

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

高染色性絹糸生産カイコ(改変 *Fibroin H, Bombyx  
mori*) (GCS500、中 515 号 × GCS500、GCS508、中 517 号 ×  
GCS508)

令和2年6月18日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課

# 目 次

	頁
1 . 第一種使用規程の承認申請に係る審査の結論 . . . . .	1
2 . 審査の概要 . . . . .	2
審査参考資料	
資料 1 . 第一種使用規程承認申請書 . . . . .	8
資料 2 . 第一種使用等による飼育等要領 . . . . .	10
資料 3 . モニタリング計画書 . . . . .	14
資料 4 . 緊急措置計画書 . . . . .	21
資料 5 . 審査データの概要 . . . . .	26

Most of the summaries and evaluations contained in this report are based on unpublished proprietary data submitted for registration to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan. A registration authority outside of Japan should not grant a registration on the basis of an evaluation unless it has first received authorization for such use from the owner of the data submitted to the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan or has received the data on which the summaries are based, either from the owner of the data or from a second party that has obtained permission from the owner of the data for this purpose.

# 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(以下、農研機構という。)より、令和2年1月17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があった以下に掲げる「高染色性絹糸生産カイコ」(改変*FibroinH, Bombyx mori*) (GCS500、中515号×GCS500、GCS508、中517号×GCS508)(以下、本遺伝子組換えカイコといい、系統名は「」書きで表記することとする。)の4種について、生物多様性影響評価を行った。

(繭生産系統の親系統): 「GCS500」, 「GCS508」

(繭生産系統<sup>1</sup>): 「中515号×GCS500」, 「中517号×GCS508」

本遺伝子組換えカイコは、生糸の染料の吸着性を高めるため、カイコの主要な繊維タンパク質を産生するフィブロインH鎖遺伝子のうち、グリシン及びアラニンの繰返し配列をコードする領域をグリシン及びグルタミン酸の繰返し配列をコードする合成遺伝子に置換した。これにより、グルタミン酸の側鎖が酸性になり、染料分子と結合し易く、染色性が高まることが確認されている。また、オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)由来の改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子(*EGFP*)の上流に昆虫の眼で特異的に発現する3xP3プロモーター<sup>2</sup>の配列を接続した。これにより、選抜マーカーとして本遺伝子組換えカイコの胚、幼虫、蛹、成虫の眼で緑色蛍光を生じさせる。

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
令和2年1月17日	第一種使用規程承認申請受理	
令和2年2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	非公開
令和2年3月11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
令和2年3月26日	学識経験者からの意見提出	
令和2年6月18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。

<sup>1</sup> 近親交配(同一系統の交配)に起因する品質低下を防ぐ等の目的で、繭を生産する系統では、親系統と別の実用品種を掛け合わせている。本申請では、非組換えカイコの実用品種である中515号<sup>5</sup>、中517号<sup>6</sup>を使用している。

<sup>2</sup> 人工的に合成された3xP3をキイロショウジョウバエ由来の熱ショックタンパク質 *hsp70* 遺伝子のプロモーターに結合させ、作成したプロモーター (Tamura *et al.*2001; Thomas *et al.*, 2002)

## 2. 審査の概要

本遺伝子組換えカイコは、次の 及び の目的遺伝子を *piggyBac* 転移因子を利用した形質転換法<sup>3</sup>により宿主である中 514 号<sup>4</sup>に導入し、G1 世代を作出した。

改変フィブロイン H 鎖遺伝子カセット; 絹糸を構成する主要な繊維タンパク質を産生するカイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子を改変している。グリシン及びアラニンの繰返し配列をコードする領域を、グリシン及びグルタミン酸の繰返し配列をコードする合成遺伝子に置換した遺伝子カセット

オワンクラゲ由来の改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*EGFP*) 発現カセット;  
オワンクラゲ由来の *EGFP* の上流に昆虫の眼で特異的に発現する 3xP3 プロモーター<sup>1</sup>を接続した遺伝子カセット

の発現により、繊維タンパク質に組み込まれたグルタミン酸の側鎖が酸性になり、染料分子と結合し易く、染色性が高められた生糸を産生する。 の発現により、選抜マーカーとして眼が緑色蛍光を呈することで、非遺伝子組換えカイコとの区別を可能としている。なお、目的遺伝子である改変フィブロイン H 鎖遺伝子は、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のみ発現するように設計されている。

作出された G1 世代は、眼で発現する緑色蛍光により選抜され、選抜個体間で兄妹交配した後代から目的遺伝子を持つ繭生産系統の親系統「GCS500」を確立した。さらに中 515 号<sup>5</sup>と「GCS500」との交配種「中 515 号 × GCS500」について、「中 515 号 × GCS500」の兄妹交配を繰返して、極細の織度の形質に育成した目的遺伝子を持つ親系統「GCS508」を確立した。

繭生産系統としては、絹糸に極細の織度の実用形質を導入し、近交弱勢による諸形質の低下を防ぐ目的で、中 515 号と「GCS500」との交配種「中 515 号 × GCS500」を育成するとともに、中 517 号<sup>6</sup>と「GCS508」との交配種「中 517 号 × GCS508」を育成した。なお繭生産系統では、採卵し継代しない。

本遺伝子組換えカイコ「GCS500」及び「中 515 号 × GCS500」において、改変フィブロイン H 鎖遺伝子発現カセット及び 改変型緑色蛍光タンパク質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がサザンハイブリダイゼーション

<sup>3</sup> *piggyBac* 転移因子 (イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni*) 由来) の機能を利用し、目的遺伝子を導入する形質転換法である。具体的には *piggyBac* 転移因子を 2 つに分割し、2 種類のプラスミド (ドナープラスミド及びヘルパープラスミド) を作成した。この 2 種類のプラスミドを同時にカイコの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 回のみ転移酵素を産生。これによりドナープラスミド中の末端配列に挿入さ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形質を転換する。

<sup>4</sup> 非遺伝子組換えカイコである。極細織度系統を作出する目的で複数実用品種を交配して育成した二化性 (1 年に 2 世代経過する品種) の中国種系統の実用品種であり (山本ら, 1999) 幼虫体色は白色、斑紋はメスで着色する。繭は白色で楕円形である。

<sup>5</sup> 非遺伝子組換えカイコである。極細織度の特性を維持しながら多糸量の方向に改良した一化性の中国種系統の実用品種であり (山本ら, 1999) 幼虫体色は白色、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で浅縊 (くびれの浅い) 短俵形である。

<sup>6</sup> 非遺伝子組換えカイコである。中 515 号に MC100 (長糸長品種) を交配して得られた後代から細織度形質がよく反映されたものを選抜し、後代 3 世代以上を経て固定した実用品種 (岡田ら, 2016) 幼虫体色は白色、斑紋は雌で着色し、繭は白色で楕円形である。

法により確認されている。また、これら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 RT-PCR により確認されている<sup>7</sup>。よって、「中 515 × GCS500」間の兄妹交配を繰り返して選抜し確立した「GCS508」についても、導入遺伝子はそれぞれ1コピーが染色体上に挿入され、安定して伝達されていると考えられる。また同じく、「GCS508」に、中 517 号を交配して得られた「中 517 号 × GCS508」についても、導入遺伝子はそれぞれ1コピーが染色体上に挿入され、安定して伝達されていると考えられた。

以上を踏まえ、育成した本遺伝子組換えカイコに関して、(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

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。我が国では長年飼育されてきた歴史があり、同じく桑を食する近縁野生種であるクワコと比べても、カイコは、幼虫時の移動能力が低く、成虫は飛翔できず、白色の体色で野鳥等に捕食されやすいなどの自然条件下での生育・繁殖において不利な性質を有していることから、クワコに対する競合において優位性を示すことはない。

カイコ由来改変フィブリン H 鎖遺伝子は、生糸の染色性を高めるために、グリシン及びアラニンの繰返し配列をコードする領域を、グリシン及びグルタミン酸の繰返し配列をコードする合成遺伝子に置換したものである。繊維タンパク質に組み込まれたグルタミン酸の側鎖により染料分子と結合し易くしているが、改変フィブリン H 鎖は繊維タンパク質であり、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はなく、幼虫の運動性や捕食性を変化させたり、成虫に飛翔能力を付与したり、繁殖能力を高めたりすることはないと考えられた。

改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子は、選抜マーカーとして 3xP3 プロモーター<sup>1</sup>の制御下で発現させることにより、本遺伝子組換えカイコの眼でのみ緑色蛍光を発現するが、産生されたタンパク質は、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おらず、幼虫の運動性や捕食性を変化させたり、成虫に飛翔能力を付与したり、繁殖能力を高めたりすることはないと考えられた。

本遺伝子組換えカイコ「中 515 号 × GCS500」と非遺伝子組換えカイコ 中 515 号 × 中 514 号 との間で生理学的及び生態学的特性を比較したところ、幼虫体重(2 齢期)・繭重、繭層重及び産卵数については、本遺伝子組換えカイコが統計学的に有意に小さく、幼虫体重(3 齢期 ~ 5 齢期)・産卵範囲・孵化歩合・営繭率・幼虫の行動範囲については、本遺伝子組換えカイコ「中 515 号 × GCS500」と非遺伝子組換えカイコ 中 515 号 × 中 514 号 との間で統計学的な有意差は認められなかった。このことから、非遺伝子組換えカイコと比べて、幼虫初期の生育能力や繁殖能力は低くなるが、競合の優位性に影響するとは考えられない。

幼虫期間については、遺伝子組換えカイコが、非遺伝子組換えカイコと比べて雌雄

<sup>7</sup> 5 齢幼虫の絹糸腺から全 RNA を抽出した。フィブリン H 鎖遺伝子に挿入した改変領域をプローブとして用いた。各世代全ての遺伝子組換えカイコで同程度に検出された。

ともに短く、両者の間には、統計学的に有意に差があった。しかしながら、目視で確認しながら上蔭<sup>8</sup>させる飼育方法であるため、幼虫期間が短いことで上蔭時期が早まったとしても、幼虫の成長に伴い飼育器から散失することを防ぎ、繭を作らせ、予期せぬ成虫の発生を防ぐことができるため、本遺伝子組換えカイコの競合における優位性を高めるとは考えられない。

また申請のあった本遺伝子組換えカイコ「GCS500<sub>11</sub>」、「GCS508」、「中 515 号 × GCS500<sub>11,2</sub>」「中 517 号 × GCS508」について、比較対象である非遺伝子組換えカイコ 8 系統との間で生理学的及び生態学的特性について検討を行った。<sup>9</sup>

その結果、「GCS508」の繭層重及び「中 517 号 × GCS508」の孵化歩合が非遺伝子組換えカイコ 8 系統よりも統計学的に有意に低くかった。また、「GCS508」の幼虫期間及び営繭率が非遺伝子組換えカイコ 8 系統より低い値を示した。「GCS508」の繭層重は極細の織度が関係していると考えられた。「中 517 号 × GCS508」の孵化歩合は他の試験では低い数値を示さなかったことから、導入した遺伝子の発現によるものではないと考えられた。したがって、これらの差異が本遺伝子組換えカイコ「GCS508」及び「中 517 号 × GCS508」の競合における優位性を高めるとは考えられない。幼虫期間については、目視で確認しながら上蔭させる飼育方法であるため、幼虫期間が短いことで上蔭時期が早まったとしても、幼虫の成長に伴い飼育器から散失することを防ぎ、繭を作らせ、予期せぬ成虫の発生を防ぐことができるため、本遺伝子組換えカイコの競合における優位性を高めるとは考えられない。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの競合における優位性が高められたとは考えられず、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

カイコの幼虫は与えられた桑葉のみを摂食し、桑葉以外の植物や昆虫等を摂食することとはなく、成虫は摂食や飲水は一切行わない。

本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に絹糸腺で改変フィブロイン H 鎖タンパク質を、眼で改変型緑色蛍光タンパク質を発現するが、これらタンパク質は捕食性を変化させる機能を有しておらず、本遺伝子組換えカイコの捕食性が変化することはないと考えられた。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの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

カイコは、我が国では長年飼育されてきた歴史を有するが、これまでに野生動植物等の生息又は生育に悪影響を及ぼす有害物質を産生したとの報告はない。

本遺伝子組換えカイコで産生される改変フィブロイン H 鎖タンパク質及び改変型緑色蛍光タンパク質は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ないこ

<sup>8</sup> カイコが食桑を止め生糸を吐き始める 5 齢後期に、専用容器で繭を作る体制を執ること。

<sup>9</sup> 遺伝的背景に近い実用品種である非遺伝子組換えカイコ 8 系統<sup>9</sup>（中 514 号、中 515 号、中 516 号、中 517 号、MC100、中 515 号 × 中 514 号、中 516 号 × 中 517 号及び日 137 号 × 支 146 号）を比較対象として使用した。飼育及び試験は、研究における第二種使用等として拡散防止措置が執られた条件下で行った。

とから、本遺伝子組換えカイコを捕食する野生動物等への影響も考えられない。また、これらタンパク質は酵素活性を有しておらず、宿主の代謝系に作用して、新たな有害物質を産生することはないと考えられた。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコの有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

#### (4)交雑性

我が国には、カイコと交雑可能な近縁野生種としてクワコが生息している。影響を受ける可能性のある野生動植物としてクワコが特定された。

本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交雑によって、その後、当該雑種が繁殖して、本遺伝子組換えカイコに導入した改変 *Fibroin H* 鎖遺伝子及び *EGFP* 遺伝子がクワコ集団に浸透・定着する可能性が考えられた。

カイコとクワコはいずれもメス成虫が放出する性フェロモンは同一である。カイコのオス成虫に飛翔能力はなく、交尾のために飛翔能力のあるクワコのメス成虫に接近できないため、自然環境下ではカイコのメス成虫が放出した性フェロモンにクワコのオス成虫が誘引されて交尾する可能性が考えられた。

しかし、以前に養蚕が行われていた地域を中心として全国各地で捕獲したクワコのオス成虫の母親由来であるミトコンドリア *cox1* 遺伝子型(7,708 頭)や核ゲノム *CAD* 遺伝子型(1,019 頭)などを解析した結果において、カイコからクワコへの遺伝子流入は見つからなかった。このことから、近年では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考えられた。

上記の要因としては、次の 、 の調査により、自然環境下で野生動物によってカイコが捕食される可能性が考えられた。

2012 年に実施した農研機構の敷地内の、桑畑から 100m 以上離れた地点での調査では、屋外で飼育したカイコの 4 齢幼虫 500 頭と 5 齢幼虫 800 頭のすべてが鳥や昆虫に捕食され、カイコのメス成虫 200 頭を屋外に置いた場合の調査では、アリ類による攻撃を受けて体が分断されることなどによりすべてが死亡した。

また、2015 年に実施した農研機構の敷地内での調査では、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幼虫(1 齢幼虫 2964 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。このことから鳥等に捕食されたと推定された。

以上のことから、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た。よって、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。

上記を踏まえ、今回新たに申請された、「GCS500」及び「GCS508」(いずれも繭生産系統の親系統)、並びに「中 515 号 × GCS500」及び「中 517 号 × GCS508」(いずれも繭生産系統)について(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 つの項目について影響を受ける可能性のある野生動植物等は特

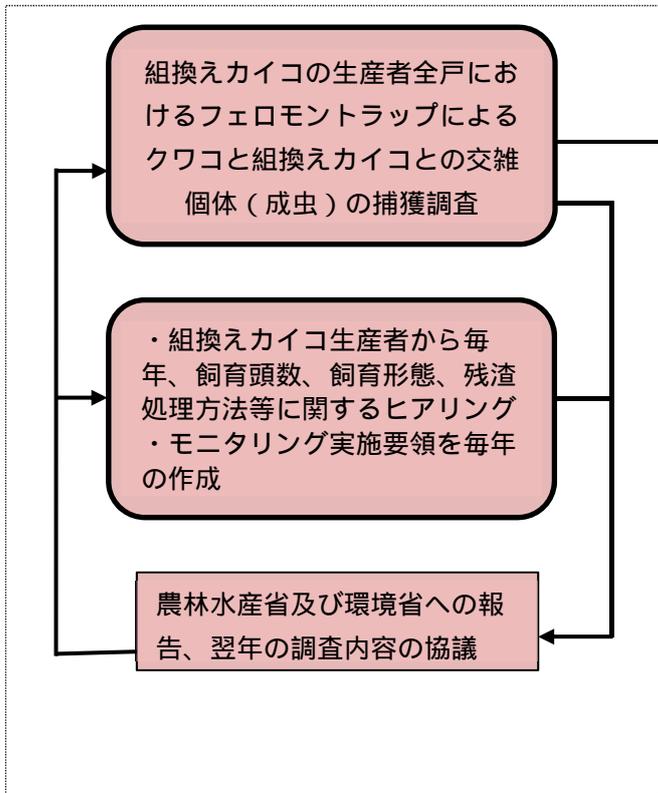
定されず、競合における優位性、捕食性、有害物質の産生性、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

以上総括すると、今回の承認申請のあった本遺伝子組換えカイコにおける各系統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の影響が生ずるおそれはないと判断した。

なお、第一種使用規程の使用等の方法では、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に従って、飼育管理を徹底することとしている。

また、繭生産系統の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を確認された場合は、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(P6図参照)。

