

厚生労働科学研究費補助金

食品安全確保研究事業

**バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に
関する研究**

平成15年度 総括・分担研究報告書

(H15-食品-003)

主任研究者 長尾 拓

平成16年3月

目次

I. 総括研究報告書

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究 長尾 拓	1
-----------------------------------	---

II 分担研究報告書

1 組換え微生物の国際動向等に関する研究 遺伝子組み換え魚文献検索に関する研究 リスク・コミュニケーションのあり方に関する研究 諸外国におけるリスク管理、ポストマーケティングに関する研究 長尾 拓	8
2 安全性評価に関する研究（1）～（4） 小関 良宏	48
3 遺伝子組換え体の検知に関する調査研究 米谷 民雄	65
4 新規タンパク質のアレルギー性評価に関する調査研究 手島 玲子	98
5 遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発ガン性併用試験 菅野 純	113

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	124
---------------------	-----

厚生労働科学研究費（食品安全確保研究事業）

総括研究報告書

ハイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所長 長尾拓

研究要旨

ハイオテクノロジー応用食品等の安全性確保に関する研究を遂行するため、1主任研究者、4分担研究者を中心として、18機関にわたる研究グループを組織した。1)ハイオテクノロジーを応用した食品のより一層の安全性確保のための科学的知見の蓄積、2)安全性審査基準への反映、検査体制の確立を目的として、各種調査研究ならびに、後代交配種に関する導入遺伝子の安定性検討、アレルギー性試験、毒性試験等の実践的研究を行った。さらに、当該食品の検知に関する試験法の確立を行うとともに、リスクコミュニケーションに関する調査研究を行った。

分担研究者

小関良宏 東京農工大学工学部教授
米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部長
手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部室長
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部長

の確立のための遺伝子組換え体の検知に関する研究を米谷班員、安全性評価方法の一層の検討、開発のための遺伝子組換え体のアレルギー性に関する研究を手島班員、遺伝子組換え体の慢性毒性試験に関する研究を菅野班員が担当し、主任研究者は、研究班全体の総括を行った。また、遺伝子組換え食品に関する開発 実用化の動向や安全性に関する調査研究の一環として、リスクコミュニケーションに関する調査、諸外国における遺伝子組換え食品に関するポストマーケティングの調査、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際動向の調査研究、遺伝子組換え魚に関する文献調査について、三菱化学安全科学研究所、東京大学薬学部、国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部並びに独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所で行われたものを主任研究者かとりまとめた。

研究目的

本研究は、厚生労働省医薬食品局食品安全部の強い依頼をうけ遂行されるもので、バイオテクノロジーを応用した食品の安全性確保のための科学的知見の蓄積、当該食品の検知に関する試験法の確立、安全性審査基準への反映並びにリスクコミュニケーション及び現在海外で開発されている組換え体の安全性評価状況等に関する調査研究を行うことを目的とする。

B 研究方法

植物中の遺伝子発現変動調査法の開発等による導入遺伝子の安定性に係わる安全性評価に関する研究を小関班員、安全性確保に有用な試験方法

C 結果と考察

諸外国におけるリスク管理、ポストマーケテ

インクに係る調査研究 遺伝子組み換え作物・食品 (GMO) については、主要各国は既にそれらの生産、販売を許可しており、日本も一定の基準のもと輸入・販売を許可している。しかし消費者の行動は慎重で、国内の消費実績は依然限定的である。事実、大豆製品のほとんどは、非遺伝子組み換え (非 GM) 表示をしており、GMO は市場で十分受け入れられていない。

GMO の安全性は、究極的には市場で消費された結果を慎重にトレースすることによって評価される。従って、生産・販売・消費実績が先行している、欧米の事例の状況調査は、我が国の対応を考える上で有益である。そこで欧米諸国の現状を調査するため、文献調査に加え、国内の GMO 関係者に面談を行なった。

その結果、GMO を原料とした食品に関して、ポストマーケティングモニタリング (PMM) を組織的・継続的に実行している国・地域は、見当たらなかった。また具体的な実施計画を策定している事例も見出せていない。唯一の例外は、米国で限定的に行なわれたスターリンクの事例である。スターリンクは Aventis 社が開発した害虫抵抗性 GM トウモロコシで、米国では飼料用としてのみ許可されていた。ところが 2000 年に人の食料への混入が判明し、問題となった。有害事象との関連が追跡調査され、絞り込まれた食物アレルギーを呈した人に対して聞き取り調査及び血清調査を行ったが因果関係は認められず、それ以降の追跡調査はされていない模様である。現状では、欧米での GMO 利用は大部分が飼料用や食用油であるため、真剣度は高くないと考える向きもある。今後の課題として、特に EU では NGO などが独自調査を行っている可能性があり、更なる調査が必要である。また近々米国で GM 小麦の生産・販

売が許可される予定であり、GMO 由来蛋白質が大規模に人に摂取されることになり、PMM 論議の見直しが予想される。最近日本でも限定的ながら GMO 食品が販売されており、追跡調査が可能であるかを評価することも重要である。

リスクコミュニケーションに関する調査研究 厚生労働省による遺伝子組換え食品に関するリスク・コミュニケーションのあり方の検討の一環として、厚生労働省による情報提供、とくに遺伝子組換え食品ホームページについて、市民がほしいと思っている情報が分かりやすく提供されているかどうかについて検討を行った。平成 13 年度の検討時点に比較して、現在は厚生労働省のトップページから遺伝子組換え食品ホームページを探すことは格段に容易になった。また、遺伝子組換え食品ホームページの中に、平成 15 年春に作成された「遺伝子組換え食品の安全性について」というパンフレットも掲載されており、市民向けの情報は増加した。しかし、遺伝子組換え食品ホームページのトップページには、まだ市民にとって分かりやすくするための工夫の余地がある。また、「遺伝子組換え食品 Q&A」は、市民が一番知りたいことや、市民によって求める情報の詳しさが異なることに対する配慮がなされていないために、市民にとって読みやすいものにはなっていないように思われる。質問内容も、「遺伝子組換え食品は安全なんだろうかなんたろうか」という市民が一番知りたいことが直接的に尋ねられていないために、市民の疑問は解消されないのではないかと懸念される。さらに、答えの記述にも市民になしみの薄い固い表現が用いられているケースが見受けられ、総じて、市民の疑問に答えよう、市民に分かりやすく情報を伝えよう、という配慮が不十分であるように感じられる。この

