

除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ
(*cp4 epsps, cry3Bb1, cry1Ab, Zea mays subsp. mays* (L.) Iltis.)
(MON 88017×MON 810, OECD UI: MON-88017-3×MON-00810-6)
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	
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	5
(1) 供与核酸に関する情報	5
(2) ベクターに関する情報	17
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	17
(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	21
(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	24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	24
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	32
(1) 使用等の内容	32
(2) 使用等の方法	32
(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	32
(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	32
(5) 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果	32
(6) 国外における使用等に関する情報	32
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	34
1 競合における優位性	34
2 有害物質の産生性	36
3 交雑性	46
4 その他	47
第三 生物多様性影響の総合的評価	48
引用文献	50
緊急措置計画書	51

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 10 月 19 日

農林水産大臣 島村 宜伸 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(<i>cp4 epsps, cry3Bb1, cry1Ab, Zea mays subsp. mays (L.)</i> Iltis)(MON 88017 × MON 810, OECD UI: MON-88017-3 × MON-00810-6)
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

(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. 一般にトウモロコシの学名は *Zea mays* L. であるが、近年、トウモロコシの近縁種である一年生テオシントが *Z. mays* に分類された結果、トウモロコシはその亜種として *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis として分類されるようになった。

ロ. 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(*Zea mays*)で、デント種に属する。

ハ. 原産地については、ほぼ米国の南西部、メキシコ、中米あるいは南米にかけての地域と考えられるが、決定的な説はなく、これら複数地域がそれぞれ独立した起源であるとする説と、メキシコ南部単独を起原とする説がある(文献 1)。尚、わが国における自然分布の報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ. トウモロコシの最古の栽培起源は今から 9,000 年前とされている(文献 1)。その後、原住民の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 3000 年~1500 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが本格的に栽培されるようになり、南北アメリカ大陸の各地に伝播し、その伝播の過程でさらにデント、ポップ、スイート種などの多数の変異種が生じたと考えられている(文献 2)。日本へは天正年間(1579 年)に長崎か四国に伝来したのが最初であるとされ、栽培の歴史は長い。

ロ. 現在、飼料としての利用が主流であるが、食用、食用油、澱粉などの食品としての用途も多岐にわたる(文献 2; 文献 1)。現在、トウモロコシは世界で最も広く栽培されている穀物で、米国、中国、ブラジル、アルゼンチン及びヨーロッパ諸国などを中心に、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能である(文献 3; 文献 1)。国連食糧農業機関(FAO)の統計情報に基づく、2002 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 4 千万 ha であり、上位国を挙げると米国が 2,800 万 ha、中国が 2,500 万 ha、ブラジルが 1,200 万 ha、メキシコが 700 万 ha、インドが 600 万 ha、ナイジェリアが 400 万 ha、南アフリカが 300 万 ha となっている(文献 4)。尚、同統計情報に基づく 2002 年の日本における栽培面積は約 3 万 ha であった。

日本は海外から約 1,600 万トンのトウモロコシを飼料用、食品用として輸入している。飼料用は約 1,100 万トン、食品用は約 500 万トンで主な用途は澱粉、異性化糖である。

わが国での飼料用トウモロコシの慣行栽培法は以下のとおりである。播種適期は寒地から温暖地までは 5 月、一部の暖地では 4 月から 6 月までである。適正栽植密度は 10a あたり 6,000~8,000 本である。雑草防除のため、生育初期に除草剤散布や 2~3 回の中耕・培土作業を行う。雌穂の抽出より 35~45 日後の黄熟期に地上部を収穫する(文献 3)。

尚、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づく、現在、一般に栽培用として市販されているトウモロコシのほとんど全ては一代雑種品種(F1)なので、収穫種子が翌年に栽培用として播種されることは一般的でない。

(3) 生理的及び生態学的特性

イ 基本的特性

—

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシ種子の発芽適温は 32~36℃、最低発芽温度及び最低生育温度は 6~10℃であり、実際には 13~14℃以上の時期が播種適期とされ、品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される一年生の作物である(文献 3)。また、一般に短日植物であり、その感光性は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である(文献 3)。これら温度条件等の他、デント種の場合は種子重量の 70%の水を吸うと発芽する(文献 5)。また、トウモロコシの栽培には腐植に富む壤土が適し、pH5.5~8.0 の範囲で栽培可能である(文献 5)。

現在のトウモロコシは栽培作物として高度に人為的に作られた作物であり、自然条件下で植物として繁殖し、生存するための能力は失われている(文献 6; 文献 1)。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

①完熟した種子は雌穂の包皮で覆われており、自然の脱粒性はない(文献 1)。トウモロコシは長い間栽培植物化されていたために、野生として生き残る能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である。種子の休眠性は極めて低く、収穫時に種子が地上に落下しても、土壌温度が 10°C 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(文献 2; 文献 3)。また、仮に発芽しても生長点が地上部に出る初期生育時(5~7 葉期)に、0°C 以下で 6~8 時間以上の条件下におかれると生存できない(文献 1)。種子の寿命は常温保存では短く、2 年目から発芽率が低下する。

②トウモロコシは栄養繁殖はせず、種子繁殖する。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があるという報告はこれまでのところない。

③トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、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(文献 1; 文献 7)。トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみで、*Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない(文献 1)。テオシントはメキシコとグアテマラにのみ自然分布しており、一方、*Tripsacum* 属の分布地域は北アメリカ東南部、コロンビアからボリビアにかけてのアンデス東側の低地、そして、この属の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラの 3 地域に大別されている(文献 2; 文献 3; 文献 1; 文献 8)。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない(文献 9; 文献 3)。

④トウモロコシの一本の雄穂には 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。花粉の寿命は盛夏のほ場条件下では 24 時間以内であるが、環境により 2 時間から 8 日までの幅がある(文献 10)。花粉は球形で、直径は 90-100 μm である(文献 11)。風媒による他家受粉が主であるが普通のほ場で 1~5% の自家受粉が起きる。雄穂の開花によって飛散した花粉は、雌穂から抽出した絹糸に付着して発芽し、24 時間以内に受精を完了する(文献 1)。また、トウモロコシ花粉が飛散する距離は、林、山などの遮蔽物の有無、風向きなどで異なるが、およそ 300~500m とされている(文献 3)。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

トウモロコシにおいて、自然条件下で周囲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は報告されていない。

ト その他の情報

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で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

除草剤グリホサート及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cp4 epsps*, *cry3Bb1*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON 88017, OECD UI: MON-88Ø17-3)(以下、MON 88017 とする)とチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON 810, OECD UI: MON-ØØ81Ø-6)(以下、MON 810 とする)を従来の交雑育種法を用いて交配させた除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cp4 epsps*, *cry3Bb1*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (OECD UI: MON-88Ø17-3×MON-ØØ81Ø-6) (以下、「本スタック系統トウモロコシ」とする)は、親系統である MON 88017 と MON 810 の2つの組換えトウモロコシのそれぞれの特性を有する。したがって、以下では MON 88017 と MON 810 の調製等に関する情報について個別に述べた。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

MON 88017 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は図 1(p7)及び表 1(p8~9)に示したとおりである。また、構成要素の塩基配列は MON 88017 の生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p32~33 及び p50~54 に記載されている。尚、本組換えトウモロコシには野生型 *cp4 epsps* 遺伝子を改変した *cp4 epsps* 遺伝子及び野生型 *cry3Bb1* 遺伝子を改変した *cry3Bb1* 遺伝子を導入しており、以下この遺伝子を「改変型 *cp4 epsps* 遺伝子」及び「改変型 *cry3Bb1* 遺伝子」、発現する蛋白質を「改変型 Cry3Bb1 蛋白質」及び「改変型 CP4 EPSPS 蛋白質」と称する。

MON810 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は図 2(p10)及び表 2(p11)に示したとおりである。

cryIAb 遺伝子の塩基配列は MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 1 の p808(2 枚目)の FIGURE 1 に示した。

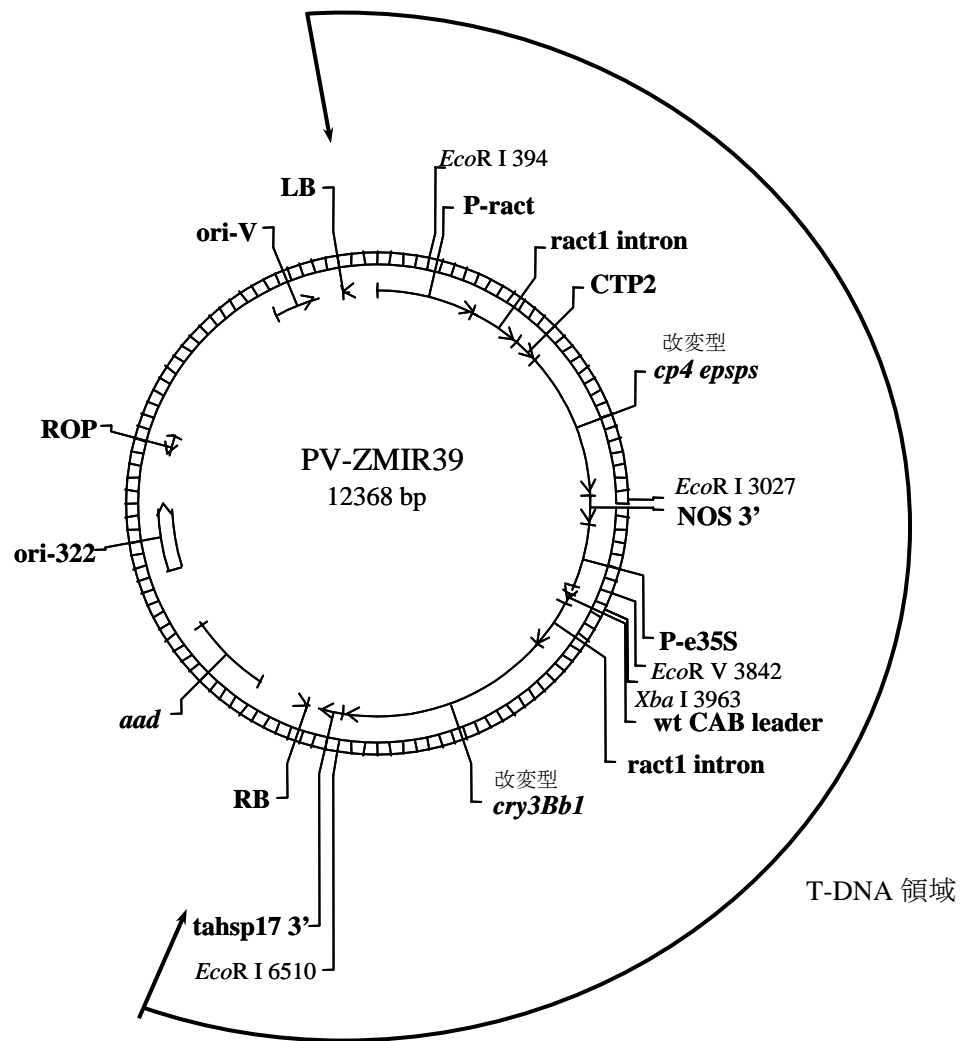


図1 MON 88017 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR39¹

¹ 本図に記載された情報に係る権利および内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 1 MON 88017 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR39 の各構成要素・由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
改変型 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット	
P-ract	イネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子を発現させる(文献 9)。
ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。スプライシングの効率を高めることによって、目的遺伝子の発現を活性化させる (文献 12)。
CTP2	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列(文献 13)。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ、CP4 EPSPS 蛋白質を輸送する。
改変型 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(文献 14; 文献 15)。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、アミノ酸配列に関しては N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されたのみである。機能の詳細については p12~13 に記載した。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (文献 16)。
改変型 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子カセット	
P-e35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター(文献 17)。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
wt CAB leader	コムギ葉緑素 a/b 結合蛋白質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる(文献 18)。
ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。スプライシングの効率を高めることによって、目的遺伝子の発現を活性化させる (文献 12)。
改変型 <i>cry3Bb1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> の改変した Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子(文献 19)。MON 863 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質とはアミノ酸配列が一ヶ所異なり、166 番目のアミノ酸配列が MON 863 ではグリシンであるのに対して MON 88017 ではアスパラギン酸である。機能詳細については p13~14 を参照。
tahsp 17 3'	コムギ熱ショック蛋白質 17.3 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 20)。

² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 1 MON 88017 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR39 の各構成要素・由来及び機能(続き)³

T-DNA 領域以外の構成要素	
RB	Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列の DNA 断片。右境界配列は、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(文献 21)。
<i>aad</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 由来の、Tn7 アデニルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン或いはストレプトマイシン耐性を付与する(文献 22)。
ori-322	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E.coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 23)。
ROP	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持の為にプライマータンパク質を抑制するコーディング配列(文献 24)。
ori-V	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(文献 25)。
LB	Ti プラスミド pTiI5955 に由来する左境界配列の DNA 断片。左境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(文献 26)。

³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

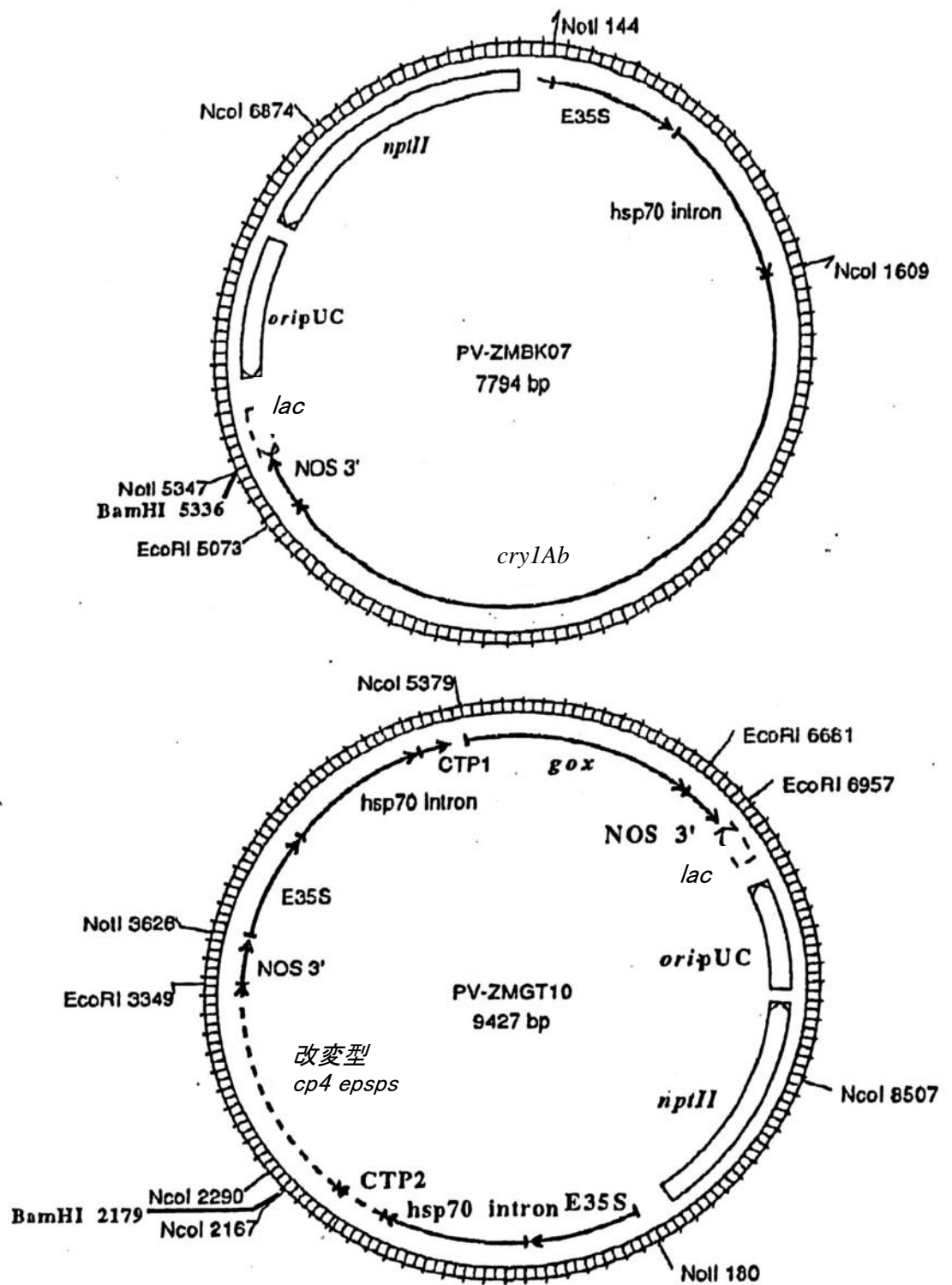


図 2 MON810 の作出に用いたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10⁴

⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 2 MON810 の作出に用いられたプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の各構成要素・由来及び機能⁵

構成要素	由来及び機能
<i>cry1Ab</i> 遺伝子カセット	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター(文献 17)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 27)。
hsp70 intron	トウモロコシの熱ストレス蛋白質遺伝子のイントロン。hsp70 intron は植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる(文献 28)。
<i>cry1Ab</i>	土壤中に存在する <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>krustaki</i> HD-1 株の Cry1Ab 蛋白質をコードする遺伝子(文献 29)。機能の詳細については p14~15 に記載した。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 16)。
改変型 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていなかった)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター(文献 17)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 27)を持つ。
hsp70 intron	トウモロコシの熱ストレス蛋白質(heat shock protein)遺伝子のイントロン。hsp70intron は植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる(文献 28)。
CTP2	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列である(文献 13)。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ、目的蛋白質を輸送する。
改変型 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(文献 14; 文献 15)。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 16)。
<i>gox</i> 遺伝子カセット(挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていなかった)	
E35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター(文献 17)及び二重エンハンサー領域を持つ(文献 27)。
hsp70 intron	トウモロコシの熱ストレス蛋白質遺伝子のイントロン。hsp70intron は植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる(文献 28)
CTP 1	シロイヌナズナ由来の <i>rubisco</i> の small subunit 1A 遺伝子の中で、 <i>rubisco</i> small subunit 1A の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする配列である。(文献 30)。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ、目的蛋白質を輸送する。
<i>gox</i>	<i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA のグリホサート分解酵素(glyphosate oxidoreductase; <i>gox</i>) 由来の変異体 v247 の C 末端をコードする配列(文献 31)。GOX 蛋白質によりグリホサートが分解される。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を集結させ、ポリアデニル化を誘導する(文献 16)。
それ以外の構成要素(PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 に共通)(MON810 中には挿入されていなかった)	
<i>lac</i>	β -D-ガラクトシダーゼ又は Lac 蛋白質の部分的コード配列(文献 32)。 β -ガラクトシドを分解して β -ガラクトースを生成する。
ori-pUC	大腸菌プラスミド pUC (文献 33)の複製開始領域を含むセグメント。大腸菌プラスミドの複製を開始する。
<i>nptII</i>	原核生物のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードする。この遺伝子が微生物内で発現されるとカナマイシン耐性が付与され、形質転換の選択マーカーとして働く(文献 34)。

⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

ロ 構成要素の機能

MON 88017 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1(p8~9)に示した。MON 810 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2(p11)に示した。

【改変型 *cp4 epsps* 遺伝子】

グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する(文献 35; 文献 36)。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。改変型 *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変型 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変型 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変型 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物中では葉緑体または色素体に存在する(文献 37)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である(文献 38; 文献 36)。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(3-deoxy-D-arabino-heptulonate-7-phosphate, DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸 3 リン酸(EPSP)の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている(文献 39; 文献 40)。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており(文献 41)、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている(文献 42; 文献 43; 文献 44; 文献 45)。これらのことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを支持している。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸 (PEP)とシキミ酸-3-リン酸 (S3P)から、EPSP と無機リン酸 (Pi)を生ずる

可逆反応を触媒する酵素であり(文献 46)、これらの基質と特異的に反応することが知られている(文献 47)。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

②改変型 CP4 EPSPS 蛋白質が、既知の接触アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

【改変型 *cry3Bb1* 遺伝子】

①コウチュウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である改変型 *cry3Bb1* 遺伝子は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* に由来し、コードされる改変型 Cry3Bb1 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫であり、トウモロコシの根を食害する corn rootworm (*Diabrotica* sp.)(以下 CRW とする)に対する殺虫活性を示す。改変型 Cry3Bb1 蛋白質を含めた *B.t.* 菌の産生する *B.t.* 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す(文献 48; 文献 49; 文献 50)。

Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトラムは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属(*Leptinotarsa*, *Diabrotica*)に分類される Colorado potato beetle(*Leptinotarsa decimlineata*) (以下 CPB とする)と CRW のみに対して殺虫活性を示す(MON 88017 生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p108 の Table 1)。この 2 属の昆虫種との同属近縁種がわが国に生息していることはこれまで報告されていないことが文献調査により示された(MON 88017 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p54 の表 10, 文献 51)。

なお、改変型 Cry3Bb1 蛋白質は野生型 Cry3Bb1 蛋白質と比較して、98%以上の相同性を有している(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 2 の p20 の図 5-2)。コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON 863 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質と MON 88017 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質とはアミノ酸配列が一ヶ所異なり、166 番目のアミノ酸配列が MON 863 ではグリシンであるのに対して本組換えトウモロコシではアスパラギン酸である。実際にはほ場における殺虫効果は MON 88017 の改変型 Cry3Bb1 蛋白質を用いて行っている。

②改変型 Cry3Bb1 蛋白質が既知の接触アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうかをデータベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用

いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

【*cry1Ab* 遺伝子】

①MON810でチョウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である *cry1Ab* 遺伝子は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来し、コードされる Cry1Ab 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫である European corn borer (*Ostrinia nubilalis*)に対する殺虫活性を有する(Frankenhuizen, 1993)。European corn borer の食害部位は植物体地上部全般である。Cry1Ab 蛋白質を含めた *B.t.*菌の産生する *B.t.*蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す(文献 48; 文献 50)。*B.t.*蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能している。

Cry1Ab 蛋白質は、チョウ目昆虫にのみ殺虫活性を示し、チョウ目以外の昆虫に対しては殺虫活性を持たない。また、この Cry1Ab 蛋白質は、米国のトウモロコシ栽培における重要害虫であるチョウ目の European corn borer (*Ostrinia nubilalis*), Southwestern corn borer (*Diatraea grandiosella*), Southern cornstalk borer (*Diatraea crambidoides*), Sugarcane cornstalk borer (*Diatraea saccharalis*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*), Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), Stalk borer (*Papaipema nebris*)に対して殺虫活性を示すことが知られている(文献 52; 文献 53; 文献 54; 文献 55; 文献 56)。これらの内、*O. nubilalis* と同属の *O. furnacalis* は日本のトウモロコシ栽培における主要チョウ目害虫として知られている(文献 57)。

②Cry1Ab 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

【改変型 *cry3Bb1* 遺伝子+*cry1Ab* 遺伝子】

改変型 Cry3Bb1 蛋白質が属する Cry3 ファミリーと Cry1Ab 蛋白質が属する Cry1A ファミリーは、それぞれコウチュウ目昆虫及びチョウ目昆虫という異なる目に分類される昆虫種の幼虫に対して特異的に殺虫活性を示すことが、1960年から生物農薬として使用されている *B.t.*製剤の知見からも知られている。

また、両蛋白質とも標的昆虫の中腸上皮細胞の特異的受容体と結合して消化プロセスを阻害するという作用機作は共通しているが、チョウ目昆虫とコウチュウ目昆虫の幼虫における中腸内の pH は、それぞれアルカリ性(pH 10.5~pH 11.0)と

中性(pH 6.5~pH 7.0)であり、両蛋白質は異なる化学条件でそれぞれ殺虫活性を発揮している(文献 58)。

更に、MacIntosh らの報告によると、表 3(p16)に示したように Cry1Ab 蛋白質と同じ Cry1A ファミリーに属する Cry1Ac 蛋白質と、改変型 Cry3Bb1 蛋白質と同じ Cry3 ファミリーに属する Cry3Aa 蛋白質に対して感受性を示さない非標的昆虫は、これら 2 つの異なるファミリーに属する *B.t.* 蛋白質を混合して与えた場合でも、変わらず非感受性のままであり、Cry1Ac 蛋白質と Cry3A 蛋白質に同時に暴露されることによる相乗的な影響を受けないことが報告されている(文献 59)。従って、従来の交雑育成法を用いて交配された交配後代品種である本スタック系統トウモロコシ中には親系統由来の Cry1Ab 蛋白質と改変型 Cry3Bb1 蛋白質が発現しているが、それらが互いの非標的昆虫に対して相乗効果的に殺虫活性を示す可能性はきわめて低いと考えられた。