## モニタリング計画書



## 緊急措置計画書

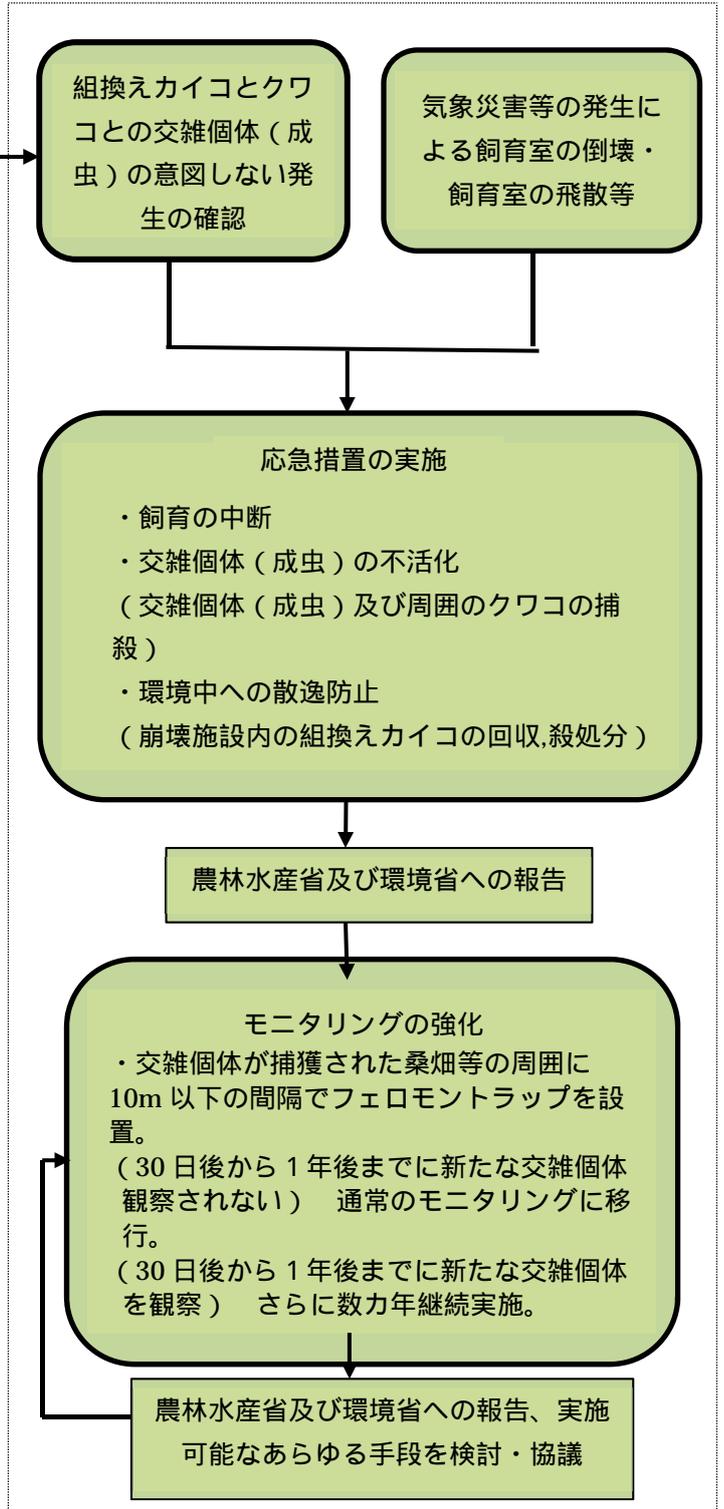


図 モニタリング計画書と緊急措置計画書の関係について

**< 審查參考資料 >**

## 資料1. 第一種使用規程承認申請書

### 第一種使用規程承認申請書

令和2年1月17日

農林水産大臣 江藤 拓 殿  
環境大臣 小泉 進次郎 殿

氏名 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
申請者 理事長 久間 和生 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

<p>遺伝子組換え生物等の種類の名称</p>	<p>高染色性絹糸生産カイコ（改変 <i>Fibroin H</i>、<i>Bombyx mori</i>）（GCS500、中 515 号×GCS500、GCS508、中 517 号×GCS508）</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>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。</p>

## 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

高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H, Bombyx mori*）（GCS500、中 515 号×GCS500、GCS508、中 517 号×GCS508）（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に、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、上蔭時等、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に、口を縛ることができる布製の繭袋等を用い、繭を入れる前に破れ目がないことを確認する。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 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（一般的な養蚕農家を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簇を用いる。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

飼育容器中の桑の枝を動かす際などは、カイコの幼虫が飼育容器から出ないように注意する。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。幼虫の飼育中は三眠蚕が発生していないか注意し、三眠蚕は廃棄する。繭を形成させるために幼虫を回転簇に移す際は時期を適切に判断する。

幼虫の飼育中及び繭の形成中に生育不良の幼虫や三眠蚕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簇から 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

## 資料 2. 第一種使用等による飼育等要領

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、管理する期間は、最終の上蔟日から 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に係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、入退室以外は出入り口を閉め切る。
- 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（115℃から 60℃まで 6 時間程度かけて乾燥するなど、一般的な方法）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

## 資料 2. 第一種使用等による飼育等要領

囲を確認してこぼれ落ちた繭を回収する。なお、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し、本遺伝子組換えカイコの繭が非遺伝子組換えカイコの繭に混入した場合は、すべてを本遺伝子組換えカイコの繭として処理する。

### (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では、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既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

令和 2 年 1 月 17 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 久間 和 生

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。

(令和 2 年 1 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 昆虫制御研究領域長
	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 新産業開拓研究領域 新特性シルク開発ユニット長
	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 新産業開拓研究領域 カイコ機能改変技術開発ユニット
	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 研究推進部 研究推進室

## (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：高染色性絹糸生産カイコ (改変*Fibroin H*, *Bombyx mori*) (GCS500、中515号×GCS500、GCS508、中517号×GCS508) (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るれば、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るれば、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<sup>(注) 1</sup>

### (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、クワコ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）1mg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0.3～2.3m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

<sup>1</sup>（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。

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

モニタリング実施要領には、モニタリング実施者、モニタリング実施場所、フェロモントラップの設置場所、実施時期及び手順等を詳細に記載するものとする。

モニタリング実施要領の作成に当たり、クワコの生息調査の結果、最新の科学的知見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、モニタリング実施者に対し、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)

Yukuhiko 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 を実施する。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 を実施する。緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（HC-EGFP ぐんま（ぐんまとの交配後代を含む。） HC-EGFP200（200 との交配後代を含む。） HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP200、HC-EGFP ぐんま×200、ぐんま×HC-EGFP）と区別する場合は、フィブロイン H 鎖遺伝子に挿入した改変領域を検出するプライマーを用いた PCR を実施する。

## 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。緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（HC-EGFP ぐんま（ぐんまとの交配後代を含む。） HC-EGFP200（200 との交配後代を含む。） HC-EGFP ぐんま×HC-EGFP200、HC-EGFP ぐんま×200、ぐんま×HC-EGFP）と区別する場合は、検出した DNA シグナルのサイズで判断する。

### 資料3. モニタリング計画書

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

高染色性絹糸生産カイコ（改変*Fibroin H*、*Bombyx mori*）(GCS500、中515号×GCS500、GCS508、中517号×GCS508)（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。

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）

（未発表データを含むため部外秘）

## 資料4 . 緊急措置計画書

## 緊急措置計画書

令和2年1月17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 久間和生  
 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高染色性絹糸生産カイコ（改変*Fibroin H*、*Bombyx mori*）（GCS500、中515号×GCS500、GCS508、中517号×GCS508）（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。

(令和2年1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 昆虫制御研究領域長
	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 新産業開拓研究領域 新特性シルク開発ユニット長
	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 新産業開拓研究領域 カイコ機能改変技術開発ユニット
	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 研究推進部 研究推進室

## 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）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4mm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。）の結果から上蔭後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齢幼虫が上蔭するまで1週間程度の期間を要すると考えられることから、管

#### 資料4 . 緊急措置計画書

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蔭後 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。

3) 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 10m 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に定めるとおりとする。

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。

## 資料4 . 緊急措置計画書

### (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、農研機構リスク管理部実験管理室を通じて、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。

(個人名・所属は個人情報のため非開示)

(令和 2 年 1 月現在)

委員長	
(業務管理責任者)	生物機能利用研究部門 昆虫制御研究領域長
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 先進昆虫ゲノム改変ユニット
	生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 新特性シルク開発ユニット長
	生物機能利用研究部門 新産業開拓研究領域 新素材開発ユニット
	生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室
	生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室 医農工連携調整 役
	本部 管理本部 藤本・大わし管理部安全衛生管理室
	本部 リスク管理部 実験管理室長
	生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域 組換え作物技術 開発ユニット
	本部 広報部広報課
	遺伝資源センター 保存技術・情報チーム
	本部 管理本部 技術支援部 中央技術支援センター つくば第6 業務科長
	群馬県蚕糸技術センター 主席研究員
	群馬県蚕糸技術センター 蚕糸研究係長
	本部 企画戦略本部 新技術対策室
	生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域長
	生物機能利用研究部門 研究推進部 研究推進室

## 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：カイコガ科 カイコガ属 カイコガ (カイコ) (江崎ら, 1971; 小池ら, 2002)

英名：silkworm

学名：*Bombyx mori* (Linnaeus, 1758)

###### ロ 宿主の品種名又は系統名

###### ① 中 514 号

極細繊維度系統を作出する目的で支 143 号と支 25 号とを交配して育成した後代に、CS31 (広食性系統) や中 511 号 (細繊維度系統) を交配して育成した二化性の中国種系統の実用品種であり (山本ら, 1999)、幼虫体色は白色、斑紋はメスで着色し、オスでは着色しない。繭は白色で楕円形である。現在、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。) で維持・保存されている。中 514 号と中 515 号との交配後代は、極細繊維度蚕品種「はくぎん」として用いられている (農林水産省農産園芸局, 1998; 山本ら, 1999)。中 514 号に遺伝子を導入し、遺伝子組換えカイコ (GCS500) を作出した。

###### ② 中 515 号

支 25 号から選抜した後代の中から、極細繊維度の特性を維持しながら多糸量の方向に改良した一化性の中国種系統の実用品種であり (山本ら, 1999)、幼虫体色は白色、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で浅縊短俵形である (現在、農研機構で維持・保存されている。遺伝子組換えカイコ ([中 515 号×GCS500]、GCS508 及び [中 517 号×GCS508]) の育成過程で使用している。

###### ③ 中 516 号

中 514 号と中 515 号との交配後代 ( $F_1$ ) を兄妹交配して  $F_2$  を作り、その中から 2d を下回る極細繊維度を示す蛾区を選抜して育成した中中固定種の実用品種であり、幼虫体色は白色、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で楕円形であるが、浅縊短俵形が混ざることもある。現在、農研機構で維持・保存されている。なお、中 516 号×中 517 号は極細繊維度品種「白麗」として一般に飼育されている (岡田ら, 2016)。

## ④ 中 517 号

中 515 号に MC100 を交配して得られた後代から細織度形質がよく反映されたものを選抜し、後代 3 世代以上を経て固定した中中固定種の実用品種であり(岡田ら, 2016)、幼虫体色は白色、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で楕円形であるが、稀に浅縊短俵形が混ざる。現在は、農研機構で維持・保存されている。遺伝子組換えカイコ([中 517 号×GCS508])の育成過程で使用している。

## ⑤ MC100

満月と漢口赭繭との交配後代から、長い繭糸長を主な目的に個体選抜して育成した長糸長品種である。一化性の中中固定種である。現在は、農研機構で維持・保存されている。繭は白色の楕円形で、稀に浅縊短俵形が混ざる。

## ⑥ 日 137 号

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所が育成した二化性の実用品種であり、幼虫体色は白色、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で浅縊短俵形である。現在は、農研機構で維持・保存されている。日 137 号と支 146 号との交配後代  $F_1$  は、繭が大きく繰糸が容易で安定した品質の繭を作る(農林水産省農蚕園芸局, 1989)。

## ⑦ 支 146 号

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所が育成した二化性の実用品種であり、幼虫体色は白色、斑紋はメスで着色し、オスでは着色しない。繭は白色で楕円形である。現在、農研機構で維持・保存されている。日 137 号と支 146 号との交配後代  $F_1$  は、繭が大きく繰糸が容易で安定した品質の繭を作る(農林水産省農蚕園芸局, 1989)。

## ハ 国内及び国外の自然環境における生息状況

カイコガ科 *Bombyx* 属は、カイコ<sup>1</sup> (*B. mori*)、クワコ (*B. mandarina*、カイコと祖先を共有すると考えられている野生種)、インドクワコ (*B. huttoni*) など数種が含まれる(吉武, 1988; 河原畑, 1998; Xia *et al.*, 2009)。カイコは、我が国に伝播した時代には、すでに自然環境下での生息能力を欠如していたとされており、我が国において野外に逃げ出して野生化したり、自然環境下で生息したりしている例は報告されていない。なお、カイコと交雑可能なクワコは、自然環境下で生息し、極東ロシア、中国、台湾及び朝鮮半島に分布している。我が国では各地に分布するが、薩南諸島の小宝島以南、沖縄諸島、及び先島諸島には分布しない(河原畑, 1998; 廣森, 2001; 金井ら, 2013)。クワコの幼虫

<sup>1</sup> 標準和名は「カイコガ」とされ、「カイコ」は幼虫の名称であるが、一般的には「カイコ」が種全般を指すことから、本情報では変態後も含めこの種全般を「カイコ」と表す。

は、カイコと同様に、クワ科のクワ (*Morus spp.*) の葉を食べるため、桑園または野生桑樹に生息していると考えられる (大門, 2014)。

## (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

人類がカイコの繭を利用し始めたのは中国において新石器時代 (紀元前 7000~6000 年頃) からと言われ、養蚕の起源と考えられている。養蚕技術とカイコは、中国から西方、東方、南方へと伝えられ、日本には弥生時代 (紀元前 300~紀元 300 年) に伝来したと考えられている (日本蚕糸学会, 2002)。中国から東西の交易に伴い、東南アジア、ヨーロッパ、日本等世界各地に広がったカイコは、それぞれの地域に適応した固有の品種へと分化し、多くの中国種、日本種、欧州種、熱帯種等地理的蚕品種が形成された (吉武, 1988)。

明治時代以降、我が国の基幹産業として生糸輸出が順調な伸びを示し、養蚕業の最盛期となった 1930 年には、国内農家の 40% で養蚕が行われ、収繭量は史上最大の 40 万トンに達した。しかし近年は、生糸価格の低迷、養蚕農家の後継者不足等により養蚕が衰退し、2019 年の収繭量は 110 トンにまで減少している (大日本蚕糸会, 2007, 2020; 農林水産省生産局生産流通振興課, 2009; 鶴井ら, 2010)。

### ロ 主たる生産地域、生産方法、流通実態及び用途

世界の生糸生産は長期的には増加傾向にあるが、近年は安定的に推移している。流通実態としては、カイコの繭の生産と生糸の消費地は少数の国に集中している (范, 2013)。

2015 年の世界全体のカイコの繭生産量は、84 万トンであり、このうち中国で 63 万トン、インドで 16 万トン、ウズベキスタンで 3 万トン、イランで 1 万トン及びタイで 5 千トンが生産され、我が国は 135 トンの生産量であった (大日本蚕糸会, 2018)。近年の我が国の主な繭の生産地は、群馬県、福島県、栃木県等である (大日本蚕糸会, 2019)。絹織物及び絹製品の消費は、アメリカ、日本、インド、西欧、中東等の先進国や主要貿易国に集中している (范, 2013)。

### ハ 国内における養蚕を目的とした飼育の現状

カイコは桑葉のみを摂食する狭食性の昆虫であり、桑 (もしくは桑を原料とした人工飼料) 以外の植物では十分に成長できない。良質の繭を多く生産するためには、新鮮な桑葉を給与する必要があることから、桑葉の貯蔵は 1 日程度が普通である。したがっ

て、養蚕では通常、大量の桑葉の入手可能な時期で、かつカイコが正常に発育できる 20℃から 30℃の気温で推移する 5 月中旬～10 月中旬までが飼育期間とされている（鶴井ら, 2010; 日本蚕糸学会, 2002）。

糸繭生産用のカイコの飼育には、強健に生育し、繭も均一な「一代雑種（単交雑）」や、4 種類の原種から 2 段階の交配を経て得られる「四元雑種（複交雑）」等が用いられる。それら実用品種の育種のための遺伝資源として、国内では、農業生物資源ジーンバンク（農研機構）及びナショナルバイオリソースプロジェクトにおいて、それぞれ 650 以上及び 450 以上の品種・系統が保存されている（農業生物資源ジーンバンク, 2018; ナショナルバイオリソースプロジェクト, 2018）。

カイコは必ず屋内で飼育される。カイコの飼育には目的は 2 つあり、1 つは飼育したカイコの成虫から卵を得て、それを販売するための蚕種製造である。もう 1 つは、カイコが繭になるまで飼育し、得られる繭を販売する養蚕業である。近年の日本での養蚕は、共同飼育所で人工飼料により 1 齢から 3 齢の幼虫（稚蚕）のみを飼育する稚蚕飼育と、そこから幼虫の分譲を受けて農家で 4 齢から 5 齢の幼虫（壮蚕）のみを飼育する壮蚕飼育とに分業化している。さらに、養蚕農家から繭を買い取って生糸を製造する製糸業者がある（日本製糸技術経営指導協会, 1993; 加藤, 1994）。

#### ・蚕種製造

養蚕に用いられるカイコの卵（蚕種）は、通常、専門の蚕種製造業者が生産する。特定の品種を交配し、産卵させ、浸酸などの人工孵化処理を経た交雑種の蚕種を養蚕農家等に販売する。蚕種製造業者は、微粒子病<sup>2</sup>を引き起こす微胞子虫 *Nosema bombycis* の経卵伝達を防ぐため、産卵後のカイコのメス成虫が微胞子虫の胞子を保有していないかどうかを調べるための「母蛾（ぼが）検査」を行い、合格した蚕種のみを販売している（日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。