ようなことから、遺伝子組換え食品ホームページのトップページの構成、および「遺伝子組換え食品 Q&A」について、市民にわかりやすいものにするための具体的な改善提案を行った。

組換え微生物の国際動向等に関する研究 ハイオテクノロジー応用食品の安全性に関する国際的な動向の情報を収集すると共に、国際機関により開催される関連会議に出席し、その議論に参加した。協力研究者の吉倉か議長を務めた codex における組換え食品のタスクフォースは、2003 年 3 月リスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の 3 つのテキストで合意に達した。同年 6 月の codex 総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が提案文書を作成する事となった。吉倉が原案を作成し、厚生労働省で最終案とし、関係国に打診中である。研究としては、遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性評価に特に重要と思われ、かつその試験法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いた検討を試みた。昨年度に引き続きマウス腸管内での遺伝子の移行について検討を行い、通常の組換えに用いるプラスミドが、自然界に分布する接合伝達性プラスミドの働きにより、マウス腸内棲息菌に伝達されることを再度確認すると共に、そのプロトコールを実際の評価法として利用可能なプロトコールとなるよう検討を加えた。

遺伝子組換え魚に関する文献調査 遺伝子組換え魚に関する情報を文献検索、インターネット、特許、雑誌・新聞等を用いて収集を行った。

前年度報告した組換え体魚種以外に新たに作

出された魚種の報告はなかった。導入される遺伝子は成長ホルモン遺伝子が主であるが、近年、成長ホルモン遺伝子以外に耐病性を付与するような遺伝子導入の報告も行われるようになってきた。昨年、秋、フランスのグループが魚類に病原性を示すウイルスの特定の蛋白をコードする領域の前にプロモーターを付けた遺伝子を導入したところ、耐病性を示すといった発表が行われた。病原性ウイルスの研究は盛んに行われ、塩基配列等の情報も多いことから、今後、このような研究が盛んになると思われる。

インターネット上の情報では、アメリカで組換え体魚類を食品として認めるように FDA に申請している A/F Protein 社と FDA のホームページを調べた結果、現在でも認可はされていない。また、アメリカ各州における組換え体の規制状況を調べた結果、8 州において何らかの規制が行われていた。

新たな特許情報として、韓国のグループが組換え体ドジョウで特許をとっていることが判明した。

遺伝子組換え技術を用いた組換え体魚介類は体外受精、産卵数の多さなどの利点から今後も多数の組換え体が作出されると思われる。組換え体の目的は単に高成長といった形質以外に耐病性、高品質化といった多岐の目的に向かった研究がなされつつある。また、対象生物も魚類以外に貝類、エビ・カニ類、海藻類といったように、広がりつつある。近い将来、陸上植物や動物に比較し、種類、数量ともに上回る状況も起こりえるかもしれない。

導入遺伝子の安定性に係わる安全性評価に関する研究

(1)後代交配種における導入遺伝子の安定性の

検討

遺伝子組換え農作物における導入遺伝子の塩基配列上の安定性を調べるため、輸入サイズに含まれていたラウンドアップ レディー・サイズ (RR サイズ) 70 粒から抽出した核 DNA について、そこに含まれる導入遺伝子である 35S-プロモーター *CTP epsps* 遺伝子領域を増幅する PCR プライマーと、サイズの内生コントロール遺伝子である α 型 β -コングリンシン サブユニット (β -*con* α) 遺伝子プロモーター領域を増幅するプライマーを作成し、これらの領域を PCR によって増幅し、その塩基配列を決定した。その結果、シーケンスを確定できた導入遺伝子由来の増幅 DNA 断片 68 個において 34 カ所の変異が認められた。これに対し、 β -*con* α 遺伝子由来の増幅 DNA 断片 65 個において 37 カ所の変異が認められ、導入された遺伝子と内生の遺伝子とにおいて、ほぼ同じ頻度で点突然変異が起こっていること、しかしタンパク質のオープン・リーディング・フレーム領域について調べたところ、導入遺伝子においてアミノ酸置換を生じさしめるような突然変異は非常に少なく、安定性が高いことがわかった。

(2) 遺伝子組換えにおけるポストゲノム解析

遺伝子組換え作物の後代交配種における導入遺伝子及び内生性遺伝子の発現産物の変動と変動の幅を解析することを目的として、大豆のプロテオーム、トランスクリプトームの検討を開始し、また、非タンパク性成分 (低分子代謝産物) の組成と含量を比較し、遺伝子組換えによって作物の栄養素の増減、あるいは有害成

分の増加などが起こっているかどうかを判別するための、メタボローム (代謝産物動態) の一斉解析基盤の整備を開始した。まず、プロテオームに関しては、二次元電気泳動法を利用した大豆のプロテオーム解析を行うための条件検討を行った。第二に、トランスクリプトーム解析の予備的な調査として、解析の障害となる大豆種子から RNA の抽出とその RNA の質的量的ばらつきの検討を行なった。はじめに無菌的な発芽大豆から 2 種類の方法で RNA を抽出し、その量的、質的な相違の有無を DNA マイクロアレイ解析によって検討した。その結果、同一の大豆品種からも相違が見られ、大豆の個体差と抽出法の差異の 2 つの要素が入っているものの、トランスクリプトームレベルでも個々の大豆種子分析によって大きな差があることが示唆された。第三に、メタボローム解析としては、超高精度・超高感度の質量分析器であるフーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置 (FT-ICRMS) を用いた組換え作物の代謝産物の一斉解析を開始した。FT-ICRMS による高分解能マススペクトル測定では、1 ppm 以下の感度で精密質量数を求めることができると同時に、試料の粗抽出物に含まれる成分を未精製のままで一斉に分析に供することが可能である。すなわち、FT-ICRMS は、多検体のメタボロームを高速でプロファイリングする目的において、最も適した質量分析法である。まずペチュニアの花弁を用い、メタノールで抽出される全化合物をエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法によりイオン化し、FT-ICRMS に直接導入し、得られたデータ (質量数と各ピーク強度) に対

