

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*pat*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (T25 × MON810, OECD UI : ACS-ZM003-2 × 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.....	5
(1) 供与核酸に関する情報.....	6
(2) ベクターに関する情報.....	10
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	12
(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...14	
(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17	
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	17
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	21
(1) 使用等の内容.....	21
(2) 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.....	21
(3) 国外における使用等に関する情報.....	21
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	22
1 競合における優位性.....	22
2 有害物質の産生性.....	23
3 交雑性.....	26
4 その他の性質.....	26
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	27
緊急措置計画書	29

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 8 月 17 日

農林水産大臣 亀井 善之 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名
デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生

申請者

住所
東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号
山王パークタワー

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	除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>pat</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (T25 × MON810, OECD UI : ACS-ZM003-2 × 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1 生物多様性影響の評価に当り収集した情報

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 分類学上の位置付け

和名：イネ科 トウモロコシ属 トウモロコシ

英名：Corn, maize

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

(The International Plant Names Index, 2004)

ロ 宿主の品種名又は系統名

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*pat*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (T25 × MON810, OECD UI : ACS-ZM003-2 × MON-00810-6) (以下、スタック系統 T25 × MON810 と表記) は、従来の一世代雑種育種法を用いて育成された除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (T25, OECD UI : ACS-ZM003-2) (以下、T25 と表記) とチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON810, OECD UI : MON-00810-6) (以下、MON810 と表記) の自殖系統同士を、従来の一世代雑種育種法により交配させた雑種品種である。親系統である T25 の宿主には、デント種トウモロコシに属する組織培養由来系統 He/89 を用い、MON810 の宿主にはデント種トウモロコシ自殖系統 A188 X B73 を用いた。

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

自然環境において、トウモロコシが自生している地域は、国内・国外ともに知られていない。

(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

現在トウモロコシの原産地について決定的な説はないが、一般的には紀元前 5000 年頃の中南米が起源と考えられている。また、植物学的起源についても決定的な説はないが、育種過程で、メキシコ、グアテマラ、ホンジュラス地域で雑草として生育しているテオシント (*teosinte*, *Zea mays* subsp. *mexicana* (Schrader) Iltis) から派生したとする説が有力とされている。1492 年のコロンブスの新大陸発見を機に、ヨーロッパ、アフリカ大陸そしてアジアへと伝播し、現在では広く

栽培され、食品、飼料等として利用されている。

トウモロコシは、我が国においても長い栽培の歴史がある。我が国への伝来は、天正年間（1580年頃）に、ポルトガル人が四国に伝えたのが最初であると言われており、その後、九州や本州でも栽培されるようになった。明治時代に、北海道開拓使によって、近代的品種が米国から輸入されるようになり、現在では、北海道から九州まで、広く栽培されている。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

我が国におけるトウモロコシの主な栽培地域は北海道、岩手県、熊本県、宮崎県等である。栽培面積が最も大きいのは北海道で、全体の約40%を占める。国外においては、米国、中国、ブラジル、ロシア等を中心に、北緯55度から南緯40度に至る広い範囲で栽培されている。

トウモロコシは、米国を代表的な例とする、大規模な機械化された近代的方法から、古くから南米アンデス高地等で行なわれているような伝統的な方法まで、多種多様な方法で栽培されている。

トウモロコシはコメ、コムギと共に世界三大穀物の一つと言われている。2002年の世界総生産量は約6億441万トンである。最大の生産国は米国で、全世界の生産量の38%を占めている。02年の統計によれば、我が国は約1,642万トンのトウモロコシを輸入しており、ほぼ100%がデント種である。輸入量の92%にあたる約1,518万トンが米国からの輸入である。輸入されたトウモロコシは、そのほとんどが、ベルトコンベアでそのまま港に隣接している食品・飼料の加工工場に運ばれる。

トウモロコシは、大きく分けてスイートコーンとデント種トウモロコシに分類することができる。スイートコーンは、生食用及び缶詰用として利用されている。デント種トウモロコシは、大きく分けて飼料用及び加工用として利用されている。2002年に我が国に輸入されたトウモロコシのうち、約1,230万トンが飼料として用いられ、残りが澱粉や油等の原料に加工されている。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシは、温暖で適度な降水量があり、日射量の多い気候に適する。生育最適温度は20～30とされている。気温が10に下がるとほとんど生長せず、生育後期に零下3以下になると枯死する。出穂前後の1ヶ月間は最も水分の消費量が多く、干ばつによる害を受けやすい。

基本的に、どのような土壌でも栽培が可能であるが、肥沃で、透水性、通気性

に優れた土壌を最も好む。最適土壌 pH は 6.0 ~ 6.5 で、pH の調整のために炭酸カルシウムが施肥されている。

□ 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

トウモロコシの雌穂は苞皮で覆われているため、自然に種子が脱粒し、拡散する可能性は極めて低い。

トウモロコシ種子には休眠性はない。発芽の最低温度は 6 ~ 11 で、最高は 42 ~ 43 、最適温度は 33 とされている。上述のように、自然に種子が脱粒する可能性は極めて低く、仮に脱粒した場合でも、土壌中での種子の寿命は短く、翌年の春に発芽する可能性は極めて低い。

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

トウモロコシには、これらの特性は知られていない。

自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無及び近縁野生種との交雑性

トウモロコシは種子繁殖を行ない、98 ~ 99% が他家受粉である。自家不和合性は知られていない。トウモロコシと交雑可能な近縁野生種としては、テオシントが知られているが、我が国には自生していない。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

雄穂あたりの花粉の生産量は、およそ 1,800 万粒と推定されている。花粉は球形で、直径はおよそ 90 ~ 100 μm である。受粉は風媒によって行なわれる。花粉の飛散距離は、最大で 200 ~ 800m とされている。トウモロコシ花粉の堆積密度を調べたいいくつかの研究によれば、トウモロコシの開花期間中、同一方向に絶えず秒速 3m の風が吹き続けたと仮定した時の風下における、最大堆積花粉数の累積値は、ほ場から 10m 離れた場所では約 4,000 粒/ cm^2 と推計され、畑端の約 15,000 粒/ cm^2 の約 1/4 となる。この値は、ほ場からの距離別に堆積する花粉密度の推定最大値で、調査対象地域において、確率的に 20 年に一度の頻度でしか起こり得ないような風速条件下での推定値であり、これ以上の堆積はないという限界値を示している。実際に、野外において花粉の飛散・堆積程度を調べた実験では、Hansen&Obrycki (2000) は葉上に堆積した花粉密度は、ほ場から 3m 離れると最大 35 粒/ cm^2 (累積) になり、Pleasant ら (2001) は 2m 離れると 14.2 粒/ cm^2 になると報告している。さらに、トウモロコシ畑から 10m 離れると、花粉のヒマワリ葉上における堆積密度は、畑内の 81.7 粒/ cm^2 から 0.3 粒/ cm^2 (約 1/272) へと激減することが示されている。