表 3 Cry1 及び Cry3 蛋白質の異なる昆虫種に対する殺虫活性を調査した結果
(MacIntosh らの論文等をもとに作成した。)

	Cry1Ab ⁽¹⁾	Cry1Ac ⁽²⁾	Cry3A ⁽³⁾	Cry1Ac + Cry3A ⁽⁴⁾
Cockroach (<i>Blatella germanica</i>)	-	-	-	-
Alfalfa weevil (<i>Hypera postica</i>)	-	-	-	-
Cotton boll weevil (<i>Antonomus grandis</i>)	-	-	-	-
Horseradish flea beetle (<i>Phyllotreta armoraciae</i>)	-	-	-	-
Southern corn rootworm (<i>Diabrotica undecimpunctata howardii</i>)	-	-	-	-
Japanese beetle (<i>Popilla japonica</i>)	-	-	-	-
Colorado potato beetle (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	-	-	+	+
Mosquito (<i>Aedes aegypti</i>)	-	-	-	-
Green peach aphid (<i>Myzus persicae</i>)	-	-	-	-
Termite (<i>Reticulitermes flavipes</i>)	-	-	-	-
Beet armyworm (<i>Spodoptera exigua</i>)	+	+	-	+
Black cutworm (<i>Agrotis ipsilon</i>)	+	+	-	+
Cabbage looper (<i>Trichoplusia ni</i>)	+	+	-	+
Corn earworm (<i>Heliothis zea</i>)	+	+	-	+
European corn borer (<i>Ostrinia nubilalis</i>)	+	+	-	+
Tobacco budworm (<i>Heliothis virescens</i>)	+	+	-	+
Tobacco hornworm (<i>Manduca sexta</i>)	+	+	-	+
Spider mite (<i>Tetranychus urticae</i>)	-	-	-	-

- 1- Cry1Ab 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
 - 2- Cry1Ac 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
 - 3- Cry3A 蛋白質の濃度が人工飼料中で 500 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
 - 4- Cry1Ac 蛋白質の濃度が人工飼料中で 50 μ g/ml、
Cry3A 蛋白質が 500 μ g/ml になるように調整して昆虫種に与えた。
- + 検定幼虫の死亡率が 25%以上であった試験区
- 検定幼虫の死亡率が 25%以下であった試験区

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

MON 88017 の作出に用いられたベクターは、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pBR322 などをもとに構築された(文献 23)。MON 810 の作出に用いられたベクターは、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pUC119 などをもとに構築された(文献 33)。

ロ 特性

MON 88017 の作出に用いられた PV-ZMIR39 の全塩基数は 12,368bp であり、大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてスペクチノマイシンあるいはストレプトマイシン耐性を付与するための *aad* 遺伝子を持つ(文献 22)。本ベクターの感染性は知られていない。

MON810 の作出に用いられた PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 の全塩基数はそれぞれ 7,794 bp、9,427 bp であり、大腸菌における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてトランスポゾン Tn5 由来のカナマイシン/ネオマイシン耐性遺伝子(*nptII* 遺伝子)を持つ。本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

MON 88017 の作出には、上記の *aad* 遺伝子を持つ pBR322 などをもとに、プラスミドベクター PV-ZMIR39 を構築した。宿主内に移入された本ベクター中の T-DNA 領域は、改変型 *cp4 epsps* 遺伝子カセット [P-ract]-[ract1 intron]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3'] 及び改変型 *cry3Bb1* 遺伝子カセット [P-e35S]-[wt CAB leader]-[ract1 intron]-[*cry3Bb1*]-[tahsp17 3'] で構成される。尚、PV-ZMIR39 のプラスミドマップは、p6 の図 1 に記載した。

MON810 の作出には、上記の *nptII* 遺伝子を持つ pUC119 由来のベクターを元に、① *cryIAb* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[*cryIAb*]-[NOS3']) を連結したプラスミド PV-ZMBK07、ならびに②改変型 *cp4 epsps* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[CTP2]-[*cp4 epsps*]-[NOS 3']) と *gox* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[CTP1]-[*gox*]-[NOS 3']) を連結したプラスミド PV-ZMGT10 を構築し、この 2 つをベクターとして用いた。尚、PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 のプラスミドマ

ップは、p9の図2に記載した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

MON 88017の作出では、プラスミドベクターPV-ZMIR39中のT-DNA領域をアグロバクテリウム法により、デント種に分類される品種であるA x HiIIに導入した。

MON 810の作出では、プラスミドPV-ZMBK07及びPV-ZMGT10の混合物をパーティクルガン法によって、デント種に分類されるトウモロコシ自殖系統A188 X B73のF2世代に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

【MON 88017の育成の経過】

①MON 88017の開発は1999年から始まった。アグロバクテリウム法によりプラスミドベクターPV-ZMIR39中のT-DNA領域をA x HiIIに導入した後、グリホサートを含む培地上で形質転換カルスを選抜して再生個体を得て、改変型Cry3Bb1蛋白質の発現をELISA分析によって検定し、グリホサート耐性と害虫抵抗性の付与された系統を選抜した。

②この際、形質転換カルスをカルベニシリンを含む培地で培養した後、これら抗生物質を含まない再生培地に移して培養することによって、アグロバクテリウムの残存性がないことを確認している(文献60)。

③2000～2001年にかけて延べ169ヶ所のほ場試験を行い、最終商品化系統を選抜するとともに、その環境安全性を評価した(試験に用いた系統についてはp20の図3を参照)。

MON 88017のわが国における認可状況は以下の通りである。

2003年4月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。

2004年8月 農林水産省及び環境省より遺伝子組み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(食用または飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為について)の審査を終了した。

【MON810 の育成の経過】

①PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 を導入したカルスを、2,4-D を含む組織培養培地上でしばらく生育させた後、グリホサートを含む培地で組換え体を選抜し、選抜されたカルスから再生個体を得て Cry1Ab 蛋白質の発現を解析した。尚、MON810 のサザンブロットによる挿入遺伝子解析の結果、*nptII* 遺伝子、改変型 *cp4 epsps* 遺伝子、*gox* 遺伝子の発現カセットは存在しないことが確認された(MON810 生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p22 の図 4)。MON810 に改変型 *cp4 epsps* 遺伝子が挿入されていなかったにもかかわらずグリホサートで選抜されたのは、再分化個体(R0)の次世代(BC0F1)で挿入遺伝子に関して分離が起きたためである可能性が考えられた。しかし、MON810 は害虫抵抗性トウモロコシとして選抜が進められ、再分化個体の次世代でグリホサート検定及びサザンブロット分析は行われなかったため、理由は特定されなかった。

②MON810 はパーティクルガン法によって DNA 断片を導入しているため、アグロバクテリウムの残存性の確認は行わなかった。

③1992 年より系統選抜の評価を開始し、1993～1995 年にかけて圃場試験を行って、最終的に優良系統を選抜した。そして、1994 年に行った米国 6 ヶ所の圃場試験において、本系統の形態及び生育特性などについて調査を行うとともに、Cry1Ab 蛋白質の発現及び挿入遺伝子の分析等を行った(試験に用いた系統については p20 の図 4 を参照)。それらの結果に基づいて、米国で必要な認可を受けて 1997 年から一般商業栽培が始められている。

MON810 のわが国における認可状況は以下の通りである。

- | | |
|-------------|---|
| 1996 年 10 月 | 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。 |
| 1997 年 5 月 | 厚生労働省(当時厚生省)より「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」に基づき、食品利用としての安全性認可を受けた。 |
| 1997 年 6 月 | 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針 6 の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。 |
| 2001 年 3 月 | 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。 |
| 2003 年 3 月 | 農林水産省より「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。 |
| 2003 年 4 月 | 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。 |

2004年6月 農林水産省及び環境省より遺伝子組み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定の承認を受けた。(食用または飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為について)

【MON 88017×MON 810 の育成の経過】

本スタック系統トウモロコシは、MON 88017 と MON 810 の自殖系統を従来の交雑育種法を用いて作出した(p20 の図 5)。

社外秘につき非開示

図 3 除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 の育成図

社外秘につき非開示

図 4 組換えトウモロコシ MON 810 の育成図

社外秘につき非開示

図 5 スタック系統トウモロコシ MON 88017×MON 810 の育成図

(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

【MON 88017 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

MON 88017 のサザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシのゲノム中1ヶ所に1コピーのT-DNA領域が組み込まれていることが確認された(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料2のAppendix IIIのp13のFigure 3)。この解析結果及び塩基配列の解析結果から明らかになった挿入遺伝子の模式図を図6(p22)に示した。更に挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代(用いた世代についてはp20の図3の*印のついた系統を参照)におけるサザンブロット分析によって示された(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料3のp26の図3-4)。また、除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性も複数世代で安定して発現していることを選抜の過程でグリホサート散布試験及びCry3Bb1蛋白質の抗体を用いたELISA法により確認している。

【MON 810 に移入した核酸の存在状態および形質発現の安定性】

MON810 のサザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、MON810 のゲノムの1ヶ所に1コピーの*cry1Ab* 遺伝子発現に必要なPV-ZMBK07由来のDNA断片が組み込まれていることが確認された(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料2のp21の図3)。この解析結果及び塩基配列の解析結果から明らかになった挿入遺伝子の模式図を図7(p23)に示した。また、挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代(p22の図4の右肩に^d印のついた世代)におけるサザンブロット分析によって示された(MON810 の生物多様性影響評価書別添資料2のp26の図6及び別添資料3のp37の図2)。また、チョウ目害虫への抵抗性も複数世代で安定して発現していることを生物検定により選抜の過程で確認している。

尚、MON810 のサザンブロット分析による挿入遺伝子解析の結果、トウモロコシのゲノム中に挿入されたのはPV-ZMBK07由来の*cry1Ab* 遺伝子発現に必要な領域のみで、*nptII* 遺伝子やPV-ZMGT10由来の改変型*cp4 epsps* 遺伝子と*gox* 遺伝子の発現カセットは存在しないことが確認された(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料2のp22の図4及びp23の図5)。

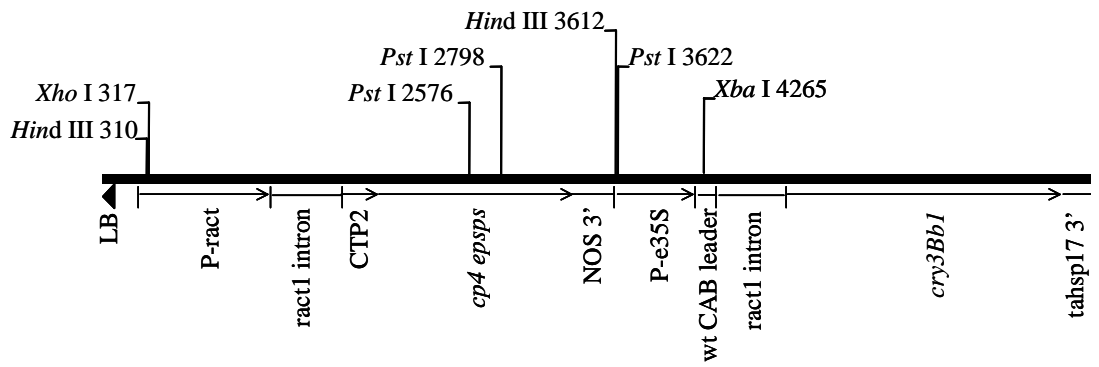


図 6 MON 88017 の挿入遺伝子地図⁶

⁶ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

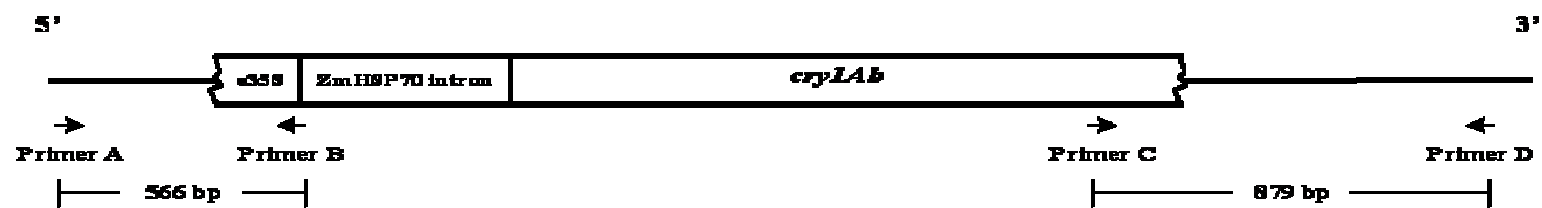


図7 MON 810 の挿入遺伝子地図⁷

⁷ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

(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

MON 88017 を検出及び識別するための方法としては、挿入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いることにより、MON 88017 を特異的に検出可能である(MON 88017 の生物多様性影響評価書の別添資料 4)。

