資料

遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の承認申請に係る審査報告書

緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ

HC-EGFP ぐんま系統、HC-EGFP200 系統及び

HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP200 系統

平成 29 年 7 月 27 日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

目　　次

1．第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論

国立研究開発法人農業･食品産業技術総合研究機構より、平成28年11月18日付けで、一般飼育施設におけるカイコの繭生産を目的として承認申請のあった「緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ HC-EGFPぐんま系統、HC-EGFP200系統及びHC-EGFPぐんま×HC-EGFP200系統（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）」の3系統について、生物多様性影響評価を行った。

本遺伝子組換えカイコは、オワンクラゲ（*Aequorea victoria*）由来の緑色蛍光タンパク質を組み込んだカイコ由来の繊維タンパク質遺伝子及びイソギンチャクモドキ類（*Discosoma* sp.）由来の赤色蛍光タンパク質遺伝子の2つの遺伝子の発現により、緑色蛍光の絹糸を産生し、眼において赤色蛍光を発するものである。

審査の概要は、本報告書の2のとおりである。

学識経験者からは、本遺伝子組換えカイコを承認申請のあった第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であるとの意見を得ている。これらにより生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(参考) これまでの審査経緯

日　付	事　項	備　考
平成２８年１１月２２日	第一種使用規程承認申請受理	
平成２８年１２月　６日	生物多様性影響評価検討会昆虫分科会における審査（第１回）	非公開※
平成２９年　１月１０日	生物多様性影響評価検討会昆虫分科会における審査（第２回）	非公開※
平成２９年　２月１４日	生物多様性影響評価検討会昆虫分科会における審査（第３回）	非公開※
平成２９年　３月１０日	生物多様性影響評価検討会昆虫分科会における審査（第４回）	非公開※
平成２９年　３月３０日	生物多様性影響評価検討会総合検討会における審査	公開
平成２９年　４月１２日	学識経験者からの意見提出	
平成２９年 7月２７日	審査報告書とりまとめ	

※　開発法人等の知的財産等が開示され特定の者に不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため。

2. 審査の概要

本遺伝子組換えカイコは、次の①及び②の遺伝子を *piggyBac* 転移因子を利用した形質転換法(注1)により導入し、作出したものである。

① 絹糸を構成する主要な繊維タンパク質であるカイコ由来フィブロイン H 鎖タンパク質の中央部を、オワンクラゲ（*Aequorea victoria*）由来の緑色蛍光タンパク質に置換した融合タンパク質（改変型緑色蛍光タンパク質）遺伝子（*HC-EGFP* 遺伝子）

② 眼で発現するイソギンチャクモドキ類（*Discosoma* sp.）由来の改変型赤色蛍光タンパク質遺伝子（*DsRed2* 遺伝子）

①の発現により緑色蛍光を呈する絹糸を産生し、②の発現により選抜マーカーとして眼が赤色蛍光を呈するため、非遺伝子組換えカイコとの区別が可能となっている。

本遺伝子組換えカイコは、①*HC-EGFP* 遺伝子発現カセット及び②*DsRed2* 遺伝子発現カセットのそれぞれ1コピーが染色体上に挿入されていること、挿入された遺伝子が複数世代にわたり安定して伝達されていること、がサザンハイブリダイゼーション法により確認されている。また、目的遺伝子は、HC-EGFP ぐんま系統及び HC-EGFP 200 系統において、複数世代にわたり安定して発現していることが RT-PCR での検出により確認されている。

以上より、本遺伝子組換えカイコに関して、生物多様性影響を生じさせる可能性のある性質である、(1) 競合における優位性、(2) 捕食性、(3) 有害物質の産生性、(4) 交雑性、の4つの項目について評価を行った。

(1) 競合における優位性

宿主が属する生物種であるカイコは、近縁野生種であるクワコ（*Bombyx mandarina*）を人が改良を重ねることにより、人工的な飼育環境に適応した昆虫である。我が国では、カイコは、弥生時代に中国大陸から養蚕技術とともに伝えられたと考えられており、長年にわたり飼育されてきた歴史がある。これまでに日本も含め養蚕が伝播した地域(注2)では、カイコが、野外に逸出して自然条件下で繁殖した例は報告されていない。

本遺伝子組換えカイコは、絹糸腺で改変型緑色蛍光タンパク質を、眼で改変型赤色蛍光タンパク質を発現するよう設計された遺伝子を持ち、いずれのタンパク質も蛍光色を呈するが、他の物質を変化させるような酵素活性を持たないため、カイコ幼虫の運動性を高めたり、カイコ成虫に飛翔能力を付与するとは考えられない。

また拡散防止措置が執られた国内の飼育室及び限定された環境の隔離飼育区画（以下、「隔離飼育区画等」という。）において、競合における優位性に関わる諸形質について、本遺伝子組換えカイコ及び対照の非遺伝子組換えカイコを調査し

(注1) *piggyBac* 転移因子（イラクサギンウワバ（*Trichoplusia ni*）由来）を改変した2種類のプラスミド（大腸菌 *Escherichia coli* 由来のドナープラスミド及びヘルパープラスミド）を同時に受精卵に顕微注入すると、ヘルパープラスミド（カイコゲノム中に挿入されない）が 1 回のみ供給する転移酵素により、ドナープラスミド中の末端配列に挟まれた目的遺伝子が切り出されてカイコゲノム中に挿入されることにより目的遺伝子の発現し形質が転換させる方法。

(注2) カイコの飼育は、少なくとも今から5千年前には中国大陸で始まったとされている。東西の交易に伴い、中国南東部から、ヨーロッパ、東南アジア、日本などに広がり、地域に適応した固有のカイコ品種がそれぞれの地域で育成されたと考えられている。

比較したところ、孵化歩合、幼虫の行動範囲及び営繭率については、本遺伝子組換えカイコと対照の非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的有意差は認められなかった。
　一方、幼虫の体重、繭重、繭層重及び産卵数は、いずれも本遺伝子組換えカイコと対照の非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差が生じ、本遺伝子組換えカイコの方が小さい値となった。実用品種では、幼虫の体重、繭重、繭層重及び産卵数は、生育能力や繁殖能力と相関することから、本遺伝子組換えカイコは実用品種として使用されている非遺伝子組換えカイコに比べ、生育能力や繁殖能力が低いと考えられた。通常、非遺伝子組換えカイコは営巣場所や生息場所等を巡って野生動物と競合することはないことから、本遺伝子組換えカイコが野生動物と競合することはないと考えられた。

以上より、承認申請のあった第一種使用規程の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動物は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(2) 捕食性
　カイコの幼虫は、人為的に与えられた桑葉又は人工飼料のみを摂食して成長し、桑葉以外の植物や昆虫等を捕食することはなく、成虫は、摂食や飲水は一切しないことが知られている。
　本遺伝子組換えカイコは、絹糸腺で改変型緑色蛍光タンパク質を、眼で改変型赤色蛍光タンパク質を発現するよう設計された遺伝子を持ち、いずれのタンパク質も蛍光色を呈するが、他の物質を変化させるような酵素活性を持たない。このため、カイコの食性を変化させ、捕食能力を高めることは考えられない。

　以上より、承認申請のあった第一種使用規程の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、捕食性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(3) 有害物質の産生性
我が国では、カイコは、弥生時代に中国大陸から養蚕技術とともに伝えられたと考えられており、長年にわたり飼育されてきた歴史があるが、これまで野生動植物等の生育に悪影響を及ぼすような有害物質がカイコから産生されたとの報告はない。また、養蚕農家においては、カイコの糞・死体などを敷地内に掘った穴や桑畑に廃棄することが一般的に行われてきたが、これらが野生動植物等に有害な影響を与えたとの報告はない。
本遺伝子組換えカイコは、絹糸腺で改変型緑色蛍光タンパク質を、眼で改変型赤色蛍光タンパク質を発現するよう設計された遺伝子を持ち、いずれのタンパク質も蛍光色を呈するが、既知の有毒タンパク質やアレルゲンと類似のアミノ酸配列を持たず、他の物質を変化させるような酵素活性を持たない。このため、有害物質を産生することはないと考えられた。
また、国内の隔離飼育区画試験において、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコの糞や死体を凍結乾燥して粉状にしたものを、それぞれ土壌中に混合し、両者の、植物や土壌微生物への影響を比較した。この結果、本遺伝子組換

えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的有意差は認められなかった。
以上より、承認申請のあった第一種使用規程の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(4) 交雑性

カイコと交雑可能な近縁野生種としては、クワコとインドクワコ（*Bombyx huttoni*）が報告されている。日本国内に分布している昆虫はクワコのみであることから交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコを特定した。

カイコとクワコの交雑については、ざる篭採り方法（注3）による非遺伝子組換えカイコとクワコの交尾試験の報告がある。この報告では、カイコのメス成虫とクワコのオス成虫との交尾率が 21%であったのに対し、カイコのオス成虫とクワコのメス成虫は、交尾が成立しないことが示された。これは、クワコのメスの歩行力及び飛翔力がカイコのオスよりも高く、カイコのオスが交尾のために接近できないためと考えられている。

また、屋外の試験報告では、非遺伝子組換えカイコのメス成虫を人為的に屋外に出して野生のクワコのオス成虫を誘引させると交尾することが確認されている。

こうしたことから、自然環境下ではカイコのメス成虫がクワコのオス成虫と交尾する可能性が考えられた。

しかしながら、日本では、カイコは、弥生時代から長年にわたり飼育され、かつ、昭和 5 年には全国の農家の約 4 割が養蚕業となり、北海道から九州･沖縄に至るまで全国各地でカイコの飼育が見られたが、カイコとクワコの交雑個体が自然環境下で見つかったとの報告はない。こうしたことから、カイコのメス成虫とクワコのオス成虫の交尾の可能性は極めて低いと考えられた。

さらに、国内で捕獲したクワコおよそ 4,200 個体及び国内の 147 系統の非遺伝子組換えカイコ各個体について、母親の遺伝子型を引き継ぐミトコンドリアゲノムの COI 遺伝子（注 4）の塩基配列を解析した。その結果、カイコとクワコはそれぞれ異なる塩基配列の COI 遺伝子を持ち、明確に区別された。また国内で捕獲したクワコの 1,019 個体及び国内の 146 系統の非遺伝子組換えカイコ各個体について、核ゲノム上の *CAD* 遺伝子（注4）の塩基配列を解析した。その結果、カイコとクワコはそれぞれ異なる塩基配列の *CAD* 遺伝子を持ち明確に区別された。

こうしたことから、少なくとも現在の養蚕の現場において、カイコとクワコとの交雑は起きていないか、極めてまれであると考えられ、日本国内の自然環境下で、クワコにカイコからの遺伝子が、また、カイコにクワコからの遺伝子が浸透･定着していないことが確認された。

実際、平成 26 年から 28 年に実施した農研機構及び群馬県蚕糸技術センターでの隔離飼育区画試験では、以下の1）から3）の結果が報告された。これらの結果から、自然環境下で本遺伝子組換えカイコの成虫が生じる可能性は低く、万が一、本遺伝子組換えカイコの成虫がクワコと交雑し、卵を産み、その交雑個体がふ化したとしても、生存し続けることは困難であると考えられた。

（注 3） 人為的にクワコを高率で交尾させるため、市販のプラスチック製のざる篭内でクワコの交尾を行わせる方法

（注 4） COI 遺伝子はミトコンドリアゲノム中の DNA 遺伝子であり、*CAD* 遺伝子は核ゲノム中の DNA 遺伝子である。カイコとクワコの共通の塩基配列を調べるため解析を行った。

1) 飼育室内で本遺伝子組換えカイコ(約 50 万頭)及び非遺伝子組換えカイコ(約10万頭)の飼育を行ったが、成虫が生じることはなかった。

2) 屋外に逸出した場合を想定し、桑畑から 100m 離れた場所に縦横1m深さ30cm の穴を掘り、非遺伝子組換えカイコ幼虫 1300 頭及び成虫 200 頭をそれぞれ穴に放置し、ビデオ撮影下で、観察したところ、すべて鳥や昆虫に速やかに捕食され、生存した個体は認められなかった。

3) 自然環境下でクワコのオス成虫と遺伝子組換えカイコのメス成虫の交雑第 1 代が生まれた場合を想定し、クワコのオス成虫と非遺伝子組換えカイコのメス成虫との交雑ふ化幼虫(1齢幼虫 3000 頭)を人為的に桑樹周囲の2m の地面に放置し20日間観察を行った。その結果、交雑ふ化幼虫は、桑樹まで到達出来ず、桑葉を摂食して生育した交雑個体は観察されなかったことから、鳥等に捕食されたと推定された。

以上より、本遺伝子組換えカイコとクワコが交雑する可能性は低く、また、仮に野外で本遺伝子組換えカイコとクワコとの交雑種が生じたとしても、それらが生育する可能性は極めて低いと考えられる。

このことから、承認申請のあった第一種使用規程の範囲内で本遺伝子組換えカイコを使用する限り、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

(5) 結論

宿主が属する生物種であるカイコは、弥生時代に中国大陸から養蚕技術とともに伝えられたと考えられており、長年にわたり飼育されてきた歴史があるが、これまでにカイコが野外に逸出して自然条件下で繁殖した例は報告されていない。

国内の隔離飼育区画において、競合における優位性に関わる諸形質を調査した結果、複数の形質において本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの間で統計学的有意差が認められた。しかし、これらの形質は実用品種として使用されている非遺伝子組換えカイコに比べ、本遺伝子組換えカイコの生育能力や繁殖能力が低いことを示しており、営巣場所や生息場所等を巡って野生動物と競合し、支障を及ぼすものではないと考えられた。

以上より、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

宿主が属する生物種であるカイコは、幼虫期に人為的に与えられた桑葉又は人工飼料のみを摂食して成長し、桑葉以外の植物や昆虫等を捕食することはなく、成虫は摂食や飲水は一切しないことが知られている。また、本遺伝子組換えカイコは絹糸線で改変型緑色蛍光タンパク質を、眼で改変型赤色蛍光タンパク質を発現するが、カイコの食性を変化させたり、捕食能力を高めるものではない。

以上より、捕食性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

宿主が属する生物種であるカイコは、長年にわたり飼育されてきた歴史があるが、これまで野生動植物等の生育に悪影響を及ぼすような有害物質がカイコから産生されたとの報告はなく、カイコの糞・死体などが野生動植物等に有害な影響を与えたとの報告もない。また、本遺伝子組換えカイコは絹糸線で改変型緑色蛍光タン

パク質を、眼で改変型赤色蛍光タンパク質を発現するが、既知の有毒タンパク質やアレルゲンと類似のアミノ酸配列を持たず、他の物質を変化させるような酵素活性を持たないため、有害物質を産生することはないと考えられた。

また、国内の隔離飼育区画において、糞や死体を土壌中に混合し、植物や土壌微生物への影響を、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で比較試験した結果では統計学的有意差は認められなかった。

以上より、有害物質の産生性に起因して生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

交雑性については、影響を受ける可能性のある野生動物としてカイコの近縁種のクワコが特定され、自然環境下ではカイコのメス成虫がクワコのオス成虫と交尾する可能性が考えられた。

しかしながら、カイコは長年にわたり飼育されてきた歴史等があり、カイコとクワコの交雑個体が自然環境下で見つかったとの報告はない。また、ミトコンドリアゲノム上のCOI遺伝子や核ゲノム上の*CAD*遺伝子について、カイコとクワコはそれぞれ異なる塩基配列を持ち、明確に区別され、クワコにカイコからの遺伝子が、カイコにクワコからの遺伝子が浸透･定着していないことが確認された。

こうしたことから、カイコとクワコとの交雑は起きていないか、極めてまれであると考えられた。

また、隔離飼育区画における飼育試験等の結果及び今回申請された第一種使用規程の使用等の方法を考慮すれば、自然環境下で本遺伝子組換えカイコの成虫が生じる可能性は低く、万が一、本遺伝子組換えカイコの成虫がクワコと交雑し、その交雑個体がふ化したとしても、生存し続けることは困難であると考えられた。以上より、交雑性に起因して生物多様性が生ずるおそれはないと判断された。

以上を総合的に評価し、以下に記載する飼育管理の徹底及びモニタリングの実施の下、本遺伝子組換えカイコを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断した。

第一種使用規程の使用等の方法は、具体的には、本遺伝子組換えカイコを使用する際に、使用者は、申請者が別に定めた第一種使用等による飼育等要領（以下、「飼育等要領」という。）に従って、本遺伝子組換えカイコの逸出防止及び飼育室へのクワコ成虫等の侵入防止等の飼育管理を徹底することとされている。

また、本遺伝子組換えカイコの飼育開始後、クワコとの交雑個体が生じていないことを確認するため、申請者による本遺伝子組換えカイコに係るモニタリングを行うこととしている。モニタリングの結果、万が一、本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が確認された場合は、緊急措置計画書に基づき、申請者が速やかに生物多様性影響を効果的に防止する措置を執ることとしている。

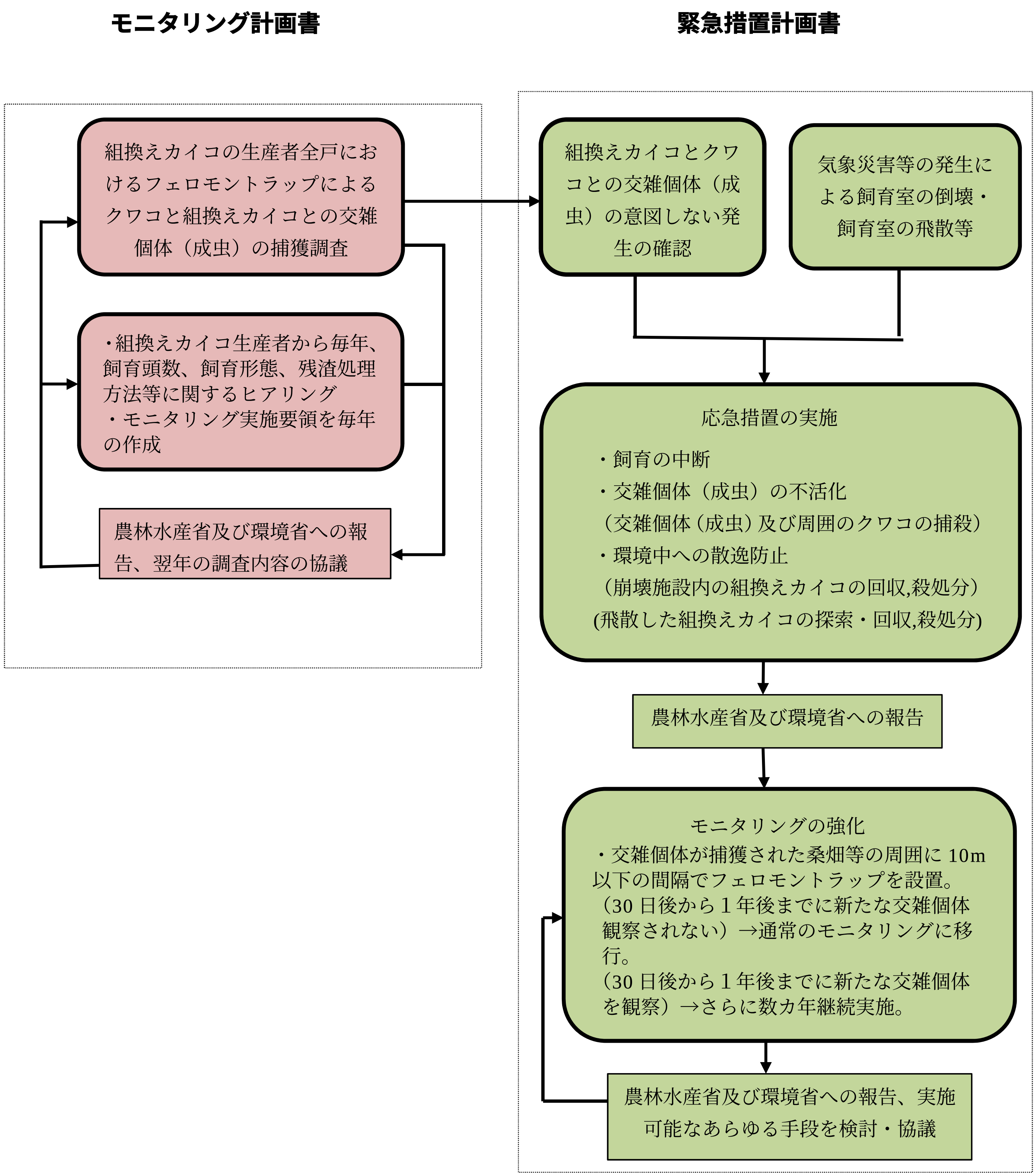


図　モニタリング計画書と緊急措置計画書の関係について

＜審査参考資料＞

資料１．第一種使用規程承認申請書

隔離飼育区画での試験飼育の承認を受けるために申請者から提出された申請書

第一種使用規程承認申請書

平成２８年１１月１８日
差し替え平成２９年7月１３日

農林水産大臣　　山 本　有 二　　殿
環 境 大 臣　　山 本　公 一　　殿

氏 名　　国立研究開発法人
申請者　　　　　　農業・食品産業技術総合研究機構
理 事 長　　井　邊　時　雄　　　印
住 所　　茨城県つくば市観音台３丁目１番地１

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。

資料１．第一種使用規程承認申請書

遺伝子組換え生物等の種類の名称	緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-EGFP*、*Bombyx mori*）（HC-EGFP ぐんま、HC-EGFP 200、HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	カイコの繭糸の生産を目的とした、①幼虫（３齢幼虫期以降のものに限る。以下同じ。）の飼育、②繭の生産及び加工、③幼虫及び繭の保管、運搬及び廃棄並びに①から③までに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	使用に当たっては、別に定める第一使用等による飼育等要領に従う。また、別に定めるモニタリング計画書に基づき、申請者によるモニタリングを実施する。

資料２．第一種使用等による飼育等要領

第一種使用等による飼育等要領

緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-EGFP*, *Bombyx mori* L.）（HC-EGFP ぐんま、HC-EGFP 200、HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の第一種使用等による飼育について、以下の通り要領（以下「本飼育等要領」という。）を定める。

１　飼育にあたっての要件

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）は、本遺伝子組換えカイコを適切に管理するため、本遺伝子組換えカイコの利用について契約等を交わした者を通じて、本遺伝子組換えカイコの幼虫の飼育や繭からの繰糸を行おうとする者等についての情報を収集し、本飼育等要領に従って適切に管理できる者に限って飼育や繰糸等をさせる。その選定にあたっては、飼育や繰糸等を行う施設や設備が本飼育等要領に規定される通りであること及び飼育や繰糸等を行う者が８に定める研修を受けていることを確認する。また、飼育や繰糸等の実施状況について、飼育や繰糸等を行う者から、契約を交わした者を通じて農研機構に報告させ、管理が不適切な者に対しては、農研機構は、本遺伝子組換えカイコの利用について契約等を交わした者に指示して幼虫や繭の提供を停止させる。

また、農研機構は、クワコの発生時期に関する情報がない地域については、本遺伝子組換えカイコの飼育初年度に７の通りクワコの発生時期の調査を行う。

２　運搬

（１）幼虫の運搬

本遺伝子組換えカイコの幼虫を運搬する際は、途中でこぼれ落ちることがないよう、蓋を固定すること等により本遺伝子組換えカイコが逸出しない容器を用いる。なお、上蔟時等、飼育室のある敷地内又は隣接する敷地内にある他の飼育室等に幼虫を運搬する際は、途中でこぼれ落ちることがない容器を用い、運搬の後にその経路を目視で確認し、カイコが落ちていた場合は回収する。

（２）繭の運搬

本遺伝子組換えカイコの繭を運搬する際は、途中でこぼれ落ちることがないよう、口を縛ることができる布製の繭袋等を用い、破れ目がないことを繭を入れる前に確認する。繭を繭袋等に入れる作業は繭を収穫した部屋で行い、繭を繭袋等に入れた後は口を固く縛り、周囲を確認して、こぼれ落ちた繭を回収する。繭袋等には取扱注意の表示を行う。製糸工場に繭が到着した際は、不活化のための乾燥機や冷凍庫に繭を入れるまで繭袋等の口は縛ったままとする。

３　3 齢幼虫から繭の収穫までの飼育

（１）飼育室及び幼虫の飼育や繭の形成のための容器

本遺伝子組換えカイコの飼育室及び幼虫の飼育や繭の形成のための容器は以下の通りとする。なお、本遺伝子組換えカイコを飼育している間は、飼育室の出入り口に、関係者以外の立ち入りを禁止する旨を表示する。また、本遺伝子組換えカイコを他のカイコ系統と区別して管理するため、他のカイコ系統と同じ時期に同じ飼育室では本遺伝子組換えカイコを飼育しない。

１）飼育室

本遺伝子組換えカイコの 3 齢幼虫から繭の収穫まで飼育する飼育室（一般的な養蚕農家の飼育室がこれにあたる。）は、外部からのクワコ成虫の侵入を防止できるようにするため、窓等の開口部に 4 mm 目以下の網を張ること又は網戸を設置すること等が可能な構造とする。

２）幼虫を飼育する容器

本遺伝子組換えカイコの幼虫を飼育する容器は、底部が 4 mm 目以下の網で覆われるなど、幼虫を適切に保持できる構造とする（一般的な養蚕農家が使用する飼育容器がこれにあたる。）。

３）繭を形成させる容器

本遺伝子組換えカイコの繭を形成させる容器としては原則として回転蔟を用いる。ただし、少数のカイコ幼虫に繭を形成させる場合等は、4 mm 目以下の網で覆った容器の中で繭を形成させることもできる。

（2）飼育中の管理

本遺伝子組換えカイコを飼育している飼育室から退出する際は、生産者の体や衣服にカイコが付着していないことを鏡もしくは他の生産者等とともに確認する。ただし、幼虫の飼育中で、飼育容器中のカイコの幼虫や桑葉に触れていない場合はカイコの付着を確認せず退出することができる。幼虫の飼育中及び繭の形成中に生育不良の幼虫等を廃棄する場合は、飼育室内で捕殺するか、飼育室内の容器に入れて蓋をするかビニール袋に入れて密封し上蔟から 30 日間管理する。また、飼育室の外でカイコの幼虫や蛹、繭を見つけた場合はその場でただちに捕殺する。

４　繭を収穫した後の飼育室の管理

本遺伝子組換えカイコの繭を収穫した後の飼育室には繭が残る可能性を完全には否定できない。隔離飼育区画における第一種使用等による本遺伝子組換えカイコの飼育試験及びモニタリング（以下「隔離飼育試験」という。）の結果から、飼育室の窓等に網を設置して管理することにより、野生のクワコとの交雑を防止することができると考えられた。このことから、繭から生じるメス成虫が野外のクワコのオス成虫と交尾することを防止するため、繭を収穫した後の飼育室については、飼育残渣を飼育室外で管理する場合はまず飼育残渣を搬出した上で、飼育室の床、壁及び天井に残された繭をできるだけ取り除き、入退室以外は窓等を閉め切るか、窓等の開口部に 4 mm 目以下の網又は網戸を設置した状態で、繭が残っていてもすべてが成虫になって死亡するまで管理する。その際、隔離飼育試験において、上蔟後の飼育残渣を飼育室外に搬出して 4 mm 目以下の網で覆って 30 日間管理することにより、野生のクワコとの交雑を防止することができると考えられたことから、管理の期間は上蔟から 30 日後までとする。

5　飼育残渣の管理

本遺伝子組換えカイコを飼育した後に残る飼育残渣については、繭が残っている可能性に配慮し、以下のいずれかの方法により管理する。

（1）飼育残渣を網で覆うことによる管理

飼育残渣を網で覆って管理することにより、飼育残渣中に本遺伝子組換えカイコの成虫が発生してもクワコ成虫と交尾することを防ぐ。隔離飼育試験の結果から、上蔟後の飼育残渣を飼育室外に搬出して 4 mm 目以下の網で覆って 30 日間管理することにより、野生のクワコとの交雑を防止することができると考えられた。本飼育等要領において飼育残渣を網で覆うことによって管理する場合は、4 mm 目以下の網で覆って上蔟から 30 日後まで管理することとし、網の設置は以下のいずれかの方法による。

