

Fig.8. IFN- γ production by MLN cells

(分担研究報告書)

モダン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 西島正弘 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。1985 年に最初の遺伝子組換え魚類に関する論文が報告されて、今年で 22 年目を迎える。この間、35 種を超える魚介類で遺伝子組換えの報告がされた。研究当初は組換え魚介類を作出したという報告が多かったが、最初の報告から 20 年以上が過ぎて、成長の促進を確認したという報告から、遺伝子導入された個体の生理・生態学的研究が報告されるようになった。生殖生理、繁殖行動の比較、摂餌行動の比較、遊泳能力や酸素消費量の比較など多くの知見が集積しつつあり、最近では遺伝子組換え魚類を用いたマイクロアレイの結果も報告された。これらの知見は、組換え体が逃避した場合の生態系に及ぼす影響を予測する知見となるなど、遺伝子組換え魚のリスク評価の基礎となるものである。

しかし、食品としての遺伝子組換え魚介類を評価したという報告は少ない。今までにキューバのグループが報告した遺伝子組換えティラピアを食べさせたボランティアの血液性状の変化を観察した報告と中国で中国健康省の規則に則り、安全性評価を行い、市場へ出荷する準備と政府の許可を求めている最中である、という報告だけである。

組換え魚介類を作出した、という報告から、これら作出した組換え魚を用いて生理・生態学的研究を行った報告が出されるようになってきたことによって、リスク評価を行う際に、具体的にどのような項目を調査した方がよいか、より具体的な検討がなされる状況になってきた。

今後、引き続き新しい遺伝子組換え魚介類の作出に関する情報を収集するとともに、市場に出回ることが想定される成長ホルモン遺伝子を導入した魚介類の安全性について情報を収集することが重要である。

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 生産技術部 育種グループ

主任研究員

ホルモン遺伝子を導入した大西洋サケやコイでは、行政当局に食品としての許可を申請中であるという報告もある。食品としての申請が許可された場合、世界一の水産物輸入大国である日本にも意図的、非意図的に輸入される可能性は大きい。そこで、海外における遺伝子組換え魚介類の開発状況や研究情報を文献検索、インターネットおよび特許等から調査し、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

組換え魚介類を作出したという報告は、多くの国で報告されるようになった。その中では、成長

B. 研究方法

遺伝子組換え魚介類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

ここ数年の傾向であるが、単に遺伝子組換え魚介類を作出したという報告から、作出した組換え魚に関する生理・生態学的な研究の報告が多くなった。また、食品としての利用以外にも医学への応用を考えた研究も報告されるようになった。

昨年度報告された論文について、内容が重複する部分もあるが大別すると次のように分類される。

1. 耐病性に関する論文
2. 遺伝子組換え魚介類作出方法に関する論文
3. 作出した遺伝子組換え魚の生理・生態について研究した論文
4. 作出した遺伝子組換え魚の評価に関する論文 (一部、3.と重複)
5. リスク評価に関して考察した論文

以下、この分類によって昨年度報告された論文の一部を紹介する。

耐病性を付与する目的は、養殖業にとっては成長を促進する目的より重要といえるかもしれない。すでに、耐病性を付与するアイデアは特定の遺伝子を導入することで行われてきた(表 1 参照)。昨年度、新たに、Yazawa *et al.* (2006)¹⁾は鶏リゾチーム遺伝子をゼブラフィッシュに導入した組換え魚を作出し、耐病性を調べた。ヒラメケラチンプロモーターの下流に鶏リゾチーム遺伝子を繋げたプラスミッドを構築し、ゼブラフィッシュに遺伝子導入し、組換え魚を作出し、そのF2を実験に用いた。攻撃試験には *Flavobacterium columnar* と *Edwardsiella tarda* を用い、コントロール(非組換え魚)が100%斃死したのに対し、遺伝子組換え魚はそれぞれ65%と60%の生存率を示した。しかし、高濃度での病原菌の攻撃試験では両者に差

は無かった、としている。また、中国で全て魚由来の遺伝子を用いて作ったプラスミッド(all-fish, CAgcGH: コイのアクチンプロモーターの下流にソウギョの成長ホルモン遺伝子を導入したもの)を黄河ゴイに導入してトランスジェニックゴイを作出したことはすでに報告しているが、Wang *et al.* (2006)²⁾はこれらの遺伝子組換え魚を同年齢のコントロールと比較し、血清中のリゾチーム活性、殺菌活性や頭腎におけるマクロファージの食細胞の割合などで組換え魚の方がコントロールに比べ有意に高い値を示すことを観察した。これらの結果から導入した成長ホルモン遺伝子が成長だけでなく、非特異的免疫機能も活性化していると推定した。

新しい遺伝子導入手法として台湾のTsaiのグループ³⁾はアワビの精巢に yellowfin porgy (鯛の仲間)の成長ホルモン遺伝子 cDNA をマイクロインジェクションし、PCR およびサザンハイブリダイゼーションによって導入遺伝子がアワビゲノム上に組み込まれたのを確認した。アワビの成長に魚類の成長ホルモンの効果があるという報告は、すでに日本の研究者が報告していた⁴⁾。Tsaiらは重量で遺伝子組換えアワビの方が大きくなることも確認した。アワビに関しては中華料理の食材として、また、日本でも高級食材として人気のあることから本研究は今後も気をつけて追跡する必要がある。

作出した遺伝子組換え魚類の生理・生態研究はすでに Bessey *et al.*(2004)⁵⁾の成長ホルモン遺伝子導入ギンザケと非組換えギンザケとを比較した論文が報告されているが、ゼブラフィッシュを用いて捕食性、温度耐性および集団行動について調べた報告がでた。これは、すでにアメリカ、韓国、台湾で組換えメダカ、ゼブラフィッシュが販売されるようになり、しかも、ゼブラフィッシュにおいては不妊化処理もされずに販売されていることから生態に与える影響を調べるためだと思われる (Cortemeglia and Beitingger (2006a, b)^{6),7)}),

Snekser *et al.* (2006)⁸⁾。この中で、ゼブラフィッシュの温度耐性を調べた結果、今まで言われていた、アメリカにおいてゼブラフィッシュは冬を越せない、との予想と異なり、一部の地域では試験の結果と自然界における水温分布からアメリカでも越冬できる可能性が示唆された。現在、不妊化されずに販売されている遺伝子組換えゼブラフィッシュが、これらの結果を受け、今後どのように販売されるか見守りたい。

