

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1B.868*, 改変 *cry1Da*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON95379, OECD UI: MON-95379-3) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種名又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	3
(2) 使用等の歴史及び現状	3
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	3
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	4
(3) 生理学的及び生態学的特性	5
イ 基本的特性	5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	5
ハ 捕食性又は寄生性	6
ニ 繁殖又は増殖の様式	6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性	6
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度	7
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	7
ホ 病原性	8
ヘ 有害物質の産生性	8
ト その他の情報	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	9
(1) 供与核酸に関する情報	9
イ 構成及び構成要素の由来	9
ロ 構成要素の機能	11
① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能	11

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨	16
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	20
(2) ベクターに関する情報	20
イ 名称及び由来	20
ロ 特性	20
① ベクターの塩基数及び塩基配列	20
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	20
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報	20
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	20
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	20
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	21
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	21
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	21
② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無	21
③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離は場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過	21
(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	24
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	24
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性	26
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	29
④ (6) の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	29
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	31
(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	31
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	31
① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態	

学的特性の具体的な内容	31
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度	31
a 形態及び生育の特性	32
b 生育初期における低温耐性	33
c 成体の越冬性	33
d 花粉の稔性及びサイズ	33
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	33
f 交雑率	34
g 有害物質の産生性	34
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	35
(1) 使用等の内容	35
(2) 使用等の方法	35
(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	35
(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	35
(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果	35
(6) 国外における使用等に関する情報	36
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	38
1 競合における優位性	38
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	38
(2) 影響の具体的内容の評価	39
(3) 影響の生じやすさの評価	39
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	39
2 有害物質の産生性	39
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	39
(2) 影響の具体的内容の評価	52
(3) 影響の生じやすさの評価	52
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	54
3 交雑性	54
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	54
(2) 影響の具体的内容の評価	54
(3) 影響の生じやすさの評価	54

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	55
4 その他の性質	55
第三 生物多様性影響の総合的評価	56
参考文献	58
別添資料リスト	70

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

2021 年 6 月 30 日

5 農林水産大臣 野上 浩太郎 殿
環境大臣 小泉 進次郎 殿

10 氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ 印
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

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

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (<i>cry1B.868</i> , 改変 <i>cry1Da</i> , <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON95379, OECD UI: MON- 95379-3)
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

5 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

① 和名、英名及び学名

10

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.) Ittis

15

② 宿主の品種名又は系統名

宿主はトウモロコシのデント種で、品種名は LH244 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

トウモロコシの野生種と見られる植物は現存せず (山田, 2001)、国外の自然環境におけるトウモロコシの自生は報告されていない。

25

なお、トウモロコシの起源に関与すると考えられる近縁種として、トウモロコシと交雑可能な *Zea* 属のテオシントと *Tripsacum* 属のトリプサクムの存在が知られている (OECD, 2003)。テオシントとトリプサクムはメキシコとグアテマラ等に広範囲に自生しており、トリプサクムはさらに米国東部、南部から南米でも認められている (山田, 2001; OECD, 2003)。

30

わが国の自然環境下において、トウモロコシ及びその近縁種の自生について報告はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中央アメリカの

複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある (OECD, 2003)。考古学的検証に基づく
と、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7000~5000 年頃であり、
紀元前 3400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、
5 南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、
スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる (山田, 2001; 戸澤, 2005)。
1492 年のコロンブスのアメリカ大陸到達後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。

10 わが国へは 1573~1591 年頃にポルトガル人によって長崎へ伝えられたフリント種が最初とされ、主に関東以南の山間地で栽培が行われていた。また、明治時代になって北海道へ米国からデント種とフリント種が新たに導入され、全国的に栽培が普及した (戸澤, 2005)。

15 ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

・主たる栽培地域

現在、トウモロコシは、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で栽培可能であり、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
20 中心に、全世界で広く栽培されている (OECD, 2003; 戸澤, 2005)。

国連食糧農業機関 (FAO) によると、2019 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 9,720 万 ha であり、上位国は、中国 4,128 万 ha、米国 3,295 万 ha、ブラジル 1,752 万 ha、インド 903 万 ha、アルゼンチン 723 万 ha である (FAO, 2020)。

25 現在、わが国で栽培されているトウモロコシは、統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用スイートコーンがあり、2019 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 4,700 ha で (農林水産省, 2020a)、同年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 3,000 ha である (農林水産省, 2020b)。

30 ・栽培方法

海外では、米国をはじめとする主要栽培国において、大型機械を利用した大規模栽培が行われている。

一方、わが国では、飼料用トウモロコシを中心に栽培が行われており、慣行栽培法は次のとおりである。

35 北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も多い。適正栽植密度は 10 a あたり 6,000~8,000 本である。中耕、除草、土寄

せは一連の作業で行い、生育初期に 2~3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い (瀧澤, 2001)。

5 なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、現在、栽培用として市販されているトウモロコシ種子のほとんどは、海外から輸入された一代雑種 (F₁) 品種であり、収穫種子を翌年に栽培用として播種することは一般的でない。

・流通実態及び用途

10 世界第一のトウモロコシ生産国である米国では、その大部分がアイオワ州、イリノイ州、ネブラスカ州及びミネソタ州を中心としたコーンベルトと呼ばれる地域で栽培されている。2019 年における米国でのトウモロコシの利用用途の内訳は、48.0 %が飼料 (8.7%の蒸留粕を含む)、29.5 %がエタノール製造、12.6 %が輸出で、残りはコーンシロップ等の食品製造であった (NCGA, 2020)。

15 わが国では、2019 年に約 1,598 万トンのトウモロコシを輸入している。輸入トウモロコシのうちの約 1,164 万トンが飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽培用と考えられる (財務省, 2020)。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている (農林水産省, 2018)。

20 また、飼料用トウモロコシは、発芽可能な状態で輸入されるものが多いが、加熱・圧ぺんすること等が関税制度の下、義務づけられている (農林水産省, 2014)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

25

イ 基本的特性

—

30 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシは、長い年月の間に栽培植物として馴化された結果、自然条件下における自生能力を失った作物である (OECD, 2003)。

35 トウモロコシ種子の発芽の最低温度は 10~11℃、最適温度は 33℃とされている。実際に播種されるのは 13~14℃以上である (中村, 2001)。

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 (瀧澤, 2001)。

また、トウモロコシはもともと短日植物であり、その感光性 (日長反応性) は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である (柿本ら, 2001)。

5 これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の 1.6~2.0 倍になったときに幼根 (初生根又は種子根) が抽出し、子実発芽となる (戸澤, 2005)。また、トウモロコシの栽培は腐植に富む土壌が適し、pH 5.0~8.0 の範囲で栽培可能である (戸澤, 2005)。

ハ 捕食性又は寄生性

10

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

15 ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

20 トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、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 (OECD, 2003)。

種子の休眠性は知られていない。種子の寿命は、主に温度と湿度によって左右され、低温乾燥下では長く、高温多湿下では短い (戸澤, 2005)。氷点下の気温は種子の発芽に悪影響を与え、トウモロコシ種子生産に影響を及ぼす主要な要因となっている。また、45℃以上の気温も種子の発芽に悪影響を及ぼすことが報告されている (Wych, 1988)。

25 さらに、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が 10℃に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する (菊池, 1987; 中村, 2001)。また、仮に発芽しても生長点が地上に出た後は 6~8 時間以上 0℃以下の外気にさらされると生存できない (OECD, 2003)。子実の活力を 6~8 年保存するには、子実水分 12 %、温度 10℃、相対湿度 55 %以内に保つことが必要である (中村, 2001; OECD, 2003)。

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

35

トウモロコシは栄養繁殖せず、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ない。

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

5

トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、主として風媒によって受粉する作物であり 95~99 %は他家受粉によって作られた種子により繁殖するが、自家不和合性は知られておらず、自家受粉も可能である (千藤, 2001; OECD, 2003)。

10

トウモロコシと交雑可能なのは、同じ *Z. mays* 種に含まれトウモロコシの近縁野生種である一年生のテオシント (*Z. mays* subsp. *mexicana*)、及び *Tripsacum* 属である。トウモロコシとテオシントは近接している場合に自由に交雑するが、*Tripsacum* 属との交雑は非常に稀である (OECD, 2003)。テオシントはメキシコからグアテマラにかけて分布しており、*Tripsacum* 属の分布地域は北アメリカ東部、南部から南米となっている (山田, 2001; OECD, 2003)。

15

なお、わが国におけるトウモロコシと交雑可能なテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種の自生について報告はない。また、受精を伴わない繁殖能力を有する種子の生産 (アポミクシス) についての報告はない。

20

- ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシは雌雄異花序で、雌花は葉腋について 1~3 本の雌穂を形成し、雄穂は茎の先端につく (柿本ら, 2001; OECD, 2003)。雄穂は抽出すると 3~5 日で開花し、開花始めから終わりまでの期間は盛夏で一般に 8~9 日である (中村, 2001)。一方、雌穂の絹糸抽出は雄穂開花のおよそ 1 日後に始まり、抽出始めから抽出揃いまでの期間は 5~6 日である (中村, 2001)。一本の雄穂には 1,200~2,000 個の小穂があり、一雄穂当たりの花粉の生産量は、約 1,800 万粒とされている (OECD, 2003)。

25

花粉の稔性は花粉の充実度を観察することで推定できる (西尾, 2002)。

花粉の形状は球形で、直径は 90~120 μm 程度である (中村, 2001)。

受粉は主に風媒によって行われ、ほとんどの場合は他家受粉である (戸澤, 2005)。他品種、系統の花粉の混入を防ぐための隔離距離は、林、高層建築物などの障害物の有無などにより異なるものの、200~400 m とされている (千藤, 2001)。

35

わが国でのトウモロコシは場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及

びイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁 (0 m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm²であった (Shirai and Takahashi, 2005)。また、ほ場から 5 m 離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm²、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で 10 粒/cm²以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

また、北米でも全 7 ヲ所のトウモロコシ畑周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度の調査が行われている (Pleasants et al., 2001)。調査の結果、トウモロコシ畑から 1 m、2 m、4~5 m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/cm²、14.2 粒/cm²、そして 8.1 粒/cm²へと減少していくことが明らかとなっている。

さらに、カナダのトウモロコシ畑周辺のトウワタの葉上における花粉堆積密度を調査しており、ほ場の縁から 1 m 及び 5 m 離れた地点での平均堆積密度は、それぞれ平均 28 粒/cm² 及び 1.4 粒/cm²であったと報告している (Sears et al., 2000)。

花粉の寿命は通常 10~30 分であるが、好適条件下ではさらに長い (CFIA, 2012)。平均的な花粉は大気中に飛散した 2 時間後にはその発芽能力を 100 % 失うという報告もある (Luna et al., 2001)。

ホ 病原性

—

ヘ 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の、わが国の畑以外での生育については、2013 年に熊本県内の港湾周辺で 1 個体、2015 年に鹿児島県内の港湾周辺で 1 個体の計 2 個体報告されている (農林水産省, 2014; 農林水産省, 2017)。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

バイエルグループは、*Bacillus thuringiensis* 由来の Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質を産生するチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1B.868*, 改変 *cry1Da*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON95379, OECD UI: MON-95379-3) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)を作出した。

本組換えトウモロコシ中で発現する Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質は、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) やアメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) といったチョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。このチョウ目害虫抵抗性の形質の付与により、本組換えトウモロコシは、チョウ目害虫による被害が深刻な地域において効果的な害虫防除方法を農家に提供することが期待されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えトウモロコシ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 (p12) 及び表 1 (p13~15) に示した。

本組換えトウモロコシには、*cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子が導入されている。それぞれの遺伝子について以下に述べる。

【*cry1B.868* 遺伝子】

cry1B.868 遺伝子から発現する Cry1B.868 蛋白質はキメラ型の殺虫蛋白質であり、*B. thuringiensis* が産生する殺虫蛋白質 (Bt 蛋白質) である野生型 Cry 蛋白質に由来するドメインから構成されている。一般に、Cry 蛋白質はドメイン I、II、III と C 末端ドメインにより構成されており、ドメイン I は昆虫の中腸細胞膜上での小孔の形成、ドメイン II 及び III は特異的な受容体の認識及び結合、そして C 末端ドメインは結晶構造形成に関与していることが明らかにされている (de Maagd et al., 2001)。Cry1B.868 蛋白質のドメインのうち、ドメイン I 及び II は Cry1Be 蛋白質、ドメイン III は Cry1Ca 蛋白質、C 末端ドメインは Cry1Ab 蛋白質に由来しており (図 1, p10)、Cry1B.868 蛋白質の各ドメインと、対応する野生型 Bt 蛋白質のドメインのアミノ酸配列は 100 %一致する。なお、Cry1A、Cry1B 又は Cry1C 蛋白質を発現する *B. thuringiensis* は、安全な使用経験のある Bt 製剤に含有されている (Betz et al., 2000; Bravo et al., 2011)。