MON810 の検出及び識別するための方法としては、現在、http://www.maff.go.jp/sogo_shokuryo/jas/manual00.htm に標準分析法が公表されている(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 4)。

本スタック系統トウモロコシを検出及び識別するためには、上記の 2 方法をトウモロコシの種子 1 粒ごとに行う必要がある。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本スタック系統トウモロコシは親系統である MON 88017、MON 810 に挿入された遺伝子により、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質が植物体内において発現していると推測される。改変型 CP4 EPSPS 蛋白質と同等の機能を持つ EPSPS 蛋白質は、シキミ酸経路の律速酵素ではないことが示唆されていること、また、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物中の芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されていることから、宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられる。さらに、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質は基質特異性が高い。また、第一の 2-(1)-ロで述べたように、改変型 Cry3Bb1 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能するとともに、Cry1 ファミリーと Cry3 ファミリーの蛋白質が相互に影響しあう可能性は極めて低いと考えられる。以上のことから、これら 3 つの蛋白質が相互に作用するとは考えにくい。

実際に確認するため、本スタック系統トウモロコシにおける除草剤グリホサート耐性については米国でラウンドアップの散布試験を、コウチュウ目害虫抵抗性及びチョウ目害虫抵抗性については米国で標的害虫である western corn rootworm(*Diabrotica virgifera virgifera*)及び European corn borer (*Ostrinia nubilalis*)を対象としたポット試験による生物検定を行った。この散布試験及び生物検定に用いた本スタック系統トウモロコシの育成図を図 8(p25)に示した。その結果、この試験条件下では、本スタック系統トウモロコシは除草剤グリホサート耐性を発現していることが確認された(p26 の表 4)。次に、本スタック系統トウモロコシの western corn rootworm(*Diabrotica virgifera virgifera*)に対する抵抗性は、改変型

Cry3Bb1 蛋白質を発現する MON 88017 と同程度だった(p27 の表 5)。さらに、本スタック系統の European corn borer に対する抵抗性は、Cry1Ab 蛋白質を単独で発現する MON 810 とほぼ同程度だった(p27 の表 6)。

以上の結果から、本スタック系統トウモロコシ中で発現するこれらの蛋白質は、それぞれ独立して作用していると考えられた。よって、第二の項目ごとの生物多様性影響の評価の際に用いる本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの相違に関する情報については、以下に示す MON 88017、MON 810 の諸形質を個別に調査した結果を引用することとした。

社外秘につき非開示

図 8 生物検定に用いた MON 88017×MON 810 の育成図

表 4 MON 88017×MON 810 の交配後代品種の除草剤グリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウェザーマックス)散布による生物検定の結果⁸

交配後代品種	生育阻害度(%)
MON 88017×MON 810	0
MON 88017	0
非組換え体	100

各交配後代品種につき 10 個体をポット栽培し、栽培開始後 13 日目に除草剤グリホサート(製剤名ラウンドアップ・ウェザーマックス)を 1.125 lb a.e./ac の割合 (10a 当たり 350 ml 散布(通常使用量の 70%)する量に相当) で散布した。グリホサート散布後 10 日目に生育阻害度(10 個体全体における成育阻害の程度)を目視による観察で評価した。生育阻害度はグリホサート未処理の 5 個体全体の成育阻害度と比較した結果である。

⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 5 MON 88017×MON 810 の交配後代品種の生物検定によるコウチュウ目害虫 western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)に対する被害度調査結果⁹

交配後代品種	根部食害程度 (NIS)
MON 88017×MON 810	0.19
MON 88017	0.17
MON 810	2.42
非組換え体	2.68

表 6 MON 88017×MON 810 の交配後代品種の生物検定によるチョウ目害虫 European corn borer に対する被害度調査結果¹⁰

交配後代品種	葉部食害程度 (LDR)
MON 88017×MON 810	1.10
MON 88017	5.10
MON 810	1.11
非組換え体	5.80

【表 5、6 について】

各交配後代品種につき 10 個体をポット栽培し、2 葉期に western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)の卵(1200 個/ポット)を接種し、4 葉期にさらに European corn borer の 1 齢幼虫(45 個体/ポット)を接種した。European corn borer 接種後 21 日目に European corn borer による食害程度を一般的な評価方法である leaf damaging rate (LDR)に従って、0(食害無)~9(食害甚：葉の大部分が食害されている)の 10 段階で調査した(文献 61)(別添資料 1)。

その後、ポットから植物体を取り出して土をていねいに除き、western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)による食害の程度を nodal injury score (NIS)を用いて評価した(文献 62)(別添資料 2)。本方法は米国で corn rootworm の食害程度を評価する際に、様々な研究機関によって利用されている一般的な方法である。corn rootworm はまず下位の節(通常は第 5 節)から生えている冠根、次にその上位の節(通常は第 6 節、次に第 7 節)から生えている冠根、と順に食害していくことから、この方法では、この食害の程度を 0.00 から 3.00 までの連続的な数値として表している。例えば食害程度が 2.80 の場合、第 5 節と第 6 節は完全に食害されており、第 7 節の 80%が食害されている状態を表す。

⁹⁻¹⁰ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

イ. MON 88017 では、改変型 *cp4 epsps* 遺伝子によってコードされる改変型 CP4 EPSPS 蛋白質が植物体の各部位で発現することによって本組換えトウモロコシには、除草剤グリホサートに対する耐性が付与された。実際に確認したところ、非組換えトウモロコシが除草剤グリホサートの影響を受けて枯死したのに対して、組換えトウモロコシは正常に生育した(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p19~22 の写真)。また、改変型 *cry3Bb1* 遺伝子によってコードされる改変型 Cry3Bb1 蛋白質が発現することにより、米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫である CRW の食害に対する抵抗性が付与され、CRW による食害が減少する。CRW はトウモロコシの根を食害するが、MON 88017 では改変型 Cry3Bb1 蛋白質は植物体の各部位で恒常的に発現している(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 2 の p28 の表 5-5)。

MON810 では、*cry1Ab* 遺伝子によってコードされる Cry1Ab 蛋白質が発現することによって、米国のトウモロコシ栽培の主要チョウ目害虫であるアワノメイガの食害に対する抵抗性が付与され、アワノメイガによる食害が減少することが確認された(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p35)。アワノメイガはトウモロコシの地上部全般を食害するが、MON810 では Cry1Ab 蛋白質は植物体の各部位で恒常的に発現している(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p24 の表 3)。また、サザンブロット分析の結果、MON810 では *nptII* 遺伝子、改変型 *cp4 epsps* 遺伝子、*gox* 遺伝子は MON810 には存在せず、これら遺伝子に由来する形質の発現は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p22 の図 4、p23 の図 5、p24 の表 3)。

従って、本スタック系統トウモロコシでも、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質が植物体の各部位で恒常的に発現していると考えられる。

ロ ¹¹MON 88017 に属する系統である MON88017-A 及び MON88017-B(以下 017-A 及び 017-B と称する)並びにその対照系統として Cont-A 及び Cont-B を供試して 2002 年に日本モンサント河内研究農場にて隔離ほ場試験を行った。017-A 及び 017-B は p20 の図 3 の系統図に示すように、同じ MON 88017 の初代(R0)から異なる育種過程によって作出された交配後代系統である。対照系統である Cont-A 及び Cont-B は 017-A 及び 017-B と遺伝的な背景が同等となるように交配された非組換えトウモロコシの交配後代系統である。

¹¹ 本項目中の以下に続く①~⑦に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

MON810 に属する系統である MON810AX 及び MON810BX、並びにその対照系統として MON810AC 及び MON810BC を供試して、1996 年及び 2001～2002 年に農業環境技術研究所にて隔離ほ場試験を行った。MON810AX 及び MON810BX は p22 の図 4 の系統図に示すように、同じ MON 810 の初代(R0)から異なる育種過程によって作出された交配後代系統である。対照系統である MON810AC 及び MON810BC は、MON810AX 及び MON810BX と遺伝的な背景が同等となるように交配された非組換えトウモロコシの交配後代系統である。

① 形態及び生育の特性

MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、発芽揃い、発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草姿または草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、収穫期の植物重の評価を行ったが、稈長を除く全ての項目で統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p30 の表 2-1 及び p31 の表 2-2)。稈長において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の稈長の平均値は 226.9 cm、Cont-B は 233.4 cm だった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p31 の表 2-2)。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p30 の表 2-1)。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、発芽率、発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、成熟期、草型、分けつ数、雌穂総数、有効雌穂数、稈長、着雌穂高、収穫時の生体重の評価を行ったが、稈長を除く全ての項目で対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p32 の表 2、別添資料 3 の p15～19)。稈長において組換えトウモロコシ MON810BX と対照の非組換えトウモロコシ MON810BC の間で統計学的有意差が認められ、MON810BX の稈長の平均値は 248.1cm、MON810BC は 229.3cm であった (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。一方、組換えトウモロコシ MON810AX と対照の非組換えトウモロコシ MON810AC の間で統計学的有意差は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。

② 生育初期における低温又は高温耐性

MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシの幼苗の低温耐性(5°C)を評価したが、24 日後にはほぼすべての個体が枯死し、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で低温耐性に差異は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p42 の表 4)。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシの幼苗の低温耐性(最高気温 12~14℃、最低気温 2℃) を評価したが、すべての展開葉が低温処理開始後 21 日目に萎凋症状を示し、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間で低温耐性に差異は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p20)。

③ 成体の越冬性又は越夏性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、結実後、冬季には通常自然に枯死する。再成長して栄養繁殖したり、種子を生産することはない。実際に親系統である MON 88017 及び MON 810 及びそれぞれの対照の非組換えトウモロコシにおいて、隔離ほ場試験の試験終了時には結実後の枯死が始まっている事を観察した。以上のことから、成体の越冬性試験は行わなかった。

④ 花粉の稔性及びサイズ

MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性(充実度)と花粉の大きさをヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p38 の表 3 及び p39~40 の写真)。

MON 810 と対照の非組換えトウモロコシの花粉の稔性(充実度)と花粉の大きさを 0.1% ニュートラルレッド溶液及びヨウ素ヨウ化カリウム溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、MON810 と対照の非組換えトウモロコシの間に差異は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p20~23)。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

MON 88017 の種子の生産量としては、きょうだい交配して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重、粒形を調査したが、雌穂径を除く全ての項目において、MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p30 の表 2-1 及び p31 の表 2-2)。雌穂径において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の雌穂径の平均値は 44.0 mm、Cont-B は 45.7 mm だった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p31 の表 2-2)。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p30 の表 2-1)。

MON 810 の種子の生産量としては、きょうだい交配して収穫した雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、1 列粒数、100 粒重を調査したが、全ての項目において、MON 810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 2 の p32 の表 3、別添資料 3 の p17 ~19 の第 6~10 表、p20 の(3))。

脱粒性について、MON 88017、MON 810 とそれらの対照の非組換え体は共に、収穫時雌穂は苞皮に覆われており、自然条件での脱粒性は観察されなかった。

MON 88017 の収穫種子を播種して 10 日後の発芽率において、MON 810 の収穫種子を播種して 4 日後の発芽率において、それぞれ組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差はなく、種子の休眠性は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p42 の表 4、MON 810 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p20)。

⑥ 交雑率

日本には交雑可能な近縁野生種は生育していないため、親系統である MON 88017、MON 810 では交雑率の試験は行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、土壌微生物相試験、後作試験、鋤き込み試験を行ったが、鋤き込み試験における検定植物ハツカダイコンの生体重を除く全ての項目で MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p44~45)。鋤き込み試験における検定植物ハツカダイコンの生体重において組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A との間で統計学的有意差が認められ、017-A の生体重平均値は 7.17 g、Cont-A は 8.38 g だった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p47 の表 7)。しかし、017-A と同時に隔離ほ場試験に供試していた組換えトウモロコシ 001-A、012-A では、鋤き込み試験におけるハツカダイコンの生体重に統計学的有意差は認められず、また、鋤き込み試験におけるハツカダイコンの発芽率や後作試験・土壌微生物相試験では 017-A と Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p44 の表 5、p45 の表 6、p47 の表 7)。