1）飼育残渣を飼育室内に残したまま、飼育室の開放している窓等を網で覆い、出入り口は入退室以外は閉め切る。

2）飼育残渣を飼育室外に搬出して網で覆う。飼育残渣を運搬した後は、その経路を目視で確認し、繭及びカイコ（幼虫及び蛹）が落ちていた場合はただちに捕殺する。

（2）飼育残渣を粉砕することによる管理

飼育残渣を粉砕処理することにより、飼育残渣中の本遺伝子組換えカイコを殺虫し、クワコ成虫と交尾することを防ぐ。隔離飼育試験の結果から、上蔟から 9 日後までの繭の収穫まで成虫が生じることはなく、それまでに飼育残渣を粉砕機で粉砕することにより、野生のクワコとの交雑を防止することができると考えられた。本飼育等要領において飼育残渣を粉砕処理する場合は、上蔟から 9 日後までに完了させることとする。粉砕処理は飼育室内で行うか、飼育残渣を飼育室外に搬出して行うこととする。飼育室外に搬出して行う場合は、搬出後ただちに粉砕処理を行い、粉砕処理の後で運搬の経路を目視で確認して繭及びカイコ（幼虫及び蛹）が落ちていた場合はただちに捕殺する。

6　繰糸用の繭の管理

（1）繭（蛹）の不活化

繰糸に用いる本遺伝子組換えカイコの繭は収穫の当日又は翌日に製糸工場に運搬し、その日のうちに熱乾燥（60℃、24 時間以上）または冷凍（-20℃、24 時間以上）にかけて、内部の蛹を死滅させる。乾燥機や冷凍庫に繭を入れた後は、周囲を確認してこぼれ落ちた繭を回収する。なお、非遺伝子組換えカイコの繭は、120℃から徐々に温度を下げながら乾燥させるのが一般的であり、本遺伝子組換えカイコの繭は非遺伝子組換えカイコの繭とは分けて処理されることになる。

（2）繰糸時の繭の管理

本遺伝子組換えカイコの繭から繰糸する場合は、非遺伝子組換えカイコの繭とは別の繰糸機を用いることにより、繰糸後に残る不活化済みの本遺伝子組換えカイコの蛹が非遺伝子組換えカイコの

蛹に混入することを防止する。

（３）繰糸後の蛹の管理

繰糸後に残る不活化済みの本遺伝子組換えカイコの蛹は飼料等として流通しないように、非遺伝子組換えカイコの蛹とは分けて管理した上で、産業廃棄物処理業者に委託して産業廃棄物として焼却処理する。不活化済みの本遺伝子組換えカイコの蛹が非遺伝子組換えカイコの蛹に混入した場合は、すべてを同様に産業廃棄物として焼却処理する。産業廃棄物として廃棄する際には、産業廃棄物管理票（マニフェスト）を取り交わし保管する。

7　クワコの発生時期の調査

モニタリング計画書に基づいて本遺伝子組換えカイコを飼育した翌年に実施するモニタリングに資するため、本遺伝子組換えカイコの飼育が予定されている地域において、本遺伝子組換えカイコを飼育する年の 5 月から 7 月まで、フェロモントラップを 1 週間に 1 回交換しながら設置し、クワコのオス成虫が発生する時期を特定する。ただし、周辺地域でクワコのオス成虫の発生時期がすでに調査されている場合は、その情報を用いることができる。

8　本遺伝子組換えカイコの使用に関する研修

農研機構は、本遺伝子組換えカイコを適切に管理するため、本遺伝子組換えカイコの利用について契約等を交わした者に対して、本遺伝子組換えカイコの幼虫を第一種使用等として飼育する者及び本遺伝子組換えカイコの繭からの繰糸を行う者を対象として、本遺伝子組換えカイコの飼育を開始する前に、法令や本飼育等要領を遵守させるための研修を行わせるとともに、その結果を報告させる。また、当該研修が実施される際は、農研機構から講師を派遣する。研修においては、別途マニュアルを作成した上で、（１）法令、（２）本遺伝子組換えカイコの第一種使用規程、（３）本飼育等要領に基づくクワコとの交雑防止措置や蛹の廃棄手順などの管理手法、（４）飼育や繰糸等の実施状況の報告手続き、などについて解説する。

資料３．モニタリング計画書

モ ニ タ リ ン グ 計 画 書

平成２８年１１月１８日
差し替え平成２９年７月１３日

氏名　　国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
理 事 長　　井　邊　時　雄
住所　　茨城県つくば市観音台３丁目１番地１

１　実施体制及び責任者

実施体制及び責任者は以下の通りである。

実施体制

（１）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

本モニタリング計画書に基づいて実施するモニタリングの統括、マニュアルの作成、生産者へのフェロモントラップの送付、捕獲したクワコの検査等を担当する。

（平成２８年１１月現在）

（個人名・所属は個人情報のため非開示）

氏名	所属・役職
（責任者）	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門　企画管理部長
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門

（２）生産者

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）の指示の下、フェロモントラップの交換と農研機構への送付を担当する。なお、毎年、本モニタリング計画書に基づき農林水産省消費・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（以下「農林水産省及び環境省」という。）にモニタリング開始前に提出するモニタリング実施要領において、該当する生産者の氏名を報告する。

２　モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称及び項目

（１）名称：カイコ（*Bombyx mori*）及びクワコ（*Bombyx mandarina*）

（２）項目：緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-EGFP*、*Bombyx mori*）（HC-EGFP ぐんま、HC-EGFP 200、HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）とクワコとの交雑個体（交雑個体の可能性を有する個体を含む。）

３　モニタリングを実施する場所

本遺伝子組換えカイコと野生のクワコとの交雑第一代が生じる可能性があるとすれば、飼育後の飼育残渣とともに繭等が屋外に出てメス成虫が生じ、野生のクワコのオス成虫と交尾した上で、飼育残渣中に産み付けられた卵から孵化した交雑第一代の孵化幼虫が近くの桑樹に到達した場合が考えられる。このことから、本遺伝子組換えカイコの飼育に係るクワコとの交雑個体の発生をモニタリングする場所としては、本遺伝子組換えカイコを飼育した後の飼育残渣が屋外に堆積される場所（以下「飼育残渣堆積場所」という。）に隣接する桑畑又は桑樹が適している。なお、本遺伝子組換えカイコの飼育にあたっては、第一種使用等による飼育等要領（以下「飼育等要領」という。）において、飼育残渣の管理を課して、飼育残渣中でのクワコとの交尾を防ぐこととしている。

農研機構は、毎年の飼育開始前に、本遺伝子組換えカイコの利用について契約を交わした者を通じて、本遺伝子組換えカイコを飼育しようとする場所を毎年の飼育開始前に把握し、そのすべての場所においてモニタリングを実施する。ただし、クワコの生息調査等の科学的な知見に基づき、クワコが生息していないと考えられる地域で飼育する場合は、本モニタリング計画書の９の（1）に定めるモニタリング実施要領の作成の際に、学識経験者の助言等を踏まえ、農林水産省及び環境省と協議の上、モニタリングを実施する場所には設定しない。

４　モニタリングを実施する場所における対象となる野生動植物等の生息又は生育の状況

（1）カイコ

カイコの自然環境における生息の報告はない。

（2）クワコ

クワコは、日本国内では北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島までで、奄美大島以南での生息記録はない。幼虫はクワの葉を摂食し、桑園だけではなく、山林にクワが自生していれば生息する可能性がある。冬季はクワが落葉するため、幼虫が生存できるのは春から秋にかけてであり、卵で越冬する。成虫の発生時期は地域によって違いはあるものの、最長で 5 月下旬から 12 月中旬までで、寒冷地ではこれより短い期間となる。

（3）カイコとクワコの交雑個体

野生のクワコ集団において、カイコとクワコの交雑個体の生息の報告はない。

５　モニタリングの期間

本遺伝子組換えカイコと野生のクワコとの交雑第一代の成虫が生じる可能性があるとすれば、本遺伝子組換えカイコのメス成虫が屋外で生じ、野生のクワコのオス成虫と交尾した上で、産み付けられた卵が冬を越して、翌春に孵化した交雑第一代の孵化幼虫が成長した場合が考えられる。このことから、本遺伝子組換えカイコの飼育に係るクワコとの交雑個体の発生をモニタリングする期間としては、本遺伝子組換えカイコを飼育した翌年から開始し、本遺伝子組換えカイコの飼育を終了した翌年までとする。

６　実施時期、頻度その他のモニタリングの方法 (注)

（１）実施時期

モニタリングの実施期間は、モニタリングを実施する場所またはその周辺でのクワコの発生時期の調査結果に基づいて、原則として、春に孵化した野生のクワコが成虫になる時期の 2 週間程度前から 2 か月間程度とし、クワの生育等も勘案して、本モニタリング計画書の９の（１）で農研機構が作成するモニタリング実施要領において定める。

（２）実施頻度

原則として、1 週間に 1 回の頻度でフェロモントラップを交換し、捕獲した個体の調査を行う。

（３）モニタリングの方法

１）フェロモントラップの仕様は以下の通りとする。

①フェロモントラップの構造

フェロモントラップの構造は、昆虫の発生予察等に一般的に用いられる粘着式トラップ（サンケイ化学、SE トラップなど）とする。

②誘引源

原則として、合成した性フェロモン（ボンビコール）1 mg を添加したゴムキャップを用いる（Yukuhiro *et al.*, 2016)。

２）フェロモントラップを設置する場所の設定

フェロモントラップを設置する場所は、本遺伝子組換えカイコを飼育する生産者と協議の上で、以下の基準に基づいて農研機構が設定し、モニタリング実施要領に記載する。

①フェロモントラップの設置高

フェロモントラップを設置する高さは 0.3 ～ 2.3 m の範囲とする（Yukuhiro *et al.*, 2016)。

②フェロモントラップの設置場所

野生のクワコ（オス成虫）との交雑の可能性は、遺伝子組換えカイコ（メス成虫）の飼育残

(注) モニタリングの方法の詳細については、別添の参考資料（平成 29 年 2 月 14 日生物多様性影響評価検討会昆虫分科会資料）に基づいて定めた。

渣に当該繭が紛れ込み、羽化した場合に想定される。しかしながら、クワコと交尾し産卵が行われ当該卵がふ化し幼虫が生じたとしても、移動能力が乏しいため、エサとなる桑樹にたどりつき、生存し続けることは難しい。そこで、念のため、交雑個体が発生するとすればその可能性があるのは飼育残渣に最も近い桑樹に孵化幼虫が到達した場合であると考えられることから、フェロモントラップを設置する場所は、原則として、飼育残渣堆積場所すべてについて、その飼育残渣堆積場所ごとに最も近い桑樹を囲むように、半径 30 m 以内に 4 カ所とし、もし飼育残渣堆積場所の敷地内に桑樹がない場合は、当該飼育残渣堆積場所を囲むように、半径 30 m 以内に 4 カ所とする。詳細は、モニタリングを実施する場所ごとにモニタリング実施要領において定める。ただし、飼育残渣堆積場所同士の距離が 30 m 以下である場合は 1 つの飼育残渣堆積場所とする。なお、モニタリング実施要領において定める期間内に、気象災害等によりフェロモントラップの継続的な設置が困難となった場合、またはフェロモントラップが安全に交換できなくなった場合は、その近くに新しく設置場所を変更してモニタリングを継続する。

３）フェロモントラップの交換

フェロモントラップは農研機構が必要数を用意し、モニタリングを実施する生産者に送付する。フェロモントラップを受け取った生産者はフェロモントラップを交換し、回収したフェロモントラップを農研機構に送付する。

４）回収したフェロモントラップの調査

生産者から送付されたフェロモントラップを受け取った農研機構は、捕獲されたクワコの頭数を記録した上で、外部形態からカイコとの交雑第一代であると考えられた個体について、別紙のとおりゲノム DNA を用いた PCR 又はゲノムサザンハイブリダイゼーションを行うことで、本遺伝子組換えカイコとの交雑個体であるかどうかを判定する。

7　モニタリング結果の解析方法

捕獲した交雑第一代の個体数と、そのうち供与核酸の保有が確認された個体数から、本遺伝子組換えカイコの第一種使用等によるクワコとの交雑の程度を分析する。

8　農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法

モニタリングを実施した翌年 1 月末までに、別表の様式に従い、農林水産省及び環境省に対し報告を行う。

9　その他必要な事項

（1）モニタリング実施要領の作成

モニタリングの実施に当たっては、モニタリングを実施する生産者、モニタリングを実施する場所の詳細（周辺状況などが分かる地図）、フェロモントラップの設置場所の詳細（飼育残渣堆積場所との関係が分かる地図又は図面）、実施時期、手順等をまとめたモニタリング実施要領を定める。

モニタリング実施要領は、飼育等要領で定めるクワコの発生時期の調査結果、最新の科学的知見、前年までに実施したモニタリングの結果及び生物多様性影響評価検討会昆虫分科会の学識経験者の助言等を踏まえ、農林水産省及び環境省と協議の上、毎年のモニタリング開始前に作成するものとする。

（２）モニタリングを実施する生産者への指導

農研機構は、モニタリングを実施する生産者に対し、フェロモントラップの交換や農研機構への送付の方法について、手順書を示して、モニタリング開始前に指導する。

（３）モニタリング計画の見直し

調査結果を踏まえ、農林水産省及び環境省と協議の上、必要に応じて本モニタリング計画書を見直すものとする。

（４）モニタリング結果の公表

特定の者に不当な利益又は不利益をもたらす可能性があると考えられる情報を除き、モニタリングの結果を公開する。

(参考文献)

Yukuhiro K., Kuwabara N., and Kômoto N. (2016) Pheromone dose and set height of pheromone traps for efficient collection of wild mulberry silkmoths, *Bombyx mandarina*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* in press.

(参考)

カイコとクワコの交雑第一代及びクワコのオス成虫

交雑第一代のオス成虫（体長 18mm 程度）はクワコのオス成虫（体長 14mm 程度）に比べて全体的に大きいこと、腹部が太いこと、体色が薄いこと等から、外部形態から容易に区別することができる。

別紙

供与核酸の有無の調査の方法

１．PCR による調査

PCR により、*EGFP* 遺伝子及び *DsRed2* 遺伝子の有無を調査する。対照として、細胞質アクチン *A3* 遺伝子を対象とした PCR も実施する。また、いずれの遺伝子についても、対照として、本遺伝子組換えカイコから抽出したゲノム DNA を用いた PCR も実施する。

２．ゲノムサザンハイブリダイゼーションによる調査

供与核酸を検出するためのプローブは *piggyBac R* に設定し、PCR により作成する。ゲノムサザンハイブリダイゼーションの対照として、本遺伝子組換えカイコから抽出したゲノム DNA を用いる。

別表

モニタリング結果報告書

年　　月　　日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長
環境省自然環境局野生生物課長

氏名（名称）
住所

緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-EGFP*、*Bombyx mori*）（HC-EGFP ぐんま、HC-EGFP200、HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の第一種使用規程に基づくモニタリングの結果を以下に報告します。

項目	内容
1. 実施体制	
2. 調査時期	
3. 実施場所	
4. 調査方法	
5. 調査結果 (1) カイコとクワコの交雑第一代（成虫）の捕獲頭数 (2) 本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体（成虫）の捕獲頭数 (3) クワコ（成虫）の捕獲頭数 (4) モニタリング結果の解析結果	
6. その他	

備考
・フェロモントラップの設置位置や、フェロモントラップの交換の記録等、関連資料を添付する。
・記載項目が多数ある場合には、別紙を用いて整理する。

資料４．緊急措置計画書

緊 急 措 置 計 画 書

平成２８年１１月１８日

氏名　　国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
　　　　理 事 長　　井　邊　時　雄
住所　　茨城県つくば市観音台３丁目１番地１

第一種使用規程の承認を申請している緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-EGFP, Bombyx mori* L.）（HC-EGFP ぐんま、HC-EGFP 200、HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合に当該影響を効果的に防止するため、以下の措置を執ることとする。

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

本遺伝子組換えカイコの第一種使用等において緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下の通りである。なお、緊急措置を講ずる際は、必要に応じて国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門カイコ業務安全委員会（以下「業務安全委員会」という。構成は本緊急措置計画書の末尾に掲載）による検討を踏まえるほか、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（以下「農林水産省及び環境省」という。）と協議することとする。また、第一種使用規程において定める第一種使用等による飼育等要領（以下「飼育等要領」という。）に基づいて本遺伝子組換えカイコを飼育するすべての生産者（以下「生産者」という。）を把握して連絡体制を構築し、緊急措置を講ずるための実施体制を整備する。

（平成２８年１１月現在）

（個人名・所属は個人情報のため非開示）

氏名	所属・役職
（管理責任者）	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門　企画管理部長
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門

資料4．緊急措置計画書

2　第一種使用等の状況の把握の方法

（1）本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体の意図しない発生

本遺伝子組換えカイコの飼育状況については、飼育等要領に基づいて把握する生産者を通じて把握する。また、モニタリング計画書に基づいて捕獲した個体が本遺伝子組換えカイコの供与核酸を保有していることを確認した場合には、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）はその旨をすみやかに農林水産省及び環境省に報告する。

（2）気象災害等による飼育施設等の被害状況

気象災害等が発生した場合は、生産者は速やかに本遺伝子組換えカイコの飼育施設等被害状況及び本遺伝子組換えカイコの状況を確認し、その結果を農研機構に報告する。

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

科学的根拠に基づき、本遺伝子組換えカイコの使用に伴い、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合、業務安全委員会において内容について確認を行い、農林水産省及び環境省と協議した上で、生産者及び飼育施設等のある自治体に電話、ファクシミリ、電子メール、文書等により連絡する。また、農研機構のウェブサイト等で広く周知するとともに、問い合わせ窓口を設置する。

4　本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が意図せず生じた場合の具体的な措置の内容

モニタリング計画書に基づいて実施するモニタリングの結果、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交雑個体が観察された場合は、農研機構は、業務安全委員会での検討を踏まえて、その周辺の生産者に指示して本遺伝子組換えカイコの飼育をすみやかに中断させ、本遺伝子組換えカイコについて以下の（1）及び（2）の措置を執らせるとともに、その結果を農研機構に報告させる。また、農研機構は（3）、（4）及び（5）に従ってモニタリングを強化して実施するほか、生産者が執った措置を必要に応じて確認する。

（1）本遺伝子組換えカイコ及びこれと同時に同じ飼育室で飼育している他のカイコの幼虫、繭（蛹）、飼育残渣等は、以下のように処理することで死滅させる。また、管理中は、取扱に注意を要する旨を見やすい箇所に表示する。

1）幼虫及びその飼育残渣については、逸失を可能な限り防ぐために、飼育室の戸や窓等を閉じるか 4 mm 目以下の網を設置して封じ込めて管理する。その際、隔離飼育区画における第一種使用等による本遺伝子組換えカイコの飼育試験及びモニタリング（以下「隔離飼育試験」という。）の結果から上蔟後 30 日間の管理でクワコとの交雑は防止できると考えられること、及び、5 齢幼虫が上蔟するまで 1 週間程度の期間を要すると考えられることから、管理する期間は 40 日間と

した上で、管理終了後に生存個体がないことを確認する。

２）飼育室で形成中の繭については、そのまま放置して成虫が大量に発生することを防ぐために、すべて集めたうえで、二重のビニール袋に密封して飼育室内で管理する。その際、隔離飼育試験の結果から上蔟後 30 日間の管理でクワコとの交雑は防止できると考えられることから、管理する期間は 30 日間とした上で、管理終了後に生存個体がないことを確認する。

（２）交雑個体と野生のクワコの交雑を防止するため、交雑個体が捕獲された地点の周囲の桑樹にフェロモントラップを継続的に設置する。設置する期間は、（３）に従って強化したモニタリングを実施している期間とする。また、クワコ以外の野生生物の生物多様性への影響を抑えつつ、野生のクワコ集団への供与核酸の浸透を防止するため、害虫防除の専門家の助言を受けながら、実施可能なあらゆる措置を排除せずに計画を策定し、農林水産省及び環境省と協議する。

（３）モニタリングは以下の通り強化して実施する。

１）交雑個体が捕獲されたフェロモントラップの設置場所の近くに桑畑があれば、その桑畑の周囲に 10 m 以下の間隔でフェロモントラップを設置する。近くに桑畑がなければ、そこから半径 30 m の範囲に生育する桑樹にトラップを設置する。

２）モニタリングの実施時期、実施頻度、方法等はモニタリング計画書の 6 に定める通りとする。

３）モニタリング結果の公表はモニタリング計画書の 9 に定める通りとする。

（４）最初に交雑個体が観察されてから 30 日以内に観察された交雑個体については、最初の観察と同一の事象とし、30 日後以降に新たに交雑個体が観察された場合は、交雑個体が継続的に観察されたとして、次の（５）に移行する。30 日後から 1 年後までに新たな交雑個体が観察されない場合は、通常のモニタリングに移行する。

（５）強化して実施したモニタリングの結果、本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が最初に観察されてから 30 日後から 1 年後までに新たな交雑個体が観察され、交雑個体が継続的に観察されたと考えられた場合は、それまでのモニタリングで得られた調査結果などを元に、農林水産省及び環境省と協議の上、さらに数か年継続してモニタリングを実施する。また、クワコ以外の野生生物の生物多様性への影響を抑えつつ、野生のクワコ集団への導入遺伝子の浸透を防止するため、（２）で害虫防除の専門家の助言を受けながら実施可能なあらゆる手段を排除せずに策定した計画を実施する。

5　気象災害等が発生した場合の具体的な措置の内容

気象災害等が発生した場合は、農研機構は、業務安全委員会での検討を踏まえて、以下の措置を執って結果を農研機構に報告するよう生産者に対し指示するほか、生産者が執った措置を必要に応じて確認する。

（1）飼育室が倒壊するなどの被害が生じた場合

本遺伝子組換えカイコを飼育している際に、気象災害等により飼育室が倒壊するなどの被害が発生して、本遺伝子組換えカイコの飼育が困難な場合は、本遺伝子組換えカイコの飼育を直ちに中止し、本遺伝子組換えカイコを2重のビニール袋に密封し、取り扱いに注意を要する旨を見やすい箇所に表示して、管理し得る屋内で40日間保管することによって死滅させる。

（2）飼育室が敷地外に飛散するなどの被害が生じた場合

本遺伝子組換えカイコを飼育している際に、気象災害等により飼育室が敷地外に飛散するなどの被害が発生した場合は、飼育室の断片等が確認された場所を中心に探索し、カイコがいればその場で捕殺するか、回収して2重のビニール袋に密封し、取り扱いに注意を要する旨を見やすい箇所に表示して、管理し得る屋内で 40 日間保管することによって死滅させる。その際、飼育室の断片が広範囲に飛散する場合も想定し、実際の被害状況に応じて必要な範囲を探索してカイコを捕殺又は回収する。

6　農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

緊急措置を執るべき状況が生じた場合は、業務安全委員会による検討を踏まえて緊急措置を講じたのち、速やかに農林水産省及び環境省へ報告するとともに緊密な連絡体制を構築するため、1で規定する管理責任者は、農研機構生物機能利用研究部門遺伝子組換え研究推進室を通じて、常に最新の情報を把握した上で、農林水産省及び環境省からの問い合わせに対応可能となるよう体制を構築する。

資料4. 緊急措置計画書

生物多様性影響の防止に関する事項について検討するための委員会の委員名簿

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門カイコ業務安全委員会は、以下の委員で構成される。

（平成２８年１１月現在）

（個人名・所属は個人情報のため非開示）

委員長	
（業務管理責任者）	生物機能利用研究部門　企画管理部長
委員	
（業務管理主任者）	生物機能利用研究部門　遺伝子利用基盤研究領域
	生物機能利用研究部門　新産業開拓研究領域
	生物機能利用研究部門　新産業開拓研究領域
	生物機能利用研究部門　企画管理部
	生物機能利用研究部門　企画管理部
	生物機能利用研究部門　企画管理部
	生物機能利用研究部門　企画管理部
	生物機能利用研究部門　企画管理部
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構　企画調整部
	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構　企画調整部
	群馬県蚕糸技術センター
	群馬県蚕糸技術センター

資料５．審査データの概要

第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

１．宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

（１）分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ　和名、英名及び学名

和名：カイコ

英名：silkworm

学名：*Bombyx mori* (Linnaeus)

ロ　宿主の品種名又は系統名

目的遺伝子を導入する系統から実用的な系統を育種した交配過程の概略を図 1 に示し、本申請に係る遺伝子組換えカイコ「緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-EGFP*、*Bombyx mori*）（HC-EGFP ぐんま、HC-EGFP 200、HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200）」（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の作出に使用した宿主の品種又は系統名について記載する。

最初に卵にプラスミド DNA を注入して遺伝子を導入する宿主系統としては①「w-1 pnd」を用いた。この系統は、注入後の卵が休眠過程を経ずにすぐに孵化することから、注入によって卵殻に穴が開いた卵の乾燥による影響を受けにくく、死亡を防ぐことができる（図 2）。

次に、得られたカイコを休眠系統である②「白/C」と交配することで、休眠系統化した。これにより、卵の長期保存が可能となり、系統の維持にかかる労力が軽減される。

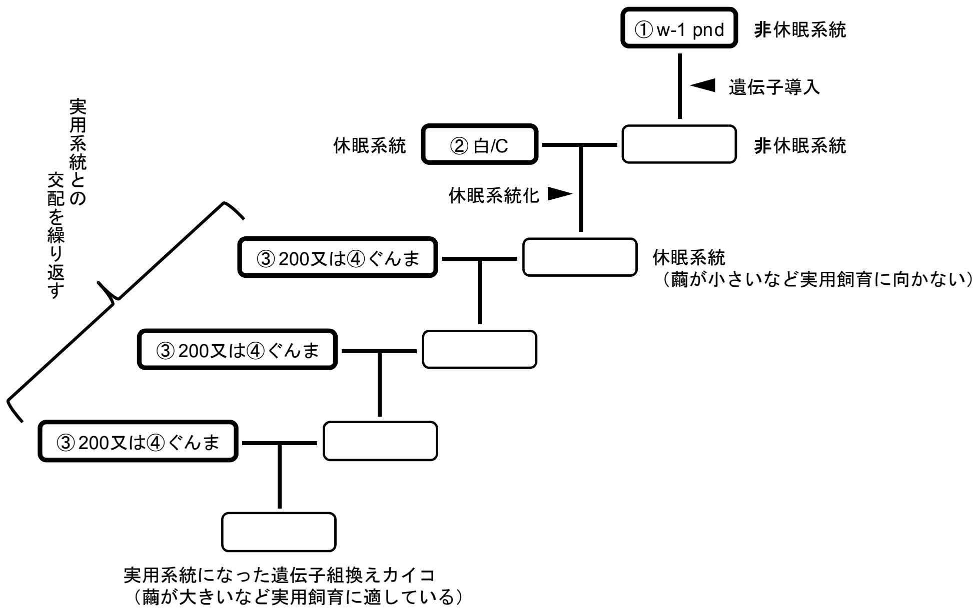


図 1.　目的遺伝子を導入する系統から実用的な系統への育種までの交配過程の概略

さらに、この段階では、繭が小さいなど、実用的な系統としては不適切な性質を持つことから、実用系統である③「200」又は④「ぐんま」との交配を繰り返すことにより、実用的な遺伝子組

換えカイコ系統に育種した。

① w-1 pnd

最初に目的遺伝子を導入するために用いた系統である。

一般的に用いられているカイコ系統は、卵の時期に数カ月に渡って休眠（越冬）するとともに、卵が着色する性質を持つが、この w-1 pnd 系統は、休眠せず、卵が着色しないという性質を持つ。

休眠しないという性質（非休眠性）は、遺伝子導入後の卵を生存させるために必要である。カイコへの遺伝子導入においては受精卵の卵殻に穴を開けて DNA を顕微注入する方法をとるため、注入後にその穴から水分が蒸発する。一般的な養蚕に用いられているカイコ系統のように卵で休眠すると、注射後から孵化までの間に数カ月の期間を要するため、穴を開けた卵は乾燥して死亡する。これに対し、非休眠性の系統を用いれば、注入後から 10 日程度で孵化するので、乾燥による悪影響を抑えて生存率を高めることができる（図 2）。