遺伝子組換え魚類について、今まで導入遺伝子のゲノム上の分子生物学的解析というのは報告されていなかった。Mitchell *et al.*⁹⁾は Devlin らが作出したベニサケ由来メタロチオネイン B プロモーターの下流に同種の成長ホルモン遺伝子を導入したギンザケを用いて詳細に検討した。彼らは遺伝子組換えギンザケのゲノムを用いてコスミッドライブラリーを作製し、解析した。その結果、プロモーター、成長ホルモン遺伝子およびターミネーター領域を含む完全長の配列が 4 つ head to tail の状態で繋がり領域と、その領域を挟むように一部の領域の欠けた 2 つの断片がつながったものが染色体上の 1 力所に挿入されていることが明らかになった(図 1A)。また、現在 FDA に食品として遺伝子組換え魚の販売の許可を申請している Aqua Bounty Technologies 社の共同研究者である Fletcher らのグループも、彼らの作出した成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケを使って導入遺伝子の解析とその安定性について報告している¹⁰⁾。その中で、食品として許可を申請する際に、行政当局から 2 つの重要な問題を明らかにするように指摘されている。1 つは導入遺伝子の特徴、2 つめは導入遺伝子の世代間での安定性を証明することである。ゲノム上に挿入されている導入遺伝子の解析では図 1B に示したように 1 コピーのプロモーターと成長ホルモン遺伝子 cDNA の前後に導入遺伝子の断片が挿入されていて、Devlin らのコピー数は異なるものの、入り方は同様であった。次に、導入遺伝子の安定性に関しては遺伝子組換え大西

洋サケの F2 と F4 およびマイクロインジェクションに用いたプラスミッドベクターの配列を比較し、導入遺伝子の配列に変異が起こっていない、すなわち、少なくとも 3 世代にわたって安定性のあることを示した。また、2 つの報告とも導入遺伝子はゲノム上の繰り返し配列領域に挿入されていた、ということである。

Raven *et al.*¹¹⁾および Deitch *et al.*¹²⁾は彼らが作出した遺伝子組換えギンザケおよび遺伝子組換え大西洋サケを用いて、さらに詳細な生理学的研究について報告を行った。

Raven らは厳密なエネルギー量を計算した数種類の餌を組換えギンザケとコントロールのギンザケに食べさせ、餌料効率等を比較した。その結果、組換えギンザケはコントロールギンザケより効率よく体成分に交換しており、このことが、もし、自然海域に組換えギンザケが逃避した場合、非組換えギンザケより生存率が勝るかもしれないということを予測させる、としている。

Deitch らも遺伝子組換え大西洋サケを用いて、心肺機能、遊泳速度、酸素消費量および、これらの機能の元になる組織である鰓、赤血球の形態的特徴、心臓や筋肉の酵素活性などについて調べた。その結果、成長を促進するために酸素要求、心肺機能の強化、組織における酵素活性の高さなどを確認することができたが、それらを裏付ける組織の形態的变化についてははっきりした結果を示すことはできなかったとしている。

Matthew *et al.* (2006)¹³⁾ は遺伝子組換えギンザケの肝臓を用いて、マイクロアレイによって発現を調べた。彼らは給餌を制限したロット (R)、飽食量を食べさせたロット (T) およびコントロール (C) の 3 群を比較した。いろいろな比較をしたが、中でも組換えギンザケでヘモグロビンを維持するために必要な遺伝子群の発現 (ヘムオキシナーゼ、ヘモグロビン $\alpha \cdot \beta$ 、クルツベル様グロブリン遺伝子活性剤、ヘプシディン) が高いことが確認された。これは成長を促進するために要求

される代謝率を高めるためと推察される、とした。

最後に Devlin *et al.* (2006)¹⁴⁾は遺伝子組換え魚の環境に対するリスク評価を行う際に、どのような考え方が必要か述べている。彼は自然界で起こっている複雑な総合作用の中で起こる組換え魚の影響の予測の困難さ等を論じているが、いずれにしても、遺伝子組換え魚介類作出技術は世界の人口の増加に伴う食料提供という観点から、重要な技術であるとしている。

昨年度、報告された論文で中国の研究者が関係しているのは前述の、成長ホルモン遺伝子を導入したコイが非特異的免疫能を高めているという報告だけである²⁾。

インターネットを使った組換え魚介類に関する情報はアメリカを中心に検索を行った。ここ数年、変化のある動きはないようである。主な検索先としては、組換えサケを実際に販売しようとしている Aqua Bounty TechnologiesTM

<http://www.aquabounty.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。

Aqua Bounty TechnologiesTM が申請している組換え魚類については昨年度、インターネット上の FISH update.com というサイトで CEO の Elliot 氏のインタビュー記事が掲載され、その記事を元に日刊水産経済新聞 (06 年 12 月 11 日) に「09 年に許可の見込み」との記事を掲載した。記事によると、Aqua Bounty TechnologiesTM が提出した資料について FDA が納得したので、09 年に許可が下りそうだとのことである。しかし、このような記事は過去にも例があり、すぐに信用することができない。しかし、文献検索の結果のところでも書いたとおり、同社が開発している遺伝子組換え大西洋サケを使った遺伝、生理学的知見については論文が出てきており、状況が以前と変化している。

組換え魚介類に関する特許関係はアメリカの特許庁のホームページを用いて調べた。その結果、以前報告した糖尿病の移植医療を目的としたトランスジェニックティラピアで Wright *et al.* が糖尿病患者への移植細胞の作製を目的としてティラピアインシュリン遺伝子をヒトインシュリン遺伝子に置換した特許 (US Patent No. 6476290) 以来、目新しいものはなかった。

D. 考察

1990 年代中頃から組換え魚介類を作出したという報告が多数発表されて以来、現在まで 35 種を超える魚介類で報告されるようになった。当初は組換え魚介類を作出したという報告が多かったものの、報告から 10 年以上たち、4 から 5 世代が作出された時期になって、組換え魚の生理・生態学的研究の報告がなされるようになってきた。これらの知見は、組換え体が逃避した場合の生態系に及ぼす影響を評価する知見となり得る。

一方、食品としての遺伝子組換え魚を評価した報告はない。

中国の組換え魚介類作出に関する報告はきわめて少ない。2003 年に報告された論文には中国健康省の規則に則り、安全性評価を行い、市場へ出荷する準備と政府の許可を求めている最中である、となっていて、昨年はこの遺伝子組換え魚が成長だけでなく、耐病性も示したという方向があるだけである。今後とも、中国の動向についても注意が必要である。

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、海草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

組換え魚介類を作出した、という報告から、これら作出した組換え魚を用いて生理・生態学的研

究を行った報告が出されるようになった。アメリカと中国ではすでに組換え魚類について許可待ちの状況である。組換え魚介類に対する各国の開発状況を常に把握することが重要である。

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.aquabouty.com/>
- 3) . 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
- 4) . 組換え魚に反対している消費者団体
The center for food safety
<http://www.centerforfoodsafety.org/home.cfm>

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
- 8) Transgenic tilapia comprising a humanized insulin gene.
U.S. Patent Number 6,476,290
Wright, Jr., et al