#### ・稚蚕飼育

1 齢から 3 齢の幼虫を稚蚕と呼ぶ。病原体への感受性が高い稚蚕期に、温度・湿度が管理され、清浄な飼育環境を維持できる稚蚕共同飼育所で飼育する。専従の技術者の指導の下で、複数の農家への配蚕を目的にして共同飼育を行うことが一般的である。多くの稚蚕共同飼育には桑葉育ではなく人工飼料育が導入されており、多くの養蚕農家が稚蚕共同飼育を利用している（日本蚕糸学会, 2002）。

<sup>2</sup> 母蛾が感染すると体内卵に伝染し、胞子を発芽させ、カイコの消化管から分裂、カイコの体内組織で増殖し、カイコを死滅させる。

### ・ 壮蚕飼育

4 齢から 5 齢の幼虫を壮蚕と呼ぶ。壮蚕飼育は繭質と収繭量の向上を目的とし、大部分が個別の養蚕農家の飼育施設において行われている。壮蚕は成長が盛んで食欲旺盛のため食桑量が多く、新鮮な桑葉を大量に必要とする。壮蚕は 11～14 日間程度の飼育で、食桑を止め、吐糸を開始する。吐糸直前のカイコを熟蚕という。農家は熟蚕を見極め、蔴<sup>3</sup>（まぶし）へ移す作業（上蔴、じょうぞく）を行う。上蔴から 7～8 日間程度経ったら収繭（蔴から繭を回収し毛羽<sup>4</sup>（けば）を取る作業）を行い、品種ごとに繭を区別して袋に入れ、製糸業者に出荷する（日本蚕糸学会, 2002）。

### ・ 製糸

繭から生糸を繰製する作業は製糸業者が行う。出荷された生繭を原料として生糸を作るための、乾燥（乾繭、かんけん）、保管（貯繭）、原料調整、煮繭（しゃけん）、繰糸<sup>5</sup>（そうし）等の一連の工程を経る（日本蚕糸学会, 2002）。

## （3）生理学的及び生態学的特性

### イ 基本的特性

カイコは完全変態をする昆虫であり、卵→幼虫→蛹→成虫の発育段階を経て生活環が回る（図 1）。卵には休眠卵と非休眠卵とがあり、休眠卵の状態越冬する。孵化後、成虫になるまでに 6 回の脱皮を行う。孵化後、通常のカイコ（四眠蚕）では、1 齢幼虫～5 齢幼虫までに 4 回の脱皮を行ってから熟蚕となり、やがて繭を作り始める。なお、遺伝的要因と環境要因によっては幼虫脱皮を 3 回経て熟蚕になる場合があり、これを三眠蚕と呼ぶ。実用品種を養蚕農家等が飼育する場合には、三眠蚕が生じることは稀である（日本蚕糸学会, 2002; 竹内, 1954）。

カイコは吐糸開始からおよそ 2 日で営繭を完了し、さらに 2～3 日経つと繭の中で脱皮して蛹となる。養蚕農家では繭は出荷されるが、蚕種製造業者などで、そのまま放置すれば、蛹は約 10～15 日程度経過後、早朝に脱皮（羽化）し、繭から出て成虫（蛾）となる。その後、成虫は交尾する。メス成虫は夕方から翌朝の間に 500 個前後の卵を産み、その後、何も食わずに数日で死滅する（鶴井ら, 2010）。一般の品種で通常管理を行えば、カイコの卵は休眠する。

休眠卵<sup>6</sup>を一定期間以上冷蔵保存した後に 25℃に保護するか、もしくは非休眠卵を

<sup>3</sup> カイコが繭を作るための足場にする器具。

<sup>4</sup> 繭の外側を覆っている真綿のようなものをいう。

<sup>5</sup> 繭から糸を引出し、数本をそろえて 1 本の糸にする工程をいう。

<sup>6</sup> 休眠卵は、産卵後自然温度で保護されると、約 2 日後に発生が停止する。その後は越冬して冬の低温に

25℃に保護すれば、9～12 日程度で孵化する（鶴井ら, 2010）。

中 514 号は、上蔘から羽化までの日数が 16 日程度、メス成虫 1 頭あたりの産卵数が 480 個、休眠卵を 25℃に移してから孵化するまでの日数が 12 日程度となっている（農林水産省農産園芸局, 1998）。中 515 号は、上蔘から羽化までの日数が 16 日程度、メス成虫 1 頭あたりの産卵数が 405 個、休眠卵を 25℃に移してから孵化するまでの日数が 12 日程度となっている。

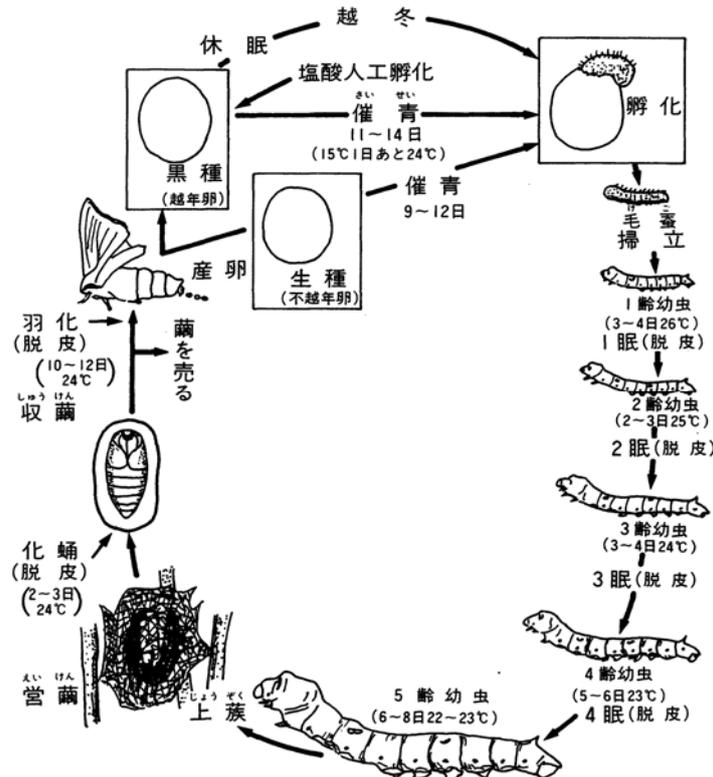


図 1. カイコの生活環

### カイコの形態

- ・卵：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）。
- ・幼虫：体長は 3 mm～85 mm。幼虫期は単眼（明暗を区別できる程度の機能を有する）が左右に 6 個ずつある。体は細長い円筒形をしており、頭部、胸部及び腹部に区別される。胸部には 3 対の胸脚、腹部には 4 対の腹脚と 1 対の尾脚、1 個の尾角がある。
- ・成虫：翅を広げた時の幅はオスで約 40 mm、メスで約 45 mm。複眼（視界がはっきり

一定期間晒されてから、春にならなければ孵化しない。人工越冬や産卵 1 日後の塩酸への浸漬（即時浸酸法）等の人為的処理で人工孵化できる。

り見える機能を有する) が左右に 1 個ずつある。全身が鱗毛で覆われ、メスは特に腹部がオスより大きい。

楕形(くしがた)の触角があり、オスの触角はメスより大きい。また、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羽ばたきはするが飛ぶことができないため、胸脚を用いて歩行することで移動する。

体色は白色のものが多く、桑の幹のような褐色を呈するクワコとは異なる。

・**骨格等**：カイコは外骨格の構造を持ち、体温が周囲の温度にともなって変化する変温動物である。

・**繭**：繭の形は系統により様々で、楕円型・俵型・くびれ型などがあるほか、2 頭以上で 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・紅色・黄色・緑色・薄緑色などがある。繭の大きさは短径が約 20 mm、長径が約 30~35 mm (日本蚕糸学会, 2002; 池田ら, 2009; 鶴井ら, 2010)。

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

カイコは高度に人間に馴化された生物であり、自然環境下における生息能力をほぼ完全に欠如したほぼ唯一の動物であるとされている(森, 1995; 河原畑, 1998)。また、全齢を通じたカイコ幼虫の移動距離の調査や野外の桑園におけるカイコの各齢の放飼試験及び飼育残渣に紛れ野外の穴に放置されたカイコを想定した放飼試験の結果等から、カイコの運動能力は低く、鳥や昆虫に捕食されるため、野外での生存の可能性は極めて低いとされている(河本ら, 2014; 下田・金勝, 2016)<sup>7</sup>。

カイコは屋内で飼育され、多くの養蚕農家では、1~2 段の給桑台車が付いた広い飼育容器を使用する。カイコ幼虫を動かさないで給桑や除沙<sup>8</sup>(じょさ)等を行う平飼い飼育法が広く用いられている(鶴井ら, 2010)(図 2)。

<sup>7</sup> カイコ幼虫の移動距離の調査結果では、孵化当日の幼虫の約 70%が 50 cm 円周上まで到達できず死亡したことから孵化した幼虫が自力で桑樹へたどり着く可能性は低いと報告され、野外における放飼試験結果では、鳥や他の昆虫等に捕食され、卵から孵化した 1 齢幼虫は 3 齢まで生き残れず、4~5 齢の各幼虫は営繭まで生き残れなかった。また、野外の穴に桑とともに放置した数百頭のカイコについて成虫の発生は認められなかった。

<sup>8</sup> カイコの糞や食べ残しの桑葉などを取り除いて清潔にすること。



図 2 . 給桑台車付糸桑飼育装置による飼育

飼育環境下での温度、湿度、気流等の条件は以下のとおり。

・飼育温度

カイコは変温動物であるので、体温は周囲の気温によって上下し、温度が高くなるにつれて、一般に生理機能は盛んとなり、発育・成長が早くなる。カイコが発育する温度の範囲は 7～40℃位であるが、正常な発育ができる温度は、おおむね 20～28℃位の範囲である（福田, 1979; 日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。

・飼育湿度

湿度が 60%以下と低い場合は、桑葉が早くしおれて飼料価値が落ちる。90%以上と高い場合は、病原菌が繁殖しやすくなり、カイコの健康を害しやすい。

室温 20～28℃位の範囲では、湿度は、1～2 齢ではおおむね 85～90%が適当であり、齢が進むに連れてこれより 4～5%程度低くなり、5 齢では 70%程度が適している。

また、高温（27℃以上）・低温（20℃以下）、通風の不良、栄養条件の不良などの場合は、湿度は低い方が良いとされている（福田, 1979; 日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。

・光条件

飼育の光条件は、常に明条件または暗条件で飼うより、16 時間程度の明期と 8 時間程度の暗期を繰り返すほうが、幼虫の発育が揃うとされている（福田, 1979; 鶴井ら, 2010）。

・気流

4 齢～5 齢期では、気温が 30℃以上になった場合は、秒速 0.1～0.5m の速さで通風し、気化熱によりカイコの体温を下げる必要がある。しかし、稚蚕期には極端な高温または多湿でない限り、通風を速めて気流を強めると桑葉が早くしおれるため望ましくない（鶴井ら, 2010）。

カイコは熟蚕期に食桑を止めて、糸を吐き始める。熟蚕は繭をつくるための容器に移され（上簇）、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 個分に区切られた区画を多数連結した繭を作るための足場（簇）（図 3）を用い、熟蚕をそこに入れて繭を作らせる方法が一般的である（鶴井ら, 2010）。

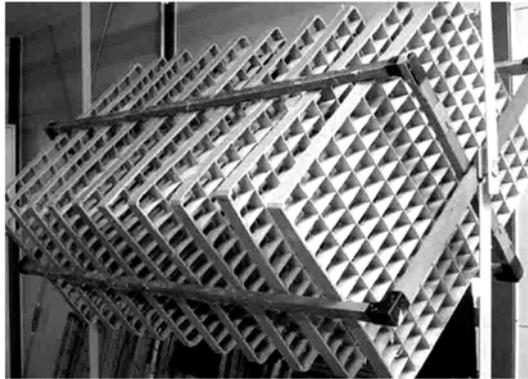


図 3 . 上簇容器（回転簇）

**[ 上簇容器に熟蚕期のカイコを登らせると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。 ]**

養蚕農家は繭の段階で出荷するため、成虫を生じさせることはなく、また養蚕農家等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速やかに乾繭（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滅する。乾繭においては、通常 120℃から 60℃に次第に下げて 5～6 時間で処理される（日本蚕糸学会, 2002）。

中 514 号及び中 515 号はともに強健で飼育取り扱いが容易であり、生息又は生育可能な環境の条件について特記する事項や飼育環境で留意する事項等はない（農林水産省農産園芸局, 1998）。

## ハ 捕食性又は寄生性

（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い。成虫は、摂食や飲水は一切しないことが知られている（日本蚕糸学会, 2002; 鶴井ら, 2010）。）

## ニ 繁殖又は増殖の様式

カイコは有性生殖を行う生物である。交尾後、メス成虫が産卵する際、オス成虫由来の精子と卵がメス体内で受精し、胚発生が開始する。

蛹からの成虫の羽化は早朝、日の出の後に一斉に起きる（普後, 1982）。成虫はメス・

オスともに飛ぶことができないが、歩行はできる。メス成虫が静止したまま、腹部末端にある誘引腺から性フェロモン（ボンビコール）を発散すると、オス成虫は触角によって性フェロモンを感知してメス成虫の位置を知り、飛ばずに羽ばたきながらメス成虫に向かって歩いて接近し、交尾に至る。放置すれば、交尾は長時間継続するため、通常は人手により約3時間程度でメスとオスを離す（「割愛」作業）。メス成虫を産卵台紙等の上に置くと、一般に夕方から翌朝にかけて産卵を行う。1頭の産卵数はおおよそ500個前後である（小泉ら, 1962; 鶴井ら, 2010）。室内での成虫の生存期間は、おおむね7～10日間で、最も長い系統で15日間との報告がある（村上ら, 2010）。

カイコの卵（蚕種）の休眠性（胚子が休眠するか否か）は、遺伝的要因と環境要因で決定する。「1化性品種」は環境要因に関係なく必ず休眠する品種を指す。2化性品種は催青（さいせい）条件（胚子発生後期の温度と光条件）によって成虫が産下する卵の休眠性が変化する品種群を指す。多化性品種は、催青条件に関係なく非休眠卵を産む品種である。1化性及び2化性品種は、催青条件の調節、卵の低温処理、塩酸浸漬などによって、孵化時期を人為的に制御することが可能である（日本蚕糸学会, 2002; 柳沼, 2015）。

なお、未交尾のメス成虫が産卵した不受精卵が、人為的刺激を与えなくても、自然単為発生によって胚発育を始めることがあるが、孵化まで達することは極めて少ない（高見, 1969）。

中514号は2化性、中515号は1化性であり、どちらも休眠卵の塩酸浸漬によって人為的に孵化させることができる（農林水産省農産園芸局, 1998）。

#### ホ 病原性

—

（カイコは、自然条件下で周囲の野生動植物の生息に影響を及ぼす病原性の発現は報告されていない。）

#### へ 有害物質の産生性

—

（カイコについては、自然条件下で周囲の野生動植物等の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

##### 【寄生バエやハチ、ネズミ等の野生生物からの捕食の可能性】

カイコに寄生す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, 2002)。その他にも、ブランコヤドリバエ (*Exorista japonica*)、カイコノクロウジバエ (*Pales pavidus*) 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、スズメバチ類、アリ類、鳥類による捕食も報告されている (横山, 1929; 河本ら, 2014)。

#### 【各種病原微生物による感染の可能性】

カイコに感染する微生物等としては、カイコ核多角体病ウイルス *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus、カイコ細胞質多角体病ウイルス *B. mori* cyovirus、カイコ伝染性軟化病ウイルス *B. mori* infectious flacherie virus、カイコ濃核病ウイルス 1 型 *B. mori* densovirus type 1、カイコ濃核病ウイルス 2 型 *B. mori* densovirus type 2 等のウイルスや、白きょう病菌・黄きょう病菌 *Beauveria bassiana*、緑きょう病菌 *Nomuraea rileyi*、黒きょう病菌 *Metarhizium anisopliae*、コウジカビ病菌 *Aspergillus* spp.等の糸状菌、細菌性軟化病の病原菌 *Enterococcus faecalis*、卒倒病の病原菌 *Bacillus thuringiensis* 等の細菌、そして微粒子病の病原体 *Nosema bombycis* 等の微胞子虫が挙げられる (日本蚕糸学会, 2002)。

#### 【非感染性物質による中毒症発生の可能性】

タバコや種々の農薬、工場から排出される煤煙中の有毒物質に対して感受性があり、これによって発生するカイコの中毒症が挙げられる (福田, 1979)。中 514 号及び中 515 号はともに強健で飼育取り扱いは容易であり、特に留意すべき病害等の報告はない。

## 2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

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 4)。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る（図 5）。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。