して主成分分析を行った。その結果、異なる色素を合成するヘチュニア花卉のメタボロームを構成する代謝産物の種類と量は、主成分分析において異なるクラスターとして存在することが明らかとなった。続いて、ダイス種子のメタノール抽出液を FT-ICRMS に供した結果、単一試料から 400 の化合物イオンを検出することかてきた。本研究により、遺伝子組み換えタイスのメタボロームプロファイルを得ること、およびそれを非遺伝子組み換えダイズの化合物のプロファイルと比較が可能となった。

組換え食品の検知法に関する研究

(1) 遺伝子組換えジャカイモ定性分析法の開発ならびに共同試験による評価

安全性審査を終了した遺伝子組換えシャカイモ全8系統を対象とした定性検知法を開発した。本検知法には8系統を網羅的に検知するためのスクリーニング法、導入されている recombinant DNA に特異的な方法、および系統に特異的な方法が含まれる。開発した全ての方法の6機関参加による協同試験を実施し、精度および頑健性のある検知法であることを実証した。

(2) 遺伝子組換えシャガイモ定量分析法の開発ならびに in house validation

昨年度までに報告している遺伝子組換えシャガイモ NewLeaf ならびに NewLeaf Plus 特異的定量系に加え、スクリーニングを目的とした CryIIIA 定量系を新たに開発し、これに基づく標準プラスミド DNA 分子の改良を行った。また、未加工シャカイモから PCR に適合した性質をもつ DNA を安定して抽出する方法として、CTAB 抽出液を用いた方法を開発した。これら開発された方法を用い、内標比の算出試験、得られた内標比の検証試験 (in

house validation) を実施し、開発した方法が半定量法として適応可能であることを明らかにした。

(3) スタック品種トウモロコシ定性検知法の開発

測定対象検体中にスタック品種が混入している際に、現在公定法とされている定量分析法により算出される混入率が過剰評価になる可能性が考えられるため、スタック品種とうもろこしの混入と粒単位での混入率を明らかにすることを目的に、簡便で迅速な検知法を開発した。

(4) 競合 PCR 法を用いた簡易定量分析法の開発

現在までに定量分析法が確立されている6系統の遺伝子組換え作物(トウモロコシ5系統およびタイズ1系統)を対象に、簡便なスクリーニング試験の開発を目的に、競合 PCR 法の原理に基づく簡易型定量分析法の開発について検討を行った。

(5) 定量分析法の加工食品適用可能性検証法の検討

加工影響を科学的に数値化し、対象検体における定量可能性の基礎的検討をするために、タイズ中の2つの内在性遺伝子の加工による変質を科学的に数値化することを可能にした。

(6) 遺伝子組換えトウモロコシ5系統 ダイズ1系統を対象とした定量分析法の改良

現在までに開発され公定法とされている遺伝子組換えトウモロコシ5系統およびタイズ1系統を対象とした定量分析法における再現性の向上を目的に、使用試薬等についての改良を行った。また、改良後の定量分析法を用いてコラボレーションスタディーを実施し、その妥当性について検証した。さらに定量分析実施可能な定量 PCR 機器の拡充を目的に、基幹機種である ABI PRISM 7700 に加え、同 7000 ならびに 7900、および Roche

LightCycler Systemを用いた検証試験を実施し、全ての定量PCR機器が実際上適応可能であることを明らかにした。

(7) モデル加工食品を使用した遺伝子組換え食品定量分析法の適用可能範囲の検証

現行の定量分析法の加工食品への適用可能性について検証するため、大豆、とうもろこしそれぞれ3種のモデル加工食品を作製し検討した結果、加工影響の小さな品目においては、現行の定量分析法が適応可能性であることを明らかにした。

組換え食品のアレルギー性に関する研究 平成15年度は、(1)アレルギー予測の解析法の検討、(2)食物アレルギー動物モデルの開発、(3)アレルギーの分解性試験の一環としての体内分解産物と患者血清との反応性の検討及び、(4)1種の新規タンパク質と1種の既知アレルギーと患者血清との反応性についてエピトープ部位を考慮した検討を行った。具体的には、(1)アレルギー予測の解析法では、B細胞エピトープの相同性も考慮に入れた既存アレルギーと新規アレルギーの相同性に関するハイオインフォーマティク手法の導入を検討した。アミノ酸の疎水性、親水性だけでなく、エピトープの出現頻度も考慮にいった方法の有用性が示されつつある。(2)食物アレルギー動物モデルの開発では、マウスを用いる経口感作の方法について数種の系統の差違、及び投与時の溶媒の差違について検討を行った。経口感作モデルとして、W/Wv マウスが最も感受性が高いこと、また、BALB/c マウスを用いた経口感作で、溶媒の脂溶性を高めることで、感作能の上昇することが認められた。また、別途、ILSI-HESI主催の食物アレルギー動物モデルの validation 試験に参画し、投与を開始した。(3)アレルギーの分解性試験の一環としての体内分解産物と患

者血清との反応性の検討では、卵白中の主要なアレルギーであるオボムコイド (OVM) の人工胃液による分解産物と患者血清との反応性を詳細に検討し、分解によるアレルギー性の変化を検討した。低分子の 7kDa, 4.5kDa の断片に対しても、一部の患者の IgE 抗体の結合が確認された。(4)1種の新規タンパク質(Cry1Ac)と1種の既知アレルギー(ABA-1)と患者血清との反応においてエピトープを考慮に入れた試験を行うために、6個の連続したアミノ酸の合成ペプチドによる ELISA の阻害試験を行ったが、今年度合成したペプチドでの阻害はかからなかった。

慢性毒性試験に関する研究 本研究は、遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性 発がん性併用試験を国民的要望に対する行政的観点から実施するものである。遺伝子組換えトウモロコシ (MON810 Event Pioneer 33P67 株)、遺伝子非組換えトウモロコシ(Pioneer 33P66 株)をアメリカ合衆国(イリノイ州の同一地域)より、それぞれのトウモロコシを購入し、粗蛋白質量や粗脂質量などの食品成分組成、アミノ酸組成、脂肪酸組成、カビ毒の分析、遺伝子非組換えトウモロコシの遺伝子検査を行い、これらを飼料に添加し、慢性毒性・発がん性併用試験を遂行する上でなんら問題がないことを確認した。改良 NIH Open Formula の飼料配合を元とし、ここで配合されるトウモロコシ 24.5%すべてを遺伝子組換えに置きかえたものを最高用量群とした。改良 NIH Open Formula の配合成分中の脱脂大豆およびグルテンミールを小麦粉に置きかえた。これにより起こる栄養価あるいは栄養バランスの変更は、飼料として問題になるようなものではないことを確認した。慢性毒性

