のイネ科植物テオシント種 (*teosinte*) であると言われている。幾千年にわたって種子の人為的選抜が行われ、テオシントは今日知られているトウモロコシとして作物化された (文献 1)。

テオシント種は、我が国においては自生していない。また、トウモロコシは、すでにテオシント種とは違い、種子を自然に散布させる能力を失っており、我が国の自然環境における自生地域はない。

20

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

25 子実用トウモロコシは、1930 年代以降、特に米国で交配により様々な品種が作り出されてきた。それらは、長い時間をかけてヒトの手により改良され、ヒトが手をかけなければ育たない。

我が国には長年にわたり、食品加工用・飼料用として海外より輸入されている。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

30 トウモロコシは、現在、緯度 30 度から 55 度に至る範囲で栽培されているが、47 度以上の緯度で栽培されることは比較的少ない。

2008 年の全世界における生産量は 8 億 2,271 万トンで、主な栽培国は米国 (3 億 738 万トン)、中国 (1 億 6,604 万トン)、ブラジル (5,902 万トン)、メキシコ (2,432 万トン)、アルゼンチン (2,202 万トン) である (文献 2)。

35

我が国においては全国にわたって栽培可能である。飼料用としてデント種が、食用としてスイート種が栽培されている。

主に子実が輸入されて飼料として利用されるが、食用油、澱粉などの加工用など、食品としての用途も多岐にわたる。

5

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

10 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

我が国の栽培品種の発芽温度は、おおむね最低 7~8℃、最適 25~30℃、最高 40℃の範囲にある。播種から収穫までの全期間の温度は、日平均気温 22~23℃程度が望ましいとされている。生育期別には、初期と後期が比較的低温で、中期が高温であることが望ましい。夜温はある程度低い方がよく、暖地では 25℃以上、寒地では 20℃以上にならない方がよく、いずれの地域でも 15℃前後が望ましい。

15

トウモロコシの乾物 1g を生産するための要水量は他の作物より少ないが、乾物生産が多いため多量の水を必要とし、全生育期間では 350~500 トン/10a の水量を必要とする。

トウモロコシは土壌の酸性に対しても強く、正常に生育する pH の範囲は広い。栽培可能な pH は 5.0~8.0 の範囲にあるが、5.5~6.5 の範囲が望ましい。

20

トウモロコシ品種の早晩性については、播種期から成熟期に至る日数が品種間で差があり、我が国では 90~170 日である(文献 3)。

ハ 捕食性又は寄生性

25

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

トウモロコシは種子で繁殖する。包葉に覆われた穂芯のついた雌花のある花序がある。したがって、個々の粒の種子拡散は自然には行われぬ(文献 1)。

30

種子の休眠性は極めて低く、前年に栽培されこぼれ落ちた種子であっても、土壌温度が 7~8℃以上ないと発芽しないため、多くの場合、発芽する前に腐敗し、枯死する。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

35

トウモロコシは種子繁殖であり、塊茎や地下茎などによる栄養繁殖はしない(文献 1)。また、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、あるいはそこから発芽するというような報告はこれまでのところない。

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

5 トウモロコシは雄穂と雌穂が分かれており、他家受粉が一般的で、雄穂から放出された花粉が同じ株か隣接しているトウモロコシの雌しべに運ばれ、受粉する。近縁野生種との間では、交雑は容易には起こらないことが知られており(文献4)、我が国においては交雑可能な近縁野生種(テオシント等)は存在しない。種子は受精によって作られ、アポミクシスは生じない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

10 トウモロコシ花粉は、直径約 0.1 mm 程度である。風により飛散するが、野外においてトウモロコシほ場の東西南北に縁(0m)及びほ場から 1、2、5、10m の地点にヒマワリ(5ポット)及びイヌホオズキ(2ポット)を設置し、トウモロコシ花粉の植物葉上における堆積密度を調べた研究では、我が国におけるヒマワリ及びイヌホオズキ葉上のトウモロコシ花粉の最大堆積密度は、ほ場縁においては、ヒマワリ葉上で 81.7 個/cm²、イヌホオズキ葉上で 71.1 個/cm²であった。しかし、ほ場縁から 5m の地点では、ヒマワリ葉上で 19.6 個/cm²、イヌホオズキ葉上で 22.2 個/cm²に減少し、さらに 10m の地点では、ヒマワリ葉上では 10 個/cm²以下であった(文献5)。