MON810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で、鋤き込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行ったが、全ての項目で統計学的有意差は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p26 の第 13-1~13-2 表、p28 の第 14 表、p29 の第 15 表、p42 の表 5、表 6)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

—

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

—

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

—

(6) 国外における使用等に関する情報

米国では、**B.t.**蛋白質に対して抵抗性を示す害虫の発生を防止する目的で、**B.t.**蛋白質を発現する遺伝子組換えトウモロコシを栽培する際には緩衝区を設定している。本スタック系統トウモロコシの栽培時には、**B.t.**蛋白質に対して抵抗性を示す害虫の発生を防止する目的で **B.t.**蛋白質を生成しないトウモロコシ品種を栽培する緩衝区を、栽培区の一部に設定して栽培する予定である。

尚、MON88017 及び MON810 のわが国における認可状況は以下の通りである。

【MON88017】

2003年4月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。

2004年8月 農林水産省及び環境省より遺伝子組み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(食用または飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為について)の審査を終了した。

【MON810】

- 1996年10月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。
- 1997年5月 厚生労働省(当時厚生省)より「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」に基づき、食品利用としての安全性認可を受けた。
- 1997年6月 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針6の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 2001年3月 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の手続」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2003年3月 農林水産省より「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2003年4月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本での栽培について、指針への適合性が確認された。
- 2004年6月 農林水産省及び環境省より遺伝子組み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定の承認を受けた。(食用または飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為について)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価¹²

本スタック系統トウモロコシは、MON 88017 と MON 810 の自殖系統を掛け合わせた交配後代品種であり、MON 88017、MON 810 の特性を併せ持つ。第一の2-(1)-ロ-①で述べたとおり、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質は酵素活性を持たず宿主の代謝系とは独立して機能するとともに、相互に影響しあう可能性は極めて低いと考えられる。また、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝系には影響を及ぼさないことから、本スタック系統トウモロコシではこれら3つの蛋白質が相互に作用することはないと考えられる。本スタック系統のコウチュウ目害虫抵抗性は親系統である MON 88017 と、チョウ目害虫抵抗性は親系統である MON 810 と同程度であることが、それぞれ生物検定により確認されている。従って、本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価は、MON 88017、MON 810 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

トウモロコシは日本に導入された1579年以来、長期間の使用経験があり、これまでトウモロコシが自然環境下で自生した例は報告されていない。

本スタック系統トウモロコシの親系統である MON 88107、MON 810 において、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、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、発芽率、休眠性及び脱粒性(第一、2-(6)、ロ、①～⑤))を比較検討した。その結果、MON 88017 における稈長及び雌穂径と MON 810 における稈長を除く全ての項目で対照の非組換えトウモロコシとの間で、差異は認められなかった。

MON 88017 の稈長及び雌穂径において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められた。稈長において組換えトウモロコシ 017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の稈長の平均値は 226.9 cm、Cont-B は 233.4 cm だった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p31 の表 2-2)。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった(別添資料 3 の p30 の表 2-1)。雌穂径において組換えトウモロコシ

¹² 本項目中で、第一の2-(6)の①～⑦に記載された試験結果に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。また、本項目の2.(2)の第二パラグラフ及び第三パラグラフに記載された生物検定の結果に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

017-B と対照の非組換えトウモロコシ Cont-B の間で統計学的有意差が認められ、017-B の雌穂径の平均値は 44.0 mm、Cont-B は 45.7 mm だった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p31 の表 2-2)。一方、組換えトウモロコシ 017-A と対照の非組換えトウモロコシ Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p30 の表 2-1)。しかし、稈長及び雌穂径以外の競合における優位性に関わる諸形質では MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差異は認められなかったことから、これらの形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

稈長において組換えトウモロコシ MON810BX と対照の非組換えトウモロコシ MON810BC の間で統計学的有意差が認められ、MON810BX の稈長の平均値は 248.1cm、MON810BC は 229.3cm であった (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。一方、組換えトウモロコシ MON810AX と対照の非組換えトウモロコシ MON810AC との間で統計学的有意差は認められなかった (MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p17 の第 4 表)。しかし、稈長以外の競合における優位性に関わる諸形質では MON 810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差異は認められなかったことから、この形質によって競合における優位性が高まるとは考えにくい。

本スタック系統トウモロコシは除草剤グリホサート耐性を有するが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート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。

本スタック系統トウモロコシはコウチュウ目害虫抵抗性及びチョウ目害虫抵抗性を有しているため、同種間では競合における優位性がある程度高まることが予想される。しかし、人の手助けがないと繁殖できない栽培作物であるトウモロコシが、本形質が付与されたことによって自然条件下で自生化し、自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競合における優位性を持つとは考えられない。

以上のように、本スタック系統トウモロコシの親系統である MON 88017 では稈長及び雌穂径、MON 810 では稈長において対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められた。しかし、これらの差異は競合における優位性を高めるほどの差異ではないと判断されている。また、第一の 2-(6)で述べたとおり、本スタック系統トウモロコシ中で発現する改変型 CP4 EPSPS 蛋白質、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質は、それぞれ独立して作用していると考えられた。従って、親系統である MON 88017 と MON 810 を従来の交雑育種法により作出された本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの間に競合における優位性にかかわる差異が認められる可能性は極めて低いと判断された。

また本スタック系統トウモロコシにおいては、除草剤グリホサート耐性、コウチュウ目害虫抵抗性、チョウ目害虫抵抗性を併せ持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、また第一の2-(6)で述べたとおり、それぞれの形質は互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはないと判断された。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシにおいても、競合における優位性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(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

以上から、本スタック系統トウモロコシは、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。

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

トウモロコシは日本に導入された1579年以来、長期間の使用経験があり、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生性は報告されていない。

本スタック系統トウモロコシの親系統であるMON 88017、MON 810について、有害物質の産生性の有無を、鋤き込み、後作、土壌微生物相試験(第一、2-(6),ロ,⑦)を行い比較検討した。その結果、MON 88017の鋤き込み試験において、組換えトウモロコシ017-Aとその対照である非組換えトウモロコシ系統Cont-Aの間でハツカダイコンの生体重に統計学的有意差が認められ、017-Aで7.17g、Cont-Aで8.38gであった(MON 88017の生物多様性影響評価書別添資料3のp46の表7)。017-Aと同時に隔離ほ場試験に供試していた組換えトウモロコシ001-A、012-Aでは、鋤き込み試験におけるハツカダイコンの生体重に統計学的有意差は認められ

なかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p44 の表 7)。また、鋤き込み試験におけるハツカダイコンの発芽率、後作試験及び土壌微生物相試験では 017-A と Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p44 の表 5、p45 の表 6、p47 の表 7)。

以上のことから、組換えトウモロコシ 017-A において有害物質の産生性が高まっているとは考えにくい。

また、MON 810 の有害物質産生性の有無に関わる試験においてはいずれの試験においても組換えトウモロコシ MON 810 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差異は認められなかった(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p26 の第 13-1～13-2 表、p28 の第 14 表、p29 の第 15 表、p42 の表 5、表 6)。

MON 88017 は除草剤グリホサートに耐性を持つ改変型 CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、p12 に示したように、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、MON 88017 中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

【コウチュウ目害虫抵抗性を付与する改変型 Cry3Bb1 蛋白質の影響を受ける可能性のある野生動植物の特定】

また、MON 88017 には改変型 Cry3Bb1 蛋白質の発現によってトウモロコシの根を食害する主要コウチュウ目害虫である CRW に対する抵抗性が付与されているため、影響を受ける野生動植物としては、改変型 Cry3Bb1 蛋白質に対して感受性を示す標的害虫と同属近縁種のコウチュウ目昆虫であると考えられた。これまでのところ、Cry3Bb1 蛋白質はコウチュウ目昆虫種の中でハムシ科の 2 属 (*Leptinotarsa*、*Diabrotica*)に分類される CPB と CRW に殺虫活性を示すが、その他の昆虫に殺虫活性を示すことは確認されておらず(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p100～p172、この部分の要約は別添資料 3 の p52～54 に記載)、殺虫スペクトラムが極めて狭いことが示されている(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p54 の表 10)。なお、これまでのところ、CPB、CRW 及びそれらと同属の近縁種はわが国に生息しているという報告はないことが文献調査

により示された(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p54 の表 10)。ただし、未調査のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す可能性もあることから、以下の検討を行った。

標的及び非標的生物が改変型 Cry3Bb1 蛋白質の影響を受ける経路としては、①トウモロコシの生育期に植物体を直接摂食する可能性、②トウモロコシの花粉飛散により影響を受ける可能性、並びに③刈り取られた後に土壤中に鋤き込まれたトウモロコシの植物体を摂食する可能性が考えられた。

①のトウモロコシの植物体の摂食を通じて影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫としては、スジコガネ、ヒメコガネ、マルクビクシコメツキ等の害虫としてリストアップされているもの(文献 63)のみが考えられるため、植物体の摂食を通じた影響については、ここでは以下の評価の対象とはしないこととする。

②に関しては、「環境省レッドリスト(日本の絶滅のおそれのある野生生物)」の 2000 年改訂版に記載された絶滅危惧及び準絶滅危惧に区分されているコウチュウ目種について、本組換えトウモロコシの花粉飛散により影響を受ける可能性があるかを、それぞれの種の食性・生息場所・行動習性・分布地域等から調査した。その結果、環境省レッドリスト記載種の中には、MON 88017 の花粉飛散によって、生息に影響を受ける可能性のあるコウチュウ目昆虫は存在しないと判定された。

更に、環境省レッドリスト記載種以外に、地域的に重要と見なされているコウチュウ目昆虫を「昆虫類の多様性保護のための重要地域(日本昆虫学会自然保護委員会編集)」第 1 集(1999)、第 2 集(2000)、第 3 集(2002)からリストアップし、レッドリストの場合と同様に、それぞれの種について、食性・生息場所・行動習性・分布地域等から、本組換えトウモロコシの花粉による影響を受ける可能性があるかを調査した。その結果、オオヨモギハムシ・ハナウドゾウムシ・ヤマトアザミテントウの 3 種の幼虫が地上部の葉を摂食し、食草もトウモロコシ栽培地の周辺にも分布しているため、飛散花粉量の程度及び昆虫種の感受性によっては、何らかの影響をうける可能性がある昆虫種として特定された。尚、一般的に第 1 齢から第 2 齢幼虫までが *B.t.* 蛋白質に対して感受性を示し、それ以降は非感受性になるため、本文献調査では幼虫のみを対象として行った。

また、③の土壤中に鋤き込まれた植物体を摂食する可能性についても検討した。その結果、「環境省レッドデータブック 2000 年改訂版」に記載されている 84 種(絶滅危惧種 I 類 27 種、絶滅危惧種 II 類 20 種、準絶滅危惧 37 種)のコウチュウ目昆虫の生息場所は山地・湿地・湿原、河川・湖沼等であった。このことからレッドリストに記載されたコウチュウ目昆虫が、トウモロコシ畑内及び畑周辺に生息し、畑土壤中に鋤き込まれたトウモロコシの植物体を摂食する可能性は低いと考

えられた。したがって、MON 88017 の植物体を摂食することによる影響を受ける可能性がある種は特定されなかった。

尚、土壌中に生息している可能性のあるコウチュウ目昆虫種(オサムシ科、ヒメマキムシ科、ケシキスイムシ科、コガネムシ科、ハネカクシ科)に対して、改変型 Cry3Bb1 蛋白質が影響を及ぼさないことが米国モンサント社におけるほ場試験で確認されている(文献 64)。

【チョウ目害虫抵抗性を付与する Cry1Ab 蛋白質の影響を受ける可能性のある野生動植物の特定】

MON810 には Cry1Ab 蛋白質の発現によってトウモロコシのチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されているため、MON810 の植物体を摂食することにより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ているが、これらはトウモロコシの害虫であるので、ここでは対象としていない。一方、MON810 から飛散した花粉により影響を受ける野生動植物等としては、MON810 の花粉が幼虫の食餌植物と共に摂食され、幼虫が影響を受ける可能性のある、わが国に生息するチョウ目昆虫があげられた。