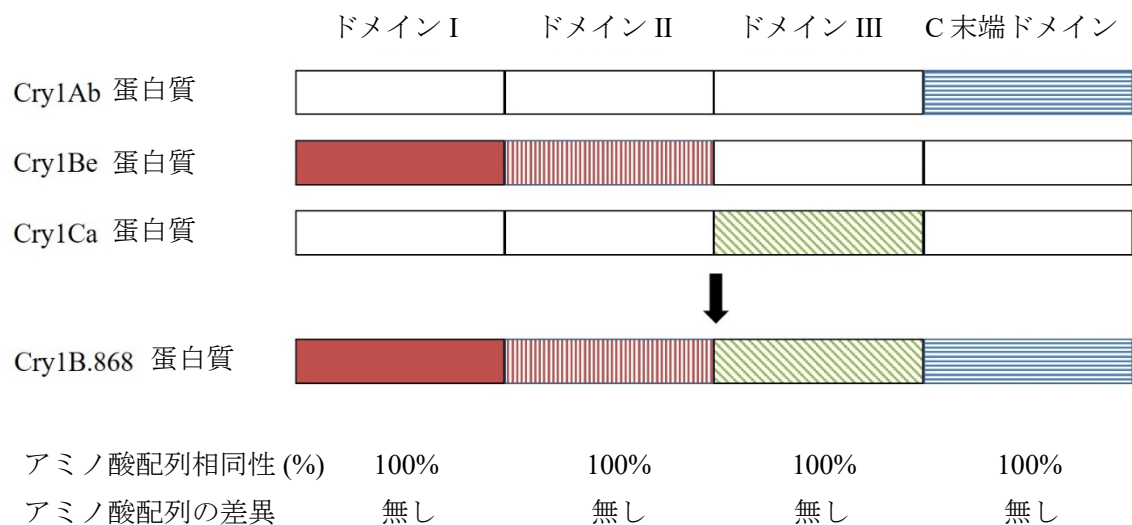


図 1 Cry1B.868 蛋白質の一次構造の概略図¹

各ドメインは由来の違いによって色分けしている。各ドメインのアミノ酸配列の長さの比は実際の比とは異なる。

このようにドメインあるいは配列を組換えることにより標的昆虫に対する殺虫活性を高めた Cry 蛋白質を発現する遺伝子組換え作物は、過去に第一種使用規程の承認を受けている。例えば、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON89034, OECD UI: MON-89034-3) (2008 年 1 月 31 日承認) 及びチョウ目害虫抵抗性ダイズ (*cry1A.105*, 改変 *cry2Ab2*, *Glycine max* (L.) Merr.) (MON87751, OECD UI: MON-87751-7) (2016 年 11 月 25 日承認) において発現する Cry1A.105 蛋白質は、Cry 蛋白質である Cry1Ab、Cry1Ac 及び Cry1F 蛋白質由来のドメインにより構成されたキメラ蛋白質である (Wang et al., 2018)。また、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ (*cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI: DAS-24236-5×DAS-21023-5) (2006 年 4 月 10 日承認) 中で発現する Cry1F 蛋白質も、Cry1Fa2 蛋白質、Cry1Ca3 蛋白質、及び Cry1Ab1 蛋白質の配列を組み合わせたキメラ蛋白質である (Gao et al., 2006)。

さらに、異なる Cry 蛋白質間でのドメイン III の組換えは、自然界で Cry 蛋白質が長年の進化の過程で多様性を獲得していく際に起こっていることが報

¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

告されている (de Maagd et al., 2001; Bravo et al., 2013)。

本組換えトウモロコシにおいて発現する Cry1B.868 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

5

【改変 *cry1Da* 遺伝子】

改変 *cry1Da* 遺伝子から発現する改変 Cry1Da 蛋白質は、*B. thuringiensis* に由来する Bt 蛋白質であり、野生型 Cry1Da 蛋白質と比較して 4 アミノ酸の差異、すなわち、アミノ酸配列の N 末端側から 2 番目へのアラニンの挿入及びドメイン II における 3 ヶ所の単アミノ酸置換 (282 番セリンのバリンへの、316 番チロシンのセリンへの、及び 368 番イソロイシンのプロリンへの置換) を有しており、いずれも殺虫活性を増強する目的で改変されている。したがって、本組換えトウモロコシに導入された *cry1Da* 遺伝子及び Cry1Da 蛋白質を、それぞれ「改変 *cry1Da* 遺伝子」及び「改変 Cry1Da 蛋白質」とする²。なお、改変 Cry1Da 蛋白質と野生型 Cry1Da 蛋白質のアミノ酸配列の相同性は 99.7% である。

10
15

野生型 Cry1Da 蛋白質を発現する *B. thuringiensis* は、安全な使用経験のある Bt 製剤に含有されている (Chang et al., 2001; Sanahuja et al., 2011; VKM, 2016)。

20

本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 Cry1Da 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

ロ 構成要素の機能

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

25

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の機能は、表 1 (p13~15) に示した。

²文献 (Wang et al., 2019) 及び別添資料における表記は *cry1Da_7* 遺伝子及び Cry1Da_7 蛋白質である。

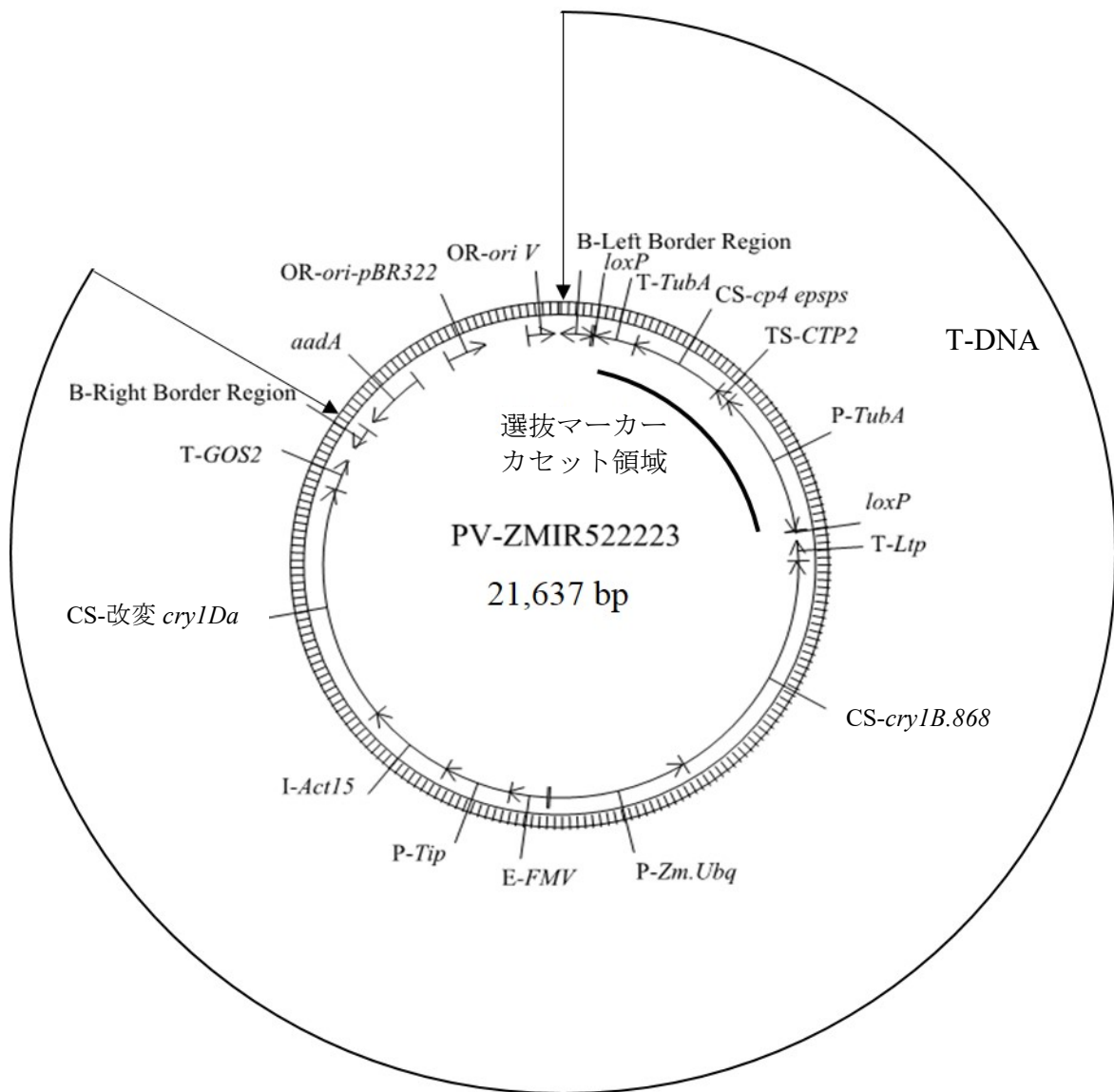


図2 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR522223 のプラスミドマップ³

- 5 本組換えトウモロコシの育成の過程で、T-DNA 領域が導入された R₂ 世代の個体を Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統と交配させることにより、PV-ZMIR522223 の T-DNA 領域のうち、2つの *loxP* 配列に挟まれる選抜マーカーカセット領域 (T-TubA、CS-cp4 *epsps*、TS-CTP2、P-TubA 及び *loxP* 配列の 1 つ) を除去し、同領域及び Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜した (第一の 2-(3)-ハ-
- 10 ③, p21~22)。

³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR522223 の各構成要素の由来及び機能⁴

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA 領域*		
B ¹ -Left Border Region	1-442	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	443-477	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>loxP</i>	478-511	バクテリオファージ P1 由来の Cre 蛋白質認識組換え部位 (Russell et al., 1992)。
Intervening Sequence	512-517	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ² - <i>TubA</i>	518-1,099	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Jeon et al., 2000)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
Intervening Sequence	1,100-1,106	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ³ - <i>cp4 epsps</i>	1,107-2,474	<i>Agrobacterium</i> CP4 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 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
TS ⁴ - <i>CTP2</i>	2,475-2,702	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	2,703-2,706	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ⁵ - <i>TubA</i>	2,707-4,887	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロンの配列 (Jeon et al., 2000)。植物細胞における転写を誘導する。
Intervening Sequence	4,888-4,893	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>loxP</i>	4,894-4,927	バクテリオファージ P1 由来の Cre 蛋白質認識組換え部位 (Russell et al., 1992)。
Intervening Sequence	4,928-5,038	DNA クローニングの際に利用された配列。

⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR522223 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T- <i>Ltp</i>	5,039-5,338	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の脂質輸送蛋白質様 (<i>Lipid Transfer Protein-like, LTP</i>) 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH931404)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	5,339-5,347	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>cry1B.868</i>	5,348-8,947	<i>Bacillus thuringiensis</i> に由来する Cry1Be 蛋白質のドメイン I 及び II、Cry1Ca 蛋白質のドメイン III、Cry1Ab 蛋白質の C 末端ドメインから構成されるキメラ蛋白質 Cry1B.868 をコードする配列で、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Wang et al., 2019)。
Intervening Sequence	8,948-8,973	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>Zm.Ubq</i>	8,974-10,981	テオシント (<i>Zea mays</i> subsp. <i>Mexicana</i>) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロン配列 (GenBank Accession: MH931399)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
Intervening Sequence	10,982-11,008	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>E⁶-FMV</i>	11,009-11,545	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
Intervening Sequence	11,546-11,556	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>Tip</i>	11,557-12,537	アワ (<i>Setaria italica</i>) 由来液胞膜内在性蛋白質 (<i>tonoplast membrane integral protein, Tip</i>) 遺伝子のプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH931400)。植物細胞における転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	12,538-12,545	DNA クローニングの際に利用された配列。
I ⁷ - <i>Act15</i>	12,546-13,838	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のアクチン 15 (<i>Act15</i>) 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH931405)。目的遺伝子の発現制御に関わる (Rose, 2008)。
Intervening Sequence	13,839-13,856	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-改変 <i>cry1Da</i>	13,857-17,357	<i>B. thuringiensis</i> 由来の改変 Cry1Da 蛋白質をコードする配列で、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Wang et al., 2019)。
Intervening Sequence	17,358-17,373	DNA クローニングの際に利用された配列。

表1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR522223 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T- <i>GOS2</i>	17,374-17,841	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来の転写開始因子をコードする <i>GOS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH931403)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	17,842-18,045	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	18,046-18,376	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない)		
Intervening Sequence	18,377-18,520	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	18,521-19,409	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)- <i>O</i> -ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	19,410-19,943	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ⁸ - <i>ori-pBR322</i>	19,944-20,532	pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>Escherichia coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	20,533-21,154	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR- <i>ori V</i>	21,155-21,551	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	21,552-21,637	DNA クローニングの際に利用された配列。

¹ B, Border (境界配列)

² T, Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

³ CS, Coding Sequence (コード配列)

⁴ TS, Targeting Sequence (ターゲティング配列)

⁵ P, Promoter (プロモーター)

⁶ E, Enhancer (エンハンサー)

⁷ I, Intron (イントロン)

⁸ OR, Origin of Replication (複製開始領域)

* T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット領域 (T-*TubA*、CS-*cp4 epsps*、TS-*CTP2*、P-*TubA* 及び *loxP* 配列の1つ) は、本組換えトウモロコシには存在しない。なお、本組換えトウモロコシに存在する構成要素のみを、別添資料 7 の Appendix Table 2 (p40~41) に示している。

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

5 本組換えトウモロコシには、*B. thuringiensis* 由来の配列により構成される Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質の発現により、特定のチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。

10 Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質はいずれも Cry 蛋白質に属する。Cry 蛋白質の作用機作はよく研究されており、多くの文献により報告されている (Gill et al., 1992; Schnepf et al., 1998; OECD, 2007; Vachon et al., 2012)。感受性昆虫の体内に取り込まれた Cry 蛋白質は、昆虫消化管の生理条件下において、結晶封入体からプロトキシシン (毒前駆体) として可溶化する。プロトキシシンは、消化管の蛋白質分解酵素により部分的に分解され、殺虫活性をもつ蛋白質分解酵素耐性のコア蛋白質へと変換される。コア蛋白質は、昆虫の中腸上皮細胞膜上の特異的受容体へ結合し、細胞膜に小孔を形成することで細胞溶解を引き起こし、その結果として中腸組織に損傷を与え殺虫活性を示す (Deist et al., 2014)。したがって、昆虫中腸において Cry 蛋白質を活性化する特異的な蛋白質分解酵素や、中腸上皮細胞膜上の Cry 蛋白質に対する特異的な受容体を介して、Cry 蛋白質は感受性昆虫に対して特異的に作用する (Bravo et al., 2013)。これまで、Cry 蛋白質に対する特異的受容体は昆虫及び線虫以外からは同定されていない (OECD, 2007)。実際、これまでに Cry 蛋白質又は Cry 蛋白質を発現する遺伝子組換え作物の摂取が、哺乳類や鳥類、両生類、爬虫類に対して悪影響を及ぼしたことはない (Schnepf et al., 1998; OECD, 2007)。