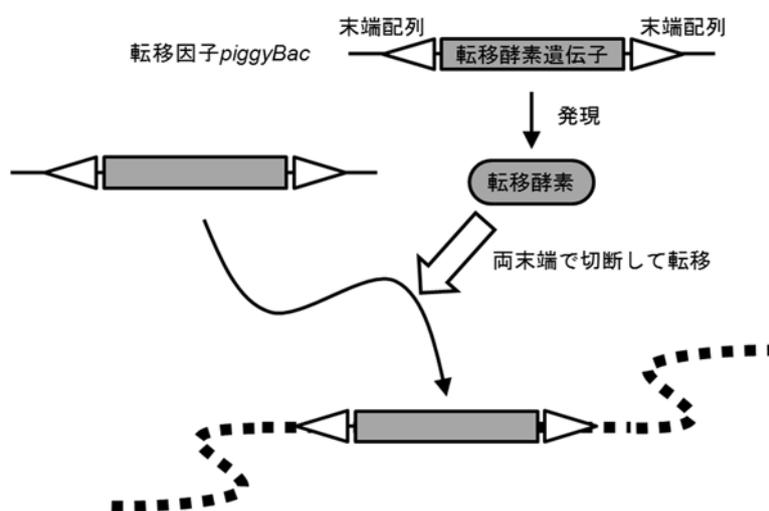


図 4 . 転移因子 *piggyBac* の働き

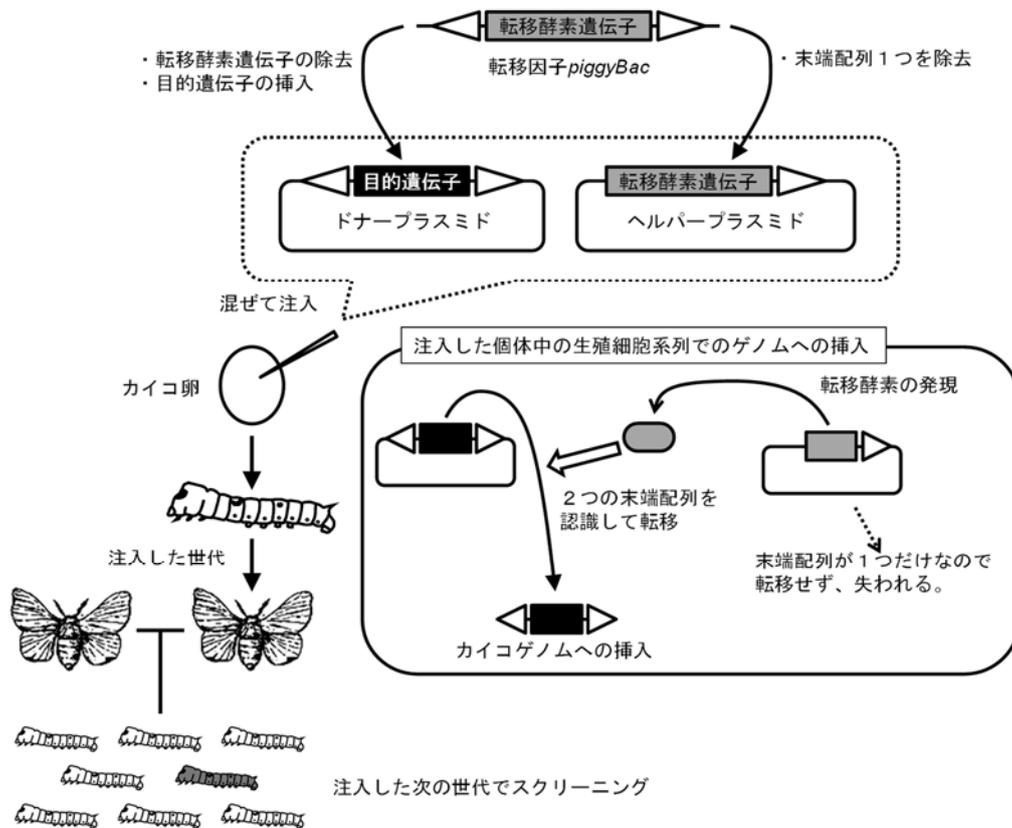


図 5 . 遺伝子組換えカイコの作出法

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 6 に、目的遺伝子の塩基配列を別添 10 に示す。

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
<b>改変フィブロイン H 鎖遺伝子発現カセット (改変 <i>Fibroin H</i> 遺伝子発現カセット)</b>		
<i>Fibroin H</i> promoter (フィブロイン H 鎖遺伝子プロモーター)	5.0 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改変 <i>Fibroin H</i> 遺伝子の転写を規定する (Kojima <i>et al.</i> , 2007)。
改変 <i>Fibroin H</i> (目的遺伝子である改変フィブロイン H 鎖遺伝子)	1.8 kb	カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のうち、グリシン及びアラニンを中心とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを、グリシン及びグルタミン酸を主に含むアミノ酸配列をコードする合成遺伝子に置換したもの (別添 10)。グルタミン酸の側鎖が酸性になる影響により生糸の染色性を高めると考えられる (別添 19)。
<i>Fibroin H</i> polyA (フィブロイン H 鎖遺伝子ターミネーター)	0.8 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 <i>et al.</i> , 2007)。
<b>緑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 AB779767 の一部)</b>		
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 ( <i>Drosophila melanogaster</i> ) 由来熱ショックタンパク質 <i>hsp70</i> 遺伝子のプロモーターに結合させたプロモーター。遺伝子の眼での転写を規定する (Berghammer <i>et al.</i> , 1999; Thomas <i>et al.</i> , 2002)。
<i>EGFP</i> (改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子)	0.7 kb	オワンクラゲ ( <i>Aequorea victoria</i> ) 由来の改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子 (クロンテック社; Yang <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子組換えカイコを選抜す

		るための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緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現する。
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)		
<i>piggyBac R</i>	1.1 kb	イラクサギンウワバ ( <i>Trichoplusia ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
<i>piggyBac L</i>	0.7 kb	イラクサギンウワバ ( <i>T. ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 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 ( <i>Escherichia coli</i> ) 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。
<i>AmpR</i>	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。

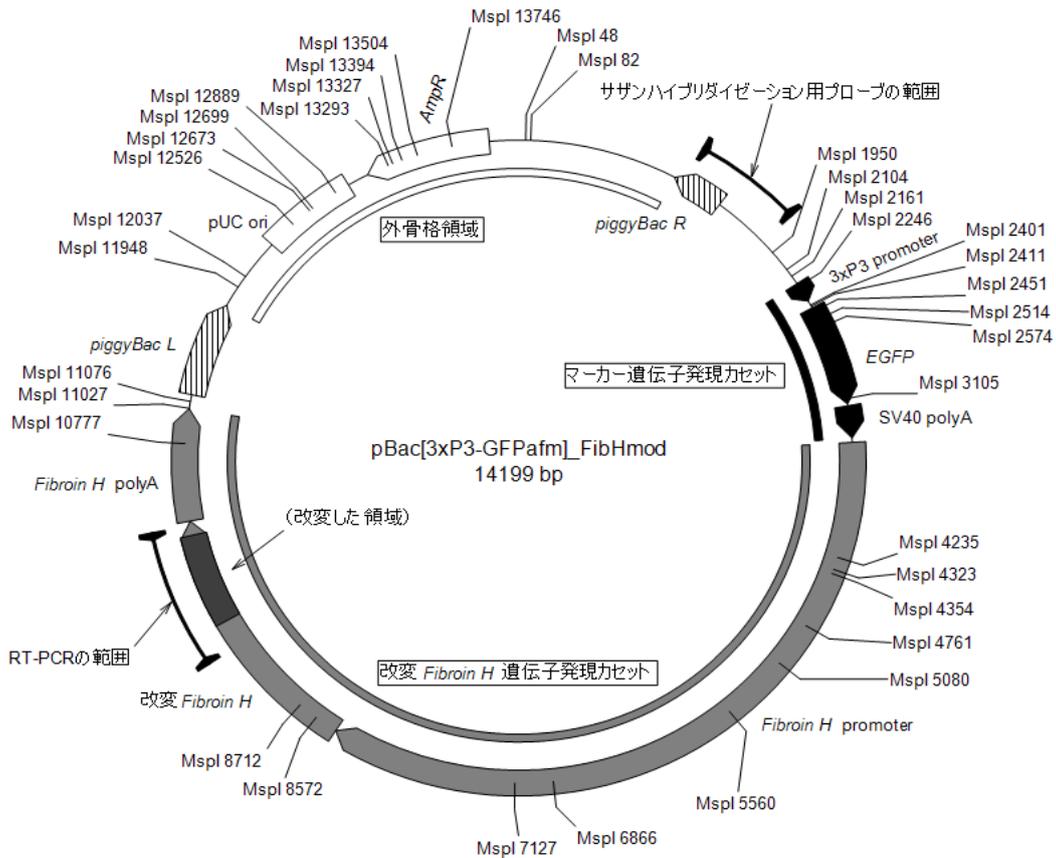


図 6 . 改変 *Fibroin H* 遺伝子導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod の構造

[ 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 7 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、緑色蛍光タンパク質発現カセット (3xP3-*EGFP*) 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-*EGFPafm*]を作製した (Horn and Wimmer, 2000)。これに、改変フィブロイン H 鎖遺伝子発現カセット (改変 *Fibroin H* 遺伝子発現カセット) を挿入して pBac[3xP3-*EGFPafm*]\_FibHmod を作製した。

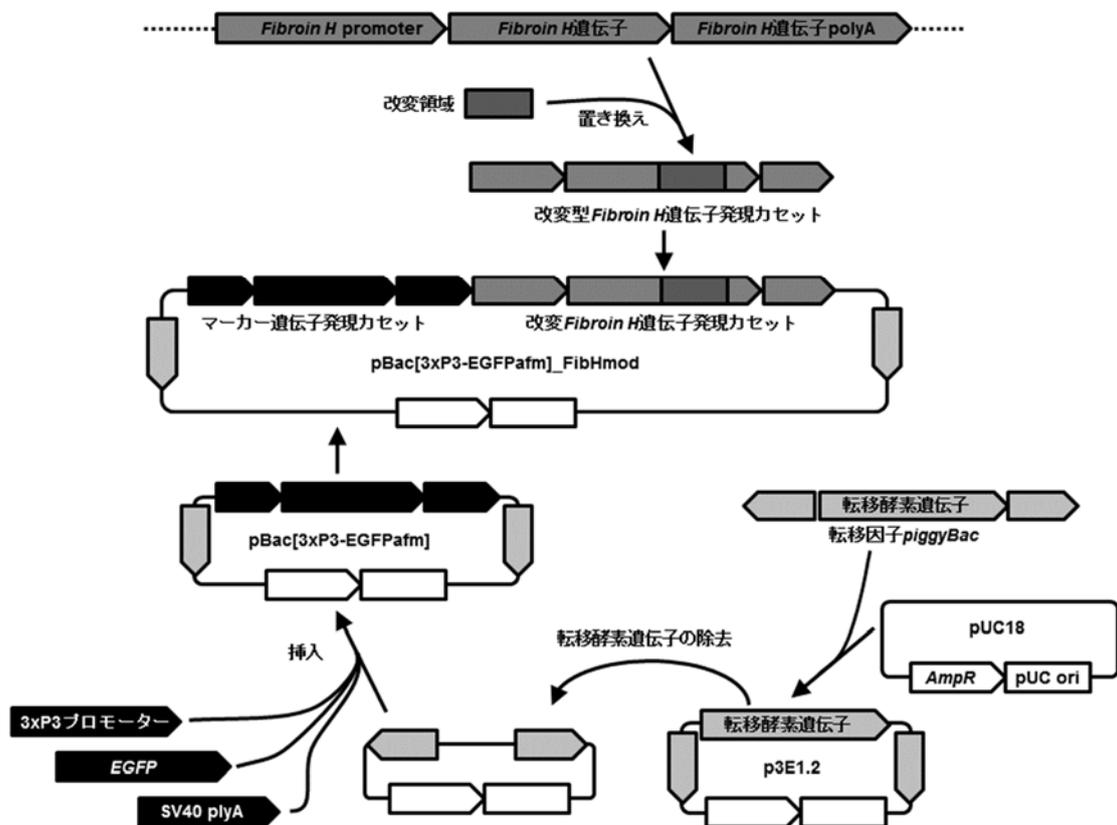


図 7 . 改变 *Fibroin H* 遺伝子の導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod の作製方法

#### ヘルパープラスミド

ドナープラスミドの *piggyBac R* と *piggyBac L* 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 5)。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、塩基配列を別添 11 に、構成の模式図を図 8 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)。
<i>piggyBac</i> transposase ( <i>piggyBac</i> 転移酵素遺伝子)	1.8 kb	イラクサギンウワバ ( <i>T. ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の転移酵素 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。 <i>piggyBac</i> 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。
<i>piggyBac R</i>	1.1 kb	イラクサギンウワバ ( <i>T. ni</i> ) 由来の転移因子 <i>piggyBac</i> の末端配列 (Cary <i>et al.</i> , 1989)。カイコゲノムへの挿入に際して、 <i>piggyBac</i> 転移酵素の認識配列として働く。
<i>AmpR</i>	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ゲノム中には挿入されない。
pUC ori	0.7 kb	大腸菌 ( <i>E. coli</i> ) 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ゲノム中には挿入されない。

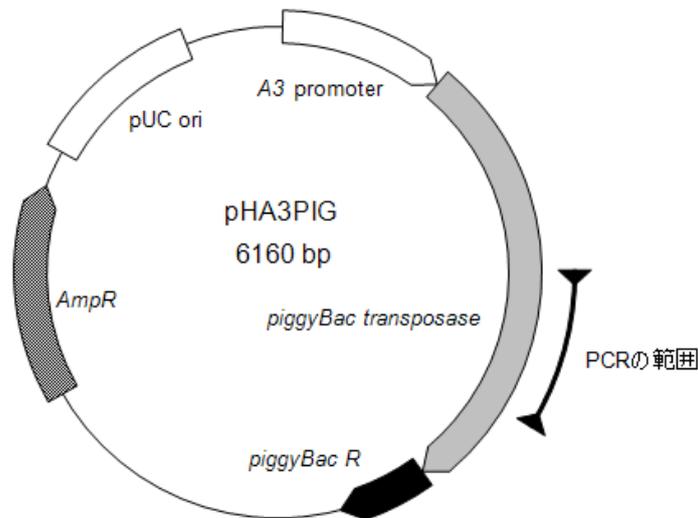


図 8 . ヘルパープラスミド pHA3PIG の構造

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

###### 【改変 *Fibroin H* 遺伝子】

目的遺伝子である改変 *Fibroin H* 遺伝子は、酸性の側鎖を持つグルタミン酸の導入により生糸の染色性を高めることを目的として、カイコ由来フィブロイン H 鎖遺伝子のうち、グリシン及びアラニンを中心とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを、グリシン及びグルタミン酸を主に含むアミノ酸配列をコードする合成遺伝子に置換している(別添 10、19)。改変 *Fibroin H* 遺伝子を発現する遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] から得られた生糸では染色性が高まっていることが確認できたほか、繭糸が、対照の非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号] (繭糸繊度 1.54 d<sup>9</sup>) と比較して細くなった (繭糸繊度 1.35 d、別添 19)。

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)。フィブロイン H 鎖に挿入したアミノ酸配列が、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

<sup>9</sup> 9,000 m あたりの重さを g で示した単位。デニール。値が小さいほど細いことを示す。

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 8 アミノ酸残基連続で一致する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。

#### 【改変型緑色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、改変型緑色蛍光タンパク質 (EGFP、クロンテック社) の眼での発現を利用した。

マーカーである改変型緑色蛍光タンパク質は、オワンクラゲ (*Aequorea victoria*、刺胞動物門・ヒドロ虫綱) 由来の緑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 8 アミノ酸残基連続で一致する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ない (図 5)。

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

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 7)。ドナープラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]\_FibHmod は、p3E1.2 に緑色蛍光タンパク質発現カセットと改変 *Fibroin H* 遺伝子発現カセットを挿入して得られた (図 7)。

ドナープラスミドの 2 つの転写因子 *piggyBac* 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 8)。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 (図 5)。

## 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-EGFPafm]\_FibHmod の塩基数は 14,199 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、外骨格領域に位置しているため、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-EGFPafm]\_FibHmod 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 8)。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ない (図 5)。

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-EGFPafm]\_FibHmod 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 6 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緑色蛍光タンパク質遺伝子の発現カセットと、目的遺伝子である改変 *Fibroin H* 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 7 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-EGFPafm]\_FibHmod (図 6) をヘルパープラスミド pHA3PIG (図 8) とともに受精卵 (胚) へ顕微注入することで移入した (図 9)。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 9)。