引用文献

1. Yazawa, R. *et al.* (2006) Transgenic zebrafish expressing chicken lysozyme show resistance against bacterial diseases. *Transgenic research* 15(3), 385-391.
2. Wang, W.B. *et al.* (2006) Effects of the “ all-fish” growth hormone Transgene expression on non-specific immune

- junctions of common carp, *Cyprinus carpio* L.. *Aquaculture* 259(1-4), 81-87.
3. Chen, H.L. *et al.* (2006) Transfer of a foreign gene to Japanese abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) by direct testis-injection. *Aquaculture* 253(1-4), 249-258.
 4. Moriyama, S. and Kawauchi, H. (2004) Somatic growth acceleration of juvenile abalone, *Haliotis discus hannai*, by immersion and intramuscular injection of recombinant salmon growth hormone. *Aquaculture*, 229, 469-478.
 5. Bessey, C. *et al.* (2004) Reproductive performance of growth-enhanced transgenic coho salmon. *Transactions of The American Fisheries Society* 133, 1205-1220.
 6. Cortemeglia, C. and Beitinger, T.L. (2006) Susceptibility of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, to predation. *Environmental biology of fishes* 76(1), 93-100.
 7. Cortemeglia, C. and Beitinger, T.L. (2006) Projected US distributions of transgenic and wildtype zebra danios, *Danio rerio*, based on temperature tolerance data. *Journal of thermal biology* 31(5), 422-428.
 8. Snekser, J.L. *et al.* (2006) Aggregation behavior in wildtype and transgenic zebrafish. *Ethology* 112(2), 181-187.
 9. Mitchell, U. *et al.* (2006) Transgene constructs in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) are repeated in a head-to-tail fashion and can be integrated adjacent to horizontally-transmitted parasite DNA. *Transgenic research* 15(6), 711-727.
 10. Edward, S. *et al.* (2006) Characterization and multi-generational stability of the growth hormone Transgene (EO-1 α) responsible for enhanced growth rates in atlantic salmon. *Transgenic Research* 15, 465-480.
 11. Raven, P. A. *et al.* (2006) Influence of dietary digestible energy content on growth, protein and energy utilization and body composition of growth hormone transgenic and non-transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 254(1-4), 730-747.
 12. Deitch, E.J. *et al.* (2006) Cardiorespiratory modifications, and limitations, in post-smolt growth hormone transgenic atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal experimental biology* 209(7), 1310-1325.
 13. Matthew, L. R. *et al.* (2006) Multiple microarray platforms utilized for hepatic gene expression profiling of GH transgenic coho salmon with and without ration restriction. *Journal of Molecular Endocrinology* 37, 259-282.
 14. Devlin, R. H. *et al.* (2006) Interface of biotechnology and ecology for environmental risk assessments for transgenic fish. *Trends in biotechnology* 24(2), 89-97.

図1. ギンザケ(A)と大西洋サケ(B)に導入された導入された遺伝子の挿入状態

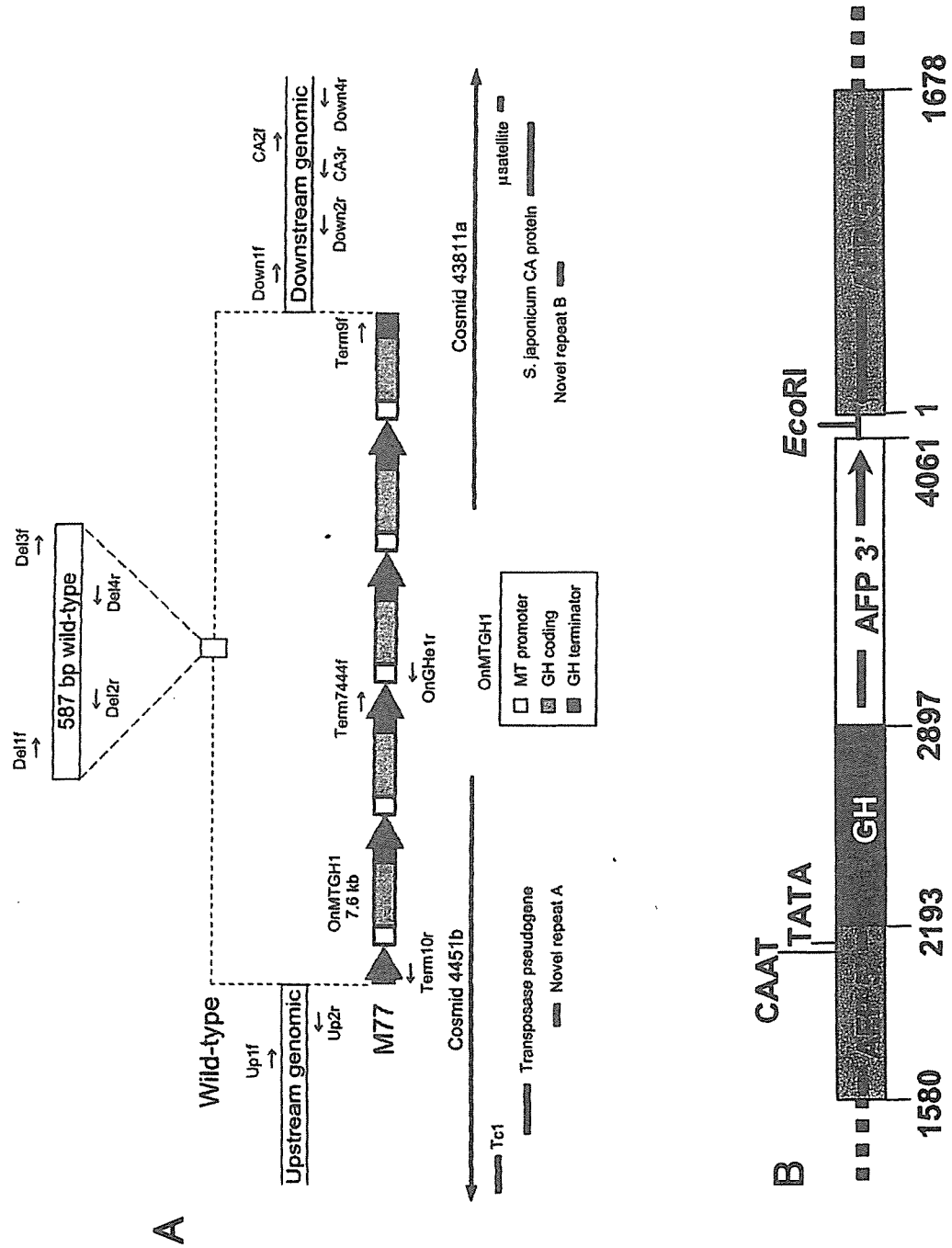


表1. 魚類に導入された遺伝子と改変形質 (Devlin, RH et al. (2006)から引用)