25 Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質についても、ツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*) の中腸上皮細胞膜上で発現する受容体への結合を介し殺虫活性を発揮することが示されており、Cry 蛋白質と同様の作用機作に従うことが示唆されている (Wang et al., 2019)。

30 Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質の殺虫スペクトラムについて、*B. thuringiensis* で発現させた蛋白質を用い、チョウ目、コウチュウ目、カメムシ目、ハチ目及びトビムシ目の 5 目 12 種の生物種に対する混餌投与による生物検定によって、それぞれ評価した (別添資料 2 及び別添資料 3)。

35 生物検定の結果、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質のいずれに対しても、チョウ目のツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*)、アメリカタバコガ (*H. zea*)、ヨーロッパアンコーンボーラー (*Ostrinia nubilalis*) 及びオオカバマダラ

(*Danaus plexippus*) は感受性を示すことが確認された。一方、コウチュウ目の
ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*)、サザンコーン
ルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardi*)、コロラドハムシ
(*Leptinotarsa decemlineata*) 及びインゲンテントウ (*Epilachna varivestis*)、カメ
ムシ目のウエスタンターニッシュドプラントバグ (*Lygus hesperus*) 及びネオト
ロピカルブラウンスティンクバグ (*Euschistus heros*)、ハチ目のセイヨウミツ
バチ (*Apis mellifera*) 並びにトビムシ目のオオフォルソムトビムシ (*Folsomia*
candida) は感受性を示さないことが確認された (表 2, p18 及び表 3, p19)。

これら生物検定の結果及びCry蛋白質としての作用機作から、Cry1B.868蛋
白質及び改変 Cry1Da 蛋白質の殺虫活性はチョウ目昆虫に限られることが示
された。

なお、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質が既知のアレルゲンと類似
のアミノ酸配列を共有するか否かを判断するため、AD_2020⁵に登録されて
いる既知のアレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミ
ノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列
は認められなかった。

⁵AD_2020: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) から2020年1月29日にダウンロ
ードしたアレルゲン配列のデータベースで、2,248配列を含む。

表2 Cry1B.868 蛋白質に対する複数種の無脊椎動物の感受性⁶

目	科	種	EC ₅₀ 又は LC ₅₀ (µg/mL diet)	感受性
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	ツマジロクサヨトウ <i>Spodoptera frugiperda</i>	0.15	有 ^b
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	アメリカタバコガ <i>Helicoverpa zea</i>	120	有 ^b
チョウ目 Lepidoptera	ツトガ科 Crambidae	ヨーロピアンコーンボローラー <i>Ostrinia nubilalis</i>	9.8	有 ^b
チョウ目 Lepidoptera	タテハチョウ科 Nymphalidae	オオカバマダラ <i>Danaus plexippus</i>	0.077	有 ^c
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	ウエスタンコーンルートワーム <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	>301 ^a	無 ^d
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	サザンコーンルートワーム <i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>	>837 ^a	無 ^d
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	コロラドハムシ <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	>1708 ^a	無 ^d
コウチュウ目 Coleoptera	テントウムシ科 Coccinellidae	インゲンテントウ <i>Epilachna varivestis</i>	>837 ^a	無 ^d
カメムシ目 Hemiptera	カスミカメムシ科 Miridae	ウエスタンターニッシュドプラントバグ <i>Lygus hesperus</i>	>700 ^a	無 ^e
カメムシ目 Hemiptera	カメムシ科 Pentatomide	ネオトロピカルブラウンスティンクバグ <i>Euschistus heros</i>	>700 ^a	無 ^f
ハチ目 Hymenoptera	ミツバチ科 Apidae	セイヨウミツバチ <i>Apis mellifera</i>	>900	無 ^g
トビムシ目 Collembola	ツチトビムシ科 Isotomidae	オオフォルソムトビムシ <i>Folsomia candida</i>	>3500	無 ^h

^a 数値は最大供試濃度において最も低めに見積もった供試飼料中の試験蛋白質濃度を示している (別添資料 2 の Table 9.7)。

^b EC₅₀ (半数影響濃度) を 5 段階以上の供試濃度で 7 日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

^c LC₅₀ (半数致死濃度) を 7 段階の供試濃度で 7 日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

5 ^d 感受性は 7 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^e 感受性は 6 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^f 感受性は 5 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^g 感受性は 10 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^h 感受性は 28 日間の給餌試験における生存率及び繁殖率により評価した。

⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表3 改変 Cry1Da 蛋白質に対する複数種の無脊椎動物の感受性⁷

目	科	種	EC ₅₀ 又は LC ₅₀ (µg/mL diet)	感受性
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	ツマジロクサヨトウ <i>Spodoptera frugiperda</i>	0.096	有 ^b
チョウ目 Lepidoptera	ヤガ科 Noctuidae	アメリカタバコガ <i>Helicoverpa zea</i>	0.042	有 ^b
チョウ目 Lepidoptera	ツトガ科 Crambidae	ヨーロピアンコーンボローラー <i>Ostrinia nubilalis</i>	11	有 ^b
チョウ目 Lepidoptera	タテハチョウ科 Nymphalidae	オオカバマダラ <i>Danaus plexippus</i>	0.016	有 ^c
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	ウエスタンコーンルートワーム <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	>106 ^a	無 ^d
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	サザンコーンルートワーム <i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>	>65 ^a	無 ^d
コウチュウ目 Coleoptera	ハムシ科 Chrysomelidae	コロラドハムシ <i>Leptinotarsa decemlineata</i>	>58 ^a	無 ^d
コウチュウ目 Coleoptera	テントウムシ科 Coccinellidae	インゲンテントウ <i>Epilachna varivestis</i>	>65 ^a	無 ^d
カメムシ目 Hemiptera	カスミカメムシ科 Miridae	ウエスタンターニッシュドプラントバグ <i>Lygus hesperus</i>	>50 ^a	無 ^e
カメムシ目 Hemiptera	カメムシ科 Pentatomide	ネオトロピカルブラウンスティンクバグ <i>Euschistus heros</i>	>50 ^a	無 ^f
ハチ目 Hymenoptera	ミツバチ科 Apidae	セイヨウミツバチ <i>Apis mellifera</i>	>500	無 ^g
トビムシ目 Collembola	ツチトビムシ科 Isotomidae	オオフオルソムトビムシ <i>Folsomia candida</i>	>500	無 ^h

^a 数値は最大供試濃度において最も低めに見積もった供試飼料中の試験蛋白質濃度を示している (別添資料 3 の Table 9.7)。

^b EC₅₀ (半数影響濃度) を 5 段階以上の供試濃度で 7 日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

^c LC₅₀ (半数致死濃度) を 7 段階の供試濃度で 7 日間の給餌試験を実施した結果から推定した。

5 ^d 感受性は 7 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^e 感受性は 6 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^f 感受性は 5 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^g 感受性は 10 日間の給餌試験における生存率により評価した。

^h 感受性は 28 日間の給餌試験における生存率及び繁殖率により評価した。

⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

—

5 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR522223 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。詳細は、表 1 (p13~15) に記載した。

ロ 特性

15 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

20 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR522223 の全塩基数は 21,637 bp である。なお、PV-ZMIR522223 の塩基配列は別添資料 4 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

25 *E. coli* 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やストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

30 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

35

宿主内に移入された PV-ZMIR522223 の構成要素は 表 1 (p13~15) に記載し

た。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置に関しては、図 2 (p12) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

5

PV-ZMIR522223 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

10

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

15

非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未熟胚細胞から採取した分裂組織と PV-ZMIR522223 を含む *Agrobacterium tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、除草剤グリホサートを含有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

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

20

25

カルベニシリン二ナトリウム塩を添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、本組換えトウモロコシの F₄ 世代の種子⁸において、形質転換に用いた PV-ZMIR522223 の外側骨格領域を標的とした PCR を行ったところ、本組換えトウモロコシには PV-ZMIR522223 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 5 の Table 1, p11)。このことから、本組換えトウモロコシには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。

30

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

35

形質転換された再分化個体 (R₀) を自殖し、R₁ 世代を作出した。R₁ 世代において、1 コピーの T-DNA 領域をホモで有し、外側骨格領域をもたない個体を PCR 及びサザンブロット分析により選抜した。そして、R₂ 世代では、優れ

⁸ バルクにした収穫種子の中からランダムに約50粒取り、DNAを抽出しPCR分析に用いた。

た表現型と T-DNA 領域の存在状態などを指標に選抜を行った。選抜された R₂ 世代の個体を、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統と交配し、Cre/lox 法により T-DNA 領域から選抜マーカークセット (T-*TubA*、CS-*cp4 epsps*、TS-*CTP2* 及び P-*TubA*) 及び loxP 配列の 1 つが除去された F₁ 世代を作出した。Cre/lox 法では、2 つの lox と呼ばれる標的配列の間に位置する DNA 配列及び片方の lox 配列が、Cre リコンビナーゼによってゲノムから切り出される (Hare and Chua, 2002; Zhang et al., 2003)。以下、PV-ZMIR522223 の T-DNA 領域のうち、選抜マーカークセット及び loxP 配列の 1 つが除去された領域を「本組換えトウモロコシに導入された T-DNA 領域」または「導入遺伝子」という。その後、F₁ 個体を自殖して得られた F₂ 世代において、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない 1 個体を選抜した。したがって、本組換えトウモロコシの F₃ 世代以降には、Cre リコンビナーゼ発現カセットは存在しない (第一の 2-(4)-②, p26~27)。F₂ 世代の選抜個体を自殖して得られた F₃ 世代において、導入遺伝子をホモで有する 1 個体を選抜した。F₃ 世代の選抜個体を自殖し、F₄ 世代を得た。

本組換えトウモロコシの育成図を図 3 (p23) に示した。なお、本申請の対象は、F₄ 世代及び F₄ 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20 図3 本組換えトウモロコシの育成図

【社外秘につき非開示】

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 本組換えトウモロコシの導入遺伝子が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えトウモロコシの F₄F₂、F₄F₃、及び F₄F₄ 世代 (図 3, p23) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 6)。

10 分離比検定に供試する世代を作出するために、導入遺伝子をホモで有する F₄ 世代を、*cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子をもたないトウモロコシ系統 HCL617 と従来育種法を用いて交配し、導入遺伝子をヘミで有する F₄F₁ 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F₄F₁ 世代を自殖し、F₄F₂ 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F₄F₂ 世代を自殖し、F₄F₃ 世代を得た。導入遺伝子をヘミで有する F₄F₃ 世代を自殖し、F₄F₄ 世代を得た。F₄F₂、F₄F₃ 及び F₄F₄ 世代において、Real-Time TaqMan PCR により導入遺伝子の分離比を確認した。

15 その結果、実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子はメンデルの分離法則に矛盾せずに遺伝していることが確認された (表 4, p25)。したがって、本組換えトウモロコシの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

表 4 本組換えトウモロコシの育成過程における導入遺伝子の分離様式⁹

世代 ¹	供試個体数	実測値 ホモ陽性 個体数	実測値 ヘミ陽性 個体数	実測値 陰性個体数	1:2:1 分離				
					期待値 ホモ陽性 個体数	期待値 ヘミ陽性 個体数	期待値 陰性個体数	χ^2	p 値 ²
F ₄ F ₂	200	60	85	55	50	100	50	4.75	0.093
F ₄ F ₃	247	62	125	60	61.75	123.5	61.75	0.07	0.966
F ₄ F ₄	246	74	109	63	61.5	123	61.5	4.17	0.124

¹ 実測値は Real-Time TaqMan PCR により、導入遺伝子の有無を確認した。

5 ² 各世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (有意水準 $\alpha = 0.05$)。

⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

- 5 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、導入遺伝子の塩基配列、並びに複数世代における伝達の安定性を確認するために、次世代シーケンシング (NGS, Next Generation Sequencing) 解析¹⁰ 並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した (別添資料 7)。
- 10 NGS 解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約 150 bp ずつの塩基配列を、全ゲノムの解析に十分な量 (冗長度¹¹75 以上) で解析している。本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシから抽出したゲノムを NGS 解析に供試した結果、本組換えトウモロコシ (F₄ 世代) で 191.54 Gb (冗長度中央値 96)、対照の非組換えトウモロコシで 202.18 Gb (冗長度中央値 100) の塩基配列が解析された (別添資料 7 の Appendix Table 3, p42)。
- 15 解析した塩基配列全てを PV-ZMIR522223 の塩基配列と照合¹²した結果、本組換えトウモロコシでは2つの接合領域が特定された (別添資料 7 の p26)。これらはそれぞれ導入遺伝子の 5'及び 3'末端を含む配列であった (別添資料 7 の Appendix Figure 32, p105~107)。対照の非組換えトウモロコシでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 7 の p26)。さらに、導入遺伝子の冗長度は中央値が 96、最低値が 32 であり、導入遺伝子の全ての配列が検出されていることが確認された (別添資料 7 の Appendix Figure 5, p48)。またこの解析からは、本組換えトウモロコシには、PV-ZMIR522223 に由来する非意図的な配列が挿入されていないことも確認された (別添資料 7 の Appendix Figure 5, p48)。
- 20 さらに、解析した塩基配列全てを Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統の形質転換に用いたベクターPV-ZMOO513642 (別添資料 7 の Appendix Figure 2, p45) の塩基配列と照合した。その結果、本組換えトウモロコシには PV-ZMOO513642 に由来する配列は存在しないことが確認された (別添資料 7 の Appendix Figure 6, p49)。
- 25