発がん性併用試験では、この配合による飼料を用い、F344/Ducrj (SPF)ラット雌雄各群 60 匹に 2 年間投与し、体重と摂餌量を測定するとともに、1 年目に各群 10 匹を対象に、血液学、血液化学検査等を行った。引き続きこれらの病理組織学的検査を行い、2 年目には残存する動物を対象に、同様の検査を行う。

1 年目までの検査結果では、遺伝子組換えトウモロコシを摂取したためと考えられる毒性学的異常所見は観察されていない。

遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発がん性併用試験は、国の内外を問わずこれまで行われたことがない。本研究は、国民的要望に対して行政的に実施が計画 決定されたものである。

D 結論

バイオテクノロジーを応用した食品のより一層の安全性確保のための科学的知見の蓄積に関して、わが国に流通する遺伝子組換え植物の遺伝的安定性についての確認、アレルギー性に関する安全性評価手法の高度化を図るとともに、消費者の意向にも配慮し、ラットを用いた慢性毒性試験が実施されている。また、遺伝子組換え食品の検知については、表示義務化されている遺伝子組換え大豆、とうもろこしにつき高感度の定量的検知法の開発が終了した。リスクコミュニケーションに関する調査研究では、厚生労働省ホームページの遺伝子組換え食品 Q&A に対する改善案が提案され、情報提供の具体的方法に関する検討が行われた。さらに、組換え微生物を用いた食品や遺伝子組換え魚の諸外国での開発動向、各国の規制状況等についても調査が行われ、今後の国際的ガイドライン作成に向けた準備状況等の調査も行われた。

ハイオテクノロジー応用食品については、安全

性に関する研究を中心に、当該食品の検知に関する試験法の確立及びリスクコミュニケーションに関する研究等を持続するとともに、透明性を確保しつつ、より一層の安全確保、消費者の不安解消に努める必要があると考えられる。ポストマーケティングのあり方に関する調査研究は、今後第二世代の組換え食品の開発が進めば、ますます重要になってくると思われる。

E 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究
組換え微生物の国際動向等に関する研究

分担研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する国際的な動向の情報を収集すると共に、国際機関により開催される関連会議に出席し、その議論に参加した。協力研究者の吉倉か議長を務めた codex における組換え食品のタスクフォースは、2003 年 3 月リスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の 3 つのテキストで合意に達した。同年 6 月の codex 総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が提案文書を作成する事となった。吉倉が原案を作成し、厚生労働省で最終案とし、関係国に打診中である。研究としては、遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性評価に特に重要と思われ、かつその試験法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いた検討を試みた。昨年度に引き続きマウス腸管内での遺伝子の移行について検討を行い、通常の組換えに用いるプラスミドか、自然界に分布する接合伝達性プラスミドの働きにより、マウス腸内棲息菌に伝達されることを再度確認すると共に、そのプロトコールを実際の評価法として利用可能なプロトコールとなるよう検討を加えた。

協力研究者

吉倉 廣 国立感染症研究所 所長
五十君静信 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部 室長

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する要件を明らかにする。吉倉は、codex 部会の議長として参加国の意見の調整と議事進行を行う。実験としては、組換え微生物応用食品の安全性確保に必要な検査法について、モデル組換え微生物を用い検討する。

A 研究目的

遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向について情報を収集すると共に、国際機関により開催される遺伝子組換え食品の安全性に関する関連会議に出席し、その議論に参加し、バイオテク

B 研究方法

国際機関により開催される遺伝子組換え食品の安全性に関する関連会議に出席し、情報収集および情報交換を行う。この議論で明

らかとなったバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に必要な要件のうち、その試験検査法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いて検査法の検討を試みた。3種類の *Lactococcus lactis* モデル乳酸菌を用い、検討を行った。基礎培地は、GM17培地を用いた。*in vitro*での伝達は、Sasakiらの方法を基に検討し、高頻度に伝達が観察できるフィルターメーティング法の確立を行った。動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行については、BALB/cマウスを用い、昨年度に検討した方法に従い、供与菌を胃内投与後、肛門閉鎖処置を行った。供与菌である *Lc lactis* (pAM β 1)と受容菌である *Enterococcus faecalis*をマウスへ胃内投与し、肛門を手術用接着剤で閉鎖し、一晚飼育した後、マウスを安楽死させ、その直腸内容物について、菌数を測定した。同様な手法を用い組換えプラスミドが腸内生息菌へ移行する頻度を、定量的に調べた。マウスから分離した腸内棲息菌である *Lactobacillus* sp を受容菌として、同様な検討を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要となる部分は含まれない。

C 研究結果 (実験結果には考察を含む)

組換え微生物の国際的な動向に関しては、遺伝子組換え微生物食品の安全性に関する会議に参加し、討論に関わった。協力研究者の吉倉が議長を務めた codex における組換え食品のタスクフォースは、2003年3月リスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の3

つのテキストで合意に達した。同年6月のcodex総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が提案文書を作成する事となった。吉倉が原案を作成し、厚生労働省で最終案とし、関係国に打診中である。

研究の成果としては、昨年度報告した組換えプラスミドの移行に関する試験管内およびマウス腸管内での試験法について、再現性を確認すると共に、広く試験法として用いることが可能なように試験法の修正、確立を行った。接合伝達性プラスミド pAM β 1を用いると、*in vitro*実験のフィルターメーティング法では、乳酸菌 *Lc lactis* から、腸内棲息菌である *Enterococcus faecalis* へは、その伝達頻度は、最高 10^2 程度で、 10^3 から 10^2 という高頻度に伝達が観察された。一方、BALB/cマウスを用いた肛門閉鎖法による腸内での伝達頻度は、 10^3 から 10^4 程度で、昨年とほぼ同様な頻度で再現性を確認した。*in vitro*実験のフィルターメーティング法と、*in vivo*の肛門閉鎖法のプロトコールを確立した。