花粉は通常、乾燥、高温に弱く、水分を失うと稔性に影響するため、受精のため

めには、開花後は速やかに受粉する必要がある。晴天の場合、午前 10 時～11 時頃が花粉の放出が最も盛んとなり、午後になると激減する。

トウモロコシの花粉の寿命は、通常 10 分～30 分程度であるが、気温及び湿度の条件が整えば、30 分以上と言われている。

八 有害物質の産生性

自然条件下で、周囲の野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼすような有害物質の産生は知られていない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

親系統である T25 は、ドイツのヘキスト・シェーリング社（現バイエルクロップサイエンス社）によって開発された。一方、MON810 は米国モンサント社によって開発された。スタック系統 T25×MON810 は、従来の一世代雑種育種法を用いて育成された T25 と MON810 の自殖系統同士を、従来の一世代雑種育種法により交配させた雑種品種である。

スタック系統 T25×MON810 は、T25 由来の *pat* 遺伝子によって付与された除草剤グルホシネートに対する耐性並びに MON810 由来の *cry1Ab* 遺伝子によって付与されたチョウ目害虫に対する抵抗性を併せ持つ。

本評価書の作成にあたって、2004 年 11 月 22 日付けで承認された T25 に関する情報及び 2004 年 6 月 1 日付けで承認された MON810 に関する情報については、公開されている生物多様性影響評価検討会における専門の学識経験者の意見及び申請書等の概要に基づいてその概要を記載した。それぞれの生物多様性影響評価検討会における専門の学識経験者の意見及び申請書等の概要が掲載されたウェブサイトは以下のとおりである。

< T25 >

専門の学識経験者の意見

http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/T25sp.pdf

申請書等の概要

http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/T25ap.pdf

< MON810 >

専門の学識経験者の意見

http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/MON810sp.pdf

申請書等の概要

http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/MON810ap.pdf

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

T25 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表 1 に、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表 2(8 ページ)に、それぞれ示した通りである。

表 1 T25 の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来

構成要素	サイズ (kbp)	由来及び機能
<i>Pat</i> 遺伝子発現カセット		
P-35S	0.52	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター領域。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>Pat</i>	0.53	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT 蛋白質) をコードする遺伝子。
<i>T-35S</i>	0.20	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S ターミネーター領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。
その他		
<i>Bla</i>	0.86	<i>E. coli</i> 由来のアンピシリン耐性遺伝子で、細菌中のみで β -ラクタマーゼを発現する。
ori-pUC	0.55	pUC18 の複製起点 (ColE1)。プラスミドの複製を開始させる。

表 2 MON810 の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来

構成要素	サイズ(kbp)	由来及び機能
<i>Cry1Ab</i> 遺伝子発現カセット		
E35S	0.61	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
ZmHsp70 intron	0.80	トウモロコシの熱ショック蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。ZmHsp70 イントロン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。
<i>Cry1Ab</i>	3.46	土壌中に存在する <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>krustaki</i> HD-1 株の <i>Cry1Ab</i> 蛋白質をコードする遺伝子。
NOS 3'	0.26	<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、ポリアダニル化を誘導する。
<i>Cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット (挿入遺伝子の解析の結果、MON810 中には挿入されていない)		
E35S	0.61	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
ZmHsp70 intron	0.8	トウモロコシの熱ショック蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。ZmHsp70 イントロン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。
CTP 2	0.31	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。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
<i>Cp4 epsps</i>	1.4	<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。
NOS 3'	0.26	<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、ポリアダニル化を誘導する。

(次ページに続く)

(前ページからの続き)

構成要素	サイズ(kbp)	由来及び機能
<i>gox</i> 遺伝子発現カセット(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	0.61	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター及び二重エンハンサー領域を持つ。全組織中に恒常的に目的遺伝子を発現させる。
ZmHsp70 intron	0.80	トウモロコシの熱ショック蛋白質 (heat shock protein) 遺伝子のイントロン。ZmHsp70 イントロン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。
CTP 1	0.26	シロイヌナズナの rubisco の small subunit 1A 遺伝子の中で、rubisco 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。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
<i>Gox</i>	1.3	<i>Achromobacter</i> sp. strain LBAA のグリホサート分解酵素 (glyphosate oxidoreductase; <i>gox</i>) に基づいた合成配列。GOX 蛋白質によりグリホサートが分解される。
NOS 3'	0.26	<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。
上記以外の構成要素 (PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 に共通)(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)		
LacZ	0.24	-D-ガラクトシダーゼ又は LacZ 蛋白質の部分的コード配列。基質の Xgal が -D-ガラクトシダーゼによって分解されることにより青色を呈し、大腸菌でのクローニング時の選抜マーカーとして利用される。
ori-pUC	0.65	大腸菌プラスミド pUC 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>	0.79	原核生物のトランスポゾン Tn5 より分離された遺伝子で、ネオマイシンフォスフ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、形質転換の選抜マーカーとして働く。

□ 構成要素の機能

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

T25 及び MON810 の目的遺伝子、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は、表 1(7 ページ)及び表 2(8 ページ)の通りである。

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

a. PAT 蛋白質

PAT 蛋白質(ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)は、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。除草剤グルホシネートは、その活性成分である *L*-グルホシネートにより、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成するグルタミン合成酵素を阻害し、その結果、植物体内にアンモニアが蓄積して植物を枯死させる。PAT 蛋白質は、*L*-グルホシネートをアセチル化し、無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。PAT 蛋白質は、極めて高い基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である *L*-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他の *L*-アミノ酸や、*D*-グルホシネートを基質としないことが報告されている。また、既知のアレルゲン蛋白質との構造相同性は認められていない。

b. Cry1Ab 蛋白質

Cry1Ab 蛋白質をコードする *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* (以下 *B.t.*) subsp. *kurstaki* に由来する。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アワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*) に対する殺虫効果を有する。アワノメイガ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効果を示す。*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 cramboides*), Sugarcane cornstalk borer (*Diatraea saccharalis*), Corn earworm (*Helicoverpa zea*), Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), Stalk borer (*Papaipema nebris*) に対して殺虫効果を

示すことが知られている。これらの内、*O. nubilalis* (ヨーロッパアワノメイガ) と同属の *O. furnacalis* (アワノメイガ) 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。なお、Cry1Ab 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、データベースを用いて比較したところ、既知の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。

スタック系統 T25×MON810 の栽培によって、トウモロコシ栽培におけるチョウ目害虫や雑草に対し効果的な防除を行なうことが可能となり、農家に対して、チョウ目害虫防除のための新たな選択肢及び雑草防除のためのより効果的な選択肢を提供するものと期待されている。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