飛散した花粉の寿命は、一夜または一昼夜であるが、5℃前後の低温下でシリカゲルを入れて封入すると、4~5 日間は受精能力を失わない(文献3)。

20

ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

25 他感作用物質のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

ト その他の情報

30

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

35 アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ(改変 *aad-1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DAS40278, OECD UI : DAS-40278-9) (以下「本組換えトウモロコシ」という。)の作出に用いられた供与核酸の構成とその由来は、表 1(p.6)のとおりである。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能

名 前	機 能
改変 <i>aad-1</i> カセット	
<i>RB7 MAR</i>	タバコ由来の核マトリックス結合領域(文献 9)。改変 AAD-1 蛋白質の発現を安定させる。
<i>ZmUbi1</i>	トウモロコシ由来のエビキチンプロモーターで、エクソン及びイントロン領域を含む(文献 10)。植物体の全体において遺伝子の転写を開始させる。
改変 <i>aad-1</i>	グラム陰性桿菌である <i>Sphingobium herbicidovorans</i> 由来のアリルオキシアルカノエート・デオキシゲナーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、改変 AAD-1 蛋白質を発現させる。アミノ酸配列に関してはクローニングサイト導入のため、2 番目にアラニンが追加されている。
<i>ZmPer5 3'UTR</i>	トウモロコシ由来のターミネーター(文献 11)。遺伝子の転写を終止する。
<i>RB7 MAR</i>	タバコ由来の核マトリックス結合領域(文献 9)。改変 AAD-1 蛋白質の発現を安定させる。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

- 5 改変 AAD-1 蛋白質は、アリルオキシアルカノエート基をもつ化合物のうち光学異性体のないもの及び光学異性体である R 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である。

アリルオキシアルカノエート基をもつ化合物と構造的、生理機能的に似通った植物体中に存在する化合物について、改変 AAD-1 蛋白質の作用を実験室レベルで検討し、代謝経路への影響を考察した。基質として、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸(GA3)、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸を、フェニルプロパノイド中間体であるトランス桂皮酸、クマル酸、シナピン酸を検討した。また、20 種類の L-アミノ酸についても検討した(添付資料 2)。

20 種類の L-アミノ酸については、1 μ M の改変 AAD-1 蛋白質の濃度において反応は認められなかった。一方、1 μ M の改変 AAD-1 蛋白質を植物ホルモン及びフェニルプロパノイド中間体に作用させた結果、アブシジン酸、ジベレリン酸、トランス桂皮酸、クマル酸にわずかながら反応が認められた。さらに、5 μ M 及び 10 μ M の改変 AAD-1 蛋白質を作用させた結果、5 μ M ではアミノシクロプロパン-1-カルボン酸のみに、10 μ M ではインドール-3-酢酸のみにわずかながら反応が認められた。このように、改変 AAD-1 蛋白質の濃度と酵素活性に相関関係が見られなかったことから、フーリエ変換質量分析(FT/MS)による酸化物の測定を行った。その結果、10 μ M の改変 AAD-1 蛋白質を作用させた場合に、インドール-3-酢酸とトランス桂皮酸の酸化物が検出された。しかしながら、その反応速度は非常に遅く、ミカエリス・メンテン式のパラメータである *K_m* と *V_{max}* を求めることができなかった。このように、高濃度の改変 AAD-1 蛋白質を作用させ、高感度のフーリエ変換質量分析を行った場合のみに酸化物が検出され、その反応速度が非常に遅いことから、認められた酸化反応が植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられる。

また、植物体中にはアリルオキシアルカノエート基をもつ化合物の存在は知られていないことから、改変 AAD-1 蛋白質は、植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

pDAS1740 作製に用いたベクターは、大腸菌由来のプラスミド pUC19 である。

ロ 特性

10 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクター pDAS1740 の塩基数は 8,512bp であり、導入に用いた直鎖状 DNA の塩基数は 6,236bp である。ベクター pDAS1740 の塩基配列は添付資料 3 に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

15 *ap^r* 遺伝子の発現によりアンピシリン耐性を付与し、ベクター pDAS1740 の選択に用いられるが、導入に用いた直鎖状 DNA には *ap^r* 遺伝子は含まれないため、本組換えトウモロコシに *ap^r* 遺伝子は導入されていない。

