高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H*、*Bombyx mori*）
（GCS500、GCS508、中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）の申請書等の概要

様式第１（第７条関係）

第一種使用規程承認申請書

令和５年１月２５日

農林水産大臣　　野 村　哲 郎　殿
環 境 大 臣　　西 村　明 宏　殿

申請者　国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
氏名　　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

申請者　群馬県蚕糸技術センター
氏名　　所　　長　　桑 原 伸 夫
住所　　群馬県前橋市総社町総社 2326 番地２

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H*、*Bombyx mori*） （GCS500、GCS508、中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離飼育区画における①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	隔離飼育区画の所在地：群馬県前橋市総社町総社 2326 番地 2 隔離飼育区画の名称： 群馬県蚕糸技術センター 遺伝子組換えカイコ飼育調査区画 使用等期間：承認日から令和 9 年 3 月 31 日まで 隔離飼育区画内の施設の内容：別に定める「隔離飼育区画の施設内容及び受容環境」のとおりとする。 隔離飼育区画の要件： 1　次に掲げる設備を有すること (1) 施設内への部外者の立入りを防止するため、遺伝子組換えカイコを隔離して飼育するための遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）を取り囲むように金属製フェンス（高さ 1.8 m）を設置している。 (2) 遺伝子組換えカイコを飼育する区画であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。 (3) 隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室は鋼管による骨組みで、内側の網（4 mm 目以下）と外側のフィルムで二重に被覆している。外側のフィルムは、天井、妻面及び側面に開閉可能な部分があるが、内側の網は開閉しない（出入口を除く）。 (4) 隔離飼育区画内のプレハブ蚕室は屋根、壁、戸及び窓を備え、開閉可能な窓、戸（出入口を除く。）及び換気口には 4 mm 目以下の網を張っている。なお、稚蚕飼育所での本遺伝子組換えカイコの人工飼料による稚蚕飼育手順を確立するため、人工飼料による稚蚕飼育試験を行うこととし、プレハブ蚕室内に、インキュベーターを設置している。 (5) 隔離飼育区画内の残渣処理室は鋼管による骨組みで、全体を網（4 mm 目以下）で覆い、天井部外側をフィルムで被覆している。内側に網を保護する合板（高さ 0.9 m）を設置している。 (6) 不活化処理で用いる冷凍庫（-30℃～-20℃設定）の設置は、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（平成 15 年法律第 97 号）に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた区画とする。 2　次に掲げる事項を遵守すること (1) 別に定める作業要領に従う。 (2) 別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを

	実施する。 (3) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

生物多様性影響評価書

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* (Linnæus, 1758)

ロ　宿主の品種名又は系統名

①　中 514 号

遺伝子組換えカイコの作出に際して、最初に卵にプラスミド DNA を注入して遺伝子を導入した系統である。

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所において、極細繊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（細繊度系統）を交配して育成した二化性[1]の中国種系統である（山本ら, 1999）。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。）において維持・保存されている。この中 514 号を中 515 号と交配した F_1 は極細繊度蚕品種「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）。

②　中 515 号

中 514 号から作出した遺伝子組換えカイコ系統（GCS500）と交配して F_1 を得るために使用した系統である（図 10 参照）。得られた F_1 は、生物多様性影響評価に必要な情報を収集するための試験に使用した。

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所において、支 25 号から選抜した後代の中から、極細繊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である（山本ら, 1999）。農研機構において維持・保存されている。

③　中 517 号

「中 515 号」に「MC100（多糸量かつ細繊度の系統）」を交配して得た後代から、細繊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

[1] 昆虫が自然状態で一年間に何世代繰りかすかという性質。一化性であれば年間一世代、二化性であれば年間二世代。

定種である（岡田ら, 2016）。農研機構において維持・保存されている。

遺伝子組換えカイコ系統（GCS500）と中 515 号との後代から選抜育成された遺伝子組換え蚕系統（GCS508）と交配して F_1 を得るために使用した系統である（図 10 参照）。農研機構において維持・保存されている。

④　中 516 号

「中 514 号」に「中 515 号」を交配して得た後代から、細繊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である（岡田ら, 2016）。農研機構において維持・保存されている。

この中 516 号を中 517 号と交配した F_1 は極細繊度蚕品種「白麗」として用いられている（岡田ら, 2016）。なお、同様の掛け合わせで育成された遺伝子組換えカイコ系統（GCS508）とは遺伝的背景が近いと考えられる。

（本申請に係る遺伝子組換えカイコ系統の直接の宿主ではないが、関連する系統であるため記載した。）

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[2]（*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

[2] 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。

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、各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 92 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, 2021）。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, 2020）。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）。

カイコの品種とは、実用形質に関して一定の遺伝的特性を持つカイコ集団である。実際に蚕品種と呼んでいるものは、かつては蚕糸業法において指定された品種（指定品種）を指し、現在では育成機関が論文や特許等で公開した、収繭量や繭糸質が良好な実用品種として育成された交雑種並びにその親系統を指している（日本蚕糸学会, 2002）。カイコの品種の育成は、実用形質を選抜する蛾区選抜、個体選抜、蛾区選抜と個体選抜の併用等により行う。

蛾区選抜[3]は、雌蛾の産卵ごとに区分しつつ、集団選抜や個体選抜と同様な選抜法がとられる（山本ら, 1999）。

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。一般的に、蚕種製造業者は、蚕種製造に用いる原種の幼虫の飼育を分場農家[4]に委託する。分場農家は生産した繭（蛹）を上蔟後 10 日余りで、蚕種製造業者に運び入れる。蚕種製造業者では繭から蛹を取りだし雌雄に分別し、蛾が羽化するまで適切に保護する。羽化した蛾は、必要に応じて掛け合わせて交配し、産卵させる。得た蚕種は、必要に応じて浸酸などの人工孵化処理を経て養蚕農家等に販売される。蚕種製造業者は、微粒子病[5]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、

[3] 1 蛾育を行い、形質の優れた蛾区（1 頭の雌蛾により産卵された卵の区画（集団））を選び出すこと。
[4] 蚕種製造業者が原蚕飼育を依頼した農家、または農家群。病害の少ない地帯が選ばれることが多い。
[5] 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。

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）。一方で、稚蚕共同飼育所において桑葉育を行っている例や個人が近隣の養蚕農家の稚蚕育を請け負う個人受託飼育所も存在する（目黒, 2010）。さらには、個人で稚蚕から壮蚕飼育まで行う養蚕農家も存在する（大日本蚕糸会, 2013）。

・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、蔟[6]（まぶし）へ移す作業（上蔟、じょうぞく）を行う。上蔟から 7~8 日間程度経ったら収繭（蔟から繭を回収し毛羽[7]（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、ちょけん）、原料調整、煮繭（しゃけん）、繰糸[8]（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、休眠卵の状態で越冬する。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）。

---

[6] カイコが繭を作るための足場にする器具。
[7] 繭の外側を覆っている真綿のようなものをいう。
[8] 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。

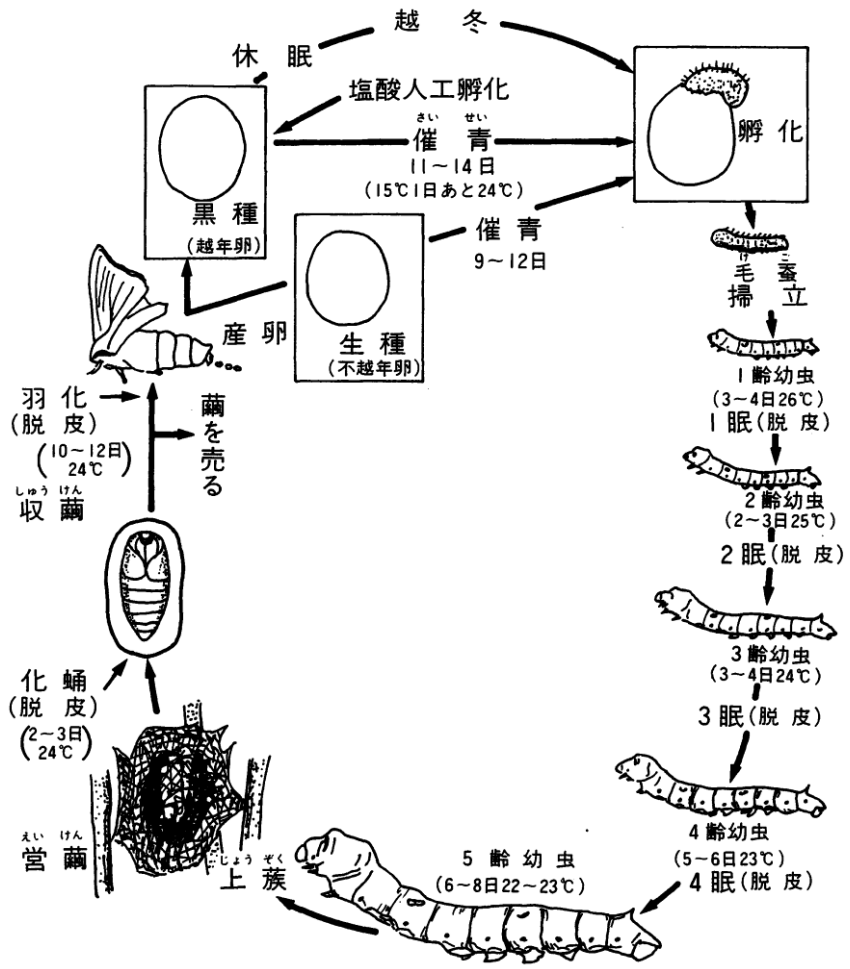


図 1. カイコの生活環

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、何も食べずに数日で死滅する（鶴井ら, 2010）。一般の品種で通常の管理を行えば、カイコの卵は休眠する。

休眠卵[9]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 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、上蔟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、上蔟から羽化までの日数が 16 日程度、メス成虫 1 頭あた

[9] 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。その後は越年して冬の低温に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。

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**：孵化したばかりの幼虫は、蟻蚕[10]、毛蚕（けご）[11]とも言う。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。櫛形（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; 鶴井ら, 2010; 池田ら, 2009）。

中 514 号は、幼虫体色が白色で、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。中 515 号は、幼虫体色が白色で、斑紋は雌雄ともに着色し、繭は白色で浅縊短俵形である（農林水産省農産園芸局, 1998）。中 516 号は、幼虫体色が白色で、斑紋は雌雄ともに着色し、繭は白色で楕円形であるが、稀に浅縊短俵形が混ざる。中 517 号は、幼虫体色が白色で、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。MC100 は、幼虫体色が白色で、斑紋は雌雄ともに着色する。繭は白色で楕円形である

[10] 卵からかえったばかりのカイコ。蟻のように見える。毛蚕（けご）とも言う。
[11] 卵からかえったばかりのカイコで、体長に対して剛毛が長いので毛深く見える。蟻蚕ともいう。

が、浅縊短俵形が混ざることもある。

ロ　生息又は生育可能な環境の条件

カイコは人間に高度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、全齢を通し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）[12]。

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[13]（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）。

図 2. 給桑台車付条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）。稚蚕期の 1 齢期は 28℃、２齢期は 27℃を目標とし、3 齢期に入ると飼育温度は 26～27℃が良いとされている。壮蚕期の 4 齢期の飼育環境は 25℃を目標とし、５齢期は 23～25℃を目標とするとされている（蚕糸・昆虫農業技術研

[12] カイコ幼虫の移動距離の調査結果では、移動距離を体長で除した歩行活性が高い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、鳥や他の昆虫等に補食され、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。

[13] 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。

究所, 1995)。

・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ことは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（上蔟)、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（蔟)（図 3) を用い、熟蚕をそこに入らせて繭を作らせる方法が一般的である（鶴井ら, 2010)。

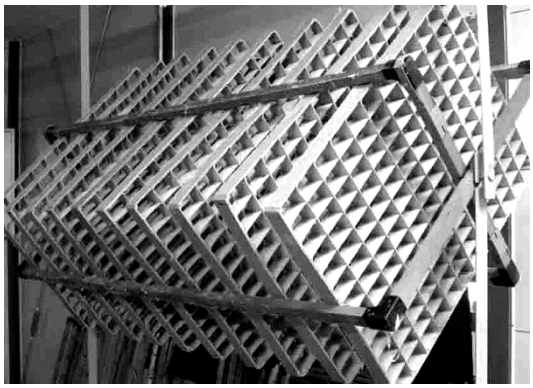


図 3. 上蔟容器（回転蔟）

上蔟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は容易であり、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（Kuwahara *et al.*, 1984; Daimon *et al.*, 2012）。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。「一化性品種」は環境要因に関係なく必ず休眠する品種を指す。二化性品種は催青[14]（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。一化性及び二化性品種は、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 号は二化性、中 515 号は一化性であり、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　近縁野生種との交雑性

【クワコとカイコの遺伝的な差異】

カイコと中国及び朝鮮半島に生息するクワコは、染色体の半数体当たり 28 本の染色体を持つが、日本に生息するクワコは 1 本少なく 27 本である(Yatsu, 1913; 川口, 1923）日本産クワコは、カイコ及び中国及び朝鮮半島に生息しているクワコより先に分岐し（Yukuhiro, 2010）、5 千～1 万年前の中国において、野生の絹糸昆虫を家畜化したものがカイコであり、カイコの祖先種がクワコであると考えられる（Sasaki,1898; 吉武, 1988; 河原畑. 1998; 伴野, 2010）。

【蚕室で飼育されるカイコとクワコとの交雑に関する情報】

試験的にカイコとクワコを交配した場合、カイコの雌と、カイコの雌のフェロモンで誘引されるクワコの雄とは交尾可能であり、カイコの雌は産卵する。交雑種の次代や後代は妊性が正常にあり、クワコとカイコは遺伝的に非常に近縁であることが確認されている（吉武, 1988; 河原畑, 1998; 伴野, 2010）。

【カイコとの交雑の痕跡の有無に関する科学的知見】

上記を踏まえ、クワコ集団のカイコとの交雑の痕跡の有無を調べるため、農研機構が北海道から鹿児島までの、現在も養蚕が行われている地域やかつて盛んだった地域において、採集したクワコとカイコの様々な系統とについて、ミトコンドリアゲノムの cytochrome C oxidase subunit I (COI)遺伝子（クワコ 4,192 個体とカイコ 147 系統）を解析したところ、野

[14] カイコの卵を孵化させるため、温度・湿度・光線などを調節した環境に保護すること。

生のクワコにカイコのミトコンドリアゲノムが流入した痕跡は認められていない（Yukuhiro et al. 2012）ことが明らかにされた

へ　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。）

ト　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。）

チ　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 pavida*）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（別添 4; 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 cypovirus、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）。

２．　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

ここでは、高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H*、*Bombyx mori*）（GCS500、GCS508、中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）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て用いる（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。

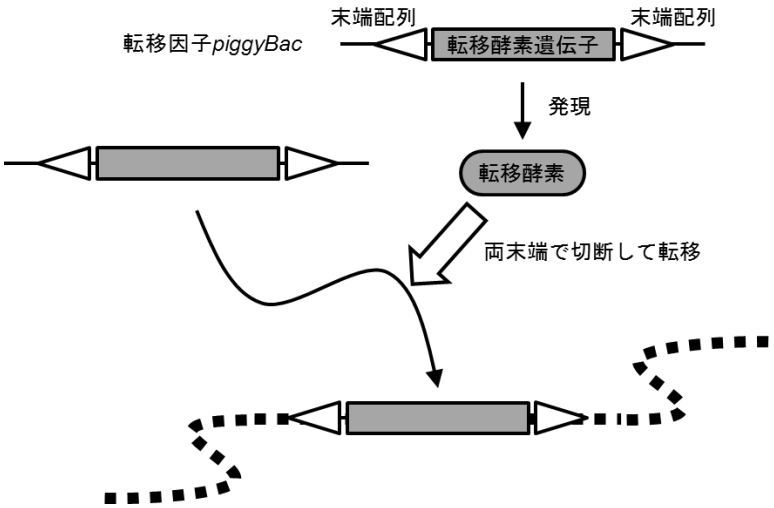


図 4. 転移因子 *piggyBac* の働き

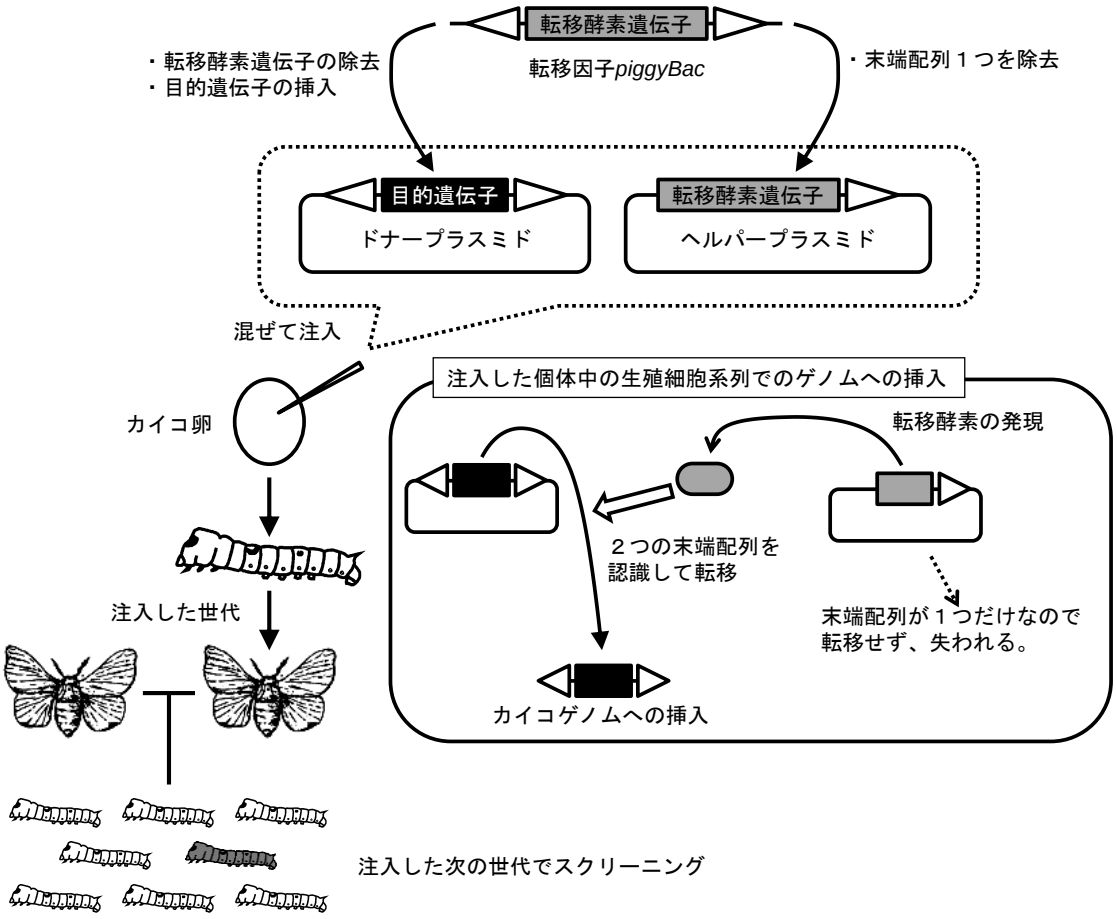


図 5. 遺伝子組換えカイコの作出法

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　ドナープラスミドの構成要素と、由来、機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
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）		
Fibroin H 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 *Fibroin H* 遺伝子の転写を規定する（Kojima *et al.*, 2007）。
改変 *Fibroin H*（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、グリシンおよびアラニンを主とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを、グリシンおよ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）。
Fibroin H 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 *et al.*, 2007）。

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）		
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（*Drosophila melanogaster*）由来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たプロモーター。遺伝子の眼での転写を規定する（Berghammer *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2002）。
EGFP（改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子）	0.7 kb	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（クロンテック社; Yang *et al*., 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）		
piggyBac R	1.1 kb	イラクサギンウワバ（*Trichoplusia ni*）由来の転移因子 *piggyBac* の末端配列（Cary *et al.*, 1989）。カイコゲノムへの挿入に際して、*piggyBac* 転移酵素の認識配列として働く。
piggyBac L	0.7 kb	イラクサギンウワバ（*T. ni*）由来の転移因子 *piggyBac* の末端配列（Cary *et al.*, 1989）。カイコゲノムへの挿入に際して、*piggyBac* 転移酵素の認識配列として働く。
外骨格領域（本遺伝子組換えカイコゲノム中には存在しない）		
pUC ori	0.7 kb	大腸菌（*Escherichia coli*）由来のプラスミド ColE1 の複製開始点。本プラスミドを大腸菌中

		で増幅するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。
AmpR	0.9 kb	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコのゲノム中には挿入されない。

注：供与核酸のうち、本表に記載されていない部分については、本組換えカイコにおいて生物多様性に影響を及ぼさない。

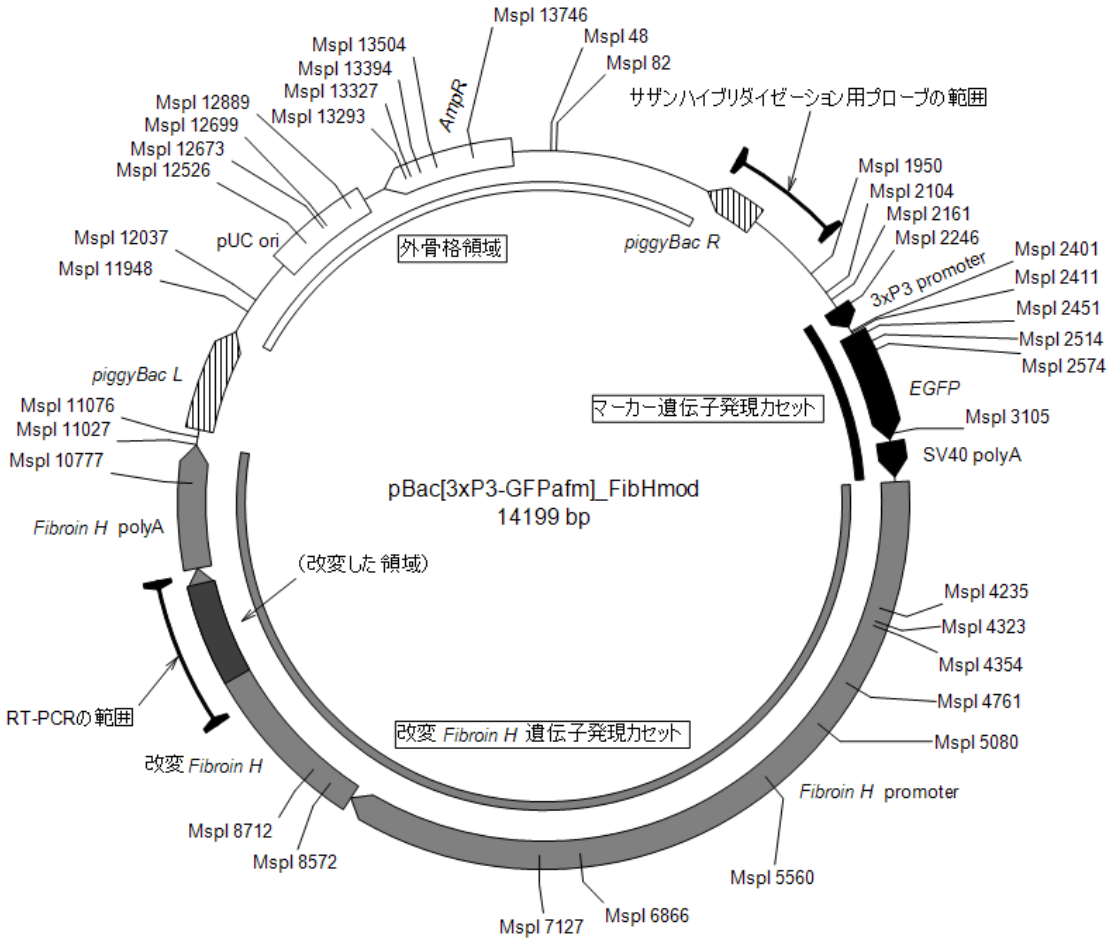


図 6. 改変 *Fibroin H* 遺伝子導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]_FibHmod の構造構成要素の由来及び機能については表 1 を参照。サザンハイブリダイゼーション用プローブの範囲及び遺伝子発現の安定性を確認するための RT-PCR の範囲を示す。