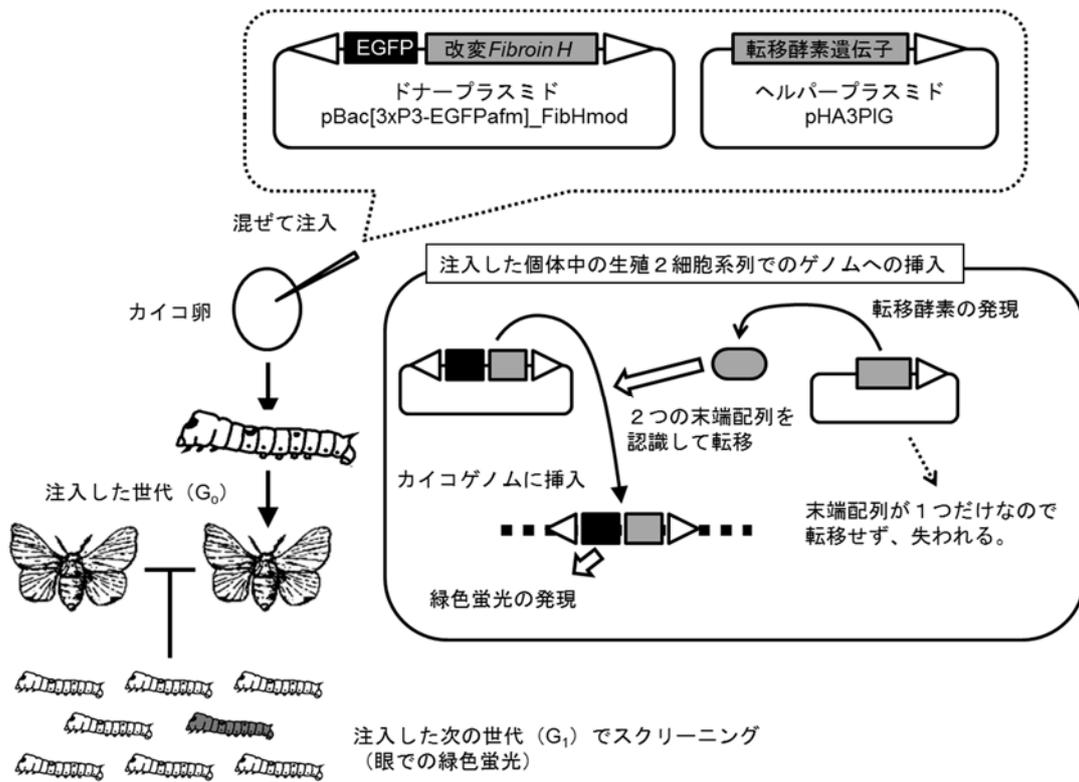


図 9 . 本遺伝子組換えカイコの作製方法

## 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-EGFPafm]\_FibHmod 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<sub>0</sub>、図 9 及び 10) を成虫まで飼育し、兄妹交配を行って産卵させた。遺伝子組換え個体は眼で緑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、眼で緑色蛍光タンパク質を発現している個体を選抜した。

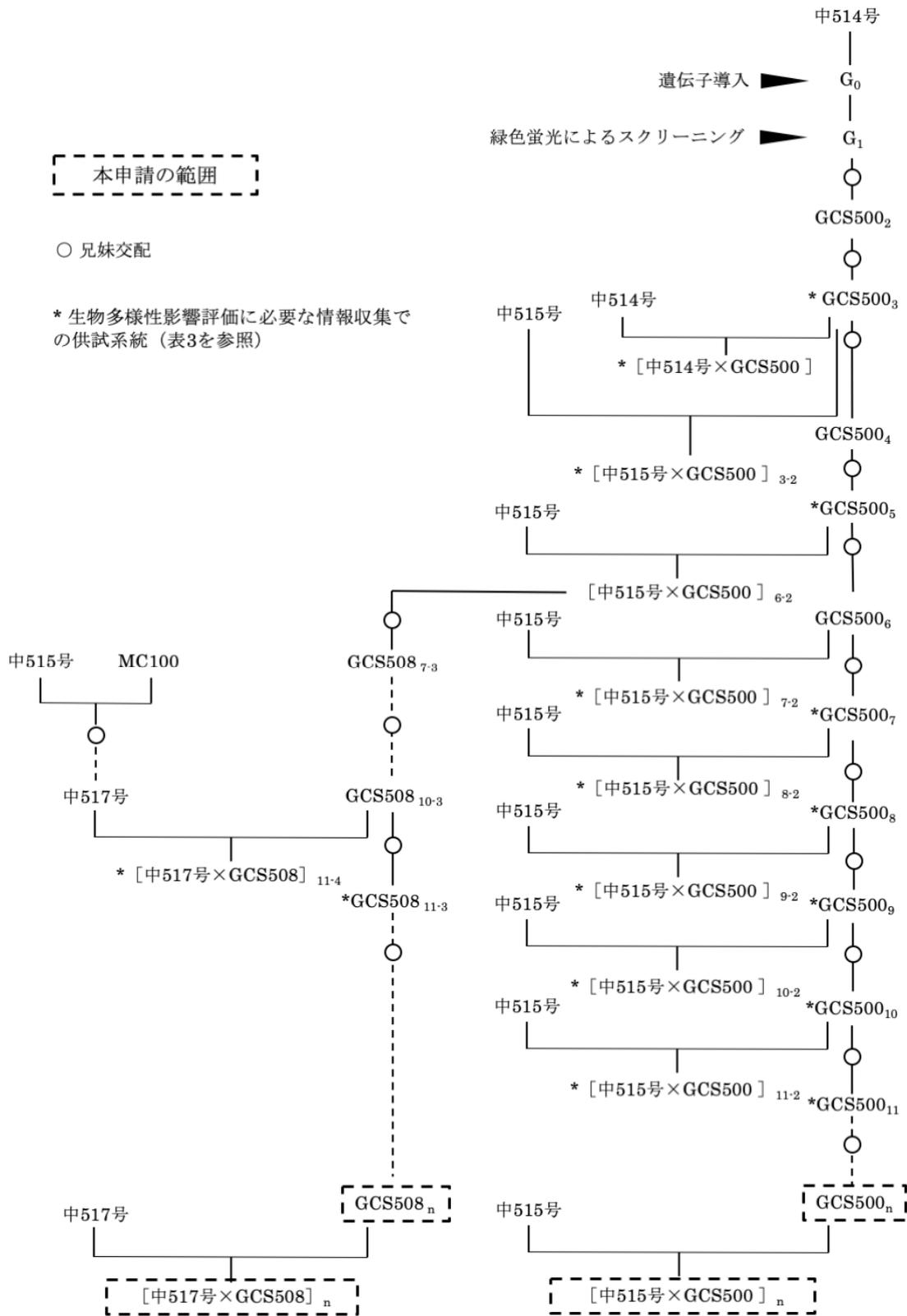


図 10 . 本遺伝子組換えカイコの育成経過と世代番号

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 10 を参照)

試験項目	飼育世代と飼育年次					
	[中 515 号 × GCS500] 3-2	GCS500 <sub>5</sub>	GCS500 <sub>7</sub>	[中 514 号× GCS500]	[中 515 号 ×GCS500] 7-2	[中 515 号× GCS500] 7-2
	2010	2012	2012	2012	2012	2014
導入した遺伝子の安定性 (サザン解析)		○	○		○	
ヘルパーの残存 (PCR)		○				
コピー数の確認				○		
遺伝子の発現状態 (RT-PCR) (SDS-PAGE)			○		○	
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) (繭糸及び生糸の特性) (幼虫の行動) (産卵行動)						○ ○ ○  ○   ○ ○
有害物質の産生性						○

試験項目	飼育世代と飼育年次				
	[中 515 号× GCS500] 8-2	GCS 500 <sub>11</sub>	GCS 508 <sub>11-3</sub>	[中 515 号× GCS500] 11-2	[中 517 号× GCS508] 11-4
	2015	2019	2019	2019	2019
導入した遺伝子の 安定性 (サザン解析)					
ヘルパーの残存 (PCR)					
コピー数の確認					
遺伝子の発現状態 (RT-PCR)  (SDS-PAGE)	○				
生理学的特性  (幼虫の体重)  (産卵数)  (孵化率)  (幼虫期間)  (営菌率)  (菌重)  (菌層重)  (菌糸及び生糸の 特性)  (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-EGFPafm]\_FibHmod 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-EGFPafm]\_FibHmod 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

遺伝子組換えカイコ GCS500<sub>5</sub> (図 10、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 8 に示す。試験の結果、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、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

旧・農業生物資源研究所 (現・農研機構) において中 514 号への遺伝子導入により遺伝子組換えカイコを作出した。眼での緑色蛍光の発現が認められる個体を選抜し、目的遺伝子を持つ GCS500 を樹立した。雑種強勢の特性を発揮するように、GCS500 に中 515 号を交配し、[中 515 号×GCS500] を育成した。GCS508 は、[中 515 号×GCS500] の兄妹交配を繰り返して樹立した。さらに、GCS508 に中 517 号を交配し、[中 517 号×GCS508] を育成した。試験には、GCS500、[中 515 号×GCS500]、GCS508 及び [中 517 号×GCS508] の他に、中 514 号との交雑個体 [中 514 号×GCS500] も用いた。育成経過を図 10、試験を実施した世代を表 3 に示す。

## (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 (GCS500<sub>3</sub>) と非遺伝子組換えカイコ (中 514 号) を交配し、得られた F<sub>1</sub> のうち幼虫の単眼での緑色蛍光を示す個体同士を兄妹交配した。次に、F<sub>2</sub> での分離を幼虫の単眼での緑色蛍光により調査したところ、陽性個体と陰性個体が 3:1 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)。

#### 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、遺伝子組換えカイコの複数の世代（GCS500<sub>5</sub>、GCS500<sub>7</sub>及び[中 515 号×GCS500]<sub>7,2</sub>）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、遺伝子組換えカイコのすべての個体から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、遺伝子組換えカイコの複数の世代（GCS500<sub>7</sub>及び[中 515 号×GCS500]<sub>7,2</sub>）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 *Fibroin H* 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、すべての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眼の緑色蛍光がいずれの世代でも安定して発現していることを確認している。なお、繭層中の改変フィブロイン H 鎖タンパク質の量は内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の量の 200 分の 1 程度であった（別添 16）。

#### (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 14 に示したサザンハイブリダイゼーションにより、遺伝子組換えカイコの複数の世代（GCS500<sub>7</sub>及び[中 515 号×GCS500]<sub>7,2</sub>）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  $\mu$ g 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、遺伝子組換えカイコを検出することが可能である。加えて、別添 15 に示した RT-PCR 用のプライマーを用いた場合、遺伝子組換えカイコを検出することが可能であると思われる。

## (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、生糸の染色性を高めることを目的として、導入された改変 *Fibroin H* 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。産生された改変 *Fibroin H* 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改変 *Fibroin H* 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緑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、成虫の眼で緑色蛍光を生じさせる。

改変 *Fibroin H* タンパク質は、繊維タンパク質であり、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。また、改変型緑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

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 及び非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号] の生理学的及び生態学的特性を調査・比較した。幼虫の体重、繭重及び繭層重、幼虫期間、幼虫の行動、産卵行動及び産卵数の調査では、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。それ以外の調査においては、全齢を桑葉で飼育した。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、3 年間、農研機構 (計 8 回) と群馬県蚕糸技術センター (計 7 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 (図 11, 別添 28)。

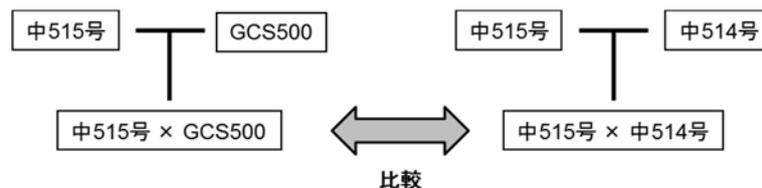


図 11 . 隔離飼育区画での試験における生理学的・生態学的特性を比較する対象

加えて、遺伝子組換えカイコ（GCS500<sub>11</sub>、GCS508<sub>11-3</sub>、[中 515 号×GCS500]<sub>11-2</sub> 及び [中 517 号×GCS508]<sub>11-4</sub>）及び非遺伝子組換えカイコ（中 514 号、中 515 号、中 516 号、中 517 号、MC100、[中 514 号×中 515 号]、[中 516 号×中 517 号]、[日 137 号×支 146 号]）の生理学的及び生態学的特性を研究における第二種使用等として制御された条件下で飼育して、追加試験を行った（別添 29）。産卵数、孵化率、幼虫期間、営繭率、繭重及び繭層重の調査では、全齢にわたり桑葉で飼育した。追加試験に用いた非遺伝子組換えカイコの 8 系統は、遺伝子組換えカイコの 4 系統と同様に実用品種であり、また、当該試験に用いた遺伝子組換えカイコと遺伝的背景が近いため、比較対象として用いた。[中 515 号×GCS500]<sub>11-2</sub> は、隔離飼育区画で用いた系統と世代が異なること並びに飼育条件が異なることから、追加試験に用いた。

### ① 形態の特性

#### 遺伝子組換えカイコ：[中 515 号×GCS500] の場合

幼虫の各齢期の初めの摂食前に体重を調査したところ、孵化直後と 2 齢期に遺伝子組換えカイコは非遺伝子組換えカイコより体重が軽く、2 齢期には統計学的な有意差が認められたが、その他の齢期では統計学的な有意差は認められなかった（別添 17、 $P > 0.1$ ）。

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）を比較するため、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて雌雄ごとに計測したところ、繭重及び繭層重は遺伝子組換えカイコのほうが雌雄ともに小さく、統計学的な有意差が認められた（別添 18、 $P < 0.001$ ）。一般的に、細織度のカイコ品種は繭重及び繭層重が低いことがあり、遺伝子組換えカイコの繭重及び繭層重の低下は、繭糸織度と関係している可能性があると思われた。

繭糸織度は遺伝子組換えカイコで 1.35 d、非遺伝子組換えカイコで 1.54 d であり、遺伝子組換えカイコのほうが細く、統計学的な有意差が認められた（別添 19、 $P < 0.01$ ）。生糸の強度は遺伝子組換えカイコで 5.14 g/d、非遺伝子組換えカイコで 4.89 g/d であり、遺伝子組換えカイコのほうが 5% 高く、統計学的な有意差が認められた（別添 19、 $P < 0.01$ ）。生糸の強度は、複数の繭から引いた繭糸をまとめて一定の織度になるように繰糸した上で計測する。今回の計測に用いた 27 d の生糸では、生糸 1 本当当たりの繭糸の平均本数は遺伝子組換えカイコで 20.0 本、非遺伝子組換えカイコで 17.5 本であり、遺伝子組換えカイコのほうが 14% 多いことになる。従って、遺伝子組換えカイコのほうが生糸の強度が高いとしても、繭糸 1 本当あたりでは強度が低くなると考えられる。

繭色は、遺伝子組換えカイコも非遺伝子組換えカイコも白色であり、繭形はどちらも

楕円であった。

生糸の染色性については、ローダミンまたはフラビンどちらで染色した場合でも、遺伝子組換えカイコのほうが非遺伝子組換えカイコに比べて L 値が低く、より濃く染まっていた（別添 19、どちらも  $P < 0.01$ ）。

#### 遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508] の場合

遺伝子組換えカイコの幼虫の体重は測定していないが、飼育中に観察した遺伝子組換えカイコのすべての系統の幼虫の大きさは、非遺伝子組換えカイコと大きな違いは見られなかった。繭重では、遺伝子組換えカイコ系統のうち、GCS508 が雌雄ともに一番低い値を示したが、非遺伝子組換えカイコ系統と比較したところ、系統や雌雄によって統計学的な有意差の有無が混在することから、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であると考えられた（別添 29）。

繭層重では、遺伝子組換えカイコ系統のうち、GCS508 の値が雌雄ともに一番低く、非遺伝子組換えカイコのすべての系統の値と統計学的な有意差は認められた（別添 29）。一般的に、細織度のカイコ品種は繭重及び繭層重が低いことがあり、GCS508 の繭重及び繭層重の低下は、繭糸織度と関係している可能性がある。実際に、遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] の繭糸は細いことから、GCS508 についても同様に繭糸織度が低いと思われた。繭色については、すべての遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコの系統で白色の楕円であった。

## ② 生育の特性

#### 遺伝子組換えカイコ：[中 515 号×GCS500] の場合

受精卵のうち幼虫が孵化する割合である孵化歩合（孵化率）を調査したところ、遺伝子組換えカイコは 91.2%、非遺伝子組換えカイコは 96.6%となり、統計学的な有意差は認められなかった（別添 20、 $P = 0.053$ ）。

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幼虫期間として調査したところ、メスでは、遺伝子組換えカイコは 26.3 日、非遺伝子組換えカイコは 26.6 日、オスでは、遺伝子組換えカイコは 25.7 日、非遺伝子組換えカイコは 26.0 日であり、雌雄ともに遺伝子組換えカイコのほうが 0.3 日短かった（別添 21、メスで  $P < 0.01$ 、オスで  $P = 0.012$ ）。なお、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。

遺伝子組換えカイコは、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。

**遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508] の場合**

GCS508 及び [中 517 号×GCS508] の孵化歩合は 77.2%及び 70.2%と低く、[中 517 号×GCS508] の孵化歩合は非遺伝子組換えカイコのすべての系統の値と統計学的な有意差が認められた（別添 29）。しかしながら、その他の遺伝子組換えカイコ系統（GCS500 及び [中 517 号×GCS508]）の孵化歩合は低下していないことから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、GCS508 は育成過程で兄妹交配が繰り返されており、孵化歩合に近交弱勢が表れた可能性が考えられたが、選抜育種で原種の維持は可能であり、蚕種製造には問題がない。

幼虫期間については、GCS508 が 22.92 日であり（別添 29）、非遺伝子組換えカイコ系統よりも 1～2 日ほど短かったが、その他の遺伝子組換えカイコ系統（GCS500、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508]）では、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であることから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、GCS508 は育成過程で兄妹交配が繰り返されており、幼虫期間に近交弱勢が表れた可能性が考えられたが、選抜育種で原種の維持は可能であり、蚕種製造には問題がない。

③ 生存能力

**遺伝子組換えカイコ：[中 515 号×GCS500] の場合**

営繭率を調査したところ、遺伝子組換えカイコが 97.5%、非遺伝子組換えカイコが 96.6%であった。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 22、 $P = 0.88$ ）。

**遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508] の場合**

GCS508 の営繭率は非遺伝子組換えカイコ系統よりも低く、80.0%であったが（別添 29）、その他の遺伝子組換えカイコ系統（GCS500、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508]）の営繭率は、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であることから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、GCS508 は育成過程で兄妹交配が繰り返されており、営繭率に近交弱勢が表れた可能性が考えられたが、選抜育種で原種の維持は可能であり、蚕種製造には問題がない。