なお、本組換えトウモロコシ中における *ap^r* 遺伝子の存在の有無をサザンブロット法もしくは PCR 法により確認した結果、*ap^r* 遺伝子は存在しないことが明らかになった(添付資料 4)。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

導入に用いた pDAS1740 から制限酵素 *Fsp I* により切り出した直鎖状 DNA は感染を可能とする配列は含まれておらず、感染性は知られていない。

25

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

ベクター pDAS1740 の構成図を図 2(p.8)に、導入に用いた直鎖状 DNA の構成図を図 3(p.8)に示した。また、添付資料 5 に pDAS1740 の作成過程を示す。

30

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への移入はウィスカー法により行った(文献 12)。すなわち、宿主トウモロコシである Hi-II の未成熟胚をカルス化させ、液体培養することにより、胚懸濁液を得た。次に、胚懸濁液に pDAS1740 から制限酵素 *Fsp I* により切り出した直鎖状 DNA と針状のシリコンカーバイトウィスカー繊維を加えて攪拌することにより、シリコンカーバイトウィスカー繊維が細胞に穴を開け、直鎖状 DNA を宿主へ移入した。

35

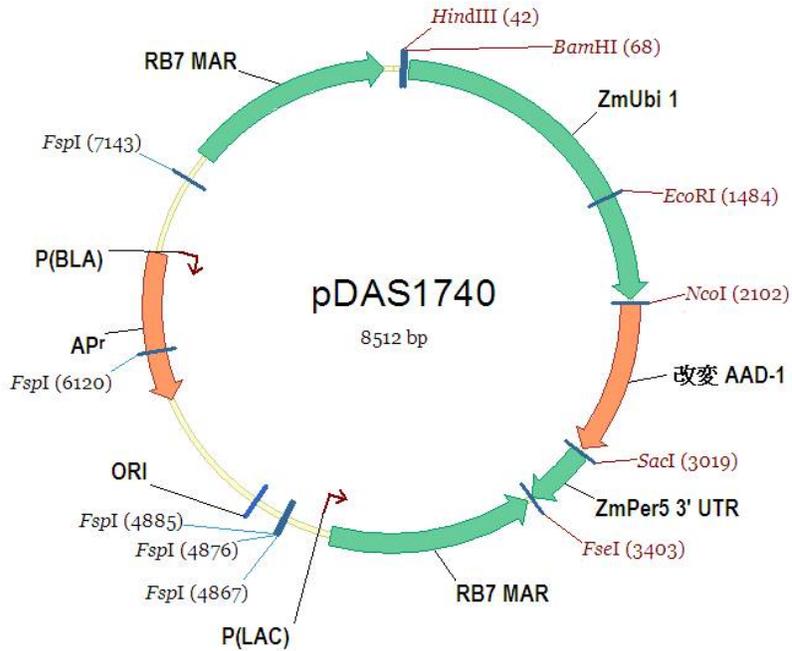
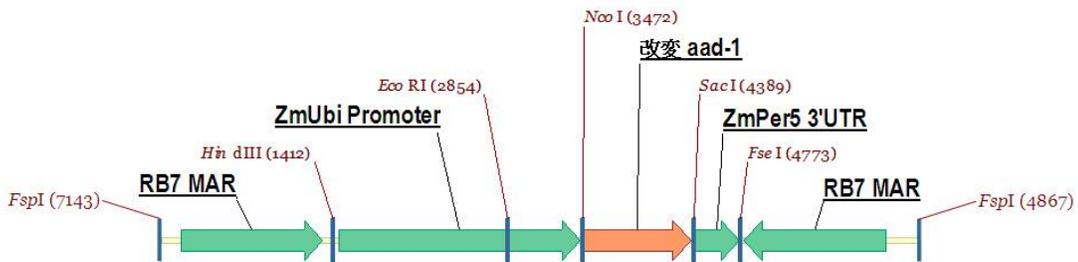


図 2 ベクターpDAS1740 の構成図及び制限酵素切断部位

5 (本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)