¹⁰NGS解析は、塩基配列解析とバイオインフォマティクスにより、サザンブロット法と同等の分子特性解析を可能とする技術である。NGS解析においては、フラグメント化した大量のサンプルゲノムDNAの配列を解析することで、全ゲノム解析を行う。次に、これらのフラグメントの塩基配列情報を用い、T-DNA領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA領域の導入箇所数及び配列並びに非意図的断片の有無を決定する (Kovalic et al., 2012)。

¹¹冗長度: ゲノム上のすべての塩基に対して塩基配列の解析を何回行っているかの尺度。その中央値が 75 以上であればすべての挿入 DNA を検出することが可能であることが報告されており (Kovalic et al., 2012)、本試験では 1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標として、中央値が 75 以上になる条件で解析を行っている。

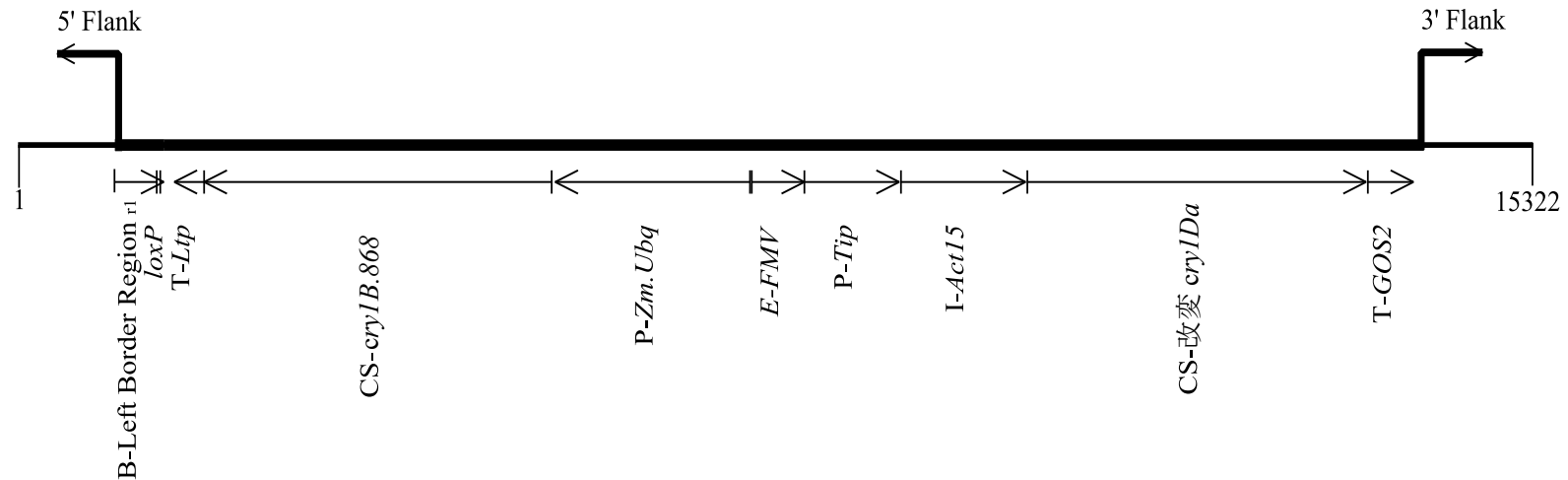
¹²Bowtie 2 v2.3.4.3 (Langmead and Salzberg, 2012) により、30 bp以上の領域で96.6 %以上の相同性が認められた配列を選抜した。

以上の解析から、本組換えトウモロコシの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの導入遺伝子が組み込まれており、ベクター由来の非意図的な配列は挿入されていないことが確認された。

- 5 また、本組換えトウモロコシにおいて検出された導入遺伝子、接合領域及び近傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、目的の遺伝子が導入されていることが確認された (別添資料 7 の Appendix Figure 8, p51-56 及び Appendix Figure 9, p57~79)。なお、本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図を図 4 (p28) に示した。

10

さらに複数世代 (F₄、F₅、F₄F₁、F₅F₁ 及び F₆F₁ 世代) の本組換えトウモロコシを対象にした NGS 解析において、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが確認された (別添資料 7 の p31)。



5 図4 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の模式図¹³

本組換えトウモロコシ中の導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図は本組換えトウモロコシ中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示している。なお、本組換えトウモロコシにおいて目的の導入遺伝子が PV-ZMIR522223 と一致した配列で導入されている。図中の「rl」の表記は、本組換えトウモロコシに導入された B-Left Border Region が PV-ZMIR522223 と比較して短くなっていることを意味する。

¹³ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 7 の p26)。

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

10 ウェスタンブロット分析により、本組換えトウモロコシの複数世代 (F₄、F₅、F₄F₁、F₅F₁ 及び F₆F₁ 世代) にわたり、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質が安定して発現していることが確認された (別添資料 8 の Figure 2, p16 及び Figure 3, p17)。

15 また、2018 年に米国の 5 カ所 (アイオワ州 2 カ所、イリノイ州、ネブラスカ州及びオハイオ州) で行ったほ場試験において、本組換えトウモロコシの葉、根、花粉、地上部及び種子のサンプルを採取し、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (別添資料 9)。その結果、本組換えトウモロコシの各組織における Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質の発現が確認された (表 5, p30 及び表 6, p30)。なお、本組換えトウモロコシ
20 の花粉における改変 Cry1Da 蛋白質の発現量は定量限界値未満であった。

表 5 本組換えトウモロコシの各組織における Cry1B.868 蛋白質の発現量 (2018 年、米国)¹⁴

組織	生育段階 ¹	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) ²	LOQ/LOD (µg/g DW) ³
葉	2 ~ 4 葉期	630 (22) 310 - 760	0.625/0.348
根	2 ~ 4 葉期	110 (8.2) 67 - 210	0.625/0.254
花粉	絹糸抽出期	91 (2.1) 73 - 110	0.625/0.323
地上部	黄熟期	110 (8.2) 50 - 170	0.625/0.455
種子	成熟期	26 (3.5) 7.8 - 77	0.625/0.420

¹ 各組織の採取時における生育段階

² 蛋白質の発現量は、組織の乾燥重 1g 当たり重量 (µg) の平均値及び標準誤差として表されている。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 - 最大値) は、全てのほ場で採取された各組織の値を基に計算されている (各組織 20 反復)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

³ LOQ = limit of quantitation (定量限界)、LOD = limit of detection (検出限界)。

10 表 6 本組換えトウモロコシの各組織における改変 Cry1Da 蛋白質の発現量 (2018 年、米国)¹⁵

組織	生育段階 ¹	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) ²	LOQ/LOD (µg/g DW) ³
葉	2 ~ 4 葉期	92 (5.2) 56 - 140	0.125/0.061
根	2 ~ 4 葉期	43 (3.1) 26 - 72	0.125/0.065
花粉	絹糸抽出期	<LOQ (NA) NA - NA ⁴	0.125/0.065
地上部	黄熟期	26 (2.1) 13 - 50	0.125/0.078
種子	成熟期	0.25 (0.032) 0.13 - 0.64	0.050/0.037

¹ 各組織の採取時における生育段階

² 蛋白質の発現量は、組織の乾燥重 1g 当たり重量 (µg) の平均値及び標準誤差として表されている。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 - 最大値) は、全てのほ場で採取された各組織の値を基に計算されている (各組織 20 反復)。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

³ LOQ = limit of quantitation (定量限界)、LOD = limit of detection (検出限界)。

⁴ NA = Not applicable (該当無し)。

¹⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

¹⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

- (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

10 本組換えトウモロコシは、本組換えトウモロコシに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して Real-time TaqMan PCR による検出及び識別が可能である (別添資料 10; 別添資料 11)。

本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 量比で 0.006 % である¹⁶ (別添資料 11, p4, p10~11)。

15 本 PCR 法の信頼性については米国バイエルグループと米国 Eurofins BioDiagnostics 社において検証され、確認されている。

- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

25 本組換えトウモロコシへ導入された *cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子は、それぞれ Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質を発現することにより、いずれもチョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。

- ② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度¹⁷

30

本組換えトウモロコシについて、「農林水産大臣がその生産又は流通を所管する遺伝子組換え植物に係る第一種使用規程の承認の申請について」(平

¹⁶ 本PCR法の検出限界値は別添資料 11 (p10~11) において5コピーと報告されている。これを表 (別添資料 11, p4) によりゲノムDNA量比に換算すれば、91,575コピー中の5コピー、すなわち 0.006%に相当する。

¹⁷ 本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

成 19 年 12 月 10 日付け 19 消安第 8999 号、環自野発第 071210001 号農林水産省消費・安全局長、農林水産省農林水産技術会議事務局長、林野庁長官、環境省自然環境局長通知) 第 3 の 1 の (6) に規定される隔離ほ場における情報収集が不要と判断されたことが、2019 年 12 月 20 日に開催された令和元年度第 2 回生物多様性影響評価検討会総合検討会において報告されている。

したがって、以下に掲げる本組換えトウモロコシの生理学的又は生態学的特性を評価するために、米国においてはほ場及び温室試験を実施した。

a 形態及び生育の特性

2018 年に米国の 8 カ所¹⁸のほ場において、本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ、及び従来商業品種 4 品種 (全ほ場合計で従来商業品種 17 種) をほ場あたり 4 反復で栽培し、10 項目 (苗立ち数、雄穂開花期までの日数、稈長、成熟期までの日数、倒伏率、落下雌穂数、最終株数、種子の水分含有率、百粒重、収量) の特性を調査した (別添資料 12)。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、上記のうち 9 項目 (苗立ち数、雄穂開花期までの日数、稈長、成熟期までの日数、倒伏率、最終株数、種子の水分含有率、百粒重、収量) について、統計解析を行った。なお、落下雌穂数については、本組換えトウモロコシにおいて平均値 0.0 本 (32 反復中 1 本)、対照の非組換えトウモロコシにおいて平均値 0.0 本 (32 反復中 1 本)、従来商業品種 17 品種において平均値 0.0~0.5 本と、いずれにおいてもほとんど落下雌穂が観察されなかったために、統計解析を行わず結果のみを記載した。

統計解析を行った 9 項目について、最終株数及び百粒重を除く 7 項目においては本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。最終株数及び百粒重においては統計学的有意差が認められたが、本組換えトウモロコシの最終株数及び百粒重の平均値 (8.2 本/m² 及び 34.1 g) は、いずれも従来商業品種の平均値の範囲内 (7.3 ~ 8.9 本/m² 及び 29.3 ~ 40.5 g) であった (別添資料 12 の Table 5, p21)。

落下雌穂数について、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシにおける平均値は同等 (0.0 本) であり、従来商業品種の平均値の範囲内であった (0.0 ~ 0.5 本) (別添資料 12 の Table 5, p21)。

¹⁸ アイオワ州 (3カ所)、イリノイ州 (2カ所)、インディアナ州、ネブラスカ州、オハイオ州。

b 生育初期における低温耐性

生育初期における低温耐性試験は、米国のバイエルグループの人工気象室において実施した (別添資料 13)。生育初期における低温耐性を比較するために、本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ、及び従来商業品種 4 品種の幼苗 (3 葉期) を、日中 12°C/夜間 5°C に設定した人工気象室において 10 反復で栽培した。低温処理開始後 10 日目に草丈を、19 日目に草丈及び乾燥重を調査し、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの草丈及び乾燥重について、統計解析を行った。

その結果、草丈及び乾燥重のいずれも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統計学的有意差は認められなかった (別添資料 13 の Table 2, p6)。

c 成体の越冬性

トウモロコシは夏型一年生植物であり、通常は、結実後、冬季に自然に枯死する。結実後に再生長して栄養繁殖することや、種子を生産することはない。2019 年に米国のは場 (ノースカロライナ州) で実施した栽培試験において、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシのいずれも収穫時に枯死していることを確認した (別添資料 14 の Figure 1, p2 及び Figure 2, p3)。

d 花粉の稔性及びサイズ

2018 年に米国の 1 ヲ所 (イリノイ州) のは場において、本組換えトウモロコシ、対照の非組換えトウモロコシ、及び従来商業品種 4 品種を 4 反復で栽培し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを調査した。その結果、花粉の稔性及びサイズ共に本組換えトウモロコシ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 (別添資料 15 の Table 2, p13)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

生産量：

第一の 2-(6)-②-a (p32) に記載したとおり、収量に関して、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

脱粒性：

トウモロコシの完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

第一の 2-(6)-②-a (p32) に記載した 2018 年の米国におけるほ場試験において、本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で脱粒性の
5 差異は報告されていない。

休眠性及び発芽率：

2018 年に米国の 1 ヲ所 (ハワイ州) のほ場にて収穫された本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシ、並びに従来商業品種 4 品種の種子を
10 4 反復各約 100 粒ずつ温室にて播種し、Association of Official Seed Analysts (AOSA) が標準試験法とする 2 つの温度条件、至適条件 (25°C 7 日間) 及び準至適条件 (10°C 7 日間/25°C 4 日間) において、種子の発芽試験を実施した。試験においては、種子の発芽率、死亡種子率、並びに生存種子における吸水膨潤状態種子率 (viable firm-swollen) 及び硬実種子率を調査した (別添資料 16)。