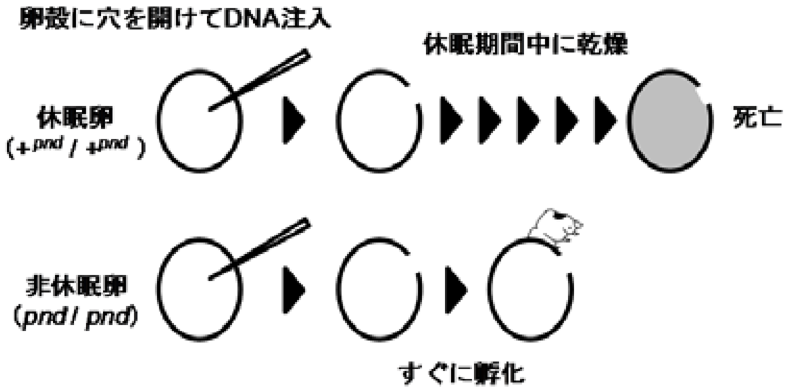


図 2. カイコへの遺伝子導入には非休眠性の系統を使用する。

卵が着色しないという性質（白卵性）は、遺伝子が導入された個体をスクリーニング（選抜）するために必要となる。本遺伝子組換えカイコの作出にあたっては、遺伝子が導入された際のマーカー（目印）として、眼において赤色蛍光タンパク質を発現させている。この赤色蛍光の発現の有無は、卵中の胚発生の途中から成虫までの各発生段階で調べることができるが、胚発生の途中で調べることで、大量の個体を効率的にスクリーニングすることが可能となる。これに対し、着色卵では赤色蛍光を卵の外から観察することが困難である（図 3）。

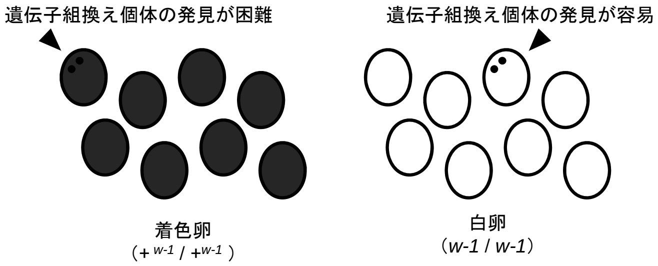


図 3. 遺伝子組換えカイコのスクリーニングは白色卵で行う。

以上のことから、非休眠性で白卵性のカイコ系統として w-1 pnd を作出した。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下「農研機構」という。）の保存蚕品種の中から、非休眠遺伝子 *pnd* を持つ No.848 と白卵性遺伝子 *w-1* を持つ No.715 とを交配し、その後代において両遺伝子を持つ個体を選抜して系統化した。

② 白/C

本系統は、非休眠性の遺伝子組換えカイコ系統と交配して、休眠性へ性質を変更するために用いた系統である。

①w-1 pnd 系統に遺伝子を導入して作出した遺伝子組換えカイコ系統は非休眠性であり、産み付けられた卵がすぐに孵化する。そのため、2 カ月ごとに飼育し続ける必要が生じ、系統維持にかかる労力が大きな負担となる。一方、休眠性の系統であれば、卵の状態で長期にわたって保存することができるため､1 年に 1 回程度の飼育で系統を維持することができる｡そこで、作出した遺伝子組換えカイコの性質を休眠性に変えることで、系統維持の労力の軽減を図る（図 4）。

これに対し、系統維持に際して、マーカーとなる赤色蛍光タンパク質の発現を確認する必要があるため、白卵性は残していることが望ましい。

以上のことから、休眠性で白卵性のカイコ系統として白/C を作出した。非休眠性（*pnd*）で白卵性（*w-1*）の ①w-1 pnd 系統と、休眠性（$+^{pnd}$）で着色卵性（$+^{w-1}$）の CS01 系統とを交配し、その後代において、休眠性（$+^{pnd}$）で白卵性（*w-1*）の個体を選抜して系統化した。

資料5．審査データの概要

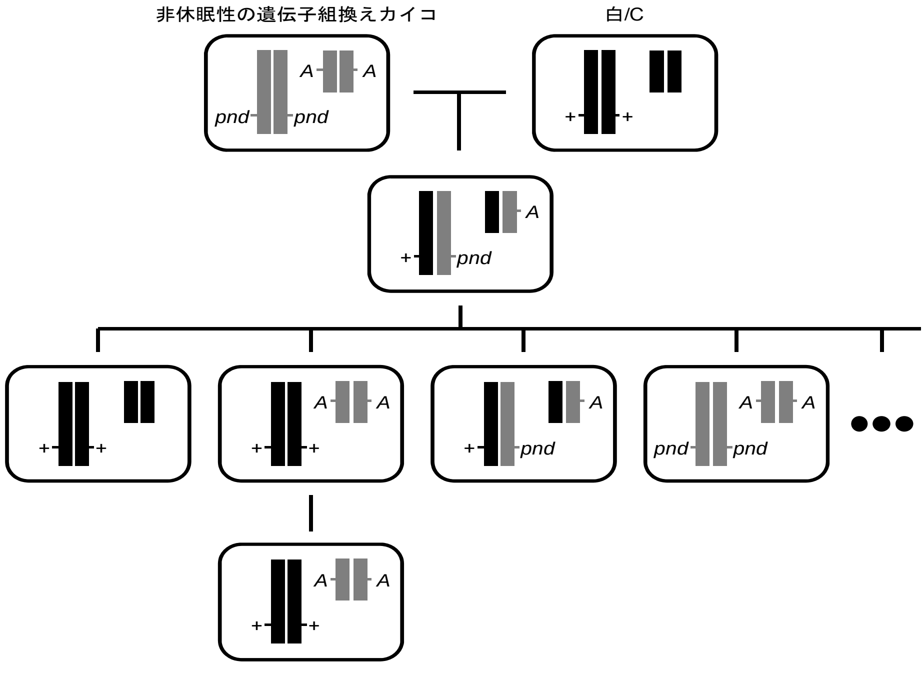


図 4. 非休眠性の遺伝子組換えカイコを休眠系統にする交配の例
遺伝子 *A* を導入した非休眠性の遺伝子組換えカイコ（左上）がある場合、休眠性の白/C 系統を交配し、その後代において、休眠性の遺伝子組換えカイコを選抜して系統化する。

③ 200

200 系統は、遺伝子組換えカイコ系統と交配して、実用的な系統とするために用いた系統である。

①w-1 pnd 系統や②白/C 系統は主に実験用に用いられている系統であり、繭が小さく、繭から糸を取る繰糸がしにくいなど、養蚕農家で飼育して産業化するのには適していない。そこで、遺伝子組換えカイコ系統と実用系統とを交配することで、繭が大きく繰糸が容易で安定した品質の繭を作る実用的な遺伝子組換えカイコ系統を育成した（図 1）。

200 系統は、群馬県蚕糸技術センターにおいて強健品種 CK01 と多糸量品種 CT03 とを交配・選抜して育成した実用系統である。

④ ぐんま

③の 200 系統と同様に、遺伝子組換えカイコ系統と交配して、繭が大きく繰糸が容易で安定した品質の繭を作る実用的な遺伝子組換えカイコ系統を育成するために用いた系統である（図 1）。 このぐんま系統は、群馬県蚕糸技術センターにおいて強健品種 GNK2 と多糸量品種 GNT3 とを交配・選抜して育成した実用系統である。

ハ 国内及び国外の自然環境における生息状況

カイコの自然環境における生息の報告はない。なお、日本に生息する近縁野生種であるクワコ *Bombyx mandarina* の生息状況については別添 1 を参照。

資料5．審査データの概要

養蚕農家で飼育するカイコについては、蚕種製造業者において、産卵後のカイコのメス成虫が微胞子虫を保有しているかどうかを調べる母蛾検査が一般的に行われている。その際、感染が判明した場合はそのメス成虫が産んだ卵を廃棄し、微胞子虫の経卵感染を防いでいる。本遺伝子組換えカイコを作出する際に用いた宿主系統のうち、w-1 pnd と白/C については、主として人工飼料を用いて飼育されており、微胞子虫の感染がないと考えられたことから、母蛾検査は行わずに使用した。実用品種であるぐんま系統と 200 系統については、母蛾検査を実施し、陰性のメス成虫が産んだ卵のみが宿主として用いられた。なお、本遺伝子組換えカイコについては、桑葉を与えて飼育した場合は、採卵のたびに母蛾検査を実施し、陰性のメス成虫が産んだ卵のみを飼育している。

（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

カイコ（*B. mori*）は、野生のクワコ（*B. mandarina*）を馴化してきわめて高度に家畜化した昆虫であり、その飼育は今から数千年前の中国本土において始まり、日本には弥生時代に養蚕が伝えられたと考えられている（日本蚕糸学会、1992; 森、1995; 河原畑、1998; 図 5）。

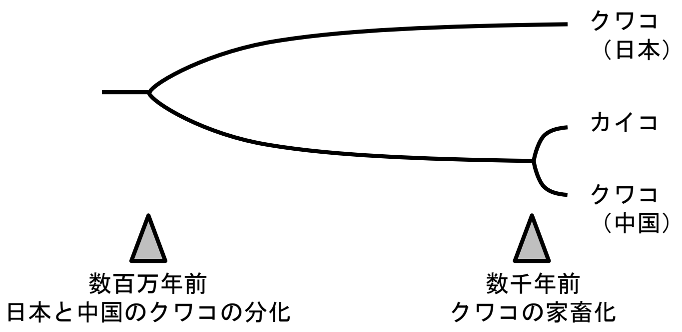


図 5.　クワコとカイコの系統関係（模式図）

明治時代以降は重要な輸出品である生糸を生産するため、日本国内において養蚕が盛んになり、最盛期である 1930 年には収繭量が 39.9 万トンに達したが、2013 年には 168 トンにまで落ち込んでいる（平成 20 年度蚕業に関する参考統計、農林水産省; 蚕糸・絹業提携支援センター、2015; 図 6）。

資料5．審査データの概要

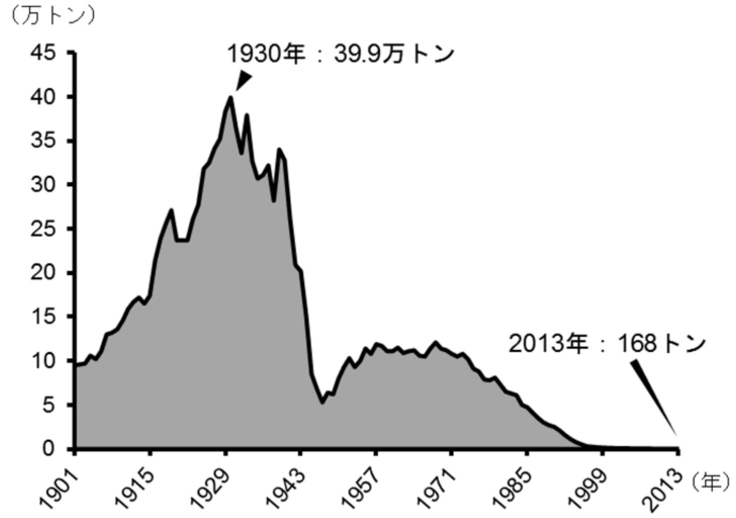


図 6. 日本の収繭量の推移

平成 20 年度蚕業に関する参考統計（農林水産省）及びシルクレポート 41 号（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）に基づいて作成

ロ　主たる生産地域、生産方法、流通実態及び用途

カイコは、世界の温帯から熱帯地域で飼育されている。近年の主な生産国は中国、インド、ベトナムなどであり、世界全体の繭生産量 80 万トンのうち 77%が中国（62 万トン）、16%がインド（13 万トン）で生産されている（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）。2013 年の日本の繭生産量は 168 トンであり、主な生産地は、福島県を中心とした東北地方と、群馬県を中心とした関東地方である（蚕糸・絹業提携支援センター、2015; 図 7）。

養蚕で得られる産物の多くは生糸などの繊維製品として流通している。国内で生産される生糸のほとんどは国内消費向けに流通している。2013 年には、生糸の国内生産量が 409 俵（約 24.5 トン）であったのに対し、輸入量は 9,332 俵（約 560 トン）であった（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）。また、同じ 2013 年には、絹糸の輸入量が 15,844 俵（約 951 トン）であったのに対して輸出量が 426 俵（約 25.6 トン）、絹織物の輸入量が 6,662 平方メートルであったのに対して輸出量が 5,431 平方メートルであった（蚕糸・絹業提携支援センター、2015）。

近年は、絹糸を繊維製品以外の化粧品等に用いることがあるほか、第二種使用等として拡散防止措置を執って、遺伝子組換えバキュロウイルスを感染させたカイコを工場で飼育してイヌやネコのインターフェロン等の有用物質の生産に用いられている（植田、2006）。遺伝子組換えカイコの作出技術が実用化される前のカイコを用いた有用物質生産では、飼育のたびに遺伝子組換えバキュロウイルスを感染させる労力や、遺伝子組換えバキュロウイルスの封じ込めなどの課題がある。

資料5. 審査データの概要

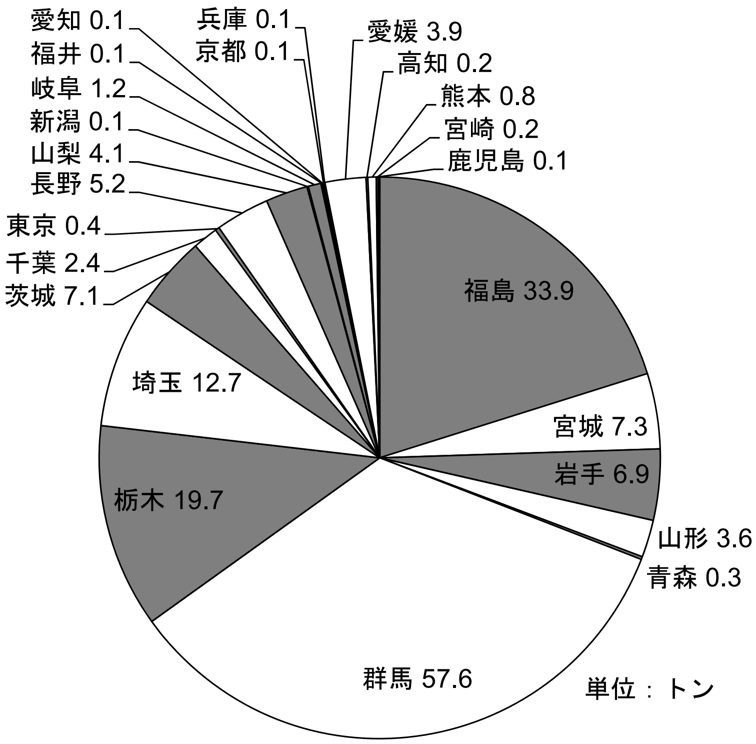


図 7. 都府県別の収繭量（2013 年）

蚕糸・絹業提携支援センター（2015）に基づいて作成

ハ　国内における養蚕を目的とした飼育の現状

日本国内での飼育期間は桑葉が入手可能な春から秋までで、屋内での飼育が一般的である。

養蚕農家で生糸生産のために飼育する実用品種としては、2 種類の原種を交配して得られる二元交雑種や、4 種類の原種から 2 段階の交配を経て得られる四元交雑種などの一代雑種が用いられており、その蚕種（卵）は養蚕農家が自ら作るのではなく、専門の蚕種製造業者が生産し、養蚕農家はこれを購入して飼育している（福田、1979）。蚕種製造業者では、微粒子病を引き起こす微胞子虫 *Nosema bombycis* の経卵感染を防ぐため、産卵後のカイコのメス成虫が微胞子虫を保有しているかどうかを調べる母蛾検査が一般的に行われ、感染が判明した場合、卵は廃棄される。

現在、日本国内の多くの養蚕農家では、孵化から 3 回目の脱皮直前までの期間（10 日間程度）は、温度・湿度が管理され、清潔な飼育環境を維持できる稚蚕共同飼育所で共同飼育を行っており、その間は人工飼料を用いることが多い。各養蚕農家では 3 回目の脱皮直前でカイコを受け取って 4 齢から桑葉での飼育を開始し、12〜13 日間程度で 5 齢幼虫が吐糸を開始する。吐糸開始から 10 日間程度経過した時点で、繭を品種ごとに区別して袋に入れ、製糸工場等に出荷する。繭を放置すると、吐糸開始から 2〜3 週間程度で成虫が羽化するが、繭から成虫が出ると、その繭が製糸に使えないだけでなく、成虫の排泄物により他の繭も汚染されて商品価値がなくなるため、養蚕農家で成虫を生じさせることはなく、製糸工場でもただちに熱風等により繭を乾燥させ、内部の蛹を殺し、成虫が生じることはない。また、養蚕農家では一代雑種を購入して飼育するため、採卵も行われない（図 8）。

資料5．審査データの概要

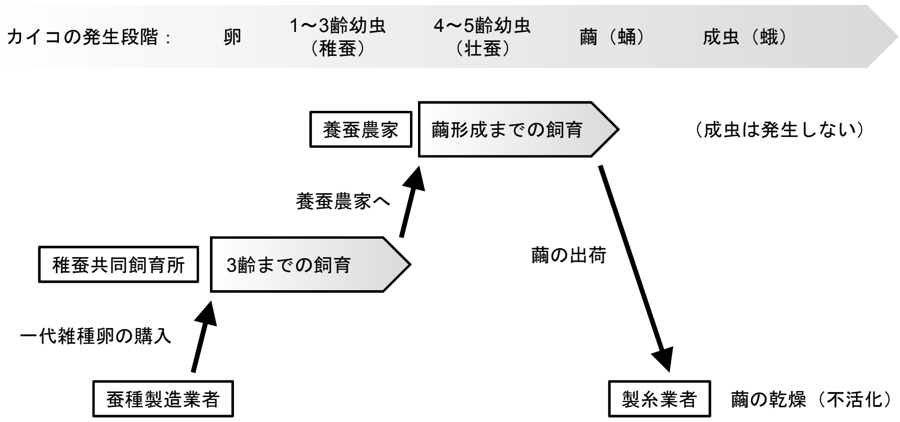


図 8. 一般的な養蚕の流れ

年間の飼育回数や飼育時期は、気候や各養蚕農家の事情等によって異なるが、たとえば、群馬県においては 5 月上旬から 9 月下旬まで、年間 4 回の飼育を行う場合が多い。

（3）生理学的及び生態学的特性

イ　基本的特性

カイコの卵は長径 1.3 mm、短径 1 mm、厚さ 0.5 mm くらいの平たい楕円形で、外側は固い卵殻で包まれている（森、1995）。自然状態で 1 年に 1 回しか世代を繰り返さず卵休眠する 1 化性系統と、2 回世代を繰り返す 2 化性系統、休眠しないで世代を繰り返す多化性系統がある（日本蚕糸学会、1992）。1 化性系統や 2 化性系統は飼育条件や卵の保護温度の管理、浸酸（受精卵の塩酸浸漬）などによって、孵化時期を人為的に制御可能である。

通常 4 回の幼虫脱皮を経て、孵化後 25 日間程度で営繭する。その後、繭の中で蛹を経て 2〜3 週間程度で成虫になる（森、1995）。遺伝的な要因や飼育条件等の影響によっては、通常より 1 回少ない 3 回の幼虫脱皮の後に蛹になる場合もあり、このようなカイコを三眠蚕と呼ぶ（脱皮前の静止状態を「眠」と言い、3 回目の脱皮の後の 4 齢が最終齢となってその後に蛹になることから）。三眠蚕の 4 齢期（最後の幼虫期間）は通常のカイコの 4 齢期よりも数日長く（竹内、1954）、通常のカイコが 4 回目の脱皮のために静止している期間に、三眠蚕は桑葉を摂食するために体を動かすため、容易に発見でき直ちに排除される。現在では、実用系統を養蚕農家等で飼育する場合には、3 齢まで温度や湿度が管理された施設で人工飼料を与えて育てることで性質を安定させており、三眠蚕が生じることはきわめて稀である。

繭の形は系統により様々で、楕円型・俵型・破風型などがあるほか、2 頭以上が 1 つの繭を作る玉繭もある。繭の色は白色が多いが、系統によって黄色・肉色・薄緑色などがある。

カイコは数千年前に中国で野生のクワコを馴化して家畜化されたと考えられており、現在は運動性が極めて退化している。たとえば、幼虫は餌がなくなっても飼育容器から外に出ることがないため、養蚕農家では飼育容器に蓋をすることなく飼育している。また、成虫に翅はあるが、体

が大きいことや飛翔筋が弱いことなどのため、羽ばたくことはできても飛ぶことはできない。オス成虫はメス成虫の放出する性フェロモンを感知すると飛ばずに歩いて探索する。交尾後のメス成虫も飛ばずに歩きながら産卵する。メス成虫が産卵する範囲を調べたところ、半径 18 cm 以内に 85%の卵を産んでいた（河本ら、2014）。実用品種においては繭が厚くなりすぎているため羽化した成虫が繭から出てこられない場合も多い。カイコはクワコのような擬態行動をすることがなく、体色も白色のものがほとんどで保護色がなく、自然環境下で鳥などの捕食者から身を守る能力を失っている。成虫の生存期間は、最も長い系統で 15 日間との報告がある（村上ら、2010）。なお、クワコの基本的特性については別添 1 を参照。

ロ　生息又は生育可能な環境の条件

幼虫は桑葉のみを摂食して成長し、成虫は一切の摂食・飲水を行わない（日本蚕糸学会、1992）。

カイコの生存可能な温度範囲は発育時期によって異なるが、おおむね 7～40℃であり、実用的に飼育できるのは 20～30℃である（福田、1979）。湿度は、高すぎると病原微生物が発生しやすくなり、低すぎると桑葉が萎れやすくなる。また、1 齢では多湿が望ましく、5 齢ではある程度の乾燥環境がよいが、いずれにしても、90%以上や 50%以下の湿度は生育に不適当である（福田、1979）。飼育の光条件は生育の揃いに影響し、明で 16 時間、暗で 8 時間程度にするのがよい（福田、1979）。

カイコは基本的に屋内で容器に入れて飼育されている。飼育容器は、飼育の目的や規模によって異なる。多くの養蚕農家では、長さ数 m 以上、深さ数 10cm の容器を用いて、枝に付いたままの葉（条桑）を与えて大量飼育を行っている（図 9）。養蚕農家で壮蚕を飼育する場合、湿度過多を避けるため、飼育容器には蓋をすることはない。養蚕農家での 1 回の飼育数は 10 万頭程度が平均的だが、大規模な養蚕農家では 1 回に 30 万頭程度を飼育する例もある。飼育に伴って生じる枝や糞等の飼育残渣の量は、飼育規模や季節等によっても変動するが、12,000 頭を飼育した場合、400 kg 程度が生じる。

図 9. 条桑によるカイコの大量飼育用の容器の例

カイコ幼虫の運動性は極めて低く、餌（桑葉）がなくなっても逃亡せず、蓋のない容器でも飼

育できる。たとえば、小泉・松田（1960）は、ほぼ平らな竹製の蚕箔（ざるの様な飼育台）に紙を敷いた飼育条件で幼虫の行動範囲を調べているが、蚕箔内の調査範囲の外に幼虫が出ることはなかった。また、脚の把握力が弱いため、仮に屋外の桑樹に幼虫を置いても、風等により容易に落下する。このため、カイコ幼虫が人間に管理されない野外に出ると、餌をとることができず、生育することができない。

幼虫期の最後に繭を形成する前（熟蚕期）には摂食を停止して行動が活発になり、上方への移動を開始するが、容器の角など繭を作ることができる足場に到達すると、そこで移動をやめて繭を形成する。養蚕農家では、繭 1 個分に区切られた蔟（まぶし）を多数連結した回転蔟に幼虫を登らせて繭を作らせる方法が一般的である（図 10）。

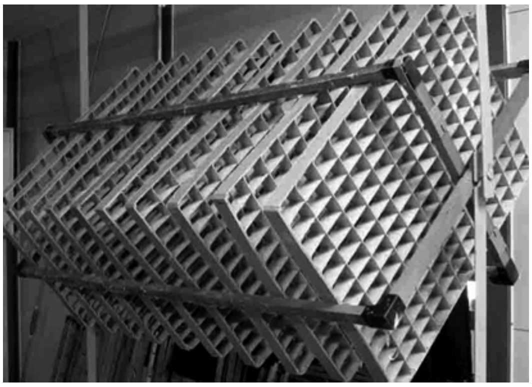


図 10. 回転蔟の例

上蔟中のカイコ幼虫が上方に移動すると、その重みで蔟が回転する。これが繰り返されることにより、カイコが全体に均等に分布し、1 区画に 1 頭ずつ繭を作る。

通常の養蚕農家においては繭の段階で出荷するため成虫が生じることはない。また、飼育するカイコのほとんどは複数の系統を交配して作る一代雑種であり、一般の養蚕農家が自ら採種（卵製造）することはないため、養蚕農家で成虫を生じさせることはない。農家から出荷された繭は、品質を維持して長期保存するために製糸工場等で乾繭（熱風等で繭を乾燥させること）されるため、繭中の蛹は成虫になる前にすべて死ぬこととなる。成虫は翅はあるが、飛翔筋が弱く体が大型化していること等により飛ぶことができず、胸脚を用いて歩行することで移動する。

カイコの幼虫は、人間の管理が行き届かない野外に放置されると、歩き回ることがないため、食草であるクワに到達することができないと考えられる。また、野生種であるクワコの幼虫とは異なり、擬態のための体色や斑紋を欠いており、桑樹に登って隠れることもできず、頭部・胸部を持ち上げて静止することで枝に擬態する行動も執らないことなどから、鳥や昆虫に速やかに捕食される（河本ら、2014）。野外でオス成虫が生じても、飛ぶことができないため、離れた場所にいるメス成虫に到達することができず、メス成虫が生じても速やかにアリ等に捕食されること等のため、交尾・産卵する機会がほとんどない（河本ら、2014）。

なお、クワコの生息又は生育可能な環境の条件については別添 1 を参照。

ハ　捕食性又は寄生性

—

ニ　繁殖又は増殖の様式

カイコは受精によって生じた卵から発生する有性生殖を行う。

蛹からの羽化（成虫の発生）は午前中に起きる（普後、1982）。蚕種製造や育種のためにカイコを交配して卵を得る際は、羽化した雌雄成虫を午前中のうちに交尾させ、午後から翌朝にかけて産卵させる。

メス成虫は静止したまま、尾部のフェロモン腺から性フェロモン（ボンビコール）を大気中に放出してオス成虫を誘引する。成虫は雌雄ともに飛ぶことができないため、性フェロモンを感知したオス成虫は歩いてメス成虫を探す。羽化した雌雄成虫を一緒に容器に入れておくと、オス成虫はただちに性フェロモンを感知してメス成虫に接近して交尾を開始する。交尾が成立したペアには個別に覆いをかぶせてペアを維持しておく場合もある。

交尾を数時間させた後は、人為的に割愛（雌雄を分けること）し、産卵用の紙の上にメス成虫を置いて産卵を開始させる。産卵は割愛後すぐに始まる場合もあるが、多くの場合では、周囲が暗くなる夕方以降に最盛となる（小泉ら、1962; 高見、1969）。割愛後のメス成虫は産卵用の紙の上を歩きながらその紙に卵を付着させて産卵する。メス成虫 1 頭の産卵数はおおよそ 500 個前後である（森、1995）。なお、通常の養蚕農家での繭生産においては出荷先の製糸工場等で繭を乾燥させて蛹を殺すため､成虫は現れない。

卵の休眠性は、自然状態で 1 年に 1 回しか世代を繰り返さず卵休眠する 1 化性系統、2 回世代を繰り返す 2 化性系統及び休眠しないで世代を繰り返す多化性系統がある（日本蚕糸学会､1992）。現在、繭生産のために飼育されるのは 1 化性系統又は 2 化性系統である。1 化性系統や 2 化性系統は飼育条件や卵の保護温度の管理、浸酸などによって、孵化時期を人為的に制御可能である。一定期間以上冷蔵保存した休眠卵を 25℃で保温すると、10～14 日間程度で孵化する。非休眠卵は産下後 10～14 日間程度で孵化する。

ごく稀ではあるが単為発生が起きることがあり、未交尾のメス成虫が産卵した不受精卵を放置した調査で、10 月に羽化したメス成虫約 150 頭が産卵した約 49,800 個の不受精卵を自然のまま放置したところ翌春に 132 頭（0.27%）が孵化した例や、6 月に羽化したメス成虫 621 頭が産卵した約 120,000 個の不受精卵を自然のまま放置したところ翌年に 22 頭（0.018%）が孵化した例が報告されている（川口、1934）。