PAT 蛋白質は極めて高い基質特異性を有し、除草剤グルホシネートの活性成分である *L*-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒するが、他の *L*-アミノ酸や、*D*-グルホシネートを基質としないことが報告されている。また、Cry1Ab 蛋白質は他の Cry 蛋白質と同様に、植物体内で酵素として働くことは報告されていない。

以上、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有すること、Cry1Ab 蛋白質に酵素活性がないと考えられることから、スタック系統 T25×MON810 において、導入遺伝子による宿主の代謝系への影響や相互作用はないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

T25 の作出に用いられたベクターは、大腸菌 (*Escherichia coli*) K12 株由来の pUC18 から作成された pDH51 の 35S プロモーターとターミネーターの間の Sal I 切断位置に合成 *pat* 遺伝子を挿入した、プラスミド pUC/Ac である (12 ページ、図 1)。一方、MON810 の作出に用いられたベクターは、大腸菌プラスミド pUC119 由来のプラスミド PV-ZMBK07 及び PV-ZMGT10 である。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

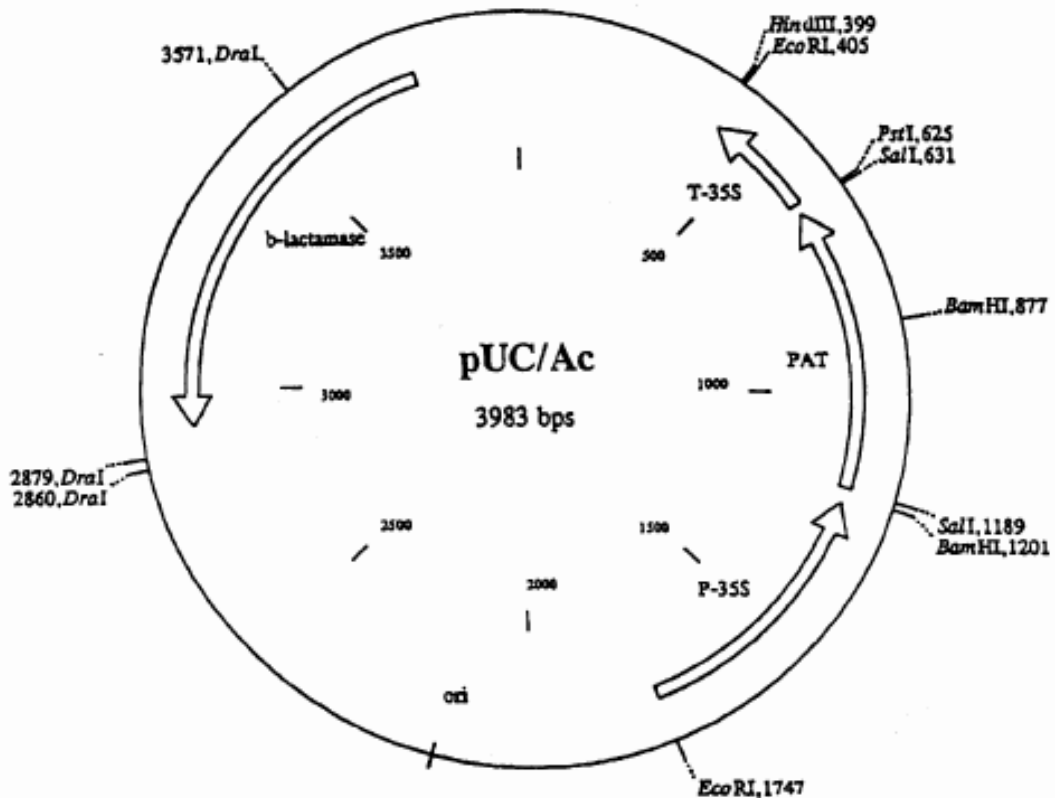


図 1 T25 の作出に用いたプラスミド pUC/Ac

T25 の評価書の概要が掲載されているホームページ、
http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/T25ap.pdf より抜粋した。

T25 の作出に用いられたベクターの塩基数は 3,983bp であり、MON810 の作出に用いられたベクターの塩基数はプラスミド PV-ZMBK07 が 7,794bp、プラスミド PV-ZMGT10 が 9,427bp である。各ベクターの構成要素の塩基配列は明らかにされている。

特定の機能を有する塩基配列の種類

T25 の作出に用いた、プラスミド pUC/Ac に存在するすべての遺伝子は、その特性が明らかにされており、既知の有害な塩基配列を含まない。

MON810 の作出に用いた、プラスミド PV-ZMBK07 及びプラスミド PV-ZMGT10 は、いずれも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。

ベクターの感染性の有無

T25 の作出に用いた、プラスミド pUC/Ac は伝達性を持たないため、感染性はない。また、ベクター pUC18 は、自立増殖可能な宿主域が大腸菌と数種のグラム陰性菌に限られていることが知られている。

MON810 の作出に用いた、プラスミド PV-ZMBK07 及びプラスミド PV-ZMGT10 は、共に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

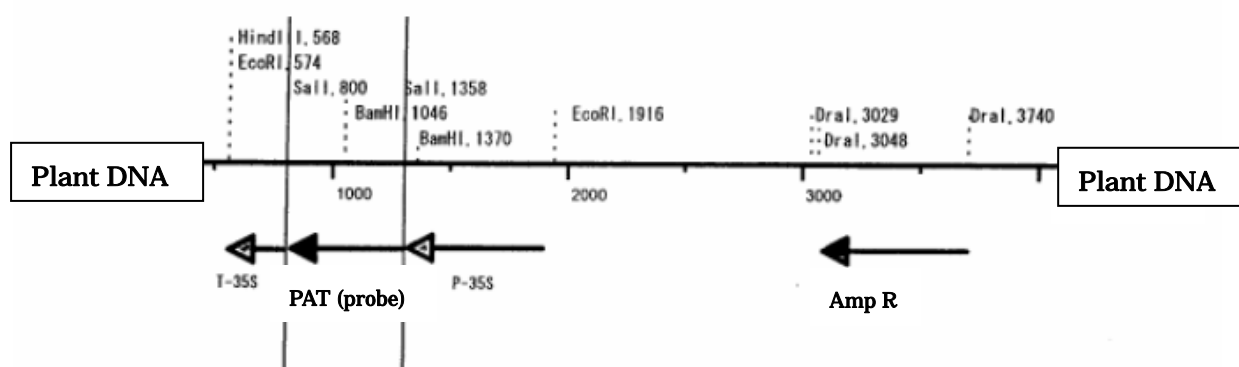


図2 T25 に挿入されている核酸の構成

T25 の生物多様性影響評価書より引用

MON810 の作出には、*nptII* 遺伝子を持つ pUC119 由来のベクターを元に、*cry1Ab* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[*cry1Ab*]-[NOS3']) を連結したプラスミド PV-ZMBK07、並びに *cp4 epsps* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[CTP2]-[*CP4EPSPS*]-[NOS3']) と *gox* 遺伝子カセット ([E35S]-[hsp70 intron]-[CTP1]-[*GOX*]-[NOS3']) 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。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