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。

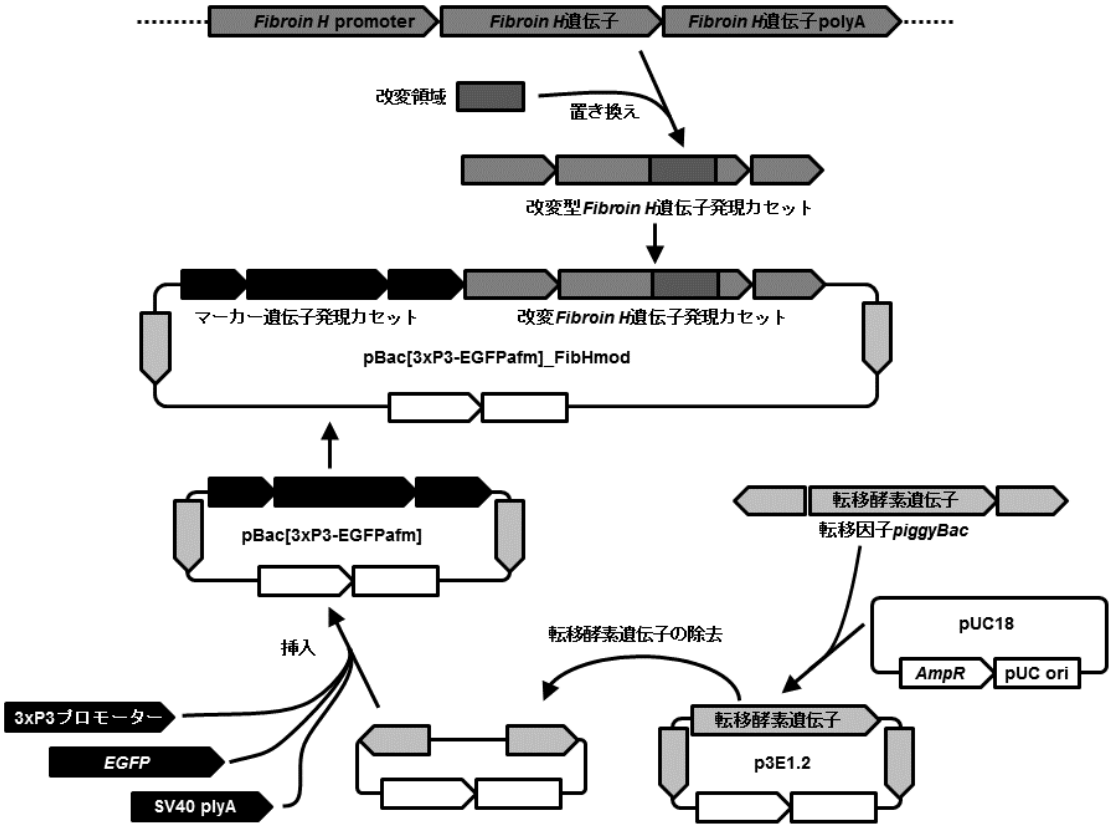


図 7．改変 *Fibroin H* 遺伝子の導入に用いたプラスミド pBac[3xP3-EGFPafm]_FibHmod の作製方法

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）。
piggyBac transposase（*piggyBac* 転移酵素遺伝子）	1.8 kb	イラクサギンウワバ（*T. ni*）由来の転移因子 *piggyBac* の転移酵素（Cary *et al.*, 1989）。*piggyBac* の 2 つの末端配列の間に挟まれた領域を切り出して、他の DNA 中に挿入する機能を持つ。
piggyBac R	1.1 kb	イラクサギンウワバ（*T. ni*）由来の転移因子 *piggyBac* の末端配列（Cary *et al.*, 1989）。カイコゲノムへの挿入に際して、*piggyBac* 転移酵素の認識配列として働く。
AmpR	0.9 kb	抗生物質アンピシリンに対する耐性遺伝子。本プラスミドを持つ大腸菌を選抜するための配列であり、本遺伝子組換えカイコゲノム中には挿入されない。
pUC ori	0.7 kb	大腸菌（*E. coli*）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。

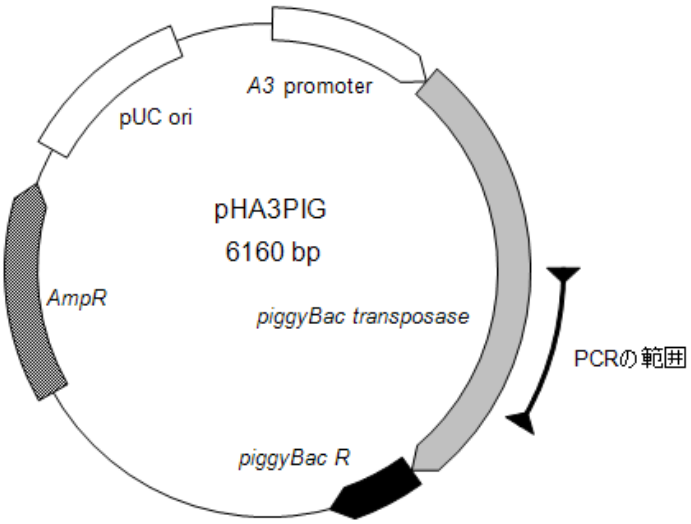


図 8. ヘルパープラスミド pHA3PIG の構造

5 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、グリシンおよびアラニンを主とする繰返し配列をコードする領域のほぼすべてを、グリシンおよ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（繭糸繊度 1.54 d[15] ）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 Research and Resource Program Database（FARRP）、ver. 20、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

[15] デニール 繊維の太さを表わす単位。糸長 450m で 0.05g あるもの 1 デニールと定められている。

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. 20、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ることがない（図 9）。

（２）ベクターに関する情報

イ　名称及び由来

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

転移因子 *piggyBac* を pUC18 に挿入して p3E1.2 が得られる（Cary *et al*, 1989; 図 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、別添 10 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、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ることがない（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 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 *EGFP* 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）。

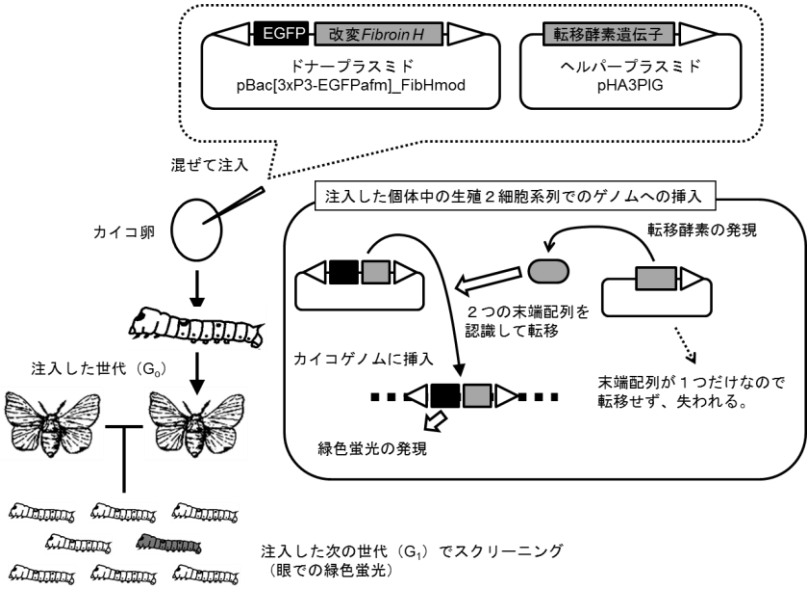


図 9. 本遺伝子組換えカイコの作製方法

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_0、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。

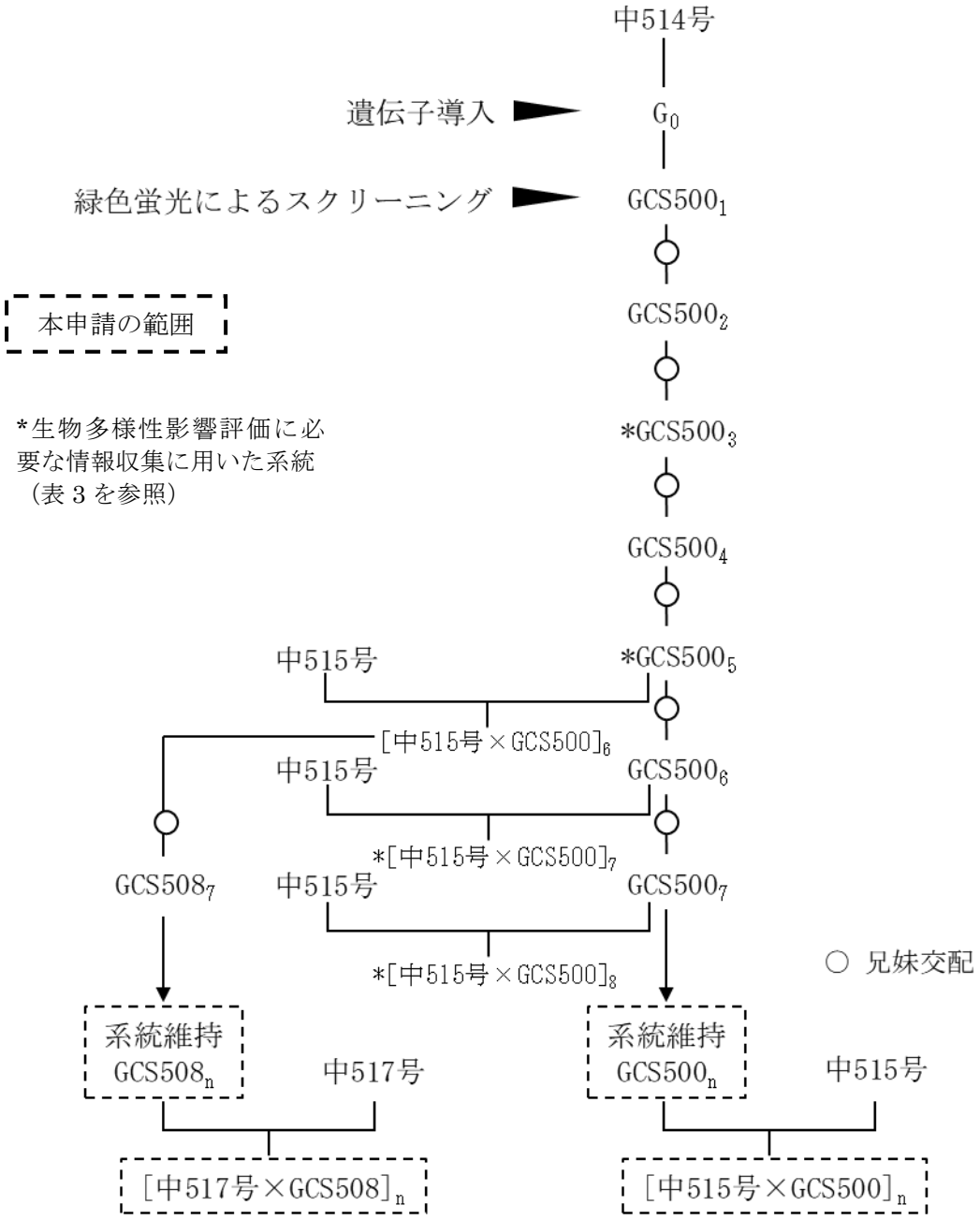


図 10. 本遺伝子組換えカイコの育成経過と世代番号

表 3　生物多様性影響評価に必要な情報収集に用いた系統

（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]$_3$	GCS500$_5$	GCS500$_7$
	2010	2012	2012
導入した遺伝子の安定性（サザン解析）		○	○
ヘルパーの残存（PCR）		○	
遺伝子の発現状態（RT-PCR）			○
（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）			
（繭糸および生糸の特性）	○		
（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]$_7$	[中 515 号×GCS500]$_7$	[中 515 号×GCS500]$_8$
	2012	2014	2015
導入した遺伝子の安定性（サザン解析）	○		
ヘルパーの残存（PCR）			
遺伝子の発現状態（RT-PCR）	○		
（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)			○
(繭糸および生糸の特性)			
(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			
	GCS500$_{12}$ 2019	GCS508$_{12}$ 2019	[中 515 号×GCS500]$_{12}$ 2019	[中 517 号×GCS508]$_{12}$ 2019
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)	○	○	○	○
(繭糸および生糸の特性)				
(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	
	[GCS500]$_{15}$ 2022	[中 515 号×GCS500]$_{15}$ 2022
生理学的特性		
(幼虫の行動)	○	○

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

$GCS500_5$ 世代の遺伝子組換えカイコ（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、$GCS500_5$ 世代の遺伝子組換えカイコのゲノム DNA から *piggyBac* 転移酵素遺伝子の増幅は認められなかった（別添 12）。このことから、本遺伝子組換えカイコにはヘルパープラスミドの配列が残存していないことが確認できた。

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

遺伝子組換えカイコは、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作出した。眼に改変型緑色蛍光を示す個体を選抜し、目的遺伝子を持つ実用系統 GCS500 を作出し、現在まで P1A での飼育および兄妹交配により系統を維持している。また、$[中515号\times GCS500]_6$ を兄妹交配し目的遺伝子をホモに持つように選抜し GCS508 を作出し、現在まで P1A での飼育および兄妹交配により系統を維持している。糸繭生産用としては、GCS500 と中 515 号の一代交雑種である[中 515 号×GCS500]、または、GCS508 と中 517 号との一代交雑種である[中 517 号×GCS508]を使用する。育成経過を図 10 に、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）と非遺伝子組換えカイコ（中 514 号）との F_1 同士を交配して、次代 F_2 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、本遺伝子組換えカイコの複数の世代及び非遺伝子組換えカイコについて、5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、サザンハイブリダイゼーションを行ったところ、本遺伝子組換えカイコからはすべて同じサイズのバンドが 1 本だけ検出されたことから、導入した遺伝子はカイコゲノムに安定的に維持されていると判断した（別添 14）。

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

ハ　移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での形質発現の安定性

移入された核酸の複製物から目的遺伝子が安定的に発現されることを確認するため、本遺伝子組換えカイコの複数の世代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、本遺伝子組換えカイコにおいて目的遺伝子が安定的に発現していることが確認できた（別添 15）。また、改変型緑色蛍光タンパク質による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、本遺伝子組換えカイコの複数の世代や個体で同等のシグナルを得ることができる。非遺伝子組換えカイコでは常にシグナルが得られなかったことから、2 μg のゲノム DNA を用いることにより、感度良く、かつ、科学的に信頼性の高い本ゲノムサザンハイブリダイゼーション法により、非遺伝子組換え個体と区別して、本遺伝子組換えカイコを検出することが可能である。

（6）宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ　移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性

本遺伝子組換えカイコでは、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

生理学的及び生態学的特性を調査するために、農家で主に飼育する交雑種を想定して、非遺伝子組換えカイコ系統[中 515 号]遺伝子組換えカイコ系統[GCS500]との交雑種である[中 515 号×GCS500]と、非遺伝子組換えカイコ系統[中 515 号]と[中 514 号]との交雑種である[中 515 号×中 514 号]について、形質を調査・比較した（図 11）。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においては、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。

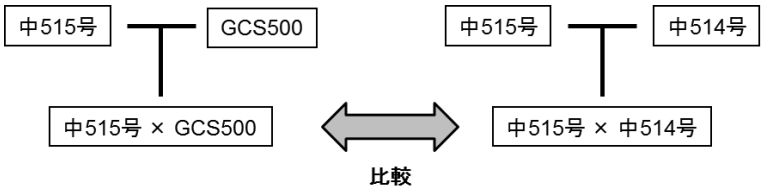


図 11.　生理学的・生態学的特性を比較する対象

【なお、本遺伝子組換えカイコはすでに 3 齢幼虫から繭の生産までの使用についての生物多様性影響評価はなされており、第一種使用規程の承認を受けている。今回は卵のふ化から稚蚕飼育を加えた繭生産の一貫飼育の評価を行うため、隔離飼育区画試験を実施する。】

加えて、遺伝子組換えカイコ（$GCS500_{12}$、$GCS508_{12}$、[中 515 号×GCS500] $_{12}$、[中 517 号×GCS508] $_{12}$）と非遺伝子組換えカイコ（中 514 号、中 515 号、中 516 号、中 517 号、[中 515 号×中 514 号]、[中 517 号×中 516 号]及び[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 31）。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。比較対象としては、遺伝子組換えカイコの 4 系統と遺伝的背景が近い 6 系統（(中 514 号、中 515 号、中 516 号、中 517 号、[中 515 号×中 514 号]、[中 517 号×中 516 号]）及び、標準品種である[日 137 号×支 146 号]を用いた。

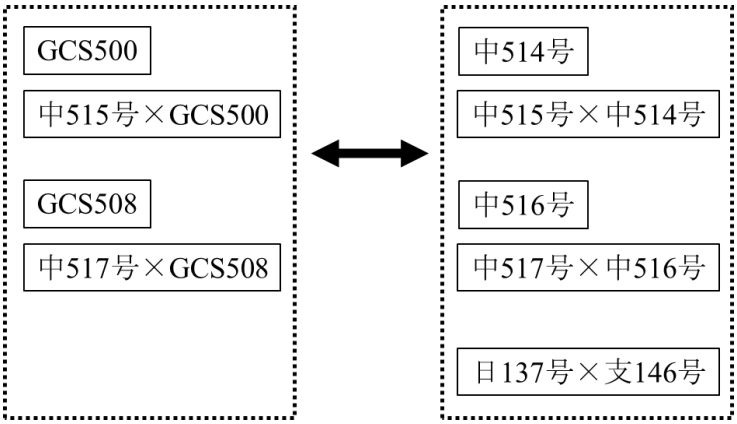


図 12. 生理学的・生態学的特性を比較する追加試験の対象

さらには、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（別添 32）。

① 形態の特性

【幼虫の体重】

一次試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500 及び[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、2 齢期に本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、統計学的な有意差が認められた（別添 17、$P<0.001$）。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、$P>0.1$）。

追加試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[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・繭層重・繭色】

一次試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500 及び[中 515 号×GCS500] の場合

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、本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、繭重も繭層重も本遺伝子組換えカイコの方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、$P < 0.001$）。

繭色は、本遺伝子組換えカイコも対照となる非遺伝子組換えカイコも白色である。繭形はどちらも楕円である。

追加試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508] の場合

繭重では、

・遺伝子組換えカイコ系統のうち、[中 515 号×GCS500] が雌雄ともに一番大きな値を示したが、非遺伝子組換えカイコ系統と比較したところ、中 514 号や中 516 号とは雌雄ともに有意差が認められたが、他の系統とは、雌雄ともに有意差が認められなかった。

・GCS508 がもっとも低い値を示し、[中 514 号×中 515 号]など 4 系統との比較では有意差が認められたが、中 514 号や中 516 号との比較では、雌雄ともに有意差は認められなかった。

・GCS500 および[中 517 号 xGCS508]については、中 514 号や中 517 号との比較では、雌雄ともに有意差は認められなかった。

以上より、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 31）。

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全ての系統の値と統計学的な有意差は認められた（別添 31）。

・GCS500、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508]においては、雌雄ともに有意差が認められたのは[日 137 号×支 146 号]のみであった。

以上により、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 31）。

繭色は、本遺伝子組換えカイコも対照となる非遺伝子組換えカイコも白色である。繭形はどちらも楕円である。

農研機構保有の遺伝資源として公開されている系統情報によると、繭重の最小値が 0.85g、最大値が 2.44g であり、繭層重は最小値が 9.7cg（0.097g）、最大値が 63.4cg（0.634g）である。また、多糸量系統として、繭重 3g、繭層重 100cg（1g）を超える系統が報告されている（小針・山本, 1980）。

本遺伝子組換えカイコの試験結果では、繭重の最小値が、GCS508 の 1.29±0.28g（平均値±標準偏差）で、最大値が[中 515 号×GCS500]の 2.01±0.21g であった。本遺伝子組換えカイコの繭重は、長く養蚕現場で使用され、生物多様性の影響を及ぼすことのないと考えられる非遺伝子組換えカイコの蚕品種の範囲内に入っており、問題ないと考えられた。

繭層重については、最小値が GCS508 の 0.24±0.06g で最大値が[中 515 号×GCS500]の 0.37±0.05g である。本遺伝子組換えカイコの繭層重は、長く養蚕現場で使用され、生物多様性の影響を及ぼすことのないと考えられる非遺伝子組換えカイコの蚕品種の範囲内に入っており、問題ないと考えられた。

【繭糸繊度・染色性】

一次試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500 及び[中 515 号×GCS500] の場合

繭糸繊度は本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、本遺伝子組換えカイコの方が細く、統計学的な有意差が認められた（別添 19、$P < 0.01$）。生糸の強度は本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、本遺伝子組換えカイコの方が 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繊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 本当たりの繭糸の平均本数は本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、本遺伝子組換えカイコの方が 14%多いことになる。従って、本遺伝子組換えカイコの方が生糸の強度が高いとしても、繭糸 1 本当たりでは強度が低くなると考えられる。

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、本遺伝子組換えカイコの方が非遺伝子組換えカイコに比べて L^*値[16]が低く、より濃く染まっていた（別添 19、どちらも $P < 0.01$）。

[16] 色を数値化し空間上の座標や角度などに対応付けた $L^*a^*b^*$色空間の座標。L^*は、明度を表し、100 が完全拡散反射の白の明度、0 がは全く光が反射しない、光を完全に吸収する物体の明度になる。

追加試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508] の場合

追加試験では、繭糸繊度、染色性は調べていない。

② 生育の特性

【孵化歩合・幼虫期間】

一次試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500 及び[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を調査したところ、本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）。

幼虫期間として、孵化幼虫に最初の給餌を行ってから、繭形成開始に伴って給餌を停止するまでの期間を調査したところ、メスでは、本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、本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、雌雄ともに本遺伝子組換えカイコの方が 0.3 日短かった（別添 21、メスで P < 0.01、オスで P = 0.012）。なお、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコはいずれも完全変態を行い、卵・幼虫・蛹・成虫の各段階を経る。

本遺伝子組換えカイコは、対照となる非遺伝子組換えカイコと同様、桑葉又は桑葉を含む人工飼料を幼虫期に摂食して成長する。なお、成虫は摂食も飲水も行わない。

追加試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508]の場合

[中 517 号×GCS508]の孵化歩合が 70.2%と最も低く、全ての非遺伝子組換えカイコ系統との比較で統計学的な有意差が認められた。一方、次に孵化歩合が低かった GCS508(孵化歩合:77.2±9.8%)については、中 514 号あるいは中 515 号と有意差は認められなかった。その他の遺伝子組換えカイコ系統については、非遺伝子組換えカイコ系統の最も高い値と低い値の中間値を示し、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 31）。

幼虫期間については、GCS508 が 22.2 日、GCS500、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508]が 23.2 日であり、非遺伝子組み換えカイコより 1〜2 日ほど短い傾向にあった（別添 31）。

③ 生存能力

【営繭率】

一次試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500 及び[中 515 号×GCS500] の場合

4 齢幼虫の最初から繭を作るまでに至った個体数の割合である営繭率を見ると、本遺伝子組換えカイコが 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、$P = 0.88$）。

追加試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508]の場合

調査した遺伝子組換えカイコ系統の中で、最も高い営繭率を示した系統は GCS500(営繭率:92.5%)であったが、その値は非遺伝子組換えカイコ系統の中で最も高い営繭率を示した系統である[中 517 号 x 中 516 号]や[日 137 号 x 支 146 号] (営繭率:96.5%)よりも低いものであった（別添 31）。

④　運動能力

【幼虫の移動度】

孵化幼虫が移動する範囲を比較するため、半径 10 cm の円を描いた紙の中心に幼虫を 30 頭ずつ置いて 30 分後に中心からの距離を計測したところ、GCS500 と[中 517 号×GCS508]は非遺伝子組換えカイコと比較して有意差が認められなかったが、[中 515 号×GCS500]と GCS508 は、比較対象と比べ平均移動距離が短かった（別添 23、$P < 0.01$）。同様に、2 齢幼虫を 10 頭ずつ置いて 60 分後に中心からの距離を計測したところ、GCS500 は有意に平均移動距離が短かったが、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508]は、非遺伝子組換えカイコと比較して有意差が認められなかった（別添 23）。

5 齢幼虫では、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。[中 515 号×GCS500]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 24、$P = 0.97$）。

⑤　繁殖様式

【産卵数・産卵する範囲】

一次試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500 及び[中 515 号×GCS500] の場合

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。本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、本遺伝子組換えカイコの方が少なく、統計学的な有意差が認められた（別添 25、P < 0.001）。

メス成虫が産卵する範囲を比較するため、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、本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 26、P = 0.085）。

追加試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508]の場合

産卵数について、GCS500 が 564.0 個と最も多かったが、非遺伝子組換えカイコと比較したところ、中 516 号や中 517 号、中 517 号×中 516 号とは有意差が認められなかった。また、最も平均産卵数が少なかった GCS508 は、中 514 号や中 515 号などとは有意差が認められず、[中 515 号 xGCS500]や[中 517 号 xGCS508]については調査したすべての非遺伝子組換えカイコ系統と有意差は認められなかった（別添 31）。