カイコはきわめて高度に家畜化された昆虫であり、人間が管理しない野外で生存又は繁殖することはできず、自然環境における生息の報告はない。カイコ幼虫は、平らな飼育台を用いて飼育しても飼育台中にとどまるなど移動能力が極めて低く、餌がなくなっても移動しないことや、脚の把握力や歩行能力が弱いことから、屋外の桑樹に置いても、自ら餌を食べて生育することはできない（小泉・松田、1960; 森、1995）。また、カイコの幼虫は擬態のための体色や斑紋を欠いて

いるほか、体の前半部を持ち上げて静止することで枝に擬態する行動も執らず、日中でも動き回ることなどから、屋外に置くと、鳥や昆虫などに速やかに捕食される(河本ら、2014; Kômoto, 2017)。成虫は飛ぶことができず歩行能力も弱いことから、離れた場所にいる成虫同士が一緒になって交尾することはできない（森、1995)。また、成虫も幼虫と同じように擬態のための体色や斑紋を欠いているほか、鳥や昆虫に襲われても逃げることができないため、成虫も屋外では速やかに捕食される（河本ら、2014)。

養蚕農家で生糸生産のために飼育する実用品種としては、2 種類の原種を交配して得られる二元交雑種や、4 種類の原種から 2 段階の交配を経て得られる四元交雑種などの一代雑種が用いられており、その蚕種（卵）は養蚕農家が自ら作るのではなく、専門の蚕種製造業者が生産し、養蚕農家はこれを購入して飼育している（福田、1979)。また、蚕種製造業者は、蚕種の品質を確保するため、異なる系統が混入しないように、交配する系統の組み合わせの管理を徹底した上で、作業は専用の施設内で蚕種を製造している。

なお、他の昆虫ではウォルバキア等の共生細菌の感染により、細胞質不和合性が生じて繁殖できなくなる場合があることが報告されているが、カイコにおいてはそのような報告はない。

クワコの繁殖又は増殖の様式については別添 1 を参照。

【カイコとクワコとの間の交雑の可能性】

日本では、養蚕が約 2,000 年前の弥生時代に中国から伝えられて以降、各地でカイコが飼育されてきた（日本蚕糸学会、1992; 森、1995; 河原畑、1998)。この間、養蚕農家の蚕室で窓を開けて飼育したり、屋外でシートで覆う程度の簡易な方法で飼育したりするなど、開放的な条件で飼育されてきたが、これまでカイコとクワコが自然環境下で交配して交雑個体が意図せず野外に生じて定着したとの報告はない。

自然環境下でのカイコとクワコの交雑の可能性を考えた場合、カイコの成虫は雌雄ともにまったく飛ぶことができず、性フェロモンを放出するメス成虫にカイコのオス成虫が接近する際は、フェロモン源に向かって小刻みにジグザグ歩行しながら進む（神崎、1993）ことから、野外の桑樹上の枝でオス成虫の飛来を待つクワコのメス成虫に対して、カイコのオス成虫が地面から直接飛んでいくことも、遠回りして幹を登って接近することもできず、カイコのオス成虫とクワコのメス成虫の組合せでの交雑は考えられない。

したがって、カイコとクワコの交雑が自然環境下で起きるとしても、カイコのメス成虫とクワコのオス成虫の組合せに限られると考え、母性遺伝するミトコンドリアゲノムの遺伝子型に基づいて、野生のクワコ集団におけるカイコ由来遺伝子の存在の有無を調査した。

北海道から鹿児島までの日本各地で採集したクワコ 4,192 頭について、ミトコンドリアゲノムの *cox1* 遺伝子型を解析したところ、カイコ由来の遺伝子型を持つクワコは見つからなかった（Yukuhiro *et al.*, 2012a; 別添 5)。同様に、クワコ 1,019 個体について核ゲノムについても念のため *CAD* 遺伝子型を解析したが、カイコと同じ遺伝子型を持つクワコは見つからなかった

（Yukuhiro *et al.*, 2012b; 別添 5）。さらに、現在カイコを飼育している一般の養蚕農家の周辺で捕獲したクワコ 3,750 個体の *cox1* 遺伝子型もすべてクワコ型であり、カイコとクワコの交雑第一代は見つからず、実際の養蚕現場においてもカイコとクワコの交雑を示唆するようなデータは得られなかった（Kômoto *et al.*, 2016; 別添 6）。

しかし、カイコとクワコは性フェロモンが同じであることから、カイコのメス成虫とクワコのオス成虫を実験室内で同じ容器に入れてペアリングを行えば交尾するほか、カイコのメス成虫を人為的に屋外に出して野生のクワコのオス成虫を誘引させると交尾することが観察されている（Kuwahara *et al.*, 1984; Daimon *et al.*, 2012; 中村ら、1997; 飯塚・行弘、2007）。

また、カイコとクワコの間の生殖隔離、すなわ交雑可能性の程度を調査した結果では、30 cm×40 cm×14 cm（高さ）と 30 cm×40 cm×7 cm（高さ）の 2 種類のプラスチック製のざる籠を重ねた中に、羽化当日の成虫を雌雄 1 頭ずつ入れて交尾させたところ、わずかでも受精卵が得られた組合せ（ペア）の割合は、カイコ同士では 100%（10 ペアすべて）、クワコ同士では 89%（47 ペア中 42 ペア）、カイコ（メス）×クワコ（オス）では 21%（18 ペア中 4 ペア）となり、クワコ（メス）×カイコ（オス）の組み合わせでは交尾が成立しなかったとの報告がある（中村ら、1997）。同様に、33 cm×26 cm×6.5 cm（高さ）のプラスチック製のざる籠内で行った別の調査でも、カイコ同士では 100%（20 ペアすべて）、クワコ同士では 85%（20 ペア中 17 ペア）、カイコ（メス）×クワコ（オス）では 45%（20 ペア中 9 ペア）、クワコ（メス）×カイコ（オス）では 0%（20 ペア中 0 ペア）であったと報告されている（飯塚・行弘、2007）。クワコのメスとカイコのオスの組み合わせでは交尾が成立しない理由としては、クワコのメスが歩行力・飛翔力がともにカイコのオスよりも活発であるために、カイコのオスが交尾しようと接近するとクワコのメスが動き回るためで、交尾できないことが報告されている（中村ら、1997）。

このように、通常の養蚕を行う中では、カイコと野生のクワコとが自然環境下で交雑して、その後代が野生のクワコ集団中に定着することは想定しがたい状況にあるが、万一、偶発的にカイコとクワコが交配した場合は、その交雑個体が野生のクワコ集団中に一時的にせよ存在する可能性も考えられる。

実際、カイコとクワコを人為的に交雑させて得られた交雑個体及びその後代は妊性を持つ場合があることが確認されており、たとえば、室内での飼育条件下では、F_3 や F_4 まで継代飼育が可能であったとの報告がある（児玉、1927; 見波・大場、1939）。また、F_1 の 3 齢幼虫を屋外の網室内の桑樹上に放飼し、鳥やハチなどから捕食されないように管理したところ、翌年以降もその後代が幼虫や成虫として生息したとの報告がある（別添 7）。また、カイコとクワコの交雑第一代のオス成虫は飛翔能力を持ち、野外で放飼した個体を周囲のフェロモントラップで捕獲する試験を実施したところ、放飼地点の四方 30 m に設置したフェロモントラップで約半数が捕獲された（別添 9）。

カイコが屋外で産卵するのは桑樹上ではなく地面の上であることから、カイコとクワコの交雑第一代の孵化幼虫 2,964 頭を屋外の桑樹から 2 m の地面に放飼したところ、その後、当該桑

樹上に幼虫は認められず、繭を形成すると想定される 20 日程度後に当該桑樹の枝を剪定しながら葉を 1 枚ずつ観察した結果、幼虫も繭も認められなかった（Kômoto *et al.*, 2016、別添 8）。

ホ　病原性

—

ヘ　有害物質の産生性

—

ト　その他の情報

【宿主として用いた蚕品種の脱皮・変態・休眠等の性質】

本遺伝子組換えカイコを作出するにあたって使用した蚕品種のうち、「白/C」、「ぐんま」及び「200」は、通常の蚕品種と同様、4 回の幼虫脱皮の後、5 齢を最終齢として、蛹を経て成虫になり、休眠卵を産む。「w-1 pnd」は、非休眠卵を産むが、その他の点は他の 3 品種と同じである。

【寄生バエやハチ、ネズミ等の野生生物から捕食される可能性】

養蚕農家においてカイコに被害を与える主な動物としては、寄生性のカイコノウジバエ（*Blepharipa zebina*）、クワコヤドリバエ（*Exorista sorbillans*）、カイコノシラミダニ（*Pediculoides ventricosus*）がある（日本蚕糸学会、1992）。その他にも、ブランコヤドリバエ（*Exorista japonica*）による寄生や、ハサミムシ類、カマドウマ類、ウマオイ類、ハネカクシ類、ゴミムシ類、アシナガバチ類、アリ類による捕食も報告されている（横山、1929）。

２．　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

ここでは、本遺伝子組換えカイコの作出のために用いた供与核酸等について記載する。それに先立ち、構成要素等の機能等に関連して、遺伝子導入法の全体像について記載する。

本遺伝子組換えカイコの作出には、転移因子（トランスポゾン）の一つである *piggyBac* による遺伝子導入法を用いた。*piggyBac* は、イラクサギンウワバ（*Trichoplusia ni*、昆虫綱：チョウ目）の培養細胞 TN-368 に由来する転移因子であり、DNA 上で切り出されたり挿入されたりする性質を利用して、様々な昆虫種で遺伝子導入に用いられている（Cary *et al*., 1989; Handler, 2002）。*piggyBac* は、転移酵素遺伝子が 2 つの末端配列に挟まれた構造を持っている。*piggyBac* の転移酵素を発現させると、この転移酵素が末端配列に特異的に結合して切断し、切り出された *piggyBac* が宿主ゲノム中にランダムに挿入される（図 11）。ただし、このままでは *piggyBac* 自体から発現する転移酵素の働きによって、ゲノム中の他の場所に転移したり失われたりする可能性がある。そこで、*piggyBac* を改変した遺伝子導入系が必要となる。

カイコに安定的に遺伝子を導入するために、*piggyBac* を改変した 2 種類のプラスミドを組み合わせて用いる（図 12）。一つは、転移酵素遺伝子の代わりに、導入したい目的遺伝子を挿入した

ドナープラスミドで、もう一つは、*piggyBac* の末端配列のうちの１つを欠損させたヘルパープラスミドである。転移酵素を供給するヘルパープラスミドは、片方の末端配列が欠損しているため、それ自体はカイコゲノム中に挿入されず、同時に導入したドナープラスミド中の末端配列に挟まれた領域を切り出してカイコゲノム中に挿入させることができる。

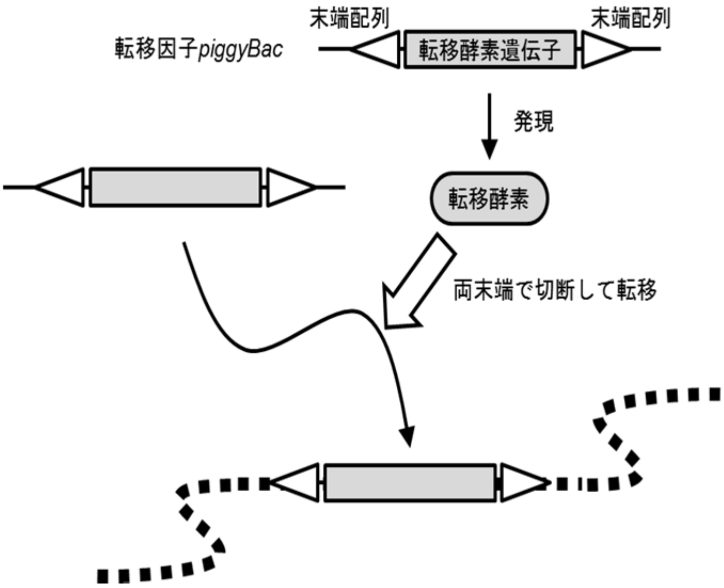


図 11. 転移因子 *piggyBac* の働き

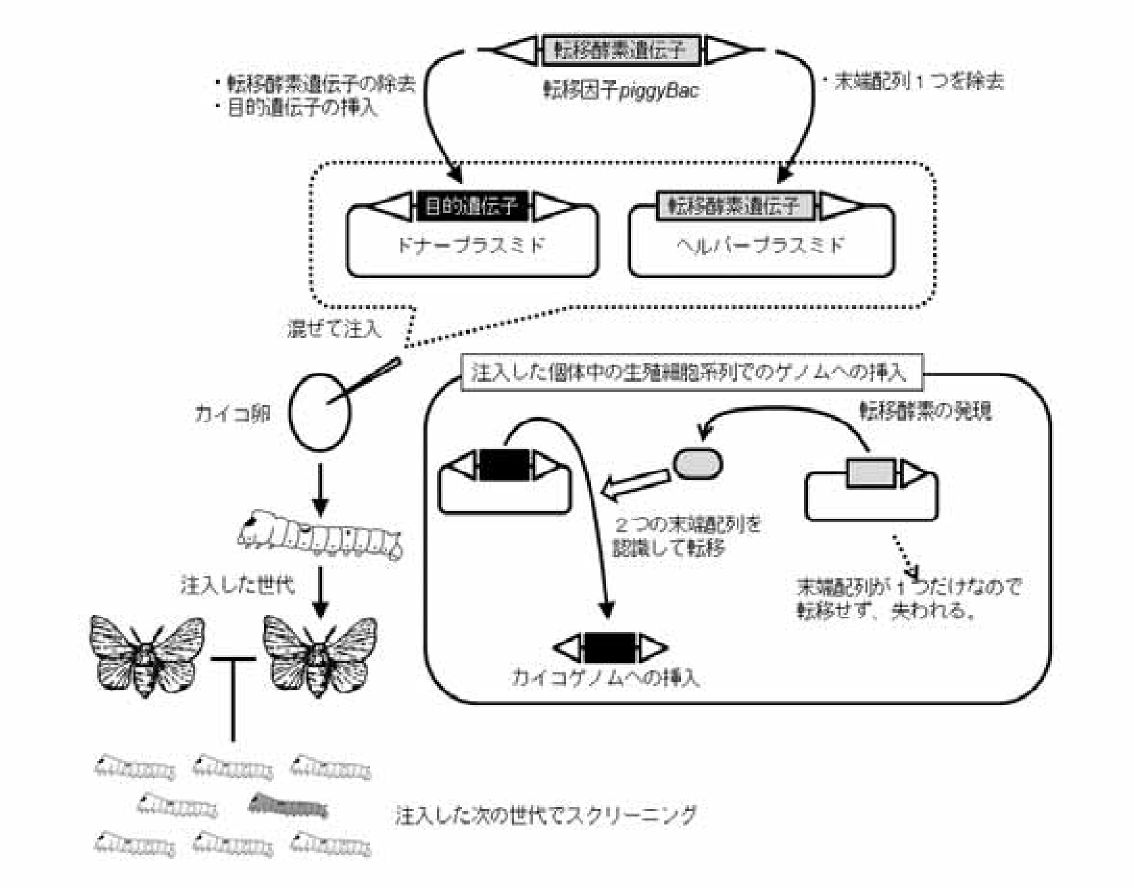


図 12. 遺伝子組換えカイコの作出法

ドナープラスミドとヘルパープラスミドをカイコに導入するには、2 つのプラスミドを混ぜてカイコ受精卵に顕微注入する方法を執る。これにより、ヘルパープラスミドから供給された転移酵素の働きで、目的遺伝子がカイコゲノム中に挿入される。顕微注入した個体の中では一部の細胞だけがこの目的遺伝子を持つこととなり、もし、卵や精子になる生殖細胞系列でこの挿入が起きると、注入した次の世代の中に、遺伝子組換え個体が生じる。一方、ヘルパープラスミド自体はカイコ細胞中では増幅しないので、発生が進んで細胞数が増えるにしたがって、細胞 1 つあたりに含まれる分子の数が減少したり分解されたりして、最終的には失われる。その結果、安定的に目的遺伝子を持つ遺伝子組換えカイコを作出することができる。

（1）供与核酸に関する情報

イ　構成及び構成要素の由来

ドナープラスミド

本遺伝子組換えカイコ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を表 1 に示す。また、構成の模式図を図 13 に、目的遺伝子の塩基配列を別添 7 に示す。

資料5．審査データの概要

表１　供与核酸のサイズと、由来、機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
フィブロイン H 鎖及び改変型緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質遺伝子発現カセット（*HC-EGFP* 遺伝子発現カセット）		
Fibroin H promoter（フィブロイン H 鎖遺伝子プロモーター）	1.1 kb	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のプロモーター。フィブロイン H 鎖遺伝子が発現する後部絹糸腺での *HC-EGFP* 遺伝子の転写を規定する（Kojima *et al.*, 2007）。
HC-EGFP（目的遺伝子である改変型緑色蛍光タンパク質－フィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子）	2.3 kb	カイコ由来フィブロイン H 鎖タンパク質の中央部を、オワンクラゲ（*Aequorea victoria*）由来緑色蛍光タンパク質に置換した融合タンパク質をコードする遺伝子。緑色蛍光を持つフィブロイン（絹繊維タンパク質）を作らせる。挿入した緑色蛍光タンパク質遺伝子は、クロンテック社製のプラスミド pEGFP の中にある改変型緑色蛍光タンパク質 EGFP の遺伝子である（Kojima *et al.*, 2007）。
Fibroin H polyA（フィブロイン H 鎖遺伝子ターミネーター）	0.3 kb	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のターミネーター。転写終結を規定する（Kojima *et al.*, 2007）。
改変型赤色蛍光タンパク質遺伝子（マーカー遺伝子）発現カセット（アクセッション番号 AB713995 の一部）		
3xP3 promoter	0.2 kb	眼での遺伝子発現のために人工的に合成された塩基配列である 3xP3 を、キイロショウジョウバエ由来熱ショック蛋白質 *hsp70* 遺伝子のプロモーターに結合させたプロモーター。改変型赤色蛍光タンパク質遺伝子 *DsRed2* 遺伝子の眼での転写を規定する（Berghammer *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2002）。
DsRed2（改変型赤色蛍光タンパク質遺伝子）	0.7 kb	イソギンチャクモドキ類（*Discosoma* sp.）由来の改変型赤色蛍光タンパク質遺伝子（クロンテック社製; Matz *et al.*, 1999）。遺伝子組換えカイコを選抜するマーカー遺伝子として用いる。上流に接続した 3xP3 promoter の働きと合わせて、

		遺伝子組換えカイコの眼で改変型赤色蛍光タンパク質（DsRed2）を作らせる。
SV40 polyA（SV40 ターミネーター）	0.3 kb	シミアンウイルス 40（Simian virus 40）ゲノム由来のターミネーター。転写終結を規定する。
その他（アクセッション番号 **AB713995** の一部）		
piggyBac R	1.1 kb	イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* 由来の転移因子 *piggyBac* の末端配列（Cary *et al.*, 1989）。カイコゲノムへの挿入に際して、*piggyBac* 転移酵素の認識配列として働く。
piggyBac L	0.7 kb	イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* 由来の転移因子 *piggyBac* の末端配列（Cary *et al.*, 1989）。カイコゲノムへの挿入に際して、*piggyBac* 転移酵素の認識配列として働く。
外骨格領域（本遺伝子組換えカイコゲノム中には存在しない）		
pUC ori	0.7 kb	大腸菌由来のプラスミド ColE1 の複製開始点。本プラスミドを大腸菌中で増幅するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。
AmpR	0.9 kb	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。

資料5．審査データの概要

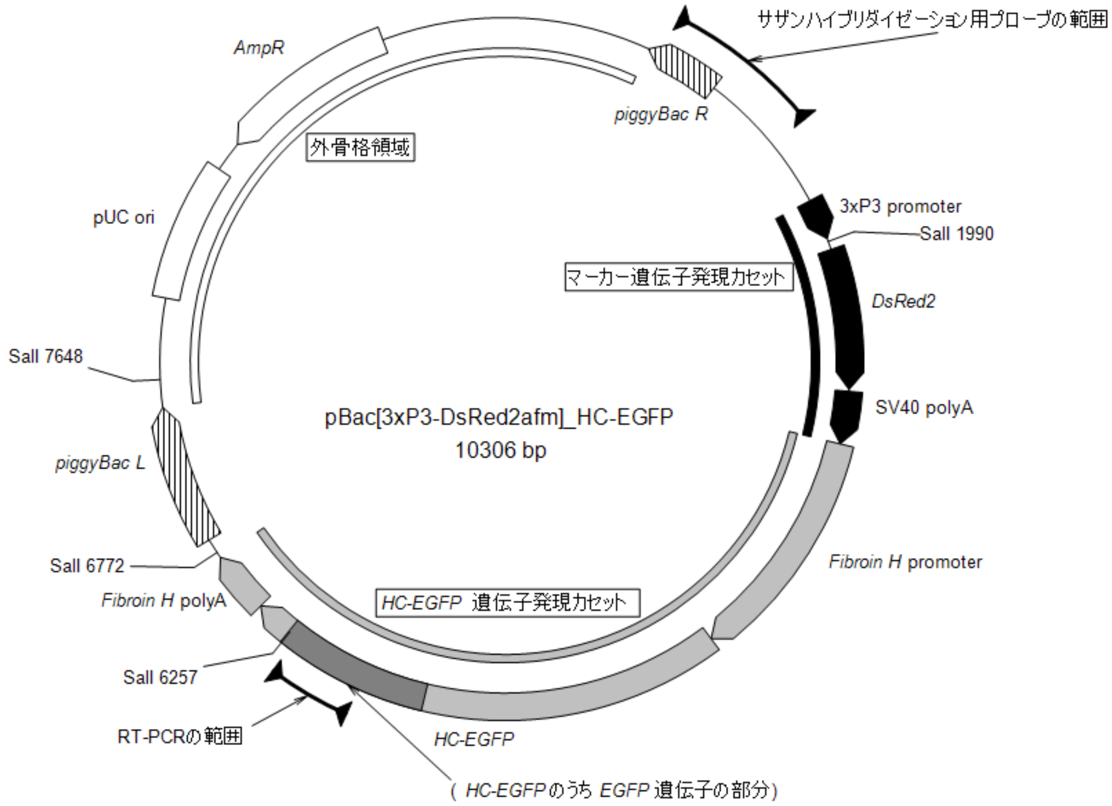


図 13. *HC-EGFP* 遺伝子導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP の構造
構成要素の由来及び機能については表 1 を参照。サザンハイブリダイゼーション用プローブの範囲及び遺伝子発現の安定性を確認するための RT-PCR の範囲を示す。

当該構成を得るまでにとられた過程を図 14 に示す。まず、転移因子 *piggyBac* を pUC18 に挿入して得られた p3E1.2（Cary *et al*, 1989）に、改変型赤色蛍光タンパク質発現カセット（3xP3-*DsRed2*）を挿入するとともに、*piggyBac* 転移酵素遺伝子の一部を除去して pBac[3xP3-DsRed2afm]を作製した（Inoue *et al*, 2005）。これに、フィブロイン H 鎖及び改変型緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質遺伝子発現カセット（*HC-EGFP* 遺伝子発現カセット）を挿入して pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP を作製した（Kojima *et al*, 2007）。

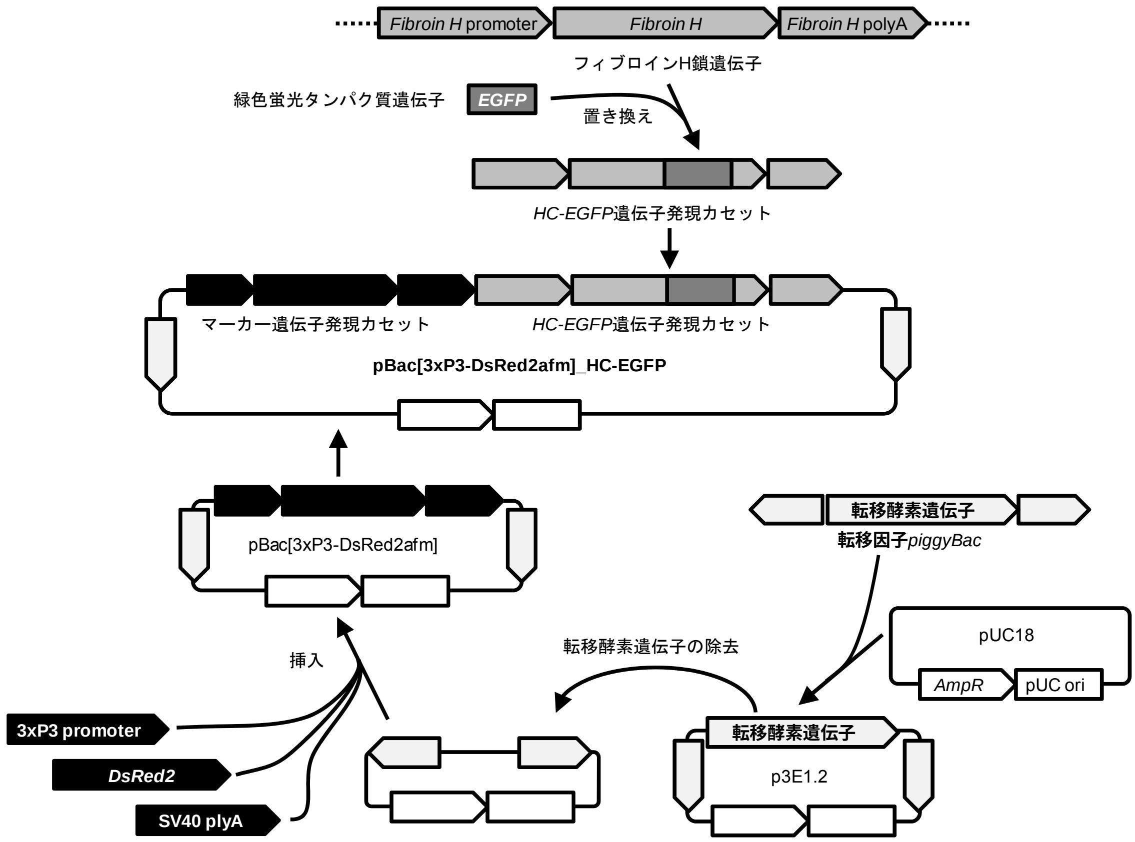


図 14. *HC-EGFP* 遺伝子導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP の作製方法

ヘルパープラスミド

ドナープラスミドの piggyBacR と piggyBacL にはさまれた目的領域をカイコゲノム中に挿入するためには、転移酵素の働きが必要となる（図 12）。この転移酵素を供給するために、ヘルパープラスミド pHA3PIG を作製して、ドナープラスミドと混ぜてカイコ卵に注入した。このヘルパープラスミド pHA3PIG の構成及び構成要素の由来を表 2 に示す。また、構成の模式図を図 15 に示す（Tamura *et al.*, 2000）。

表 2　ヘルパープラスミド pHA3PIG の構成要素と、由来、機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
A3 promoter（細胞質アクチン遺伝子プロモーター）	0.7 kb	カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーター。様々な組織で遺伝子を発現させることができる（Mounier and Prudhomme, 1991）。
piggyBac *transposase*（*piggyBac* 転移酵素遺伝子）	1.8 kb	イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* 由来の転移因子 *piggyBac* の転移酵素（Cary *et al.*, 1989）。*piggyBac* の 2 つの末端配列の間に挟まれた領域を切り出して、他の DNA 中に挿入する機能を持つ。
piggyBac R	1.1 kb	イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* 由来の転移因子 *piggyBac* の末端配列（Cary *et al.*, 1989）。カイコゲノムへの挿入に際して、*piggyBac* 転移酵素の認識配列として働く。
AmpR	0.9 kb	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。
pUC ori	0.7 kb	大腸菌由来のプラスミド ColE1 の複製開始点。本プラスミドを大腸菌中で増幅するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。