T25 においては、組織培養由来系統 He/89 のプロトプラストを使い、ポリエチレングリコール法により遺伝子の導入を行なった。

MON810 においては、プラスミド PV-ZMBK07 及びプラスミド 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。

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

T25とMON810の育成の経過はそれぞれの生物多様性影響評価書の記載されたとおりである。即ち、組換え体トウモロコシT25は、黄色デントコーン系の商用品種及びバイエルクロップサイエンス社保有の品種と交配、選抜育種を行なった。また、MON810は、1992年に系統選抜の評価を開始し、1993～1995年にかけてほ場試験を行なって、最終的に優良系統として選抜された。そして、1994年に行なった米国6ヶ所のほ場試験において、MON810系統の形態及び生育特性などについて調査を行なうとともに、Cry1Ab蛋白質の発現及び挿入遺伝子の分析等を行なった。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。

また、本スタック系統T25×MON810の育成経過は表3(15ページ)に示したように、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社によって、従来の一代育種法を用いて育成がなされている。

我が国において、T25は1995年に「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」(以下「指針」)に基づき、開放系における利用計画が指針に適合していることが確認されている。また、2001年に食品として、1997年に飼料としての安全性の確認がなされている(飼料に関しては2003年に審査の法制化に伴って再認可された)。一方、MON810は1996年に開放系における利用計画が指針に適合していることが確認されている。また、2001年に食品として、1997年に飼料としての安全性の確認がなされている(飼料に関しては2003年に審査の法制化に伴って再認可された)。なお、スタック系統T25×MON810については、2002年3月に指針に基づき、開放系における安全性が確認されている。また、2003年6月に食品として、また、2001年12月に飼料としての安全性の確認がなされている。

さらに、2004年2月に施行された「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2項の規程に基づき、T25及びMON810のいずれについても、第一種使用の承認申請が行なわれ、MON810は2004年6月1日に、T25は2004年11月22日に承認され、生物多様性影響評価検討会において、各々第一種使用等を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されている。

表 3 スタック系統 T25 × MON810 の育成過程

トウモロコシ ハイブリッド系統	ハイブリッドに用いた品種
T25 ¹⁾	Inbred A + T25 x Inbred B
MON810 ²⁾	Inbred A x Inbred B + MON810
スタック系統 T25 × MON810 ³⁾	Inbred A + T25 x Inbred B + MON810

- 1) T25 ハイブリッドは Inbred A に除草剤耐性を付与した Inbred A + T25 と Inbred B を伝統的手法で掛け合わせ、種子を得た。
- 2) MON810 ハイブリッドは Inbred B に害虫抵抗性を付与した Inbred B + MON810 と Inbred A を伝統的手法で掛け合わせ、種子を得た。
- 3) スタック系統 T25 × MON810 は T25 ハイブリッドである Inbred A + T25 と MON810 ハイブリッドである Inbred B + MON810 とを伝統的手法で掛け合わせ、種子を得た。

(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 移入された核酸の複製物が存在する場所

T25 及び MON810 共に、トウモロコシゲノムに組み込まれていることが確認されている。

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

T25 においては、サザンプロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、T25 のゲノムに 1 コピーの pUC/Ac が組み込まれていることが確認されている。さらに、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におけるサザンプロット分析によって示されている。*bla* 遺伝子はトウモロコシゲノムに挿入される際に 2 つに分断され、一部消失しており、*bla* 遺伝子断片の 5' 末端に 35S プロモーター様配列が位置していることが示されているが、分断された *bla* 遺伝子及び 35S プロモーター様配列はいずれも不完全なものであり、ノーザンプロット解析により、*bla* 遺伝子が機能していないことが確認されている。さらに、 β -ラクタマーゼ活性測定により、 β -ラクタマーゼ活性は検出限界以下であることが確認され、これらのことから T25 に移入された不完全な *bla* 遺伝子及び 35S プロモーター様配列は機能していないことが確認されている。

一方、MON810 においては、サザンプ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プラス

ミド 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。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におけるサザンブロット分析によって示された。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が選抜の過程で確認されている。

なお、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プラスミド PV-ZMBK07 由来の Cry1Ab 蛋白質発現に必要な領域のみで、*nptII* 遺伝子やプラスミド PV-ZMGT10 由来の *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ている。

T25 と MON810 由来の導入遺伝子が、スタック系統 T25 × MON810 中に安定的に伝達されることを、サザンブロット分析で確認した。温室で栽培したスタック系統 T25 × MON810 及び T25、MON810 の各 4 個体から、個体ごとに葉を採取してゲノム DNA を抽出し、制限酵素で消化して、*pat* 遺伝子及び *cry1Ab* 遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析を行なった。その結果、本スタック系統は、T25 及び MON810 に対して同一のバンドパターンを示し、T25 と MON810 に導入された遺伝子が、スタック系統 T25 × MON810 中に安定して遺伝することが確認されている。

ロ 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

本スタック系統 T25 × MON810 においても、PAT 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質が安定的に産生されていることを、ELISA 法によって確認した。分析に供したトウモロコシは 2000 年に、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社がフランスの 3 箇所、イタリアの 2 箇所、ブルガリアの 1 箇所のほ場において栽培したものをを用いた。各試験地において、それぞれ 5 個体のトウモロコシの V9 ステージの葉を採取し分析に供した。供試サンプルは、採取後に凍結乾燥して水分を除き、粉碎後、PBST（界面活性剤 Tween20 を添加したリン酸緩衝生理食塩水）に懸濁し、さらに細砕した。懸濁液を遠心分離し、上澄みを ELISA 測定用試料とした。PAT 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質の測定には、それぞれの蛋白質に対するポリクローナル抗体を用いた、2 抗体サンドイッチ法を用いた。各蛋白質の検出は、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）で標識した 2 次抗体を用い、HRP 基質を加え発色させた後、反応停止液を加え、450nm の吸光度を測定した。

その結果、表 4 に示すとおり、スタック系統 T25 × MON810 における PAT 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質の平均発現量は、親系統である T25 及び MON810 における各蛋白質の発現量とそれぞれ同等であり、T25 及び MON810 由来の導入遺伝子がスタック系統 T25 × MON810 において、それぞれ安定的に発現していることが確認された。