試験の結果、本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの発芽率は、それぞれ至適条件下で 99.5% 及び 100.0%、準至適条件下で 99.3% 及び 100.0% であった。いずれの温度条件下でも、発芽率を含む全ての項目で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統計学的有意差は認められなかった (別添資料 16 の Table 3, p18)。
15

f 交雑率

20

日本にはトウモロコシと交雑可能な近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。
25

g 有害物質の産生性

土壌微生物相試験：

2020 年に米国のバイエルグループの温室において本組換えトウモロコシ、
30 対照の非組換えトウモロコシ、及び従来商業品種 6 品種を 6 反復で栽培し、土壌微生物相試験を行った (別添資料 17)。

その結果、土壌微生物の菌数について本組換えトウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 17 の Table 1, p5)。
35

鋤込み試験及び後作試験：

2020 年に米国のバイエルグループの温室において本組換えトウモロコシ、
対照の非組換えトウモロコシ及び従来商業品種 6 品種を 6 反復で栽培し、鋤
込み試験及び後作試験を行った (別添資料 18)。鋤込み試験及び後作試験にお
いては、検定植物 (ハツカダイコン) の発芽株数、草丈、及び乾燥重を調査し
た。

その結果、いずれの試験におけるいずれの調査項目においても、本組換え
トウモロコシ区と対照の非組換えトウモロコシ区との間に統計学的有意差は
認められなかった (別添資料 18 の Table 1, p5)。

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

—

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えトウモロコシの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は表 7 (p37) のとおりである。

表7 本組換えトウモロコシの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請予定¹⁹

2021年6月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2020年2月	—
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2020年2月	—
ブラジル国家バイオ安全技術委員会 (CTNBio)	環境・食品・飼料	2020年5月	2020年12月
米国農務省 (USDA)	環境	2020年7月	—
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2020年8月	—
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2021年4月	—

5

なお、本組換えトウモロコシのわが国における申請状況は以下のとおりである (表8, p37)。

表8 本組換えトウモロコシのわが国における申請及び認可状況²⁰

10

2021年6月現在

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ²¹	2021年6月	—
農林水産省	飼料 ²²	2021年5月	—
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 ²³ : 一般使用)	2021年6月	—

¹⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

²⁰ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

²¹ 食品衛生法に基づく。

²² 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

²³ 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²⁴

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

10

競合における優位性に関わる諸形質として、本組換えトウモロコシの形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を米国において調査した(第一の2-(6)-②-a~e, p32~34)。その結果、統計解析を行った項目では、形態及び生育の特性に関する項目の最終株数及び百粒重においてのみ、本組換えトウモロコシ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が認められた。しかし、本組換えトウモロコシの最終株数及び百粒重の平均値

15

(8.2 本/m² 及び 34.1 g) は、いずれも従来商業品種の平均値の範囲内 (7.3 ~ 8.9 本/m² 及び 29.3 ~ 40.5 g) であった。したがって、本試験で認められた最終株数及び百粒重の差は、非組換えトウモロコシの種内品種間変動の範囲内であり、本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

20

また、トウモロコシは、栽培化の過程で雑草性や自生能力、すなわち非農耕地で人間の手助けなく繁殖し、個体群を存続させる能力を失っている(OECD, 2003; Nakai et al., 2015; 後藤ら, 2018)。わが国においても、これまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。自生能力をもたない栽培作物を宿主とした遺伝子組換え作物が競合における優位性を獲得するには、まず自生能力を獲得することが必要であり、それには自生能力に必須の特性である種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている(後藤ら, 2018)。

25

本組換えトウモロコシには、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、これは上記特性に関与する形質ではない。このことから、この形質の付与により栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性が高まるとは考えにくい。

30

²⁴ 本項目中で、第一の2-(6)-②のa~gに記載された試験結果に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

以上のことから、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

5

—

(3) 影響の生じやすさの評価

10

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

15

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

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

20

トウモロコシはわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生は報告されていない。

25

本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を米国の温室において行った (第一の 2-(6)-②-g, p34~35)。その結果、これらの試験におけるいずれの調査項目においても、本組換えトウモロコシ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。したがって、有害物質の産生性について、本試験において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で差は見いだされなかった。

30

35

また、本組換えトウモロコシ中では、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質が発現しているが、いずれも既知アレルゲンと類似性のある配列を有していないことが確認されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p17)。また、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質は酵素活性をもたないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられる。

本組換えトウモロコシ中で発現する Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質は、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示すが、それ以外の昆虫種に対しての殺虫活性は認められていない (表 2, p18 及び表 3, p19)。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現する Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質により何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物等として、わが国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。チョウ目昆虫が、自然環境下で Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質に曝露される可能性のある経路は、幼虫がトウモロコシ栽培ほ場内で本組換えトウモロコシを直接食餌する場合及びほ場外で飛散した花粉を食餌する場合に限定される。一般的に、トウモロコシの慣行栽培においてチョウ目昆虫は防除対象とされており、広くチョウ目に対して活性を有する殺虫剤がほ場において使用されていることから、ほ場内において本組換えトウモロコシを直接食餌することによる影響は、慣行栽培による影響を超えないと考えられる。したがって、ほ場外へ飛散した花粉をチョウ目昆虫の幼虫が食餌することによる影響について以下に検討した。

チョウ目昆虫のうち、環境省レッドリスト 2020 (環境省, 2020a) に絶滅危惧種及び準絶滅危惧種として掲載されているものは 199 種である。これら 199 種について、「わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価」 (山本ら, 2003) を参考に、分布域や生息環境、幼虫の食草、幼虫の生育期とトウモロコシの開花期の重なり合いの点から絞り込みを行った。その結果、影響を受ける可能性が否定できない種として 30 種が特定された (表 9, p41~44)。68 種については影響評価のための情報が不足していた (表 9, p44~51)。残りの 101 種については影響を受ける可能性は無いと判断した。

なお、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質が殺虫活性を示したオオカバマダラ (*D. plexippus*) は、わが国においては迷蝶として小笠原諸島などで発見された例はあるものの、定着しているとの報告はない (矢田, 2007)。また、オオカバマダラはタテハチョウ科マダラチョウ亜科に属するが、わが国に生息するマダラチョウ亜科のうち、環境省レッドリスト 2020 において絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されている種は存在しない。

表9 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているチョウ目昆虫

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
影響を受ける可能性があるチョウ目昆虫						
絶滅危惧ⅠA類 (CR)						
オオルリシジミ本州亜種	<i>Shijimiaeoides divinus barine</i>	半自然草原	マメ科のクララ	年1化	九州5月上旬～中旬、長野県伊那地方6月上旬頃、佐久地方や妙高高原5月下旬～6月上旬、青森県下の産地では5月下旬より発生して6月上～中旬頃が最盛期	蛹
ヒメヒカゲ本州中部亜種	<i>Coenonympha oedippus annulifer</i>	半自然草原 (主に湿性草原)	カヤツリグサ科のスゲ類	年1化	暖地では6月中・下旬から、寒地では7月上・中旬	幼虫
ウスイロヒヨウモンモドキ	<i>Melitaea protomedia</i>	乾性草原	オミナエシおよびカノコソウ	年1化	低標高地では6月中旬から下旬、高標高地では7月上旬から中旬	幼虫
ヒヨウモンモドキ	<i>Melitaea scotosia</i>	湿性草原	キク科のキセルアザミやタムラソウ	年1化	低標高地では6月上旬、低山帯で7月上旬、高原地域では7月中～下旬	幼虫
アサギリヨトウ (キシダムラサキヨトウ)	<i>Sideridis incommoda</i>	静岡県富士宮市朝霞高原のみに分布、生息環境はススキ草原	ヨモギ (キク科)	年1化	8月	蛹
絶滅危惧ⅠB類 (EN)						
チャマダラセセリ	<i>Pyrgus maculatus maculatus</i>	山地の広い草原、ところどころに二次林があり、近くに耕作地があるような人為の影響を受けた環境、人家、畑地など	バラ科のキジムシロ、ミツバチグリなど	年1～3化	本州では通常年2化、5～6月、7～8月頃	蛹
ツマグロキチョウ	<i>Eurema laeta betheseba</i>	採草地、農地、河川敷、河川堤防	マメ科のカワラケツメイ	年3～4化	秋型は9月下旬頃から、夏型は5月下旬頃から出現	成虫

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
ヤマキチョウ	<i>Gonepteryx rhamni maxima</i>	明るい疎林や林縁部、草原、湿地。食樹は火山の裾野などの高原地帯に多い	クロツバラ	年1化	7～8月	成虫
ヒメシロチョウ	<i>Leptidea amurensis</i>	採草地、農地、河川堤防、人家周辺、林縁	マメ科のツルフジバカマなど	多化	本州、九州では4月中下旬～5月、6月下旬、7月上旬～下旬、8月中旬～9月の年3化、寒冷地では5～6月、7月の年2化	蛹
ミヤマシジミ	<i>Plebejus argyrognomon praeterinsularis</i>	採草地、農地、河川敷、河川堤防	マメ科のコマツナギ	多化	5月中旬～11月上旬	卵
オオルリシジミ九州亜種	<i>Shijimiaeoides divinus asonis</i>	半自然草原	マメ科のクララ	年1化	九州5月上旬～中旬、長野県伊那地方6月上旬頃、佐久地方や妙高高原5月下旬～6月上旬、青森県下の産地では5月下旬より発生して6月上～中旬頃が最盛期	蛹
シルビアシジミ	<i>Zizina emelina</i>	河川堤防、農地、採草地	マメ科のミヤコグサ、ヤハズソウ、シロツメクサなど	多化	4月下旬～11月	幼虫
ヒメヒカゲ本州中部・近畿・中国地方亜種	<i>Coenonympha oedippus arothius</i>	半自然草原(主に湿性草原)	カヤツリグサ科のヤチカワズスゲやショウジョウスゲなどのスゲ類など	年1化	6～7月	幼虫
コヒョウモンモドキ	<i>Melitaea ambigua nippona</i>	半自然草原	ゴマノハグサ科のクガイソウ、オオバコなど	年1化	低山帯では6月下旬から出現し7月中旬頃が最盛期、標高1500m付近では7月中旬頃から現れ7月下旬が最盛期	幼虫
ミツモンケンモン	<i>Cymatophoropsis trimaculata</i>	クロウメモドキ、クロツバラが生える疎林	クロウメモドキ科のクロウメモドキ、クロツバラ	年2化	5～6月及び7～8月	蛹
絶滅危惧Ⅱ類 (VU)						
ウラギンスジヒョウモン	<i>Argyronome laodice japonica</i>	採草地、農耕地周辺、河川堤防、疎林などの草原	スミレ類	年1化	5～10月	卵

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
ヒヨウモンチョウ本州中部亜種	<i>Brenthis daphne rabdia</i>	湿潤な草原あるいは溪畔などの湿地	ワレモコウ、ナガボノシロワレモコウ	年1化	6月中旬～8月下旬	幼虫
ウラナミジャノメ日本本土亜種	<i>Ypthima multistriata nipponica</i>	疎林、草原、湿地	イネ科のシナダレスズメガヤ、イヌビエなど、カヤツリグサ科のショウジョウスゲ	年1化	7～8月	幼虫
ガマヨトウ	<i>Capsula aerata</i>	北海道、本州。寄主植物がある湿地環境に生息する。	ガマ(ガマ科)	年1化	7～8月	不明
キスジウスキヨトウ	<i>Capsula sparganii</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬、湿地環境に生息	ガマ(ガマ科)、ミクリ(ミクリ科)	年1化	6～9月	不明
準絶滅危惧 (NT)						
ギンイチモンジセセリ	<i>Leptolina unicolor</i>	山地および平地や丘陵地の草原	ススキ、チガヤなど	年1～3化	寒冷地では年1化(6～7月)、それ以外の場所では2～3化	幼虫
カバイロシジミ	<i>Glaucopsyche lycormas</i>	北海道、青森県北部の津軽半島と下北半島の海岸沿い。分布は狭い地域。	マメ科のクサフジ、オオバクサフジ、ヒロハノクサフジ、クララ、ムラサキツユクサ、アカツメクサ	年1化	5月下旬～9月上旬	蛹
ヒヨウモンチョウ北海道・本州北部亜種	<i>Brenthis daphne iwatensis</i>	湿潤な草原あるいは溪畔などの湿地	ワレモコウ類、オニシモツケ、エゾノシモツケソウ	年1化	6月中旬～8月下旬	幼虫
カラフトヒヨウモン	<i>Clossiana iphigenia</i>	札幌市以東の低山地から山地	ミヤマスミレ・エゾノタチツボスミレ・アイヌタチツボスミレなど	年1化	5月下旬～8月	幼虫
シロオビヒメヒカゲ北海道西部亜種	<i>Coenonympha hero neoperseis</i>	北海道南西部の開けた草地	ヒカゲスゲ、ヒメノガリヤス、スズメノカタビラなど	年1化	6月中・下旬頃	幼虫
クワトゲエダシャク	<i>Apochima excavata</i>	北海道、本州、九州。桑林。	クワ(クワ科)、ソメイヨシノ、リンゴ(バラ科)	年1化	初夏	蛹
オナガミズアオ	<i>Actias gnoma</i>	北海道、本州、四国、九州。落葉の中で繭を作ることもある(冬)。	ハンノキ、カワラハンノキ、ヤシャブシ(カバノキ科)	年1～2化	初夏～秋	蛹