⑥　脱皮・変態・休眠等

一次試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500 及び[中 515 号×GCS500] の場合

追加試験結果　遺伝子組換えカイコ：GCS500、GCS508、[中 515 号×GCS500] 、[中 517 号×GCS508]の場合

遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコの幼虫脱皮の回数はともに 4 回であった。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すると休眠卵を産んだ。以上のことから、内分泌系ホルモンの制御機能について、遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に違いはないと考えられた。

⑦　クワコとの交雑の可能性

一般的な養蚕農家の施設を模して農研機構及び群馬県蚕糸技術センターに設置した隔離飼育区画において、クワコ成虫の侵入を防ぐために飼育室の窓に網を設置するなど一定の交雑防止措置を講じつつ、本遺伝子組換えカイコの第一種使用等の内容に沿って 4 齢幼虫から繭の収穫までの各過程において、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの行動や生育等の特性を比較しながらカイコとクワコの交雑可能性を以下の通り調査した（別添 32）。

ａ）幼虫の飼育

養蚕農家の飼育段階において本遺伝子組換えカイコ及び対象の非遺伝子組換えカイコの行動等の特性を詳細に調査するため、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 32【調査方法】）。

いずれの隔離飼育区画においても、本遺伝子組換えカイコは対照の非遺伝子組換えカイコとの間で行動特性において特段の違いは見られず、農研機構の隔離飼育区画では、摂食期の幼虫が飼育容器外で見つかった個体数は、本遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 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 32【結果】A（1）, p65）。また、摂食を停止して繭を形成する前（熟蚕期）の幼虫が飼育容器外で見つかった個体数は、本遺伝子組換えカイコで 0～2 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 32【結果】A（1）, p65）。

同様に、群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画では、幼虫が飼育容器外で見つかった個体数は、摂食期には、1 回・1 室あたり本遺伝子組換えカイコの比較用試験区で飼育数 4,774～5,986 頭のうち 0 頭（0%）、本遺伝子組換えカイコの繭生産用試験区で飼育数 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 32【結果】B（1）, p74）。また、熟蚕期には、本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（0～002%）であった（別添 32【結果】B（1）, p74）。

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

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、本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 32【結果】A（1）, p65）。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、本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 月は本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、そのために本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本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 32【結果】A（2）, p67）、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 32【結果】A（3）, p71）。

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 室あたり本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%）、本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 32【結果】B（1）, p74）。2018 年 7 月には、本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本遺伝子組換え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 32【結果】B（2）, p77）、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 32【結果】B（3）, p81）。

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 32【結果】A（1）, p65）。

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 32【結果】B（1）, p74）。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蔟（まぶし）に幼虫を移して天井から懸垂し、そのまま飼育室内で繭を作らせる上蔟を行った。

農研機構の隔離飼育区画では、繭を作らせるための容器である蔟の中で繭を形成したのは、本遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 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 32【結果】A（2）, p67）。一方、蔟の下に幼虫が落ちて繭を作ったのは、本遺伝子組換えカイコで 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%）、天井から蔟を懸垂している器具を伝って蔟の上に幼虫が登って繭を作ったのは、本遺伝子組換えカイコで 0～19 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 32【結果】A（2）, p67）。蔟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、本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蔟に移すのに適した個体が最も多くなる時間が上蔟日の夜になっていて、蔟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、蔟に移すのが早かったカイコが落下しても、再び蔟に移せば繭を形成する場合が多いので、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、蔟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、蔟から落下した幼虫を毎日回収して健全な幼虫は蔟に戻し、生育不良の幼虫は廃棄するという方法で繭を作らせており、蔟の中に繭を形成したのは､1 回･1 室あたり本遺伝子組換えカイコで飼育数 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 32【結果】B（2）, p77）。蔟の上に繭を作ったのは、本遺伝

子組換えカイコでも非遺伝子組換えカイコでも 0 頭（0%）であった（別添 32【結果】B（2），p77）。蔟の中に繭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、上蔟の前までの飼育中に死亡して繭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、これら上蔟の過程において、飼育室内で本遺伝子組換えカイコも非遺伝子組換えカイコも成虫が生じるようなことはなかった。

ｃ）飼育残渣

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

農研機構の隔離飼育区画では、飼育残渣の飼育室からの搬出前に飼育残渣中に見つかった繭の数は、本遺伝子組換えカイコで 1 回あたり飼育数 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 32【結果】A（4），p71）。この中には、幼虫も見つかったが、いずれも生育不良か死亡しており、繭を作ることができる状態のものではなかった。

また、その後、飼育残渣を網で覆って 30 日後まで管理したが、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、羽化した跡のある繭 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 32【結果】A（4），p71）。

群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画では、飼育残渣を飼育室に隣接する残渣処理室に運び、粉砕機で飼育残渣を粉砕することとし、当該粉砕前に飼育残渣の中のクワの枝を 1 本ずつ確認したところ、見つかった繭は、1 回・1 室あたり本遺伝子組換えカイコで飼育数 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、本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 32【結果】B（4），p81）。

また、粉砕機による不活化の程度を確認するため、別に、非遺伝子組換えカイコの繭や幼虫を飼育残渣に意図的に混入させて粉砕機による不活化試験を実施した。具体的には、クワの枝 2 kg または食べ残しの葉と糞 2.5 kg に 4 齢幼虫 200 頭を混入させた場合、クワの枝 2 kg または食べ残しの葉と糞 2 kg に 5 齢幼虫 20 頭を混入させた場合、クワの枝 2 kg または

食べ残しの葉と糞 2 kg に繭 10 個を混入させた場合について、カイコの不活化の程度を確認したが、いずれも、幼虫や繭は確実に裁断又は圧殺されて生存個体は認められなかった。

d）モニタリング

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

農研機構では 2016 年からの 3 年間で計 239 頭、群馬県蚕糸技術センターでは 2016 年からの 3 年間で計 688 頭が捕獲された（別添 32【結果】A（5）, p72、B（5）, p83）。

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 32【結果】A（5）, p72、B（5）, p83）。

以上により、非遺伝子組換えカイコに比べて遺伝子組換えカイコがクワコと交尾する機会が高まる可能性はないと考えられた。

また、万一、飼育容器から逸出し、野生動物の捕食を免れてカイコのメス成虫が野外に生じたと想定し試験を行った報告が以下のとおりである。

1) 飼育中のカイコ成虫発生の可能性については、飼育室内で成虫が生じたことはなく、飼育残渣についても、網で覆って管理したり、粉砕処理したりすることにより、クワコとの交雑は認められなかった（別添 29、30）。
2) 野生動物による捕食の可能性については、カイコの 4 齢幼虫 500 頭と 5 齢幼虫 800 頭を屋外で飼育したところ、すべて鳥や昆虫に捕食されて成虫が生じることがなく、カイコのメス成虫 200 頭を屋外に置いた場合も、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（河本ら, 2014）。
3) 仮にカイコのメス成虫とクワコのオス成虫の偶発的な交尾が生じ、カイコのメス成虫が飼育室内又は野外に置かれた飼育残渣内で産卵したとしても、カイコのメス成虫はまったく飛翔できず、歩行能力も弱いなど、狭い範囲に産卵することから、それら交雑卵から幼虫が孵化することを想定して、実際に野外の桑樹から 2 m の地面に交雑個体の孵化幼虫 2,964 頭を置き、その後の生存調査を行ったが、桑樹まで到達し桑葉を摂食して生育した個体は全く観察されなかった（Kômoto *et al.*, 2016; 別添 8）。

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可能性はないと考えられた。

⑨　有害物質の産生性

飼育残渣を屋外に廃棄した場合に、そこに含まれる本遺伝子組換えカイコの糞や死体が植物に影響を与える可能性があるかどうか、ブロッコリーの発芽・生育に与える影響を調査したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に差は認められなかった（別添 27）。同様に、土壌微生物に与える影響についても調査したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間に有意差は認められなかった（別添 28）。

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、2021 年の 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、2021 年のアレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database（FARRP）、ver. 20、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。

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、2021 年の 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、2021 年のアレルゲンデータベース（Food Allergy Research and Resource Program Database（FARRP）、ver. 20、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。

本申請において飼育残渣を廃棄する際、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遺伝子組換えカイコは極めて少量であると考えられ、脊椎動物等が捕食することによる有害物質の影響は想定されない。

ハ　遺伝子組換えカイコと宿主の属する分類学上の種との識別の方法

本遺伝子組換えカイコは眼に改変型緑色蛍光タンパク質を発現することから、目視等により、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の挿入された遺伝子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

本申請では、①高染色性絹糸の特性・加工法を調査・研究するための材料を確保すること、並びに、②養蚕農家における繭生産を想定して生育経過等の調査を行うこと、を目的として、隔離飼育区画における幼虫（催青処理開始後の卵を含む）の飼育、繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為を行うものである。

（１）　使用等の内容

①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為。

（２）　使用等の方法

隔離飼育区画の所在地：茨城県つくば市大わし 1 番 2

隔離飼育区画の名称：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構　遺伝子組換えカイコ飼育調査区画

使用等期間：承認日から令和 9 年 3 月 31 日まで

隔離飼育区画内の施設の内容：別に定める「隔離飼育区画の施設内容及び受容環境（別紙 1）」のとおりとする。

隔離飼育区画の要件：

1.　次に掲げる設備を有すること。

(1) 施設内への部外者の立入りを防止するため、遺伝子組換えカイコを隔離して飼育するための遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）を取り囲むようにネット（高さ 4 m）を設置し、その外側に金属製フェンス（高さ 1.5 m）を設置している。

(2) 遺伝子組換えカイコを飼育する区画であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

(3) 隔離飼育区画内の稚蚕飼育室は屋根、壁及び戸を備え、前室、空調を設備し、出入口以外に開閉可能な窓はない。隣接する壮蚕室へは、引き戸から入室が可能である。給排気口はない。

(4) 隔離飼育区画内の壮蚕飼育室は屋根、壁、戸及び窓を備え、開閉可能な窓、シャッター及び換気口には 4 mm 目以下の網を張っている。

(5) 壮蚕用飼育室及び稚蚕用飼育室は、建築基準法（昭和 25 年法律第 201 号）第 6 条第 1 項の規定に係る自治体における適合を満たしている。

(6) 不活化処理で用いる冷凍庫（-30℃～-20℃設定）又は乾燥機（60℃設定）の設置は、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（平成 15 年法律第 97 号）に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた区画とする。

2. 次に掲げる事項を遵守すること。

(1) 別に定める作業要領（別紙 2）に従う。

(2) 別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。

(3) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

イ　施設の地図及び設備の配置図

別紙 1 を参照。

ロ　隔離飼育区画試験の計画

隔離飼育区画試験の計画を参照。

（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

―

第二　項目ごとの生物多様性影響の評価

１．　競合における優位性

（1）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

カイコは、日本国内においても長期間使用等の歴史があるが、これまでに日本を含めてカイコが野外に逸出して自然条件下で繁殖している例は報告されていない。カイコは、人間の管理が行き届かない野外に放置されると、

① 幼虫は、歩き回ることがなく、食草である桑に到達することができない（森、1995）。
② 近縁野生種であるクワコとは異なり、擬態のための体色や斑紋を欠いており、桑樹に登って隠れることもできず、頭部・胸部を持ち上げて静止することで枝に擬態する行動も執らないこと（別添 1）などから、鳥や昆虫に速やかに捕食される（河本ら, 2014; 下田・金勝, 2016）。
③ オス成虫が生じても、飛ぶことが全くできないため、離れた場所にいるメス成虫に到達することができず、交尾する機会がほとんどない。
④ メス成虫が生じても、速やかにアリ等に捕食されること等、交尾・産卵する機会がほとんどない（河本ら, 2014; 下田・金勝, 2016）。

以上のことから、カイコが自然条件下で生存・繁殖する可能性は低い。

また、食草を同じくするクワコと比べても、カイコは、幼虫時の移動能力が低く、成虫は飛翔できない。さらに、クワコとの交尾率が低い（中村ら、1997; 飯塚・行弘、2007）など、自然条件下での生育・繁殖においては不利な性質を有していることから、クワコに対して競合における優位性を示すことはない。

本遺伝子組換えカイコは、改変 Fibroin H タンパク質を絹糸に含むが、このタンパク質は絹糸腺で発現して、宿主である非遺伝子組換えカイコに比べて繭糸を 10%程度細くしたり染色性を高めたりするなど物性を改変するにすぎず、幼虫の運動性を高めたり成虫に飛翔能力を付与したりすることもないことから、カイコの競合における優位性を高めることはない。また、遺伝子組換え個体の選抜マーカーである改変型緑色蛍光タンパク質も、幼虫や成虫の眼に緑色蛍光を付与するにすぎず、カイコの競合における優位性を高めることはない。

宿主である非遺伝子組換えカイコ（[中 515 号×中 514 号]）と本遺伝子組換えカイコ（[中 515 号×GCS500]）との間で生理学的特性について検討したところ、幼虫体重（2 齢期、別添 17）・繭重及び繭層重（別添 18）・産卵数（別添 25）については本遺伝子組換えカイコの

方が非遺伝子組換えカイコに比べて統計学的に有意に小さく、幼虫体重（2 齢期以外、別添 17）・産卵範囲（別添 26）・孵化歩合（別添 20）・営繭率（別添 22）については本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で有意差は認められなかった。幼虫の行動については、1 齢幼虫の分散性では、[GCS500×中 515 号]と[中 514 号×中 515 号]との間、GCS508 と中 516 号との間で有意差が認められたが、2 齢幼虫、5 齢幼虫では有意差が認められなかった（別添 23, 24）。繭糸繊度は本遺伝子組換えカイコの方が統計学的に有意に細かった（別添 19）。複数の繭から繰糸して繊度を揃えた生糸の強度は本遺伝子組換えカイコの方が統計学的に有意に高かったが、繭糸 1 本当たりでは低いと考えられた（別添 19）。幼虫期間については本遺伝子組換えカイコの方が、非遺伝子組換えカイコに比べて雌雄ともに統計学的に有意に短かった（別添 21）が、その差は 0.3 日程度であり、このことが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、農研機構及び群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画において、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で生理学的特性について調査したところ、繭重・繭層重ともに本遺伝子組換えカイコの方が非遺伝子組換えカイコより重い場合も軽い場合も、またほぼ同程度の場合もあり、幼虫期間については本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコで同じだった（別添 32）。幼虫期間を個体別に調査した結果（別添 21）で本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとでは幼虫期間に 0.3 日の違いがあったが、これは各個体が実際に繭を作り始めた日を調査したものであり、隔離飼育試験において、翌日までに繭を作り始めると考えられる個体の割合を飼育容器ごとに目視で確認した上でまとめて蔟に移す場合には影響が生じなかったと考えられる。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（２）影響の具体的内容の評価

―

（３）影響の生じやすさの評価

―

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

２．　捕食性

（１）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

カイコは幼虫期に人為的に与えられた桑葉又は人工飼料のみを摂食して成長し、桑葉以外の植物や昆虫等を捕食することはない。また、カイコ幼虫の運動能力は著しく低く、野外に逸出して桑樹を登り、野外で桑葉を摂食して生育した例はこれまで報告されていない。さらに、成虫は摂食や飲水は一切しない。

本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に改変 Fibroin H タンパク質を絹糸腺及び繭糸で発現するほか、選抜マーカーとして幼虫の単眼で改変型緑色蛍光タンパク質を発現するが、これらのタンパク質がカイコ幼虫の食性を変化させたり捕食能力を高めたりす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は、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、捕食性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（２）影響の具体的内容の評価

―

（３）影響の生じやすさの評価

―

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区

画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、捕食性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

３．　有害物質の産生性

（１）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

カイコは、弥生時代から日本国内で飼育されているが、これまで野生動植物等の生育に悪影響を及ぼすような有害物質が産生されているとの報告はない。また、養蚕農家においては、飼育中に生じる桑葉等の残渣やカイコの糞・死体などを、敷地内に掘った穴や桑畑に廃棄することが一般的に行われているが、それらの排泄物等が野生動植物等に有害性をもたらすとの報告もない。

本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に改変 Fibroin H タンパク質を絹糸腺で発現するほか、選抜マーカーとして改変型緑色蛍光タンパク質を眼で発現するが、タンパク質としての特性から考えても、土壌中に混入した場合に他の生物に影響を与えるとは想定されない。また、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコの糞や死体を土壌中に混合し、植物の発芽・生育や土壌微生物に与える影響を比較検討したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった（別添 27 及び 28）。また、本遺伝子組換えカイコが発現する改変 Fibroin H 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特異的に相同性のあるアミノ酸配列を持たないことや、他の物質を変化させるような酵素活性を有しておらず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こと、飼育残渣に含まれて屋外に廃棄される本遺伝子組換えカイコがあったとしてもきわめて少量であると考えられること等から、捕食動物への影響も考えられない。

以上のことから、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（２）影響の具体的内容の評価

—

（３）影響の生じやすさの評価

—

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

４．　交雑性

（１）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

カイコと交雑可能な近縁野生種としてはクワコとインドクワコ *Bombyx huttoni* が報告されているが、日本国内に分布している昆虫は、北海道からトカラ列島の悪石島まで生息しているクワコのみである（河原畑, 1998; 廣森, 2001; 金井ら, 2013; 別添 1 及び 2）。したがって、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコが特定された。

（２）影響の具体的内容の評価

カイコとその近縁野生種であるクワコとの間では、人為的に交尾させれば交雑個体が生じ（河原畑、1998）、後代において妊性も確認されている（児玉、1927; 見波・大場、1939; 別添 7）。したがって、交雑性に関する具体的な影響としては、本遺伝子組換えカイコ由来の赤色蛍光タンパク質―フィブロイン H 鎖融合タンパク質遺伝子及び改変型緑色蛍光タンパク質遺伝子が当該交雑個体からクワコの集団に浸透し、定着する可能性が考えられた。

（３）影響の生じやすさの評価

日本では、養蚕が弥生時代に中国から伝えられて以降、日本各地でカイコが飼育されてきた（日本蚕糸学会, 1992; 森, 1995; 河原畑, 1998）。特に 20 世紀前半には生糸が重要な輸出産品となり、1930 年には全国の農家の約 4 割が養蚕業に従事し、蚕室へのクワコの侵入な

どを特に防止することなくカイコの飼育が行われてきたが、これまでにカイコとクワコの交雑個体が自然環境下で見つかったとの報告はない。

カイコを飼育している養蚕農家 5 戸（群馬県前橋市）の周辺で 3 年間に渡ってフェロモントラップを用いて捕獲したクワコ 3,750 頭を調査した結果では、カイコとクワコの交雑個体は見つかっておらず（Kômoto *et al.*, 2016; 別添 6）、実際、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も、カイコからクワコへの遺伝子流入は見つからなかった（Yukuhiro *et al.*, 2012a, b, 2017; 別添 5）。

なお、自然環境下において、仮に、クワコとカイコとの交雑を想定した場合であったとしても、カイコ成虫は雌雄ともに飛翔できないほか、カイコのオス成虫がクワコのメス成虫の性フェロモンを感知して交尾行動を起こしたとしても、カイコのオス成虫はフェロモン源にむかって小刻みにジグザグ歩行をしながら進む（神崎, 1993）こととなるため、野外の桑樹の幹を歩いて登り、樹上のクワコのメス成虫と交尾することはおよそできないと考えられる。このため、自然環境下で仮にそのような交尾を想定する場合には、クワコのオス成虫がカイコのメス成虫の放出する性フェロモンに誘引され、交尾が成立する可能性を念頭に置くことが適当である。

自然環境下でカイコからクワコへの遺伝子流入が見つからない要因は以下のように考えられる。

① 一般的な養蚕農家でのカイコの飼育が繭の形成までに限定されるほか、収穫された繭（蛹を含む。）は製糸工場で熱乾燥処理されて不活化されるため、養蚕農家では、交尾可能な成虫を取り扱うことがない。

② カイコ幼虫の運動性は極めて低く、餌（桑葉）がなくても移動しないことから、飼育室の外に逃亡することはなく、仮に野外に出たとしても桑樹に到達して生育することもなく、鳥や昆虫等にも容易に捕食されて生き残ることがきわめて難しい。

③ 飼育室内や飼育残渣の中に幼虫や繭が残されて成虫が羽化したとしても、カイコ成虫は飛翔能力がなく歩行能力も極めて低いため、鳥や昆虫等に容易に捕食されて生き残ることが難しい。

④ 仮に、それら野生動物の捕食を免れてカイコのオス成虫が野外に生じたとしても、樹上にいるクワコのメス成虫が発する性フェロモンを感知してその方向に移動しようとしても、飛翔能力がないため到達できないため、交尾は不可能である。

⑤ 万一、野生動物の捕食を免れてカイコのメス成虫が野外に生じたとしても、飛翔能力が全くなく歩行能力も極めて低いため、蚕室内や飼育残渣の中に休眠卵を産下するに過ぎず、万一、そこから交雑第一代の幼虫が孵化しても、周辺の桑樹に到達して生存することができない。

加えて、本遺伝子組換えカイコに導入した遺伝子は、絹糸腺や繭糸に改変フィブロイン H 鎖タンパク質を発現させたり、眼で改変型緑色蛍光タンパク質を発現させたりするものであり宿主の繁殖能力を高めることはない。実際、本遺伝子組換えカイコと対照の非遺伝子組換えカイコの繁殖特性を調査したところ、産卵範囲には統計学的な有意差は認められなかった（別添 26）が、産卵数について本遺伝子組換えカイコの方が非遺伝子組換えカイコに比べて統計学的に有意に小さく、本遺伝子組換えカイコの方が繁殖能力が劣る可能性が示唆された（別添 25）。

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

第三　生物多様性影響の総合的評価

宿主の属する分類学上の種であるカイコ（*Bombyx mori*）は、日本において弥生時代以降、長期にわたる飼育経験がある中で、自然環境下への定着や有害物質の産生性は認められない。

競合における優位性：

宿主であるカイコは、人間の管理が行われない野外に放置されると、速やかに捕食されて死亡することや、擬態に必要な斑紋・行動を欠いていること、移動能力が低いことなどから、生存・繁殖することがない。また、食草を同じくする近縁野生種であるクワコと比べても幼虫や成虫の移動能力が低いことなど、自然条件下で生育・繁殖に不利な性質を有していることから、野生のクワコに対して競合における優位性を示すことはない。

本遺伝子組換えカイコは、改変フィブロイン H 鎖タンパク質を絹糸に含み、改変型緑色蛍光タンパク質を眼で発現するが、これらのタンパク質が競合における優位性を高めることはない。宿主である非遺伝子組換えカイコと本遺伝子組換えカイコとの間で生理学的・生態学的特性について検討したところ、幼虫体重（2 齢期）及び産卵数については本遺伝子組換えカイコの方が統計学的に有意に小さいほか、幼虫体重（2 齢期以外）・産卵範囲・孵化歩合・営繭率・幼虫の行動範囲については統計学的に有意な差がなかった。繭重及び繭層重については本遺伝子組換えカイコの方が小さかった。繭糸繊度については本遺伝子組換えカイコの方が統計学的に有意に細かった。生糸強度については本遺伝子組換えカイコの方が統計学的に有意に高かったが繭糸 1 本当たりでは低くなると考えられた。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

捕食性：

宿主であるカイコは幼虫期に人為的に与えられた桑葉のみを摂食する。また、カイコ幼虫が野外で桑葉を摂食している例はこれまで報告されていない。さらに、成虫は摂食及び飲水は一切しない。

本遺伝子組換えカイコは、改変フィブロイン H 鎖タンパク質を絹糸に含み、改変型緑色蛍光タンパク質を眼で発現するが、これらのタンパク質がカイコ幼虫の捕食性を高めるこ

とはない。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、捕食性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されなかったことから、生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

有害物質の産生性：

宿主であるカイコは、弥生時代から日本国内で飼育され、養蚕農家で生じる糞や死体を含む残渣を敷地内に掘った穴や桑畑に廃棄することが一般的に行われているが、これまで、野生動植物等の生育に悪影響を及ぼすような有害物質を産生しているとの報告はない。

本遺伝子組換えカイコは、改変フィブロイン H 鎖タンパク質を絹糸に含み、改変型緑色蛍光タンパク質を眼で発現するが、どちらのタンパク質も、その特性から考えても、土壌中に混入した場合に他の生物に影響を与えるとは想定されない。また、糞や死体を土壌中に混合したところ、植物の発芽・生育や土壌微生物に与える影響は、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコとの間で統計学的に有意な差は認められなかった。

以上のことから、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

交雑性：

カイコと交雑可能な近縁野生種として日本国内に分布している昆虫はクワコのみであり、交雑性に起因して影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコが特定された。

カイコとクワコは、メス成虫が放出する性フェロモンが同一であるため、カイコのメス成虫とクワコのオス成虫を人為的に出会わせれば交尾して交雑個体を生じることができるが、一般的な養蚕農家の周辺でクワコとカイコの交雑第一代は認められなかったことや、日本各地のクワコにカイコからの遺伝子流入は見つかっていないことから、現在行われている養蚕の現場において、交雑が起きていないか、極めて稀であると考えられる。

一般的な養蚕農家では、繭（蛹）までしかカイコを飼育しないほか、収穫した繭は製糸工場で熱乾燥処理により不活化するため、成虫を生じさせることがない。また、養蚕に用いるカイコの卵（蚕種）は、通常、専門の蚕種製造業者が生産する。一般的に、蚕種製造業者は、

蚕種製造に用いる原種の幼虫の飼育を分場農家に委託する。分場農家では蚕種製造に必要な原種の飼育を行い、生産した繭（蛹）は上蔟後 10 日余りで、蚕種製造業者に運び入れるため、分場農家において成虫を生じさせることはない。

もし成虫が生じたとしても、屋外では鳥や昆虫類に速やかに捕食されることから生存することは難しい。その上で、カイコのメス成虫が生き残ってクワコのオス成虫と交尾して産卵したとしても、交雑第一代の幼虫が孵化するのは屋外に廃棄した飼育残渣等の中であり、そこから周辺の桑樹に到達して生存することは考えられない。

本遺伝子組換えカイコの幼虫の行動範囲及びメス成虫の産卵範囲は、非遺伝子組換えカイコとほぼ同程度又は狭い場合があり、本遺伝子組換えカイコがクワコと交尾する可能性が高まることはない。

仮に、本遺伝子組換えカイコのメス成虫と野生のクワコのオス成虫が交尾して交雑個体が生じたとしても、絹糸腺や繭糸での改変フィブロイン H 鎖タンパク質の発現や、眼での改変型緑色蛍光タンパク質の発現が、自然環境下での競合における優位性を高めるとは考え難く、その交雑個体が野生のクワコ集団において優占化する可能性は低いと考えられた。

以上のことから、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

よって、総合評価として、本遺伝子組換えカイコは、本申請における作業要領に従って隔離飼育区画における、①催青処理開始後の卵の保管、運搬及び孵化、②幼虫の飼育（孵化直後から繭の形成まで）、③繭の生産、④幼虫及び繭の保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びに①から④までに付随する行為の範囲内では、日本国内の生物多様性影響を生ずるおそれはないと結論された。

引用文献リスト

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

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

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

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

Horn C. and Wimmer E. A. (2000) A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev.Genes Evol.*, 210, 630-637.