「環境省レッドリスト(2000年改訂版)」を用いて、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ栽培の影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧及び準絶滅危惧に区分されているチョウ目昆虫の特定を行った。1)幼虫の活動期(摂食期)と本遺伝子組換えトウモロコシの開花期の関係、2)幼虫の食餌植物と花粉の接触の可能性、の2点から絞込みを行い、ヒメシロチョウ (*Leptidea amurensis*)、ツマグロキチョウ (*Eurema laeta betheseba*)、シルビアシジミ (*Zizina otis emelina*)、ミヤマシジミ (*Lycaeides argyrognomon*)、ヒヨウモンモドキ (*Melitaea scotosia*)、ウスイロヒヨウモンモドキ (*Melitaea regama*)、コヒヨウモンモドキ (*Mellicta ambigua nippona*)、ヒメヒカゲ (2 亜種) (*Coenonympha oedippus arothius* 及び *Coenonympha oedippus annulifer*)、ウラナミジャノメ (*Ypthima motschulskyi nipponica*)、ミツモンケンモン (*Cymatophoropsis trimaculata*)の 11 種(2 亜種を含む)を特定した。

【本スタック系統トウモロコシの影響を受ける可能性のある野生動植物の特定】

本スタック系統トウモロコシは改変型 Cry3Bb1 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質を発現することから、影響を受ける可能性のある野生動植物としては、親系統である MON 88017 と MON 810 の生物多様性影響評価書で特定された種と同じであると考えられる。

よって、本スタック系統トウモロコシの花粉の飛散により何らかの影響を受ける可能性がある種としては、MON 88017 で特定されたコウチュウ目昆虫 3 種及び MON 810 で特定されたチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)の計 13 種(2 亜種を含む)が挙げられた。

(2) 影響の具体的内容の評価

表 5(p31) のポット試験による生物検定の結果では、本スタック系統トウモロコシの corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*)に対する殺虫活性は、MON 88017 の交配後代品種と同程度だった。また、表 6(p31)に示したように、本スタック系統トウモロコシのアワノメイガに対する殺虫活性は、MON810 の交配後代品種と同程度だった。従って、本スタック系統トウモロコシの花粉飛散による非標的昆虫への影響は、MON 88017 並びに MON 810 の花粉による生物検定の結果より評価した。

MON 88017 と対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫 Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*)の孵化後 24 時間以内の幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、有意な差が 4,000 粒/cm² の花粉密度で認められた(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p83 の Table 3)。しかし、2,000 粒/cm² の花粉密度でも死亡率が比較的高い数値であったため、日本に生息するコウチュウ目昆虫に対する影響を評価する際の指標値は 2,000 粒/cm² とした。

MON 810 と対照の非組換えトウモロコシの花粉を生物検定用昆虫ヤマトシジミ (*Zizeeria maha argia*)の 1 齢幼虫に摂食させて生存率を比較したところ、MON810 の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率と対照に非組換え体の花粉を摂食したヤマトシジミの生存率との間で、有意な差が 2,000 及び 4,000 粒/cm² の花粉密度で認められた(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p32~34)。

(3) 影響の生じやすさの評価

MON 88017 並びに MON 810 とそれらの対照の非組換えトウモロコシ間で、花粉飛散に影響を与える要因である花粉の量、形状及びサイズについて比較した結果、統計学的有意差は認められなかった(MON 88017 の生物多様性影響評価書別添資料 3 の p38~40、MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 3 の p20~23)。

MON 88017 及び MON 810 について、Colorado potato beetle とヤマトシジミの生存率に影響の出た花粉密度 2,000 及び 4,000 粒/cm² となるほ場からの距離を推定したところ、4,000 粒/cm² の濃度で堆積するのは最大 10m、2,000 粒/cm² の濃度で堆積するのは最大 20m となった(文献 65)。

MON 88017 と MON810 の影響を受ける可能性のある野生動植物として前述のコウチュウ目昆虫 3 種並びにチョウ目 11 種(2 亜種を含む)が特定された。表 7(p45)にこれらの幼虫の食餌植物と食餌植物の主な生育場所をまとめた(MON810 の生物多様性影響評価書の別添資料 5 の p74~78、文献 66)。こうした食餌植物は野原、山地など広範な地域で生育している。

これまで、運搬等においてこぼれ落ちたトウモロコシが畑以外で生育したという報告はない。仮に生育したとしても、その個体数は、ほ場で栽培されるトウモロコシと比較して極めて少ないために、その花粉飛散が非標的コウチュウ目昆虫や非標的チョウ目昆虫に及ぼす影響は無視できるものと考えられた。また、前述のコウチュウ目昆虫 3 種とチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)はこぼれ落ちの想定される畜舎や道路を主な生息域としていない。さらに、今回未調査であるその他のコウチュウ目及びチョウ目昆虫に関しても同様に、これらの昆虫がトウモロコシが栽培されているほ場やその近辺のみに生息しているとは考えにくいことから、個体群で影響を受ける可能性はきわめて低いと判断された。

尚、以下に挙げる試験報告では MON 863 の改変 Cry3Bb1 蛋白質が用いられているが、MON 863 と MON 88017 中でそれぞれ発現する改変型 Cry3Bb1 蛋白質の標的昆虫に対する殺虫活性は同等であることが確認されている(文献 67)。

また、実際にはほ場中で Cry3Bb1 蛋白質が殺虫活性を維持したまま蓄積しているかを調べたところ、改変型 Cry3Bb1 蛋白質を発現するトウモロコシを 3 年間にわたって継続的に栽培した土壌から改変型 Cry3Bb1 蛋白質は検出されなかった(文献 68)。また、土壌中に鋤き込んだ植物体中での改変型 Cry3Bb1 蛋白質の半減期は 1.8~2.3 日と比較的短いことも報告されている(文献 69)。以上のことから、土壌中に生息するコウチュウ目昆虫の幼虫が鋤き込まれた MON 88017 の植物体を

摂食したとしても、影響を受ける可能性は低いと考えられた。

さらに、コウチュウ目昆虫以外の土壌中の生物(ダニ、トビムシ)の数が、改変型 Cry3Bb1 蛋白質を発現するトウモロコシを栽培した土壌と対照の非組換え体を栽培した土壌とで差は認められなかったことから(文献 68)、コウチュウ目昆虫以外で土壌中に生息する生物相に対しても、MON 88017 は影響を与える可能性は低いと考えられた。

尚、MON 88017、MON 810 について、今後の育種により今回試験に用いた系統とは花粉の飛散時期、飛散量が異なる系統が育成される可能性があるが、花粉を用いた生物検定においては *B.t.*蛋白質に対して最も感受性の高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常的气象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、品種・系統が異なっても今回想定した影響を大きく超えるようなことはないと考えられる。

表 7 非標的昆虫が食餌する植物の生育場所

	食餌植物	食餌植物の主な生育場所	
1	ヒメシロチョウ	ツルフジバカマ	山野の草原、道ばた、海岸の林縁
2	ツماغロキチョウ	カワラケツメイ	川原、土手、道ばたの草地
3	シルビアンシジミ	ミヤコグサ、ヤハズソウ、コマツナギ	野原、道ばた、鉄道線路、土手、海岸
4	ミヤマシジミ	コマツナギ	野原、土手、海岸
5	ヒョウモンモドキ	タムラソウ、ノアザミ、ノハラアザミ、キセルアザミ	山野、草原、湿地
6	ウスイロヒョウモンモドキ	オミナエシ、カノコソウ	山地の草地及び湿地
7	コヒョウモンモドキ	クガイソウ	山地の草地
8	ヒメヒカゲ(2亜種)	ヒカゲスゲ、ヒメカンスゲ、アオスゲ、ススキ	疎林地、林地、草原、
9	ウラナミジャノメ	カヤツリグサ科、イネ科	草地、林地、海岸
10	ミツモンケン	クロツバラ、クロウメモドキ	山地、高原
11	オオヨモギハムシ	フキ類	山地の道端
		ヒヨドリバナ類	山地、湿地、川原
12	ハナウドゾウムシ	ハナウド類	山地
13	ヤマトアザミテントウ	アザミ類	草地、林地、湿地、海岸、川原
		ナス科(野生種)	山地、道端、草地、湿地、林地、畑地
		バレイシヨ	畑地
	参考文献：	文献69	
		文献70	

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

MON 88017 並びに MON810 の花粉が影響する範囲は、トウモロコシほ場周辺の 20m 以内と推定された。本来自然生態系に生息している非標的コウチュウ目昆虫種及び非標的チョウ目昆虫種がトウモロコシほ場の近辺に主に生息しているわけではないことから、個体群レベルで花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと結論された。

以上から、本スタック系統トウモロコシの親系統である MON 88017、MON810 はそれぞれ有害物質の産生性に起因して生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

さらに、MON 88017 と MON810 の花粉による生物検定では感受性の最も高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、遺伝的背景の差異や掛け合わせによる雑種強勢による花粉飛散時期や飛散量の変動があつたとしても、想定した影響を大きく超えることはないと考えられる。尚、親系統の有する導入遺伝子はそれぞれ独立に機能し、その産物は相互作用することはないため、本スタック系統トウモロコシにおいて導入遺伝子により従来 of 交配によって起きる雑種強勢に影響を与えることはないと判断された。

以上のことから、本スタック系統トウモロコシが非標的コウチュウ目昆虫及びチョウ目昆虫へ影響を及ぼす可能性は親系統である MON 88017 及び MON810 と同様に極めて低いと考えられる。

従って、本スタック系統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。

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

トウモロコシの近縁種は *Tripsacum* 属と *Zea* 属に分類されるテオシントであるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。我が国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因して、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

4 その他

生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる本組換えトウモロコシの性質は、上記の他にはないと判断された。

第三 生物多様性影響評価の総合的評価

本スタック系統トウモロコシは、MON 88017 の自殖系統と MON810 の自殖系統を掛け合わせた交配後代品種であり、MON 88017、MON810 の特性を併せ持つ。第一の 2-(6)で述べたとおり、本スタック系統トウモロコシにおける改変型 CP4 EPSPS 蛋白質、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質が相互に作用することは考えにくい。従って、親系統である MON 88017、MON810 の生物多様性影響の評価の結果を用いて本スタック系統トウモロコシの生物多様性影響の評価を行った。

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシは、わが国において長期間の使用経験がある。また、本スタック系統トウモロコシの親である MON 88017、MON810 とそれらの対照である非組換えトウモロコシとの間で競合における優位性に関わる諸形質を比較検討した。その結果、MON 88017 における稈長及び雌穂径と、MON810 における稈長で統計学的有意差が認められた。しかし、これらの差異は競合における優位性を高めるほどの差異でもないと判断されている。また、第一の 2-(6)で述べたとおり、本スタック系統トウモロコシ中で発現する改変型 CP4 EPSPS 蛋白質、改変型 Cry3Bb1 蛋白質、Cry1Ab 蛋白質は、それぞれ独立して作用すると考えられた。従って、親系統である MON 88017 と MON 810 を従来の交雑育種法を用いて交配させることにより作出された本スタック系統トウモロコシと宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシとの間に競合における優位性にかかわる差異が認められる可能性は極めて低いと判断された。

また、本スタック系統トウモロコシは、除草剤グリホサート耐性、コウチュウ目害虫抵抗性、チョウ目害虫抵抗性を併せ持つが、これらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、また第一の 2-(6)で述べたとおり、それぞれの形質が互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはないと判断された。

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

MON 88017、MON 810 において有害物質の産生性の有無を、鋤き込み試験、後作試験、土壤微生物相試験で評価した。その結果、MON 88017 の鋤き込み試験において組換えトウモロコシ 017-A とその対照である非組換えトウモロコシ Cont-A との間でハツカダイコンの生体重に統計学的有意差が認められた。しかし、017-A と同時に隔離ほ場試験に供試した組換えトウモロコシ 001-A、012-A では鋤き込み試験におけるハツカダイコンの生体重に統計学的有意差は認められず、また、鋤き込み試験におけるハツカダイコンの発芽率、後作試験及び土壤微生物相試験では 017-A と Cont-A の間で統計学的有意差は認められなかった。