10 図 3 pDAS1740 から制限酵素 *Fsp I* により切り出した直鎖状 DNA の構成図

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

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択の方法

15 アリルオキシアルカノエート系除草剤であるハロキシホップを含む培地で培養することにより選抜した。

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

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

再生させた植物体(T0 世代)に、アリルオキシアルカノエート系除草剤であるキザロホップを散布することで改変 AAD-1 蛋白質が産生されていることを確認した。さらに、米
10 国及びカナダの野外ほ場における導入遺伝子解析、蛋白質発現の確認、除草剤耐性及び農業形質等から総合的に判断し、本組換えトウモロコシを選抜した。申請の範囲は T1 世代以降の後代系統である。

詳細を図 4(p.9)に示す。また、各試験に用いられた世代を表 2(p.9)に示す。

15 本組換えトウモロコシの我が国における認可、申請の状況は次のとおりである。

2009 年 7 月 農林水産省及び環境省より「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」に基づく第一種使用規程(隔離ほ場試験)の承認を得た。

20 2010 年 6 月 厚生労働省に「遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行った。

2010 年 6 月 農林水産省に「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性審査基準」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行った。

25

社外秘情報につき非開示

図 4 本組換えトウモロコシの育成図

30

表 2 各試験に用いられた世代

社外秘情報につき非開示

35 (4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

移入した核酸は、いったん植物染色体に組み込まれると、メンデル遺伝の法則に従う。

本組換えトウモロコシに導入された形質が、T1 及び T2 世代の集団でどのような分離を示すかを分析した。除草剤キザロホップ耐性の有無を調べた結果、核内遺伝子におけるメンデルの法則から予想される分離比と試験結果がほぼ一致したことにより、移入した核酸が染色体上に存在していることを確認した(表 3、p.10)。

5

表 3 本組換えトウモロコシの T1 及び T2 世代の形質分離

社外秘情報につき非開示

10

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

移入された核酸のコピー数を確認するために複数世代についてサザンロット分析を行った結果、改変 *aad-1* カセットが 1 コピー移入されていること及び複数世代において安定して伝達されていることを確認した(添付資料 4)。

15

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

染色体上に複数コピーは存在しない。

20

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

本組換えトウモロコシの T3、BC1 及び BC2 世代において、葉における改変 AAD-1 蛋白質の発現量を ELISA 法により調べた。その結果、遺伝子型がヘテロである BC1 及び BC2 世代における AAD-1 蛋白質は同程度の発現量であった。一方で、T3 世代は遺伝子型がホモであるため、AAD-1 蛋白質の発現量は、遺伝子型がヘテロである BC1 及び BC2 世代における AAD-1 蛋白質の発現量と比べ、約 2 倍量であった。以上より、異なる世代間においても、改変 AAD-1 蛋白質の発現は安定していると考えられる(表 4、p.10)。

25

30 表 4 本組換えトウモロコシの葉における改変 AAD-1 蛋白質の発現量

社外秘情報につき非開示

35 ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

本組換えトウモロコシには、伝達性を有する配列は含まれておらず、本組換えトウモロコシに導入された遺伝子が伝達されることはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えトウモロコシの検出及び識別の方法として、本組換えトウモロコシに特異的な塩基配列をプライマーとして用いた PCR 法が開発されている(添付資料 6)。本 PCR 法の検出限界値は 0.04%である。

5

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

10 本組換えトウモロコシには、改変 *aad-1* 遺伝子が導入されており、改変 AAD-1 蛋白質が発現することによりアリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与された本組換えトウモロコシを栽培することにより、栽培農家は使用する除草剤の選択肢が増えるとともに、他の除草剤に抵抗性を獲得した雑草を防除することができる。

15 2009 年に独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 那須研究拠点(以下「畜産草地研究所」という。)で行った隔離ほ場試験において、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの除草剤キザロホップ耐性試験を行った。発芽約 2 週間後の本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシ(各 25 個体)に 250 倍希釈した除草剤キザロホップ(商品名:ポルトフロアブル)を散布した。散布 1 週間後には、非組換えトウモロコシは全て枯死したのに対し、本組換えトウモロコシは全て傷害も見られず、十分な
20 除草剤耐性を示した(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 1、p.2)。

除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀(半数致死濃度)は淡水魚で 1.7mg/L、オオミジンコ(*Daphnia magna*)で 1.4mg/L であり、ウキクサの EC₅₀(半数影響濃度)が 1.5mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC(無影響濃度)が 0.14mg/L、オオミジンコの NOEC
25 が 0.21mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC₅₀ が 125mg/kg、オオフォルソムトビムシ(*Folsomia candida*)の EC₁₀(10%影響濃度)が 0.7mg/kg である(文献 13)。