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

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

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.

Linnæus C. (1758) Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, sysnonymis, locis. Tomus I. Editio decima, reformata. - pp. [1-4], 1-824. Holmiæ. (Salvius).

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

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

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

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

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

Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 247-253.Yang T.-T., Cheng L., and Kain S. R. (1996) Optimized codon usage and chromosome mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein *Nucleic Acids Res.*, 24, 4592-4593.

Xia Q., Guo Y., Zhang Z., Li D., Xuan Z., Li Z., Dai F., Li Y., Cheng D., Li R., Cheng T., Jiang T., Becquet C., Xu X., Liu C., Zha X., Fan W., Lin Y., Shen Y., Jiang L., Jensen J., Hellmann I., Tang S., Zhao P., Xu H., Yu C., Zhang G., Li J., Cao J., Liu S., He N., Zhou Y., Liu H., Zhao J., Ye C., Du Z., Pan G., Zhao A., Shao H., Zeng W., Wu P., Li C., Pan M., Li J., Yin X., Li D., Wang J., Zheng H., Wang W., Zhang X., Li S., Yang H., Lu C., Nielsen R., Zhou Z., Wang J., Xiang Z., Wang J. (2009) Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx*). *Science*, 326, 433-436.

Yang T.-T., Cheng L., and Kain S. R. (1996) Optimized codon usage and chromosome mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein *Nucleic Acids Res.*, 24, 4592-4593.

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

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

Yukuhiro K., Sakaguchi H., Kômoto N., Tomita S., and Itoh M. (2017) Three single nucleotide polymorphisms indicate four distinctive distributions of Japanese *Bombyx mandarina* populations. *J. Insect Biotechnol. Sericol.*, 86, 77-84.

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.

池田真琴・白井孝治・金勝廉介・三浦幹彦・Edwards J.・木口憲爾（2009）カイコの繭形形成行動：幼虫体節の運動制約が吐糸営繭行動に及ぼす影響.　蚕糸・昆虫バイオテック　78, 141-149.

江崎悌三・一色周知・六浦晃・井上寛・岡垣弘・緒方正美・黒子浩（1971）原色日本蛾類図鑑（下巻）　12-13、保育社

岡田英二・中島健一・井波勇二・橋本好二・飯塚哲也（2016）新しい極細繊度品種「白麗」の育成と性状.　日本シルク学会誌　24, 11-16.

加藤幸三郎（1994）蚕糸業.　日本大百科全書　10 巻　394、小学館

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.
神崎亮平（1993）性フェロモン源への雄蛾の定位行動．　植物防疫　47, 19-24.
小池啓一・町田龍一郎・森上信夫・小野展嗣・田辺力・筒井学（2002）小学館の図鑑 NEO 昆虫　132、小学館
小泉二郎・塩見昭男・小針洋子（1962）家蚕における羽化の早晩と産卵速度．　蚕糸研究 40, 7-10.
河本夏雄・津田麻衣・岡田英二・飯塚哲也・桑原伸夫・瀬筒秀樹・田部井豊（2014）遺伝子組換えカイコの飼育における生物多様性影響の評価手法の構築．　蚕糸・昆虫バイオテック　83, 171-179.
児玉彌曾衛（1927）家蚕と野蚕の交配．　佐久良会雑誌　21, 59-64.
小針要吉・山本俊雄（1980）夢のジャンボ繭品種．　蚕糸科学と技術 19 (1): 36-39.
蚕糸・昆虫農業技術研究所（1995）蚕の飼育者便覧（未定稿）
下田みさと・金勝廉介（2016）カイコ幼虫の歩行距離と野外での生存の可能性．　蚕糸・昆虫バイオテック　85, 145-151.
大日本蚕糸会（2007）カイコからのおくりもの カイコとあそぼう・シルクでつくろう、財団法人大日本蚕糸会
大日本蚕糸会（2013）蚕糸絹情報　第 1 回蚕糸絹業提携確立技術・経営コンクール　農林水産大臣賞受賞者は、山梨県芦澤定弘氏に決定．　シルクレポート No.32, 20-22.
大日本蚕糸会（2020）シルクレポート No.65
大日本蚕糸会（2021）シルクレポート No.68
大門高明（2014）カイコガ亜科のバイオロジーと性フェロモン．　蚕糸・昆虫バイオテック　83, 105-114.
高見丈夫（1969）蚕種総論、全国蚕種協会
竹内孝三（1954）四眠交雑種から発現した三眠蚕について．　日本蚕糸学雑誌　23, 83-88.
鶴井裕治・飯田のり子・常楽千恵子・常山泉（2010）養蚕、財団法人大日本蚕糸会 蚕業技術研究所
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.
ナショナルバイオリソースプロジェクト（2018）https://silkworm.nbrp.jp/
日本蚕糸学会編（2002）改訂蚕糸学入門、財団法人大日本蚕糸会
日本製糸技術経営指導協会編（1993）蚕糸業のあらまし　ーシルク産業の姿ー．　はじめてシルクを作る人のほん　ー製糸技術の基礎知識ー、日本製糸技術経営指導協会
農業生物資源ジーンバンク（2018）https://www.gene.affrc.go.jp/

農林水産省生産局生産流通振興課（2009）平成 20 年度 蚕業に関する参考統計

農林水産省農産園芸局（1998）特徴ある蚕品種―「中 514 号×中 515 号（愛称：はくぎん）」、技術資料 134, 3-4.

范作冰（2013）蚕糸絹業の国際比較分析、農林水産政策研究所セミナー資料（2013 年 8 月 20 日）、http://www.maff.go.jp/primaff/koho/seminar/2013/attach/pdf/130820_01.pdf

伴野豊（2010）クワコの形質特性-カイコとの比較研究を中心に- 蚕糸･昆虫バイオテック 79(2), 87-95.

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.

福田紀文（1979）総合蚕糸学、日本蚕糸新聞社

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

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

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

森精 編著（1995）カイコと教育・研究、サイエンスハウス

目黒友（2010）福島県の養蚕の歴史と目指す方向～ 今が旬・ふくしまの繭 ～. シルクレポート No.10. 35-39

柳沼利信（2015）カイコ胚休眠の研究 ー特に筆者の見聞を中心にー. 蚕糸・昆虫バイオテック 84, 99-118.

山本俊雄, 間瀬啓介, 長坂幸吉, 岡田英二, 伊坪友子, 宮島たか子, 榎島守利, 熊井敏夫, 和泉清二（1999）極細繊度蚕品種「はくぎん」の育成, 日本蚕糸学雑誌 68(2), 125-132.

横山桐郎（1929）最新日本蚕業害虫全書、明文堂

吉武成美（1988）家蚕の起源と分化に関する研究序説、東京大学農学部養蚕学研究室

緊急措置計画書

令和５年１月２５日

申請者　国立研究開発法人農業･食品産業技術総合研究機構
氏名　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

申請者　群馬県蚕糸技術センター
氏名　所長　桑原伸夫
住所　群馬県前橋市総社町総社２３２６番地２

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、GCS508、中 515 号×GCS500、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

本計画書の末尾に記載する国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構遺伝子組換え安全委員会（カイコ第一種使用等）（以下「農研機構遺伝子組換え安全委員会」という。）の指示の下、具体的な緊急措置は以下の体制で実施する。

（令和 5 年 1 月現在）

実験・業務等安全主任者	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係長
実験・業務等責任者	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
実験・業務等従事者	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係
〃	【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター	蚕糸研究係

〃　　【個人情報につき非開示】　群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係

〃　　【個人情報につき非開示】　群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係

（以上は現時点での体制及び責任者であり、異動や所内での業務体制の見直しによる変更の際には適切な対応を行う。）

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野生のクワコとの交雑個体の発生の有無

本申請におけるモニタリング計画書に基づき、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交雑個体の発生の有無を確認し、その結果を農研機構遺伝子組換え安全委員会及び群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換え実験・業務等安全委員会（以下「群馬安全委員会」という。）に報告する。

（2）気象災害等による隔離飼育区画の設備等の被害状況

気象災害等が発生した場合は、業務従事者は速やかに群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）の設備等の被害状況及び隔離飼育区画の外への本遺伝子組換えカイコの逸出の有無を確認し、その結果を農研機構遺伝子組換え安全委員会及び群馬安全委員会に報告する。

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、生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、農研機構遺伝子組換え安全委員会及び群馬安全委員会で内容について確認を行い、業務従事者にその旨を直接口頭で伝え、本件に関する事実を記録する。また、直ちにその内容を周知するために隔離飼育区画のある自治体に電話、ファックス、電子メール、文書などにより連絡する。さらに必要に応じて本件についてホームページ等で周知する。

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

（1）本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が観察された場合

フェロモントラップを用いたモニタリング等の結果、本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が観察された場合は、隔離飼育区画における本遺伝子組換えカイコの飼育を直ちに中断する。遺伝子組換えカイコ及びこれと同時に飼育している非遺伝子組換えカイコの幼虫、繭（蛹）、飼育残渣等は、2 重のビニール袋に入れ、袋は密封して、取扱いに注意を要する旨を見やすい箇所に表示し、窓や戸等をすべて閉めた蚕室内又

は残渣処理室内で保管する。次に、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた施設（以下「拡散防止措置が講じられた施設」という。）にある冷凍庫を用いて、遺伝子組換えカイコ等を不活化する。冷凍庫までの運搬の際は、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構造の容器に入れるとともに、取扱いに注意を要する旨を容器の見やすい箇所に表示する。

隔離飼育区画における作業記録を確認するとともに、交雑個体の発生数・発生時期等を考察することにより、本遺伝子組換えカイコとクワコとが交尾して、その交雑個体が生存した経緯を明らかにする。

上述の措置と合わせてモニタリングを強化する。具体的には、隔離飼育区画の外側に10 m 以下の間隔で、クワコの成虫が発生する 6 月から 11 月まで、フェロモントラップを常時設置し、可能な限り多くのオス成虫を捕獲する。捕獲したオス成虫については、改変 *Fibroin H* 遺伝子の有無を PCR 法又はサザンハイブリダイゼーション法により検定する。

合わせて、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、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。

最初に交雑個体が捕獲されてから 30 日以内に捕獲された交雑個体については、最初の観察と同一の事象とする。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発生したと判断し、次の（２）に移行する。30 日後から 1 年後までに新たな交雑個体が観察されない場合は、通常のモニタリングに移行する。

（２）本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が継続的に観察された場合

30 日後以降に新たな交雑個体が観察された場合は、農林水産省及び環境省と協議の上、さらに数ヶ年間、継続してモニタリングを実施するものとする。

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導入遺伝子の浸透を防止するため、（１）で策定した計画を実施する。

策定する計画として、次の措置が考えられる。交雑個体の幼虫は、隔離飼育区画の周辺に桑樹が多く生育しているのは群馬県蚕糸技術センターの桑園であることから、ここに殺虫剤を散布するほか、必要に応じて、当該桑園のすべてのクワを剪定すること等により、幼虫の生育を防止する。交雑個体の成虫については、隔離飼育区画及び群馬県蚕糸技術センターの桑園やその周辺に集中的にフェロモントラップを設置すること等による捕殺や交信かく乱により、交雑後代の発生を抑制する。

なお、モニタリングによって捕獲した個体については、遺伝子型の検査に用いる標本とするために、拡散防止措置が講じられた施設においてエタノールに浸漬するか、冷凍

庫で凍結することにより不活化する。

5　気象災害等が発生した場合の具体的な措置の内容

（１）隔離飼育区画内の蚕室に被害が生じた場合

隔離飼育区画内の蚕室で本遺伝子組換えカイコを飼育している際に、気象災害等により蚕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と野生のクワコの接触を防止することが困難な場合は、本遺伝子組換えカイコの使用を直ちに中止し、本遺伝子組換えカイコを４の（１）に沿って不活化する。

倒壊した蚕室の断片等が隔離飼育区画外に出た場合には、飼育中の本遺伝子組換えカイコも同様に隔離飼育区画外に出ていることが想定されるため、断片等が確認された場所を中心に探索し、カイコを回収し、４の（１）に沿って不活化する。その際、蚕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回収する。なお、カイコの幼虫は餌がなくてもほとんど移動せず、自ら桑樹を登って摂食することもできないことや、野外では鳥類や他の昆虫類等に速やかに捕食されることから、人間の管理が行き届かない野外で生存・繁殖することは考えにくい。そのため、隔離飼育区画外に出たとしてもクワコとの交雑個体が生じることは考えにくい。倒壊した蚕室の断片等が確認された場所やその周辺に桑樹が生育していれば、交雑個体の発生を確認するため、念のために、モニタリングを実施し、４に沿って対応する。

（２）隔離飼育区画内の残渣処理室に被害が生じた場合

隔離飼育区画内の残渣処理室で、本遺伝子組換えカイコを飼育した後の飼育残渣を保管している際に、気象災害等により残渣処理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と野生のクワコの接触を防止することが困難な場合は、残渣処理室での飼育残渣の管理を直ちに中止し、飼育残渣に含まれる可能性がある本遺伝子組換えカイコを４の（１）に沿って不活化する。

倒壊した残渣処理室の断片等が隔離飼育区画外に出た場合には、（１）に沿って対応する。

（３）隔離飼育区画外に本遺伝子組換えカイコが逸出した場合

隔離飼育区画の外に本遺伝子組換えカイコと考えられるカイコが確認された場合は、当該カイコを速やかに回収し、拡散防止措置が講じられた施設にある冷凍庫を用いて不活化する。運搬の際は、蓋を固定すること等により当該カイコが逸出しない構造の容器に入れるとともに、取扱いに注意を要する旨を容器の見やすい箇所に表示する。また、４の（１）に沿ってモニタリングを強化する。

6　農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体の発見や気象災害等による本遺伝子組換えカイコの隔離飼育区画外への逸出などの生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、緊急措置を講じた後、速やかに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。その他、農研機構業務安全委員会及び群馬安全委員会が必要と判断した場合は、同様の対処を講じる。

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カイコ業務安全委員会は、以下の
5　委員で構成される。

（令和 5 年 1 月現在）

委員長	
【個人情報につき非開示】 （管理責任者）	生物機能利用研究部門　昆虫利用技術研究領域長
委員	
【個人情報につき非開示】 （管理主任者）	生物機能利用研究部門　昆虫利用技術研究領域 昆虫デザイン技術グループ
【個人情報につき非開示】	生物機能利用研究部門　絹糸昆虫高度利用研究領域 カイコ基盤技術開発グループ長
【個人情報につき非開示】	生物機能利用研究部門　絹糸昆虫高度利用研究領域 新素材開発グループ
【個人情報につき非開示】	生物機能利用研究部門　昆虫利用技術研究領域 昆虫制御技術グループ
【個人情報につき非開示】	生物機能利用研究部門　医農工連携調整役
【個人情報につき非開示】	生物機能利用研究部門　作物ゲノム編集研究領域 ゲノム編集作物開発グループ
【個人情報につき非開示】	生物機能利用研究部門　研究推進部　研究推進室長
【個人情報につき非開示】	生物機能利用研究部門 遺伝子利用基盤研究領域長
【個人情報につき非開示】	本部　管理本部　藤本・大わし管理部　安全衛生管理室
【個人情報につき非開示】	基盤技術研究本部　遺伝資源センター　資源保存ユニット
【個人情報につき非開示】	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
【個人情報につき非開示】	本部企画戦略本部　新技術対策課長
【個人情報につき非開示】 （外部）	群馬県蚕糸技術センター　主席研究員
【個人情報につき非開示】 （外部）	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係長

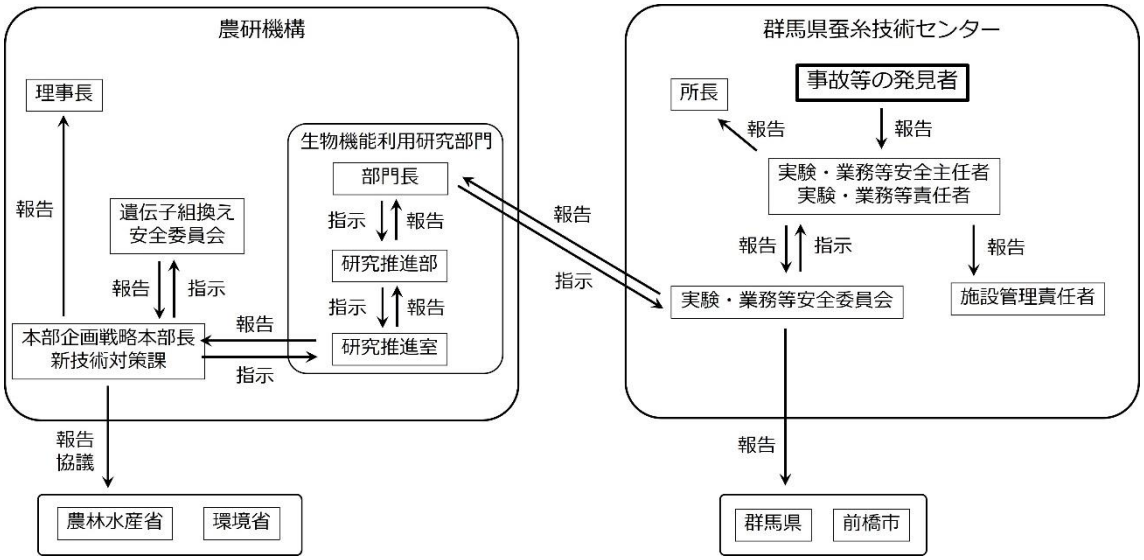
群馬県蚕糸技術センターの遺伝子組換え実験・業務等安全委員会は、以下の委員で構成される。

（令和 5 年 1 月現在）

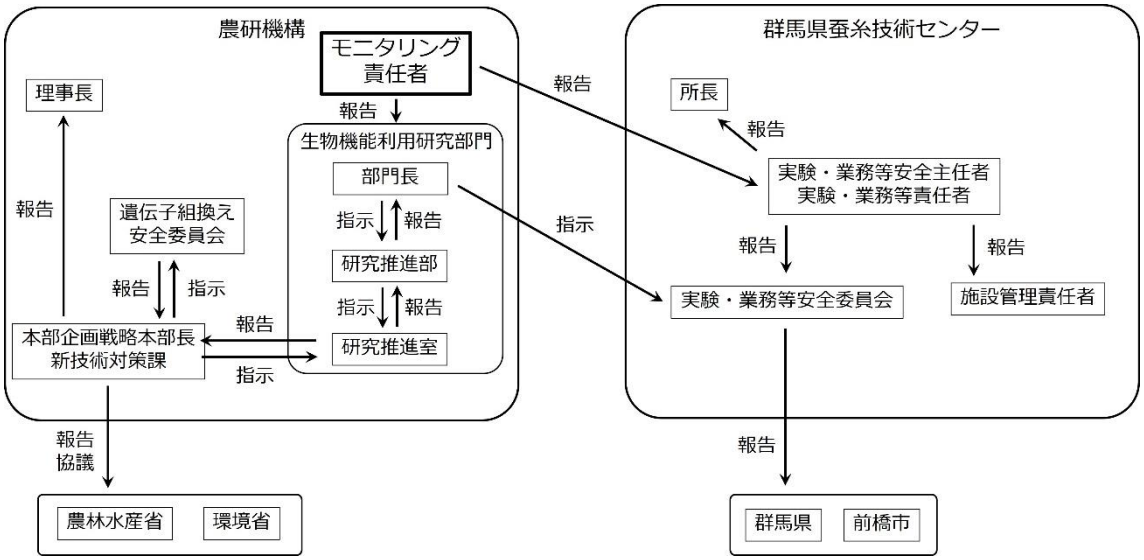
委員長	
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　主席研究員
委員	
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　次長
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係長
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　技術支援係長
【個人情報につき非開示】（外部）	農研機構　　生物機能利用研究部門　上級研究員

緊急連絡体制

本遺伝子組換えカイコとクワコとの交雑個体が群馬県蚕糸技術センターにおいて観察された場合及び気象災害等が発生した場合の緊急連絡体制は以下のとおりとする。



農研機構における遺伝子解析により本遺伝子組換えカイコとクワコとの交雑個体が検出された場合の緊急連絡体制は以下のとおりとする。



モニタリング計画書

令和５年１月２５日

申請者　　国立研究開発法人農業･食品産業技術総合研究機構
氏名　　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

申請者　　群馬県蚕糸技術センター
氏名　　所 長　　桑 原 伸 夫
住所　　群馬県前橋市総社町総社２３２６番地２

１　実施体制及び責任者

現時点での実施体制及び責任者は以下の通りである。

（令和５年 １月現在）

氏名	所属・役職
【個人情報につき非開示】 （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　絹糸昆虫高度利用研究領域 カイコ基盤技術開発グループ長
【個人情報につき非開示】	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　絹糸昆虫高度利用研究領域 カイコ基盤技術開発グループ　グループ長補佐
【個人情報につき非開示】	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　絹糸昆虫高度利用研究領域 カイコ基盤技術開発グループ 上級研究員
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係長
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係
【個人情報につき非開示】	群馬県蚕糸技術センター　蚕糸研究係

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

クワコ（*Bombyx mandarina*）

３　モニタリングを実施する場所

本申請における高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H*、*Bombyx mori*）（GCS500、GCS508、中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の使用は、群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（以下「隔離飼育区画」という。）に限られる。万一、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコが交雑する場合、その可能性は、本遺伝子組換えカイコのメス成虫に野生のクワコのオス成虫が飛来して交尾する場合に限られる上、本遺伝子組換えカイコのメス成虫は全く飛翔できず、周辺に産卵するにすぎない。したがって、本遺伝子組換えカイコと野生のクワコの交雑個体が生じて生育し、成虫が発生する可能性がある場所は、隔離飼育区画の周辺に限られる。このため、成虫を捕獲し観察するためには、隔離飼育区画の周辺においてモニタリングすることが最適である。