また、わが国において、MON 88017 と MON810 の花粉の飛散により生息もしくは生育に影響を受ける可能性のある野生動植物として特定されたコウチュウ目昆虫 3 種とチョウ目昆虫 11 種(2 亜種を含む)への影響を調べたが、MON 88017 と MON810 の花粉が影響する範囲は、トウモロコシほ場周辺の 20m 以内と推定された。非標的コウチュウ目昆虫と非標的チョウ目昆虫がトウモロコシほ場近辺に主に生息しているわけではないことから、個体群レベルで花粉による影響を受ける可能性は極めて低いと結論された。

以上から、MON 88017 並びに MON810 が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。さらに、花粉による生物検定では感受性の最も高い生育段階の幼虫を用いて試験を行っており、花粉飛散距離も通常の気象条件下で考えうる最大限の距離を考慮していることから、遺伝的背景の差異による花粉飛散時期や飛散量の変動があったとしても、想定した影響を大きく超えることはないと判断された。また、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質の植物における発現が、植物の持つ代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、新たな有害物質を産生するとは考えられない。以上のことから、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。

わが国ではトウモロコシの近縁種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されておらず、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、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に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

【引用文献】

社外秘につき非開示

緊急措置計画書 (栽培目的の場合)

平成16年10月19日

氏名 日本モンサント株式会社
 代表取締役社長 山根 精一郎 印
 住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cp4 epsps, cry3Bb1, cry1Ab, Zea mays subsp. mays (L.)* Ittis)(MON 88017×MON 810, OECD UI: MON-88Ø17-3×MON-ØØ81Ø-6)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、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は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、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とは、本スタック系統トウモロコシに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

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は以下に示す通りである。

平成 16 年 10 月現在

社内委員	
*	日本モンサント (株) 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント (株) 農薬規制・環境部
	日本モンサント (株) 河内研究農場
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

生物多様性影響に関して必要に応じて生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

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

具体的措置として、特定された問題に応じ、本スタック系統トウモロコシの環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシがあった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。

緊急措置計画書 (食用・飼料用に供する場合)

平成16年10月19日

氏名 日本モンサント株式会社
 代表取締役社長 山根 精一郎 印
 住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cp4 epsps, cry3Bb1, cry1Ab, Zea mays subsp. mays (L.) Itis*)(MON 88017×MON 810, OECD UI: MON-88Ø17-3×MON-ØØ81Ø-6)(以下、「本スタック系統トウモロコシ」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可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、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は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、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とは、本スタック系統トウモロコシに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

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は以下に示す通りである。

平成 16 年 10 月現在

社内委員	
*	日本モンサント (株) 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント (株) 農薬規制・環境部
	日本モンサント (株) 河内研究農場
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部
	日本モンサント (株) バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

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

生物多様性影響に関して必要に応じて生産国の生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

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

具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された本スタック系統トウモロコシの環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本スタック系統トウモロコシがあった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること、必要に応じて本スタック系統トウモロコシが日本に輸入されないようにすること等、必要な措置を実行する。

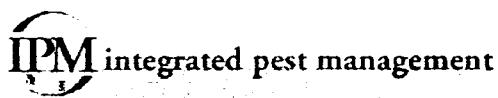
5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。

別添資料一覧

別添資料 1 : チョウ目害虫による食害度の評価方法

別添資料 2 : コウチュウ目害虫による食害度の評価方法

[IPM Site Index](#)

[Educational Materials](#) [FAQs](#) [Video](#) [Decis](#)
[Field Crops](#)
[Fruits](#)
[Vegetables](#)
[Landscape & Turf](#)
[Greenhouse](#)
[Home, Yard & Garden](#)
[Livestock](#)

Insect Management & Insecticide Evaluations, Illinois 2000 Field, Forage, Fruits & Vegetable Crops

The Effectiveness of *Bt*-corn Varieties for the Control of European Corn Borer in Illinois, 2000

John T. Shaw, Kevin L. Steffey, and Michael E. Gray

Summary

A trial was established near the University of Illinois, Champaign, to compare the effectiveness of different *Bt*-corn varieties with their non-*Bt* corn isolines for control of European corn borer. At least 70% of the non-*Bt* plants were injured by corn borers. All *Bt* varieties had significantly less damage and fewer European corn borer larvae than most of the non-*Bt* isolines for all parameters measured. Few differences were observed among *Bt* varieties. However, CBH-351 *Bt* had a significantly higher percentage of plants injured (27.5%) than the other *Bt* hybrids.

Plot Information and Methods

Location	University of Illinois Cruse Farm, Champaign, Illinois.
Plot Size	Four rows ´ 25 ft for each treatment, with 30 plants per row after thinning. Between each of the replications was a 10-ft alley.
Experimental Design	Randomized complete block with four replications.
Planting Dates and Agronomic Factors	Refer to Table 6.1.
Manual Infestation of European Corn Borer Larvae	Manual infestations of European corn borer (ECB) larvae were made to all plants in each of the middle two rows of each four-row plot. Manual infestations to simulate the first-generation were made on July 11 and 12 by applying five egg masses (black-head stage) per plant whorl on each of the two days. Corn plants were in the V6 leaf stage (Ritchie et al. 1993). Manual infestations to simulate the second generation were made to the same plants in the same two rows, at corn anthesis (V18 - VT corn stage, Ritchie et al. 1993). Three egg masses (black-head stage) per plant per day were applied on August 16 and 18.
Post-Infestation Evaluations of Injury Caused by First- and Second-Generation ECB	<p><i>Evaluation of first-generation corn borer injury:</i> On July 31, 10 plants in each of the center two rows that had been manually infested were evaluated using the 0-9 modified Guthrie scale:</p> <ol style="list-style-type: none"> 0. No visible leaf feeding 1. Small amount of pin-hole or fine shot-hole injury on a few leaves 2. Small amount of shot-hole injury on a few leaves

Insect Management and Insecticide Evaluations

- 2000
- 1998
- 1996

Hot Topics

Soybean Aphid Wo.
Download and view powerpoint presentations from workshop....

Google
powered by

Search the IPM Website

	<ol style="list-style-type: none"> 3. Shot-hole injury common on several leaves 4. Several leaves with shot holes and elongated lesions 5. Several leaves with elongated lesions 6. Several leaves with elongated lesions about 2.5 cm long 7. Long lesions common on about one-half of the leaves 8. Long lesions common on about two-thirds of the leaves 9. Most leaves with long lesions <p><i>Evaluations of first- and second-generation corn borer injury:</i></p> <p>On September 9 and 10, five corn plants from each of the middle two rows were split with a corn knife for evaluation. Evaluations of injury to the ear, ear shank, stalk above the ear, and stalk below the ear were recorded separately for each plant. The mean percentages of plants with cavities, mean numbers of cavities per plants, mean lengths of stalk tunneling (cm) per plant and mean numbers of live larvae per plant were recorded.</p>
Weather Information	Refer to Appendix A, Table A.1, Table A.2 and Table A.3.
Statistical Analysis	Data were analyzed with Agriculture Research Manager (ARM) version 6.1.6, from Gylling Data Management, Inc. (GDM). Means were separated by Duncan's New Multiple Range Test (MRT) (P = 0.05).
Results and Discussion	
<p>All plots were examined periodically throughout the growing season for signs of infestation and/or injury caused by insects other than European corn borer. Nothing was found in sufficient quantity to analyze, so the data are not presented.</p> <p>Results from evaluations of first-generation European corn borer injury are presented in Table 6.2. The mean Guthrie ratings for all <i>Bt</i> hybrids were significantly lower than the mean Guthrie ratings for the non-<i>Bt</i> isolines. There were no significant differences in Guthrie ratings among the <i>Bt</i> hybrids tested.</p> <p>The percentages of plants injured by European corn borer larvae are presented in Table 6.3. The mean numbers of larvae, mean numbers of cavities, and mean cavity lengths (cm) per plant are presented in Table 6.3 (whole plant), Table 6.4 (plant below the ear), and Table 6.5 (plant above the ear). The mean numbers of larvae per shank and ear, mean numbers of cavities per shank, and mean percentage of ears injured are presented in Table 6.6.</p> <p>The percentages of non-<i>Bt</i> plants with injury caused by European corn borer larvae indicated that the infestation in our trial was severe; 70 to 100 % of the non-<i>Bt</i> plants were injured (Table 6.3). The percentages of plants injured by corn borer larvae were significantly lower for all <i>Bt</i> hybrids than for all non-<i>Bt</i> isolines. One <i>Bt</i> hybrid (CBH-351) had a significantly higher percentage of injured plants than the other <i>Bt</i> hybrids. All <i>Bt</i> hybrids had significantly fewer cavities per plant than the non-<i>Bt</i> isolines. The mean numbers of larvae per plant were significantly lower in all <i>Bt</i> hybrids than in all but two non-<i>Bt</i> isolines (LEPOTD 11 and CBH-351 non-<i>Bt</i>). There were no significant differences in mean numbers of larvae per plant among the <i>Bt</i> hybrids. The mean cavity lengths per plant were significantly lower in all <i>Bt</i> hybrids than in all but one non-<i>Bt</i> isolate (LEPOTD 11). There were no significant</p>	

differences in mean cavity length per plant among the *Bt* hybrids. Evaluations of the amount of injury below and above the ears are presented in Table 6.4 and Table 6.5, respectively. The mean numbers of larvae per plant and mean numbers of cavities per plant below the ear for all *Bt* hybrids were significantly lower than in all but one non-*Bt* isolate (Y non-*Bt*-larvae; CBH-351 non-*Bt*-cavities) (Table 6.4). There were no significant differences in numbers of larvae or numbers of cavities per plant below the ear among the *Bt* hybrids. The mean cavity lengths per plant below the ear for all *Bt* hybrids were significantly lower than in all but two non-*Bt* isolines (LEPOTD 11 and CBH-351 non-*Bt*) (Table 6.4). There were no significant differences in mean cavity lengths per plant below the ear among the *Bt* hybrids.

The mean numbers of larvae per plant above the ear for all *Bt* hybrids were significantly lower than in all but two non-*Bt* isolines (Y non-*Bt* and CBH-351 non-*Bt*) (Table 6.5). There were no significant differences in numbers of larvae per plant above the ear among the *Bt* hybrids. The mean numbers of cavities per plant above the ear for all *Bt* hybrids were significantly lower than in all but one non-*Bt* isolate (CBH-351 non-*Bt*) (Table 6.5). There were no significant differences in numbers of cavities per plant above the ear among the *Bt* hybrids. The mean cavity lengths per plant above the ear for all *Bt* hybrids were significantly lower than for all non-*Bt* isolines (Table 6.5). There were no significant differences in mean cavity lengths per plant above the ear among the *Bt* hybrids.

Evaluations for numbers of European corn borer larvae and amount of injury to shanks and ears are shown in Table 6.6. There were no larvae, and consequently there was no injury in any of the shanks of the *Bt* hybrids. The numbers of larvae and numbers of cavities in the non-*Bt* isolines were very low. No corn borer larvae were found in any of the ears of the *Bt* hybrids. However, 2.5% of the ears of one *Bt* hybrid (CBH-351 *Bt*) have evidence of injury, although not significantly more than the amount of injury in the other *Bt* hybrids. There were no significant differences in the mean numbers of larvae and mean numbers of cavities per shank, the mean numbers of larvae per ear, and the mean percentages of ears injured among the *Bt* hybrids.

Few stalks were broken either above or below the ears, and no ears were found on the ground at evaluation time. Also, we observed no differences in the amount of stalk rot at the time of evaluation.

Similar to our results from *Bt*-corn efficacy trials in the past, the *Bt*-corn varieties in this year's trial were quite effective in reducing the numbers of European corn borer larvae and the amount of injury they caused to the stalks, shanks, and ears. However, CBH-351 *Bt* had a significantly higher percentage of plants injured (27.5%) than the other *Bt* hybrids.