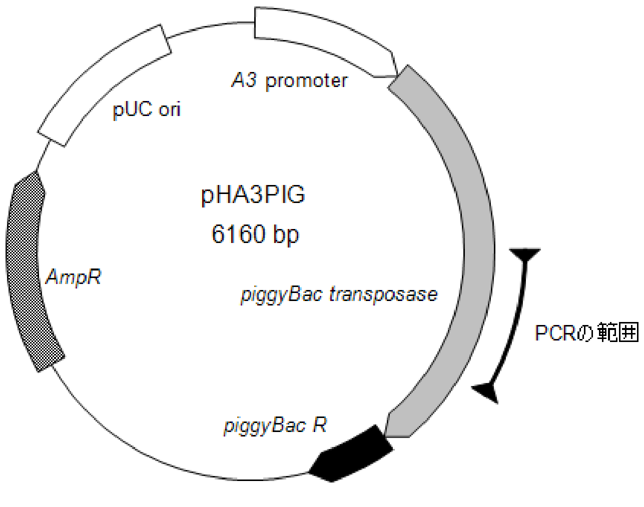


図 15.　ヘルパープラスミド pHA3PIG の構造

構成要素の由来及び機能については表 2 を参照。ヘルパープラスミドの残存性を確認するための PCR の範囲を示す。

ロ　構成要素の機能

①　供与核酸の構成要素の機能

【*HC-EGFP* 遺伝子】

目的遺伝子である *HC-EGFP* 遺伝子は、カイコ由来フィブロイン H 鎖タンパク質と、オワンクラゲ（*Aequorea victoria*、刺胞動物門・ヒドロ虫綱）由来改変型緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質をコードしている。

フィブロイン H 鎖は、絹糸を構成する主要な繊維タンパク質である。今回移入する遺伝子には、フィブロイン H 鎖遺伝子の発現を調節する上流領域から、mRNA への転写を停止させるターミネーターを含む下流領域までの全体を用いている（Takiya *et al*., 1990; Kojima *et al*., 2007）。

緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein、GFP）は青色励起光を受けて緑色蛍光を発するタンパク質で、遺伝子発現マーカー等として幅広く用いられている。今回用いたのは、蛍光強度を高めるように一部のアミノ酸を置換した改変型緑色蛍光タンパク質（EGFP、Enhanced GFP、クロンテック社）の遺伝子である。

目的遺伝子とした *HC-EGFP* 遺伝子は、フィブロイン H 鎖遺伝子の中央部を除去し、代わりに改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子を挿入して作製した（Kojima *et al*., 2007）。

改変型緑色蛍光タンパク質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうか、アレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database（FARRP）、ver. 13、http://www.allergenonline.org/）に対して E 値の閾値を 0.1 として FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと類似の配列は認められなかった。

この発現カセットは、宿主の持つ代謝系を変化させる機能は有していない。

【改変型蛍光タンパク質遺伝子】

本遺伝子組換えカイコの選抜には、改変型蛍光タンパク質（DsRed2、クロンテック社）の眼での発現を利用した。

マーカー遺伝子である改変型赤色蛍光タンパク質は、イソギンチャクモドキ類（*Discosoma* sp.、刺胞動物門・花虫綱）由来の改変型赤色蛍光タンパク質であり、遺伝子発現マーカーとして幅広く用いられている。

3xP3 プロモーターは、眼での遺伝子発現のために人工的に合成された塩基配列である 3xP3 に、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 由来の熱ショックタンパク質 *hsp70* 遺伝子のプロモーターを結合して作られた。この 3xP3 プロモーターは様々な昆虫の単眼や複眼において遺伝子を発現させる（Sheng *et al*., 1997; Thomas *et al*., 2002）。なお、3xP3 プロモーターの活性には熱ショックによる誘導は不要である。

SV40 ターミネーターは、シミアンウイルス 40 ゲノム由来のターミネーターで、mRNA への転

写を停止させる。

改変型赤色蛍光タンパク質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうか、アレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database（FARRP）、ver. 13、http://www.allergenonline.org/）に対して E 値の閾値を 0.1 として FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと類似の配列は認められなかった。

この発現カセットは、宿主の持つ代謝系を変化させる機能は有していない。

【ヘルパープラスミド】

ヘルパープラスミドの作製にあたっては、2 つの末端配列のうちの 1 つを削除して、カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーターを挿入した。これにより、カイコの細胞中で *piggyBac* 転移酵素が発現し、同時に注入したドナープラスミドの *piggyBac* 末端配列の間にある目的遺伝子がカイコのゲノム中に挿入される。一方、ヘルパープラスミド自体は末端配列を 1 つ欠損しているため、カイコのゲノム中に挿入されることがない（図 12）。

（２）ベクターに関する情報

イ　名称及び由来

本遺伝子組換えカイコの作出に用いたベクターは大腸菌 *Escherichia coli* 由来の pUC18 である。

転移因子 *piggyBac* を pUC18 に挿入して p3E1.2 が得られる（Cary *et al*, 1989; 図 14）。ドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP は、p3E1.2 に改変型赤色蛍光タンパク質発現カセットと *HC-EGFP* 遺伝子発現カセットを挿入して得られた（図 14）。

ドナープラスミドの 2 つの末端配列及びその内側を含む領域をカイコゲノムに挿入するため、この末端配列を認識してカイコゲノム中に挿入する *piggyBac* 転移酵素を供給するヘルパープラスミド pHA3PIG を用いている（Tamura *et al.*, 2000; 図 15）。pHA3PIG は細胞質アクチン A3 遺伝子プロモーターの働きで *piggyBac* 転移酵素を発現させるが、末端配列の一つを欠損させているため、それ自体はカイコゲノム中には挿入されない。

ロ　特性

①　ベクターの塩基数及び塩基配列

pUC18 の塩基数は 2,686 bp。塩基配列はアクセッション番号 L08752 を参照。

pUC18 に転移因子 *piggyBac* を挿入した p3E1.2 の塩基数は 5,958 bp。塩基配列は piggyBac Website（http://piggybac.bio.nd.edu/）を参照。

ドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP の塩基数は 10,306 bp。目的遺伝子の塩基配列は別添 10 を参照。

ヘルパープラスミド pHA3PIG の塩基数は 6,160 bp。塩基配列は別添 11 を参照。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pUC18 には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、アンピシリン耐性を発現する遺伝子が含まれるものの、本遺伝子組換えカイコのゲノム中にこの遺伝子は導入されていない。

p3E1.2 には、*piggyBac* 転移酵素遺伝子及びその両側の末端配列からなる転移因子 *piggyBac* の全体が含まれる。

ドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP においては、p3E1.2 から *piggyBac* 転移酵素遺伝子が除去されている。

ヘルパープラスミド pHA3PIG には、カイコの細胞での遺伝子発現を規定する細胞質アクチン A3 遺伝子プロモーターと、その下流に接続された *piggyBac* 転移酵素遺伝子が含まれる（図 15）。作製にあたっては、2 つの末端配列のうちの 1 つを削除して、カイコ由来の細胞質アクチン A3 遺伝子のプロモーターを挿入した。これにより、カイコの細胞中で *piggyBac* 転移酵素が発現し、同時に注入したドナープラスミドの *piggyBac* 末端配列の間にある目的遺伝子がカイコのゲノム中に挿入される。一方、ヘルパープラスミド自体は末端配列を 1 つ欠損しているため、カイコのゲノム中に挿入されることがない（図 16）。

③ ベクターの伝染性・病原性の有無及び伝染性・病原性を有する場合はその宿主域に関する情報

ベクターの伝染性・病原性はない。

（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

ドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP 内での供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位を図 13 に示す。2 つの *piggyBac* 末端配列の間に、選抜マーカーである改変型赤色蛍光遺伝子の発現カセットと、蛍光絹糸の生産を目的とした *HC-EGFP* 遺伝子の発現カセットが挿入されている。

ベクターへの供与核酸の挿入方法の要点を図 14 に示す。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

ドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP（図 13）をヘルパープラスミド pHA3PIG（図 15）とともに受精卵（胚）へ顕微注入することで移入した（図 16）。ヘルパープラスミドは *piggyBac* の 2 つの末端配列のうち 1 つを欠損しているために、それ自体がカイコゲノム中に転移することはない。プラスミドを注入された胚の中の生殖細胞系列で *piggyBac* 転移酵素が働いて供与核酸がカイコゲノム中に挿入されると、その次の世代で遺伝子組換えカイコを選抜することができる（図 16）。

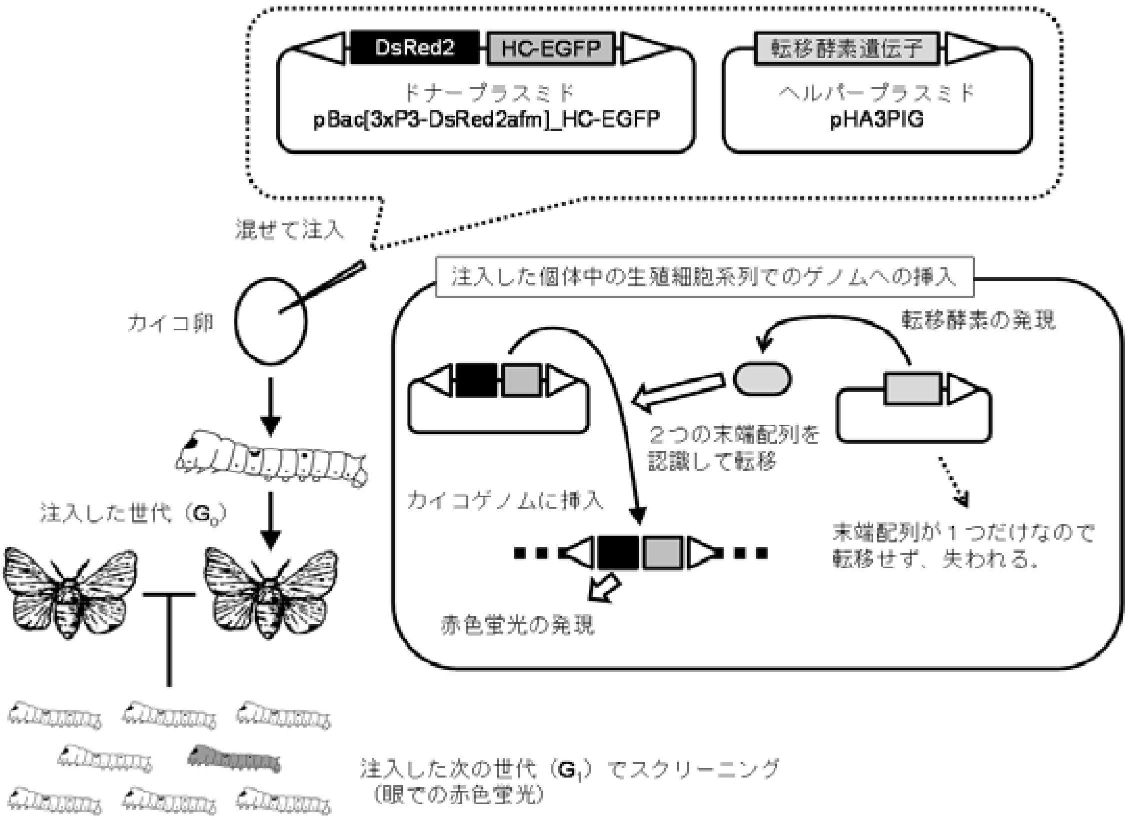


図 16.　本遺伝子組換えカイコの作製方法

ハ　遺伝子組換え生物等の育成の経過

①　核酸が移入された個体の選抜の方法

ドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP とヘルパープラスミド pHA3PIG を顕微注入された受精卵から孵化した幼虫（G_0、図 16 及び 17）を成虫まで飼育した。このままでは非休眠系統となって系統維持の負担が大きいため、この G_0 個体を白/C 系統と交配することによって休眠性の受精卵を得た（G_1、図 17）。遺伝子組換え個体は眼で赤色蛍光タンパク質を発現することから、発生を進行させた胚を蛍光顕微鏡で観察し、眼で赤色蛍光タンパク質を発現している個体を選抜した。

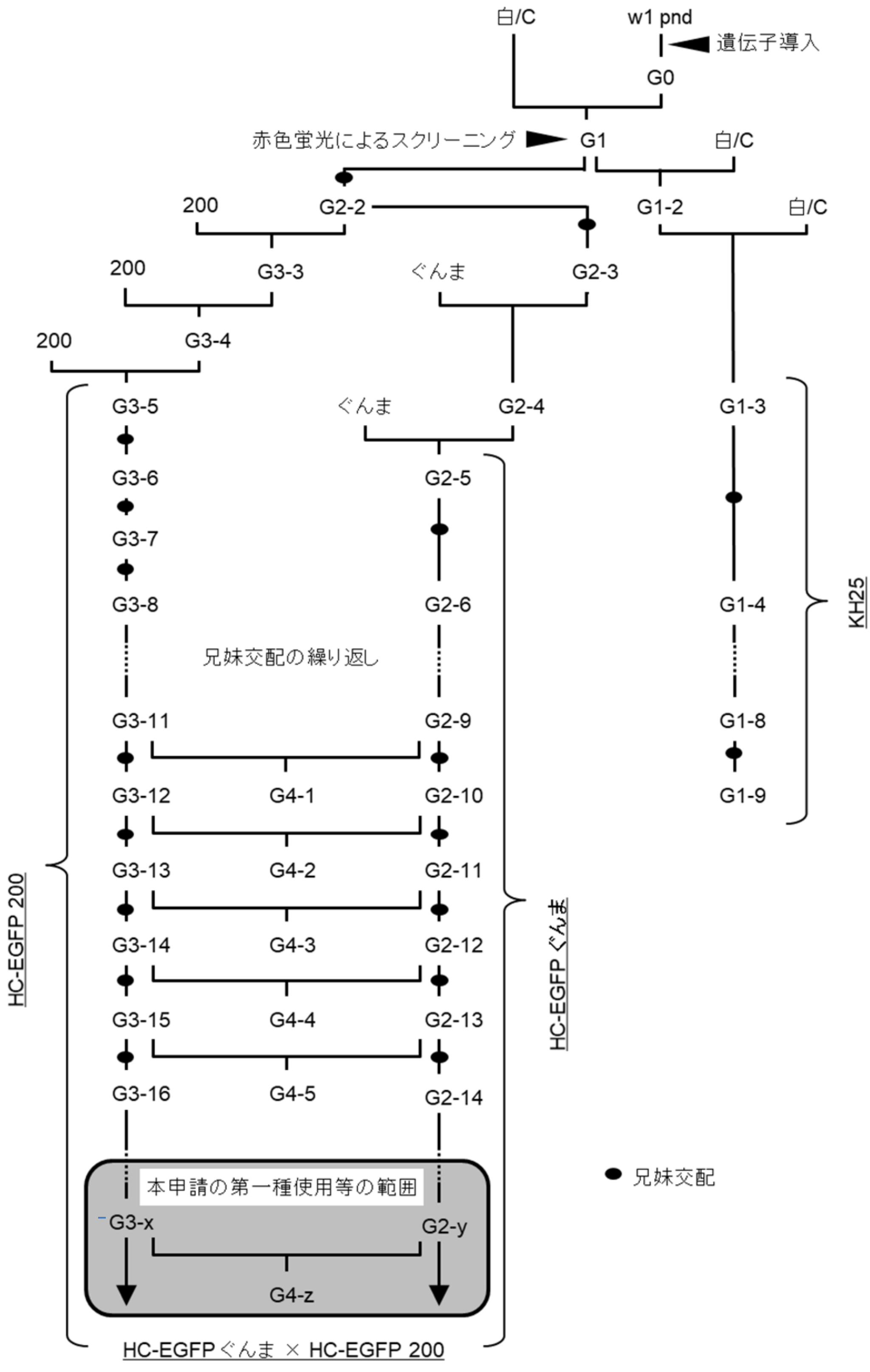


図 17. 本遺伝子組換えカイコの育成経過と世代番号

表 3　生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために行った試験
（世代番号は図 17 を参照）

試験項目	飼育世代と飼育年次							
	$G_{1\text{-}6}$ 2010	$G_{1\text{-}8}$ 2010	$G_{2\text{-}10}$ 2011	$G_{3\text{-}12}$ 2011	$G_{4\text{-}1}$ 2011	$G_{4\text{-}2}$ 2012	$G_{4\text{-}3}$ 2013	$G_{4\text{-}5}$ 2015
導入した遺伝子の安定性（サザン解析）		○	○	○	○			
ヘルパーの残存（PCR）	○							
遺伝子の発現状態（RT-PCR）			○	○	○			
生理学的特性								
（幼虫の体重）							○	
（産卵数）					○			
（孵化率）					○			
（幼虫期間）								○
（営繭率）					○			
（繭重）								○
（繭層重）								○
（幼虫の行動）						○		
（産卵行動）						○		
有害物質の産生性			○	○	○			

②ドナープラスミドにおいて ***piggyBac*** 転移酵素遺伝子が欠落していることの確認

作製したドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP において *piggyBac* 転移酵素遺伝子が存在していないことを、当該プラスミドの塩基配列解読により確認した。

③ドナープラスミドにおける核多角体病ウイルスゲノムの断片の有無

作製したドナープラスミド pBac[3xP3-DsRed2afm]_HC-EGFP において、転移因子 *piggyBac* のクローニングの過程で、AcNPV（*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus）のゲノムに由来する

FP 遺伝子（全長 642 bp）の 5' 側断片（340 bp）と *lef9* 遺伝子（全長 1,548 bp）の 5' 側断片（469 bp）が残っている。いずれの断片も、*piggyBac* 末端配列の外側にあり、カイコゲノム中には挿入されない。

④ヘルパープラスミドの残存性

$G_{1\text{-}6}$ 世代の遺伝子組換えカイコ（図 17、表 3）の 5 齢幼虫の後部絹糸腺から抽出したゲノム DNA を鋳型として、転移酵素遺伝子の一部を PCR により増幅した。PCR に用いたプライマーと増幅する断片の位置を図 15 に示す。試験の結果、$G_{1\text{-}6}$ 世代の遺伝子組換えカイコのゲノム DNA から *piggyBac* 転移酵素遺伝子の増幅は認められなかった（別添 12）。このことから、本遺伝子組換えカイコにはヘルパープラスミドの配列が残存していないことが確認できた。

⑤　生物多様性影響評価に必要な情報を収集するまでに用いられた系統の育成の経過

閉鎖系の飼育室（P1A）で G_1 世代の遺伝子組換えカイコを育成し、眼での改変型赤色蛍光タンパク質の発現及び繭糸での改変型緑色蛍光タンパク質の発現が認められる系統を選抜した。その後、実用系統である「200」又は「ぐんま」との戻し交配を行い、目的遺伝子を持つ実用系統「HC-EGFP 200」及び「HC-EGFP ぐんま」を作出し、現在まで P1A での飼育・交配により系統を維持している。また、「白/C」系統との戻し交配で「KH25」系統を作出し、同様に飼育・系統維持を続けている。育成経過を図 17 に、試験を実施した世代を表 3 に示す。なお、本申請において使用する世代は、「HC-EGF ぐんま」の $G_{2\text{-}15}$ 世代以降、「HC-EGFP 200」の $G_{3\text{-}17}$ 世代以降及び「HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200」の $G_{4\text{-}6}$ 世代以降である（図 17）。

（4）細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ　移入された核酸の複製物が存在する場所及びコピー数

遺伝子組換えカイコ（KH25）と非遺伝子組換えカイコ（白/C）との F_1 に、非遺伝子組換えカイコ（白/C）を戻し交配して、次代での分離をサザンハイブリダイゼーションにより調査したところ、バンドが検出される個体と検出されない個体が 1:1 に分離したことから、移入された遺伝子は染色体上に 1 コピー挿入されていると判断した（別添 13）。なお、*piggyBac* を用いた遺伝子組換えカイコの作出において、ベクターの外骨格領域がカイコのゲノム中に挿入されたとの報告はない。

ロ　移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

移入された核酸の複製物が安定的に伝達されることを確認するため、同じ元系統（G_1 世代）に由来する異なる子孫系統（$G_{2\text{-}10}$ 世代、$G_{3\text{-}12}$ 世代及び $G_{4\text{-}1}$ 世代）の本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコについて、5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、本遺伝子組換えカイコからはすべて同じサイズのバンドが 1 本だけ検出されたことから、導入した遺伝子はカイコゲノムに安定的に維持されていると判断した（別添 14）。

なお、カイコゲノム中に、*piggyBac* を転移させる活性を持つ転移酵素をコードする遺伝子の存在は報告されていない。

ハ　移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での形質発現の安定性

移入された核酸の複製物から目的遺伝子が安定的に発現されることを確認するため、同じ元系統（G_1 世代）に由来する異なる子孫系統の本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコについて、5 齢幼虫の絹糸腺から全 RNA を抽出して、改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子を検出する RT-PCR を行ったところ、複数の遺伝子組換え個体で同程度に転写産物が検出され、一方、非遺伝子組換え個体では検出されなかったことから、本遺伝子組換えカイコにおいて目的遺伝子が安定的に発現していることが確認できた（別添 15）。また、改変型緑色蛍光タンパク質による繭の緑色蛍光がいずれの子孫系統でも安定して発現していることを確認している。

（５）遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

別添 13 及び 14 に示したサザンハイブリダイゼーションにより、本遺伝子組換えカイコの複数の世代や個体で同等のシグナルを得ることができる。非遺伝子組換えカイコでは常にシグナルが得られなかったことから、2 μg のゲノム DNA を用いることにより、感度良く、かつ、科学的に信頼性の高い本ゲノムサザンハイブリダイゼーション法により、非遺伝子組換え個体と区別して、本遺伝子組換えカイコを検出することが可能である。

（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

本遺伝子組換えカイコでは、導入された *HC-EGFP* 遺伝子を、フィブロイン H 鎖遺伝子プロモーターの制御下で幼虫の後部絹糸腺で発現させる。産生された HC-EGFP タンパク質は内在性のフィブロイン H 鎖と会合することから、この導入遺伝子を持つ本遺伝子組換えカイコは緑色蛍光を発するタンパク質を含む絹糸を産生する。

また、選抜マーカーとして、3xP3 プロモーターの制御下で改変型赤色蛍光タンパク質の遺伝子を発現させることにより、胚や幼虫、蛹、成虫の眼で赤色蛍光を生じさせる。

HC-EGFP タンパク質は、繊維タンパク質であるフィブロイン H 鎖と蛍光タンパク質である改変型緑色蛍光タンパク質の融合タンパク質であり、いずれのタンパク質も他の物質を変化させるような酵素活性を有していないことから、宿主の持つ代謝系を変化させる機能を有していないと考えられる。また、改変型赤色蛍光タンパク質も蛍光タンパク質であり、他の物質を変化させるような酵素活性を有していないことから、宿主の持つ代謝系を変化させる機能を有していないと考えられる。

ロ　生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との間の相違

生理学的及び生態学的特性を調査するために、遺伝子組換えカイコ系統「HC-EGFP ぐんま」と「HC-EGFP 200」との交雑種である「HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200」と、非遺伝子組換えカイコ「ぐんま」と「200」との交雑種である非遺伝子組換えカイコ「ぐんま×200」について、稚蚕期（1齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育して、形質を調査・比較した（図 18)。調査は、拡散防止措置を執った第二種使用等として、制御された条件で飼育して生育日数や体重、行動範囲等を詳細に実施したほか、隔離飼育区画での第一種使用等として、農研機構で 3 年（計 8 回)、群馬県蚕糸技術センターで 2 年（計 5 回)、養蚕農家の蚕室と同様に外気温等の影響を受ける施設で養蚕農家と同様の手順で飼育して、幼虫の生育や行動、繭を形成する割合などを調査した（別添 26)。

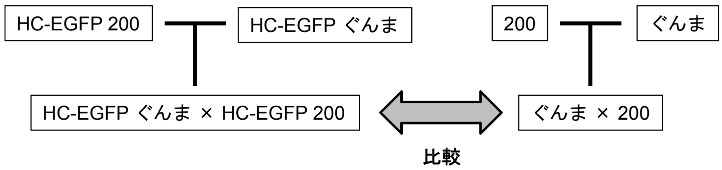


図 18.　生理学的・生態学的特性を比較する対象

①　形態の特性

幼虫の各齢期の初めの給桑前に体重を調査したところ、いずれの齢期においても、本遺伝子組換えカイコ（孵化直後 0.355 mg（平均値、以下同じ。)、2 齢起蚕 4.52 mg、3 齢起蚕 30.8 mg、4 齢起蚕 171 mg、5 齢起蚕 774 mg）は非遺伝子組換えカイコ（孵化直後 0.404 mg、2 齢起蚕 6.29 mg、3 齢起蚕 40.3 mg、4 齢起蚕 190 mg、5 齢起蚕 1,003 mg）より体重が軽く、統計学的な有意差が認められた（別添 16、P＜0.05)。

蛹を含む繭の重さ（繭重）及び蛹と脱皮殻を除いた繭だけの重さ（繭層重）を比較したところ、P1A で飼育した場合、繭重については、本遺伝子組換えカイコ（オス 1.66 g、メス 2.13 g）の方が雌雄ともに非遺伝子組換えカイコ（オス 1.83 g、メス 2.28 g）より小さく、繭層重についても、遺伝子組換えカイコ（オス 0.294 g、メス 0.301 g）の方が雌雄ともに非遺伝子組換えカイコ（オス 0.436 g、メス 0.459 g）より小さかった（別添 17、P＜0.001)。また、農研機構及び群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画における第一種使用による飼育試験（以下「隔離飼育試験」という。）でも、同じように繭重については、本遺伝子組換えカイコ（オス 1.08～1.54 g（飼育時期ごとの平均値の最小値と最大値、以下同じ。)、メス 1.38～1.99 g）の方が雌雄ともに非遺伝子組換えカイコ（オス 1.29～1.67 g、メス 1.57～2.14 g）より小さく、繭層重についても本遺伝子組換えカイコ（オス 0.170～0.273 g、メス 0.191～0.314 g）の方が雌雄ともに非遺伝子組換えカイコ（オス 0.308～0.423 g、メス 0.337～0.458 g）より小さいという結果が得られた（別添 26（表 5 及び表 9))。

繭色は、本遺伝子組換えカイコが淡緑色、対照となる非遺伝子組換えカイコが白色である。繭形はどちらも浅縊俵又は楕円である。

② 生育の特性

受精卵のうち幼虫が孵化する割合である孵化歩合を調査したところ、本遺伝子組換えカイコは 97.6%、非遺伝子組換えカイコは 98.1%となり、統計学的な有意差は認められなかった（別添 18、P = 0.90）。

幼虫期間として、孵化幼虫に最初の給餌を行ってから、繭形成開始に伴って給餌を停止するまでの期間を調査したところ、本遺伝子組換えカイコ（オス 24.0 日（平均値、以下同じ。）、メス 24.1 日）は雌雄ともに非遺伝子組換えカイコ（オス 25.1 日、メス 25.2 日）より短かった（別添 19、P＜0.001）。隔離飼育試験では、本遺伝子組換えカイコが繭形成を開始する日は非遺伝子組換えカイコと同じ場合と 1～3 日早い場合とがあったが、本遺伝子組換えカイコの方が遅いことはなかった（別添 26（表 1 及び表 2））。

なお、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコはいずれも完全変態を行い、卵・幼虫・蛹・成虫の各段階を経る。

隔離飼育試験では、本遺伝子組換えカイコでは三眠蚕（通常より 1 回少ない 3 回の幼虫脱皮の後に蛹になるカイコ）は認められず、非遺伝子組換えカイコでは 0.0001%以下であった（別添 26（表 3 及び表 7））。この三眠蚕を目視で確認して捕殺したところ、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコいずれも三眠蚕の成虫が発生することはなかった（別添 26）。

本遺伝子組換えカイコは、対照となる非遺伝子組換えカイコと同様、桑葉又は桑葉を含む人工飼料を幼虫期に摂食して成長する。4 齢幼虫からは、繭質や収繭量の向上及び飼料のコスト低減のために桑葉を摂食させることが有効であり、特に、枝に付いたままの桑葉を与える条桑育により労力も低減できる。なお、成虫は摂食も飲水も行わない。

③ 生存能力

4 齢幼虫の最初から繭を作るまでに至った個体数の割合である営繭率を見ると、本遺伝子組換えカイコが 99.0%、非遺伝子組換えカイコが 98.8%であり、いずれにおいても途中で死亡する個体はわずかであり、2 試料間で統計学的な有意差は認められなかった（別添 20、P = 0.97）。一方、隔離飼育試験では、本遺伝子組換えカイコの方が営繭率が低くなる場合が多かった（別添 26（表 4 及び表 8））。