一方、2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀ は淡水魚で 0.26mg/L、オオミジンコで 2.2mg/L であり、ウキクサの EC₅₀ が 0.2992mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476mg/L、オオミジンコの NOEC
30 が 0.20mg/L である(文献 14)。

このように、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D に比べて毒性が低い。

また、本組換えトウモロコシに適正使用範囲の上限量の 2,4-D を散布し、穀粒中の 2,4-DCP の残留濃度を調べた結果、定量限界値(0.01 ppm)未満であった(文献 15)。

35

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

2009 年に、畜産草地研究所において隔離ほ場試験を行い、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの相違を検討した(「隔離ほ場試験結果報告書」参照)。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草型、分げつ数、着雌穂高、黄熟期、雌穂数、有効雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一粒粒数、粒色、百粒重、粒形、収穫期の地上部生体重について、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの比較を行った。なお、生育後期の温度不足のため、ほ場における組換え体及び非組換え体ともに完熟まで至らなかった。そのため、雌穂長、雌穂径、粒列数、一粒粒数、粒色、百粒重及び粒形の調査については、2009年11月15日に本組換えトウモロコシ、非組換えトウモロコシのそれぞれ各区2個体をほ場内のビニールハウスに移し(加温なし)、完熟させた雌穂を用いた。また、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシはビニールハウスに移した時には、すでに生長が停止していたことから、雌穂長、雌穂径、粒列数、一粒粒数、粒形については、ビニールハウスに移した後も変化がないと考えられる。

本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシはともに発芽揃いは良好で、雄穂抽出期及び絹糸抽出期に差異はなかった。本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの草型は、ともにアップライトであり、分げつは見られず、黄熟期にも差異はなかった。本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの雌穂数はともに1つ、有効雌穂数はともに1つであり、差異はなかった。また、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの粒色及び粒形は、ともに黄色のくさび形をしており、差異はなかった。さらに、発芽率、稈長、着雌穂高、雌穂長、雌穂径、粒列数、一粒粒数、百粒重、収穫期の地上部生体重について、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差は認められなかった(表5、p.12)。

表5 本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの形態及び生育特性比較

社外秘情報につき非開示

25

b 生育初期における低温又は高温耐性

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの生育初期における低温耐性について検討した。2~3葉期まで生育した本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシ(各25個体)を2009年12月30日に野外(隔離ほ場敷地内)に放置した。その結果、本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシともに、4日間程度で全ての個体が枯死し、差異は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図5、p.8)。

35 c 成体の越冬性又は越夏性

トウモロコシは夏型1年生作物であり、成熟後、自然に枯死する。実際に、隔離ほ場において、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシともに枯死していることを確認した(「隔離ほ場試験結果報告書」、図6、p.9)。

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性及びサイズをアセトカーミン溶液で染色して観察した。その結果、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間に統計学的有意差は認められなかった(表 6、p.13)。

5

表 6 本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの花粉の稔性及び直径

社外秘情報につき非開示

10

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量については、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの有効雌穂数、粒列数、一列粒数、百粒重を比較した。その結果、全ての項目において統計学的有意差が認められなかったことから、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの種子の生産量に差異はないと判断した(表 5、p.12)。

15

種子の脱粒性については、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの雌穂が収穫時に苞皮に覆われており、種子の脱粒は認められなかった。

種子の休眠性については、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの種子親及び収穫後すぐに供試した収穫種子の発芽率がともに高く、休眠性は極めて浅いと判断された(表 7、p.13)。なお、収穫種子の発芽率の調査には、ビニールハウスで完熟させた種子を用いた。

20

表 7 本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの発芽率

社外秘情報につき非開示

25

f 交雑率

我が国において交雑可能な近縁野生種は自生していないので、試験を行っていない。

30

g 有害物質の産生性

本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの有害物質の産生性を比較するために、後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った。

35

<後作試験>

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの根域土壌を各区 4 ヶ所から採取して混和し、化成肥料を混合後、5 穴×5 穴の育苗バットに土壌を詰めた。育苗バットの各セルにハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、7 日後に発芽率、14 日後に草丈及び乾燥

重の調査を行った。その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈及び乾燥重について統計学的有意差は認められなかった(表 8、p.14)。