なお、隔離飼育区画から最も近い桑園は、隔離飼育区画の西側に接しており、面積は約 6.7 ha である。

以上のことから、モニタリングを実施する場所は、隔離飼育区画の四隅の外側とする。

４　モニタリングの期間

これまでの調査結果から、群馬県において野生のクワコ成虫が発生する期間は、5 月中旬から 11 月下旬となる（生物多様性影響評価書の別添 3）。本遺伝子組換えカイコの飼育を 5 月から開始したと想定すると、本遺伝子組換えカイコとクワコが交雑した場合、交雑個体の成虫の発生は、その年の夏以降と考えられる。また、9 月から飼育を開始したと想定すると、交雑個体の成虫の発生は、翌年の 5 月以降と考えられる。したがって、交雑個体の発生は、飼育する当年とその翌年となる。

以上のことから、モニタリングの期間は、飼育した当年及び翌年とする。

５　実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

1)　実施時期

隔離飼育区画周辺におけるクワコ成虫の発生状況に関する情報は、生物多様性影響の可能性をあらかじめ検討する上で重要であり、群馬県におけるクワコ成虫の発生期間は 5 月中旬から 11 月下旬であることから、この時期をモニタリングすることが望ましい。

以上のことから、モニタリングの実施期間は、飼育した当年及び翌年とし、実施時期は、

当年では、本遺伝子組換えカイコの飼育残渣を廃棄する時にモニタリングを開始し、11 月下旬に終了する。飼育した翌年では、5 月中旬にモニタリングを開始し、11 月下旬に終了する。

2) モニタリングの方法

モニタリングは、フェロモントラップを使用する。

クワコを捕獲する方法として、クワコのオス成虫を誘引するため、誘引源としてカイコのメス成虫又は合成した性フェロモン（ボンビコール）を使用し、粘着板で捕獲するフェロモントラップが効率的である（別添 3, 別添 9)。また、本遺伝子組換えカイコがクワコと交雑する可能性として、本遺伝子組換えカイコのメス成虫の放出する性フェロモンに誘引されたクワコのオス成虫が飛来し、交尾して交雑個体が発生することが考えられる。カイコのメス成虫又は合成した性フェロモンを用いたフェロモントラップは、これと同じ現象を再現することから、この手法を本モニタリングに採用する。

これまでのフェロモントラップによる野生のクワコの発生状況調査では、2 週間に 1 回程度の調査で季節的な消長を確認することができている。

以上のことから、カイコのメス成虫又は合成した性フェロモンをフェロモン源として粘着板によるトラップを設置し、フェロモントラップの交換の頻度は 2 週間に 1 回とする。

3）交雑個体の確認方法

本遺伝子組換えカイコが野生のクワコと交雑して、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は、改変 *Fibroin H* 遺伝子の有無を PCR 法又はサザンハイブリダイゼーション法により検定する。

（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。

６　緊急措置を実施する場合のモニタリングの強化

緊急措置計画書に定めるモニタリングの強化を実施する場合、隔離飼育区画の周囲、群馬県蚕糸技術センターの桑園、及びその周辺において、フェロモントラップを設置することとなる。フェロモントラップの設置位置については、緊急措置の内容によって検討する。

緊急措置計画書の「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　（１）本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が観察された場合」において、隔離飼育区画の外側に 10 m 以下の間隔で設置することとしている。

同「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　（２）本遺伝子組換えカイコとクワコの交雑個体が継続的に観察された場合」において、農林水産省及び環境省と協議の上、さらに数ヶ年間、継続してモニタリングを実施するものとする。具体的な措置として、群馬県蚕糸技術センターの桑園の中央に 1 ヶ所並びに当該桑園の周囲に 30 m 以下の間隔でフェロモントラップを設置するほか、隔離飼育区画の周囲 500 m 以内に認められる桑樹又はその周辺の設置可能な場所に設置し、モニタリングを実施する。

同「５　気象災害等が発生した場合の具体的な措置の内容　（１）隔離飼育区画内の蚕室に被害が生じた場合」又は同「（２）隔離飼育区画内の残渣処理室に被害が生じた場合」において、倒壊した蚕室等の断片等が隔離飼育区画外に認められ、その周辺に桑樹が生育している場合、モニタリングを実施する。

なお、フェロモントラップの構造や設置期間については５と同様とする。

７　モニタリング結果の解析方法

検定結果をもとに、本遺伝子組換えカイコとクワコとの自然交雑率を調べる。

８　農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告方法

モニタリング及びその解析結果は、場所を指定しない本遺伝子組換えカイコの第一種使用規程の最終申請時に、農林水産大臣及び環境大臣への報告書として添付する。

９　その他必要な事項

養蚕農家においてカイコが野生のクワコと交雑する可能性について、最新の研究成果や知見を収集し、生物多様性影響を防止するための管理措置やモニタリングの手法の改善に活用する。

隔離飼育区画において本遺伝子組換えカイコを飼育する間、並びに残渣処理室で飼育残渣を保管する間は、飼育するカイコの生育状況、退室の際の衣類等へのカイコの付着の有無、交雑防止のための網等の管理状況、保管している飼育残渣からの成虫の発生の有無等を、各作業終了時に記録する。

モニタリング期間中に捕獲したクワコのうち、本遺伝子組換えカイコとの交雑によって当該遺伝子の移行あるいは移行したと疑われる結果が得られた場合には、農林水産省及び環境省と協議を行うものとする。

高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H*、*Bombyx mori*）
（GCS500、GCS508、中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）
隔離飼育区画試験計画書

１　使用するカイコ品種

遺伝子組換えカイコとして高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H*、*Bombyx mori*）原種（GCS500、GCS508）、交雑種（中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）を飼育する。対照の非遺伝子組換えカイコとして、中 514 号、中 516 号及び[中 515 号×中 514 号]、[中 517 号×中 516 号]を飼育する。生育及び行動の特性は交雑種（中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）を用い、対照は非遺伝子組換えカイコの交雑種（[中 515 号×中 514 号]及び[中 517 号×中 516 号]）とする。交配試験に用いる原種には、GCS500、GCS508、中 515 号及び中 517 号を用いる。

２　試験の目的

養蚕農家での本遺伝子組換えカイコの第一種使用等による交雑種及び原種の飼育に向けて、本遺伝子組換えカイコをパイプハウス蚕室及びプレハブ蚕室の 2 種類の構造の蚕室で、養蚕農家と同様の環境、規模及び方法で飼育した場合、催青開始後の卵の孵化、稚蚕の飼育課程における生育及び行動の特性を中心に、非遺伝子組換えカイコとの違いの有無を確認する。なお、第一種使用等における、稚蚕飼育所での本遺伝子組換えカイコの人工飼料による稚蚕飼育手順を確立するため、人工飼料による稚蚕飼育試験を行う。隔離飼育区画で生産した原種の繭については、第二種使用において、羽化・産卵させ、飛翔行動、産卵数、卵の休眠性等を調査する。

３　一般使用に係る第一種使用規程の承認後に想定される養蚕農家の飼育形態

- 飼育室はプレハブ等の比較的簡素な構造とし、一般に産業利用出来うる強度を有する。
- 催青処理開始後の卵及び 1－3 齢の稚蚕期の幼虫は、稚蚕共同飼育所が刻んだ桑葉を与える桑葉育か、人工飼料を与える人工飼料育を行い、拡散防止措置を執った上で養蚕農家に配蚕を行う。
- 稚蚕共同飼育を行わず、養蚕農家が自ら稚蚕育を行う場合は、プレハブ製稚蚕施設等において人工飼料育もしくは桑葉育を行う。
- 3－5 齢期の壮蚕期においては、条桑（桑葉付きの枝）を与える条桑育で繭生産を行い、繭（蛹）は拡散防止措置を執った上で製糸工場等に運搬する。なお、製糸工場においては、速やかに繭（蛹）の不活化を行う。蚕種業者においては第二種使用等の施設で採卵した上で不活化を行う。

・　分場農家[17]にあっては、蚕種製造に用いる原種の幼虫を飼育し、生産した繭は出荷時に繭の状態を確認し、拡散防止を執った上で、既に第二種使用等の確認がなされた施設に運搬する。
・　毎回の飼育終了後に飼育残渣を飼育室から搬出する。
・　飼育残渣は、粉砕による殺虫処理、又は、網を掛けて管理する。

４　試験の場所

群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（別紙 1 図 2、以下「隔離飼育区画」という。）で試験を行う。本試験は催青処理を開始した卵から繭の形成までとし、隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室（別紙 1 図 5）及びプレハブ蚕室（別紙 1 図 7）（以下合わせて「各蚕室」という。）内で行う。飼育残渣の管理手法の試験は、隔離飼育区画内の残渣処理室（別紙 1 図 9）内で行う。

５　飼育の方法

・　孵化幼虫（催青処理開始後の卵を含む）は、拡散防止措置を執った上でプレハブ蚕室に運び入れる（別紙 1 図 3）。飼育には、プレハブ蚕室内に設置したインキュベータを用いる。
・　1－4 齢の稚蚕期の幼虫には、人工飼料を与える。
・　3－5 齢の壮蚕期の幼虫には、枝付きの桑葉である条桑を与える。
・　1 回に飼育する頭数は、本遺伝子組換えカイコ及び対照とする非遺伝子組換えカイコとの合計で約 12 万頭までとする。
・　パイプハウス蚕室の場合、別紙 1 に従って、内側全体に 4 mm 目以下の網を張っており、気温が高い場合等、環境条件に応じて、側面の外側フィルムを巻き上げたり、天井や妻面の外側フィルムを開けたりすることがある。
・　プレハブ蚕室の場合、別紙 1 に従って、開閉可能な窓及び戸（出入口を除く）並びに換気口には 4 mm 目以下の網を張っており、気温が高い場合等、環境条件に応じて、窓や戸を開けることがある。
・　そのほか、別紙 2 に従って作業する。

６　他の遺伝子組換えカイコ系統と同時に飼育する場合の混入防止措置

[17] 蚕種業者に幼虫の飼育、繭の生産を委託され、原種の幼虫を飼育し、繭の段階で蚕種業者に出荷する。

本申請に係る本遺伝子組換えカイコの飼育にあたっては、別紙 2 に従って作業することにより成虫を生じさせないこととしているが、その上で、他の遺伝子組換えカイコ系統と同時期に蚕室内で飼育して試験を実施する場合は、異なる遺伝子組換えカイコ系統同士の混入を防止する措置を執る。

まず、カイコ幼虫の性質として、飼育容器から出たとしても別の飼育容器の中に移動することは考えにくい。繭を形成する前に活動が活発になる場合でも、繭を形成させるための器具（蔟）は天井から吊るされており、他の蔟に移動することは考えにくい。その上で、飼育作業等の人為的な要因による混入を防止するため、以下の措置を執る。

- 一つの飼育容器や蔟には、一つの遺伝子組換えカイコ系統だけを入れる。
- 異なる遺伝子組換えカイコ系統を世話する際は、衣服等にカイコが付着していないことを確認する。
- 飼育容器外のカイコは飼育容器に戻さず、捕殺や不活化等を行って廃棄する。
- 繭を形成させている時期は、蔟から落下したカイコを回収するため、蔟の下に容器等を置く。
- 可能であれば、繭色の異なる遺伝子組換えカイコ系統を用いる。

7　遺伝子組換えカイコを使用する試験の内容（非遺伝子組換えカイコとの比較試験）

（1）　比較試験に供するカイコの準備

- 各蚕室ともに、比較試験に供するカイコの数は、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコそれぞれ約 1,000 頭とし、それ以外に、必要に応じて繭及び糸の品質試験に供する本遺伝子組換えカイコを飼育する。
- 得られた試験結果により、必要に応じて、それ以降の飼育において比較試験に供するカイコの数を変更する。その場合も、比較試験に供する本遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコはほぼ同数となるようにする。
- 比較試験に供するカイコ幼虫を隔離飼育区画に運び込む際は、原則として生育の経過等による選抜は行わない。

（2）　生育経過

- 繭を作るまでに要する日数や斉一性（繭を作る時期にあるカイコ幼虫の割合を目視で確認し、すべての幼虫を 1 日のうちに蔟に移すことができるか、生育の遅いカイコ幼虫を翌日以降に蔟に移すことにするかを、養蚕農家での飼育に準じて判断した結果）
- 早熟個体（三眠蚕）の発生の有無（もしあればその数や発生状況）
- 繭を回収するまでの成虫の発生の有無（もしあればその数や発生状況）

・　繭を作った個体の割合
・　2頭以上が一つの繭を作る玉繭の割合

（3）　幼虫の行動の特性

毎回の飼育作業時に以下の項目を調査する。

・　飼育台から出ている幼虫の有無（もしあればその数及び発見場所）
・　作業者が各蚕室から退出する際の幼虫の付着の有無（もしあればその数及び付着場所）
・　作業者及び桑葉運搬用の車両等が隔離飼育区画から退出する際の幼虫の付着の有無（もしあればその数及び付着場所）

（4）　繭の形成

毎回の飼育作業時に以下の項目を調査する。

・　幼虫の飼育期間中に早めに作られる繭の有無（もしあればその数及び場所）
・　繭の形成時に蔟の外（蔟から落下したものも含む）で作られる繭の有無（もしあればその数及び場所）

（5）　成虫（原種）の行動の特性

・　飛翔行動の有無
・　産卵数（概数）

（6）　卵の休眠性

・　高温明催青条件における非休眠卵の出現率

（7）　飼育残渣の処理

①　粉砕による殺虫処理

・　粉砕処理前の飼育残渣に含まれる幼虫及び繭の数
・　飼育残渣の粉砕処理にかかる時間

②　網を掛けて管理

・　網の内外に発生するカイコ成虫の有無（もしあればその数及び状況）
・　網で覆った飼育残渣に飛来するクワコ成虫の有無（もしあればその数及び状況）

（8）　遺伝子組換えカイコの飼育管理手法の確立

養蚕農家に近い構造や規模の蚕室を用いて、養蚕農家において生物多様性影響を効果的

に防ぎながら、催青処理開始後の卵の孵化から稚蚕、壮蚕の飼育、繭の生産まで、効率的に遺伝子組換えカイコを飼育する管理手法を確立し、生物多様性影響や法令遵守に関することの教育も含め、マニュアル化する。

また、実際の養蚕農家や稚蚕共同飼育所への飼育管理手法の技術移譲を行うため、試験担当が現地に赴いて飼育予定者に飼育管理の研修を行うとともに、研修を希望する者に対して群馬県蚕糸技術センターに受け入れることを計画している。

８　飼育後の処理

本遺伝子組換えカイコを用いた試験の終了後は、使用したサンプル等を、別紙 2 に従って適切に処理する。

（別紙１）

隔離飼育区画の施設内容及び受容環境

１　隔離飼育区画の所在地等

（１）名称：遺伝子組換えカイコ飼育調査区画

（２）住所：群馬県前橋市総社町総社 2326 番地 2

（３）電話番号：027-251-5145（群馬県蚕糸技術センター）

（４）地図：図 1 及び図 2 を参照

２　責任者等

（１）隔離飼育区画において行う試験の責任者：主席研究員　【個人情報につき非開示】

（２）隔離飼育区画管理責任者：蚕糸研究係長　【個人情報につき非開示】

３　隔離飼育区画施設の概要

（１）隔離飼育区画全体の面積：1,700 m^2

（２）隔離飼育区画内の施設の配置：図 3 を参照。

（３）隔離飼育区画内の施設の概要：区画を金属製フェンス（高さ 1.8m）で囲い、区画内にパイプハウス蚕室、プレハブ蚕室、残渣処理室及び物置を設置する。

１）パイプハウス蚕室

・遺伝子組換えカイコの幼虫の飼育と繭の生産を行う。

・7.2 m×39.6 m（面積 285 m^2）×3.8 m（高さ）。

・外観は図 5、平面図は図 6 を参照。

・遺伝子組換えカイコの飼育時は、内側全体に 4 mm 目以下の網を張るとともに、外側をフィルムで被覆する。

２）プレハブ蚕室

・インキュベーターにより、遺伝子組換えカイコの催青処理開始後の卵の保管及び孵化、1-4 齢の稚蚕期の飼育を行う。人工飼料育とする。

・遺伝子組換えカイコの 3 齢以降の幼虫の飼育と繭の生産を行う。

・5.6 m×40 m（面積 224 m^2）×3.6 m（高さ）。

・外観は図 7、平面図は図 8 を参照。

・遺伝子組換えカイコの飼育時は、開閉可能な窓、戸（出入口を除く。）及び換気口には 4 mm 目以下の網を張るとともに、開けない戸は施錠し、閉切であることを示す表示を掲示する。

・出入口付近の外側に流し台を備える（図 3 を参照）。

３）残渣処理室

・飼育後の残渣を収容し、残渣の粉砕処理又は網を掛けて管理する。

・5.4 m×27 m（面積 146 m^2）×2.9 m（高さ）。

・外観は図 9、平面図は図 10 を参照。

・全体を 4 mm 目以下の網で被覆し、内側に網を保護する合板（高さ 0.9 m）を設置、天井部外側はフィルムで被覆する。

４）物置

・飼育に必要な道具を保管する。

・3.7m×2.1m（面積 7.8m^2）×2.1m（高さ）。

・外観は図 11 を参照。

５）部外者への注意書き

・隔離飼育区画の出入口に掲示する。

４　設備の仕様等

蚕室における幼虫の飼育は、1.5 m×1.8 m×0.6 m の枠に 2 mm 目の網を張った飼育台を、各蚕室で最大 20 台使用して行う。

５　隔離飼育区画の周辺環境

（１）地形

隔離飼育区画の周辺は標高 130 m 程度の平坦な地形である。

（２）周辺の土地利用状況

隔離飼育区画の周辺は畑・民家が散在している。隔離飼育区画から半径 1 km の範囲には群馬県蚕糸技術センターの桑園以外には桑園はない。

（３）周辺の環境保護区の名称と隔離飼育区画からの位置

隔離飼育区画は、環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、自然環境保全地域等）ではない。また、最も近い自然保護地域は、妙義荒船佐久高原国定公園であり、隔離飼育区画から約 25 km である。

（４）市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ（策定されている場合）

前橋市の洪水ハザードマップでは浸水が想定される区域とはなっていない。

https://www.city.maebashi.gunma.jp/material/files/group/5/hazardonannbu.pdf

前橋市の地震被害想定では、関東平野北西縁断層帯主部によるマグニチュード 8.1 の地震が起きた場合の震度は最大で 6 弱が予想されている。

https://www.city.maebashi.gunma.jp/material/files/group/5/sindobunnpu.pdf

（５）台風の襲来歴

隔離飼育区画のある関東地方への過去 10 年間の台風の接近数を表 1 に示す（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページ）。

https://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

表 1. 関東地方への過去 10 年間の台風の接近数

台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署等から 300 km 以内に入った場合。なお、接近は 2 か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しない。

年	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月	7 月	8 月	9 月	10 月	11 月	12 月	年間
2021							1	1	1	1			4
2020									1	1			2
2019						1	1		1	1			4
2018						1	1	2	2	1			6
2017							1	1	1	2			5
2016								4	1	1			6
2015									1				1
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2

６　隔離飼育区画周辺の生物相

（１）隔離飼育区画での遺伝子組換えカイコ飼育により影響を受ける可能性のある野生動植物の生態

影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコが想定される。群馬県蚕糸技術センター内の桑園のクワ及び周辺に自生するクワに生息するクワコの幼虫や繭が見られる。また、群馬県下仁田町に、カイコ雌成虫をフェロモン源とするフェロモントラップを設置すると、5 月から 11 月までの間、クワコのオス成虫が捕獲されている（生物多様性影響評価書の別添 3 を参照）。

（２）野外におけるカイコ（鱗翅目昆虫）の幼虫を捕食又は寄生すると考えられる鳥類・昆虫類

生物多様性影響評価書の別添 4 に、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と考えられる野生の鳥類・昆虫類を挙げている。

（３）クワの生育状況

群馬県蚕糸技術センターの桑園（約 6.7 ha）にクワが植えられているほか、同センター内及び周辺の半径 1 km において、実生等により自生するクワが散在している。