④ 運動能力

**遺伝子組換えカイコ：[中 515 号×GCS500] の場合**

幼虫が移動する範囲を比較するため、半径 18 cm の円形の枠の中心に 5 齢幼虫を 1 頭ずつ置き、12 時間後に元の位置からの距離を計測した。遺伝子組換えカイコの平均は 2.9 cm、非遺伝子組換えカイコの平均も 2.9 cm となって、統計学的な有意差は認められなかった（別添 23、 $P = 0.29$ ）。

**遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508] の場合**

これらの遺伝子組換えカイコ系統（GCS500、GCS508 及び [中 517 号×GCS508]）の運動能力に関する試験は行っていないが、飼育中に観察したところ、遺伝子組換えカイコのすべての系統の幼虫は、飼育容器から這い出すことはなく、遺伝子組換えカイコの移動範囲には、非遺伝子組換えカイコと違いは認められなかった。このことから、これらの遺伝子組換えカイコ系統（GCS500、GCS508 及び [中 517 号×GCS508]）の運動能力は、[中 515 号×GCS500] 及び [中 515 号×中 514 号] の試験結果と大きく違いは認められないことが考えられた。

⑤ 繁殖様式

**遺伝子組換えカイコ：[中 515 号×GCS500] の場合**

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 18 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。遺伝子組換えカイコの平均は 531 個、非遺伝子組換えカイコの平均は 736 個となって、遺伝子組換えカイコのほうが少なく、統計学的な有意差が認められた（別添 24、 $P < 0.001$ ）。

メス成虫の産卵行動を比較するため、産卵数の調査に合わせて、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 18 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、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとで産卵する範囲に統計学的な有意差は認められなかった（別添 25、 $P = 0.085$ ）。

**遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508] の場合**

産卵数について、GCS508 が 307.8 個と最も少なく、GCS500 は 564.0 個と最も多かったが（別添 29）、非遺伝子組換えカイコ系統と比較したところ、系統によって統計学的な有意差の有無が混在することから、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であり、導入した遺伝子の発現に起因するものではないと考えられた。

遺伝子組換えカイコ系統（GCS500、GCS508 及び [中 517 号×GCS508]）のメス成虫

の産卵行動に関する試験は行っていないが、飼育中に観察したところ、メス成虫が飼育容器から這い出すことはなく、遺伝子組換えカイコの産卵行動は、非遺伝子組換えカイコと違いは認められなかった。このことから、遺伝子組換えカイコ系統（GCS500、GCS508 及び [中 517 号×GCS508]）の産卵行動は、[中 515 号×GCS500] 及び [中 515 号×中 514 号] の試験結果と大きく違いは認められないことが考えられた。

#### ⑥ 脱皮・変態・休眠等

2016 年から 3 年にわたって隔離飼育区画において [中 515 号×GCS500] 及び [中 515 号×中 514 号] をそれぞれ 24 万及び 13 万頭を飼育したところ、3 眠蚕（幼虫脱皮：3 回）の発生率はそれぞれ 0.4%（1055 頭）及び 0.3%（380 頭）であり、ほとんど 3 眠蚕は発生しなかった（別添 28）。

第二種使用等の条件下で GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 及び [中 517 号×GCS508] をそれぞれ 200 頭飼育した際は、3 眠蚕は発生しなかった。これらのことから、すべての遺伝子組換えカイコ系統の幼虫脱皮の回数は、基本的に 4 回であり、非遺伝子組換えカイコと同様の脱皮・変態であった。

また、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して得られた卵は休眠であった。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、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、遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] と非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号] 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 28）。

##### a) 幼虫の飼育

養蚕農家の飼育段階において遺伝子組換えカイコ及び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、2016 年 7 月から 2018 年 9 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 2,800～9,950 頭、非遺伝子組換えカイコ 3,056～9,958 頭）、2016 年 7 月から 2018 年 9 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 7 回（1 回あたり飼育室 2 棟の合計で遺伝子組換えカイコ 5,888～11,967 頭、非遺伝子組換えカイコ 5,864～11,965 頭）の比較調査を実施した（別添 28 【調査方法】）。

いずれの隔離飼育区画においても、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、遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 2,800~9,950 頭のうち 0~4 頭 (0~0.04%)、非遺伝子組換えカイコで飼育数 3,056~9,958 頭のうち 0~2 頭 (0~0.02%) であった (別添 28【結果】A (1))。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、遺伝子組換えカイコで 0~2 頭 (0~0.03%)、非遺伝子組換えカイコで 0~4 頭 (0~0.1%) であった (別添 28【結果】A (1))。

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 室あたり遺伝子組換えカイコの比較用試験区で飼育数 4,774~5,986 頭のうち 0 頭 (0%)、遺伝子組換えカイコの繭生産用試験区で飼育数 16,836~24,000 頭のうち 0~1 頭 (0~0.006%)、非遺伝子組換えカイコで 5,674~5,984 頭のうち 0~1 頭 (0~0.02%) であった (別添 28【結果】B (1))。また、熟蚕期には、遺伝子組換えカイコで 0 頭、非遺伝子組換えカイコで 0~1 頭 (0~0.002%) であった (別添 28【結果】B (1))。

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、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認められなかった。

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、遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 2,800~9,950 頭のうち 0~870 頭 (0~14%)、非遺伝子組換えカイコで飼育数 3,056~9,958 頭のうち 0~317 頭 (0~5.2%) であった (別添 28【結果】A (1))。

三眠蚕が特に多かったのは 2017 年 7 月であり、それ以外の 2016~2018 年の 7 回の飼育試験では、遺伝子組換えカイコで 0~5 頭 (0~0.2%)、非遺伝子組換えカイコで 0~19 頭 (0~0.6%) であった。2017 年 7 月は遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコのどちらも三眠蚕が多くなった。この飼育期は、3 齢の終わりの頃 (3 回目の脱皮の前の状態) にカイコを隔離飼育区画に搬入しており、この日の室温が特に高かった (35.8℃)。また、その翌日も、脱皮が完了して 4 齢になった幼虫の割合が低く、搬入から 2 日後になって 4 齢の給桑を開始していることから、3 齢の終わりで飼料の供給を停止する時期が早すぎたと言える。幼虫期の高温接触や飼料の状況が影響して三眠蚕

が発生しやすくなることが知られており（高見、1969）、この飼育期の状況が三眠蚕の発生に影響したと考えられる。さらに、隔離飼育区画内の空気の循環が不十分で、飼育容器が置かれている場所によって室温にむらがあった可能性があり、そのために遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとで三眠蚕の発生率に違いが生じたものと考えられた。また、この飼育期は、繭を形成した個体の割合が遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコのどちらも低くなっており（別添 28【結果】A (2)）、隔離飼育区画に搬入後の飼育環境の影響でその後の生育が不良になったと考えられた。なお、いずれの場合も、成虫の発生には至らなかったことから、仮に三眠蚕が発生しても、蚕室内で遺伝子組換えカイコの成虫が生じる可能性はきわめて低いと考えられる（別添 28【結果】A (3)）。

群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画においては 1 回・1 室あたり遺伝子組換えカイコの比較用試験区で飼育数 4,774～5,986 頭のうち 0～80 頭（0～1.3%）、遺伝子組換えカイコの繭生産用試験区で飼育数 16,836～24,000 頭のうち 0 頭、非遺伝子組換えカイコで 5,674～5,984 頭のうち 0～21 頭（0～0.35%）であった（別添 28【結果】B (1)）。2018 年 7 月には、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコのどちらも三眠蚕が発生した。幼虫期の高温接触が影響して三眠蚕が発生しやすくなることが知られており（高見、1969）、この飼育期は日中には室温が 37℃を超えるなど例年になく気温が高かったことから、三眠蚕が発生する要因になったと考えられた。また、次の「b）繭の形成」で述べるように、この飼育期は、繭を形成した個体の割合が他の飼育時期に比べて遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコのどちらも大幅に低くなっており（別添 28【結果】B (2)）、異常高温によって生育が不良であったことがわかる。ただし、同時期に同じ隔離幾区画で飼育試験を実施した青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（*HC-Sirius*、*Bombyx mori*）及びその対照の非遺伝子組換えカイコでは、繭を形成した個体の割合は同様に低かったものの、三眠蚕はほとんど発生しなかったことから、飼育条件等が三眠蚕の発生に与える影響が宿主の遺伝的背景によって異なった可能性がある。なお、いずれの場合も、成虫の発生には至らなかったことから、仮に三眠蚕が発生しても、蚕室内で本遺伝子組換えカイコの成虫が生じる可能性はきわめて低いと考えられる（別添 28【結果】B (3)）。

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 0～2 頭、クワコの繭が 0～5 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（別添 28【結果】A (1)）。

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 0～8 頭、クワコの繭が 0～7 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 0～3 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（別添 28【結果】B (1)）。本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が交尾したとしても、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蔭（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蔭を行った。

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蔭の中で繭を形成したのは、遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 2,800～9,950 頭のうち 1,577～8,238 頭（46.6～82.8%）、非遺伝子組換えカイコで飼育数 3,056～9,958 頭のうち 1,552～8,564 頭（47.3～83.0%）であった（別添 28【結果】A (2)）。一方、蔭の下に幼虫が落ちて繭を作ったのは、遺伝子組換えカイコで 46～3,001 頭（1.4～30.3%）、非遺伝子組換えカイコで 13～2,938 頭（0.4～29.6%）、天井から蔭を懸垂している器具を伝って蔭の上に幼虫が登って繭を作ったのは、遺伝子組換えカイコで 0～19 個（0～0.3%）、非遺伝子組換えカイコで 0～7 頭（0～0.07%）であった（別添 28【結果】A (2)）。蔭の下に落ちた幼虫が特に多かったのは、2018 年 5 月と 7 月であり、遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコで同じ傾向を示したことから、カイコが熟蚕になって蔭に移すのに適した個体が最も多くなる時間が上蔭日の夜になっていて、蔭に幼虫を移す時期がやや早かったことが考えられた。なお、蔭に移すのが早かったカイコが落下しても、再び蔭に移せば繭を形成する機会が多いので、農家ではそのようにしているが、農研機構の隔離飼育試験では落下したカイコの総数を調査しているため、蔭から落下する個体が多くなる傾向がある。

群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画では、蔭から落下した幼虫や蔭を吊るす器具を上がっている幼虫を毎日回収して健全な幼虫は蔭に戻し、生育不良の幼虫は廃棄するという方法で蔭を作らせており、蔭の中に蔭を形成したのは、1回・1室あたり遺伝子組換えカイコで飼育数 4,774~5,986 頭のうち 516~5,439 頭 (8.6~91.2%)、非遺伝子組換えカイコで 5,674~5,984 頭のうち 2,805~5,358 頭 (46.9~92.4%) であった (別添 28【結果】B (2))。蔭の上に蔭を作ったのは、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 (別添 28【結果】B (2))。蔭の中に蔭が形成された割合が低かったのは 2018 年 7 月であり、日中には室温が 37℃を超えるなど例年になく気温が高く、上蔭の前までの飼育中に死亡して蔭収穫時の調査に残らなかった個体が特に遺伝子組換えカイコで多く、パイプハウス蚕室で 73%、プレハブ蚕室で 65%に達したことが影響したものと考えられる。

また、これら上蔭の過程において、飼育室内で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、カイコの蔭が残り、飼育残渣が野外に廃棄される際に当該蔭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碎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、飼育残渣の蔭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蔭の数は、遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 2,800~9,950 頭のうち 0~21 頭 (0~0.3%)、非遺伝子組換えカイコで飼育数 3,056~9,958 頭のうち 0~15 頭 (0~0.2%) であった (別添 28【結果】A (4))。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、蔭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、7 回の飼育試験の後で管理したうち、非遺伝子組換えカイコの試験区の網の中で、羽化した跡のある蔭 1 個が発見されたことが 1 回、成虫の一部が発見されたことが 1 回あったが、いずれの場合もクワコとの交雑は認められなかった (別添 28【結果】A (4))。

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、粉碎機で飼育残渣を粉碎することとし、当該粉碎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、見つかった蔭は、1回・1室あたり遺伝子組換

えカイコで飼育数 4,774~5,986 頭のうち 0~23 頭 (0~0.4%)、非遺伝子組換えカイコで 5,674~5,984 頭のうち 0~20 頭 (0~0.4%) であり、幼虫は、死亡個体も含めて、遺伝子組換えカイコで 0~33 頭 (0~0.6%)、非遺伝子組換えカイコで 1~20 頭 (0.02~0.3%) であった (別添 28 【結果】 B (4))。

なお、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<sup>2</sup>、1,700 m<sup>2</sup>) 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、遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 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 4 年間で計 623 頭、群馬県蚕糸技術センターでは 2016 年からの 4 年間で計 1,399 頭が捕獲された (別添 28 【結果】 A (5)、B (5))。

この結果、本遺伝子組換えカイコに導入された *EGFP* 遺伝子に由来する緑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* 遺伝子を保有する個体は検出されなかった (別添 28 【結果】 A (5)、B (5))。

「⑦ クワコとの交雑の可能性」に関する隔離飼育区画における飼育試験では、遺伝子組換えカイコ GCS500、GCS508 及び [中 517 号×GCS508] を用いていないが、「① 形態の特性、② 生育の特性、③ 生存能力、④ 運動能力、⑤ 繁殖様式、⑥ 脱皮・変態・休眠等」について調査・比較した。GCS508 では、幼虫期間の短縮、営繭率及び繭層重の低下が見られ、[中 517 号×GCS508] では、孵化歩合の低下が見られた。しかしながら、その他の遺伝子組換えカイコ (GCS500 及び GCS508) では、非遺伝子組換えカイコの品種間差の範囲内であることから、導入した遺伝子の発現に起因するものではなく、非遺伝子組換えカイコ的能力を超える生理学的又は生態学的特性を持ち合わせていないことが考えられた。

なお、GCS500 は [中 515 号×GCS500] の親系統、GCS508 は [中 515 号×GCS500] 由来の系統、[中 517 号×GCS508] は中 515 号を親に持つ 517 号との交配後代であ

る。これらの系統は、同じイベント由来の遺伝子組換えカイコであることから、[中 515 号×GCS500] と近い遺伝的背景を持つ。

以上のことから、GCS500、GCS508 及び [中 517 号×GCS508] は、「⑦ クワコとの交雑の可能性」の「a) 幼虫の飼育、b) 繭の形成、c) 飼育残渣、d) モニタリング」について、[中 515 号×GCS500] と同様の作業手順で試験飼育した場合、当該試験結果とそれほど変わらない結果であると推測できる。

#### 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 Fibroin H 蛋白質は繊維タンパク質として機能するものであり、病原性を有するとは考えられない。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、遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] と非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号] との間に差は認められなかった（別添 26）。同様に、土壤微生物に与える影響についても調査したところ、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 27）。

本遺伝子組換えカイコが産生する改変 Fibroin H タンパク質は、繊維タンパク質であるフィブロイン H 鎖タンパク質の一部のアミノ酸配列を改変したものであり、改変した領域について、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、食品安全委員会において遺伝子組換え食品の既知アレルゲンとの相同性検索の指標とされている連続 8 アミノ酸残基の相同性を示す配列は認められなかった。なお、本遺伝子組換えカイコの繭において、改変 Fibroin H タンパク質の量は内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の 200 分の 1 程度であった（別添 16）。

また、改変型緑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、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。

遺伝子組換えカイコ (GCS500、GCS508 及び [中 517 号×GCS508]) について、有害物質の産生性に関する試験は行っていないが、GCS500 は [中 515 号×GCS500] の親系統、GCS508 は [中 515 号×GCS500] 由来の系統、[中 517 号×GCS508] は中 515 号を親に持つ 517 号との交配後代であり、加えて、これらの系統は同じイベント由来の遺伝子組換えカイコのため、[中 515 号×GCS500] と近い遺伝的背景を持つことから、新たな有害物質を産生するとは考えられない。

#### 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眼に緑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 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  
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)
- 別添 3 クワコ成虫の発生時期に関する調査  
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)
- 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 カイコから日本各地の野生のクワコ集団とカイコとの間の遺伝的多型の比較  
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)
- 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関する調査
- 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  
(知的財産保護の観点から部外秘)
- 別添 10 目的遺伝子の塩基配列  
(知的財産保護の観点から部外秘)
- 別添 11 ヘルパープラスミドの塩基配列  
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)
- 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  
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)
- 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 改変フィブロイン H 鎖タンパク質の発現量
- 別添 17 幼虫体重の比較
- 別添 18 繭重及び繭層重の比較
- 別添 19 繭糸および生糸の特性
- 別添 20 孵化歩合の比較
- 別添 21 幼虫期間の比較

- 別添 22 営繭率の比較
- 別添 23 幼虫の行動の比較
- 別添 24 産卵数の比較
- 別添 25 産卵行動の比較
- 別添 26 植物の発芽や生育に与える影響の比較
- 別添 27 土壌微生物に与える影響の比較
- 別添 28 隔離飼育区画における飼育試験  
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)
- 別添 29 本遺伝子組換えカイコの生理学的特性に関する追加試験  
(論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。)

## 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	<i>Bombyx mori</i> (Linnaeus)	<i>Bombyx mandarina</i> (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、南限はトカラ列島の悪石島までで、小宝島以南でのクワコの生息記録はない (河原畑, 1998; 廣森, 2001; 金井ら 2013; 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; 蛭木・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。
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頭のメス成虫の産卵数は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、南限はトカラ列島の悪石島までで、小宝島以南でのクワコの生息記録はない（河原畑, 1998; 廣森, 2001; 金井ら 2013; 別添 2）。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)。

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 20 m) と群馬県下仁田町下小坂 (標高 280 m) では 6 月頃、8 月頃及び 11 月～12 月頃の年 3 回程度 (別添 3)、長野県佐久市内山峠 (標高 1,000 m) では 7 月頃及び 9～10 月頃の年 2 回程度である (別添 3)。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) である (橋本・佐藤, 1958; 別添 3)。

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; 蟻木・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 3）。

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冬卵では、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ですが、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冬卵となり、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プ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.