表 8 ハツカダイコンを用いた後作試験結果

5

社外秘情報につき非開示

< 鋤込み試験 >

10 本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの収穫期の茎葉の乾燥粉末 5g を 850g の育苗用市販土壌と混合し、5 穴×5 穴の育苗バットに土壌を詰めた。育苗バットの各セルにハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、7 日後に発芽率、14 日後に草丈及び乾燥重の調査を行った。その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈、新鮮重及び乾燥重について統計学的有意差は認められなかった(表 9、p.14)。

15

表 9 ハツカダイコンを用いた鋤込み試験結果

社外秘情報につき非開示

20

< 土壌微生物相試験 >

本組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシの収穫後の土壌を各区 4 ヶ所から採取し混和した。希釈平板法により、細菌数、放線菌数及び糸状菌数を測定した。その結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの間で統計学的有意差は認められなかった(表 10、p.14)。

25

表 10 本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの栽培における収穫後の土壌微生物数

社外秘情報につき非開示

30

以上の結果から、有害物質の産生性に関して、本組換えトウモロコシにおいて意図しない有害物質の産生はないと考えられる。

35

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

食用又は飼料に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

5

(2) 使用等の方法

(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

10

(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

15

「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

20

(6) 国外における使用等に関する情報

米国(2004～2008年)では延べ110カ所、カナダ(2007～2008年)では延べ4カ所のほ場において試験を行ってきたが、非組換えトウモロコシと比較して生物多様性影響を生じのおそれがあるような相違は報告されていない。

25

なお、米国においては、2009年8月21日に農務省(USDA)に無規制承認申請(栽培承認)を、2009年10月1日に連邦食品医薬品局(FDA)に食品及び飼料安全承認申請を行った。また、カナダにおいても、2009年11月23日に保健省(Health Canada)に食品としての承認申請を、食品検査庁(CFIA)に飼料及び環境安全の承認申請を行った。

第二 項目ごと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

5 第一の2の(6)に示したとおり、2009年に畜産草地研究所で実施した隔離ほ場試験の結果、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量・脱粒性・休眠性及び発芽率について本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの相違は見られなかった。

10 本組換えトウモロコシは、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を持つが、アリルオキシアルカノエート系除草剤を散布されることが想定しにくい自然条件下においてアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

したがって、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いと判断された。

15 (2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

20

(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、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えトウモロコシの競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

25

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシには、他感作用物質のような野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

30 本組換えトウモロコシは、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する改変AAD-1蛋白質を産生する。改変AAD-1蛋白質については、有害物質としては知られていない。また、改変AAD-1蛋白質が他の代謝系に関与するとは考えられていない。

なお、2009年に畜産草地研究所の隔離ほ場試験において、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を実施した結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの相違は見られなかった。

5 除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀(半数致死濃度)は淡水魚で 1.7mg/L、オオミジンコ (*Daphnia magna*)で 1.4mg/L であり、ウキクサの EC₅₀(半数影響濃度)が 1.5mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC(無影響濃度)が 0.14mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.21mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC₅₀ が 125mg/kg、オオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*) の EC₁₀(10%影響濃度)が 10 0.7mg/kg である(文献 13)。

一方、2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC₅₀ は淡水魚で 0.26mg/L、オオミジンコで 2.2mg/L であり、ウキクサの EC₅₀が 0.2992mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.20mg/L である(文献 14)。

15 このように、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

また、本組換えトウモロコシに適正使用範囲の上限量の 2,4-D を散布し、穀粒中の 2,4-DCP の残留濃度を調べた結果、定量限界値(0.01 ppm)未満であったことから(文献 20 15)、本組換えトウモロコシの輸入種子が野生動物に影響を及ぼすことはないと考えられる。

したがって、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いと判断された。

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、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えトウモロコシの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がないと判断された。

35

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国では、本組換えトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は自生していないため、交雑性によって影響を受ける野生動植物等は特定されないと判断された。

5

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

10

(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、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えトウモロコシの交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれがないと判断された。

15

4 その他

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量・脱粒性・休眠性及び発芽率)について、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの相違は認められなかった。また、

5 本組換えトウモロコシはアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を持つが、アリルオキシアルカノエート系除草剤を散布されることが想定しにくい自然条件下において、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