マウス腸内から分離したグラム陽性細菌である *Lactobacillus* sp A株、B株において、上述のプロトコールを用いて、その伝達頻度を調べたところ、*E. faecalis*とは異なった傾向が観察された。フィルターメーティング法では、乳酸菌 *Lc lactis* (pAM β 1)を供与菌とすると、A株へは 9.7×10^6 、B株へは 5.3×10^5 の頻度で伝達が確認されたか、マウス肛門閉鎖法では、A、Bいずれの *Lactobacillus* ても伝達株が分離されなかった。すなわち、これらの *Lactobacillus* では、*in vitro*と *in vivo*で、明らかに伝達頻度の違いが認められた。

上述のプロトコールを用いて、E.テール組換

え乳酸菌における組換え用プラスミドベクター単独のマウス腸管内での挙動について検討した。*in vitro*のフィルターメーティング法により、*Lc lactis* (pDL278) から、腸内生息菌 *Ec faecalis* への移行を調べたところ、組換えプラスミド pDL278 の移行は全く検出されなかった。マウスを用いて、3日間 *Lc lactis* (pDL278) と *Ec faecalis* を投与し、pDL278 のマーカーであるスペクチノマイシン耐性を獲得した糞便中の *Ec faecalis* 株を分離し、pDL278 特異的なプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったが、pDL278 移行株は検出されなかった。肛門閉鎖検出法においても組換えプラスミドの移行は検出されなかった。従って、プラスミド自体が伝達能を持たない *Lc lactis* (pDL278) は、プラスミドの移行頻度は非常に低く、これらすべての実験系の検出限界以下であった。

D 考察

2003年6月のcodex総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が提案文書を作成する事となった。吉倉が原案を作成し、厚生労働省で最終案とし、関係国に打診中である。魚などの動物の組換え体の提案もあるか、環境影響の問題がクリアされないとcodexが環境影響評価の場になりかねないので、十分な検討が必要である。特に、養殖中個体が産出する幼生魚の封じ込めが難しい事、組換え魚の維持には交配相手を常に変えて行く必要がある事など、食品としての安全性を考える前の技術的な問題があるようである。むしろ、クローン技術は組換え動物作出に不可欠であるので、この辺りからアプローチするのが賢明かも知れ

ない。又、次のタスクフォースとしては、今迄の作業の上に立ってつぎの活動を考えた方がよいとの考えもあり、例えば、栄養促進組換え植物、組換え植物食品の成分分析、非食用組換え植物の問題を取り上げては、と云う考えもある。

既にcodexのガイドラインが作成された組換え微生物ガイドラインについては、実際に安全性評価を行う上でその試験法が十分に確立していないため評価が困難な部分がある。組換え微生物は、生きたまま摂取することにより、動物あるいはヒト消化管内で増殖することから、これまでの組換え食品と異なり、微生物に固有と考えられるいくつかの問題点が指摘されている。同時に多くの重要な項目において、安全性評価法が未だ確立されていない。ガイドラインでは、今後そのような方面の研究が進むことにより、早急にその評価手法が確立されることか必要であることが明記されている。特に、実質的同等性の適用方法、消化管内での組換え遺伝子の移行、腸内フローラへの影響、免疫系への刺激等の問題について研究することは重要である。昨年、ヒト腸管内における組換え遺伝子の腸内棲息菌への移行に関し、マウス腸管内で定量的に遺伝子の移行を観察できるというたいへん重要な知見を示した。今年度は引き続きこの問題に関し実験を行い、結果の再現性の確認を行うと共に、用いた実験系を広く安全性評価に用いることの出来る方法とする目的で、検討を加えた。試験管において超高感度に遺伝子移行を定量的に評価する評価法、マウス腸管内において定量的にかつ高感度で遺伝子伝達を検出できる肛門閉鎖マウスの実験系を確立した。この実験系を用

いて、自然界に広く分布する高頻度で接合伝達を起こす伝達性プラスミド pAM β 1 と、自らは伝達能を持たない乳酸菌組換え用プラスミド pDL278 の遺伝子の移行を評価した。

組換え乳酸菌 *Lc lactis* (pDL278) が、動物腸管内に多量に入ってきたとしても、組換え体自身からプラスミドが直接移行する頻度は、我々の開発した高感度の検査法においても検出限界以下であり、非常に低いことが確認された。従って、腸内で組換え体から腸内棲息菌への移行が起こるとすると、昨年我々が検討を行って実証したトリヘアレンタルトランスファーが重要となってくる。すなわち、自然界に存在する接合伝達性プラスミドをもつ菌、たとえば *Ec faecalis* (pAM β 1) が、腸内に生息していると、この菌から接合伝達により *Lc lactis* (pDL278) へのプラスミドの接合伝達が起こる。実験結果から pAM β 1 であれば、*Ec faecalis* (pAM β 1) から *Lc lactis* への伝達頻度は、約 10^3 程度であるので、1000 個以上の *Ec faecalis* (pAM β 1) が腸内に存在すれば、条件さえ整えば、動物腸管内で *Lc lactis* (pDL278, pAM β 1) が生成することになる。2 つのプラスミドの共存する *Lc lactis* (pDL278, pAM β 1) から、pAM β 1 は再び、 10^4 程度の頻度で腸内生息菌 *Ec faecalis* へ伝達して行く。このとき pDL278 は pAM β 1 の影響を受け 10^{10} 程度の頻度で伝達される。大腸菌の R 因子では、この現象をトリヘアレンタルトランスファーと呼んでいる。グラム陰性菌である大腸菌とグラム陽性菌の接合伝達は異なるか、これに類似するプラスミドの移行がグラム陽性菌でも起こっているのである。

このプラスミドは相同性を持たない自然界に分布する接合伝達性プラスミド pAM β 1 により、マウス腸内棲息菌である *Ec faecalis* に移される。この移行は、移行する遺伝子に相同性を持たない自然界に存在する接合伝達性プラスミドによることから、その意義は大きい。すなわち、プラスミドのように宿主のゲノムから分離して存在するレプリコンは、動物腸管内で他の棲息菌へ、その頻度の差こそあるが、トリヘアレンタルトランスファーなどにより移行すると考えられる。従って、組換え微生物特に、プラスミド等の宿主遺伝子とは独立して存在するレプリコンを用いて組換え体を作成すれば、遺伝子の移行は常に起こりうるし、条件を整えば、それを定量的に確認することが可能である。今回確立した実験法は、その移行頻度を確認する最も有用な手法である。