図 1. 群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画周辺の地形図（Google マップより）

赤く囲んだところがセンターの敷地（図 2 を参照）

5

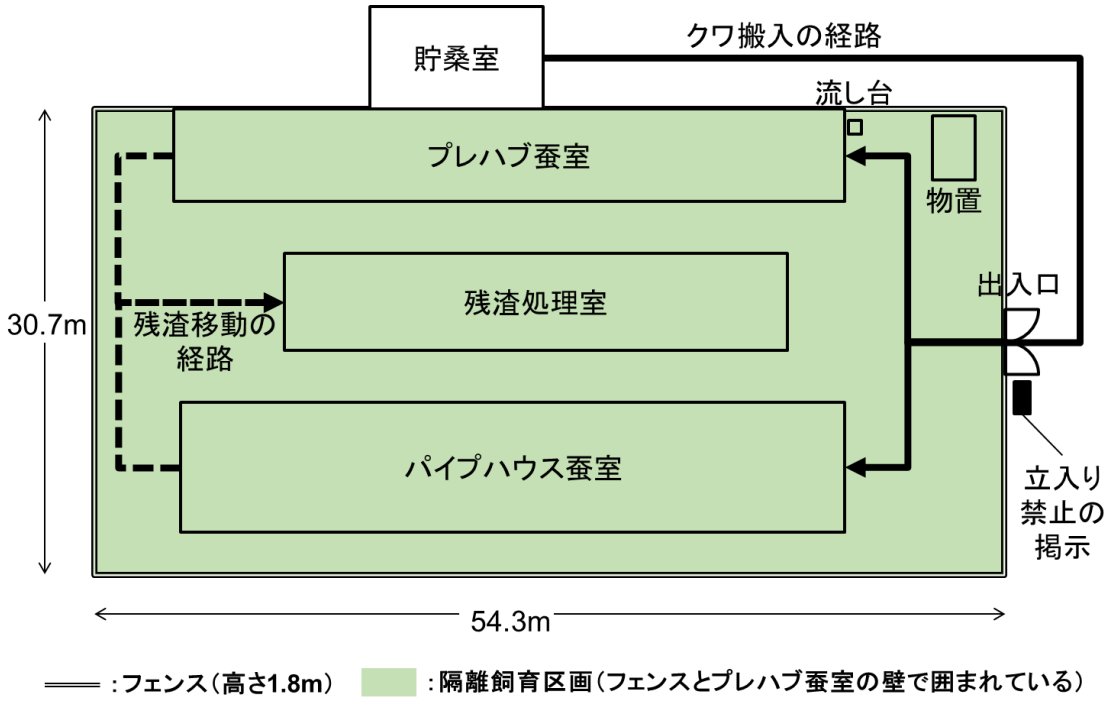
図 2. 群馬県蚕糸技術センターの隔離飼育区画の位置

（図 1 で赤く囲んだ部分の拡大）

赤：隔離飼育区画

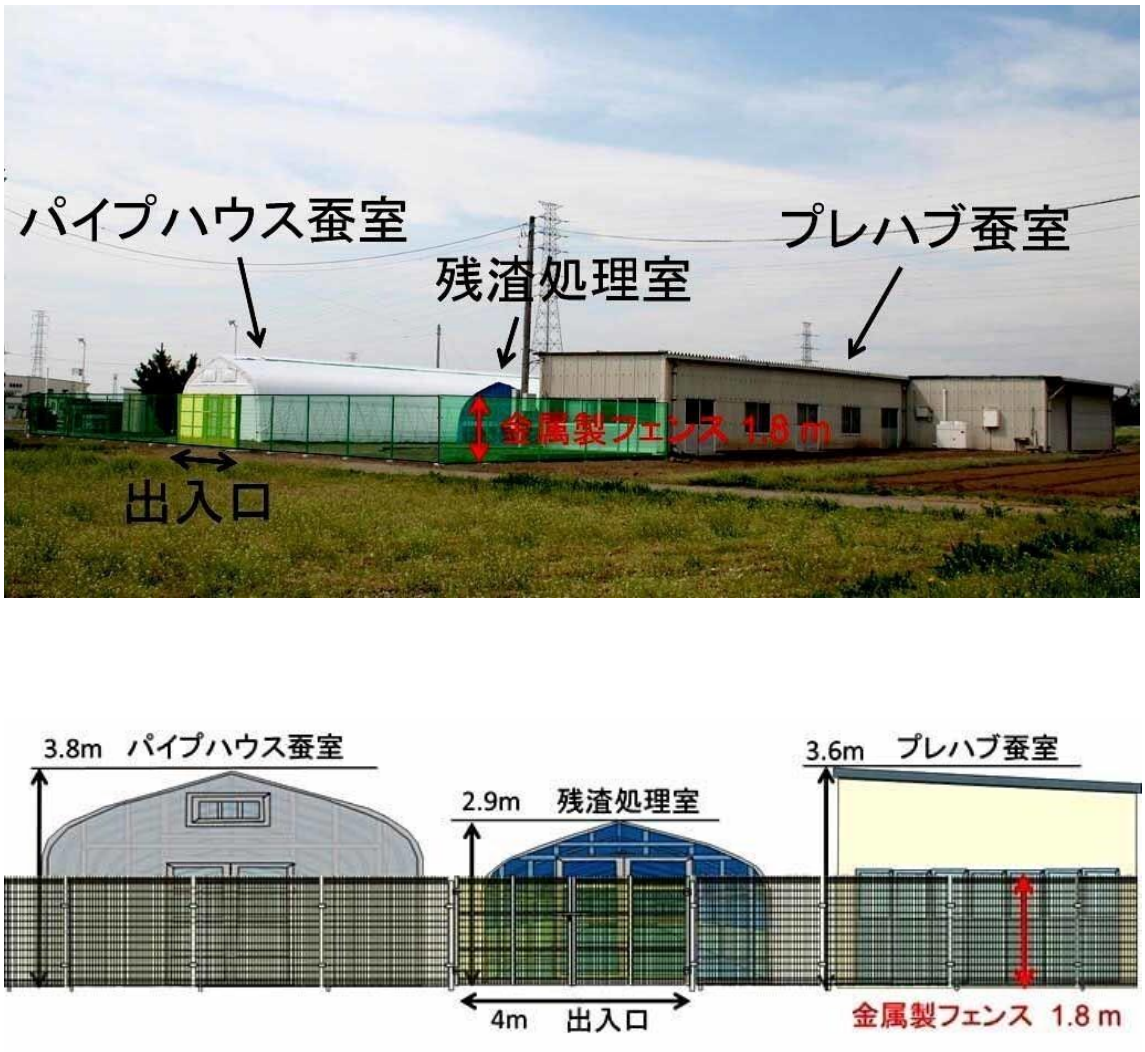
青：卵の保管、稚蚕の飼育、繭の不活化等を行う第二種使用等の施設

緑：桑園（面積：合計約 6.7 ha）



5

図 3. 隔離飼育区画内の施設の概要



5

図 4. 隔離飼育区画を囲むフェンス

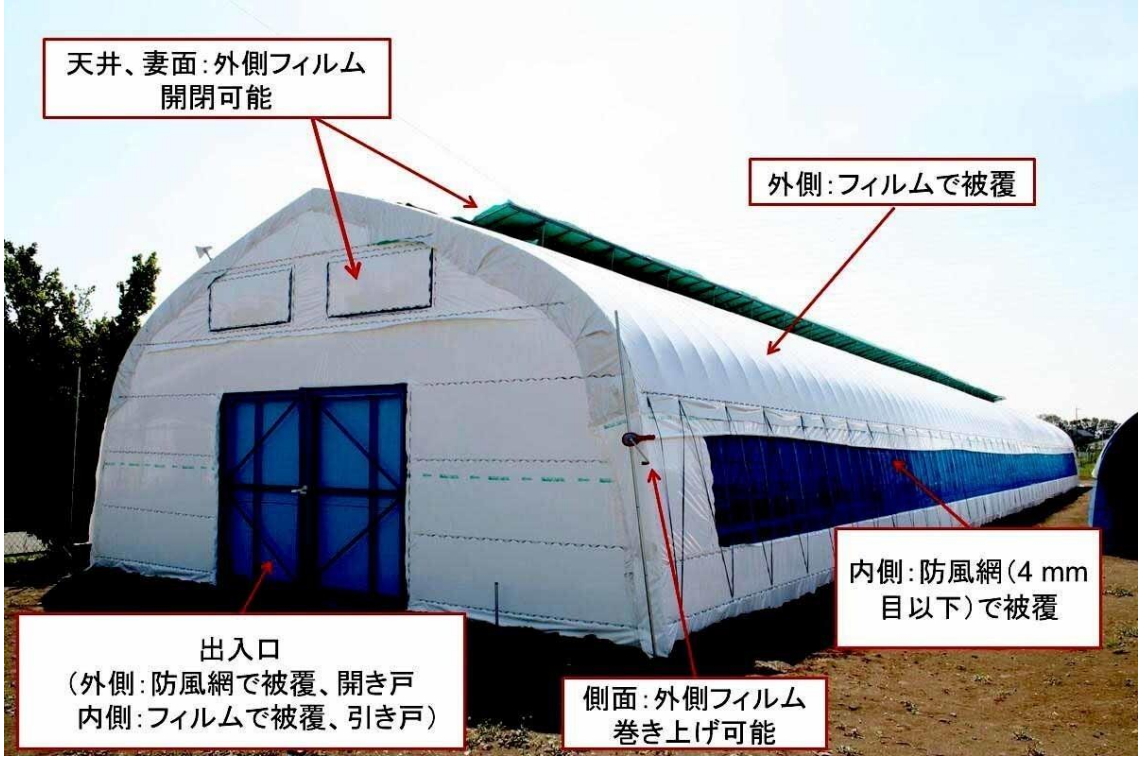


図 5. 隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室

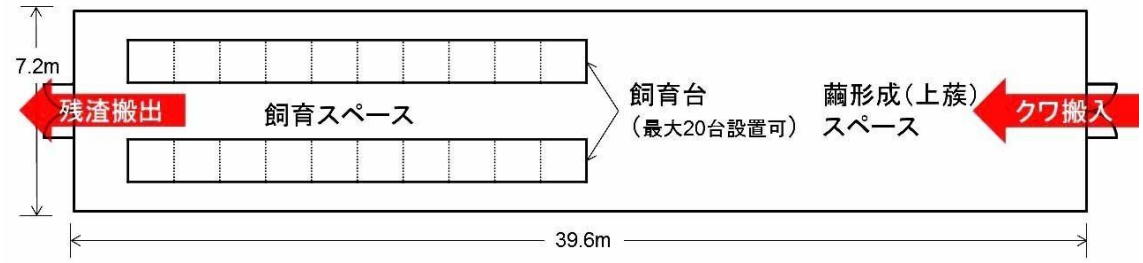


図 6. 隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室の平面図

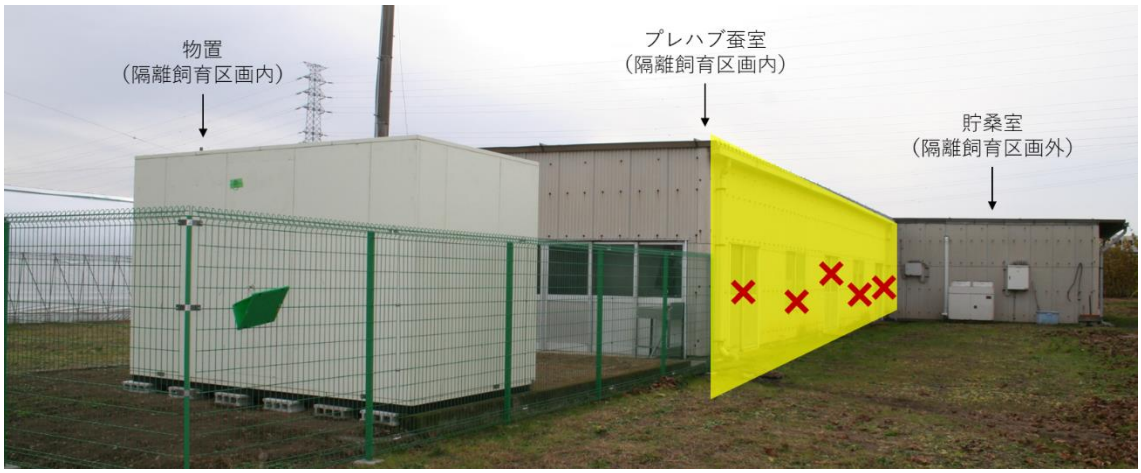


図 7. 隔離飼育区画内のプレハブ蚕室

黄色で示した壁面を隔離飼育区画の境界とするため、窓及び戸は閉切とする（赤の×）。写真の撮影位置は図 8 を参照。

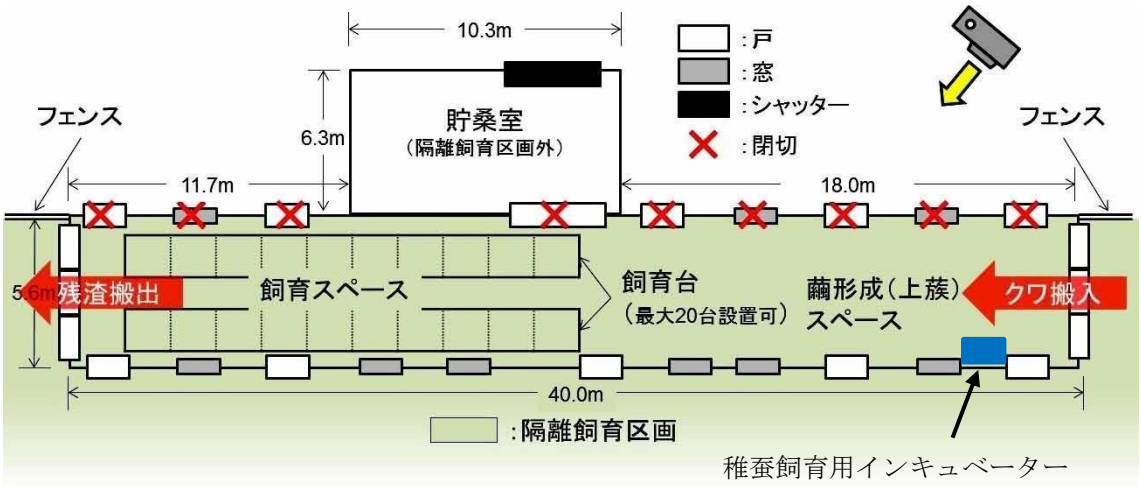


図 8. 隔離飼育区画内のプレハブ蚕室の平面図

開閉可能な窓、戸（出入口を除く。）及び換気口には 4 mm 目以下の網を張る。右上の黄色矢印は図 7 の写真を撮影した位置。また、飼育時に開閉しない戸は施錠し、閉切であることを示す表示を掲示する。

図 9. 隔離飼育区画内の残渣処理室

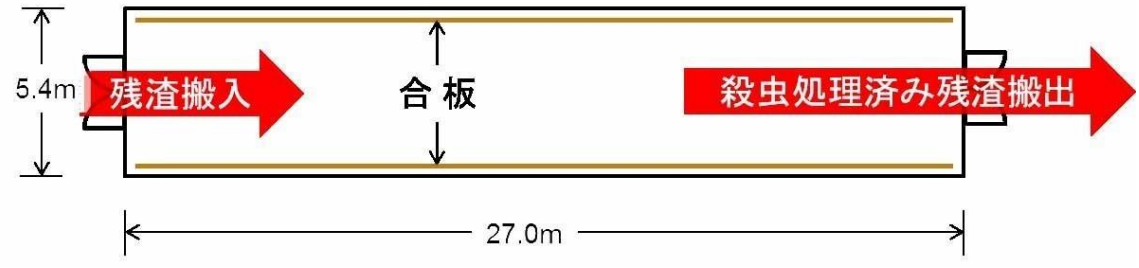


図 10. 隔離蚕室区画内の残渣処理室の平面図

全体を 4 mm 目以下の網で被覆し、内側に網を保護する合板（高さ 0.9 m）を設置、天井部外側はフィルムで被覆

図 11. 物置

（別紙２）

作業要領

１．共通事項

（１）　群馬県蚕糸技術センター遺伝子組換えカイコ飼育調査区画（別紙 1 図 2、以下「隔離飼育区画」という。）への部外者の立入りを防止するため、作業時以外は隔離飼育区画の出入口（別紙 1 図 3 上及び図 4）を施錠すること。

（２）　隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室（別紙 1 図 5 及び図 6）、プレハブ蚕室（別紙 1 図 7 及び図 8）及び残渣処理室（別紙 1 図 9 及び図 10）の出入口の扉は、常時、閉めておく（入退室時以外を除く。）とともに、偶発的に開放されることを防止するため、作業時以外は施錠すること。

（３）　設備が本来有すべき機能が十分に発揮される状態を保持すること。

（４）　施設の維持管理を適切に行うとともに、これらに変更がある場合には、別に定める様式により速やかに報告すること。

（５）　一連の作業を通じて、遺伝子組換えカイコの環境中への曝露を極力減らすよう留意すること。

（６）　高染色性絹糸生産カイコ（改変 *Fibroin H*、*Bombyx mori*）（GCS500、GCS508、中 515 号×GCS500、中 517 号×GCS508）（以下「本遺伝子組換えカイコ」という。）の隔離飼育区画内における飼育頭数は必要最小限に抑える。

（７）　本遺伝子組換えカイコを隔離飼育区画内に搬入する場合、並びに、隔離飼育区画の外に運搬・保管する場合は、本遺伝子組換えカイコが逸出しない構造の容器に入れるとともに、取扱いに注意を要する旨を容器の見やすい箇所に表示する。

２．遺伝子組換えカイコの飼育

・催青処理開始後の卵の孵化及び 1-4 齢の稚蚕期幼虫の飼育

（１）　催青処理開始後の卵の孵化及び 1-4 齢の稚蚕期の幼虫の飼育は、プレハブ蚕室内に設置したインキュベータの中で行う。

（２）　本遺伝子組換えカイコの卵を孵化のためにプレハブ蚕室内に搬入するまでの保管は、カルタヘナ法に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた施設（壮蚕研究蚕室・蚕種保護室・育蚕蚕室・生理研究蚕室）（別紙 1 図 2）において行い、１．（７）　に従って隔離飼育区画に運び込む。

（３）　1-4 齢の稚蚕期の幼虫には、人工飼料を与える。

（４）　3 齢眠から 4 齢起蚕となった幼虫は、本遺伝子組換えカイコが逸出しない構造の容器に入れインキュベータからプレハブ蚕室内もしくはパイプハウス蚕室に設置した飼育台に移動させる。

（５）　なお、インキュベータで飼育できる稚蚕の頭数に限りがあるため、また、インキュベータが使用できない際には、催青処理開始後の卵の孵化及び 1-4 齢の稚蚕期の幼虫の飼育を蚕種保護室・壮蚕研究蚕室内で行う場合がある。この場合、隔離飼育区画内に 3 齢以降の壮蚕を運び込む際は、１．（７）に従う。

・3 齢期以降の幼虫の飼育と繭の生産

（６）　遺伝子組換えカイコの幼虫（3 齢期以降）の飼育と繭の生産はパイプハウス蚕室かプレハブ蚕室で行う。基本的に、枝付きのままのクワを与える条桑育とする。

（７）　各蚕室内の繭は、絹糸の特性及び織物への加工法等についての研究に供するため、カルタヘナ法に基づく第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が講じられた施設（壮蚕研究蚕室・蚕種保護室・育蚕蚕室・生理研究蚕室）（別紙 1 図 2）に、１．（７）に従って運搬し、冷凍庫を用いて－30℃～－20℃で 24 時間以上の条件下において凍結することにより、本遺伝子組換えカイコの蛹を不活化する。不活化された蛹は、飼料等として流通しないように一般廃棄物収集運搬業者に委託して事業系一般廃棄物として焼却処理する。交配試験に用いる原種の繭については、カルタヘナ法に基づく第二種使用等にもとづき、蚕種保護室・壮蚕研究蚕室において繭を切開し蛹を取りだす。取りだした蛹は、蛾が羽化するまで適切に保護する。羽化した蛾は交配させて採種する。なお、採種の際には、成虫の産卵行動の観察を行う。

（８）　早熟個体等の生育異常のカイコ（本遺伝子組換えカイコ及びこれと同時に飼育している非遺伝子組換えカイコを含む。以下同じ。）を発見した場合は、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、（７）に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。また、各蚕室又は残渣処理室内に侵入したクワコを発見した場合も、同様に対処する。

（９）　熟蚕（繭を形成する前に摂食を停止した幼虫）の割合を目視で確認し、その数が全体の 1 割以上と判断した場合、繭を形成させるため、すべての幼虫を蔟（繭を形成させる器具）に移動させて、上蔟とする。熟蚕が 1 割未満の状況で、繭の形成を始めた場合、必要に応じてその熟蚕を個別に回収し、同じ蚕室内にある蔟に移動させる。なお、熟蚕の割合が低い場合や斉一性が悪い場合、数日に分けて蔟に幼虫を移動させるなどの措置を執る。

（１０）　同じ蚕室内において、遺伝子組換えカイコの複数品種を同時に飼育する場合、蔟から落下したカイコは蔟には戻さず、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、（７）に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。なお、必要に応じて、回収した個体を 4 mm 目以下の網で覆って繭を作らせた後に（７）に従って不活化する。

（１１）　各蚕室内の繭を蚕種保護室・壮蚕研究蚕室に運搬した後、各蚕室内の清掃及び点検を徹底する。仮に各蚕室内で幼虫及び繭を発見した場合、すべて回収し、隔離飼育

区画内でただちに捕殺するか、（７）に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。

（１２） 本遺伝子組換えカイコが意図せずに隔離飼育区画の外に持ち出されることを防止するため、各蚕室で作業する際は、作業者は専用の作業着及び履物を着用する。各蚕室での作業をすべて終えた際には、原則として、2 人 1 組となり、衣服等にカイコが付着していないことを目視で確認するとともに、各蚕室内で着替え、使用した作業着及び履物を各蚕室内に保管する。また、隔離飼育区画外に出る前は、同様に目視で確認する。仮に、カイコが付着していた場合、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、（７）に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。

（１３） 隔離飼育区画内で使用した機械や器具は、作業終了後、カイコが付着していないことを目視で確認し、カイコが隔離飼育区画外に持ち出されることを防止する。仮に、カイコが付着していた場合、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、（７）に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。また、隔離飼育区画の入口から各蚕室への桑葉の輸送経路と、各蚕室から残渣処理室への飼育残渣の輸送経路を交叉させないことで、桑葉を輸送する道具にカイコが付着するリスクを減少させる（別紙 1 図 3）。

３．飼育残渣の処理

1. 粉砕による不活化の場合

（１） 各蚕室から残渣処理室に飼育残渣を搬出する前に、目視で確認し、飼育残渣内の幼虫及び繭をできるだけ取り除く。

（２） 搬出時、飼育残渣のこぼれ落ちを防ぐため、桑の枝は束ねたり、枝以外の糞や葉等は飼育網で覆ったりして、幌を備えた運搬車に積載し、残渣処理室に運搬する。

（３） 飼育残渣の運搬後、運搬経路（別紙 1 図 3）を目視で確認し、仮に、幼虫及び蛹が落ちていた場合、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、２．（７）に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。

（４） 残渣処理室に運搬した飼育残渣は、上蔟から 7 日以内に速やかに粉砕機で粉砕することにより、含まれている可能性がある幼虫や蛹を殺虫処理して不活化する。飼育残渣の粉砕は、ビニールシート上で行い、仮に、粉砕処理前に飼育残渣がこぼれ落ちた際は、残渣を回収して、確実に粉砕する。粉砕処理が完了した飼育残渣は、隔離飼育区画外の堆肥盤に搬出し、堆肥化させ、群馬県蚕糸技術センター内で自家消費する。

（５） 各蚕室への桑葉の搬入と飼育残渣の搬出は、別の日に行う。

2. 網を掛けて保管する場合

（１）　飼育残渣は残渣処理室で保管する。飼育残渣を飼育室から残渣処理室に運び出す前に、飼育室内で目視確認により、繭及びカイコ（幼虫及び蛹）を取り除く。

（２）　搬出時、飼育残渣のこぼれ落ちを防ぐため、桑の枝は束ねたり、枝以外の糞や葉等は飼育網で覆ったりして、幌を備えた運搬車に積載し、残渣処理室に運搬する。

（３）　飼育残渣の運搬後、運搬経路（別紙 1 図 3）を目視で確認し、仮に、幼虫及び蛹が落ちていた場合、隔離飼育区画内でただちに捕殺するか、２．（７）に従って不活化するとともに、その経緯を記録する。

（４）　飼育残渣は、成虫が生じてもすべて死亡する 30 日間以上、残渣処理室で 4 mm 目以下の網を掛けて保管する。

（５）　飼育残渣を保管している間に、網の中にカイコ成虫が確認された場合はただちに捕殺し、その発生状況を記録する。

（６）　30 日間以上経過した飼育残渣は、隔離飼育区画外の堆肥盤に搬出し、堆肥化させ、群馬県蚕糸技術センター内で自家消費する。

（７）　各蚕室への桑葉の搬入と飼育残渣の搬出は、別の日に行う。

別添資料リスト

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
別添 3　クワコ成虫の発生時期に関する調査
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への遺伝子流入に関する調査
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
別添 10　目的遺伝子の塩基配列
別添 11　ヘルパープラスミドの塩基配列
別添 12　遺伝子導入に用いたヘルパープラスミドが残存していないことの確認
別添 13　移入された核酸の複製物が染色体に 1 コピー存在することの確認
別添 14　移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性
別添 15　移入された核酸の複製物の個体間及び世代間での発現の安定性
別添 16　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（稚蚕）の行動の比較
別添 24　幼虫（５齢）の行動の比較
別添 25　産卵数の比較
別添 26　産卵行動の比較
別添 27　植物の発芽や生育に与える影響の比較
別添 28　土壌微生物に与える影響の比較
別添 29　粉砕機での粉砕による飼育残渣内のカイコの不活化
別添 30　飼育残渣を屋外で保管する際の管理措置
別添 31　遺伝子組換えカイコの生理学的特性に関する追加試験
別添 32　隔離飼育区画における飼育試験

別添 1　カイコとクワコの生理学的及び生態学的特性の比較

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

表．カイコとクワコの比較表

	カイコ	クワコ
学名	*Bombyx mori* (Linnaeus)	*Bombyx mandarina* (Moore)
国内の自然環境における生息状況	自然環境における生息の報告はない。	北海道、本州、四国、九州に分布し、南限はトカラ列島の悪石島までで、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、一化性、二化性、多化性がある。	主として二化性又は三化性で、標高が高い地域等では 1 化性になる場合もある（橋本・佐藤, 1958; 別添 3）。
幼虫の脱皮回数	通常は 4 回で、3 回になることもある。	3 回が多いが 4 回もある（大村, 1950; 蜷木・竹田, 1982）。
幼虫の運動性	餌がなくなっても飼育容器から外に出ない。	餌があっても動き回る。

成虫の運動性	翅はあり羽ばたくことはできるが飛ぶことは全くできない。	飛ぶことができる。
幼虫の体色	脱皮直後は毛に覆われ体色の判別は困難であるが、餌を摂食した後は体長がのび体色の判別が可能となる。白色が多い。	脱皮直後は毛に覆われ体色の判別は困難であるが、餌を摂食した後は体長がのび体色の判別が可能となる。灰褐色や黒褐色（名和, 1936）。鳥糞に似ている（横山, 2019）。
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 個前後をまとめて産卵する。	1 個ずつ又は数個～10 数個程度ずつ場所を変えて産卵し、1 頭のメス成虫の産卵数は 250～300 個程度（名和, 1936; 大場, 1939b; 横山, 2019）。

【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 回世代を繰り返す二化性または、三回世代を繰り返す 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（二化性又は三化性）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に摂

食するようになる（名和, 1936; 大村, 1950）。幼虫脱皮の回数は 3 回（三眠蚕）が多いが、4 回もある（大村, 1950; 蜷木・竹田, 1982）。

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

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

成虫はオス・メスともに飛翔することができる（河原畑, 1998）。メス成虫は交尾が終了するまで静止し、日中に性フェロモンを放出してオス成虫を誘引する。オス成虫は午前中を中心に日中に飛んだり休んだりを繰り返しながらメス成虫を探索すると考えられる（Sasaki and Jibiki, 1984）。オス成虫の生存期間として最も長い記録は 21 日間である（村上ら, 2010）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：生息又は生育可能な環境の条件】

クワコは幼虫期に桑葉を摂食して成長するため、生息場所はクワが生えている場所に限られ、クワが落葉する冬季は幼虫が生存することができず、卵で越冬する（名和, 1936）。地域や気候によって時期は異なるが、冬を越した卵から、クワが芽吹く 5 月頃に幼虫が孵化し、11 月から 12 月にはその年の最後の成虫が発生する（橋本・佐藤, 1958; 別添 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に摂食するようになる（名和, 1936; 大村, 1950）。飼育に際しては、餌があっても動き回るため、容器の蓋を閉めて、逃亡を防止する必要がある。

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

【クワコの生理学的及び生態学的特性：繁殖又は増殖の様式】

クワコは受精によって生じた卵から発生する有性生殖を行う。

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

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

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

冬を越して春に孵化する越年卵では、卵から幼虫が出てくる孵化は一斉に起きるのではなく、4 月頃から始まって 2 か月以上にわたって徐々に起きる（大場, 1939a; 大村, 1950）。孵化率は、自然条件下では寄生蜂による被害を受けるため一定しない。飼育条件下での孵化率は変異が大きいが、概ね 80%程度と報告されている（大村, 1950）。春に生まれた個体が産卵すると、休眠しないで胚発生が進む不越年卵となり、この場合は、産卵から 10 日程度で一斉に孵化する（大村, 1950）。

【クワコの生理学的及び生態学的特性：捕食・寄生される可能性】

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

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

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

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

Kuwahara Y., Mori N., Yamada S., and Nemoto T. (1984) Evaluation of bombykol as the sex

pheromone of *Bombyx mandarina* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 19, 265-267.