10 以上のことから、本組換えトウモロコシは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

トウモロコシには、他感作用物質のような野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。また、改変 AAD-1 蛋白質は有害物質としては知られていない。有害物質の産生性について、後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った結果、本組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの相違は認められなかった。2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならず、また、2,4-D を散布し生育した本組換えトウモロコシの輸入種子が野生動物に影響を及ぼすことはないと考えられた。

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

また、本組換えトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は我が国に自生していないため、本組換えトウモロコシは、交雑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。

25

よって、総合評価として、本組換えトウモロコシを第一種使用規程に従って使用した場合、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと結論づけられた。

30

参 考 文 献

1. OECD (2003), Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.27, Consensus Document on the Biology of Zea Mays subsp. Mays (Maize).
2. FAOSTAT (2009), <http://faostat.fao.org>
- 5 3. 戸澤英男 (2005), 「トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用」, (社)農山漁村文化協会
4. Doebley JF (1984) Maize introgression into teosinte - a reappraisal. *Ann.Missouri Bot.Gard.* **71**, 1100-1113.
5. Shirai Y, Takahashi M (2005) Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target
10 lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. *Apple Entomol. Zool.* **40**, 151-159.
6. Allen G.C., Spiker S. and Thompson, W.F. (2000) Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**, 361-376.
7. Halweg C., Thompson W.F. and Spiker, S. (2005) The Rb7 matrix attachment
15 region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells : A flow cytometric study. *The Plant Cell* **17**: 418-429.
8. Dow AgroSciences LLC (2004) Novel Herbicide Resistance Genes. U.S. Patent Application Number 60/567,052.
9. Allen GC, Hall Jr G, Michalowski S, Newman W, Spiker S, Weissinger AK, Thompson WF (1996) High-level transgene expression in plant cells : Effects of a
20 strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* **8**, 899-913.
10. Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes : Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* **18**, 675-689.
- 25 11. Dow AgroSciences LLC (1997) Regulatory Sequences from Transgenic Plants. U.S. Patent Application Number 60/049,752.
12. Thompson JA, Drayton PR, Frame BR, Wang K, Dunwell JM (1995) Maize transformation utilizing silicon carbide whiskers : A review. *Euphytica* **85**, 75-80.
13. OECD Existing Chemicals Database (2006)
30 <http://webnet.oecd.org/hpv/UI/Default.aspx>

14. EPA (2004) Environmental Fate and Effects Division's Risk Assessment for the Reregistration Eligibility Document for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)
<http://www.regulations.gov/search/Regs/home.html#documentDetail?R=09000064800b9450>
- 5 15. Culligan JF (2010) Magnitude of the Residue of 2,4-D and Quizalofop-P-ethyl in/on Herbicide Tolerant Field Corn Containing the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1) Gene (社内報告書)

緊急措置計画書

平成22年7月16日

5

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
代表取締役 フィリップ・ファイル
住所 東京都品川区東品川2丁目2番24号

10

第一種使用規程の承認を申請しているアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ(改変 *aad-1*, *Zea mays subsp.mays* (L.) Iltis) (DAS40278, OECD UI : DAS-40278-9) (以下「本組換えトウモロコシ」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、科学的根拠に基づき立証された場合、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

(個人名・所属・電話番号は個人情報のため非開示)

平成22年7月現在

社内委員	
	ダウ・ケミカル日本株式会社 東京都品川区東品川2丁目2番24号 (電話番号)
*	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

5

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

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換えトウモロコシの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

10

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り、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は米国ダウ・アグロサイエンス社の協力のもと、本組換えトウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えトウモロコシは、環境中で生存しないように不活化する。

15

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが示唆された場合、直ちに農林水産省 消費・安全局 農産安全管理課及び環境省 自然環境局 野生生物課に報告する。

20

以上

アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ

(改変 *aad-1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis.)

(DAS40278, OECD UI : DAS-40278-9)

5

生物多様性影響評価書

添 付 資 料

10

添付資料 1 AAD-1 蛋白質が活性を示す除草剤

添付資料 2 Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1)

15 添付資料 3 pDAS1740 の塩基配列

添付資料 4 導入遺伝子のコピー数並びに世代間及び同一世代における安定性

添付資料 5 pDAS1740 の直鎖状 DNA の作成過程

添付資料 6 本組換えトウモロコシの検出法

隔離ほ場試験結果報告書

20

社外秘情報につき非開示

25

ダウ・ケミカル日本株式会社