| 改変形質 | 魚種 | 導入遺伝子 | 文献 |
|-----------|--------------|-------------------------------|--|
| 成長 (2倍以上) | 大西洋サケ | growth hormone | Du, SJ et al. (1992) |
| | ティラピア | | Martinez, R. et al. (2000), Rahman, MA et al. (2001) |
| | ニジマス | | Devlin RH et al. (1995), Devlin RH et al. (2001), Pitkanen, Devlin, RH et al. (2004), Devlin, RH et al. (1994) |
| | ギンザケ | | Devlin, RH et al. (1995) |
| | マスノスケ | | Devlin, RH et al. (1995) |
| | ロフー (コイに似た魚) | | Venugopal T et al. (2004) |
| | ドジョウ | | Nam, YK et al. (2001), Zhu, Z et al. (1986) |
| 不凍性 | 大西洋サケ | antifreeze protein | Shears, MA et al. (1991) |
| 耐病性 | アメリカナマズ | cecropin | Dunham, RA et al. (2002) |
| | コイ | lactoferrin | Zhong J et al. (2002) |
| | メダカ | cecropin | Sarmasik, A et al. (2002) |
| 炭水化物代謝 | ニジマス | glucose transporter | Pitkanen, TI et al. (1999) |
| | ニジマス | hexokinase | Pitkanen, TI et al. (1999) |
| 生殖 | ニジマス | antisense GnRH | Uzbekova, S et al. (2000) |
| 脂質代謝 | ゼブラフィッシュ | D6-desaturase | Alimuddin et al. (2005) |
| リン代謝 | ゼブラフィッシュ | phytase | Hostetler, H et al. (2005) |
| ビタミンC代謝 | ニジマス | L-gulonogamma-lactone oxidase | Krasnov, A et al. (1998), Toyohara, H et al. (1996) |

分担研究報告書（平成 18 年度）

リスク・コミュニケーションのあり方に関する研究

分担研究者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨：第二世代の遺伝子組換え食品（GM 食品）の認可状況および認可の際の評価に関する情報を収集し、安全性の側面から第一世代とは異なるコミュニケーションが必要となった事例があるかどうかを検討した。また、現在開発中の第二世代の GM 食品としてゴールデンライス为例にとり、最近 FAO/WHO から発表されたマニュアルをもとに、第二世代の GM 食品のリスク・コミュニケーションの留意点について検討した。リスク・コミュニケーションでは、科学的側面のみでなく、それ以外の側面からのコミュニケーションも重要である。特に第二世代の GM 食品のリスク・コミュニケーションでは、リスクと便益の均衡も含めた幅広いコンテキストでのリスク・コミュニケーションが必要であり、マニュアルの原則に沿った戦略的アプローチが必要である。このような幅広いリスク・コミュニケーションを行うこと、およびそれを誰がになっていくかが、GM 食品の今後を考える上で重要であると考えられた。

協力研究者

加藤順子

（株）三菱化学安全科学研究所

リスク評価研究センター長

A. 研究目的

我が国では平成 9 年に最初の遺伝子組換え食品（GM 食品）の市場流通が認められ、その後、GM 食品の数は増加し、平成 18 年 8 月 15 日現在、食品としての利用が認められている遺伝子組換え農作物品種の数は 76 品種に上っている¹。しかし、世間一般では GM 食品が受け入れられているとは言い難く、市場で GM であるという表示を見ることはほとんどなく、むしろ GM ではない、という任意表示ばかりが目につくのが実状である。

一方、遺伝子組換え食品開発を行っている研究者らは、除草剤耐性や害虫抵抗性を付与した作物等の、生産者にメリットのある作物から、食品としての品質や機能を向上させた作物等へと、研究開発の方向性を変化させている。これらの作物は、従来の GM 作物が第一世代の GM 食品と呼ばれるのに対し、第二世代の GM 食品と呼ばれており、消費者に直接的なメリットをもたらすことをねらったものである。このような第二世代の GM 食品では、意図して付与した形質が食品としての機能や栄養価等に直接的に関わっているため、意図した形質をその摂取量や摂取方法との組み合わせで評価することが特に重要になる。

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に関する研究では、これまでリ

スク・コミュニケーションのための体制や方法論に関する研究を行って来たが、本年度はこのような第二世代の組換え食品のリスク・コミュニケーションに焦点をあて、特に留意すべき点について検討を行った。

B. 研究方法

研究は、インターネット等を利用して文献等を収集し、これらの文献等に基づく解析により行った。

調査対象とした文献等は下記である。

- ① 第二世代の GM 食品として各国政府等で認可¹されているものに関する情報
- ② 第二世代の GM 食品に関する各国政府等の認可に際する評価文書
- ③ 第二世代の GM 食品に対する社会の対応
- ④ 第二世代の GM 食品に関するリスク・コミュニケーション事例

また、下記を解析の軸とした。

¹ :ここでは便宜上、認可という言葉を使用したが、米国では組換え技術の利用により有意な変化を生じていない遺伝子組換え作物由来の食品については法に基づく認可は行っておらず、確認という言葉を使用している。以下の文章でも同様である。

- 第一世代と比較した社会的受容の違い
- 第二世代と比較したリスク・コミュニケーション内容の違い

また、上記の他に、GM食品のリスク・コミュニケーションのあり方を考える上で重要な文献がある場合には、これ入手し、解析した。

本研究においては、特に倫理面への配慮を要する事項はなく、特別な配慮は行わなかった。

C. 研究結果

1. 各国で認可されている第二世代 GM 食品

第二世代の GM 食品として各国政府等で認可されているものを表1に示した。なお、遺伝子組換え技術を利用して成熟遅延を引き起こしたものを第二世代とするかどうかは明確ではないが、ここでは品質の改変という意味で便宜上、第二世代に含めて記した。

成熟遅延トマトは GM 作物由来の食品として米国で最初に認可されたものであり、類似の GM 作物由来食品が米国、カナダで認可されているが、豪州、EU、日本では認可されていない。

表1 各国で認可されている第二世代 GM 食品ⁱⁱ

| GM 作物 | 名称 | 開発者 | 認可国 |
|------------|--------------------------------------|----------------|--------------|
| 成熟遅延トマト | FLAVR SAVR | カルジーン | 米国、カナダ |
| 成熟遅延トマト | 8338 | モンサント | 米国 |
| 成熟遅延トマト | B, Da, F | ゼネラル | 米国、カナダ |
| 成熟遅延トマト | 1345-4 | DNA プラントテクノロジー | 米国、カナダ |
| 成熟遅延トマト | 35-1-N | アグリトロップ | 米国 |
| 成熟遅延カトロープ | A, B | アグリトロップ | 米国 |
| 高ラウリル酸カノーラ | 23 | カルジーン | 米国、カナダ |
| 高オレイン酸ダイズ | G94-1, G94-19, G168 (日本では 260-05 系統) | デュポン | 米国、カナダ、豪州、日本 |
| 高リジントウモロコシ | LY038 | モンサント | 米国、カナダ |