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
マエアカヒトリ	<i>Aloa lactinea</i>	本州、四国、九州、屋久島、トカラ列島、沖縄島、石垣島、西表島。畑地および、その周辺の畦、農道、小川の縁などの草地。	ネギ (ネギ科)、ダイズ (マメ科)、トウモロコシ (イネ科)、ミソハギ (ミソハギ科)	年2化	6～7月	不明
ハマヤガ	<i>Agrotis desertorum</i>	本州 (秋田県、新潟県、石川県の海岸砂浜)	カワラヨモギ	年1化	8月中旬～9月中旬	幼虫
キシタアツバ	<i>Hypena claripennis</i>	宮城県付近を北限。四国、九州、対馬に至る。人里的な環境を好む。	ヤブマオ (イラクサ科)	不明	4～9月	前蛹
情報不足であったチョウ目昆虫						
絶滅危惧ⅠA類 (CR)						
カバシタムクゲエダシヤク	<i>Sebastosema bubonaria</i>	本州。疎林のある河川敷。	不明	年1化	3～4月	不明
ノシメコヤガ	<i>Sinocharis korbae</i>	岩手県盛岡市内。人里的な環境。	不明	年1化	6～7月	不明
絶滅危惧ⅠB類 (EN)						
ミスジコスカシバ	<i>Scalarignathia montis</i>	長野県軽井沢町追分と岡谷市高ボッチのみ。標高 1,000m 以上の山地の草原が生息地。	不明	不明	不明	不明
チャホシホソバナミシヤク	<i>Brabira kasaii</i>	青森県下北郡東通村大利	幼虫は未発見。同属のキリバナホソナミシヤクはウド (ウコギ科) を食べる。	推定年1化	7～8月	不明
ヒトスジシロナミシヤク本州亜種	<i>Epirrhoe hastulata echigoensis</i>	新潟県糸魚川市葛葉峠	不明。ヨーロッパの名義タイプ亜種はヤエムグラを食す。	年1化	5月上旬	不明
ソトオビエダシヤク	<i>Isturgia arenacearia</i>	河川敷内のマメ科草本の粗生する乾性草原。マコモ、ヨシなどが密生した場所にはいない。本州 (長野県)。	ツルフジバカマ、クサフジ、ヤハズエンドウなどマメ科植物	年2化以上	5～9月	不明
ヘリグロヒメヨトウ	<i>Condica illustrata</i>	長野県松本盆地周辺の丘陵地、八坂村、明科町	キク科	不明	不明	不明

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
オガサワラヒゲヨトウ	<i>Dasypolia fani</i>	本州の内陸部、セリ科植物のある草原	不明。ヨーロッパの同属種では大型のセリ科を食す。	年1化	初冬、翌年3～4月	成虫
オイワケクロヨトウ	<i>Lacanobia aliena</i>	北海道定山溪、青森県手賀町、長野県菅平高地の草原と関係すると思われる	ホースシューヴェッチ (マメ科、 <i>Hippocrepis comosa</i> L.) などの草本類を食べる	年1化	6月	不明
クロコシロヨトウ	<i>Leucapamea hikosana</i>	九州 (福岡県英彦山)	不明。同属のコマエアカシロヨトウはスゲ属の一種 (カヤツリグサ科) を食べる。	推定年2化	不明	不明
ミスズコヤガ	<i>Paraphyllophila confusa</i>	長野県長野市飯縄高原と大町市葛温泉のみ。ガマ、ヨシなどが優占する湿地。	産卵管の形状から単子葉類を食している可能性が高い	年1化	7月	不明
コンゴウミドリヨトウ	<i>Staurophora celsia</i>	岡山県新見市の草原	ヨーロッパではイネ科	年1化	11月	不明
絶滅危惧Ⅱ類 (VU)						
アシナガモモブトスカシバ	<i>Macroscelesia longipes</i>	本州、四国、中国の平地のゴキヅルが生える水辺	ウリ科のゴキヅルの実から幼虫、茎から蛹が採取されている	年2化	6～10月	不明
ベニモンマダラ道南亜種	<i>Zygaena nippona hakodatensis</i>	北海道函館周辺。青森県、岩手県も同じ特徴を有するので最近、本亜種に含められた。草地に生息。	クサフジ (マメ科)	年1化	7～8月	幼虫
クロフカバシャク	<i>Archiearis notha okanoi</i>	青森県、岩手県、ゴルフ場との境のイタリアポプラ	イタリアポプラ (ヤナギ科) が知られているが、セイヨウハコヤナギ、ヤマナラシ (ヤナギ科) でも飼育可能	年1化	4～5月	不明
アキヨシトガリエダシャク	<i>Hypoxystis pulcheraria</i>	山口県美弥市秋吉台のみ。カルスト台地の草原。	不明。バラ科植物を与えたが、全く食いつかなかったという。	年2化	6～7月と8～9月	不明

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
ヒロバカレハ	<i>Gastropacha quercifolia</i>	宮城県仙台市、長野県軽井沢町、御代田町、静岡県富士宮市、裾野市などの草原	野外では不明だが、サクラ (バラ科) で飼育可能	年1化	8月	不明
スキバホウジャク	<i>Hemaris radians</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬、沖縄島、西表島	オミナエシ、オトコエシ、スイカズラ (以上スイカズラ科)、アカネ (アカネ科)	不明	5～9月	不明
ミヤノスゲドクガ	<i>Laelia miyanoi</i>	本州 (愛知県、岐阜県)	不明。本属の他の種はイネ科やカヤツリグサ科などを食べる。	不明	6～7月	不明
ヌマベウスキヨトウ	<i>Chilodes pacificus</i>	北海道、本州。ヨシ草原を中心とした湿地環境に生息。東京荒川河川敷では5～6月に水辺のヨシ原に多産する。	不明。シルクメイトによる人工飼育に成功している。生息地からヨシ、マコモなどイネ科やカヤツリグサ科の湿地植物に依存していると考えられる。	不明	5～10月	不明
キュウシュウスジヨトウ	<i>Doerriesa coenosa</i>	本州 (千葉県、三重県)、九州、対馬。海岸の湿地。	不明	推定年2化	5～8月	不明
エゾスジヨトウ	<i>Doerriesa striata</i>	北海道、本州。湿地環境。	不明。採集記録などから、モウセンゴケを伴う傾斜地の貧栄養湿地が本種の生息環境と推測される。生息地からヨシ、マコモなどイネ科やカヤツリグサ科の湿地植物に依存していると考えられる。	推定年2化	6～9月	不明
シラユキコヤガ	<i>Eulocastra sasakii</i>	秋田県、福井県、岐阜県、愛知県の小規模な湿地	幼虫の食草としてヌマガヤが報告されている。	年1化	7月	不明
オオチャバネヨトウ	<i>Nonagria puengeleri</i>	北海道、本州、九州の湿地環境	ガマ (ガマ科)	年1化	7～8月	不明

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
ギンモンアカヨトウ	<i>Plusilla rosalia</i>	北海道、本州、四国、九州。 低湿地、河川敷、火山草原。 低湿地でよく検出されており、水辺を好むものと思われる。	ヤナギタデ (タデ科)	不明	4～9 月	不明
マガリスジコヤガ	<i>Protodeltote wiscotti</i>	北海道東部。本州では極めて少ない。沼沢地で採集される。	不明	年 1 化	7～8 月	不明
エゾクシヒゲモンヤガ	<i>Pseudohermionassa velata</i>	北海道 (北部、東部) の湿原	不明	年 1 化	7 月	不明
イチモジヒメヨトウ	<i>Xylomoia fusei</i>	本州。沼沢地や河川敷に限られた低湿地環境。	クサヨシ (イネ科)	年 1 化	5 月	不明
クシロモクメヨトウ	<i>Xylomoia graminea</i>	北海道、本州 (秋田県)。限られた低湿地環境。	ヨシ (イネ科)	年 1 化	7～8 月	不明
準絶滅危惧 (NT)						
ハイイロボクトウ	<i>Phragmataecia castaneae</i>	北海道、本州、四国、九州の湿地	ヨシ (イネ科)	年 1 化	6～7 月	不明
ヤホシホソマダラ	<i>Balataea octomaculata</i>	本州、四国、九州	イネ科のササ、タケ類、ヌマガヤ	年 1 化	6～8 月	不明
ツシマキモンチラシ	<i>Eterusia watanabei</i>	本州 (和歌山県、広島県) と対馬	野外では不明だが、ヒサカキ (サカキ科) で飼育できる	年 1 化	6～7 月	不明
ルリハダホソクロバ	<i>Rhagades pruni</i>	本州、九州、対馬、五島列島などの火山性草原や河川敷	ズミ (バラ科)	年 1 化	6～8 月	不明
ベニモンマダラ本土亜種	<i>Zygaena nippona nippona</i>	長野県や山梨県で局所的に細々と残存している。草原に生息。	クサフジ、ツルフジバカマ (マメ科)	年 1 化	7～8 月	幼虫
ゴマフツトガ	<i>Chilo pulveratus</i>	本州 (群馬県、静岡県、愛知県、三重県)、沖縄島の湿地。	不明	年 1 化	7 月	不明

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
モリオカツトガ	<i>Chrysoteuchia moriokensis</i>	北海道、本州 (東北地方、関東北部、北陸) の湿地に局地的分布。高原のヨシなどが生える冷涼な湿原と考えられる。	不明。同属のテンスジツトガはムギ (イネ科) を食べる。	不明	7～8 月	不明
カワゴケミズメイガ	<i>Paracymoriza vagalis</i>	九州 (宮崎県、鹿児島県) と屋久島	カワゴケソウ、カワゴロモ	多化性	5～10 月	不明
ムナカタミズメイガ	<i>Parapoynx ussuriensis</i>	北海道と本州 (新潟県以北)	イネ (イネ科)、タヌキモ (タヌキモ科)	年 2 化	6～7 月と 8～9 月	不明
シロマダラカバナミシャク	<i>Eupithecia extensaria</i>	北海道、本州の草原	不明。ヨーロッパではヨモギ類 (キク科)。	年 1 化	6～7 月	不明
ヒメスズメ	<i>Deilephila askoldensis</i>	北海道、本州、四国、九州の火山性草原や河川敷	カワラマツバ、キバナカワラマツバ (アカネ科)	年 1 化	6～7 月	不明
クワヤマエグリシャチホコ	<i>Ptilodon kuwayamae</i>	北海道、本州、四国、九州の山地の草原	マメ科ヤマハギの単食性。ヤナギ科のヤナギ類でも飼育できる。	年 2 化	6 月と 8 月	不明
カバイロシャチホコ	<i>Ramesa tosta</i>	本州、四国、九州の草地	メヒシバ (イネ科)	年 2 化	5 月と 8 月	不明
ウスジロドクガ	<i>Calliteara virginea</i>	東北地方や本州中部の草原	ハギ類 (マメ科)	年 1 化	5～6 月	不明
トラサンドクガ	<i>Kidokuga torasan</i>	本州、四国、九州、対馬の草地	野外の食草は不明だが、クヌギ (ブナ科) で飼育されている	年 2 化	5 月と 7～8 月	不明
スゲドクガ	<i>Laelia coenosa</i>	北海道と本州の湿地	マツカサススキ (カヤツリグサ科)、ヒメガマ (ガマ科)、ヨシ (イネ科)	年 2 化	5～6 月と 8～9 月	不明
シロホソバ	<i>Eilema degenerella</i>	北海道、本州、四国、九州	地衣類	年 2 化	5～8 月	不明
ヤネホソバ	<i>Eilema fuscodorsalis</i>	本州 (宮城県以西)、四国、九州、対馬、屋久島、南西諸島。わらぶき屋根の農家などで発生。	地衣類、コケ類	年 3～4 化	4～9 月	不明

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
ゴマベニシタヒトリ	<i>Phyparia purpurata</i>	本州、長野県諏訪湖周辺や浅間山周辺の高原性草原	キンギンボク(スイカズラ科)、オオバコ(オオバコ科)、ヤブムグラ(アカネ科)、ノコギリソウ(キク科)	年1化	7月	不明
ミカボコブガ	<i>Meganola mikabo</i>	北海道(南西部)、本州、九州のカシワ林	カシワ(ブナ科)	年1化	8月	不明
チョウカイシロコブガ	<i>Nola umetsui</i>	秋田県の鳥海山麓のにかほ市冬師の湿地のみ。	不明。本属の他の種ではシソ科、スイカズラ科(ツマグロコブガ)、カヤツリグサ科(クロスジシロコブガ)、マンサク科(クロフマエモンコブガ)、ブナ科、カバノキ科、バラ科(カバイロコブガ)などが知られている。	年1化	7~8月	不明
ウスズミケンモン	<i>Acronicta carbonaria</i>	本州、四国、九州。産出は局地的でまれ。クヌギを主とする二次林。	クヌギ(ブナ科)	年2化	5月および7~8月	不明
クビグロケンモン	<i>Acronicta digna</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬の湿地環境	カキツバタ(アヤメ科)、イタドリ(タデ科)	年2化	4~5月と7~8月	不明
ウスジロケンモン	<i>Acronicta lutea</i>	北海道、本州(青森県、岩手県、秋田県、長野県)の草原	ワレモコウ(バラ科)	年1化	5~6月	不明
アカヘリヤガ	<i>Adisura atkinsoni</i>	関東地方以西の本州、四国、九州	フヨウ(アオイ科)、フジマメ、ノアズキ(マメ科)	年1化	8~9月	不明
コシロシタバ	<i>Catocala actaea</i>	北海道、本州、四国、九州のクヌギやコナラの二次林	クヌギなど(ブナ科)	年1化	6~10月	不明
ミヤマキシタバ	<i>Catocala ella</i>	北海道、本州。本州では主に長野県以東に分布するが、関東地方の平野部からの記録はない。	ハンノキ(カバノキ科)	年1化	7~9月	不明
ヒメシロシタバ	<i>Catocala nagioides</i>	北海道、本州、四国、九州、対馬の冷温帯の山地	カシワ(ブナ科)	年1化	6~10月	不明