表 4 ELISA 法による葉における PAT 蛋白質及び Cry1Ab 蛋白質の測定結果

	スタック系統T25×MON810		T25		MON810	
	平均値	最低-最高	平均値	最低-最高	平均値	最低-最高
PAT蛋白質	33.3	17.1 - 54.5	33.9	11.9 - 64.6	-	-
Cry1Ab蛋白質	118	43 - 224	-	-	117	48 - 202

(ng/mg 乾物重)

また、本スタック系統 T25×MON810 において発現しているそれぞれの蛋白質の機能が変化していないことを、ヨーロッパアワノメイガに対する抵抗性のほ場における評価試験並びに除草剤グルホシネートの散布試験を行ない、表現型において確認した。

ヨーロッパアワノメイガに対する抵抗性の評価は、1998 年に米国アイオワ州及びミネソタ州において、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社が、本スタック系統 T25×MON810 及び親系統 MON810、非組換えトウモロコシを栽培したほ場において行なった。試験は、1 反復あたり 30 個体として、2～3 反復行なった。観察は、葉部における食害はおよそ V6 ステージに、茎部における食害は収穫のおよそ 2 週間前に目視にて行ない、その食害指数を記録した。その結果、非組換えトウモロコシの葉部及び茎部においては食害が観察されたのに対し、本スタック系統 T25×MON810 及び親系統である MON810 の葉部及び茎部においては、ほとんど食害が認められなかった。以上のことから、本スタック系統 T25×MON810 も親系統 MON810 と同程度のヨーロッパアワノメイガに対する抵抗性を有することが示され、Cry1Ab 蛋白質の機能に変化がないことが確認された。

除草剤散布試験には、2001 年に米国において、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社が栽培した本スタック系統 T25×MON810 及び非組換えトウモロコシを供試した。通常使用される量で除草剤グルホシネートを散布し (Liberty^R: 0.48kg ai/ha) 本スタック系統 T25×MON810 においても、親系統 T25 由来の除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されているか否かを目視により調査した。その結果、本スタック系統 T25×MON810 においても、除草剤グルホシネートの影響を受けた個体は観察されず、表 5 に示すように、本スタック系統 T25×MON810 における収穫量の調査においても、非組換えトウモロコシとの間で有意な差は認められなかった。以上のことから、本スタック系統 T25×MON810 中に産生される PAT 蛋白質の機能に変化のないことが確認された。

表 5 スタック系統 T25 × MON810 の収量調査

	収 穫 量				LSD (-0.5)	Pr>F	有意差
	スタック系統 T25 × MON810 (bu/acre) (カッコ内は t/ha)	反 復	非組換え体 (bu/acre)* (カッコ内は t/ha)	反 復			
ほ場 1	160.81 (10.13)	13	154.99 (9.76)	13	19.16	0.5697	なし
ほ場 2	190.01 (12.00)	17	189.32 (11.93)	17	14.79	0.9403	なし
ほ場 3	193.00 (12.22)	17	192.22 (12.16)	17	22.41	0.8433	なし
ほ場 4	185.83 (11.71)	11	186.05 (11.72)	11	28.78	0.9620	なし

*非組換え体には、雑草害による減収を防ぐため、従来のトウモロコシ栽培で一般的に使用される除草剤 Basis^R Gold を 0.14kg ai/ha の薬量で散布した。

以上のことから、親系統 T25 及び MON810 由来の獲得形質が、本スタック系統 T25 × MON810 においてそれぞれ安定的に発現し、また双方の親系統から付与された各形質が本スタック系統 T25 × MON810 内で相互に作用しないことが確認された。

ハ ウイルスの感染その他の経路を經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がある場合は、当該伝達性の有無及び程度

移入された核酸に他の野生動植物等への伝達を可能とする配列は含まれておらず、したがって伝達性はない。

(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

T25 及び MON810 の、PCR 法による検出方法の詳細については、厚生労働省の遺伝子組換え食品ホームページ中の「組換え技術応用食品の検査方法について」において公開されている

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/identshi/kensa/kensa.html>)。T25 及び MON810 のそれぞれについて公開されている検出方法をトウモロコシ種子一粒ごとに適用することで本スタック系統 T25 × MON810 の検出が可能である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

除草剤グルホシネートに対する耐性

スタック系統 T25 × MON810 には、T25 に導入された *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子によって、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。*pat* 遺伝子の発現により産生される PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。

チョウ目害虫抵抗性

スタック系統 T25 × MON810 には、MON810 に導入された *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstakiyurai* 由来の *cry1Ab* 遺伝子により、Cry1Ab 蛋白質が産生されており、その結果、European corn borer (ヨーロッパアワノメイガ、*Ostrinia nubilalis*) 等のトウモロコシを食害するチョウ目害虫に対して抵抗性を示す。ヨーロッパアワノメイガは、米国のトウモロコシ栽培において、最も被害を与えている害虫の一つである。ふ化した幼虫は葉を食べて成長し、やがて葉のつけ根から茎に入る。いったん茎の中に入ると、通常散布する薬剤が届きにくいために駆除が難しく、雄穂を中から食害して空洞にし、また、雌花に侵入した幼虫は、生育中の雌穂を食害する。本害虫の防除にかかる費用の総額は、毎年約 10 億ドルにもものぼると考えられている。

□ 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

スタック系統 T25 × MON810 は、T25 と MON810 の戻し交配自殖系統同士を掛け合わせた雑種品種であり、両者の交配により雑種強勢が起こることが予想される。PAT 蛋白質は高い基質特異性を有し、また、Cry1Ab 蛋白質に酵素活性がないことから、本スタック系統において、導入遺伝子による宿主の代謝系への影響や相互作用はないと考えられる。したがって、本スタック系統で雑種強勢によって生じる諸形質への影響は、従来の非組換えトウモロコシ同士の雑種品種や、組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシの掛け合わせによる雑種品種で生じる変動の範囲を超えるものではないと判断される。

以上のことから、本スタック系統と宿主の属する分類学上の種との間の相違については、スタック系統 T25 × MON810 での諸形質に関する個別調査の結果に基づいて記載した。

T25 については、2003 年に独立行政法人 農業技術研究機構 畜産草地研究所 草地研究センターにおいて隔離ほ場試験が実施されている。MON810 については、1996 年及び 2001 年から 2002 年にかけて、独立行政法人 農業環境技術研究所において隔離ほ場試験が実施されている。以下にそれらの結果を要約した。

形態及び生育の特性

T25 について、発芽揃い及び発芽率、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、有効雌穂数、雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、粒色、百粒重、粒形、及び収穫期の生重量について評価した。その結果、すべての項目で、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 について、発芽率及び発芽揃い、雄穂抽出期、絹糸抽出期、稈長、草型、分けつ数、着雌穂高、成熟期、雌穂数、有効雌穂数、収穫期の生重量について評価した。その結果、稈長を除くすべての項目で、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。稈長について、供試した2種類のハイブリッド品種のうち、1品種（MON810BX）で対照の非組換えトウモロコシ（MON810BC）と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。もう一方のハイブリッド品種において有意差は認められなかった。