遺伝子組換え技術により成熟遅延を起こしたもの他には、米国およびカナダで認可されている高ラウリル酸カノーラ、米国、カナダ、豪州、日本で認可されている高オレイン酸ダイズ、米国、カナダで認可されている高リジントウモロコシがある。

2. 第二世代 GM 食品の認可に際する評価

1) 成熟遅延トマト

米国で 1994 年に認可されたカルジーン社の成熟遅延トマトは世界で最初の GM 作物由来食品であったため、極めて慎重に評価された。しかし、この GM 食品に加えられた改良は成熟の遅延であり、従来トマトと本質的に異なるものではなかったため、質の違いに関する食品安全性の問題は惹起しなかったⁱⁱⁱ。

2) 高ラウリル酸カノーラ

次に認可された高ラウリル酸カノーラは米国で 1995 年、カナダで 1996 年に認可されたものである。このカノーラから作られるオイル中のラウリル酸のレベルはココナツオイルやパームオイルと同レベルであるとされており、カナダにおける評価書のサマリーでは、このカノーラオイルを用いて作られる製品中の飽和、不飽和脂肪酸の量には変化はないであろうとし、特別な注意書きはない^{iv}。

3) 高オレイン酸ダイズ

デュポン社の高オレイン酸ダイズは米国、カナダ、豪州、日本で認可されており、現時点で認可されている第二世代の GM 食品の代表的なものである。通常、ダイズ油は多価不飽和脂肪酸を多く含み熱安定性が低いため、水素化処理が行われている。高オレイン酸ダイズではオレイン酸が脂肪酸全体の 80%程度、リノレン酸がかなり少ない。また、高オレイン酸ダイズから作られる油では、水素化処理を行わないため、水素化処理の際に生成するトランス脂肪酸の含量も低く抑えられる。米国、カナダの評価書では、これらの脂肪酸含量の変化に基づいて、高オレイン酸ダイズ油については「ダイズ油」ではなく「高オレイン酸ダイズ油」と表記することを求めている^v。また、オーストラリアの評価書でも、高オレイン酸ダイズに由来する油について、食品の真の性質を説明するために、従来の表示からの変更の必要性を示唆している^{vi}。

4) 高リジントウモロコシ

モンサント社の高リジントウモロコシは、飼料とすることを目的としたものである。米国で2005年に安全性が確認された後にカナダで2006年に認可された。このGMトウモロコシは高リジン含量とすることが意図されており、実際リジン含量は有意に高かった。しかし、FDAはリジンはGRAS (generally recognized as safe) であることからこのレベルについて特段の吟味をおこなっていない。その他にリジンの2つの代謝物の含量が有意に上昇していたが、これらについては容易に分解されること、および文献的知見等から安全上の問題はないとしている。その他の成分含量の有意な違いについては統計学的解析、および既知見に見られる濃度範囲から問題ないと判断している。カナダの評価においても同様であり、意図された形質の発現増加に関して、特段の考慮は行われていない^{vii}。

3. 現在開発中の第二世代のGM食品

前述のように、すでに認可されている第二世代のGM食品については、その意図されている成分に関して、摂取量や接種方法と関連して安全上の問題は指摘されていない。また、インターネットでの検索でも、これらのGM食品の社会的受容およびリスク・コミュニケーションに関する情報は入手できなかった。

そこで、現在開発が行われており、今後実用化が見込まれる第二世代のGM食品として、ビタミンA強化米(ゴールデンライス)を取り上げ、この社会的受容およびリスク・コミュニケーションに関連する情報をインターネットで検索し、現時点における議論のポイントを整理した。

1) ゴールデンライスとは

ゴールデンライスとは、遺伝子組換えによりビタミンAの含量を高めたイネのことである。開発途上国の米を主食とする地域ではビタミンA欠乏症が多く、そのために、多くの子供達が盲目になっているとされている。そのような問題の解決のためにゴールデンライスが開発された^{viii}。

2) ゴールデンライスに対する社会的反応

ゴールデンライスはまだ現実に認可されていないこともあり、市場における受け入れを通じた社会的受容の把握はできない。一方、インターネット上には、ゴールデンライスに対する様々な情報が多数見いだされる。

農業バイオテクノロジーに関する情報を提供

している Ag BioTech Info Net^{ix}では、ゴールデンライスに特化したサイト^xを持っており、ここで、①一般的な議論、②新聞報道等、③科学および研究、④食品安全保障問題、⑤栄養価、⑥産業界というカテゴリーに分けて様々な情報提供を行っている。

この中に収載されているグリーンピースによる2001年の記事では、現時点ではゴールデンライスに含まれるビタミンAの量はビタミンA欠乏症の解決には不十分であり、産業界はGM食品が欧州で受け入れられないために、その代替りの市場を求めているのであると断じている。

その他にもインターネット上にはいくつかの反対意見が見られる。これらの反対意見を社会的反応の典型例とすることはできないが、このようなインターネット上の反対意見は比較的影響力が高いと考えられるため、これらを見捨てることはできない。

現在インターネット上で見られるゴールデンライスに対する反対意見の例としては、下記がある。ただし、記事は2001年のものである。

- ビタミンA欠損は、ゴールデンライスの利用よりもリスクの低い、廉価な方法で解決できる(地球の友)^{xi}
- ゴールデンライスにより利益を得るのはバイオテク企業であって、貧しいアジアの農家ではない(フィリピン農業-科学者パートナーシップ)^{xii}

3) ゴールデンライスに関するコミュニケーション

現在、ゴールデンライスに関しては、ゴールデンライス・プログラムというプログラムが設置されており、そのウェブサイト^{xiii}ができています。このプログラムは開発に関わった研究者、当初の研究資金提供者であるロックフェラー財団、シンジエント、その他の研究者らにより運営されており、ゴールデンライスの各国における実用化に向けた活動を、国際イネ研究所、ベトナム、中国、バングラデシュの研究機関およびインド、インドネシアの政府機関と共同で進めている。このサイトには、開発の経緯や目的、Q&A、研究の動向や安全性に関する研究、規制等についての情報が収載されている。Q&Aには、プロジェクトの説明、知的財産権のライセンス、ビタミンAの発現レベル、今後の研究開発、環境安全性等に関するQ&Aに加えて、かなり詳細な科学的質問への回答も載せられている。しかし、まだ認可を受ける段階ま