金井賢一・守山泰司・中村京平 (2013) 2011 年 10 月悪石島における昆虫記録. 鹿児島県立博物館研究報告 32, 17-22.

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.

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.

廣森敏昭 (2001) トカラ列島 宝島・小宝島, 2000 年 6 月の昆虫. 鹿児島県立博物館研究報告

20, 49-54.

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 (Kômoto *et al.*, 2016)。カイコとクワコの交雑は、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 (中村ら, 1997) ことから、カイコとクワコとの第一代はカイコ由来のミトコンドリアを持ち、ミトコンドリア *coxI* 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 B C D	99 万頭	5 回	5 月中旬から 10 月中旬
E	57 万頭	4 回	5 月中旬から 10 月下旬
	24 万頭	2 回	5 月中旬から 10 月上旬
	60 万頭	5 回	5 月中旬から 10 月下旬
	7 万 5 千頭	1 回	5 月中旬から 6 月中旬

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

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.*, 85, 67-71.

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.

## 別添 7 カイコとクワコの交雑後代の妊性に関する調査

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。

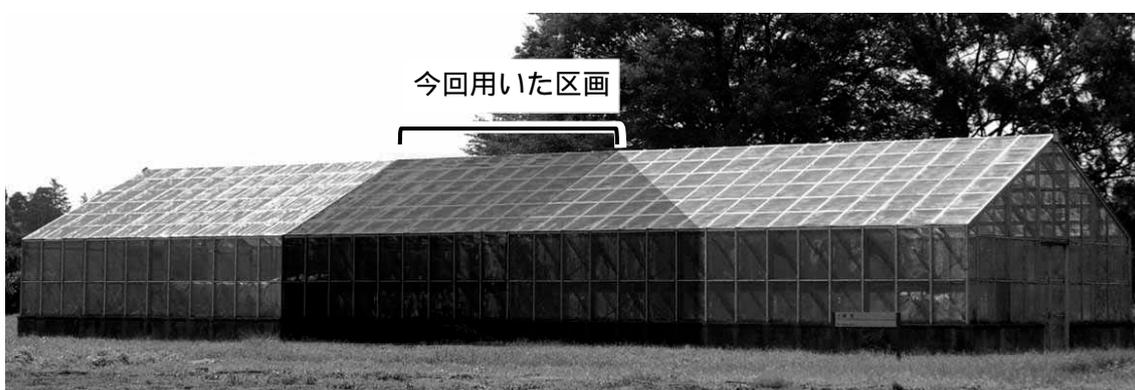


図 1. 網室の外観。

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。

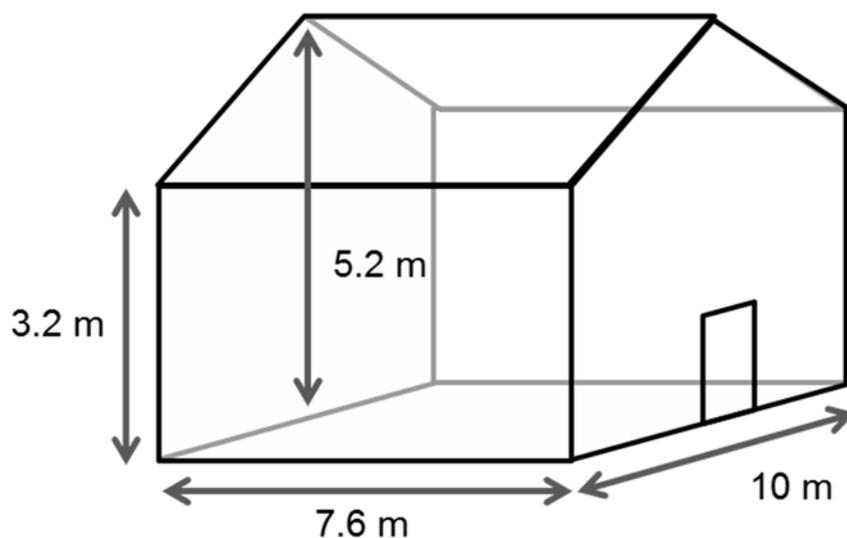


図 2. 使用した区画の大きさ

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 F3 まで、見波・大場 (1939) が F4 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、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 日間で合計 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.*, 85, 67-71.

## 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】

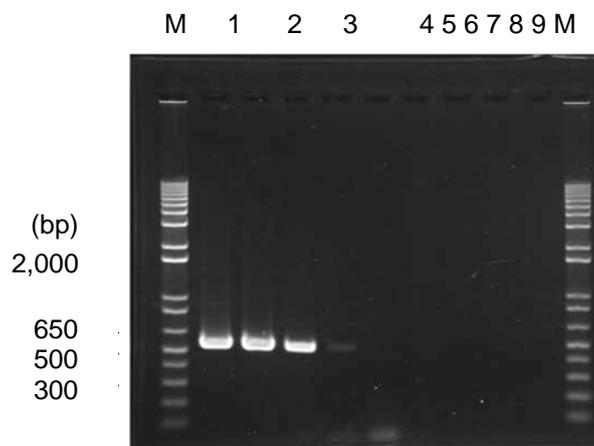
遺伝子組換えカイコ（GCS5005）の 5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、0.5  $\mu\text{g}$  を鋳型として、KOD-plus を用いて 30 サイクルの PCR を行い、転移酵素遺伝子の一部を増幅した。検出限界を示すため、ヘルパープラスミドを段階希釈して鋳型とした PCR も行った。PCR は 50  $\mu\text{l}$  の反応系で行い、そのうち 5  $\mu\text{l}$  を 1%アガロースゲルで電気泳動した。

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  $\mu\text{g}$  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、遺伝子組換えカイコのゲノム DNA 0.5  $\mu\text{g}$  からは検出されなかったことから、遺伝子組換えカイコ（GCS5005）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 4 ng (カイコゲノム DNA 0.5  $\mu\text{g}$  での 700 コピー分に相当)

2 : ヘルパーDNA 40 pg (7 コピー分)

3 : ヘルパーDNA 0.4 pg (0.07 コピー分)

4 : ヘルパーDNA  $4 \times 10^{-3}$  pg ( $7 \times 10^{-4}$  コピー分)

5 : ヘルパーDNA  $4 \times 10^{-5}$  pg ( $7 \times 10^{-6}$  コピー分)

6-9 : GCS500 ゲノム DNA 0.5  $\mu\text{g}$  (それぞれ別個体)

## 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（GCS5003）と非遺伝子組換えカイコ（中 514 号）との F1 同士を交配して、次代（F2）での分離を解析した。1 ペア（蛾区）の卵から孵化した幼虫の単眼を蛍光実体顕微鏡で観察し、選抜マーカである緑色蛍光タンパク質の発現の有無を確認した。

## 【結果】

F2 世代の孵化幼虫 292 頭のうち、単眼で緑色蛍光を発現している個体が 220 頭（75.3%）、発現していない個体が 72 頭（24.7%）であった。F2 世代で優性マーカである緑色蛍光を発現している個体が約 4 分の 3 であったことから、導入遺伝子は遺伝子組換えカイコ（GCS5005）のゲノム中に 1 コピー挿入されていると考えられる（二項検定で  $P=0.89$ ）。

## 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

## 【方法】

遺伝子組換えカイコの複数の世代（GCS5005、GCS5007 及び [中 515 号×GCS500] 7-2）及び非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号] から 6 頭ずつについて、5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、ゲノムサザンハイブリダイゼーションを行った。

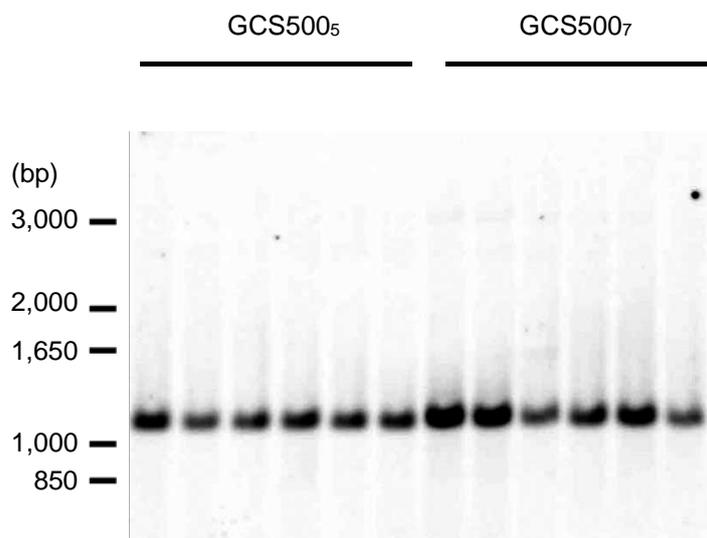
ゲノム DNA を（2 µg）を制限酵素 *Msp* I で消化したのち、0.8 %アガロースゲルで電気泳動を行い、ナイロンメンブレン Hybond-N+にトランスファーした。プローブは、生物多様性影響評価書中の図 6 に示すように piggyBac R に設定し、PCR で作製した（691 bp）。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

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。

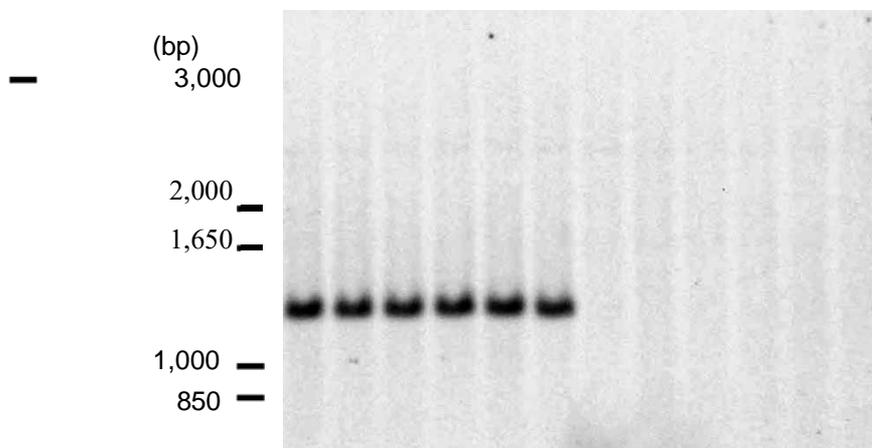
## 【結果】

図に示すように、移入された遺伝子は、すべての遺伝子組換えカイコのカイコゲノムに安定的に維持されている。



[ 中515 号×GCS500 ]<sub>7-2</sub>

中515 号×中514 号  
( 非組換え )



## 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】

遺伝子組換えカイコ（GCS500<sub>7</sub> 及び [中 515 号×GCS500]<sub>7,2</sub>）及び非遺伝子組換えカイコ（中 514 号及び中 515 号×中 514 号）の 4 系統を同時期に飼育し、それぞれの系統から 3 個体ずつ選択し、5 齢幼虫の後部絹糸腺から全 RNA を抽出して、フィブロイン H 鎖遺伝子に挿入した改変領域を検出する 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 LA Taq（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 6 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。

KS446: 5'-CGCTCTGCAGTATGTCGCTTATA-3' KS447: 5'-GCGGACGTTACGACGAGAATAGT-3'

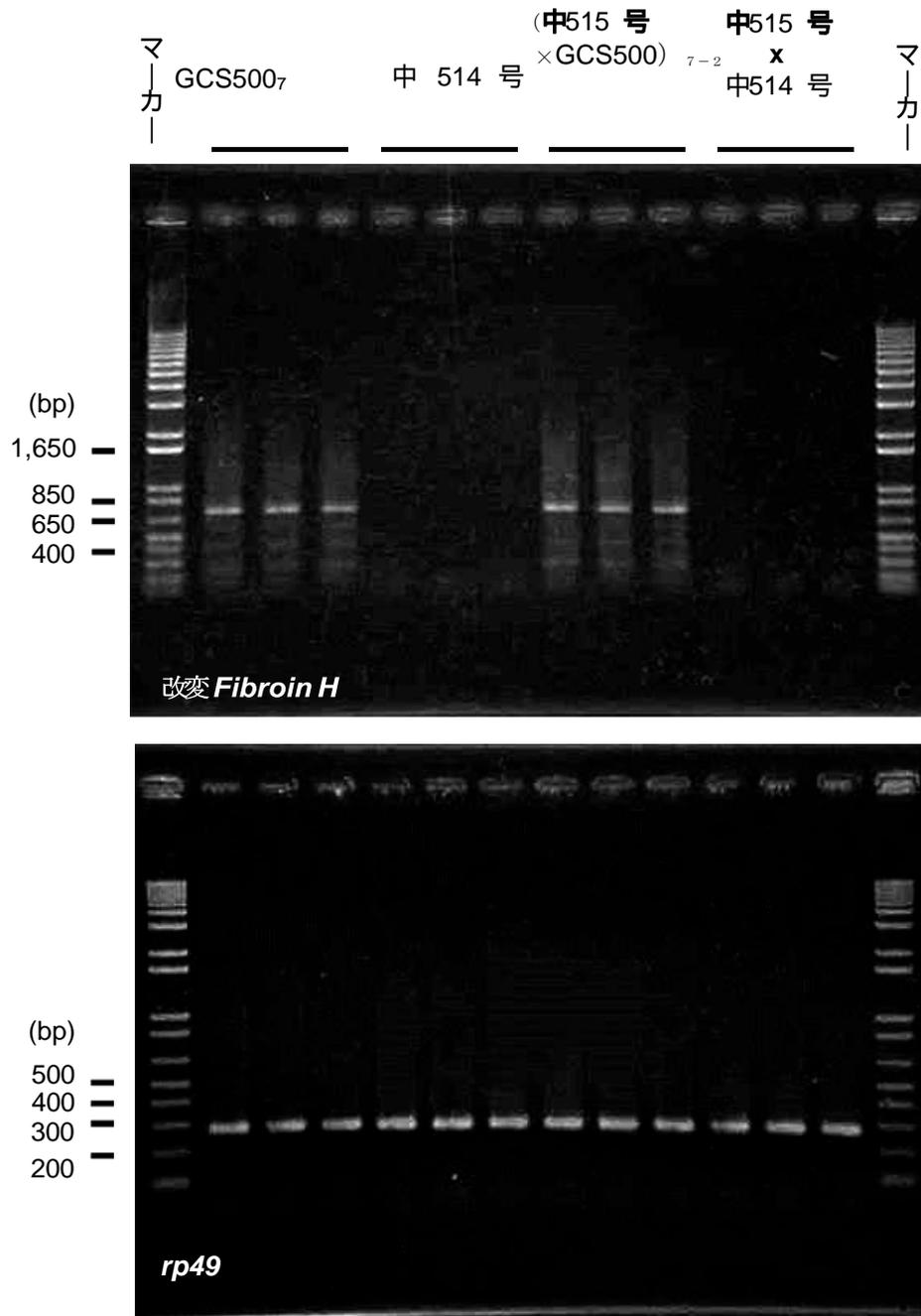
PCR は 10 µl の反応系で行い、そのうちの 3 µl を 2%アガロースゲルで電気泳動した。

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 を行った。*rp49* 遺伝子のプライマーの塩基配列は以下のとおり

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

## 【結果】

図のとおり、予想されるサイズ（748 bp）の改変領域の PCR 産物が、すべての遺伝子組換えカイコ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、遺伝子組換えカイコ（GCS500<sub>7</sub> 及び [中 515 号×GCS500]<sub>7,2</sub>）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。



## 別添 16 改変フィブロイン H 鎖タンパク質の発現量

## 【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、繭層のタンパク質を電気泳動し、遺伝子組換えカイコで発現する改変フィブロイン H 鎖タンパク質の量を、内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の量を比較した。稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・齢）を桑葉で飼育した。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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 8-2

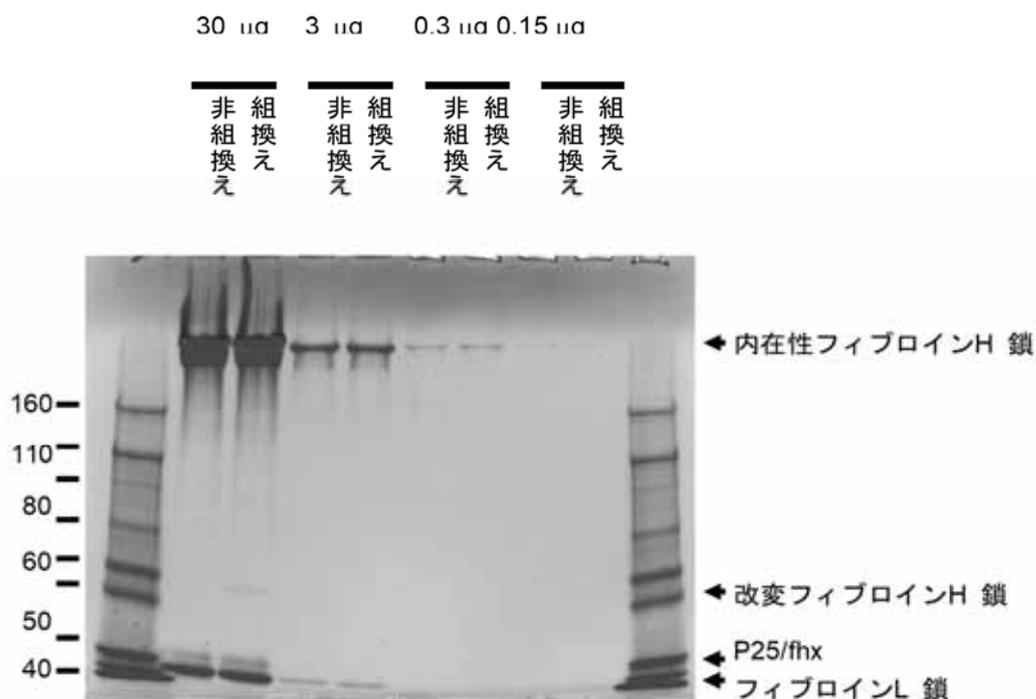
非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