実際に、本スタック系統 T25 × MON810 を供試して行なわれた発芽試験の結果、本スタック系統 T25 × MON810 の発芽率は 98.4% であり、従来のハイブリッド種子の発芽率の変動範囲内である 92% ~ 100% の範囲に収まっていることが確認された。

以上の結果より、形態及び生育の特性において、本スタック系統と宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

生育初期における低温耐性

T25 において幼苗の低温耐性が評価された。4 の定温器中で低温処理し、生育状況を観察した結果、一様に伸長成長が阻害された。また、冬季のほ場に放置された幼植物体は数日ですべてが枯死し、T25 と対照の非組換えトウモロコシとの間で差は認められなかった。

MON810 についても、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 と非組換えトウモロコシの間で差異は認められなかった。

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し、越冬することは知られていない。また、収穫後に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、結実後、隔離ほ場にそのまま放置した T25 と非組換えトウモロコシは共に、冬季の寒さで自然に枯死した。また、MON810 についても、隔離ほ場試験の終了時には、結実後の枯死が始まっていることを観察した。成体の越冬性については、本スタック系統 T25 × MON810 においても、低温耐性

については宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

花粉の稔性及びサイズ

T25 について、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ードヨードカリ溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、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 についても、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ードヨードカリ溶液で染色し、顕微鏡下で観察をしたが、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。

したがって、本スタック系統 T25 × MON810 の花粉の稔性及びサイズについては宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

T25 の種子の粒列数及び一列粒数、百粒重について非組換えトウモロコシと比較を行なったが、統計学的有意差は認められなかった。MON810 については、雌穂の雌穂長、雌穂径、粒列数、一列粒数、100 粒重を調査したが、すべての項目において、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。

脱粒性については、収穫時のトウモロコシの種子は苞皮に覆われており、また穂軸にしっかりと付いており、脱粒性は極めて低いと考えられるため、T25 では脱粒性の試験は行っていない。MON810 についても同様であり、実際に自然条件での脱粒性は観察されなかった。

T25 の収穫種子の発芽性試験において、T25 及び非組換えトウモロコシ共に直ちに発芽を開始し、また、いずれも 100% の発芽性を示し、休眠性は認められなかった。MON810 については、収穫種子の播種後 4 日目の発芽率において、非組換えトウモロコシと共に発芽率は高く、両者に差異は認められず、種子の休眠性は認められなかった。

以上の結果より、本スタック系統における種子の生産量等の特性に関して、宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

交雑率

宿主であるトウモロコシと交雑可能な近縁野生種（テオシント）は、我が国においては自生していない。

有害物質の産生性

トウモロコシについて、周辺の植物や土壤微生物に影響を与えるような有害物質

を、根から分泌することは知られていない。また、枯死した後に他の植物に影響を与えるような他感物質が産生されることも知られていない。

T25 と非組換えトウモロコシとの間で後作試験、鋤込み試験、土壌微生物相試験を行なったが、すべての項目で、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 についても、非組換えトウモロコシとの間で後作試験、鋤込み試験、土壌微生物相試験を行なったが、すべての項目で、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。

したがって、スタック系統 T25×MON810 においても、有害物質の産生性については宿主の属する分類学上の種のトウモロコシとの間で差異はないと考えられる。

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

緊急措置計画書を参照。

(3) 国外における使用等に関する情報

米国及びカナダ、オーストラリア、ニュージーランドでは、親系統である T25 及び MON810 共に承認を得ている。なお、スタック系統 T25×MON810 については、2004 年をもって商品化が中止されている。

第2 項目ごとの生物多様性影響の評価

トウモロコシ(*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) は、長年にわたり食品・飼料への加工用として海外より輸入されてきた。また、生食用やサイレージ用として我が国でも栽培されている。我が国における長い栽培の歴史の中で、トウモロコシが野生化し、野生動植物の生育に支障を及ぼしたという報告はない。

スタック系統 T25×MON810 は T25 と MON810 の戻し交配自殖系統同士を掛け合わせた雑種品種であり、T25 と MON810 の特性を併せ持つ。しかし、本スタック系統で発現する PAT 蛋白質は高い基質特異性を有すること、また、Cry1Ab 蛋白質には他の Cry 蛋白質と同様に酵素活性がないと考えられることから、本スタック系統において、これら 2 つの蛋白質が発現する形質が相互に作用することはないと考えられる。したがって、本スタック系統における項目ごとの生物多様性影響の評価については、T25 と MON810 の生物多様性影響評価の結果に基づいて行なった。

なお、スタック系統 T25×MON810 については、2004 年をもって商品化が中止されており、我が国に輸入される食品や飼料への加工用及び種子中に混入する可能性は極めて低いと考えられる。

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

トウモロコシについては、これまで我が国において栽培等がなされてきているが、我が国において雑草化したという報告はされていない。我が国で行なわれた T25 と MON810 のそれぞれの隔離ほ場試験結果において、野生植物との競合における優位性に寄与すると考えられる雑草性に関する特性(種子の生産量及び脱粒性、発芽率及び発芽揃い期、休眠性、生育初期の低温耐性、花粉の稔性、周辺植物への影響)について調査が行なわれているが、MON810 において、2 品種のうち 1 種で見られた稈長の差異を除いたいずれの項目についても、組換え体と非組換えトウモロコシの間で、導入遺伝子により生じたと考えられる差は認められなかった。

以上のように、MON810 において、2 品種のうち 1 種で稈長に差異が認められたが、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、競合における優位性が高まることはないと判断された。

スタック系統 T25×MON810 には T25 由来の除草剤グルホシネート耐性が付与されているが、自然環境下でこれらの除草剤が使用されることはなく、この除草剤耐性が選択圧とはならないので、除草剤グルホシネートに対する耐性がスタック系

統 T25 × MON810 に野生植物との競合性における優位性を高めるとは考えられない。また、本スタック系統 T25 × MON810 は、MON810 由来のヨーロッパアワノメイガ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。しかしながら、グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性を併せ持つことによって自然条件下で自生することが可能となったり、競合において優位になるとは考えられない。

以上のことより、スタック系統 T25 × MON810 においても、競合における優位性について、影響を及ぼす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。

(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、本スタック系統が、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等の特定

トウモロコシには、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。T25 と MON810 において、導入遺伝子により、意図しない有害物質が産生されていないことを、隔離ほ場試験において後作試験、土壌微生物相の評価、鋤込み試験を行なって検討した。T25 と MON810 のいずれの試験においても、組換えトウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に差は認められなかった。