で至っていないため、総合的な評価結果については記載されていない。また、そのような情報に基づくリスク・コミュニケーション情報も記載されていない。

4. リスク・コミュニケーションに関する重要文献

上述のように第二世代のGM作物に関するリスク・コミュニケーション事例は入手できなかった。一方、2005年6月にFAO/WHOが発表した食品安全リスク分析マニュアルの暫定版にはリスク・コミュニケーションに関するマニュアルが含まれており、これが日本語に翻訳されて食品安全委員会のウェブサイトに掲載されている^{xiii}。このリスク・コミュニケーションに関するマニュアルは極めて重要なものであり、第二世代のGM作物のリスク・コミュニケーションを考える上でも役立つものと思われるため、ここでその概要を紹介する。

1) FAO/WHOのリスク・コミュニケーションマニュアルの概要

このマニュアルの構成は概略下記のようになっている。

- ①リスク・コミュニケーションの目標
- ②リスク・コミュニケーションの方法
- ③利害関係者の確認と関与、役割
- ④リスクの科学的側面と感情的側面のコミュニケーション
- ⑤リスク・コミュニケーションの戦略
- ⑥リスク・コミュニケーションの原則

マニュアルはリスク・コミュニケーションの目的について、表2のように記している。

表2 リスク・コミュニケーションの目的

- ・ 意味のある正しい情報を簡明な分かり易い言葉で対象となる人に伝える。
- ・ リスク管理に関する決定のより幅広い理解と受容を導く。
- ・ 信用と信頼を築きこれを維持する。
- ・ リスク管理に関する決定に対し、関係者のより高い合意と支持を促す。
- ・ すべての違いを解消できるわけではないが、違いのよりよい理解を導く。

また、リスク・コミュニケーションの方法について、表3のように記している。

表3 リスク・コミュニケーションの方法

- ・ 良い効果を生むためには慎重に計画、実施、管理することが必要。
- ・ 責任と目的を明確に確認する。
- ・ リスク分析の過程全体を通して、利害団体すべてが参加できる体制を作る。
- ・ リスクコミュニケーションの専門家が伝達過程の計画及び実施に関与するのが有効。

その問題にどのような利害関係者がいるか、どのような人が関与することが重要かは、場合によって異なるため、事例毎にリスク・コミュニケーションに関与すべき利害関係者を選択することが必要である。利害関係者としては、表4のような人々が挙げられている。

表4 利害関係者の例

農民、食品生産者、食品加工業者、製造業者、流通業者、その供給業者、食品卸売業者、小売業者、消費者、権利擁護団体（消費者、環境、宗教、その他のロビー組織など）、地域団体、公衆衛生団体、ヘルスケア業界、大学、調査機関、政府（地方政府、州規制当局、連邦規制当局、公選の役職者など）、地理的地域、文化、経済、民族グループの代表者、民間団体、企業、労働組合、業界団体、マスコミ

利害関係者の関与の方法には、集会を利用する方法とそれ以外の方法とがある（表5）。

表5 利害関係者の関与の方法

集会を利用する方法：

公聴会、公的集会、状況説明会、質疑応答、タウンホール・ミーティング、パネルディスカッション、フォーカスグループ、研修会

それ以外の方法：

面談、ホットライン、フリーダイヤル、インターネットのホームページ、広告、チラシ、テレビ、ラジオ、報告書、パンフレット、広報紙、ブース、展示、コンテスト、イベント

マニュアルは、リスク・コミュニケーションにおいては、科学的・技術的側面のみでなく、感情的側面も重要であるとしている。これは、人々がリスクの科学的情報そのものよりも、より幅広い

コンテキストに関心を示すためである。また、感情的側面に対応するコミュニケーションが重要なもう一つの理由は、個人が認知するリスクレベルがリスクの受容に重要な影響を持つためである。この個人が認知するリスクレベルに影響を与えるとされている事項を表6に示す。

表6 個人のリスク認知に影響を与える因子

- ・ 恐ろしいか
- ・ 自分で管理できるか
- ・ 自然か・人為的か
- ・ 選択の余地があるか
- ・ 子供に影響があるか
- ・ 新規のものか、良く知られているか
- ・ 自分が暴露されるか
- ・ リスクに均衡する便益があるか
- ・ その機関は信用できるか

マニュアルはリスク・コミュニケーションの戦略を表7のようにまとめている。

表7 リスク・コミュニケーションの戦略

1. 食品安全リスクやステークホルダーの認識、状況などの背景情報を収集、分析する。
2. 特定の聴衆に対する鍵となるメッセージを作成し、広める。
 - ・ 科学的側面と感情的側面の両方に対応
 - ・ 最も適切なメディアを選択
 - ・ リスクの科学的側面のみでなく人間的側面も強調
 - ・ リスク評価の手順と不確実性の説明
 - ・ 公開、透明性、柔軟性を確保
 - ・ リスクに関係する特定の行動・選択の便益の認知を促す。
3. ステークホルダーに、リスクに関する対話に参加してもらう。
4. リスク・コミュニケーションの結果をモニターし、評価する。

そして、リスク・コミュニケーションの原則を表8のようにまとめている。

表8 リスク・コミュニケーションの原則

1. 聴衆を知る
2. 科学の専門家を巻き込む
3. コミュニケーションの専門知識を確立する
4. 信頼できる情報の発信源となる
5. 責任を共有する
6. 科学的判断と価値判断を区別する
7. 透明性を確保する
8. リスクを大局的に見る

2) 第二世代のGM食品のリスク・コミュニケーションに向けて

FAO/WHOのリスク・コミュニケーションマニュアルに記述されていることは、第一世代、第二世代の別なく、当てはまるものである。第二世代のGM食品の特徴は、機能性の付加であることを考えると、コミュニケーションにおいて、第一世代と異なる点は、機能性の付加に関連する科学的側面およびその他の側面が中心的な課題となると考えられる。

前述のゴールデンライス（ビタミンA強化米）の場合に当てはめて考えると、科学的側面としては、通常のGM食品の安全性評価に加えて、ビタミンA強化米の想定外の摂取がおこらないための管理とコミュニケーションが必要となるものと考えられる。ここで、「想定外の摂取」とは、想定外の人、想定外の量、想定外の調理・加工等による摂取である。このような想定外の摂取がおこらないように管理するためには、幅広い利害関係者の関与を求めて、想定外の摂取が起こりうる状況を洗い出すことが重要になると考えられる。

一方、ゴールデンライスの科学的・技術的側面以外の側面としては、開発の目的や、もたらされる便益、地域社会や経済への影響などがある。第二世代のGM食品では、機能の付加に伴って、第一世代のものに加えて追加のリスク管理が必要になる一方で、明確な便益もみこまれると考えられる。従って、リスクと便益のバランスを取る上でも広いコンテキストの中でリスクを捉えたコミュニケーションが必要となる。