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

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

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

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

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

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

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

横山岳（2019）　クワコの生殖・産卵と天敵．　蚕糸・昆虫バイオテック 88, 25－38.

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

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 5　カイコから日本各地の野生のクワコ集団への遺伝子流入に関する調査

（論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。）

別添 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第一代はカイコ由来のミトコンドリアを持つことから、ミトコンドリア *cox1* 遺伝子の遺伝子型を解析することにより、クワコ集団内の交雑第一代の割合を直接的に明らかにすることができる。

【調査方法】

（1）クワコを採集するフェロモントラップの設置

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

（2）調査地

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

表 1. 調査地とした養蚕農家の飼育規模（平成 26 年）

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

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.

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。

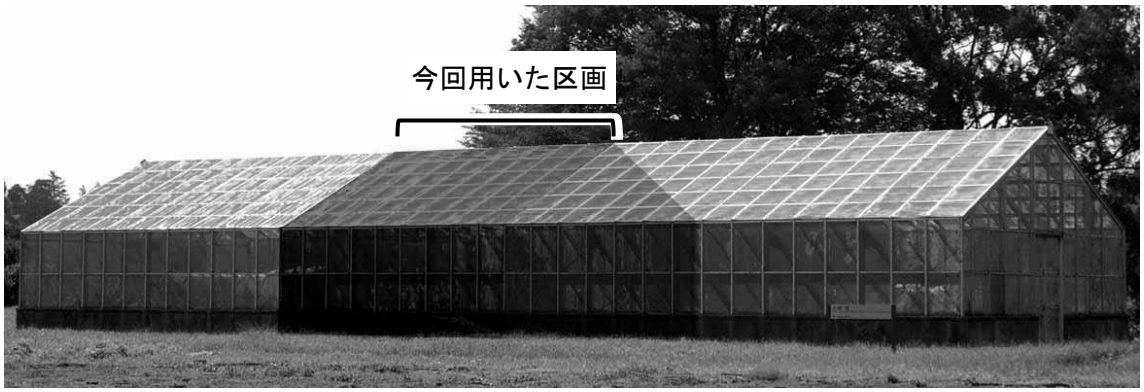


図 1.　網室の外観。

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。

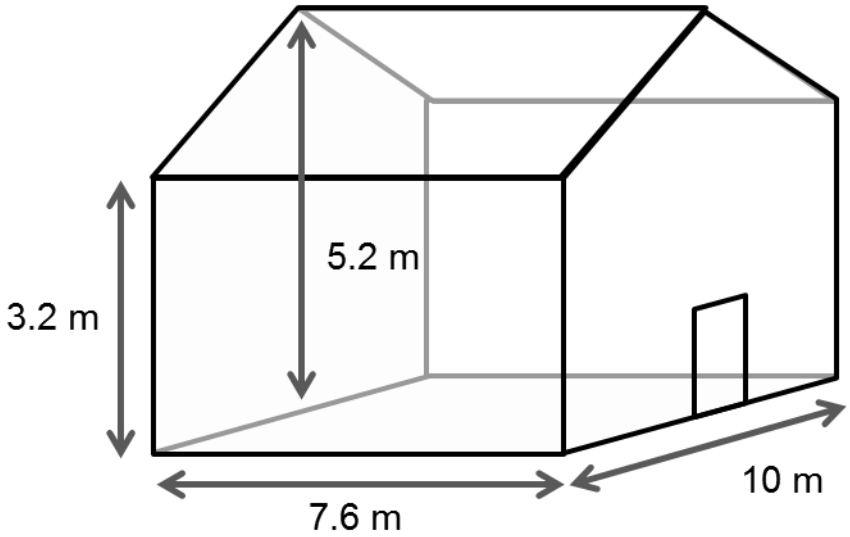


図 2.　使用した区画の大きさ

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 F_3 まで、見波・大場（1939）が F_4 まで、それぞれ経代飼育の結果を報告している。このことからも、カイコとクワコの交雑個体及びその後代には妊性があることが確認できる。

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

別添 8　自然界におけるカイコとクワコの交雑第一代の生存能力に関する調査

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

【調査方法】

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

【結果】

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

2015 年 6 月に 3 日間で合計 626 頭、2015 年 8 月に 3 日間で合計 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 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

（論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。）

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

（知的財産保護の観点から部外秘）

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

【方法】

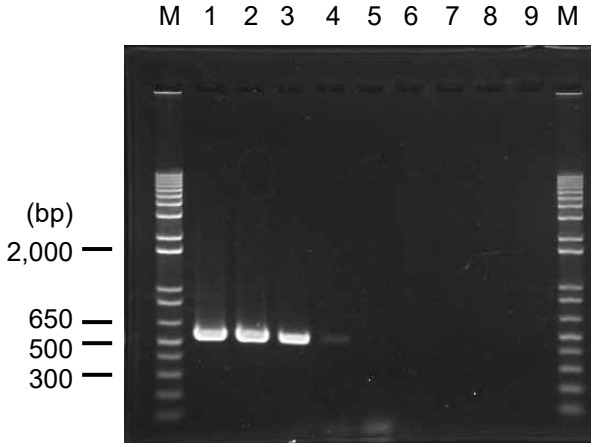
GCS500$_5$ 世代（生物多様性影響評価書　図 10 参照）の遺伝子組換えカイコ（GCS500 系統）の 5 齢幼虫の後部絹糸腺からゲノム DNA を抽出し、0.5 μg を鋳型として、KOD-plus を用いて 30 サイクルの PCR を行い、転移酵素遺伝子の一部を増幅した。検出限界を示すため、ヘルパープラスミドを段階希釈して鋳型とした PCR も行った。PCR は 50 μl の反応系で行い、そのうち 5 μl を 1 %アガロースゲルで電気泳動した。

プライマーの塩基配列は以下のとおり。

pig-TP4868U25: 5’-TATATCCCAAACAAGCCAAGTAAGT-3’
pig-TP5394L23: 5’-CCACCTATTCGTCTTCCTACTGC-3’

【結果】

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



M　:　分子量マーカー
1　:　ヘルパーDNA　4 ng　(カイコゲノム DNA 0.5 μg 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　$4x10^{-3}$ pg　($7x10^{-4}$ コピー分)
5　:　ヘルパーDNA　$4x10^{-5}$ pg　($7x10^{-6}$ コピー分)
6-9　:　GCS500 ゲノム DNA 0.5 μg（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（GCS500 系統）と非遺伝子組換えカイコ（中 514 号系統）との F_1 同士を交配して、次代（F_2）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、選抜マーカー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】

F_2 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。F_2 世代で優性マーカー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 GCS500 系統のゲノム中に 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 GCS500 系統の複数の世代（$GCS500_5$ 世代及び $GCS500_7$ 世代、生物多様性影響評価書　図 10 参照、以下同じ。）、GCS500 系統と非遺伝子組換えカイコ（中 515 号系統）の F_1（[中 515 号×GCS500]$_7$ 世代）及び非遺伝子組換えカイコ（中 515 号系統と中 514 号系統の F_1）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。

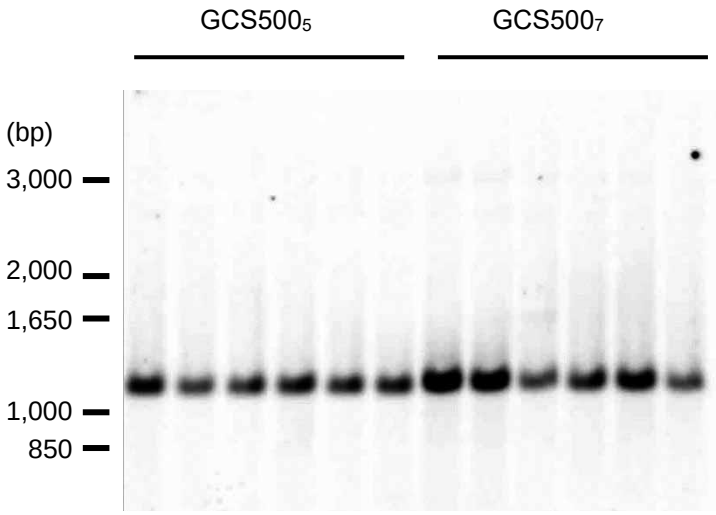
ゲノム DNA を（2 μg）を制限酵素 *Msp* I で消化したのち、0.8 %アガロースゲルで電気泳動を行い、ナイロンメンブレン Hybond-N+にトランスファーした。プローブは、生物多様性影響評価書中の図 6 に示すように piggyBac R に設定し、PCR で作製した（691 bp）。プライマーの塩基配列は以下のとおりである。

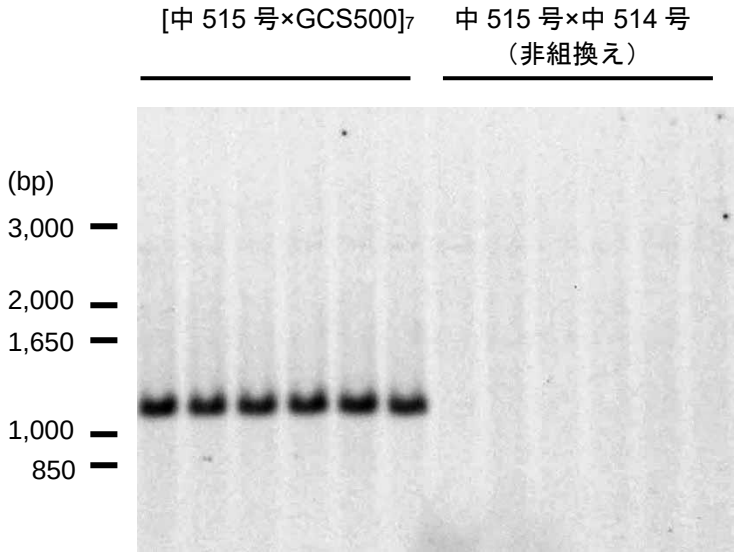
Rarm-5: 5’-TGTTTTATCGGTCTGTATATCGAGG-3’
Rarm-3: 5’-GGTGGCCTATGGCATTATTGTACGG-3’

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カイコゲノムに安定的に維持されている。




[中 515 号×GCS500]7
中 515 号×中 514 号
（非組換え）
(bp)
3,000
2,000
1,650
1,000
850

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である GCS500 系統（$GCS500_7$ 世代）、GCS500 系統と非遺伝子組換えカイコ（中 515 号系統）の F_1（[中 515 号×GCS500]$_7$ 世代）、非遺伝子組換えカイコである中 514 系統、中 515 系統と中 514 系統の F_1 を同時期に飼育して、それぞれ 3 個体について、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’

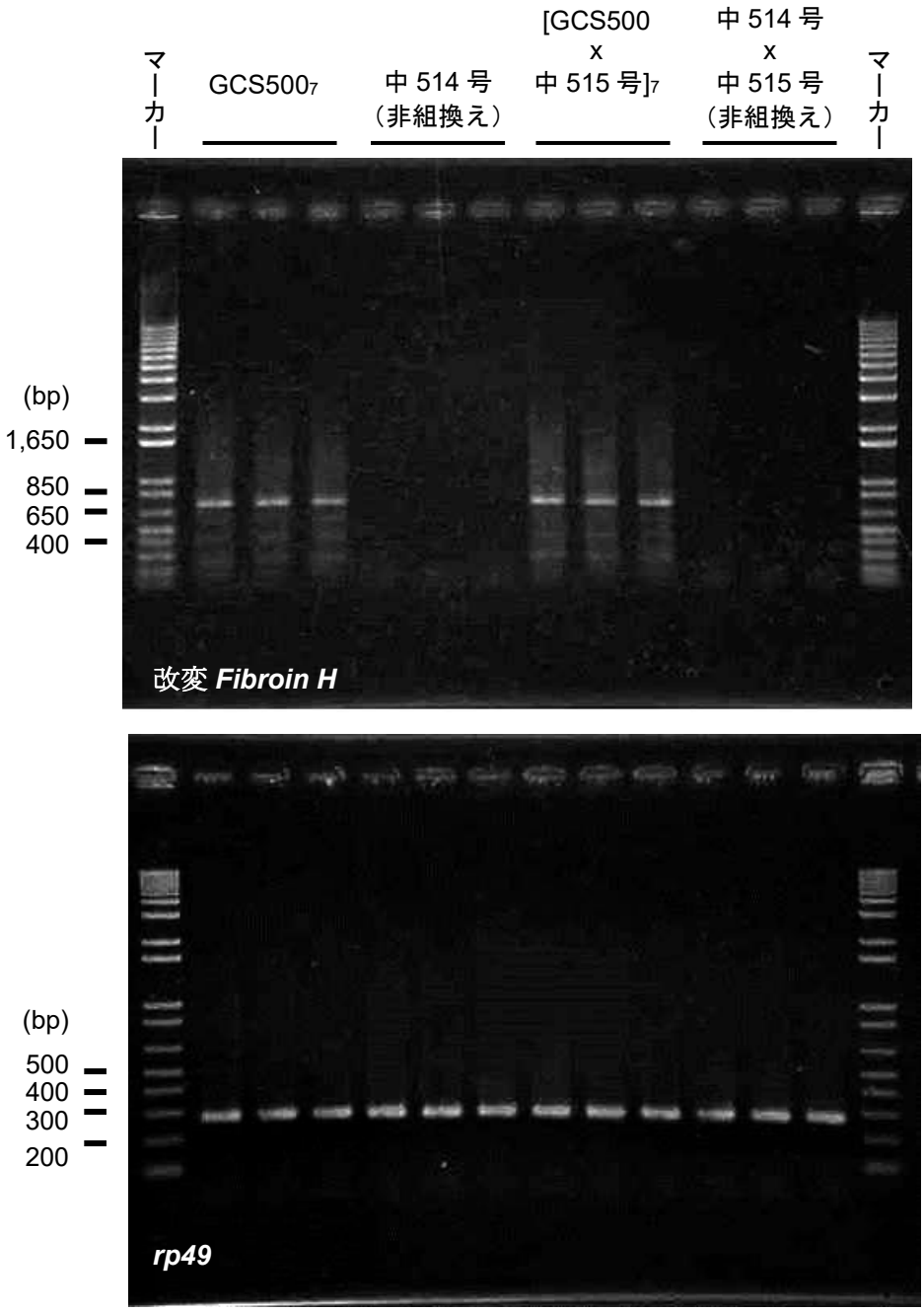
PCR は 10 μl の反応系で行い、そのうちの 3 μl を 2%アガロースゲルで電気泳動した。

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 も行った。*rp49* 遺伝子のプライマーの塩基配列は以下のとおりである。

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

【結果】

図のとおり、予想されるサイズ（748 bp）の改変領域の PCR 産物が、遺伝子組換えカイコすべてで同程度に検出され、一方、非遺伝子組換えカイコでは検出されなかった。また、*rp49* 遺伝子はいずれの個体からも増幅された（276 bp）。このことから、今回の申請に用いる遺伝子組換えカイコ系統では、導入遺伝子が安定的に発現していることが確認できた。


マーカー
GCS500$_7$
中 514 号
（非組換え）
[GCS500
x
中 515 号]$_7$
中 514 号
x
中 515 号
（非組換え）
マーカー
(bp)
1,650
850
650
400
改変 *Fibroin H*
(bp)
500
400
300
200
rp49

別添 16　改変フィブロイン H 鎖タンパク質の発現量

【方法】

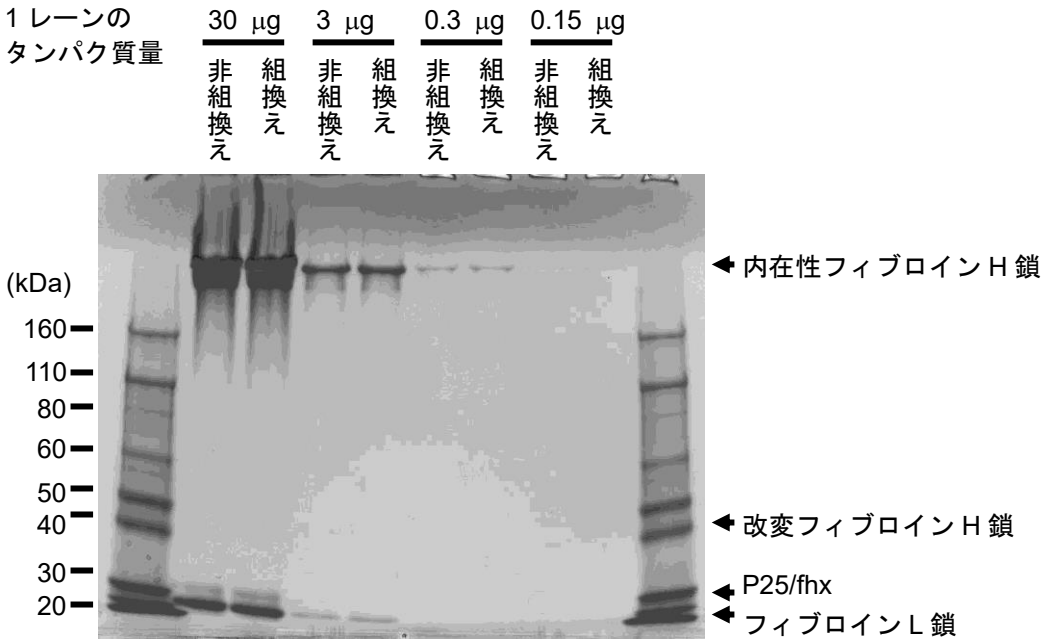
遺伝子組換えカイコと非遺伝子組換えカイコについて、繭層のタンパク質を電気泳動し、遺伝子組換えカイコで発現する改変フィブロイン H 鎖タンパク質の量を、内在性のフィブロイン H 鎖タンパク質の量を比較した。稚蚕期（1 齢から 3 齢）を人工飼料で、壮蚕期（4・5 齢）を桑葉で飼育した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 10 の [中 515 号×GCS500]$_8$）。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500
対照となる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℃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℃、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℃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。



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 の[中 515 号×GCS500]$_7$）。

遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×GCS500
対照となる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 頭をまとめて体重を測定し、1 頭あたりの体重を計算した。4 グループずつを計測した。

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	2 齢起蚕	3 齢起蚕	4 齢起蚕	5 齢起蚕
中 515 号×GCS500	0.385±0.0452	4.66±0.199	30.7±3.09	181±17.8	797±72.4
中 515 号×中 514 号	0.391±0.0332	5.32±0.208	29.6±2.60	175±13.6	815±74.3
P（t 検定）	0.85	0.00	0.11	0.14	0.27

（単位：mg、平均±標準偏差）

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 の[中 515 号×GCS500]$_8$）。

遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×GCS500
対照となる非遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×中 514 号

【結果】

	オス			メス		
系統	個数	繭重	繭層重	個数	繭重	繭層重
中 515 号×GCS500	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
P（t 検定）		0.00	0.00		0.00	0.00

（単位：g、平均±標準偏差）

別添 19　繭糸および生糸の特性

【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、繭糸およ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 の[中 515 号×GCS500]$_3$）。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500
対照となる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℃、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、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℃、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℃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、緩やかに撹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】

繊度および強度

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

繊度およ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 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。

ローダミン染色およ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 10 の[中 515 号×GCS500]$_7$）。

遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×GCS500
対照となる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	不受精卵数	死卵数	孵化卵数	孵化歩合（%）
中 515 号×GCS500	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 の[中 515 号×GCS500]$_8$）。

遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×GCS500
対照となる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】

	オス		メス	
系統	繭形成数	幼虫期間（日）	繭形成数	幼虫期間（日）
中 515 号×GCS500	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）
P（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 の[中 515 号×GCS500]$_7$）。

遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×GCS500
対照となる非遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×中 514 号

【結果】

系統	4 齢 起蚕数	結繭蚕数	営繭率 （%）
中 515 号×GCS500	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（稚蚕）の行動の比較

【方法】

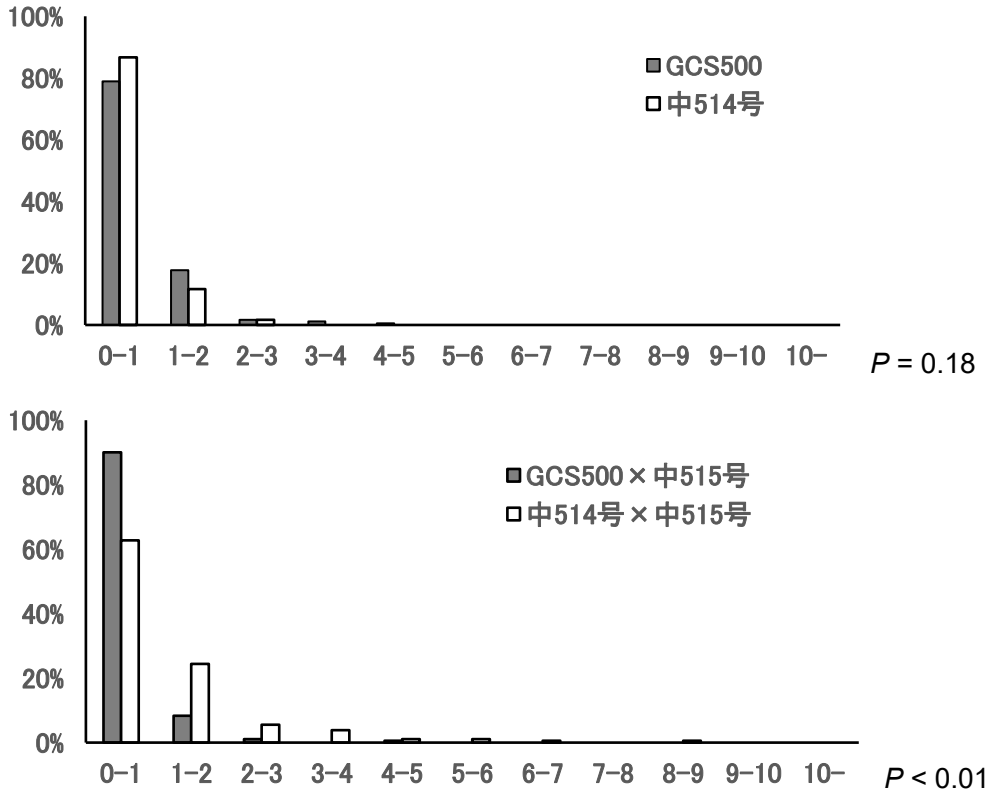
孵化当日のカイコ幼虫については、半径 10 cm の円を描いた紙の中央に 30 頭ずつ置いて、30 分後の位置を写真に撮って記録し、中央からの距離を計測した。これを各系統について 6 回繰り返した。

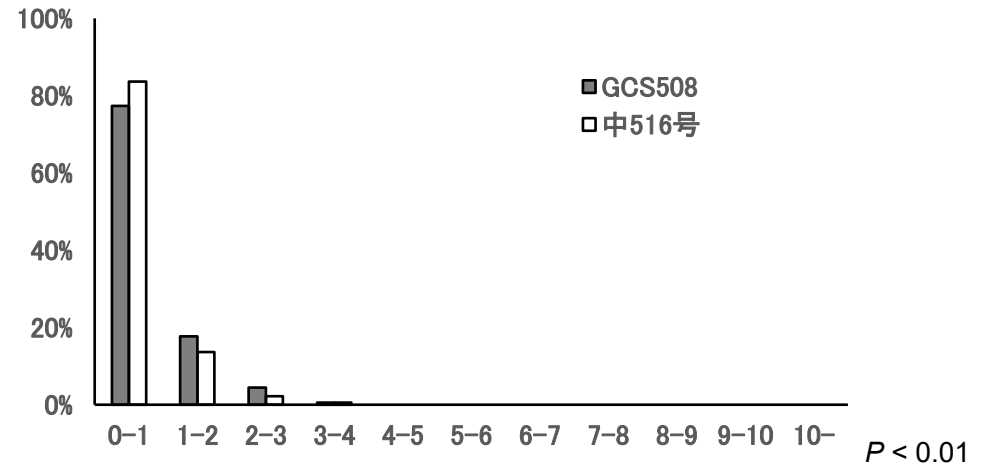
2 齢脱皮当日のカイコ幼虫については、半径 10 cm の円を描いた紙の中央に 10 頭ずつ置いて、60 分後の位置を写真に撮って記録し、中央からの距離を計測した。これを各系統について 6 回繰り返した。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 10 を参照）。