また、スタック系統 T25 × MON810 中に産生される PAT 蛋白質は、植物の生長に悪影響を及ぼさないこと及び動物に対して毒性を持たないことが報告されている。また、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有すること、並びに Cry1Ab 蛋白質には、他の *B.t.* 蛋白質同様に酵素活性はないことから、本スタック系統 T25 × MON810 において、導入遺伝子が宿主の代謝経路に影響を与えたり、相互作用することによって、野生動植物等に影響を及ぼす可能性のある有害物質を産生することはないと判断された。

スタック系統 T25×MON810 には、MON810 由来の *cry1Ab* 遺伝子の発現によって Cry1Ab 蛋白質が産生され、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。そのため、スタック系統 T25×MON810 の植物体を摂取することにより影響を受ける野生動植物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 (*Ostrinia nubilalis*) 等のチョウ目昆虫が想定される。標的及び非標的チョウ目昆虫が当該蛋白質に曝露される経路としては、トウモロコシ植物体を直接食餌する場合と、トウモロコシ花粉の飛散により曝露される場合が考えられる。このうち、トウモロコシを主な食草とするチョウ目昆虫については、トウモロコシ栽培期間中は、害虫として殺虫剤等により駆除されるので、ここでは考察の対象にはしない。一方、スタック系統 T25×MON810 から飛散した花粉により、何らかの影響を受ける可能性がある野生動植物としては、スタック系統 T25×MON810 の花粉が食餌植物と共に摂食された場合に、幼虫が影響を受ける可能性のある、我が国の非標的チョウ目昆虫があげられた。そこで、今日、種としての存続が危惧されている非標的チョウ目昆虫について、花粉の飛散により当該蛋白質に曝露される可能性を以下に考察した。

「環境省レッドリスト(2000年改訂版)」に記載された絶滅危惧種のチョウ目昆虫 74 種のうち、トウモロコシの栽培が可能な低地から山地にかけて生育し、トウモロコシの開花時期に幼虫生育期間が重なるのは、以下の 12 種である。

絶滅危惧 I 類：台湾ツバメシジミ、シルビアシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、ミツモンケンモン

絶滅危惧 II 類：ヒメシロチョウ、ツマグロキチョウ、ミヤマシジミ、コヒョウモンモドキ、ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ

準絶滅危惧：ヒョウモンチョウ

これら 12 種の中で、産卵が年に 1 回のみで、その幼虫の生育期間がトウモロコシの開花時期と重なる種は、7 種(台湾ツバメシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、コヒョウモンモドキ、ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ、ヒョウモンチョウ)である。このうち 4 種(台湾ツバメシジミ、ウスイロヒョウモンモドキ、ヒョウモンモドキ、コヒョウモンモドキ)は、食草がそれぞれマメ科やオミナエシ科、キク科、ゴマハノグサ科で、さらに幼虫が主に蕾の内部や葉の裏面を摂食するか、あるいは集団でネット状の巣を作りその中の葉しか食べないため、スタック系統 T25×MON810 の花粉に感受性が高いと考えられる若齢幼虫が、その生存に影響する量の花粉を摂食する可能性はほとんど無い。残り 3 種(ヒメヒカゲ、ウラナミジャノメ、ヒョウモンチョウ)については、幼虫が食餌植物の葉の表面を摂食するが、ヒメヒカゲとウラナミジャノメについては、食草がカヤツリグサ科やイネ科で、葉が細くほぼ直立しており、花粉が葉上に堆積しにくいいため、その生存に影響するような量の花粉を摂食する可能性はほとんどないと考えられる。またヒョウモンチョウは、食草がバラ科で、主な生息地がトウモロコシ栽培に適さない湿原であることから、トウモロコシ畑周辺に生息する可能性はほとんどないと考えられる。

以上のことから、スタック系統 T25×MON810 が、仮に我が国で栽培された場合でも、これら絶滅危惧種の種としての存続に影響を与える可能性は無視できるほど低いと考えられた。しかしながら、我が国に生息するチョウ目昆虫の中には、当該蛋白質に曝露された場合、何らかの影響を受けるものがある可能性があり、チョウ目昆虫が影響を受ける濃度で当該花粉に曝露される可能性が、現実的にどの程度想定されるのかについて、検討を行なった。

(2) 影響の具体的内容の評価

MON810 の隔離ほ場試験において、MON810 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、2,000 及び 4,000 粒/cm² の花粉密度で、MON810 の花粉を摂取したヤマトシジミの生存率と、非組換えトウモロコシの花粉を摂取したヤマトシジミの生存率の間で、有意な差が認められた。

(3) 影響の生じやすさの評価

前述のように、トウモロコシを主な食草とするチョウ目昆虫については、トウモロコシ栽培の期間中には、害虫として殺虫剤等により駆除されるので、ここでは評価の対象とはしない。したがって、非標的チョウ目昆虫がトウモロコシ花粉の飛散により当該蛋白質に曝露される可能性についてのみ、評価を行なうこととする。

以下に、我が国においてスタック系統 T25×MON810 が、仮に我が国で栽培された際にトウモロコシ畑の周辺にチョウ目昆虫がいた場合を想定し、実際にどの程度花粉に曝露される可能性があるのかを、MON810 について行なわれた生物検定試験の結果及び野外において花粉の飛散・堆積密度を調べた実験の結果に基づき考察した。

表 6 に示すように、ヒマワリの葉を用いて、トウモロコシ畑周辺での花粉の飛散・堆積程度を調べた実験によると、トウモロコシ畑内での花粉の堆積密度は 81.7 粒/cm² であった。畑から 5m 離れると堆積密度は 5.2 粒/cm² と大きく減少し、10m 離れた場合の堆積密度は、畑内の 270 分の 1 の 0.3 粒/cm² まで減少した (平成 15 年度 (2003) 農業環境調査研究成績・計画概要集)。5m 地点における花粉堆積密度は、ヤマトシジミを用いた生物検定において生存率に有意差の認められた 2,000 粒/cm² 及び 4,000 粒/cm² の、それぞれ約 385 分の 1 及び 769 分の 1、10m 地点ではそれぞれ約 6,667 分の 1 及び 13,333 分の 1 である。

表 6 ほ場端からの距離と花粉蓄積数

ほ場端からの距離	花粉密度 (粒/cm ²)
0m	81.7
1m	136.5
2m	33.5
5m	5.2
10m	0.3
20m	0.3
50m	0.1

以上の結果より、仮にトウモロコシ畑の周辺にチョウ目昆虫の幼虫が生息している場合でも、影響を受ける濃度で MON810 の花粉に暴露される可能性はまずないと考えられた。したがって、MON810 由来の Cry1Ab 蛋白質を発現するスタック系統 T25 × MON810 が、仮に我が国において栽培された場合においても、我が国に生息するチョウ目昆虫の、種としての存続に影響を与える可能性は極めて低いと結論された。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上の検討結果より、スタック系統 T25 × MON810 の有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずる恐れはないと判断された。