さらに、上述のように、ゴールデンライスに対しては、様々な観点からの反対意見がある。従って、これらの反対意見に対しても対応していることが必要であろう。

D. 考察

本研究では第二世代のGM食品のリスク・コミュニケーションについて事例に基づいて検討することを目指したが、実際にはまだ、認可されている第二世代のGM食品の中に代表的な事例がないために、事例に基づく検討はできなかった。

そこで、現在開発中の第二世代のGM食品であるゴールデンライスを例にとり、最近FAO/WHOから発表されたマニュアルに従って、第二世代のGM食品のリスク・コミュニケーションの留意点について検討した。その結果、リスク・コミュニケーションでは、科学的側面のみでなく、それ以外の側面からのコミュニケーションも重要であること、特に第二世代のGM食品のリスク・コミ

コミュニケーションでは、リスクと便益の均衡も含めた幅広いコンテキストでのリスク・コミュニケーションが必要であることが明らかになった。また、マニュアルの原則に沿った戦略的アプローチが必要であることが浮き彫りになった。

ここで、戦略的アプローチとは、下記のようなものである。

1. ステークホルダーの認識、状況などの背景情報の収集、分析
2. 受け手に対する、鍵となるメッセージを作成し、広める
科学の専門家とリスク・コミュニケーションの専門家を巻き込む
科学的側面とその他の側面の両方に対応
幅広いコンテキストで
最も適切なメディアを選択
公開、透明性、柔軟性を確保
3. ステークホルダーとの意見交換等
4. リスク・コミュニケーションの結果をモニターし、評価する

しかし、実際には、誰がこのような幅広いリスク・コミュニケーションのコーディネータの役割を担うのか、という重要な問題がある。行政は自らの所管している領域、すなわち縦割りで物事を考える。食品としての安全性、環境安全性、経済的影響、社会的影響等々である。一方、一般の市民はトータルで考えており、遺伝子組換え食品の食品としての安全性の他に、環境安全性、社会的インパクト等、全体を考えて、その受容に対するスタンスを決定している。

リスク・コミュニケーションにおいて、全体像を把握し、戦略を描く役割を誰がどのように担うのか、そして、その戦略を描きうる人をどのように確保するのかが、我が国において GM 食品の将来を考える際に、問題となってくるであろう。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

H. 文献

- i : 安全性審査の経たれた遺伝子組換え食品及び添加物一覧
(<http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/1ist.html>)
- ii : 米国 :
<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/biocon.html>、カナダ :
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/index_e.html
EU :
http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm
豪州 :
<http://www.foodstandards.gov.au/foodmatters/gmfoods/gmcurrentapplication1030.cfm>
- iii :
<http://www.cfsan.fda.gov/~acrobat2/bnfMF LV.pdf>
- iv :
<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/bnfm025.html>、
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/ofb-096-100-a_e.html
- v :
<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/bnfm039.html>、
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/oleic_soybean-soja_oleique_e.html
- vi :
<http://www.foodstandards.gov.au/standarddevelopment/applications/applicationa387foodd937.cfm>
- vii :
<http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/bnfm087.html>、
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/nf-an129decdoc_e.html
- viii : <http://www.goldenrice.org/>
- ix : <http://www.biotech-info.net>
- x : <http://www.biotech-info.net/golden.html>
- xi : <http://www.foe.org/safefood/rice.html>
- xii : <http://www.grain.org/briefings/?id=18>
- xiii : <http://www.fsc.go.jp/sonota/riskanalysis.html>

分担研究報告書（平成 18 年度）

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究

分担研究名

分担研究者 西島正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨：平成 18 年度は、ニワトリを本研究の遺伝子組換え動物のモデルとして、鶏卵成分中のアレルゲンタンパク質を改変した遺伝子組換えニワトリを作出するために必要なターゲティングベクターの開発を行った。具体的には、鶏卵成分中の食物アレルギー誘発頻度が最も高く、また物理化学的安定性が高く変性除去が困難なオボムコイドを標的とし、このタンパク質を遺伝的に除去（ノックアウト）もしくはアレルゲンエピトープを改変するためのベクターの作出を行った。ベクターの構築のために、ニワトリゲノムからオボムコイド遺伝子座のクローニング、コンティグを作成後、null 型（開始コドンに変異）改変配列の準備、またオボムコイドのアレルギー反応に最も重要とされる 2 箇所のアミノ酸残基に変異を導入したエピトープ改変配列を準備した。さらにこれらの配列には、薬剤耐性遺伝子配列と改変配列を視覚的に追跡できるように EGFP（緑色蛍光タンパク質）をそれぞれ付加した配列を準備し、最終的にこれらの配列を DT-A（ジフテリア毒素 A 鎖）遺伝子配列を付加したベクターに挿入し、最終的なターゲティングベクターを構築した。

協力研究者

堀内浩幸（国立大学法人広島大学・大学院生物圏
科学研究科 助手）

手島玲子（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

遺伝子組換え食品の安全性評価は、次世代の国民の食の安全性を確保する上で重要な研究課題であり、既に遺伝子組換え植物は、多くが世界的な流通規模となっており、様々な対策が図られ、またリスクコミュニケーションが進められている。一方遺伝子組換え動物では、水域における魚類において流通の許可待ちの段階まできており、その対策が急がれている。陸域の遺伝子組換え動物は、現在研究段階であるものが多いが、技術的な開発は既に完成の域に達しており、今後 10 年以内には、遺伝子組換え動物の産物が食品として流通することが予想される。既に医薬品では、EU において遺伝子組換えヤギにより作製されたトロンビン（血液凝固因子）が認可を受けている。そこで本研究では、次世代の遺伝子組換え動物として注目されているニワトリに焦点を絞り、今後遺伝子組換えニワトリとして開発が予想されるモデルケースを提案するとともにその食品としての安全性を評価することを目的とした。ニワトリは高生産性の産業動物であり、国土に限りのあるわが国には最も適した畜産動物である。また、ニワトリは世界的に見ても宗教的制限の少ない

動物種であり、ワクチン生産などの医薬品としての実績も豊富であり、世界中で遺伝子組換えニワトリの開発が進められている。現在その開発の主流は、鶏卵中に医薬品などの有用タンパク質を生産させる技術開発であり、ウイルスベクター法によるサイトカインや抗体産生が模索されている。本協力研究者は、ニワトリ ES（胚性幹）細胞を用いた研究開発を進めており、この手法を応用すれば、単に有用タンパク質生産への利用だけでなく、鶏卵成分を改変した機能性鶏卵や抗病性のニワトリの開発などその利用範囲は広い。一方鶏卵は日本人の食物アレルギーの原因の第一位であり、低年齢層への鶏卵由来ワクチン接種などで障害となっている。本分担研究では、遺伝子組換えニワトリから産生される鶏卵や鶏肉の安全性評価系を構築することを第一の目的として、そのモデルケースとして低アレルギー鶏卵の作出を行い、遺伝子改変による成分変化、アレルギー性試験等を実施することを目的とした。平成 18 年度には、この研究に利用する遺伝子組換えニワトリを作出するための遺伝子改変用ターゲティングベクターの開発を行った。