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
カギモンハナオイアツバ	<i>Cidaripura signata</i>	本州、四国、九州、屋久島。 明るい雑木林の林縁や河川敷 などの草地	不明。同属のキスジハナオイ アツバは藻類を食べる。	年 1～2 化	5～7 月	不明
アオモンギンセダカモクメ	<i>Cucullia argentea</i>	秋田県から福井県にかけての 日本海沿岸と瀬戸内海沿岸の 海岸草原や岐阜県の河川敷、 秋吉台などの石灰岩台地およ び長崎県、佐賀県の県境の草 原	カワラヨモギ (キク科)	年 1 化	8～9 月	不明
ホシヒメセダカモクメ	<i>Cucullia fraudatrix</i>	北海道、本州中部に分布。本 州中部では高原地帯や河川敷 などに生息し、やや局所的。	ヨモギ、オオヨモギ (キク科)	年 1 化	8～9 月	蛹
ギンモンセダカモクメ	<i>Cucullia jankowskii</i>	北海道、本州、九州に分布す るが分布は局所的で河川敷や 火山性草原などに生息	ヨモギ、オオヨモギ (キク科)	年 1 化	8～9 月	不明
ダイセンセダカモクメ	<i>Cucullia mandschuriae</i>	本州や九州の草原に局所的	ノコンギク、ユウガギク (キク 科)	年 1 化	8～9 月	不明
ウスミミモンキリガ	<i>Eupsilia contracta</i>	北海道、本州、四国、九州の ハンノキの自生する湿地	ハンノキ (カバノキ科)	年 1 化	冬季	不明
ヒダカミツボシキリガ	<i>Eupsilia hidakaensis</i>	北海道日高地方 (新冠町)	野外では未知だが、シナノキ (アオイ科) で飼育されている	年 1 化	冬季	成虫
ギンスジアカヤガ	<i>Heliothis bivittata</i>	長崎県大野原の自衛隊演習地 の草原	不明	不明	8 月下旬	不明
ミスジキリガ	<i>Jodia sericea</i>	北海道、本州、四国、九州、 クヌギやコナラの二次林	クヌギ、アラカシ、カシワ (以 上ブナ科)	年 1 化	冬季	成虫
ツリフネソウトラガ	<i>Sarbanissa yunnana</i>	九州 (大分県、熊本県) の九重 山、阿蘇山	ツリフネソウ、キツリフネ、 ハガクレツリフネ (ツリフネソ ウ科)	年 2 化	6 月と 8 月	不明

和名	学名	分布域、生息環境	幼虫の食草	化性	成虫発生期	越冬態
ニセトガリヨトウ	<i>Virgo confusa</i>	北海道南部から九州にかけて分布し、平地から低山地の草原に生息	不明	推定年 1 化	8～10 月	不明

井上ら (1982)、福田ら (1982; 1983; 1984a; 1984b)、山本ら (1987)、手代木 (1990; 1997)、中村ら (1996)、吉松 (1994)、秋田県 (2002)、長野県 (2004)、青木ら (2005)、白水 (2006)、矢田 (2007)、石川県 (2009)、岐阜県 (2010)、岸田 (2011a; 2011b)、矢野 (2011)、駒井ら (2011)、安田 (2010; 2012)、みんなで作る日本産蛾類図鑑 (2012)、山口むしの会 (2013)、及び環境省 (2015; 2017; 2018; 2020a; 2020b) を生態的知見の調査に用いた。

(2) 影響の具体的内容の評価

B. thuringiensis で発現させた精製蛋白質を用いた生物検定により、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質はチョウ目昆虫に対してのみ殺虫活性を示すことが確認された (表 2, p18 及び表 3, p19)。チョウ目昆虫であるツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*)、アメリカタバコガ (*H. zea*) 及びヨーロピアンコーンボラー (*O. nubilalis*) に対する EC₅₀ 値は、Cry1B.868 蛋白質ではそれぞれ 0.15、120 及び 9.8 µg/mL diet、改変 Cry1Da 蛋白質ではそれぞれ 0.096、0.042 及び 11 µg/mL diet であった。また、オオカバマダラに対する LC₅₀ 値は、Cry1B.868 蛋白質では 0.077 µg/mL diet、改変 Cry1Da 蛋白質では 0.016 µg/mL diet であった。

ここで、自然環境下で本組換えトウモロコシの花粉を食餌することによるチョウ目昆虫への影響を定量的に評価するために、感受性を示したオオカバマダラに対する本組換えトウモロコシの花粉を用いた生物検定を追加的に実施した。その結果、オオカバマダラへの花粉の LC₅₀ 値は 30 粒/cm² であることが示された (別添資料 19 の Figure 1, p3)。

(3) 影響の生じやすさの評価

第二の 2-(1) (p39~40) で特定されたチョウ目昆虫が本組換えトウモロコシから飛散した花粉を食餌することで受けうる影響の生じやすさについて、同項目で調査した生態的知見に加え、トウモロコシほ場周辺に飛散する花粉量に関する国内外の文献報告をもとに評価した。

わが国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) の葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査した研究では、ほ場の縁から 5 m 離れた場合の最大花粉堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm²、イヌホオズキの葉で 22.2 粒/cm²、ほ場から 10 m 離れた場合はヒマワリの葉で 7.4 粒/cm² へと減少していた (表 10, p53) (Shirai and Takahashi, 2005)。

また、北米ではより大規模な調査が行われている。全 7 ヲ所のトウモロコシほ場周辺で、延べ 1,700 本以上のトウワタ (*Asclepias syriaca*) を用いて花粉堆積密度を調査した結果、トウモロコシほ場から 1 m、2 m、4 ~ 5 m 離れるにつれて、花粉の平均堆積密度は 35.4 粒/cm²、14.2 粒/cm²、8.1 粒/cm² へと減少していくことが明らかとなっている (表 11, p53) (Pleasants et al., 2001)。

これらの報告に基づけば、トウモロコシほ場周辺に堆積する花粉量はほ場から離れるほど低下し、10 m 離れると 10 粒/cm²以下になると考えられる。

5 表 10 日本で行われたトウモロコシほ場周辺におけるトウモロコシ花粉の堆積密度調査 (Shirai and Takahashi, 2005)

場所	ほ場面積	植物	ほ場からの距離に対する平均堆積密度の範囲 (粒/cm ²)				
			0 m	1 m	2 m	5 m	10 m
日本 (筑波)	49 m ²	ヒマワリ	4.7-81.7	2.8-155.4	0.6-84.1	0.0-19.6	0.0-7.4
		イヌホオズキ	3.3-71.1	4.5-150.3	0.7-145.5	0.0-22.2	-

表 11 北米で行われたトウモロコシほ場周辺におけるトウモロコシ花粉の堆積密度調査 (Pleasants et al., 2001)

場所	ほ場面積	植物	ほ場からの距離に対する平均堆積密度 (粒/cm ²)			
			0 m	1 m	2 m	4~5 m
米国 (メリーランド)	8 ha	トウワタ	63.1	35.4	14.2	8.1
カナダ (オンタリオ)	4.8-17.2 ha (6 箇所)					

10

したがって、特定されたチョウ目昆虫が、最も高い感受性を示したチョウ目昆虫であるオオカバマダラの幼虫の生存に影響を与えうる量の花粉に継続的に曝露される可能性は、トウモロコシほ場の周辺数 m 以内に限定され、10 m を超えると花粉への曝露はほとんど無くなると考えられた。

15

生態的知見を鑑みれば、特定されたチョウ目昆虫がトウモロコシほ場周辺という限定された環境に局所的に生息しているとは考えがたい (表 9, p41~51)。なお、特定されたチョウ目昆虫のうち、準絶滅危惧種であるマエアカヒトリは、かつてはネギやダイズ、トウモロコシを食害する害虫として知られていた。その生息数が減少したことから第 4 次レッドリストにおいて準絶滅危惧種に区分されたが、近年再び生息数は増加しているとみられている (環境省, 2015)。加えて、幼虫はネギ、ダイズ、トウモロコシ、ミソハギ等を食害しその食性の範囲は広く (矢田, 2007; 岸田, 2011b; 環境省, 2015)、トウモロコシ栽培地でのトウモロコシに対する近年の加害の報告はない (農林水産省, 2013)。

20

25

さらに、このような地理的条件に加え、チョウ目昆虫幼虫への飛散したトウモロコシ花粉の曝露は、自然環境において複数の要因によって制限されることが知られている。トウモロコシの開花期と、感受性のある若齢幼虫の成

長期が重なり合うことは、曝露の必要条件の一つである (Sears et al., 2001)。加えて、一般的にチョウ目昆虫が産卵を行う宿主植物の葉の裏側は、花粉がほとんど又は全く無い。したがって、感受性のある若齢幼虫は、花粉がほとんど無い葉の裏側組織から摂食を開始し、花粉密度が比較的高い葉の表側に移動する頃には、より感受性の低い後期幼虫へと成長していることが一般的である。また、天候も曝露を制限する要因の一つであり、トウモロコシ開花期における一度の降雨によって、葉上の花粉の 50%以上が洗い流されることが知られている (Pleasants et al., 2001)。

上記の理由により、特定されたチョウ目昆虫が、本組換えトウモロコシ由来の Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質により、集団のレベルで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

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。わが国では、テオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。

以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(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

以上のことから、本組換えトウモロコシは、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。

5

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

- 競合における優位性に関わる諸形質として、本組換えトウモロコシの形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を米国において調査した。その結果、統計解析を行った項目では、形態及び生育の特性に関する項目の最終株数及び百粒重においてのみ、本組換えトウモロコシ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が認められた。検討の結果、本試験で認められた最終株数及び百粒重の差は、非組換えトウモロコシの種内品種間変動の範囲内であり、本組換えトウモロコシの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

- トウモロコシは、栽培化の過程で自生能力を失っており、わが国においてもこれまでトウモロコシが自然条件下で自生した例は報告されていない。栽培作物であるトウモロコシが自生能力を獲得するには、自生能力に必須の特性である種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている。本組換えトウモロコシには、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、これは上記特性に関与する形質ではない。このことから、この形質の付与により、栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性が高まるとは考えにくい。

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

有害物質の産生性：

- トウモロコシはわが国に導入されて以来、長期間の使用経験があるが、これまでトウモロコシにおいて有害物質の産生は報告されていない。

- 本組換えトウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を米国の温室において行ったが、いずれの調査項目においても本組換えトウモロコシ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。したがって、有害物質の産生性について、本試験において本組換えトウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの間で差は見いだされなかった。

- 本組換えトウモロコシ中では、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質が発現しているが、いずれも既知アレルゲンと類似性のある配列を有していないことが確認されている。また、Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質は酵素活性をもたないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと

考えられる。

5 本組換えトウモロコシ中で発現する Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質は、チョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。したがって、本組換えトウモロコシ中で発現する Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質により何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物等として、わが国に生息するチョウ目昆虫が考えられた。本組換えトウモロコシを直接食餌する可能性及び飛散した花粉を食餌する可能性を踏まえ、分布域や生息環境、幼虫の食草、幼虫の生育期とトウモロコシの開花期の重なり合いの点から絞り込みを行った結果、影響を受ける可能性が否定できない種として、絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に指定されているチョウ目昆虫 30 種を特定した。

10 トウモロコシ栽培ほ場周辺に堆積する花粉量は、ほ場から離れるほど低下し、10 m 離れると 10 粒/cm²以下となることが報告されている。したがって、特定されたチョウ目昆虫が、最も高い感受性が認められたチョウ目昆虫の幼虫の生存に影響を与えうる量の花粉に継続的に曝露される可能性は、トウモロコシほ場の周辺数 m 以内に限定され、10 m を超えると花粉への曝露はほとんど無くなると考えられた。また、生態的知見を鑑みれば、特定されたチョウ目昆虫がトウモロコシほ場周辺に局所的に生息しているとは考えがたい。

15 以上のことから、特定されたチョウ目昆虫が、本組換えトウモロコシ由来の Cry1B.868 蛋白質及び改変 Cry1Da 蛋白質により集団のレベルで影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

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

交雑性：

25 わが国において、トウモロコシと自然交雑可能な近縁野生種の自生について報告はないため、影響を受ける可能性のある野生動植物種は特定されない。したがって、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。

30 以上のことから、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、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Betz, F.S., B.G. Hammond and R.L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 32: 156-173.
- Bravo, A., I. Gómez, H. Porta, B.I. García-Gómez, C. Rodríguez-Almazan, L. Pardo and M. Soberón. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology* 6: 17-26.
- Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S.S. Gill and M. Soberón. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41: 423-431.
- CFIA. 2012. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario. <http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818367> [Accessed February 25, 2014].
- Chang, L., R. Grant and A. Aronson. 2001. Regulation of the Packaging of *Bacillus thuringiensis* δ -Endotoxins into Inclusions. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5032-5036.
- Cornejo, M.-J., D. Luth, K.M. Blankenship, O.D. Anderson and A.E. Blechl. 1993. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* 23: 567-581.
- de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has

evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.

Deist, B.R., M.A. Rausch, M.T. Fernandez-Luna, M.J. Adang and B.C. Bonning. 2014. Bt toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins (Basel)* 6: 3005-3027.

Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.

FAO. 2020. FAOSTAT. (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>) [Accessed January 26, 2021].

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

Gao, Y., K.J. Fencil, X. Xu, D.A. Schwedler, J.R. Gilbert and R.A. Herman. 2006. Purification and characterization of a chimeric Cry1F δ -endotoxin expressed in transgenic cotton plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 829-835.

Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action for *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37: 615-636.

Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20: 575-580.

Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.

Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential

expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123: 1005-1014.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.

Luna, S.V., J.M. Figueroa, B.M. Baltazar, R.L. Gomez, R. Townsend and J.B. Schoper. 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science* 41: 1551-1557.

Nakai, S., K. Hoshikawa, A. Shimono and R. Ohsawa. 2015. Transportability of confined field trial data from cultivation to import countries for environmental risk assessment of genetically modified crops. *Transgenic Research* 24: 929-944.