References Cited	Ritche, S.W., J.J. Hanway, and G.O. Benson. 1993. How a corn plant develops. Special Report No. 48, Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Ames.
-------------------------	---

Table 6.1: Agronomic factors and evaluation dates for the <i>Bt</i>-corn efficacy trial for control of European corn borer Champaign, Illinois, 2000	
Variables	Urbana
Planting date	June 9, 2000
Hybrid	Various <i>Bt</i> and Non- <i>Bt</i> hybrids
Plant population	30 plants per 25 row feet after thinning
Row spacing	30 inches
Soil condition (top 2-3 inches)	Moist
Soil temperature (4-inch level)	68°F
Air temperature	79°F

Wind	0 - 5 mph
Previous crop	Soybeans
Soil insecticide	None
Herbicides	Dual + Atrazine
Infestation Dates	
First Generation	July 11 and 12, 2000 (V6 plant stage)
	5 egg masses per plant per date
Second Generation	August 16 and 18 (Anthesis)
	3 egg masses per plant per date
Evaluation dates:	
Guthrie Rating	July 31, 2000
Stalk splitting	September 9 and 10, 2000

Table 6.2 Guthrie ratings for the *Bt*-corn efficacy trial for control of first-generation European corn borer Champaign, Illinois, 2000

Treatment ¹	Guthrie rating ²	
Cry 1F / TC1507 / M2722	0.01	c
M2722 non- <i>Bt</i> isoline	5.70	a
Y <i>Bt</i>	0.05	c
Y non- <i>Bt</i> isoline	5.60	a
LEPOTD 11 non- <i>Bt</i>	0.55	c
LEPOTD 12	0.00	c
LEPOTD 13	0.05	c
LEPOTD 14	0.00	c
LEPOTD 18	0.15	c
LEPOTD 19 non- <i>Bt</i>	5.95	a
CBH-351 <i>Bt</i>	0.10	c
CBH-351 non- <i>Bt</i> isoline	3.80	b

¹ Cry 1F and its isoline was supplied by Dow AgroSciences; all LEPOTD hybrids were supplied by Monsanto; and the CBH-351 hybrids were supplied by Aventis.

² The modified Guthrie rating scale is explained in the text. Means in a column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05; Duncan's New MRT).

Table 6.3 Mean numbers of larvae, cavities, and cavity length (cm) per plant for the *Bt*-corn efficacy trial for control of first and second-generation European corn borer Champaign, Illinois, 2000^{1,2}

Treatment	% Injured plants	Mean no. of larvae per plant	Mean no. of cavities per plant	Mean cavity length (cm) per plant

Cry 1F / TC1507 / M2722	0.0	e	0.0	c	0.0	d	0.0	e
M2722 non- <i>Bt</i> isoline	92.5	ab	0.8	b	2.3	bc	8.2	bc
Y <i>Bt</i>	2.5	e	0.0	c	0.1	d	0.1	e
Y non- <i>Bt</i> isoline	100.0	a	1.2	b	2.8	b	10.5	b
LEPOTD 11 non- <i>Bt</i>	70.0	c	0.6	bc	1.7	c	3.3	de
LEPOTD 12	5.0	e	0.0	c	0.1	d	0.1	e
LEPOTD 13	2.5	e	0.0	c	0.0	d	0.0	e
LEPOTD 14	2.5	e	0.0	c	0.0	d	0.0	e
LEPOTD 18	0.0	e	0.0	c	0.0	d	0.0	e
LEPOTD 19 non- <i>Bt</i>	96.7	a	2.0	a	4.8	a	15.2	a
CBH-351 <i>Bt</i>	27.5	d	0.1	c	0.3	d	1.0	e
CBH-351 non- <i>Bt</i> isoline	80.0	bc	0.7	bc	1.7	c	5.5	cd
<p>¹ Cry 1F and its isoline was supplied by Dow AgroSciences; all LEPOTD hybrids were supplied by Monsanto; and the CBH-351 hybrids were supplied by Aventis.</p> <p>² Means in a column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05; Duncan's New MRT).</p>								

Table 6.4 Mean numbers of, larvae, cavities, and cavity length (cm) per plant, below the ear for the *Bt*-corn efficacy trial for control of first and second-generation European corn borer Champaign, Illinois, 2000

Treatment ²	Injury below the ear ¹					
	Mean no. of larvae per plant		Mean no. of cavities per plant		Mean cavity length (cm) per plant	
Cry 1F / TC1507 / M2722	0.0	d	0.0	e	0.0	d
M2722 non- <i>Bt</i> isoline	0.5	bc	1.3	c	4.7	b
Y <i>Bt</i>	0.0	d	0.1	e	0.1	c
Y non- <i>Bt</i> isoline	0.9	b	2.1	b	8.0	a
LEPOTD 11 non- <i>Bt</i>	0.1	cd	0.5	de	0.9	c
LEPOTD 12	0.0	d	0.1	e	0.1	c
LEPOTD 13	0.0	d	0.0	e	0.0	c
LEPOTD 14	0.0	d	0.0	e	0.0	c
LEPOTD 18	0.0	d	0.0	e	0.0	c
LEPOTD 19 non- <i>Bt</i>	1.3	a	3.2	a	10.4	a

CBH-351 <i>Bt</i>	0.1	d	0.3	e	0.8	c
CBH-351 non- <i>Bt</i> isoline	0.4	bcd	1.1	cd	3.5	b

¹ Means in a column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05; Duncan's New MRT).
² Cry 1F and its isoline was supplied by Dow AgroSciences; all LEPOTD hybrids were supplied by Monsanto; and the CBH-351 hybrids were supplied by Aventis.

Table 6.5 Mean numbers of larvae, cavities, and cavity length (cm) per plant above the ear for the *Bt*-corn efficacy trial for control of first and second-generation European corn borer Champaign, Illinois, 2000

Treatment ²	Injury above the ear ¹					
	Mean no. of larvae per plant		Mean no. of cavities per plant		Mean cavity length (cm) per plant	
Cry 1F / TC1507 / M2722	0.0	c	0.0	d	0.0	d
M2722 non- <i>Bt</i> isoline	0.3	bc	1.0	bc	3.5	ab
Y <i>Bt</i>	0.0	c	0.0	d	0.0	d
Y non- <i>Bt</i> isoline	0.4	bc	0.7	bc	2.4	bc
LEPOTD 11 non- <i>Bt</i>	0.4	ab	1.1	ab	2.3	bc
LEPOTD 12	0.0	c	0.0	d	0.0	d
LEPOTD 13	0.0	c	0.0	d	0.0	d
LEPOTD 14	0.0	c	0.0	d	0.0	d
LEPOTD 18	0.0	c	0.0	d	0.0	d
LEPOTD 19 non- <i>Bt</i>	0.7	a	1.6	a	4.7	a
CBH-351 <i>Bt</i>	0.0	c	0.1	d	0.1	d
CBH-351 non- <i>Bt</i> isoline	0.2	bc	0.5	cd	2.0	c

¹ Means in a column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05; Duncan's New MRT).
² Cry 1F and its isoline was supplied by Dow AgroSciences; all LEPOTD hybrids were supplied by Monsanto; and the CBH-351 hybrids were supplied by Aventis.

Table 6.6 Mean numbers of larvae and cavities per shank, and mean numbers of larvae per ear and of ears injured percentage for the *Bt*-corn efficacy trial for control of first and second-generation European corn borer Champaign, Illinois, 2000¹

Treatment ²	Mean no. of larvae per shank	Mean no. of cavities per shank	Mean cavity length (cm) per shank	% of ears injured
Cry 1F / TC1507 /				

M2722	0.0	c	0.0	d	0.0	c	0.0	b
M2722 non-Bt isoline	0.2	a	0.3	bc	0.4	a	50.0	a
Y Bt	0.0	c	0.0	d	0.0	c	0.0	b
Y non-Bt isoline	0.3	a	0.5	a	0.3	ab	35.0	a
LEPOTD 11 non-Bt	0.0	bc	0.2	cd	0.2	bc	17.5	b
LEPOTD 12	0.0	c	0.0	d	0.0	c	0.0	b
LEPOTD 13	0.0	c	0.0	d	0.0	c	0.0	b
LEPOTD 14	0.0	c	0.0	d	0.0	c	0.0	b
LEPOTD 18	0.0	c	0.0	d	0.0	c	0.0	b
LEPOTD 19 non-Bt	0.2	a	0.4	ab	0.3	a	43.3	a
CBH-351 Bt	0.0	c	0.0	d	0.0	c	2.5	b
CBH-351 non-Bt isoline	0.2	ab	0.2	bcd	0.2	bc	13.3	b
<p>¹ Means in a column followed by the same letter are not significantly different (P=0.05; Duncan's New MRT).</p> <p>² Cry 1F and its isoline was supplied by Dow AgroSciences; all LEPOTD hybrids were supplied by Monsanto; and the CBH-351 hybrids were supplied by Aventis.</p>								

[Back to Table of Contents](#)



College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences
 Crop Sciences | Entomology
 Natural Resources & Environmental Sciences
 Illinois Natural History Survey

[Home](#) | [Field Crops](#) | [Fruits](#) | [Vegetables](#) | [Landscape & Turf](#) | [Greenhouse](#) | [Home, Yard & Garden](#) | [Livestock](#)
[Insects](#) | [Weeds](#) | [Plant Diseases](#) | [Search IPM](#)
[Contact Us](#)

[Help](#) [Cont](#)

Integrated Pest M
 Copyri
 University of Illinois at Urbana-C

Interactive Node-Injury Scale

The root injury illustrated demonstrates how the Node-Injury Scale quantifies progressive feeding by corn rootworm larvae. The actual sequence of feeding will vary visually depending on a variety of conditions such as planting date, corn variety, degree days, soil moisture, insecticide application and placement, genetically modified roots, soil conditions, etc. The secondary roots (root hairs) are displayed only when no injury is represented; they have been removed to facilitate better viewing of the injury once larval feeding is simulated.

Node-Injury Scale

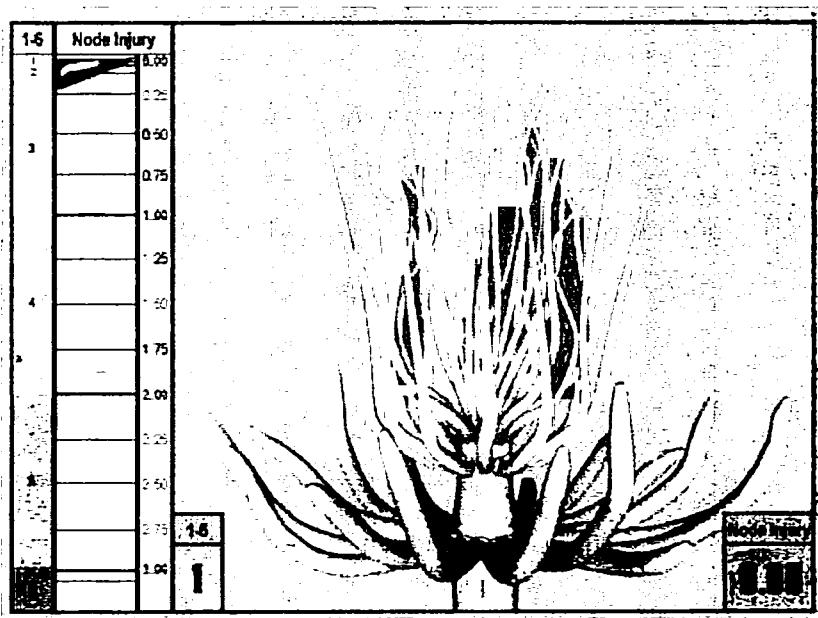
(Oleson, J.D., Y. Park, T.M. Nowatzki, and J.J. Tollefson. 2005. *J. Econ Entomol.* 98(1): 1-8)

Value	Description
0.00	No feeding damage (lowest rating that can be given)
1.00	One node (circle of roots), or the equivalent of an entire node, eaten back to within approximately two inches of the stalk (soil line on the 7th node)
2.00	Two complete nodes eaten
3.00	Three or more nodes eaten (highest rating that can be given)

Damage in between complete nodes eaten is noted as the percentage of the node missing, i.e. 1.50 = 1 1/2 nodes eaten, 0.25 = 1/4 of one node eaten, etc.

1.50

Number of full nodes eaten	Percentage of a node eaten



To use the interactive node-injury scale, click on the image above. The scale will appear in a new window. Once the scale has loaded, use arrow keys for precise movement: up and down to increase/decrease root injury and left and right to rotate the root.

The scale is a large file (9 MB) and requires QuickTime 4 or later.

1-6 "Traditional" Scale

(Hills, T.M. & D.C. Peters. 1971. *J. Econ. Entomol.* 64: 764-765)

1	No damage or only a few minor feeding scars
2	Feeding scars evident, but no roots eaten off to within 1 1/2 inches of the plant
3	Several roots eaten off to within 1 1/2 inches of the plant, but never the equivalent of an entire node of roots destroyed
4	One node of roots completely destroyed
5	Two nodes of roots completely destroyed
6	Three or more nodes of roots destroyed