精練のため、繭層 200 mg を 40 ml の 8 M 尿素に入れて 90°C で 1 時間置いた後に、8 M 尿素及び水での洗浄、エタノールでの脱水を経て、80°C、30 分で乾燥させた。得られた試料 80 mg を 2 ml の溶解液（9 M LiBr、10 mM Tris-HCl (pH 9.0)）に入れて 37°C で 3 時間置いて溶解させた。これを、SDS-PAGE（Bio-Rad TGX Gel 7.5%）にかけ、ATTO EzStain AQua で染色した。

## 【結果】

図のとおり、改変フィブロイン H 鎖タンパク質は遺伝子組換えカイコでのみ検出された。SDS-PAGE での改変フィブロイン H 鎖タンパク質のバンドの染色性は、内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の 200 分の 1 と同程度であった。

1 レーンの  
タンパク質量



## 別添 17 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。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。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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 7-2

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

孵化直後の幼虫については、26 頭から 47 頭をまとめて遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコで 4 グループずつ体重を測定し、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれの測定結果をまとめて 1 頭あたりの体重を計算した。

2 齢起蚕については、10 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について 14 回、非遺伝子組換えカイコについて 12 回繰り返した。

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 <sup>*1</sup>	2 齢起蚕 <sup>*2</sup>	3 齢起蚕	4 齢起蚕	5 齢起蚕
中 515 号× GCS500	0.382	46.4±0.53	30.7±0.490	181±2.81	797±11.4
中 515 号× 中 514 号	0.392	53.2±0.60	29.6±0.410	175±2.14	815±11.8

(単位 : mg、平均±標準誤差)

P (t 検定) 二 0.00 0.11 0.14 0.27

\*1 計測した体重の合計を全頭数で除して平均値（1 頭あたりの体重）を示している。このため、統計学的な検定は実施していない。

\*2 10 頭ずつまとめて測定した値を用いて検定を実施した。

## 別添 18 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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 8-2

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

## 【結果】

系統	オス			メス		
	個数	繭重	繭層重	個数	繭重	繭層重
[中 515 号 ×GCS500] 8-2	93	1.68 ±0.111	0.358 ±0.0619	83	2.12 ±0.119	0.372 ±0.0397
[中 515 号 ×中 514 号]	93	1.74 ±0.0908	0.386 ±0.0302	85	2.24 ±0.131	0.416 ±0.0338

(単位：g、平均±標準偏差)

P (t 検定)    0.00    0.00    0.00    0.00

## 別添 19 繭糸及び生糸の特性

### 【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、繭糸及び生糸の特性を比較した。

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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 3-2

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

### 繊度試験

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの繭 10 個ずつについて、一粒繰り繰糸機（ハラダ製、枠周 1.125 m）を用いて繰糸を行なった。巻き取り 50 回（56.25 m）ごとに繭糸を繰糸機から取り外して乾燥させた後、温度 20°C、湿度 65%で 24 時間静置してから秤量した。この値を繭糸繊度（デニール、d、9,000 m 当たりの重さを g で示した単位）に換算し、15 繭 1 個ずつの平均繭糸繊度を求めた。

### 強度試験

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれの繭から、繭検定用自動操糸機（日産自動車、CT2 型）を用い、旧繭検定法に準じて、目的繊度 27 d、繰糸速度 200 m/min で繰糸して生糸を得た。これから、検尺器により 100 回繊度糸（長さ 112.5m の生糸）を作製し、温度 20°C、湿度 65%で 24 時間静置してからテンシロン（オリエンテック、TRA-100）を用いて強度を測定した。測定に用いた試料長は 100 mm、延伸速度は 150 mm/min、試験回数は 50 回とした。

### 染色性試験

ローダミンとフラビンそれぞれの染料を水 100 ml に投入して 0.05%の染液を作製し、湯煎器を用いて 60°Cまで間接加熱した。ここに、強度試験と同様に作成した 100 回繊度糸を入れ、緩やかに攪拌しながらさらに温度を上げて染色した。その後、色落ちしなくなるまで水洗いしてから風乾した。明度と色彩値は色彩色差計（コニカミノルタ、CR-400P）を用いて測定した。繰り返し回数は 5 回とした。

## 【結果】

## 繊度及び強度

系統	繭糸繊度 (d)	強度 (g/d)
[中 515 号×GCS500]	1.35 ± 0.157	5.14 ± 0.0744
[中 515 号×中 514 号]	1.54 ± 0.0897	4.89 ± 0.247

## 平均±標準偏差

繊度及び強度ともに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認められた (どちらも  $P < 0.01$ )。

## 染色性

## ローダミン染色

系統	L 値	a 値	b 値
[中 515 号×GCS500]	43.9 ± 1.96	71.1 ± 2.62	-9.29 ± 1.42
[中 515 号×中 514 号]	53.3 ± 0.698	70.9 ± 1.58	-15.1 ± 0.676
$P$ (t 検定)	< 0.01	0.89	< 0.01

平均±標準偏差

## フラビン染色

系統	L 値	a 値	b 値
[中 515 号×GCS500]	82.8 ± 0.925	-15.0 ± 1.55	95.8 ± 3.49
[中 515 号×中 514 号]	87.7 ± 0.743	-27.9 ± 0.804	79.3 ± 2.19
$P$ (t 検定)	< 0.01	< 0.01	< 0.01

平均±標準偏差

L 値は明度で 0 (黒) ~100 (白)、a 値と b 値は色度で 0 で無彩色、a 値はプラスの方向は赤、マイナスの方向は緑が強く、b 値はプラスの方向は黄色、マイナスの方向は青が強くなる。

ローダミン染色及びフラビン染色どちらでも遺伝子組換えカイコの生糸の方で L 値が低く、濃く染まっていると認められた。

## 別添 20 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 図を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 7-2

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

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のこと、死卵とは、受精はしたが胚発生が進まなかった卵のことを言う。

## 【結果】

系統	総数	不受精		孵化卵数	孵化歩合 (%)
		卵数	死卵数		
[中 515 号×GCS500] 7-2	2,482	522	172	1,788	91.2
[中 515 号×中 514 号]	3,216	74	106	3,036	96.6

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  $P=0.053$ ）。

## 別添 21 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）までは人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）は桑葉で飼育して、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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 8-2

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

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】

系統	オス		メス	
	繭形成数	幼虫期間（日）	繭形成数	幼虫期間（日）
[中 515 号× GCS500] 8-2	99	25.7±0.645	86	26.3±0.659
[中 515 号×中 514 号]	99	26.0±0.745	88	26.6±0.627
				(平均±標準偏差)
<i>P</i> (t 検定)		0.012		0.0005

## 別添 22 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、全齢を桑葉で飼育した。4 齢起蚕で頭数を 200 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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 7-2  
 非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

## 【結果】

系統	4 齢		営繭率 (%)
	起蚕数	結繭蚕数	
[中 515 号×GCS500] 7-2	200	195	97.5
[中 515 号×中 514 号]	200	192	96.0

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  $P=0.88$ ）。

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 23 幼虫の行動の比較

## 【方法】

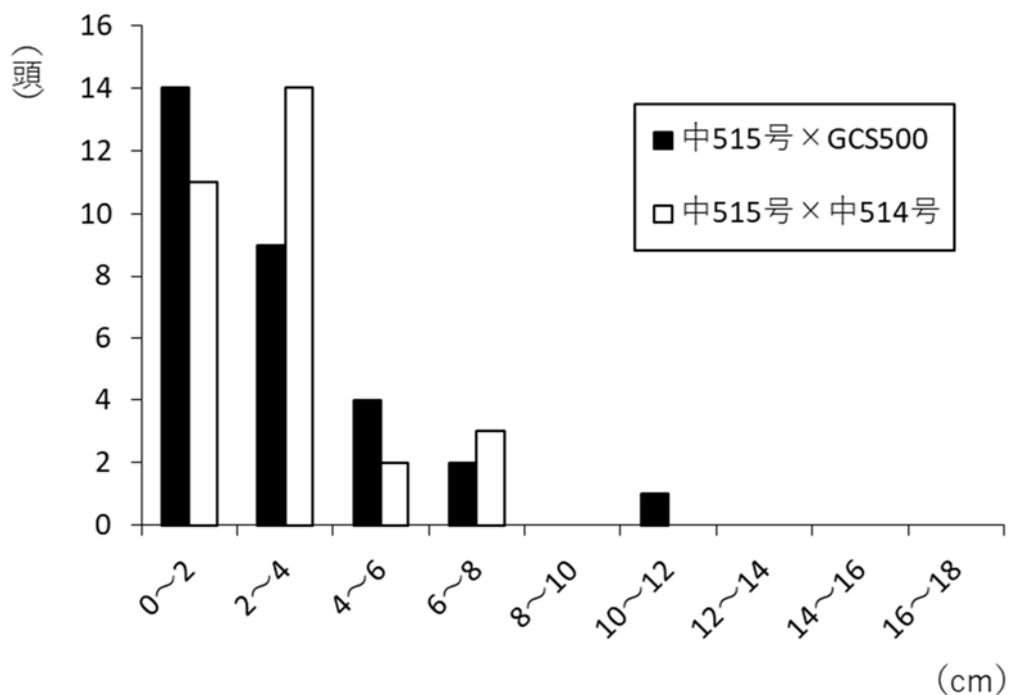
5 齢 2 日目のカイコ幼虫を、半径 18 cm の円形の枠の中央に 1 頭ずつ置いて 12 時間放置し、それぞれのカイコが元の場所からどのくらいの距離を移動したかを記録する。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書 図 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 7-2

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

## 【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 2.9 cm（±2.5 cm）、非遺伝子組換えカイコで 2.9 cm（±1.7 cm）であり、差は認められなかった（差がないことを帰無仮説とした Mann-Whitney の U 検定で  $P=0.29$ ）。また、移動距離を 2 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 24 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 20 頭ずつのメス蛾を交尾・割愛させた後、半径 18 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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ	[中 515 号×GCS500] 7-2
非遺伝子組換えカイコ	[中 515 号×中 514 号]

## 【結果】

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
[中 515 号×GCS500] 7-2	531±179
[中 515 号×中 514 号]	736±168

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 25 産卵行動の比較

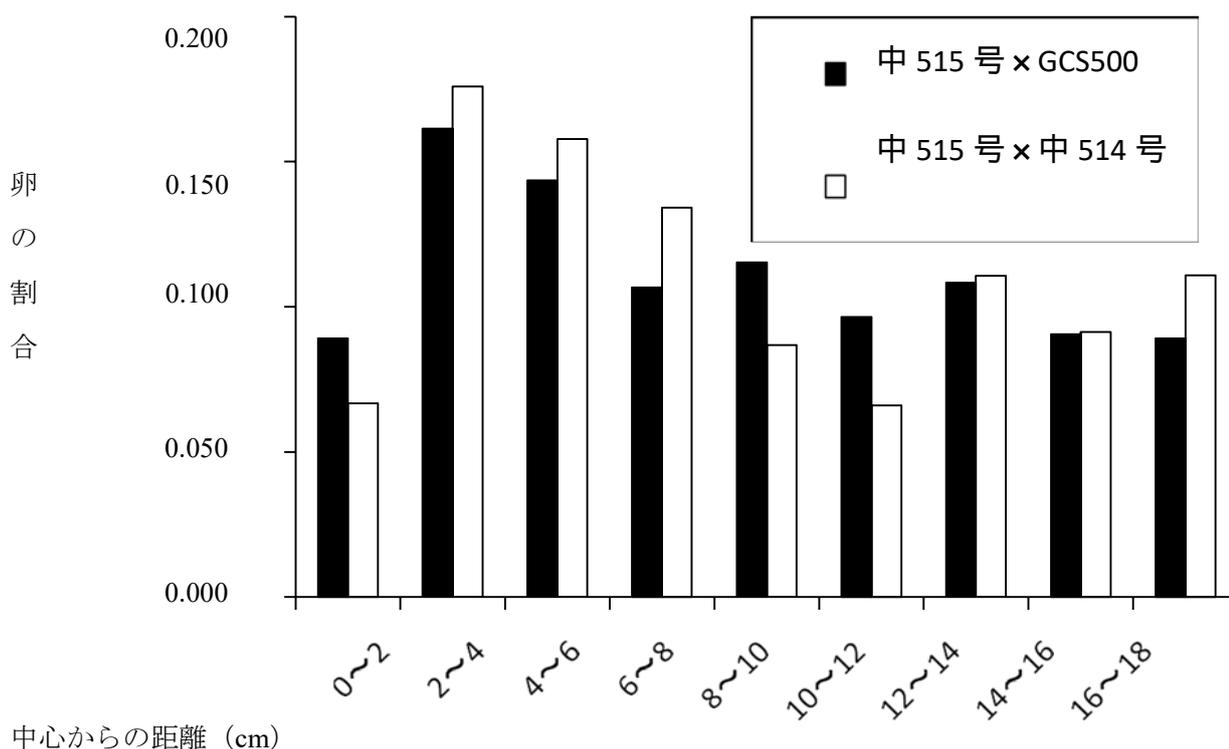
## 【方法】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 20 頭ずつのメス蛾を交尾・割愛させた後、半径 18 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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ	[中 515 号×GCS500] 7-2
非遺伝子組換えカイコ	[中 515 号×中 514 号]

## 【結果】

遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ 20 頭ずつについて中心から 2 cm ほど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った。遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコで産卵位置の分布について統計学的な有意差は認められなかった（差がないことを帰無仮説とした Mann-Whitney の U 検定で  $P=0.085$ ）。



## 別添 26 植物の発芽や生育に与える影響の比較

## 【方法】

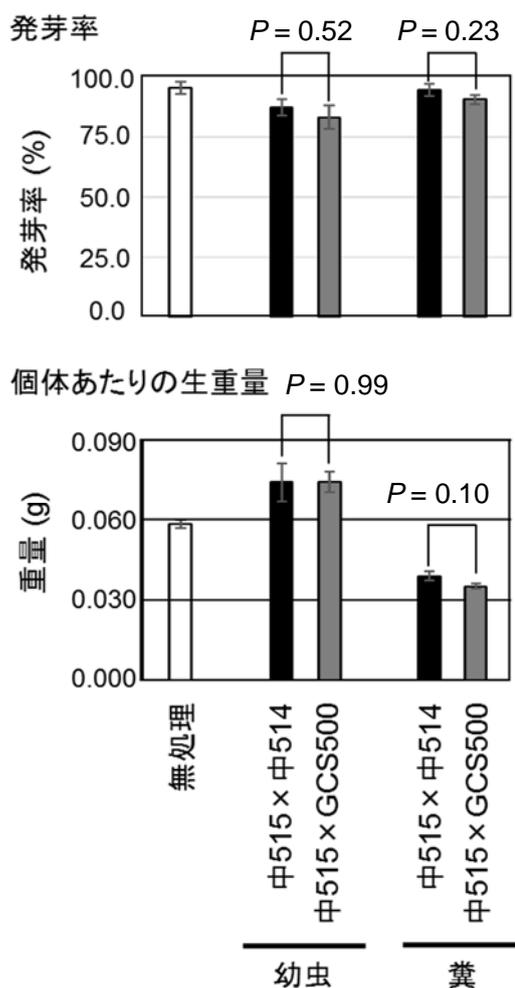
冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、これを 1%混入した無肥粒状培土を連結トレイ (7.5 cm 角) に 100 g ずつ入れ、1 穴にブロッコリー (緑嶺) 種子 30 粒を播種した (各試験区について 5 反復)。これを 20°C・自然光の条件に置き、播種後 7 日で発芽数を調査し、2 週間で地上部を回収して、一株当たりの新鮮重を調査した。試験期間中に施肥は行っていない。供試系統は以下のとおりとした (生物多様性影響評価書 図 10 を参照)。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500]

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

## 【結果】

図に示すとおり、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 (t 検定、データの正規性、等分散性についてはいずれも棄却されなかった。発芽率については逆正弦変換後の t 検定も行い、P 値は幼虫で 0.58、糞で 0.20 であった。)



別添 27 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。この土壌 100g に滅菌水 50 ml を加えて湿潤させ、25°C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、102~106 倍希釈液を作成した。糸状菌については、102、103、104 倍希釈液 200  $\mu$ l 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°Cで 3 日間培養した後、コロニー数を調査した（各試験区について 5 反復）。細菌・放線菌については、104、105、106 倍希釈液 200  $\mu$ l を直径 9 cm シャーレの PTYG 培地上に塗布し、25°Cで 3 日間培養した後、コロニー数を調査した（各試験区について 5 反復）。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 10 を参照）。

遺伝子組換えカイコ [中 515 号×GCS500] 7-2

非遺伝子組換えカイコ [中 515 号×中 514 号]

【結果】

図に示すとおり、糸状菌と細菌・放線菌ともに、遺伝子組換えカイコと、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（t 検定で  $P > 0.05$ ）。