④ 運動能力

幼虫が移動する範囲を比較するため、20 cm ずつ離して 5 齢幼虫を置き、16 時間後に元の位置からの距離を計測した。本遺伝子組換えカイコの平均は 9.4 cm（標準偏差 5.4 cm）、非遺伝子組換えカイコの平均は 9.6 cm（同 5.0 cm）となって、統計学的な有意差は認められなかった

（別添 21、P = 0.87）。

隔離飼育試験において、摂食期の幼虫が飼育容器の外に出ることがあったが、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で大きな違いは認められなかった（別添 26）ことから、運動能力に違いはないと考えられた。

⑤　繁殖様式

カイコは有性生殖により繁殖する。

メス成虫 1 頭当たりの産卵数を比較するため、半径 19 cm の円形の枠の中心に、交尾後のメス成虫を 1 頭ずつ 24 時間置いて産卵数を調査した。本遺伝子組換えカイコの平均は 516.4 個（標準偏差 102.7 個）、非遺伝子組換えカイコの平均は 645.6 個（標準偏差 109.2 個）となって、本遺伝子組換えカイコの方が少なく、統計学的な有意差が認められた（別添 22、P < 0.001）。

メス成虫が産卵する範囲を比較するため、産み付けられた卵 1 個ずつの中心からの距離を計測した。半径 19 cm の枠まで到達した場合があったため、距離の平均値を出すことはできなかったが、距離の分布を比較したところ、本遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコよりも狭い範囲に産卵していて、統計学的な有意差が認められた（別添 23、P < 0.001）。

⑥　脱皮・変態・休眠等

本遺伝子組換えカイコも非遺伝子組換えカイコも幼虫脱皮の回数は 4 回であった。また、本遺伝子組換えカイコ同士、非遺伝子組換えカイコ同士を交配すると休眠卵を産む。以上のことから、内分泌系ホルモンの制御機能に違いはないものと考えられる。

⑦　クワコとの交雑の可能性

一般的な養蚕農家の施設を模して農研機構及び群馬県蚕糸技術センターに設置した隔離飼育区画において、クワコ成虫の侵入を防ぐために飼育室の窓に網を設置するなど一定の交雑防止措置を講じつつ、本遺伝子組換えカイコの第一種使用等の内容に沿って 4 齢幼虫から繭の収穫までの各過程において、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの行動や生育等の特性を比較しながらカイコとクワコの交雑可能性を以下の通り調査した（別添 26）。

ａ）幼虫の飼育

養蚕農家の飼育段階において本遺伝子組換えカイコ及び対象の非遺伝子組換えカイコの行動等の特性を詳細に調査するため、2014 年 7 月から 2016 年 10 月にかけて農研機構（茨城県つくば市）の隔離飼育区画において 8 回（1 回あたり遺伝子組換えカイコ 4,887～15,000 頭、非遺伝子組換えカイコ 3,000～9,709 頭）、2015 年 7 月から 2016 年 10 月にかけて群馬県蚕糸技術センター（群馬県前橋市）において 5 回（1 回あたり飼育室 2 棟の合計で遺伝子組換えカイコ 59,764～113,963 頭、非遺伝子組換えカイコ 11,737～12,000 頭）の比較調査を実施した。

資料5. 審査データの概要

いずれの隔離飼育区画において、本遺伝子組換えカイコは対照の非遺伝子組換えカイコとの間で行動特性において特段の違いは見られず、農研機構の隔離飼育区画では、摂食期の幼虫が飼育容器外で見つかった個体数は、本遺伝子組換えカイコで1回あたり飼育数5,192〜9,619頭のうち0〜3頭（0〜0.04%）、非遺伝子組換えカイコで飼育数5,148〜9,709頭のうち0〜4頭（0〜0.04%）であった。また、摂食を停止して繭を形成する前（熟蚕期）の幼虫が飼育容器外で見つかった個体数は、本遺伝子組換えカイコで0〜4頭（0〜0.05%）、非遺伝子組換えカイコで0〜1頭（0〜0.01%）であった。

同様に、群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画では、幼虫が飼育容器外で見つかった個体数は､摂食期には､1回･1室あたり本遺伝子組換えカイコの比較用試験区で飼育数5,871〜6,000頭のうち0頭（0%）、本遺伝子組換えカイコの繭生産用試験区で飼育数36,000〜49,000頭のうち0〜6頭（0〜0.01%）、非遺伝子組換えカイコで5,833〜6,000頭のうち0〜1頭（0〜0.02%）であった。また、熟蚕期には、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコどちらも0頭であった。

いずれの場合も、飼育容器外で見つかった幼虫はきわめて少数であり、それも、桑葉を与えるなどの作業中に落ちたことが主な原因だと考えられた。なお、すべての試験において、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコが飼育室の外に這い出るような現象はまったくなかった。

また、カイコ幼虫が通常より1回少ない3回の脱皮の後に蛹になる、いわゆる三眠蚕が生じる程度を調査したところ、農研機構の隔離飼育区画においては、本遺伝子組換えカイコで1回あたり飼育数5,192〜9,619頭のうち0頭、非遺伝子組換えカイコで飼育数5,148〜9,709頭のうち0〜1頭（0〜0.01%）であった。群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画においては本遺伝子組換えカイコでも非遺伝子組換えカイコでも0頭（0%）であり、幼虫の飼育中に早期に繭を形成する三眠蚕が生じる可能性は一般的なカイコ系統と同様に極めて低いという結果が得られた。

なお、上述の隔離飼育区画での飼育試験中に飼育室内にクワコ成虫が侵入する可能性についても、毎回の飼育作業時に飼育室内や飼育容器内を目視で確認して調査したが、農研機構の隔離飼育区画では飼育試験1回あたり、クワコの幼虫が0〜5頭、クワコの繭が0〜2個、いずれも餌の桑葉とともに持ち込まれているのが認められたが、クワコ成虫が侵入したことはなかった。また、群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画では、飼育試験1回・1室あたり、クワコの幼虫が0〜18頭、クワコの繭が0〜9個、いずれも餌の桑葉とともに持ち込まれているのが認められたほか、クワコの成虫が1〜3頭存在しているのが認められたが、毎回の作業の出入りの際にクワコの成虫が出入りしていないことは確認しており、桑葉とともに持ち込まれた繭から羽化したものであると考えられた。本隔離飼育試験においては、飼育室内で見つかったクワコの幼虫や繭、成虫はすべてその場で殺虫処理しているが、養蚕農家等の飼育室内で仮にクワコの成虫が羽化したとしても、餌を与えている時期の飼育室にはカイコの幼虫しかいないた

めカイコの成虫と交尾することは考えにくい。また、万一飼育室内でカイコのメス成虫とクワコのオス成虫の交尾したとしても、飼育室内で産卵するにすぎず、産下された卵から孵化した幼虫が飼育室外に出て生育することはおよそ考えられない。

ｂ）繭の形成

上述の隔離飼育区画で飼育されたカイコ幼虫については、幼虫期の最後に摂食を停止して繭を作る段階になったところで、同じ飼育室内において、繭を作らせるための容器である蔟（まぶし）に幼虫を移して天井から懸垂し、そのまま飼育室内で繭を作らせる上蔟を行った。

農研機構の隔離飼育区画では、繭を作らせるための容器である蔟の中で繭を形成したのは、本遺伝子組換えカイコで1回あたり飼育数4,922～9,619頭のうち3,004～7,958頭（61.0～82.7%）、非遺伝子組換えカイコで飼育数 4,883～9,709 頭のうち 3,612～8,521 頭（73.2～92.8%）であった。一方、蔟の下に幼虫が落ちて繭を作ったのは、本遺伝子組換えカイコで 116～1,219 頭（2.4～14.4%）、非遺伝子組換えカイコで 155～760 頭（2.1～15.4%）、天井から蔟を懸垂している器具を伝って蔟の上に幼虫が登って繭を作ったのは、本遺伝子組換えカイコで 0～6 個（0～0.1%）、非遺伝子組換えカイコで 0～12 頭（0～0.2%）であった。

群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画では、蔟から落下した幼虫を毎日回収して健全な幼虫は蔟に戻し、生育不良の幼虫は廃棄するという方法で繭を作らせており、蔟の中に繭を形成したのは、1 回・1 室あたり本遺伝子組換えカイコで飼育数 5,871～6,000 頭のうち 4,919～5,502 頭（83.6～92.0%）、非遺伝子組換えカイコで 5,833～6,000 頭のうち 5,177～5,734 頭（88.8～96.1%）であった。蔟の上に繭を作ったのは、本遺伝子組換えカイコでも非遺伝子組換えカイコでも 0 頭（0%）であった。

また、これら上蔟の過程において、飼育室内で本遺伝子組換えカイコも非遺伝子組換えカイコも成虫が生じるようなことはなかった。

ｃ）飼育残渣

飼育後に残るクワの枝などの飼育残渣には、カイコの繭が残り、飼育残渣が野外に廃棄される際に当該繭が羽化して野外でカイコ成虫が生じる可能性があるため、カイコ成虫が生存可能な期間を考慮して少なくとも 30 日以上は 4 mm 目以下の網で覆うか、飼育後に飼育残渣を粉砕処理することによって、カイコの不活化を図ることとしている。このため、これら飼育残渣の不活化処理の効果を確認するため、飼育残渣の繭等の混入率や生存状況を調査した。

農研機構の隔離飼育区画では、飼育残渣の飼育室からの搬出前に飼育残渣中に見つかった繭の数は、本遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 5,192～9,619 頭のうち 0～7 頭（0～0.08%）、非遺伝子組換えカイコで飼育数 5,148～9,709 頭のうち 0～4 頭（0～0.04%）であった。この中には、幼虫も見つかったが、いずれも生育不良か死亡しており、繭を作ることができる状態のものではなかった。

また、その後、飼育残渣を網で覆って30日後まで管理したが、6回の隔離飼育試験の後で管理したうち1回だけ本遺伝子組換えカイコの繭1個が網の中で発見された。

群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画では、飼育残渣を飼育室に隣接する残渣処理室に運び、粉砕機で飼育残渣を粉砕することとし、当該粉砕前に飼育残渣の中のクワの枝を1本ずつ確認したところ、見つかった繭は、1回･1室あたり本遺伝子組換えカイコで飼育数5,871～6,000頭のうち0～28頭（0～0.5%）、非遺伝子組換えカイコで5,833～6,000頭のうち0～10頭（0～0.2%）であり、幼虫は、死亡個体も含めて、本遺伝子組換えカイコで0～21頭（0～0.4%）、非遺伝子組換えカイコで0～33頭（0～0.6%）であった。

また、粉砕機による不活化の程度を確認するため、別に、非遺伝子組換えカイコの繭や幼虫を飼育残渣に意図的に混入させて粉砕機による不活化試験を実施した。具体的には、クワの枝2 kgまたは食べ残しの葉と糞2.5 kgに4齢幼虫200頭を混入させた場合、クワの枝2 kgまたは食べ残しの葉と糞2 kgに5齢幼虫20頭を混入させた場合、クワの枝2 kgまたは食べ残しの葉と糞2 kgに繭10個を混入させた場合について、カイコの不活化の程度を確認したが、いずれも、幼虫や繭は確実に裁断又は圧殺されて生存個体は認められなかった。

d）モニタリング

農研機構及び群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画（それぞれ2,100 m^2、1,700 m^2）の外側4カ所で、カイコとクワコの性フェロモン（ボンビコール）を誘引源とするフェロモントラップを6月から12月まで継続的に設置し、クワコのオス成虫を捕獲して、本遺伝子組換えカイコとの交雑個体の有無を調査した。

農研機構では2016年からの3年間で計303頭、群馬県蚕糸技術センターでは2015年からの2年間で計529頭が捕獲された。

この結果、本遺伝子組換えカイコの導入された *DsRed2* 遺伝子に由来する赤色蛍光を複眼に持つ個体は0頭であり、遺伝子検査を実施しても、*EGFP* 遺伝子または *DsRed2* 遺伝子を保有する個体はまったく検出されなかった。

⑧　病原性

カイコが、他の生物に対して病原性を有するという報告はない。また、本遺伝子組換えカイコが産生する改変型緑色蛍光タンパク質及び改変型赤色蛍光タンパク質が病原性を有するという報告もない。したがって、本遺伝子組換えカイコが他の生物に対して病原性を有するとは考えられない。

⑨　有害物質の産生性

飼育残渣を屋外に廃棄した場合に、そこに含まれる本遺伝子組換えカイコの糞や死体が植物に影響を与える可能性があるかどうか、ブロッコリーの発芽・生育に与える影響を調査したと

ころ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に差は認められなかった（別添 24）。同様に、土壌微生物に与える影響についても調査したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に差は認められなかった（別添 25）。

また、改変型緑色蛍光タンパク質及び改変型赤色蛍光タンパク質は様々な遺伝子組換え実験を通じ、多数の使用実績を有するタンパク質であり、有害物質であるとの報告はない。生態系に対し問題を起こすタンパク質とは認識されておらず、緑色蛍光タンパク質については高校生向けの遺伝子組換え実験用のキットが市販されている。既知の有毒タンパク質と類似のアミノ酸配列を有するかどうか、Toxin and Toxin Target Database（http://www.t3db.org/）で FASTA 検索を行ったところ、既知の有毒タンパク質と類似の配列は認められなかった。また、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有するかどうかを、アレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database（FARRP）、ver. 13、http://www.allergenonline.org/）に対して FASTA 検索を行ったところ、既知アレルゲンと類似の配列は認められなかった。さらに、養蚕農家においては飼育残渣を廃棄する際はカイコの繭を取り除くなどしていることから、飼育残渣に含まれて屋外に廃棄される可能性のある本遺伝子組換えカイコはきわめて少量であると考えられ、脊椎動物等が捕食することによる有害物質の影響は想定されない。

ハ　遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との識別の方法

本遺伝子組換えカイコは絹糸腺や繭に改変型緑色蛍光タンパク質を発現し、眼に改変型赤色蛍光タンパク質を発現することから、非遺伝子組換えカイコとの区別は容易である。また、別添 13 及び 14 に示したサザンハイブリダイゼーションにより、非遺伝子組換えカイコと区別して、本遺伝子組換えカイコを感度良く検出及び識別することが可能である。

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

カイコの繭糸の生産を目的とした、①幼虫（３齢幼虫期以降のものに限る。以下同じ。）の飼育、②繭の生産及び加工、③幼虫及び繭の保管、運搬及び廃棄並びに①から③までに付随する行為

（２）使用等の方法

使用に当たっては、別に定める第一使用等による飼育等要領に従う。また、別に定めるモニタリング計画書に基づき、申請者によるモニタリングを実施する。

（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

モニタリング計画書を参照。

（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

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

—

添付資料リスト

別添 1　カイコとクワコの生理学的及び生態学的特性の比較
別添 2　日本国内におけるクワコの分布に関する調査（部外秘につき非公開）
別添 3　クワコ成虫の発生時期に関する調査（部外秘につき非公開）
別添 4　鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生する可能性のある鳥類・昆虫類
別添 5　カイコから野生のクワコ集団への遺伝子流入についての調査（部外秘につき非公開）
別添 6　養蚕農家周辺でのカイコとクワコの交雑第一代の発生に関する調査
別添 7　カイコとクワコの交雑後代の妊性についての調査
別添 8　自然界におけるカイコとクワコの交雑第一代の生存能力に関する調査
別添 9　カイコとクワコの交雑第一代のオス成虫の放飼再捕獲試験（部外秘につき非公開）
別添 10　目的遺伝子の塩基配列（部外秘につき非公開）
別添 11　ヘルパープラスミドの塩基配列（部外秘につき非公開）
別添 12　遺伝子導入に用いたヘルパープラスミドが残存していないことの確認
別添 13　移入された核酸の複製物が染色体に 1 コピー存在することの確認
別添 14　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
別添 15　移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での発現の安定性
別添 16　幼虫体重の比較
別添 17　繭重及び繭層重の比較
別添 18　孵化歩合の比較
別添 19　幼虫期間の比較
別添 20　営繭率の比較
別添 21　幼虫の行動の比較
別添 22　産卵数の比較
別添 23　産卵行動の比較
別添 24　植物の発芽や生育に与える影響の比較
別添 25　土壌微生物に与える影響の比較
別添 26　隔離飼育区画における飼育試験（部外秘につき非公開）

資料5. 審査データの概要

別添 1　カイコとクワコの生理学的及び生態学的特性の比較

生物多様性影響評価書の第一の「１．宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報」に関連する情報について、クワコの生理学的及び生態学的特性についての情報をとりまとめるとともに、カイコとクワコの比較を以下の表のとおりとりまとめた。

表．カイコとクワコの比較表

	カイコ	クワコ
学名	*Bombyx mori* (Linnaeus)	*Bombyx mandarina* (Moore)
国内の自然環境における生息状況	自然環境における生息の報告はない。	北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島までで、奄美大島以南でのクワコの生息記録はない（河原畑、1998; 伴野・中村、1999; 別添 2）。
国外の自然環境における生息状況	自然環境における生息の報告はない。	日本のほか、中国本土、朝鮮半島、台湾及び極東ロシア沿海州に生息記録がある（河原畑、1998）。
食草	幼虫はクワを摂食する。成虫は口器がなく飲水も摂食もしない。	幼虫はクワを摂食する。成虫は口器がなく飲水も摂食もしない。
幼虫の生育時季	自然環境では生育できない。	クワが葉をつけている期間（5 月から 11 月頃）。
化性（1 年間に発生する回数）	系統により、1 化性、2 化性、多化性がある。	主として 2 化性又は 3 化性で、標高が高い地域等では 1 化性になる場合もある（橋本・佐藤、1958; 別添 3）。
幼虫の脱皮回数	通常は 4 回で、3 回になることもある。	3 回が多いが 4 回もある（大村、1950; 蜷木・竹田、1982）。
幼虫の運動性	餌がなくなっても飼育容器から外に出ない。	餌があっても動き回る。
成虫の運動性	翅はあり羽ばたくことはできるが飛ぶことは全くできない。	飛ぶことができる。

資料5．審査データの概要

幼虫の体色	白色が多い。	灰褐色や黒褐色（名和、1936）。
幼虫の擬態行動	しない。	腹部第2体節から先を持ち上げて静止し、枝に擬態する。
繁殖様式	有性生殖	有性生殖
交尾	メス成虫がボンビコールを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は歩いてメス成虫に接近する。	メス成虫がボンビコールを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は飛んでメス成虫に接近する。
産卵	歩きながら500個前後を産卵する。	1個ずつ又は数個～10数個程度ずつまとめて産卵し、1頭の雌成虫の産卵数は250～300個程度（名和、1936; 大場、1939b）。

【カイコとクワコの関係】

カイコと同じ *Bombyx* 属には、野生種としてクワコ *Bombyx mandarina* が含まれ、形態学的、遺伝学的及び分子生物学的知見から、カイコの祖先は中国のクワコであると考えられている（河原畑、1998）。中国のクワコを家畜化してカイコが作られたのが数千年前で、中国のクワコ（カイコ）と日本のクワコが分化したのは、それよりはるか以前の数百万年前であると考えられている（河原畑、1998; Yukuhiro *et al*., 2002）。染色体数については、カイコと中国のクワコが 2n = 56、日本のクワコが 2n = 54 という違いがあるが、カイコと日本のクワコを人為的に交尾させると妊性を持つ交雑個体が生じる（河原畑、1998）。

【クワコの国内及び国外の自然環境における生息状況】

クワコは、日本、中国本土、朝鮮半島、台湾及び極東ロシア沿海州に分布する（河原畑、1998）。日本においては、北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島までで、奄美大島以南でのクワコの生息記録はない（河原畑、1998; 伴野・中村、1999; 別添1）。クワコの幼虫はクワの葉を摂食し、桑園だけではなく、山林にクワが自生していれば生息する可能性がある。しかし、養蚕用に管理された桑園ではクワが定期的に株元まで剪定され、クワコの卵も枝とともに除去される可能性が高まることから、生息数が少なくなることが推測される。

冬季はクワが落葉するため、クワコ幼虫が生存できるのは春から秋にかけてであり、卵で越冬する（名和、1936; 大村、1950）。

資料5. 審査データの概要

クワコの成虫の発生時期については、長野県松本市では7月中旬と10月中旬の年2回程度（橋本・佐藤、1958）、茨城県つくば市大わし（標高20m）と群馬県下仁田町下小坂（標高280m）では6月頃、8月頃及び11月～12月頃の年3回程度（別添2）、長野県佐久市内山峠（標高1,000m）では9月頃の年1回程度である（別添2）。以上のことから、地域による違いはあるものの、日本国内のクワコは主に、1年に2回世代を繰り返す2化性または、3回世代を繰り返す3化性であり、標高が高い地域では1年に1回世代を繰り返す1化性になることもある。

微粒子病を引き起こす微胞子虫 *Nosema bombycis* の野生のクワコにおける感染率は、1941年秋に1.4%（216頭中3頭）、1942年春に0%（156頭中0頭）であったとの報告がある（大村、1950）。

【中国産クワコ及び韓国産クワコ】

幼虫皮膚の斑紋と成虫の翅の形態について、中国産・韓国産・日本産それぞれのクワコ集団の間で明瞭な違いは認められないが、染色体数については、中国産クワコがカイコと同じ2n = 56、韓国産クワコと日本産クワコでは2n = 54である（河原畑、1998; Nakamura *et al.*, 1999; Kawanishi *et al.*, 2008）。中国産クワコを飼育した結果では、日本産クワコよりも成虫や蛹が小さく、高温時でも飼育しやすいことなどが報告されている（河原畑、1998）。中国産クワコとカイコを人為的に交尾させると、妊性のある交雑個体が生じるが、交雑個体同士を交配した場合に次代の孵化率が低下するとの報告がある（中村ら、1996）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：基本的特性】

クワコの卵は長径1.2～1.3 mm、短径1 mmくらいの平たい楕円形で、外側は堅い卵殻で包まれている（名和、1936; 大村、1950; 河原畑、1998）。1年に繰り返す世代の回数は主に2回又は3回（2化性又は3化性）で、標高が高い地域等では1回（1化性）になる場合もある（橋本・佐藤、1958; 別添2）。

飼育条件下での調査では、孵化してから繭を作るまでの幼虫期間は20日～30日程度だった（大村、1950）。1齢～2齢頃の間は昼間に摂食するが、成長するに従って夜間のみに摂食するようになる（名和、1936; 大村、1950）。幼虫脱皮の回数は3回（三眠蚕）が多いが、4回もある（大村、1950; 蜷木・竹田、1982）。

幼虫の体色は地域や個体ごとの変異が大きいが、灰褐色ないし黒褐色で、胸部第2体節と腹部第2体節、腹部第5体節に明瞭な斑紋がある（名和、1936; 森、1995）。このような体色が桑樹の枝に似ている他、摂食時以外は腹部第2体節から先を持ち上げて静止することで枝に擬態する。

繭は葉を巻き込むようにしてその間に作るが、その際、枝から葉柄を通して糸で足場を作り、葉が落ちないようにする（名和、1936; 大村、1950）。羽化するまでの蛹の期間は個体による違いが大きく、20日から1か月程度から、長い場合は100日以上という例もある（大場、1939a; 大村、1950）。

成虫はオス・メスともに飛翔することができる（河原畑、1998）。メス成虫は交尾が終了するまで静止し、日中に性フェロモンを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は午前中を中心に日中に飛ん

だり休んだりを繰り返しながらメス成虫を探索すると考えられる（Sasaki and Jibiki, 1984）。オス成虫の生存期間として最も長い記録は 21 日間である（村上ら、2010）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：生息又は生育可能な環境の条件】

クワコは幼虫期に桑葉を摂食して成長するため、生息場所はクワが生えている場所に限られ、クワが落葉する冬季は幼虫が生存することができず、卵で越冬する（名和、1936）。地域や気候によって時期は異なるが、冬を越した卵から、クワが芽吹く 5 月頃に幼虫が孵化し、11 月から 12 月にはその年の最後の成虫が発生する（橋本・佐藤、1958; 別添 2）。

幼虫は、腹脚を用いてクワの葉や枝を確実に把握することができ、カイコに比べて移動性が高く活発に動き回る。1 齢～2 齢頃の間は昼間に摂食するが、成長するに従って夜間のみに摂食するようになる（名和、1936; 大村、1950）。飼育に際しては、餌があっても動き回るため、容器の蓋を閉めて、逃亡を防止する必要がある。

繭は葉を巻き込むようにしてその間に作るが、その際、枝から葉柄を通して糸で足場を作り、葉が落ちないようにする（名和、1936; 大村、1950）。成虫はオス・メスともに飛翔することができる（河原畑、1998）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：繁殖又は増殖の様式】

クワコは受精によって生じた卵から発生する有性生殖を行う。

蛹からの羽化（成虫の発生）は、午前中に起きるという報告（大村、1950）や、オスの羽化が午前中を中心に、メスの羽化が午後を中心に起きるという報告（Kuwahara, 1984）がある。

メス成虫は羽化後もその場にとどまり、尾部のフェロモン腺から性フェロモン（ボンビコール）を大気中に放出してオス成虫を誘引して交尾する（Kuwahara *et al.*, 1984; Daimon *et al.*, 2012）。オス成虫は昼行性で、日中に飛翔するため、ボンビコールを用いたフェロモントラップでのオス成虫の捕獲は午前中が中心となる（Sasaki and Jibiki, 1984; Kuwahara, 1984）。成虫はオス・メスともに夜間に灯火に誘引される例が報告されているが、クワの害虫としてのクワコの防除として、灯火誘殺は必ずしも効果的ではないとされている（名和、1936; 大場、1939b）。

メス成虫は、1 個ずつ、又は数個～10 数個程度ずつまとめて卵を産みつけ、1 頭のメス成虫が産む卵の総数は 250 個～300 個程度である（名和、1936; 大村、1950）。自然条件下では、クワの葉や樹皮に産み付けることが一般的であるが、クワの近くに生えているサクラやケヤキに産み付けた例もある（大村、1950）。飼育条件下では、メス成虫を入れている紙袋やプラスチック籠などにも産卵する（中村ら、1999）。交尾したメス成虫は、1 夜のうちに産卵を終えると考えられる（大村、1950）。

冬を越して春に孵化する越年卵では、卵から幼虫が出てくる孵化は一斉に起きるのではなく、4 月頃から始まって 2 か月以上にわたって徐々に起きる（大場、1939a; 大村、1950）。孵化率は、自然条件下では寄生蜂による被害を受けるため一定しない。飼育条件下での孵化率は変異が大きいが、概ね

80%程度と報告されている（大村、1950）。春に生まれた個体が産卵すると、休眠しないで胚発生が進む不越年卵となり、この場合は、産卵から 10 日程度で一斉に孵化する（大村、1950）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：捕食・寄生される可能性】

野生のクワコは、卵の時期には、寄生蜂による寄生を受ける（名和、1936）。その寄生率は年や場所によって大きく異なるが、最大で 90%を超えることがある（大村、1950）。幼虫期には、カイコノウジバエとクワコヤドリバエが寄生するほか、アシナガバチによって捕食され、蛹期には、ヒラタヒメバチとアシブトコバチが寄生することが報告されている（名和、1936）。

Daimon T., Fujii T., Fujii T., Yokoyama T., Katsuma S., Shinoda T., Shimada T. and Ishikawa Y. (2012) Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkmoth *Bombyx mandarina*: the effects of bombykal and bombykol acetate. *J. Chem. Ecol.*, 38, 1031-1035.

Kawanishi Y., Banno Y., Fujimoto H., Nho S. K., Tu Z., Mita K., Tsuchida K., Takada N., Maekawa H., and Nakajima Y. (2008) Method for rapid distinction of *Bombyx mandarina* (Japan) from *B. mandarina* (China) based on rDNA sequence differences. *J. Insect Biotechnol. Sericol*. 77, 79-85.

Kuwahara Y. (1984) Flight time of *Bombyx mandarina* males to a pheromone trap baited with bombykol. *Appl. Entomol. Zool.*, 19, 400-401.

Kuwahara Y., Mori N., Yamada S., and Nemoto T. (1984) Evaluation of bombykol as the sex pheromone of *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 19, 265-267.

Nakamura T., Banno Y., Nakada T., Nho S. K., Xü M. K., Ueda K., Kawarabata T., Kawaguchi Y., and Koga K. (1999) Geographic dimorphism of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, in the chromosome number and the occurrence of a retroposon-like insertion in the arylphorin gene. *Genome*, 42, 1117-1120.