3 交雑性

宿主であるトウモロコシは、我が国における定着の事例がなく、また交雑可能な近縁野生種（テオシント）が自生していることは知られていない。このため、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した。

以上のことより、スタック系統 T25 × MON810 の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。

4 その他の性質

以上の他に、生物多様性影響の評価を行うことが適切であると考えられる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

スタック系統 T25 × MON810 は、従来の一世代雑種育種法を用いて育成し、育成された自殖系統同士を互いに交配させた雑種品種であり、親系統である T25 由来の *pat* 遺伝子、並びに MON810 由来の *cry1Ab* 遺伝子を併せ持つ。*pat* 遺伝子が発現する PAT 蛋白質は除草剤グルホシネート耐性を、MON810 由来の *cry1Ab* 遺伝子が発現する Cry1Ab 蛋白質は、ヨーロッパアワノメイガ等のトウモロコシを食害するチョウ目害虫に対する抵抗性をそれぞれ付与する。

PAT 蛋白質が高い基質特異性を有すること、並びに Cry1Ab 蛋白質には他の Cry 蛋白質と同様に、酵素活性はないと考えられることから、スタック系統 T25 × MON810 中で、導入遺伝子が宿主の代謝系に影響したり、相互に作用することはないと考えられた。したがって、スタック系統 T25 × MON810 の生物多様性影響の評価は、T25 と MON810 の個別の生物多様性影響評価結果に基づいて行なった。

なお、スタック系統 T25 × MON810 については、2004 年をもって商品化が中止されており、今後、食品・飼料への加工用あるいは栽培種子として我が国に輸入される可能性は極めて低い。

宿主の属する分類学上の種であるトウモロコシには、我が国において輸入や栽培等を通じた長期間の使用経験がある。また、T25 及び MON810 について、競合における優位性に関わる諸形質を比較したところ、それぞれの非組換え体品種との比較において、導入遺伝子の影響によると考えられる有意差は認められなかった。さらに、スタック系統 T25 × MON810 は、除草剤グルホシネートに対する耐性、及びトウモロコシを食害するヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目昆虫に対する抵抗性を示すが、これらの特性がスタック系統 T25 × MON810 に競合における優位性を高めるとは考えられない。以上のことから、スタック系統 T25 × MON810 が、競合における優位性に起因して生物多様性影響を生じる恐れはないと判断された。

トウモロコシには、これまでの長期間の使用経験を通じて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。T25 と MON810 において有害物質の産生性について、後作試験、土壌微生物の評価、鋤込み試験等の結果から検討したが、意図しない新たな有害物質は産生されていないことが確認された。スタック系統 T25 × MON810 は、Cry1Ab 蛋白質を産生するため、本スタック系統 T25 × MON810 の花粉の飛散により影響を受ける可能性のある野生動植物として、今日種としての存続が危惧されている非標的チョウ目昆虫 12 種を特定し、当該蛋白質の影響を受ける可能性について検討した。これらの非標的チョウ目昆虫は、本来自然生態系に生息しており、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、有害物質の産生性に関して、MON810 が生物多様性影響を生じ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なっていることから、遺伝的背景の差異による花粉飛散時期や花粉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、PAT 蛋白質についても、高い基質特異性を示すこと等から、植物の代謝経路に関与して、意図しない有害物質を産生する可能性はまずないと考えられた。以上のことから、スタック系統 T25×MON810 が、有害物質の産生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。

宿主であるトウモロコシは、我が国における定着の事例がなく、また交雑可能な近縁野生種が自生していることは知られていない。したがって、スタック系統 T25×MON810 が、交雑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。

以上の考察結果に加えて、スタック系統 T25×MON810 については、2004 年をもって商品化が中止されており、今後、食品・飼料への加工用あるいは栽培種子として我が国に輸入される可能性は極めて低いことから、スタック系統 T25×MON810 を第一種使用規程にしたがって使用した場合に、我が国において生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論された。

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成 16 年 8 月 17 日

氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生
住所 東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号
山王パークタワー

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*pat*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (T25×MON810, OECD UI : ACS-ZMØØ3-2×MON-ØØ81Ø-6) (以下、スタック系統 T25×MON810 と表記) について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、スタック系統 T25×MON810 については、我が国で商業栽培を行なう予定は当面ない。商業栽培を行なうことを決定し、今後、科学的根拠に基づき、スタック系統 T25×MON810 の栽培によって生物多様性影響が生ずるおそれがあると立証された場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

弊社内に、緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部）の部門長から構成される。同時に、農業製品事業部内に、本措置に適切に対応するための組織を設置し、危機対策本部並びに、スタック系統 T25×MON810 の開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。本組織は、農業製品事業部長が責任者となる。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、スタック系統 T25×MON810 の開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社と連絡をとり、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

米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、販売した種子の購入者及び穀物取扱業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、スタック系統 T25×MON810 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

また必要に応じて、弊社のホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

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

今後、スタック系統 T25×MON810 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、弊社は、種子取扱い業者及び国内のスタック系統 T25×MON810 の栽培者に対して不活化または拡散防止に適切な措置をとるよう通知する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的正当性のある根拠に基づき、スタック系統 T25×MON810 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合）

平成 16 年 8 月 17 日

氏名 デュポン株式会社
代表取締役社長 小林 昭生
住所 東京都千代田区永田町 2 丁目 11 番 1 号
山王パークタワー

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*pat*, *cry1Ab*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (T25×MON810, OECD UI : ACS-ZMØØ3-2×MON-ØØ81Ø-6) (以下、スタック系統 T25×MON810 と表記)について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、科学的根拠に基づき、生物多様性影響が生ずるおそれがあると立証された場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

弊社内に、緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、社長を本部長とし、管理部門（法務部及び財務部、安全環境部、人事部、総務部、広報部）の部門長から構成される。同時に、農業製品事業部内に、本措置に適切に対応するための組織を設置し、危機対策本部並びに、スタック系統 T25×MON810 の開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社との円滑な連絡を確保する。本組織は、農業製品事業部長が責任者となる。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、スタック系統 T25×MON810 の開発者である米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社と連絡をとり、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

米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、米国におけるスタック系統 T25×MON810 種子の購入者及び穀物取扱い業者、トウモロコシの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、スタック系統 T25×MON810 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、米国パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社は、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

また必要に応じて、弊社のホームページ等、日本国内の適切な媒体を通して、本件について通知する。

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

今後、スタック系統 T25×MON810 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、弊社は、米国パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社とともに、日本向けに輸出している穀物取扱い業者及び種子取扱い業者に対して本件を通知する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的正当性のある根拠に基づき、スタック系統 T25×MON810 が我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。