肛門閉鎖マウスは、あらかじめ供与菌と受容菌を投与し、人工的に肛門閉鎖を行ったのち、マウスを一晩飼育することにより、直腸内に糞便が圧縮状態で蓄積する。したがって、*in vitro* のフィルターメーティング法と同様な理由で、接合伝達に適する状態が期待される実験法である。ただ、大変興味深いことは、フィルターメーティング法と、肛門閉鎖法でその伝達頻度がほぼ同じ値で示される *Ec faecalis* に対し、フィルターメーティング法では、十分に伝達を確認されるのに *in vivo* の肛門閉鎖法での伝達を確認できない *Lactobacillus* の様な菌があることが示されたことである。この結果には再現性があり、原因はまだ不明であるが、少なくとも *in vitro* の結果のみから腸管内での *in vivo* の伝達頻度を推定することはまだ出来ないようである。

本年度は、組み込む遺伝子をプラスミド上から宿主遺伝子上に移した場合に、腸内棲息菌への伝達の可能性がどの程度変化するかを検討を行うためのモデル組換え体の作成に取りかかった。まだ、適当な組換え乳酸菌の作出に成功していないが、引き続き作出を試み、組み込む遺伝子を宿主遺伝子上に移した場合に、その移行頻度にとの様な影響があるかを実証的に示す予定である。組換え遺伝子をプラスミド上から宿主遺伝子上に移すと当然その移行頻度が大幅に低下することが期待される。

E 結論

吉倉は、codex 部会の議長として、その責務を果たし、組換え微生物応用食品の安全性に関するガイドラインなど3つのテキストを最終合意とした。さらに、次の組換え食品に関するタスクフォースの立ち上げを開始した。

組換え微生物からの腸内棲息菌への遺伝子漏出に関する実験と実験結果をまとめると、

- 1 試験管において超高感度に遺伝子移行を定量的に評価する評価法、マウス腸管内で乳酸菌から腸内生息菌への遺伝子移行を調べる肛門閉鎖マウスの実験法を確立した。
- 2 この実験法を用い、乳酸菌の組換えに用いるプラスミド pDL278 が、試験管内、マウス腸管内においてマウス腸内棲息菌に伝達されるかどうかを評価した。
- 3 試験管内とマウス腸管内でその伝達頻度が大きく異なる腸内棲息菌も存在する事を示した。

F 健康危険情報

特になし

G 研究発表

1 論文発表

- (1) Xin KQ, Hashino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, Ohba K, Kushiro A, Kiwaki M, Hamajima K, Klinman D and Okuda K Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env Blood 102 223-228 2003
- (2) Shizunobu Igimi, Akinobu Kajikawa, and Akiko Okutani Development of oral vaccines based on lactic acid bacteria Milk Science 52 185-187 2003
- (3) 五十君静信 乳酸菌を応用した感染症対策 獣医畜産新報 56 493-497 2003.
- (4) 五十君静信 Codexにおける遺伝子組換え微生物利用食品の安全性に関するガイドライン作り 日本乳酸菌学会誌 14 89-93 2003

2 学会発表

- (1) 梶川揚申、五十君静信、佐藤英一。Int1m1nを抗原とする組換え乳酸菌の経口ワクチンモデル。2003年度日本農芸化学会大会。2003年4月1日。東京。
- (2) 五十君静信。乳酸菌ワクチンの開発。シンポジウムプロハイオティクスの乳業における将来性。日本酪農科学会。2003年9月5日。弘前市

H 知的財産権の出願 登録状況（予定を含む）

1 特許取得

サルモネラの毒性検査方法（申請）

2 実用新案登録

なし

3 その他

専門家会議の報告および CODEX 関連の情報は、以下の頁に仮の日本語訳を含め公開されています。

<http://www.mhlw.go.jp/topics/idsnsh/codex/codex.html>

厚生科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）

（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究

遺伝子組換え魚文献検索に関する研究

分担研究者 長尾拓 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

遺伝子組換え魚に関する情報を文献検索、インターネット、特許、雑誌、新聞等を用いて収集を行った。前年度報告した組換え体魚種以外に新たに作出された魚種の報告はなかった。導入される遺伝子は成長ホルモン遺伝子が主であるが、近年、成長ホルモン遺伝子以外に耐病性を付与するような遺伝子導入の報告も行われるようになってきた。昨年、秋、フランスのグループが魚類に病原性を示すウイルスの特定の蛋白をコードする領域の前にプロモーターを付けた遺伝子を導入したところ、耐病性を示すといった発表が行われた。病原性ウイルスの研究は盛んに行われ、塩基配列等の情報も多いことから、今後、このような研究が盛んになると思われる。

インターネット上の情報では、アメリカで組換え体魚類を食品として認めるように FDA に申請している A/F Protein 社と FDA のホームページを調べた結果、現在でも認可はされていない。また、アメリカ各州における組換え体の規制状況を調べた結果、8州において何らかの規制が行われていた。

新たな特許情報として、韓国のグループが組換え体ドショウで特許をとっていることが判明した。

遺伝子組換え技術を用いた組換え体魚介類は体外受精、産卵数の多さなどの利点から今後も多数の組換え体が作出されると思われる。組換え体の目的は単に高成長といった形質以外に耐病性、高品質化といった多岐の目的に向かった研究がなされつつある。また、対象生物も魚類以外に貝類、エビ・カニ類、海藻類といったように、広がりつつある。近い将来、陸上植物や動物に比較し、種類、数量ともに上回る状況も起こりえるかもしれない。

協力研究者

名古屋博之

独立行政法人 水産総合研究センター

養殖研究所 育種グループ

主任研究官

れている。また、魚類以外にも貝類、エビ類で組換え体が作出されている。成長ホルモン遺伝子を組み込んだ太平洋サケについては、米国の民間会社が既に実用化に向け、米国FDAに対して食品利用を申請中である。このため、各国でのGM魚に関する安全性評価状況等の調査を行い、我が国での安全性評価基準作成の一助とする。