Sasaki M. and Jibiki F. (1984) Timing of the sexual behavior of wild and domestic silk moths. *Appl. Entomol. Zool.*, 20, 99-101.

Yukuhiro K., Sezutsu H., Itoh M., Shimizu K., and Banno Y. (2002) Significant levels of sequence divergence and gene rearrangement have occurred between the mitochondrial genome of the wild mulberry silkmoth, *Bombyx mandarina*, and its close relative, the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Evol.*, 19, 1385-2389.

大場治男（1939a）桑蚕に関する調査　一、越年卵に於ける孵化並第一世代羽化期の不斉一に就て．衣笠蚕報　396, 115-123.

大場治男（1939b）桑蚕蛾の飛来すること．　衣笠蚕報　397, 201-202.

大村清之助（1950）桑蚕の生態習性及び繭に関する調査．　蚕糸試験場報告　13, 79-130.

河原畑勇（1998）クワコとカイコ．文部省科学研究費補助金基盤研究(A) (2)研究成果報告書（別冊）課題番号：07406004.

資料5. 審査データの概要

中村隆・伴野豊・徐孟奎・中田徹・河口豊・古賀克己（1996）中国産クワコとカイコとの雑種後代個体における染色体構成.　九州蚕糸　27, 31.

中村隆・伴野豊・河口豊・古賀克己（1999）効率的なクワコの採卵方法.　日本蚕糸学雑誌　68, 165-166.

名和梅吉（1936）桑樹害虫クワゴに就いて.　昆虫世界　40, 2-5.

蜷木理・竹田敏（1982）クワコの全齢人工飼料育.　日本蚕糸学雑誌　51, 237-238.

橋本春雄・佐藤京二（1958）松本市におけるクワコの羽化時期. 日本蚕糸学会中部支部講演集　14, 9.

伴野豊・中村隆（1999）クワコをめぐる最近の話題(3)　－外部形態・染色体－.　野蚕（Wild Silkworm News）37、6-7.

村上聡・岩松琢磨・北村優・北澤裕太・片田美幸・藤森遼・横山岳・蜷木理（2010）カイコの成虫生存期間の分布に関する系統間差異.　蚕糸・昆虫バイオテック　79, 53-59.

森精　編著（1995）カイコと教育・研究、サイエンスハウス

別添 **4**　鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生する可能性のある鳥類・昆虫類

野外におけるカイコの潜在的な捕食動物として、群馬県前橋市において鱗翅目昆虫の幼虫を捕食又は幼虫に寄生することが考えられる野生の鳥類・昆虫類を以下に挙げる。

鳥類

ムクドリ（観察による）
カラス類（観察による）

昆虫類

カイコノウジバエ（横山、1929）
クワコヤドリバエ（横山、1929）
ブランコヤドリバエ（横山、1929）
ハサミムシ類（横山、1929）
カマドウマ類（横山、1929）
ウマオイ類（横山、1929）
ハネカクシ類（横山、1929）
ゴミムシ類（横山、1929）
アシナガバチ類（横山、1929）
スズメバチ類（飯塚・行弘、2007）
アリ類（横山、1929）

飯塚哲也・行弘研司（2007）野外におけるカイコ遺伝子拡散の可能性評価手法の開発.　遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究（プロジェクト研究成果シリーズ 447）, 100-102.
横山桐郎（1929）最新日本蚕業害虫全書、明文堂

別添 6　養蚕農家周辺でのカイコとクワコの交雑第一代の発生についての調査

養蚕の過程でのカイコとクワコの交雑の可能性を直接的に検証する実験として、養蚕農家において特段の交雑防止措置を講じない慣行的な手法でカイコ幼虫を飼育し、その周辺で採集したクワコの遺伝子型を解析した。カイコとクワコの交雑第一代はカイコ由来のミトコンドリアを持つことから、ミトコンドリア *cox1* 遺伝子の遺伝子型を解析することにより、クワコ集団内の交雑第一代の割合を直接的に明らかにすることができる。

【調査方法】

（１）クワコを採集するフェロモントラップの設置

フェロモントラップとして、害虫発生予察用の粘着板を使用し、誘引源として、平成 25 年はカイコのメス成虫 1～3 頭ずつ、平成 26 年と平成 27 年は合成フェロモン（ボンビコール）1 mg を添加したゴムキャップ 1 個ずつを用いた。調査期間は、平成 25 年は 6 月 12 日から 12 月 24 日まで、平成 26 年は 5 月 26 日から 12 月 23 日まで、平成 27 年は 6 月 2 日から 12 月 14 日までであった。おおむね 2 週間に 1 回、粘着板と誘引源とともにフェロモントラップを交換して、捕獲されたクワコのオス成虫を回収した。

（２）調査地

調査地とした群馬県前橋市の養蚕農家の飼育規模は表 1 のとおりであり、実際にフェロモントラップを設置した調査地の状況は表 2 のとおりである。

表 1．調査地とした養蚕農家の飼育規模（平成 26 年）

農家	年間飼育頭数	年間飼育回数	飼育時期
A	99 万頭	5 回	5 月中旬から 10 月中旬
B	57 万頭	4 回	5 月中旬から 10 月下旬
C	24 万頭	2 回	5 月中旬から 10 月上旬
D	60 万頭	5 回	5 月中旬から 10 月下旬
E	7 万 5 千頭	1 回	5 月中旬から 6 月中旬

資料5．審査データの概要

表 2. 調査地の状況

調査地	農家	調査年	調査地の環境
A1	A	平成 25～27 年	蚕室に隣接して飼育残渣を堆積している場所で桑畑にも隣接
A2	A	平成 25・26 年	調査地 A1 から約 2 km 離れた桑畑
A3	A	平成 25・26 年	調査地 A2 から約 400 m 離れた桑畑
B	B	平成 26・27 年	蚕室に隣接して飼育残渣を堆積している場所で桑畑にも隣接
C	C	平成 26・27 年	蚕室に隣接した桑畑
D	D	平成 26・27 年	蚕室に隣接した場所（農家 D は蚕室、桑畑、残渣廃棄場所がそれぞれ離れている。）
E	E	平成 26・27 年	畦間に残渣を廃棄している桑畑と蚕室に隣接

（３）遺伝子型の解析

別添 6 と同様に、採集したクワコのオス成虫から抽出したゲノム DNA を鋳型とした PCR でミトコンドリア *cox1* 遺伝子の一部を増幅した。その一部をとってアガロースゲル電気泳動で確認した後、残りの一部を制限酵素 *Ssp* I で消化してアガロースゲル電気泳動を行い、断片長多型からカイコ型とクワコ型を区別した。必要に応じて PCR 産物の塩基配列を決定してカイコ型とクワコ型を区別した。

【結果】

平成 25～27 年に捕獲したクワコのオス成虫のうち、PCR 産物が得られた 3,750 個体すべてがクワコ型であった（表 3）。

表 3. 調査地ごとの調査結果

調査地	解析数			解析の結果
	平成 25 年	平成 26 年	平成 27 年	
A1	75 頭	253 頭	188 頭	すべてクワコ型
A2	119 頭	542 頭	—	すべてクワコ型
A3	128 頭	814 頭	—	すべてクワコ型
B	—	187 頭	179 頭	すべてクワコ型
C	—	168 頭	111 頭	すべてクワコ型
D	—	226 頭	112 頭	すべてクワコ型
E	—	426 頭	222 頭	すべてクワコ型

【考察】

本試験では、野生のクワコ集団に現に交雑第一代が生じているかどうかを検証しているものであり、ミトコンドリアゲノムを調べることで確実に検出できる。

特段の交雑防止措置を講じることなく、桑畑の中や隣接地に残渣を廃棄・堆積するなど、カイコとクワコの交雑が起きやすい状況を作り出しても、野生のクワコ集団中に交雑個体の成虫は認められなかったことから、実際の養蚕農家及びその周辺で交雑第一代が生じることはないか、または極めてまれであると考えられた。

Kômoto N., Kuwabara N., and Yukuhiro K. (2016) Absence of hybrids between the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*, and the wild mulberry silkmoth, *B. mandarina*, in natural populations around sericulture farms. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* (in press).

別添7　カイコとクワコの交雑後代の妊性についての調査

カイコとクワコの交雑個体及びその後代が妊性を持つかどうかを調査した。

【方法】

カイコ（中145号×日140号）のメスとクワコのオスとを野外で交尾させ、得られた受精卵から孵化した交雑第1代の幼虫を3齢幼虫まで室内で飼育した後、約250頭を網室（図1、2）内の桑樹に放飼した。

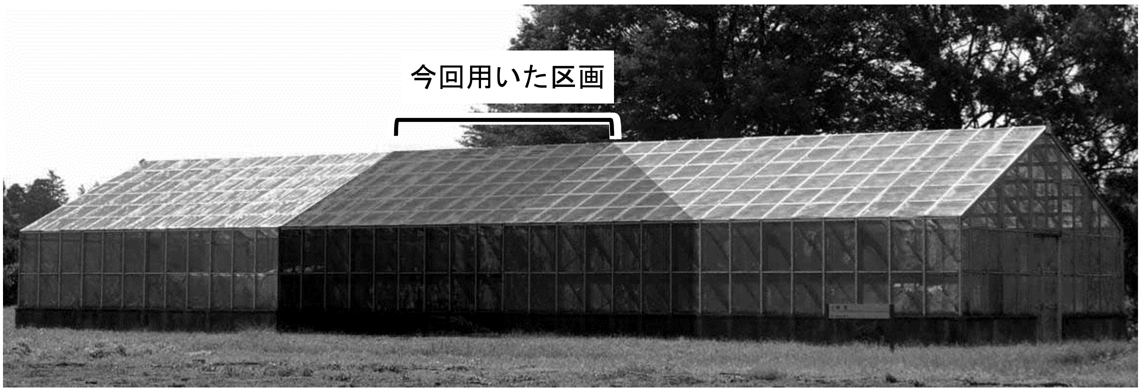


図1. 網室の外観

全体が3つの区画に分かれていて、中央の灰色に塗った部分が今回用いた区画。

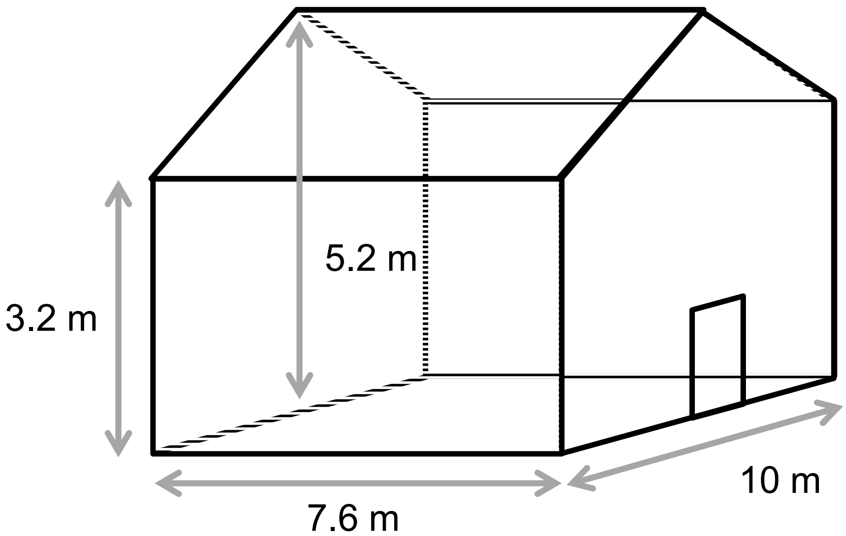


図2. 使用した区画の大きさ

網室内には、桑樹が5本ある。下草の除草や桑樹の剪定等の管理を1年に1回以上行い、その際に、交雑個体の後代が生存していることを確認した。

【結果】

2008 年夏に網室内に交雑第 1 代の幼虫を放飼した後、成虫の発生が確認された。その後、2012 年夏に繭を回収して試験を終了するまで、網室の中で交雑個体の後代が継続的に生存していることは、年に 1 回以上確認された。なお、網室内には、主要な捕食者である鳥類及びハチ類は生息しておらず、交雑個体が捕食される様子も観察されていない。

【考察】

本試験で得られた結果は、カイコとクワコの交雑個体及びその後代に妊性があり、捕食や競合がない条件で野外でも生存できることを示している。室内での飼育としては、児玉（1927）が F_3 まで、見波・大場（1939）が F_4 まで、それぞれ経代飼育の結果を報告している。このことからも、カイコとクワコの交雑個体及びその後代には妊性があることが確認できる。

児玉彌曾衛（1929）家蚕と野蚕の交配.　　佐久良会雑誌, 21, 59-64.
見波定治・大場治男（1939）桑蚕と家蚕との交雑種に就て.　　衣笠蚕報, 394, 71-82.

別添 8　自然界におけるカイコとクワコの交雑第一代の生存能力に関する調査

カイコのメス成虫が屋外に生じてクワコのオス成虫と交尾し、交雑第一代の幼虫が孵化した場合の生存の可能性について、網室内での観察では、捕食者がいないことから自然条件が再現されていないという課題があった。そこで、網室外の桑樹を調査地として交雑第一代の孵化幼虫を放飼し、その生存の可能性を検証した。

【調査方法】

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の敷地内に、他の桑樹から離れて生育している桑樹の葉上または桑樹から 2 m 離れた地面に、カイコ（日 137 号×支 146 号）とクワコ（群馬県由来の飼育系統）との交雑第一代の孵化幼虫を放飼した。20 日程度後に当該桑樹の枝を剪定しながら葉を 1 枚ずつ観察して幼虫や繭の有無を調査した。

【結果】

2014 年 5 月に 3 日間で合計 150 頭の交雑第一代の孵化幼虫を桑樹の葉上に放飼した。7 日後には生存個体が観察されなくなり、最終的に 23 日後に確認した際には、幼虫も繭も認められなかった。

2015 年 6 月に 3 日間で合計 626 頭、2015 年 8 月に 3 日間で 2,338 頭の交雑第一代の孵化幼虫を桑樹から 2 m 離れた地面に放飼した。その後の観察では生存個体は観察されず、最終的に 19～21 日後に確認した際にも、幼虫・繭ともに認められなかった。

【考察】

カイコのメス成虫が屋外でクワコのオス成虫と交尾して産卵する場所として可能性があるのは飼育残渣の中であり、孵化幼虫を地面に放飼した調査はそれを再現している。カイコのメス成虫 5 頭が実験室内で産卵するのとほぼ同数の孵化幼虫を放飼しても蛹まで生存することがなく、生存の可能性を高めるためにあえて葉上に放飼しても残らなかったことから、飼育残渣に紛れてカイコのメスが屋外に出て、仮に捕食等により死亡することなく羽化してクワコのオス成虫と交尾したとしても、交雑第一代が生存する可能性は極めて低いと考えられる。

なお、網室での調査（別添 7）で交雑第一代が生存可能であったことから、今回の網室外での調査で生存できなかったのは、網室内に存在していない鳥類等の捕食者による影響によるものと推定される。

Kômoto N., Kuwabara N., and Yukuhiro K. (2016) Absence of hybrids between the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*, and the wild mulberry silkmoth, *B. mandarina*, in natural populations around sericulture farms. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* (in press).

別添 **12**　遺伝子導入に用いたヘルパープラスミドが残存していないことの確認

【方法】

$G_{1\text{-}6}$世代（生物多様性影響評価書　図 17 参照）の遺伝子組換えカイコ（KH25 系統）の 5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、0.5 μg を鋳型として、KOD-plus を用いて 30 サイクルの PCR を行い、転移酵素遺伝子の一部を増幅した。検出限界を示すため、ヘルパープラスミドを段階希釈して鋳型とした PCR も行った。PCR は 50 μl の反応系で行い、そのうち 5 μl を 1 %アガロースゲルで電気泳動した。

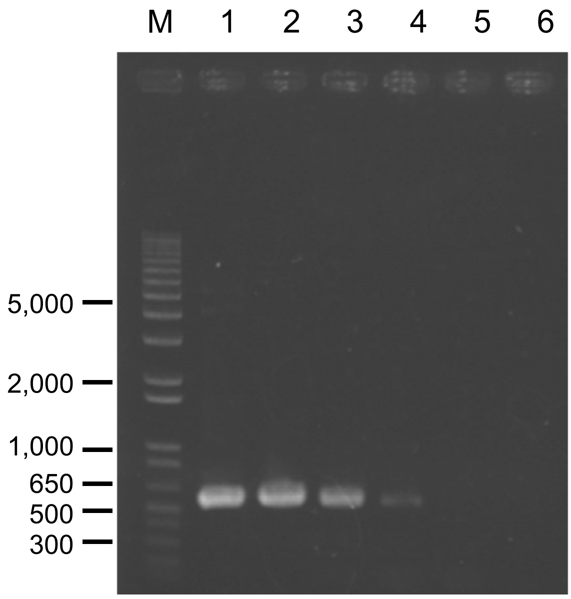
プライマーの塩基配列は以下のとおり。

pig-TP4868U25: 5’-TATATCCCAAACAAGCCAAGTAAGT-3’

pig-TP5394L23: 5’-CCACCTATTCGTCTTCCTACTGC-3’

【結果】

仮にカイコゲノム中に 1 コピーの *piggyBac* 転移酵素遺伝子が挿入されているとすると、カイコゲノム 0.5 μg に相当するヘルパープラスミドの量は約 6 pg となる。PCR の結果、図のとおり、予想されるサイズ（550bp）のバンドが、ヘルパープラスミド 0.4 pg からも検出できた一方、本遺伝子組換えカイコのゲノム DNA 0.5 μg からは検出されなかったことから、本遺伝子組換えカイコにはヘルパープラスミドの配列が残存していないことが確認できた。



M	:	分子量マーカー	
1	:	ヘルパーDNA	400 ng (カイコゲノム DNA 0.5 μg での $7\text{x}10^4$ コピー分に相当)
2	:	ヘルパーDNA	4 ng (700 コピー分)
3	:	ヘルパーDNA	40 pg (7 コピー分)
4	:	ヘルパーDNA	0.4 pg (0.07 コピー分)
5, 6	:	KH25 ゲノム DNA	0.5 μg（5 と 6 は別個体）

別添 13　移入された核酸の複製物が染色体に 1 コピー存在することの確認

【方法】

遺伝子組換えカイコ（KH25）と非遺伝子組換えカイコ（白/C）との F_1 に、非遺伝子組換えカイコ（白/C）を戻し交配して、次代での分離を解析した。戻し交配は 3 ペア（蛾区）について行い、4 齢の 2 日目〜3 日目に約 70 頭をランダムに選んで飼育した。死亡蚕、同功繭を除いて、緑色蛍光を持つ繭と白繭とを区別し、羽化した蛾から個体別にゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションを行った。

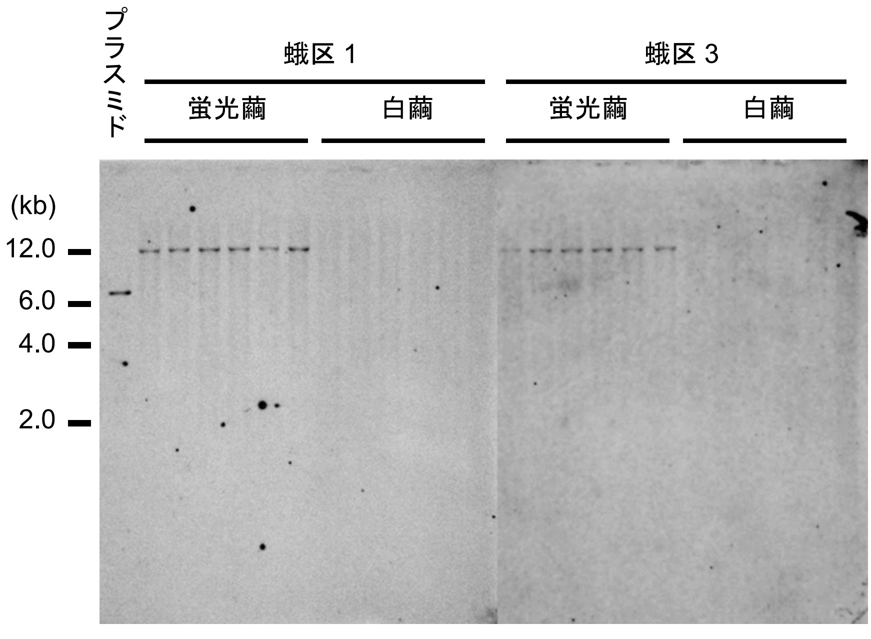
ゲノム DNA（2 μg）を制限酵素 *Sal*I で消化したのち、0.8%アガロースゲルで電気泳動を行い、ナイロンメンブレン Hybond-N+にトランスファーした。プローブは、生物多様性影響評価書中の図 14 に示すように *piggBac R* 中に設定し､PCR で作製した｡プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

Rarm-5: 5’-TGTTTTATCGGTCTGTATATCGAGG-3’
Rarm-3: 5’-GGTGGCCTATGGCATTATTGTACGG-3’

得られた PCR 産物を AlkPhos Direct Kit（GE ヘルスケア社製）を用いてラベルし、CDP-*Star* を基質として化学発光で検出した。なお、プラスミドベクターpBac[3xP3-DsRed2afm]（6.5 kb）を制限酵素 *Asc*I で切断してポジティブコントロールとした。

【結果】

サザンハイブリダイゼーションでバンドが検出される陽性個体と検出されない陰性個体とが 1：1 に分離したことから、移入された遺伝子は染色体上に 1 コピー挿入されていると推定された。



資料5．審査データの概要

蛾区番号	サザン陽性個体数	サザン陰性個体数
1	18	19
2	21	20
3	29	27
計	68	66

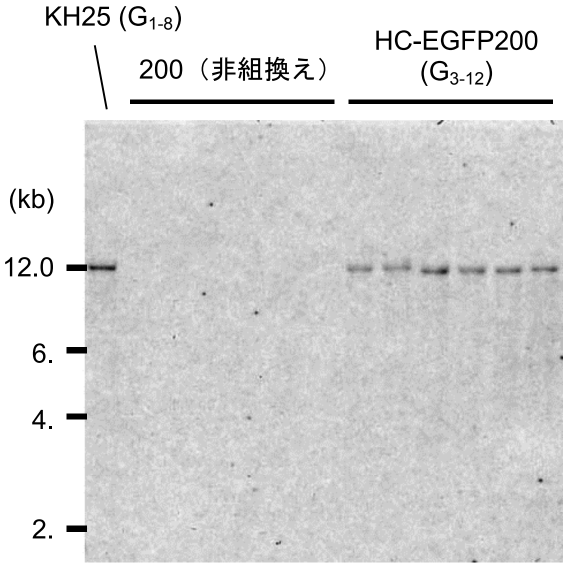
別添 **14**　移入された核酸の複製物の複数の子孫系統における伝達の安定性

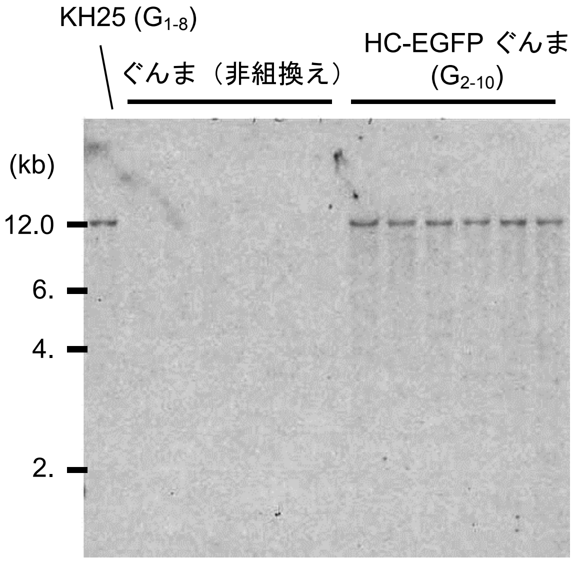
【方法】

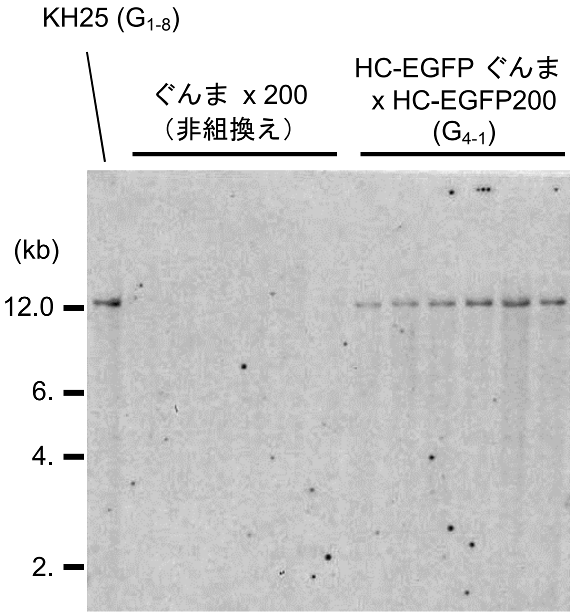
同じ元系統（G_1 世代）に由来する異なる子孫系統の遺伝子組換えカイコ（各世代 6 個体ずつ）及び非遺伝子組換えカイコ（各 6 個体ずつ）について、5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、別添 13 と同様にゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った。

【結果】

図に示すように、移入された遺伝子はカイコゲノムに安定的に維持されている。







別添 **15**　移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での発現の安定性

【方法】

同じ元系統（G_1 世代）に由来する異なる子孫系統の遺伝子組換えカイコ（各 6 個体ずつ）と、同時期に飼育した非遺伝子組換えカイコ（各 6 個体ずつ）について、5 齢幼虫の後部絹糸腺から全 RNA を抽出して *EGFP* 遺伝子を検出する RT-PCR を行った。RNA はそれぞれ 1 μg ずつを用い、逆転写酵素 AMV Reverse Transcriptase XL（タカラバイオ）によって cDNA を合成し、そのうちの 20 分の 1 を鋳型として *Ex* Taq HS（タカラバイオ）で PCR を行った。プライマーは生物多様性影響評価書中の図 14 に「RT-PCR の範囲」として図示している部分を増幅するように設定し、その塩基配列は以下のとおりである。

ks35: 5’-ACGACGGCAACTACAAGACC-3’
ks248: 5’-GAACTCCAGCAGGACCATGTGAT-3’

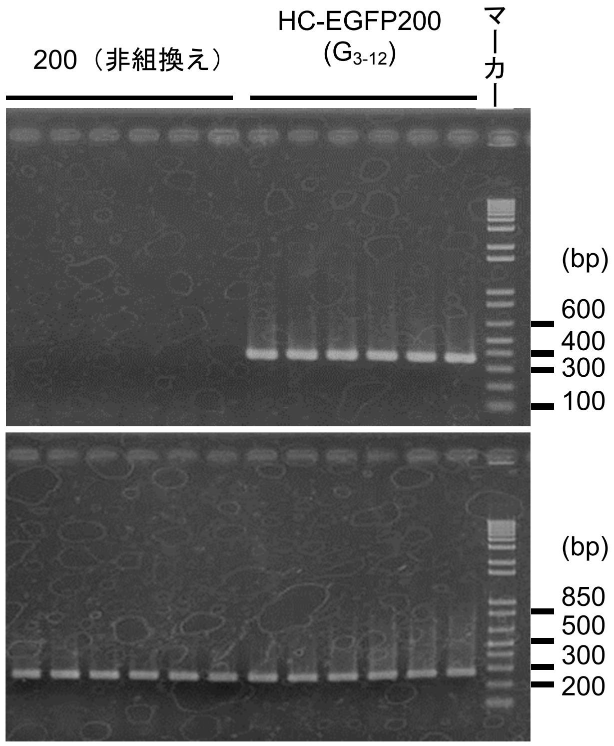
PCR は 10 μl の反応系で行い、そのうちの 3 μl を 2%アガロースゲルで電気泳動した。