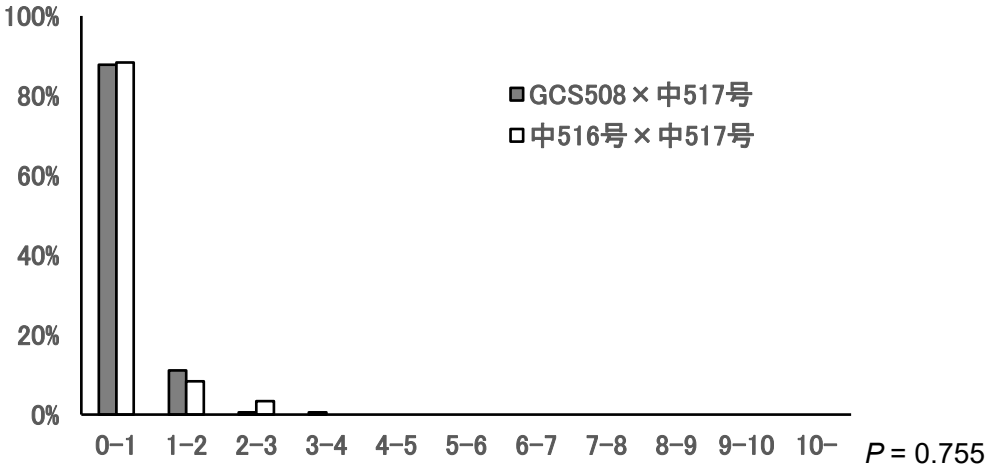
遺伝子組換えカイコ	非遺伝子組換えカイコ
$GCS500_{15}$ $[GCS500\times中515号]_{15}$	中 514 号 [中 514 号×中 515 号]
$GCS508_{15}$ $[GCS508\times中517号]_{15}$	中 516 号 [中 516 号×中 517 号]

【結果】

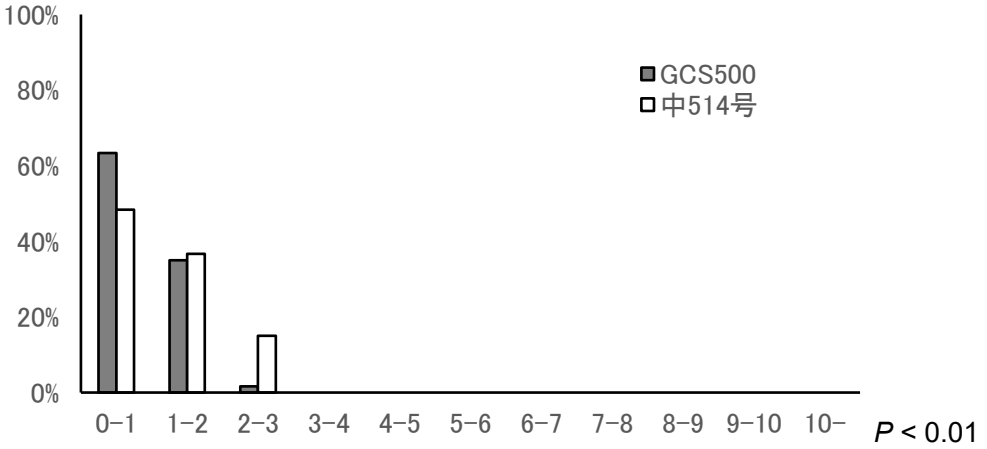
孵化幼虫の移動距離を 1 cm ごとのヒストグラムに表すと下図のようになった。差がないことを帰無仮説とした Mann-Whitney の U 検定の結果を図の右に示す。

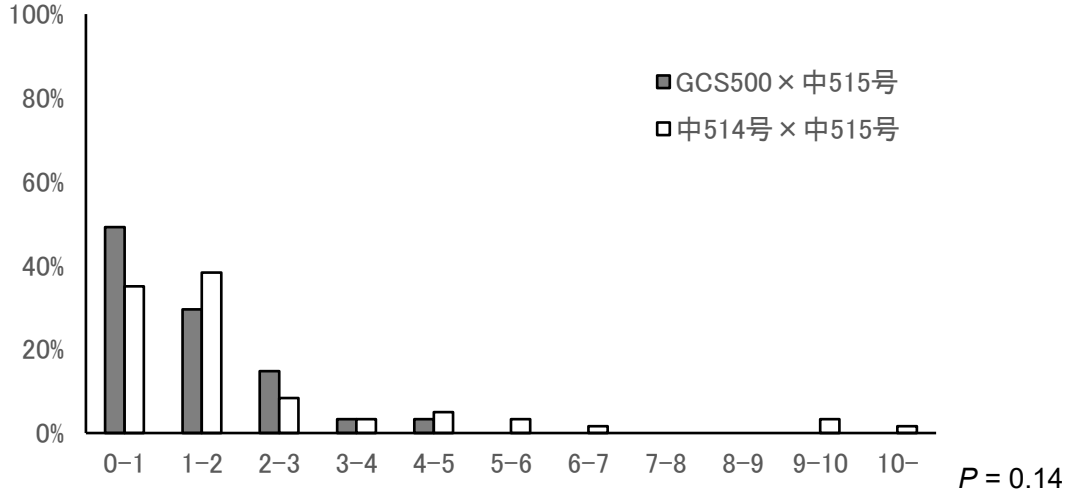


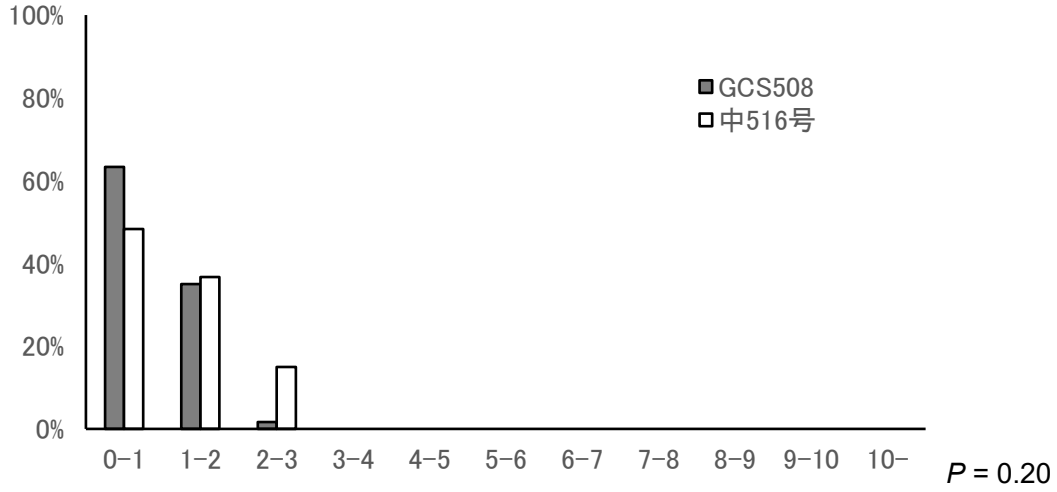


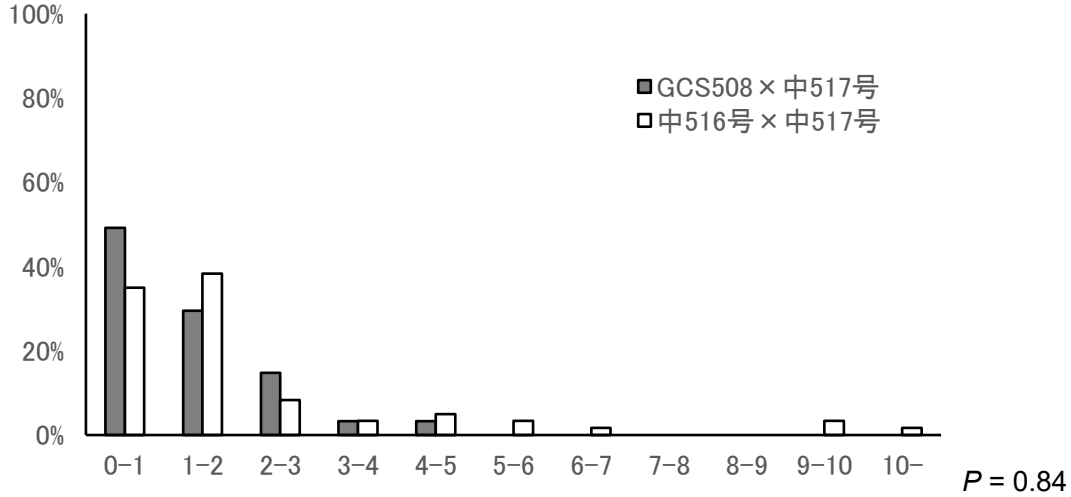


2 齢幼虫の移動距離を 1 cm ごとのヒストグラムに表すと下図のようになった。差がないことを帰無仮説とした Mann-Whitney の U 検定の結果を図の右に示す。




100%
80%
60%
40%
20%
0%
GCS500×中515号
中514号×中515号
0-1
1-2
2-3
3-4
4-5
5-6
6-7
7-8
8-9
9-10
10-
P = 0.14


100%
80%
60%
40%
20%
0%
GCS508
中516号
0-1
1-2
2-3
3-4
4-5
5-6
6-7
7-8
8-9
9-10
10-
P = 0.20


100%
80%
60%
40%
20%
0%
GCS508×中517号
中516号×中517号
0-1
1-2
2-3
3-4
4-5
5-6
6-7
7-8
8-9
9-10
10-
P = 0.84

別添 24　幼虫（５齢）の行動の比較

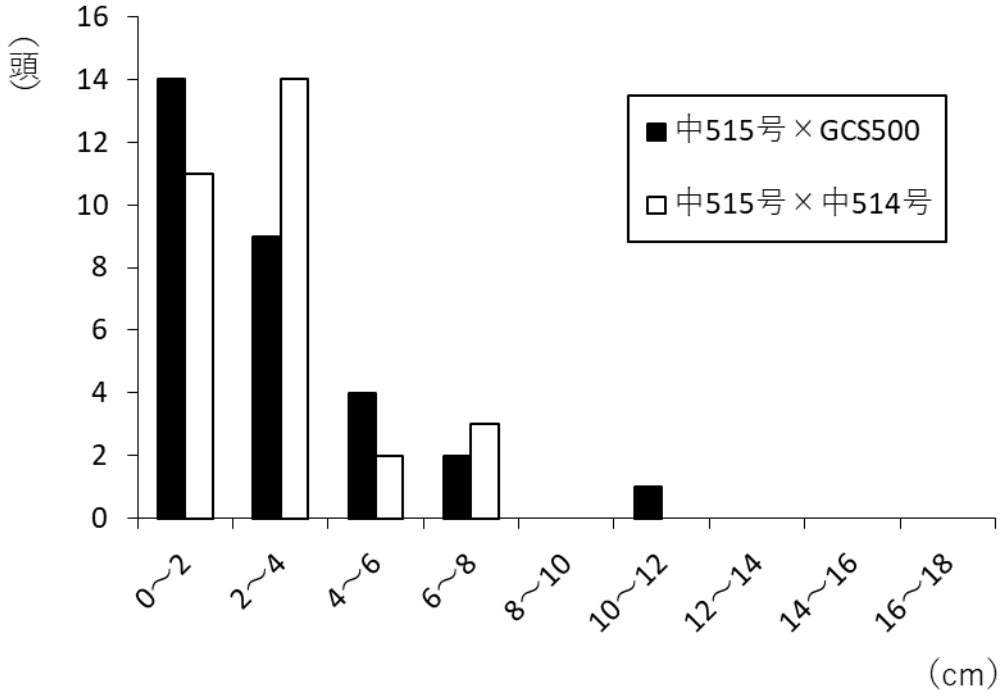
【方法】

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 の $G_{7\text{-}2}$）。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500
対照となる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（t 検定で $P = 0.97$）。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 25　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 の [中 515 号×GCS500]$_7$）。

遺伝子組換えカイコ　　中 515 号×GCS500
対照となる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	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 26　産卵行動の比較

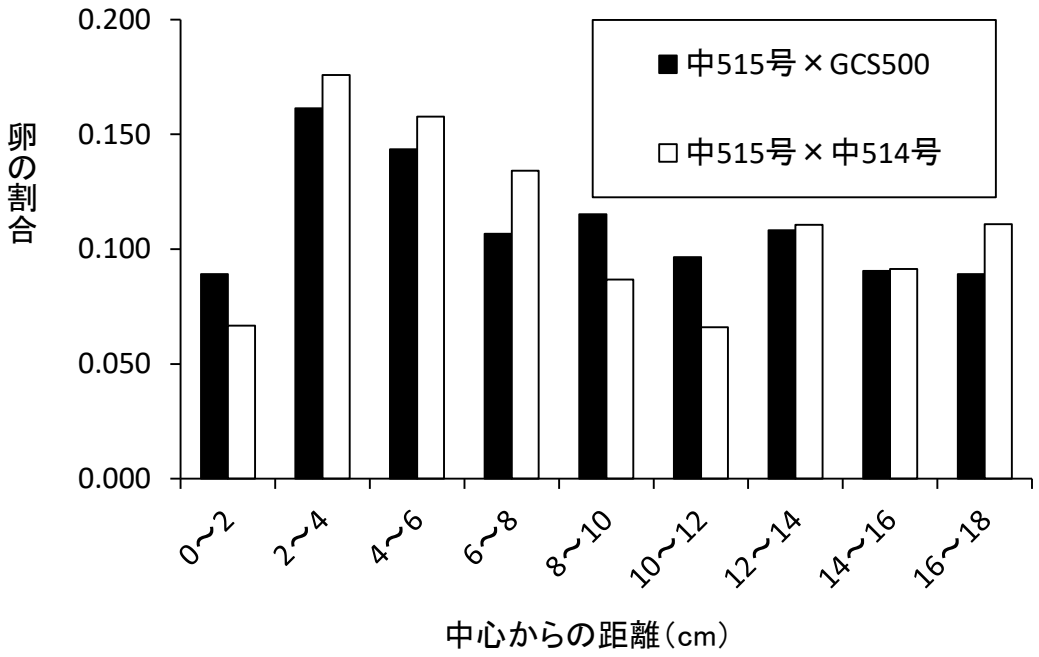
【方法】

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 の[中 515 号×GCS500]$_7$）。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500
対照となる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 ごとの卵の数を合計して、それぞれの卵の総数に対する割合をヒストグラムに表すと下図のようになった。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 27　植物の発芽や生育に与える影響の比較

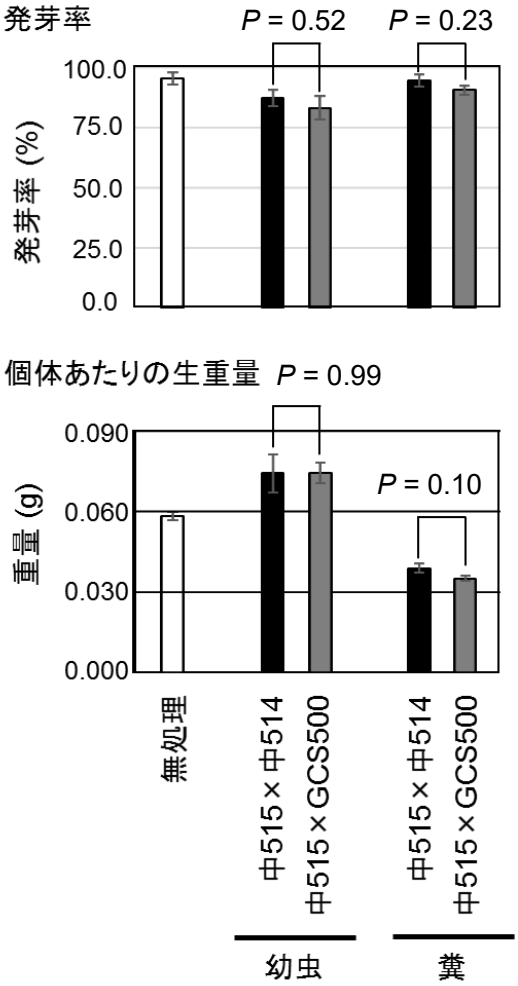
【方法】

冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、これを 1%混入した無肥粒状培土を連結トレイ（7.5 cm 角）に 100 g ずつ入れ、1 穴にブロッコリー（緑嶺）種子 30 粒を播種した（各試験区について 5 反復）。これを 20℃・自然光の条件に置き、播種後 7 日で発芽数を調査し、2 週間で地上部を回収して、一株当たりの新鮮重を調査した。試験期間中に施肥は行っていない。供試系統は以下のとおりとした（生物多様性影響評価書　図 10 の[中 515 号×GCS500]$_7$）。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500
対照となる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 28　土壌微生物に与える影響の比較

【方法】

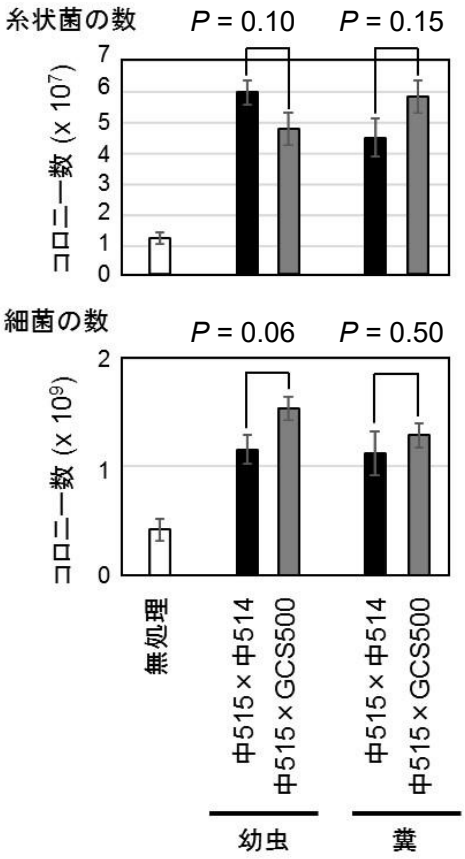
冷凍保存したカイコ 5 齢幼虫または糞を凍結乾燥して粉末とし、前年に麦を栽培した畑の土（土壌消毒していない）に 1%の割合で混和した。この土壌 100g に滅菌水 50 ml を加えて湿潤させ、25℃で 2 週間培養した。その後、5 g を秤量して 45 ml の滅菌水と混合した後、10^2～10^6 倍希釈液を作成した。糸状菌については、10^2、10^3、10^4 倍希釈液 200 μl を直径 9 cm シャーレのローズベンガル培地上に塗布し、25℃で 3 日間培養した後、コロニー数を調査した（各試験区について 5 反復）。細菌・放線菌については、10^4、10^5、10^6 倍希釈液 200 μl を直径 9 cm シャーレの PTYG 培地上に塗布し、25℃で 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 の[中 515 号×GCS500]$_7$）。

遺伝子組換えカイコ	中 515 号×GCS500
対照となる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（放線菌を含む）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 検定で $P > 0.05$）。



別添 29　粉砕機での粉砕による飼育残渣内のカイコの不活化

（論文投稿予定の未発表データを含むため部外秘。）

別添 30　飼育残渣を屋外で保管する際の管理措置

屋外における飼育残渣に混入したカイコの調査及びクワコとの交雑を調べた。

【方法】

15,000 頭のカイコを飼育した後に残った飼育残渣について、飼育容器に入れたままの状態で目視できる範囲で繭やカイコを取り除いた上で屋外の残渣保管場所に運び、4 mm 目の網で覆って 20 日間保管した後で、飼育残渣内を確認した。

【結果】

飼育残渣内に繭が 12 個見つかり、そのうち成虫が羽化した跡があった繭は 7 個であった。飼育残渣内に生存しているカイコは認められなかった。また、クワコの昆虫や交雑の形跡は認められなかった。

生物多様性影響を防ぐための飼育残渣の管理措置について、以下に検討結果を示す。

【飼育残渣中からのカイコの除去】

飼育残渣中にカイコが混入する可能性として、

（1）4 齢期中に繭を作り（三眠蚕）、飼育残渣内に紛れ込む場合、

（2）5 齢期中に通常の個体より早く繭を作り、飼育残渣内に紛れ込む場合、

（3）生育が遅れて飼育残渣内に紛れ込む場合、

が考えられる。

（1）については、三眠蚕の 4 齢期は通常のカイコの 4 齢期よりも数日長く（竹内、1954）、通常のカイコが 4 回目の脱皮のために静止している期間に、三眠蚕は桑葉を摂食するために体を動かすので、目視で容易に発見でき、排除しやすい。このため、飼育残渣内に残る可能性は低い。

（2）については、繭を形成する時期のカイコは、上方に移動すること、並びに、本遺伝子組換えカイコの繭は赤色であることから、飼育残渣内で発見することが容易である。

（3）については、生育が遅くても最終的に営繭し成虫まで至る壮健な幼虫であれば、飼育残渣の上方まで出てくる性質があるため、発見することが可能である。一方、虚弱な幼虫は飼育残渣の中にとどまるおそれがある。

【網の目合いの大きさ】

クワコのオス成虫の大きさは、体長 14 mm 程度、翅長 30～40 mm 程度であり、4 mm 目合いの網を通り抜けることができない。また、カイコのメス成虫はさらに大きいため、

これも網を通り抜けることができない。以上のことから、4 mm 目合いの網又はビニールシートで飼育残渣を覆えば、クワコのオス成虫の侵入とカイコのメス成虫の脱出を防ぐことができる。

【管理する期間】

カイコの成虫の生存期間については、25℃で最大で 15 日との報告がある（村上、2010）ことから、残渣を網で覆って管理を始めた際に繭又は蛹が混入していた場合、蛹の期間を 2 週間程度と考えると、30 日間経過すれば、すべて死亡し、クワコとの交雑の可能性はなくなると考えられる。

実際、上述の試験においても、15,000 頭分の飼育残渣を網で覆って 20 日間保管した後で、飼育残渣を詳細に確認したところ、羽化の形跡がある繭が 7 個あったものの、生存しているカイコは認められていない。

【残渣保管場所で 30 日間保管した後の状態】

上で述べたように、飼育残渣からカイコを取り除いてから、残渣保管場所において網で覆って 30 日間保管した後は、保管開始時に含まれていた幼虫や蛹、成虫は、クワコと交尾することなくすべて死亡している。その上で、もし、網の中でカイコのメス成虫とオス成虫が生じて交尾した場合、飼育残渣中の桑枝等に受精卵が産み付けられる可能性が考えられる。しかし、その受精卵から孵化するカイコ幼虫は人間が世話をしない状態で自立的に桑樹を登って生存することはできない。したがって、上述の 30 日間の保管が終了した段階で、クワコと交尾可能なカイコが生じる可能性はなく、交雑性に起因する生物多様性影響は生じない。

【飼育残渣に残された受精卵と孵化幼虫の不活化】

もし、残渣保管場所での保管中に網の中で遺伝子組換えカイコのメス成虫とオス成虫が生じて交尾し、受精卵からカイコ幼虫が孵化しても、飼育残渣中には食べられる桑葉はない。餌がない状態で孵化幼虫の 95%が死亡するのは気温 23℃で 240 時間以内、15℃で 430 時間以内であり、最長生存期間は 23℃で 288 時間、15℃で 504 時間であったと報告されている（山崎ら、1958）。

産卵から孵化までの期間は非休眠卵と休眠卵で異なる。

非休眠卵の場合は 10～14 日程度であるから、孵化後の生存日数と合わせて 35 日程度ですべてが死亡する。

休眠卵の場合は、産卵時期に関わらず冬を越して翌春に孵化する。自然温度に休眠卵を置いた場合の孵化時期については、兵庫県明石市での 1947 年から 1953 年までの調査では、最多孵化日が 5 月 3 日から 5 月 18 日であった（江口ら、1954）。また、孵化の初日

から終了までの期間は 9～11 日間（1952 年の調査）であった（江口、1954）。孵化期間の中間が最多孵化日であるとすると、孵化は遅くとも 5 月 24 日には終了すると見積もられる。上述の孵化幼虫の生存期間と合わせると、飼育残渣内でカイコの休眠卵が産み付けられていても、摂食可能な桑葉がない状態で翌年の 6 月 15 日まで飼育残渣を保管すれば、その中のカイコはすべて不活化される。

文献

江口嘉清（1954）自然状態に保護した蚕卵の孵化の地方差について.　蚕糸研究　8, 10-13.

江口嘉清・中田昌保・飛田勉（1954）自然状態に保護した蚕卵の孵化期と温度及び春期桑樹の脱苞、開葉期との関係.　蚕糸研究　8, 3-9.

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

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.

山崎昭治・石野昭治・黒井静・石川フミ（1958）蟻蚕の環境別生存日時について.　新潟県蚕業試験場要報　3, 1-6.

別添 31　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 32　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。）