A 研究目的

現在までに組換え魚類は世界で20数種作出さ

B 研究方法

遺伝子組換え魚に関する情報を文献データベース、インターネット、特許情報、新聞等を用いて調査した。

C 研究結果

文献検索によって、昨年度報告した組換え体魚種から新たな作出魚種の報告はなかった。主な種毎に整理したものを別紙1に示す。ここに示した論文は組換え体魚介類の報告、全てを網羅しているわけではない。しかし、サケ・マス類、コイ、ティラピアに関する報告が多かった。

別紙1には人間の食用となり得る魚介類の文献について報告したが、最近、組換え体観賞魚か新聞、雑誌等で話題になっている。光るメダカを開発した台湾のタイコン社についての詳細はわからなかったが、日本の輸入業者が100匹輸入し、販売したとなっている(2003年7月12日、朝日新聞夕刊)。これらの光るメダカは3倍体化処理をしているので、不妊になっているとのことであった。現在、これらの組換え体メダカは輸入されていないか、国内のカルタヘナ担保法が整備され次第、輸入の申請再開をするとのことである。ゼブラフィッシュにGFP等の遺伝子を導入して、体色を変えた組換え体魚がアメリカで販売され話題となっている。詳しくは Yorktown Technologies 社のホームページ (<http://www.glofish.com/default.asp>) を参照してほしい。これらの技術はシンガポール大学の Dr Gong Zhiyuan によって作出されたゼブラフィッシュの技術が基礎になっている。FDA もこれら組換え体ゼブラフィッシュについて、食用にされる

こともないし、今までアメリカで販売されてきたゼブラフィッシュ以上に環境に脅威を与える証拠もない、公衆衛生上、明らかに危害を与える証拠もない限りFDAはこれらの組換え体ゼブラフィッシュを規制する理由はない、と述べている (<http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2003/NEW00994.html>)。

インターネットを使った組換え体魚介類に関する情報はアメリカを中心に検索を行った。主な検索先としては、組換え体サケを実際に販売しようとしている A/F Protein 社

(<http://www.afprotein.com/>)、これらを規制する立場にあるFDA (<http://www.fda.gov/>)、組換え体動物の食品利用に反対しているアメリカの消費者団体

(<http://www.centerforfoodsafety.org/> 以下FCSと略記)について調べた。

A/F Protein 社が申請している組換え体魚類については本報告書を書いている段階ではFDAによって許可されていない

(<http://www.fda.gov/cvm/index/consumer/transgen.htm>)。

アメリカ各州における組換え体に対する規制は下記にインターネット上で調べることができる。

(<http://www.centerforfoodsafety.org/GEF1shStateActionChart.pdf>)。この表によると、カリフォルニア、メリーランド、ミシガン、ミネソタ、ミシシッピ、オレゴン、ワシントンおよびウィスコン州の8州で組換え体に関する規制があり、なかでもワシントン州は州内の水域における組換え体魚類の利用を禁止している。

組換え体に関する特許関係はアメリカの特許庁

のホームヘーシを用いて調べた。その結果、今までに報告していた以外に、韓国のKimらが成長ホルモン遺伝子を組み込んだドジョウで特許をとっていることが判明した (US Patent No 6372959)。

新聞、雑誌等による報道では前述の「光るメダカ」や「赤やオレンジのゼブラフィッシュ」の報道が新聞、雑誌等でなされた。

D 考察

組換え体魚類作出の研究目的別に分類すると、①基礎研究のための実験動物として、②応用（主に食用）研究を念頭に置いた研究および③観賞魚としての利用の3つに分類できる。

基礎研究用としてはゼブラフィッシュ、メダカを用いて遺伝子の機能解析等の研究のために、作出されている。これらの魚種は世代交代が早いこと、多数の突然変異体がとられていることから遺伝子の機能解析に利用しやすいことが考えられる。また、飼育条件を一定にすることによって1年中、子供をとることが可能なことも重要な理由である。実験動物として開発されていたものから、鑑賞用として利用されたのが「光るメダカ」や「赤やオレンジ色のゼブラフィッシュ」である。これらの魚種は人間の食用にはならないと思われるが、環境中へ逃避した場合などのリスクを考えると食品行政以外では重要な問題である。

食品への応用研究としては引き続き、成長や耐病性関連の研究が行われている。養殖産業にとって、成長は非常に重要な因子で、これまでも選抜や交雑研究が盛んに行われてきた。遺伝子機能の解析や遺伝子導入技術の発達に伴い、これらの形質を人為的に導入する研究は自然の成り行きと

思われる。研究当初はステーシも発現部位も制御できないプロモーターから、最近の研究ではむしろ、弱い発現をするようなプロモーターを使用している。耐病性に関しても以前コイに人のラクトフェリン遺伝子を導入して耐病性を高めた論文を紹介したが、昨年11月にチリで開催された第8回 Genetics in Aquaculture という学会において、フランスのグループがウイルスの特定の蛋白をコードしている配列領域にプロモーターをつけ、ニジマスに遺伝子導入したところ、耐病性が増したとの発表を行った。今後とも耐病性を目指した遺伝子導入魚の研究は行われていくものと思われる。

別紙1を見るとわかるように、サケマス類の組換え体に関する研究は多いが、それ以外にティラピアやコイに関する研究も多い。ティラピアに関してはイギリス、キューバ、バンクラティッシュの研究グループが盛んに研究を行っている。キューバのグループは別紙1の文献44の論文で成長ホルモン遺伝子を導入した組換え体ティラピアの食性生態、組換え体とコントロール（非組換え体）を猿に食べさせ、猿の血清成分や各臓器の比較、さらに人間のボランティアを募り、組換え体ティラピアを食べさせ、血液成分の比較を行っている。彼らはこれらの結果を基に安全性に問題はないといっているが、成長ホルモン遺伝子を導入した組換え体魚類をとっても、これだけのデータでは不十分のように思われる。導入遺伝子の挿入された結果、その周囲の遺伝子の発現に影響がないか、あるいは、成長ホルモンを常時、発現させることによってその他のタンパクの発現等に影響はないかなど、調べるべき項目は他にもあるように思う。