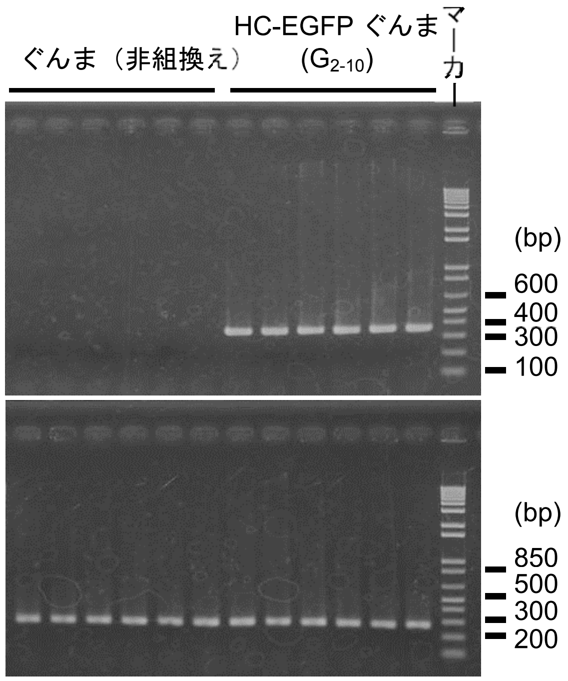
また、RT-PCR のポジティブコントロールとして、*rp49* 遺伝子（リボソームタンパク質遺伝子、アクセッション番号 NM_001098282）の PCR も行った。*rp49* 遺伝子のプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

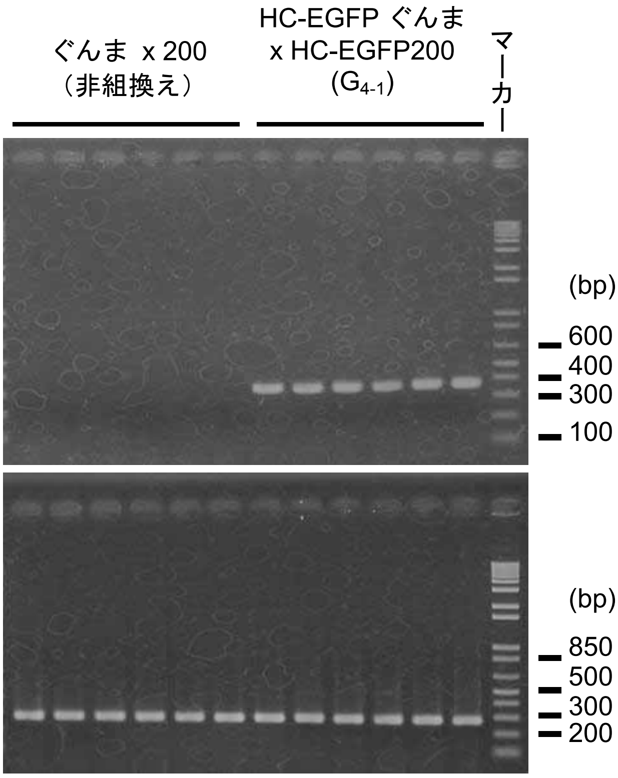
ks13: 5’-GGATCGCTATGACAAACTTAAGAGGA-3’
ks12: 5’-TGCTGGGCTCTTTCCACGA-3’

【結果】

図のとおり、予想されるサイズ（365bp）の *EGFP* 遺伝子の PCR 産物が、遺伝子組換えカイコすべてで同程度に検出され、一方、非遺伝子組換えカイコでは検出されなかった。また、*rp49* 遺伝子はいずれの個体からも増幅された（276 bp）。このことから、今回の申請に用いる遺伝子組換えカイコ系統では、導入遺伝子が安定的に発現していることが確認できた。


200（非組換え）
HC-EGFP200
(G3-12)
マーカー
(bp)
600
400
300
100
(bp)
850
500
300
200


ぐんま（非組換え）
HC-EGFP ぐんま
(G2-10)
マーカー
(bp)
600
400
300
100
(bp)
850
500
300
200


ぐんま x 200
（非組換え）
HC-EGFP ぐんま
x HC-EGFP200
(G4-1)
マーカー
(bp)
600
400
300
100
(bp)
850
500
300
200

別添 16　幼虫体重の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、孵化後及び脱皮後の給餌前の幼虫（起蚕）の体重を測定した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}2}$）。

遺伝子組換えカイコ　　HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200
対照となる非遺伝子組換えカイコ　　ぐんま×200

孵化直後の幼虫については、1 つの母親由来の幼虫（蛾区）をまとめて体重を測定し、孵化した卵の数を数えて幼虫の数として、1 頭あたりの体重を計算した。遺伝子組換えカイコについては 3 蛾区、非遺伝子組換えカイコについては 4 蛾区を計測した。

2 齢起蚕については、20 頭をまとめて体重を測定し、1 頭あたりの体重を計算した。これを、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコについて、それぞれ 12 回ずつ繰り返した。

3 齢起蚕以降については、1 頭ずつの体重を、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 40 頭ずつ測定した。

【結果】

系統	孵化直後	2 齢起蚕	3 齢起蚕	4 齢起蚕	5 齢起蚕
HC-EGFP ぐんま x HC-EGFP 200	0.355 ±0.0195	4.52 ±0.279	30.8 ±5.74	171 ±29.5	774 ±95.0
ぐんま x 200	0.404 ±0.0201	6.29 ±0.142	40.3 ±4.74	190 ±14.9	1003 ±102

（単位：mg、平均±標準偏差）

いずれの齢期においても、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコで統計学的な有意差があった（t 検定で $P < 0.05$）。

別添 17　繭重及び繭層重の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの孵化幼虫 200 頭ずつについて、稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育した。得られた繭（2 頭以上が 1 つの繭を作った場合などを除いた正常な繭）について、繭重（蛹を含む繭の重さ）と繭層重（繭から蛹と脱皮殻を除いた重さ）を計測した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}5}$）。

遺伝子組換えカイコ　HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200
対照となる非遺伝子組換えカイコ　ぐんま×200

【結果】

	オス			メス		
系統	個数	繭重	繭層重	個数	繭重	繭層重
HC-EGFP ぐんま x HC-EGFP 200	77	1.66 ±0.122	0.294 ±0.0334	90	2.13 ±0.194	0.301 ±0.0482
ぐんま x 200	90	1.83 ±0.108	0.436 ±0.0274	89	2.28 ±0.162	0.459 ±0.0317

（繭重と繭層重は単位：g、平均±標準偏差）

繭重及び繭層重いずれについても遺伝子組換えカイコは雌雄ともに非遺伝子組換えカイコよりも小さかった（Welch の t 検定で $P < 0.001$）。

別添 18　孵化歩合の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、受精卵のうち幼虫が孵化する割合である孵化歩合を比較した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}1}$）。

遺伝子組換えカイコ	HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200
対照となる非遺伝子組換えカイコ	ぐんま×200

なお、不受精卵とは、受精卵特有の漿膜細胞の着色が認められない卵、死卵とは、受精はしたが胚発生が進まなかった卵、催青死卵とは、胚発生が進んで孵化前の幼虫が透けて見える状態（催青）にはなったが孵化しなかった卵のことを言う。卵総数のうち不受精卵以外を受精卵とした。

【結果】

系統	総数	不受精卵数	死卵数	催青死卵数	孵化卵数	孵化歩合（%）
HC-EGFP ぐんま x HC-EGFP 200	1,056	20	5	20	1,011	97.6
ぐんま x 200	1,596	30	14	16	1,536	98.1

孵化歩合は（孵化卵数）／（(総数）－（不受精卵数)）として算出している。

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で、孵化歩合に有意差は認められなかった（カイ二乗検定で P = 0.90）。

別添 19　幼虫期間の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの孵化幼虫 200 頭ずつについて、稚蚕期（1 齢から 3 齢）までは約 600 頭ずつを人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）は 400 頭を桑葉で飼育して、幼虫期間を比較した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}5}$）。

遺伝子組換えカイコ	HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200
対照となる非遺伝子組換えカイコ	ぐんま×200

なお、ここで幼虫期間とは、孵化した幼虫に最初の給餌を行ってから、繭形成の開始に伴って給餌を停止するまでの日数を言う。

【結果】

	オス		メス	
系統	繭形成数	幼虫期間（日）	繭形成数	幼虫期間（日）
HC-EGFP ぐんま x HC-EGFP 200	84	24.0±1.58	97	24.1±1.35
ぐんま x 200	98	25.1±0.922	93	25.2±0.870

遺伝子組換えカイコは雌雄ともに非遺伝子組換えカイコに比べて幼虫期間が短かった（Brunner-Munzel 検定で $P < 0.001$）。

別添 20　営繭率の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育した。4 齢起蚕で頭数を 400 頭にそろえて飼育し、繭を作った個体数（結繭蚕数）を調査した。結繭蚕数を 4 齢起蚕数で割った値を営繭率とした。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}1}$）。

遺伝子組換えカイコ　HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200
対照となる非遺伝子組換えカイコ　ぐんま×200

【結果】

系統	4 齢 起蚕数	結繭蚕数	営繭率 （%）
HC-EGFP ぐんま x HC-EGFP 200	400	396	99.0
ぐんま x 200	400	395	98.8

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で、営繭率に有意差は認められなかった（カイ二乗検定で P = 0.97）。

なお、繭を作らなかった個体については、幼虫期での死亡を確認した。

別添 21　幼虫の行動の比較

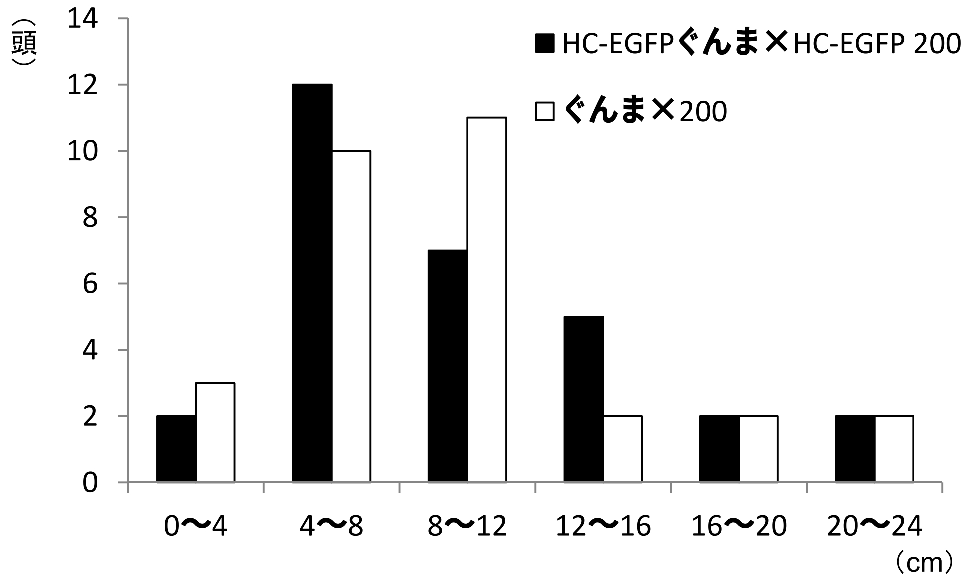
【方法】

150 cm 四方の紙の上に、20 cm ずつ間を取って 5 列×6 列で合計 30 個の点をつけ、そこに、5 齢 2 日目のカイコ幼虫を 1 頭ずつ合計 30 頭置く。個体識別のため幼虫には通し番号を書いておく。そのまま 16 時間放置し、それぞれのカイコが元の場所からどのくらいの距離を移動したかを記録する。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}2}$）。

遺伝子組換えカイコ	HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200
対照となる非遺伝子組換えカイコ	ぐんま×200

【結果】

移動距離の平均値（±標準偏差）は、遺伝子組換えカイコで 9.4 cm（±5.4 cm）、非遺伝子組換えカイコで 9.6 cm（±5.0 cm）であり、差は認められなかった（t 検定で P = 0.87）。また、移動距離を 4 cm ごとのヒストグラムに表すと下図のようになった。



別添 22　産卵数の比較

【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 21 頭ずつのメス蛾を交尾・割愛させた後、半径 19 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 24 時間放置して産卵させ、それぞれの産卵数を調査した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}2}$）。

遺伝子組換えカイコ	HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200
対照となる非遺伝子組換えカイコ	ぐんま×200

【結果】

遺伝子組換えカイコのうち 2 頭は少数（30 個と 41 個）しか産卵していなかったため、これを集計から除いた。1 頭当たりの産卵数は以下のとおりとなった。

系統	平均±標準偏差
HC-EGFP ぐんま x HC-EGFP 200	516.4±102.7
ぐんま x 200	645.6±109.2

遺伝子組換えカイコの産卵数は非遺伝子組換えカイコの産卵数より少なかった（差がないことを帰無仮説とした t 検定で $P < 0.001$）。

別添 23　産卵行動の比較

【方法】

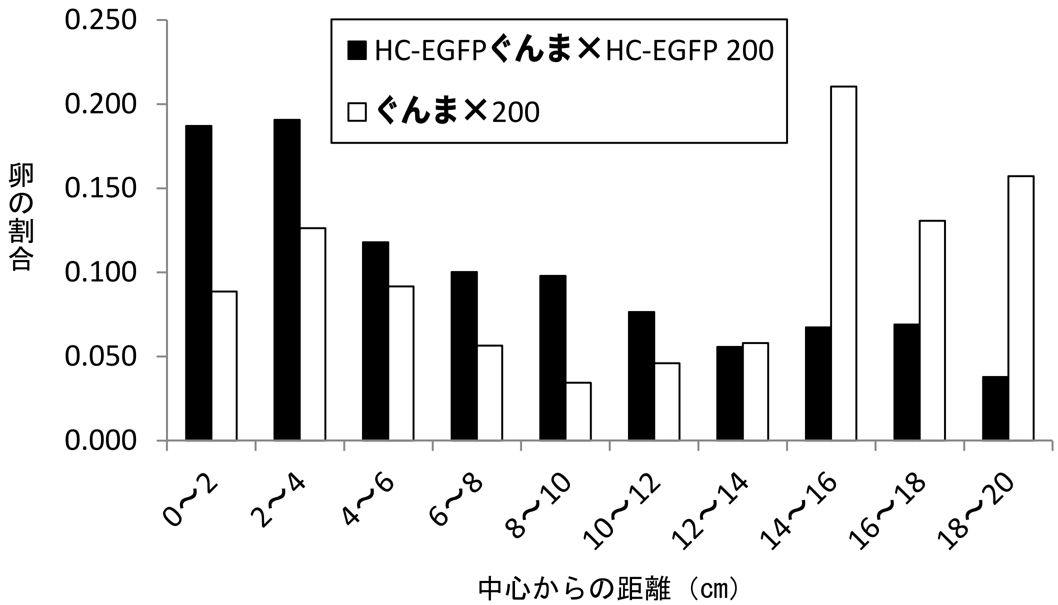
遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 21 頭ずつのメス蛾を交尾・割愛させた後、半径 19 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 24 時間放置して産卵させ、卵 1 つずつの中心からの距離を記録した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 17 の $G_{4\text{-}2}$）。

遺伝子組換えカイコ　　HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200

対照となる非遺伝子組換えカイコ　　ぐんま×200

【結果】

遺伝子組換えカイコのうち 2 頭は少数（30 個と 41 個）しか産卵していなかったため、これを集計から除いた。遺伝子組換えカイコ 19 頭と非遺伝子組換えカイコ 21 頭それぞれについて中心から 2 cm ごとの卵の数を合計して、それぞれの卵の総数に対する割合をヒストグラムに表すと下図のようになる。遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコに比べて中心に近い位置に産卵している（差がないことを帰無仮説とした Mann-Whitney の U 検定で $P < 0.001$）。



別添 24　植物の発芽や生育に与える影響の比較

【方法】

冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、これを 1%混入した無肥粒状培土を連結トレイ（7.5 cm 角）に 100 g ずつ入れ、1 穴にブロッコリー（緑嶺）種子 30 粒を播種した（各試験区について 5 反復）。これを 20℃・自然光の条件に置き、播種後 7 日で発芽数を調査し、2 週間で地上部を回収して、一株当たりの新鮮重を調査した。試験期間中に施肥は行っていない。供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ
・HC-EGFP ぐんま
・HC-EGFP 200
・HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200

対照となる非遺伝子組換えカイコ
・ぐんま
・200
・ぐんま×200

【結果】

表に示すとおり、発芽率と地上部の重量ともに、遺伝子組換えカイコと、対照となる非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった。

表 1. 発芽率に与える影響

試験区	発芽率±標準偏差（%）	非組換え区と組換え区の比較（t 検定による P 値）
無処理区（土壌のみ）	86.7 ± 6.3	
幼虫粉末		
ぐんま	92.7 ± 4.4	0.68
HC-EGFP ぐんま	91.3 ± 4.5	
200	89.3 ± 3.9	0.65
HC-EGFP 200	86.7 ± 10.5	
ぐんま×200	89.3 ± 6.5	0.70
HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200	90.7 ± 1.3	
糞粉末		
ぐんま	86.7 ± 8.4	0.79
HC-EGFP ぐんま	88.0 ± 4.5	
200	93.3 ± 5.6	0.085
HC-EGFP 200	87.3 ± 2.5	
ぐんま×200	90.7 ± 4.9	0.80
HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200	91.3 ± 1.6	

表 2．生育に与える影響

試験区	重量±標準偏差 （g）	非組換え区と組換え区の比較 （t 検定による *P* 値）
無処理区（土壌のみ）	0.11 ± 0.018	
幼虫粉末		
ぐんま	0.063 ± 0.0075	0.28
HC-EGFP ぐんま	0.072 ± 0.012	
200	0.069 ± 0.0035	0.35
HC-EGFP 200	0.065 ± 0.0077	
ぐんま×200	0.050 ± 0.0049	0.074
HC-EGFP ぐんま ×HC-EGFP 200	0.059 ± 0.0071	
糞粉末		
ぐんま	0.056 ± 0.0071	0.33
HC-EGFP ぐんま	0.062 ± 0.010	
200	0.052 ± 0.0073	0.45
HC-EGFP 200	0.049 ± 0.0057	
ぐんま×200	0.064 ± 0.0062	0.97
HC-EGFP ぐんま ×HC-EGFP 200	0.064 ± 0.010	

別添 25　土壌微生物に与える影響の比較

【方法】

冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、前年に麦を栽培した畑の土（土壌消毒していない）に 1%の割合で混和した。これに滅菌水 5 ml を加えて湿潤させ、25℃で 2 週間培養した。その後、5 g を秤量して 45 ml の滅菌水と混合した後、10^2～10^6 倍希釈液を作成した。糸状菌については、10^2、10^3、10^4 倍希釈液 200 μl を直径 9 cm シャーレのローズベンガル培地上に塗布し、25℃で 4 日間培養した後、コロニー数を調査した。細菌・放線菌については、10^4、10^5、10^6 倍希釈液 200 μl を直径 9 cm シャーレの PTYG 培地上に塗布し、25℃で 4 日間培養した後、コロニー数を調査した。

供試系統は以下のとおりとした。

遺伝子組換えカイコ	対照となる非組換えカイコ
・HC-EGFP ぐんま	・ぐんま
・HC-EGFP 200	・200
・HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP 200	・ぐんま×200

【結果】

表に示すとおり、糸状菌と細菌・放線菌ともに、遺伝子組換えカイコと、対照となる非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった。

資料5. 審査データの概要

表 1. 糸状菌への影響

試験区	乾土 1 g あたりの平均コロニー数±標準偏差（x 10^6）	非組換え区と組換え区の比較（t 検定による P 値）
無処理区（土壌のみ）	0.12 ± 0.04	
幼虫粉末		
ぐんま	1.02 ± 0.36	0.058
HC-EGFP ぐんま	2.46 ± 1.90	
200	1.01 ± 0.34	0.41
HC-EGFP 200	1.62 ± 0.42	
ぐんま×200	1.53 ± 0.76	0.49
HC-EGFP ぐんま ×HC-EGFP 200	2.01 ± 0.73	
糞粉末		
ぐんま	1.91 ± 0.49	0.95
HC-EGFP ぐんま	1.86 ± 0.30	
200	1.30 ± 0.24	0.47
HC-EGFP 200	1.83 ± 0.56	
ぐんま×200	1.77 ± 0.55	0.22
HC-EGFP ぐんま ×HC-EGFP 200	2.69 ± 0.79	

表 2. 細菌・放線菌への影響

試験区	乾土 1 g あたりの平均コロニー数±標準偏差（x 10^6）	非組換え区と組換え区の比較（t 検定による *P* 値）
無処理区（土壌のみ）	0.85 ± 0.44	
幼虫粉末		
ぐんま	0.97 ± 0.19	0.30
HC-EGFP ぐんま	1.50 ± 0.12	
200	1.67 ± 0.45	0.92
HC-EGFP 200	1.72 ± 0.73	
ぐんま×200	1.31 ± 0.41	0.06
HC-EGFP ぐんま ×HC-EGFP 200	2.30 ± 0.39	
糞粉末		
ぐんま	3.85 ± 0.53	0.89
HC-EGFP ぐんま	1.31 ± 0.49	
200	1.14 ± 1.10	0.67
HC-EGFP 200	1.35 ± 0.48	
ぐんま×200	0.53 ± 0.03	0.85
HC-EGFP ぐんま ×HC-EGFP 200	0.63 ± 0.21	

引用文献リスト

Berghammer A. J., Klingler M., and Wimmer E. A. (1999) A universal marker for transgenic insects. *Nature*, 402, 370-371.

Cary L. C., Goebel M., Corsaro B. G., Wang H.-G., Rosen E., and Fraser M. J. (1989) Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology*, 172, 156-169.

Daimon T., Fujii T., Fujii T., Yokoyama T., Katsuma S., Shinoda T., Shimada T. and Ishikawa Y. (2012) Reinvestigation of the sex pheromone of the wild silkmoth *Bombyx mandarina*: the effects of bombykal and bombykyl acetate. *J. Chem. Ecol.*, 38, 1031-1035.

Handler A. M. (2002) Use of the *piggyBac* transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32, 1211-1220.

Hutton T. (1864) On the revision and restoration of the silkworm (part II.); with distinctive characters of eighteen species of silk-producing *Bombycidae*. *Trans. Entmol. Soc. London*, 3rd ser., Vol. II, 295-331.

Inoue S., Kanda T., Imamura M., Quan G.-X., Kojima K., Tanaka H., Tomita M., Hino R., Yoshizato K., Mizuno S., and Tamura T. (2005) A fibroin secretion-deficient silkworm mutant, *Nd-s*^{D}, provides an efficient system for producing recombinant proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 51-59.

Kojima K., Kuwana Y., Sezutsu H., Kobayashi I., Uchino K., Tamura T., and Tamada Y. (2007) A new method for the modification of fibroin heavy chain in the transgenic silkworm. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 71, 2943-2951.

Kômoto N., Kuwabara N., and Yukuhiro K. (2016) Absence of hybrids between the domesticated silkmoth, *Bombyx mori*, and the wild mulberry silkmoth, *B. mandarina*, in natural populations around sericulture farms. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 85, 67-71.

Kômoto N. (2017) Behavior of the larvae of wild mulberry silkmoth, *Bombyx mandarina*, domesticated silkworm *B. mori* and their hybrid. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, in press.

Kuwahara Y., Mori N., Yamada S., and Nemoto T. (1984) Evaluation of bombykol as the sex pheromone of *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 19, 265-267.

Matz M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L., and Lukyanov S. A. (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nature Biotechnol.*, 17, 969-973.

Mounier N. and Prudhomme J. C. (1991) Differentianl expression of muscle and cytoplasmic actin genes during development of *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 21, 523-533.

Sheng G., Thouvenot E., Schmucker D., Wilson D. S. and Desplan C. (1997) Direct regulation of *rhodopsin 1* by *Pax-6*/*eyeless* in *Drosophila*: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev.*, 11, 1122-1131.

Takiya S., Hui C.-c., and Suzuki Y. (1990) A contribution of the core-promoter and its surrounding regions to the preferential transcription of the fibroin gene in posterior silk gland extracts. *EMBO J.* 9, 489-496.

Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Kômoto N., Thomas J.-L., Mauchamp B., Chavancy G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme, J.-C., and Couble P. (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a *piggyBac* transposon-derived vector. *Nature Biotechnol.*, 18, 81-84.

Thomas J.-L., Da Rocha M., Besse A., Mauchamp B., and Chavancy G. (2002) 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 247-253.

Yukuhiro K., Iwata K., Kômoto N., Tomita S., Itoh M., and Kiuchi M. (2012a) Nucleotide sequences of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I (COI) gene show clear differences between the domesticated silkmoth *Bombyx mori* and the wild mulberry silkmoth *Bombyx mandarina* from Japan. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 81, 29-35.

Yukuhiro K., Sezutsu H., Tamura T., Kosegawa E., Iwata K., Ajimura M., Gu S.-H., Wang M., Xia Q., Mita K., Kiuchi M. (2012b) Little gene flow between domestic silkmoth *Bombyx mori* and its wild relative *Bombyx mandarina* in Japan, and possible artificial selection on the *CAD* gene of *B. mori*. *Genes Genet. Syst.*, 87, 331-340.

Yukuhiro K., Kuwabara N., and Kômoto N. (2016) Pheromone dose and set height of pheromone traps for efficient collection of wild mulberry silkmoths, *Bombyx mandarina*. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, in press.

飯塚哲也・行弘研司（2007）野外におけるカイコ遺伝子拡散の可能性評価手法の開発.　遺伝子組換え生物の産業利用における安全性確保総合研究（プロジェクト研究成果シリーズ447）, 100-102.

植田吉純（2006）カイコを利用した動物用医薬品の生産.　蚕糸・昆虫バイオテック　75, 129-130.

樺沢敦・瀬戸川喜多夫（1956）起蚕の絶食生命時数に及ぼす温湿度の影響及び起蚕体重並びに体重減耗率との関係について.　茨城県蚕業試験場報告　14, 20-24.

川口栄作（1934）単性生殖蚕の遺伝学的並に細胞学的解析.　日本蚕糸学雑誌　5, 1-20.

河原畑勇（1998）クワコとカイコ．文部省科学研究費補助金基盤研究(A) (2)研究成果報告書（別冊）課題番号：07406004.

神崎亮平（1993）性フェロモン源への雄蛾の定位行動.　植物防疫　47, 19-24.

小泉二郎・松田洋子（1960）蚕座における蚕児の水平移動.　蚕糸研究　36, 3-12.

小泉二郎・塩見昭男・小針洋子（1962）家蚕における羽化の早晩と産卵速度.　蚕糸研究　40, 7-10.

河本夏雄・津田麻衣・岡田英二・飯塚哲也・桑原伸夫・瀬筒秀樹・田部井豊（2014）遺伝子組換えカイコの飼育における生物多様性影響の評価手法の構築.　蚕糸・昆虫バイオテック　83, 171-179.

児玉彌曾衛（1927）家蚕と野蚕の交配.　佐久良会雑誌　21, 59-64.

蚕糸・絹業提携支援センター（2015）シルクレポート、41.

下田みさと・金勝廉介（2016）カイコ幼虫の歩行距離と野外での生存の可能性.　蚕糸・昆虫バイオテック　85, 145-151.

高見丈夫（1969）蚕種総論、全国蚕種協会

竹内孝三（1954）四眠交雑種から発現した三眠蚕について.　日本蚕糸学雑誌　23, 83-88.

中村隆・伴野豊・河口豊（1997）カイコとクワコとの間における生殖隔離の程度．九州蚕糸　28, 30.

日本蚕糸学会編（1992）蚕糸学入門、大日本蚕糸会

野村菊太郎（1926）蚕児の飢餓及減食に関する試験.　衣笠蚕報　241, 305-313.

伴野豊・中村隆（1999）クワコをめぐる最近の話題(3)　－外部形態・染色体－．野蚕（Wild Silkworm News）37、6-7.

福田紀文（1979）総合蚕糸学、日本蚕糸新聞社

普後一（1982）カイコガの羽化行動とそのホルモン制御.　　日本蚕糸学雑誌　51, 523-527.

見波定治・大場治男（1939）桑蚕と家蚕との交雑種に就て.　　衣笠蚕報　394, 71-82.

村上聡・岩松琢磨・北村優・北澤裕太・片田美幸・藤森遼・横山岳・蜷木理（2010）カイコの成虫生存期間の分布に関する系統間差異.　　蚕糸・昆虫バイオテック　79, 53-59.

森精　編著（1995）カイコと教育・研究、サイエンスハウス

横山桐郎（1929）最新日本蚕業害虫全書、明文堂

平成 20 年度蚕業に関する参考統計、農林水産省