NCGA. 2020. World of Corn 2020. (<http://www.worldofcorn.com/pdf/WOC-2020.pdf>) [Accessed January 29, 2021].

OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 27. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation for

Economic Co-operation and Development, Paris, France.

Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup ReadyTM gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Pleasants, J.M., R.L. Hellmich, G.P. Dively, M.K. Sears, D.E. Stanley-Horn, H.R. Mattila, J.E. Foster, P. Clark and G.D. Jones. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 11919-11924.

Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.

Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 326: 277-290.

Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.

Sanahuja, G., R. Banakar, R.M. Twyman, T. Capell and P. Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9: 283-300.

Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.

Sears, M.K., R.L. Hellmich, D.E. Stanley-Horn, K.S. Oberhauser, J.M. Pleasants, H.R. Mattila, B.D. Siegfried and G.P. Dively. 2001. Impact of *Bt* corn pollen on Monarch butterfly populations: A risk assessment. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 98: 11937-11942.

Sears, M.K., D.E. Stanley-Horn and H.R. Matilla. 2000. Preliminary report on the ecological impact of Bt corn pollen on the Monarch butterfly in Ontario. Plant Biotechnology Office, Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.

Shirai, Y. and M. Takahashi. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. Applied Entomology and Zoology 40: 151-159.

Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Molecular and General Genetics 181: 8-12.

Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.

Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. Journal of Invertebrate Pathology 111: 1-12.

VKM. 2016. Risk assessment of the biological plant protection product Turex 50 WG, with the organism *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* GC-91. Opinion of the Panel on Plant Protection Product of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety. 20.

Wang, C., W. Li, C.R. Kessenich, J.S. Petrick, T.J. Rydel, E.J. Sturman, T.C. Lee, K.C. Glenn and T.C. Edrington. 2018. Safety of the *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1A.105 protein: Evidence that domain exchange preserves mode of action and safety. Regul Toxicol Pharmacol 99: 50-60.

Wang, Y., J. Wang, X. Fu, J.R. Nageotte, J. Silverman, E.C. Bretsnyder, D. Chen, T.J. Rydel, G.J. Bean, K.S. Li, E. Kraft, A. Gowda, A. Nance, R.G. Moore, M.J. Pleau, J.S. Milligan, H.M. Anderson, P. Asiimwe, A. Evans, W.J. Moar, S. Martinelli, G.P. Head, J.A. Haas, J.A. Baum, F. Yang, D.L. Kerns and A. Jerga. 2019. *Bacillus thuringiensis* Cry1Da_7 and Cry1B.868 Protein Interactions with Novel Receptors Allow Control of Resistant Fall Armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Applied and

Environmental Microbiology 85: e00579-00519.

Wych, R.D. 1988. Production of hybrid seed corn. Pages 565-607 in Corn and Corn Improvement. Third Edition. G. F. Sprague and J. W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 361-370.

Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson. 2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. Theoretical and Applied Genetics 107: 1157-1168.

青木典司ほか 2005 日本産幼虫図鑑 学習研究社 東京

秋田県 2002 秋田県の絶滅のおそれのある野生生物 2002 秋田県版レッドデータブック 動物編 秋田県環境と文化のむら協会 秋田

石川県 2009 改訂・石川県の絶滅のおそれのある野生生物 いしかわレッドデータブック〈動物編〉 2009 (http://www.pref.ishikawa.lg.jp/sizen/reddata/rdb_2009/documents/ikkatu.pdf) [Accessed August 2012]

井上寛・杉繁朗・黒子浩・森内茂・川辺湛・大和田守 1982 日本産蛾類大図鑑 講談社 東京

柿本陽一・山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 III 植物としての特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

環境省 2015 レッドデータブック 2014 5 昆虫類 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室 (編) ぎょうせい 東京

環境省 2017 環境省レッドリスト 2017 補遺資料 環境省自然環境局野生生物課希少種保全推進室 (編) (<https://www.env.go.jp/press/files/jp/107163.pdf>) [Accessed

December 7, 2020]

環境省 2018 環境省レッドリスト 2018 補遺資料 環境省自然環境局野生生物課
希少種保全推進室 (編) (<https://www.env.go.jp/press/files/jp/109206.pdf>) [Accessed
December 7, 2020]

環境省 2020a 環境省レッドリスト 2020 令和2年3月27日公表 環境省自然環境
局野生生物課希少種保全推進室 (編) (<http://www.env.go.jp/press/files/jp/113628.pdf>) [Accessed December 7, 2020]

環境省 2020b 環境省レッドリスト 2020 補遺資料 環境省自然環境局野生生物課
希少種保全推進室 (編) (<http://www.env.go.jp/press/files/jp/113684.pdf>) [Accessed
December 7, 2020]

菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京

岸田泰則 2011a 日本産蛾類標準図鑑 1 学習研究社 東京

岸田泰則 2011b 日本産蛾類標準図鑑 2 学習研究社 東京

岐阜県 2010 岐阜県の絶滅のおそれのある野生動物 (動物編) 改訂版 6. 昆虫類
(<http://www.pref.gifu.lg.jp/kankyo/shizen/red-data-dobutsu/konchu-rui/>) [Accessed
August 2012]

後藤秀俊・黒川俊二・笠井美恵子・福田美雪・高橋靖幸・井上公一・中井秀
一・山根精一郎・津田麻衣・大澤良 2018 遺伝子組換え作物の生物多様性影響
の競合における優位性に関する考察 育種学研究 20: 105-114

駒井古実・吉安裕・那須義次・斉藤寿久 2011 日本の鱗翅目 系統と多様性 東
海大学出版会 神奈川

財務省 2020 財務省貿易統計 (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>)
[Accessed November 17, 2020]

白水隆 2006 日本産蝶類標準図鑑 学習研究社 東京

千藤茂行 2001 トウモロコシの品種生態 IV 採取 転作全書 第三巻 雑穀 社団法人 農山漁村文化協会 東京

瀧澤康考 2001 子実用トウモロコシの栽培 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

手代木求 1990 日本産蝶類幼虫・成虫図鑑 I タテハチョウ科 東海大学出版会 神奈川

手代木求 1997 日本産蝶類幼虫・成虫図鑑 II シジミチョウ科 東海大学出版会 神奈川

戸澤英男 2005 トウモロコシー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用ー 農山漁村文化協会 東京

長野県 2004 長野県版レッドデータブック～長野県の絶滅のおそれのある野生動物～動物編 長野県自然保護研究所 長野

中村茂文 2001 生育のステージと生理、生態 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

中村正直・工藤広悦・内藤幸之助 1996 葦毛湿原(豊橋市岩崎町)で獲られた蛾類目録・葦毛第2湿原(指定外地)の蛾類調査 (4) 蛾類通信 189, pp.223-230

西尾剛 2002 新農学実験マニュアル 改訂版第3版 株式会社ソフトサイエンス社

農林水産省 2013 第4次レッドリストの改訂に伴う評価の確認について 平成24年度第7回生物多様性影響評価検討会総合検討会 (https://www.affrc.maff.go.jp/docs/committee/diversity/130228/pdf/siryo_9.pdf) [Accessed September 15, 2021]

農林水産省 2014 飼料用トウモロコシの流通・加工実態調査結果報告書 平成26年3月26日公表 (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/pdf/140326-01.pdf>) [Accessed April 23, 2015]

農林水産省 2017 「平成 27 年度 トウモロコシ生育実態調査」の結果について
平成 29 年 3 月 22 日公表 (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/170322.html>) [Accessed March 22, 2017]

農林水産省 2018 飼料をめぐる情勢 平成 30 年 11 月公表
(http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/index.html) [Accessed November 21, 2018]

農林水産省 2020a 令和元年産作物統計(普通作物・飼料作物・工芸農作物) 2020
年 11 月 25 日公表 (<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000032026432&fileKind=2>) [Accessed January 29, 2021]

農林水産省 2020b 令和元年産野菜生産出荷統計 2021 年 1 月 20 日公表
(<https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000032029574&fileKind=2>) [Accessed January 29, 2021]

福田晴夫・浜栄一・葛谷健・高橋昭・高橋真弓・田中蕃・田中洋・若林守男・
渡辺 康之 1982 原色日本蝶類生態図鑑 I 保育社 大阪

福田晴夫・浜栄一・葛谷健・高橋昭・高橋真弓・田中蕃・田中洋・若林守男・
渡辺 康之 1983 原色日本蝶類生態図鑑 II 保育社 大阪

福田晴夫・浜栄一・葛谷健・高橋昭・高橋真弓・田中蕃・田中洋・若林守男・
渡辺 康之 1984a 原色日本蝶類生態図鑑 III 保育社 大阪

福田晴夫・浜栄一・葛谷健・高橋昭・高橋真弓・田中蕃・田中洋・若林守男・
渡辺 康之 1984b 原色日本蝶類生態図鑑 IV 保育社 大阪

みんなで作る日本産蛾類図鑑 2012 (<http://www.jpmoth.org/>) [Accessed August, 2012]

安田守 2010 イモムシハンドブック 文一総合出版 東京

安田守 2012 イモムシハンドブック 2 文一総合出版 東京

矢田脩 2007 新訂・原色昆虫大図鑑 第 I 巻(蝶・蛾篇) 北隆館 東京

矢野高広 2011 高ボッチ高原のミスジコスカシ やどりが 230, pp.236-237

山 口 む し の 会 2013
(<http://www.geocities.jp/yamagutimusinokai/topics/2009/090825akiyosidai/090823a.htm>) [Accessed June 13, 2013]

山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

山本勝利・大黒俊哉・松村雄 2003 5. わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価 農業環境研究叢書 第 14 号 遺伝子組換え作物の生態系への影響評価 農業環境技術研究所 (編) 養賢堂 東京 pp.62-81

山本光人・中臣謙太郎・佐藤力夫・中島秀雄・大和田守 1987 日本産蛾類生態図鑑 杉繁郎 (編) 講談社 東京

吉松慎一 1994 スマベウスキョトウの幼生期と人工飼育 蛾類通信 177, pp.122-123

緊急措置計画書

2021 年 6 月 30 日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ハーラルト・プリンツ
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ(*cry1B.868*, 改変 *cry1Da*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (MON95379, OECD UI: MON-95379-3) (以下、「本組換えトウモロコシ」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

- 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は以下に示すとおりである。

2021年1月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部長 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 部長
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 クロップサイエンス広報部長
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーサイエンス本部 種子規制部 河内試験圃場 圃場長

*：管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、バイエルグループと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性がある関係各者から情報収集を行う。

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

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

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

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、バイエルグループの協力のもと、本組換えトウモロコシが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えトウモロコシに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信頼性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

別添資料リスト

- | | |
|---------|---|
| 別添資料 1 | 本組換えトウモロコシにおいて発現する Cry1B.868 蛋白質及び
改変 Cry1Da 蛋白質の推定アミノ酸配列 (社外秘) |
| 別添資料 2 | Characterizing the Activity Spectrum of Cry1B.868 Against a Range
of Invertebrate Taxa (TRR0000610) (社外秘) |
| 別添資料 3 | Characterizing the Activity Spectrum of Cry1Da_7 Against a Range
of Invertebrate Taxa (TRR0000609) (社外秘) |
| 別添資料 4 | Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR522223 (社外秘) |
| 別添資料 5 | PCR Analysis to Confirm the Absence of <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Used to Produce MON 95379 (MSL0029717) (社外秘) |
| 別添資料 6 | Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Insect Protected Maize
MON 95379 Across Three Generations (MSL0030175) (社外秘) |
| 別添資料 7 | Amended from MSL0030839: Molecular Characterization of Insect
Protected Maize MON 95379 (TRR0000070) (社外秘) |
| 別添資料 8 | Demonstration of the Presence of Cry1Da_7 and Cry1B.868 Proteins
in Maize Seed Samples Across Multiple Generations of MON 95379
(MSL0030807) (社外秘) |
| 別添資料 9 | Assessment of Cry1B.868 and Cry1Da_7 Protein Levels in Leaf, Root,
Pollen, Forage and Grain Tissues Collected from MON 95379
Produced in United States Field Trials During 2018 (TRR0000556)
(社外秘) |
| 別添資料 10 | A Recommended Procedure for Real-Time Quantitative TaqMan®
PCR for MON 95379 (社外秘) |
| 別添資料 11 | In House Validation of “A Recommended Procedure for Real-Time
Quantitative TaqMan® PCR for MON 95379” for Global
Submissions (社外秘) |

別添資料 12	Phenotypic Evaluation and Environmental Interactions of Maize MON 95379 in 2018 U.S. Field trials (MSL0030490) (社外秘)
別添資料 13	Assessment of the Effect of Cold Stress on Growth of Maize MON 95379 in 2019 under Controlled Environmental Conditions (TRR0000088) (社外秘)
別添資料 14	Overwintering Photographs for Maize MON 95379 in a 2019 U.S. Field Trial (MSL0030876) (社外秘)
別添資料 15	Pollen Viability and Morphology Evaluation of Maize MON 95379 Grown in a 2018 U.S. Field Trial (MSL0030195) (社外秘)
別添資料 16	Dormancy and Germination Evaluation of Maize MON 95379 at Optimum (25°C) and Sub-Optimum (10/25°C) Temperatures (MSL0030696) (社外秘)
別添資料 17	Enumeration of Soil Microorganisms from a Greenhouse Study Assessing Potential Residual Effects from Maize MON 95379 (TRR0000266) (社外秘)
別添資料 18	Residual Effects of Maize MON 95379 (TRR0000383) (社外秘)
別添資料 19	An Evaluation of Functional Activity of MON 95379 Pollen Against Monarch Butterfly, <i>Dananeus plexippus</i> in Leaf Disc Bioassay (MSL0030847) (社外秘)