人間が利用している水産魚介類はたくさんの種類があり、今回添付した文献にある魚介類だけでなく、他の魚類、貝類、軟体動物、海藻類などにおいても今後、遺伝子導入技術の発達に伴い、多くの研究が行われることが予想される。

E. 結論

遺伝子組換え技術を用いた組換え体魚介類は体外受精、産卵数の多さなどの利点から今後も多数の組換え体が作出されると思われる。組換え体の目的は単に高成長といった形質以外に耐病性、高品質化といった多岐の目的に向かった研究がなされつつある。また、対象生物も魚類以外に貝類、エビ、カニ類、海藻類といったように、広がりつつある。近い将来、陸上植物や動物に比較し、種類、数量ともに上回る状況も起こりえるかもしれない。

参考インターネットホームページ

- 1). A/F Protein 社
<http://www.afprotein.com/>
- 2) 実際に生産している現場（同社が生産している組換え体大西洋サケに関する情報も掲載）
<http://www.aquabounty.com/>
- 3). 同社がまとめた組換え体魚類に関する文献
<http://www.aquabounty.com/>
- 4) A/F Protein 社が所属する会社
<http://www.genesis.mun.ca/>
http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af_protein.html§ion=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone
- 5) The center for food safety
<http://www.centerforfoodsafety.org/gefish/index.html>

組換え体に関する特許情報

- 1) Isolation and Characterization of an Actin Gene from Abalone
U S Patent Number 5,675,061
Powers *et al*
Oct 7, 1997
- 2) Lycopene Cyclase Gene
U S Patent Number 5,792,903
Hirschberg *et al*
August 11, 1998
- 3) Transgenic Salmonid Fish Expressing Exogenous Salmonid Growth Hormone
U S. Patent Number 5,545,808
Hew *et al*
August 13, 1996
- 4) Transgenic Fish and Vectors Therefor
U S Patent Number 5,998,697
Devlin, Robert H.
Dec. 7, 1999
- 5) Transgenic fish and a method of harvesting islet cells therefrom,
U.S. Patent 6,015,713
Wright Jr. *et al*
Jan 18, 2000
- 6) Cell-lineage specific expression in transgenic Zebrafish.
U.S Patent Number 6,380,458
Lin Shuo
June 9, 1997
- 7) Expression vector of a mud loach growth hormone gene
U S. Patent Number 6,372,959
Kim, et al
April 16, 2002

種毎に整理した組換え体文献

- Transgenic Salmon (サケ・マス類)
- 1 Uzbekova, S , et al., *Analysis of cell-specificity and variegation of transgene expression driven by salmon prolactin promoter in stable lines of transgenic rainbow trout*. Transgenic Res, 2003. 12(2) p. 213-27.
 - 2 Hoag, H , *Transgenic salmon still out in the cold in United States* Nature, 2003 421(6921) p. 304.
 3. Gray, G., *Objective assessment of transgenic salmon* Nature, 2003. 421(6926) p 889.
 4. Check, E , *Environmental impact tops list of fears about transgenic animals* Nature, 2002. 418(6900) p. 805.
 - 5 Uzbekova, S , et al , *Transgenic rainbow trout expressed sGnRH-antisense RNA under the control of sGnRH promoter of Atlantic salmon* J Mol Endocrinol, 2000. 25(3) p 337-50.
 - 6 Niller, E., *FDA, researchers consider first transgenic fish* Nat Biotechnol, 2000. 18(2) p 143
 - 7 Jia, X , et al., *Antimicrobial peptides protect coho salmon from *Vibrio anguillarum* infections*. Appl Environ Microbiol, 2000 66(5) p 1928-32
 - 8 Mori, T. and R.H. Devlin, *Transgene and host growth hormone gene expression in pituitary and nonpituitary tissues of normal and growth hormone transgenic salmon*. Mol Cell Endocrinol, 1999 149(1-2) p. 129-39.
 - 9 Krasnov, A., et al , *Transfer of growth hormone (GH) transgenes into Arctic charr. (*Salvelinus alpinus* L) II Nutrient partitioning in rapidly growing fish* Genet Anal, 1999. 15(3-5) p 99-105.
 - 10 Hew, C., et al., *Liver-specific and seasonal expression of transgenic Atlantic salmon harboring the winter flounder antifreeze protein gene*. Transgenic Res, 1999 8(6) p 405-14.
 - 11 Abrahams, M.V and A. Sutterlin, *The foraging and antipredator behaviour of growth-enhanced transgenic Atlantic salmon*. Anim Behav, 1999. 58(5) p 933-942.
 - 12 Hanley, S , et al., *Isolation and functional analysis of the histone H3 promoter from atlantic salmon (*Salmo salar* L)* Mol Mar Biol Biotechnol, 1998. 7(3) p. 165-72.
 13. Male, R., et al., *Biotechnology in aquaculture, with special reference to transgenic salmon*. Biotechnol Genet Eng Rev, 1993 11 p 31-56.
 14. Chan, W.K. and R.H. Devlin, *Polymerase chain reaction amplification and functional characterization of sockeye salmon histone H3, metallothionein-B, and protamine promoters* Mol Mar Biol Biotechnol, 1993. 2(5) p. 308-18.
 15. Hew, C L., P L. Davies, and G Fletcher, *Antifreeze protein gene transfer in Atlantic salmon* Mol Mar Biol Biotechnol, 1992. 1(4-5) p. 309-17.
 - 16 Du, S.J., et al., *Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct* Biotechnology (N Y), 1992. 10(2) p. 176-81.
 - 17 Houdebine, L.M. and D. Chourrout, *Transgenesis in fish*. Experientia, 1991. 47(9) p 891-7.
 - 18 Liu, Z.J , et al., *Development of expression vectors for transgenic fish*. Biotechnology (N Y), 1990. 8(12) p 1268-72.
- Transgenic Mud Loach (ドンヨウ)
- 19 Nam, Y.K., et al., *Accelerated growth performance and stable germ-line transmission in androgenetically derived homozygous transgenic mud loach, *Misgurnus mizolepis**. Aquaculture, 2002 209(1-4) p. 257-270
 20. Nam, Y K., et al., *Dramatically accelerated growth and extraordinary gigantism of transgenic mud loach*