B. 研究方法と結果

1) オボムコイド遺伝子座のクローニング

データベース上に公開されている予想されるオボムコイド遺伝子座（赤色野鶏）の塩基配列をもとに、2 箇所（region 1 と region 2）の相同領域

(図1)を白色レグホン種鶏ゲノムからPCRにより増幅し、ベクターへクローニングした。このうちregion1はnull型(ノックアウト用)に、region2はアレルギーエピトープ改変用に使用した。ベクターへクローニングした2つの領域は、それぞれショットガン法により全塩基配列を決定した。なお塩基配列の決定においては、重合度が3以上でひとつの決定領域が5'側及び3'側の双方向から決定されていることを最低条件として行った。決定した塩基配列はそれぞれ、コンティグを作成後、制限酵素地図を作成し、遺伝子挿入時に使用する制限酵素認識配列の選択に利用した。

2) 部位特異的変異導入

クローニングしたregion1とregion2は、PCRを用いた部位特異的変異導入法により、それぞれ目的の変異を導入した。Region1には、クローニング領域に存在するexon1中の開始コドンに変異を導入し、その直後に制限酵素認識配列を付加した。またregion2には、クローニング領域に存在するexon7中の主要な2箇所のアレルギーエピトープに変異を導入した。それぞれの改変領域は、再度塩基配列の決定を行い改変の有無と目的領域以外に変異がないことを確認した。

3) ポジティブ選抜・追跡用カセットの作製

最終的に構築したターゲティングベクターをニワトリES細胞株へ導入する際、導入の有無を*in vitro*で選抜(ポジティブ選抜)する必要がある。また遺伝子改変の有無を視覚的に簡便に判断できればさらに有益である。さらに、変異導入ES細胞から遺伝子改変ニワトリを誕生させるにあたり、これらの外来遺伝子は持ち込まれないほうが理想的である。そこで図2に示した4種のカセットを準備した。1つはピューロマイシン耐性遺伝子をニワトリのβアクチンプロモーターで制御するものを準備した。また遺伝子改変の有無を視覚的に簡便に判断できるように、βアクチンプロモーターの下流にEGFP(緑色蛍光タンパク質遺伝子)が連結されたものも準備した。上記2つのカセットは、理化学研究所(神戸)・丹羽仁博士より分与頂いたpCAGIpuroプラスミドベクターから準備した。またES細胞での選抜終了後にこれらのカセットの除去が可能ないように、これらのカセットの両端に*loxP*配列を付加し、Creリコンビナーゼの発現により外来導入遺伝子のみを除去できるようにした。

4) 変異導入配列へのカセットの挿入

2)で作製した2種の変異導入配列へ3)で作製した4種のカセットのうち*loxP*配列を付加していない2種のカセットを挿入し、相同遺伝子組換え領域を完成させた。*loxP*配列を付加した2種のカセットは今後挿入する予定である。

5) ターゲティングベクターの構築

4)で作製した相同遺伝子組換え領域は、最終的に効率よく相同遺伝子組換え細胞が取得できるように、ネガティブ選抜用に付加したチミジンキナーゼプロモーター制御下のDT-A(ジフテリア毒素A鎖)配列上流に挿入した。DT-Aによるネガティブ選抜とは、相同遺伝子組換え領域がES細胞にランダムに導入される場合にDT-A遺伝子も導入され、DT-Aの細胞毒性によりこの領域が導入された細胞を死滅させる方法である。相同遺伝子組換えが起きれば、DT-Aは導入されず、結果的に相同遺伝子組換え細胞のみを効率よく選抜・増殖させることが可能となる。最終的に本研究で構築・構築予定のベクター構成図を図3に示した。1-1および2-1ベクターは最終的に遺伝子改変ニワトリ作出に利用するベクターである。1-2および2-2ベクターは挿入したEGFP遺伝子の発現を追跡することにより、ES細胞により遺伝子改変の有無を評価するベクターとして利用する。また*loxP*配列を付加した1-3、4、2-3、4ベクターは将来的に外来遺伝子を除去した遺伝子改変ニワトリ作出及びその評価に利用する予定である。

(倫理面への配慮)

本研究で実施している組換えDNA実験は、我が国が定める「生物の多様性確保に関する法律」を順守し、協力研究者が研究を実施する広島大学において規定されている「広島大学組換えDNA実験安全管理規則」に従い適正に研究計画を立案し、機関承認を得ている。また実験動物の使用に関しては、同じく同機関が定める「広島大学動物実験実施規則」に従い研究計画書を提出するとともに、本実施規則に従い適切に実験動物を使用している。

C. 考察

本研究では、近い将来食品として利用価値が増大することが予想される遺伝子組換えニワトリに焦点を絞り、その想定される利用形態から実際に遺伝子組換えニワトリを作出し、食品としての安全性評価に利用することを目的に、まず遺伝子

組換えニワトリを作出するために遺伝子改変ベクターの作出を行った。

遺伝子改変ベクターの作出では、想定されるいろいろな遺伝子改変ニワトリの形態でその評価が実施できるように、薬剤耐性遺伝子が導入されるもの、レポーター遺伝子が導入されるもの、またゲノム遺伝子の一部が改変されるのみで外来遺伝子の導入が無いものなどを準備した。本研究では、平成18年度に計画していた全ての研究を終了させ、現在これらのベクターの機能試験を実施している。本研究では、ニワトリES細胞に対して相同遺伝子組換えで遺伝子改変を行うことを計画しているが、現在までのところこの実施例は国内外ともに皆無である。そこで、まず遺伝子組換えを高頻度に起こすことが知られるDT-40

(ニワトリB)細胞株を用いた機能試験(標的領域で相同遺伝子組換えが可能かどうか)を進めており、本研究報告書には結果を示していないが、良好な結果が得られつつある。今後はCre-loxPのシステムをどのように活用して、挿入された外来遺伝子配列を除去していくかの戦略をたて、その機能試験を実施していくとともに、平成19年度中には試作品として、遺伝子改変ニワトリを作出する予定である。

本研究では、鶏卵タンパク質であるオボムコイドを標的に研究を進めているが、遺伝子改変ニワトリの作出から鶏卵を生産させ、その成分評価を行うには、順調に研究が推移しても2年間の研究期間が最低でも必要であり、協力研究者が進めている別の遺伝子改変ニワトリを先行して評価対象に加えることも視野に入れ、平成19年度の研究を進める予定である。

D. 結論

平成18年度に計画した「オボムコイドを標的としたターゲティングベクターの開発」は、計画したほぼすべての内容を実施期間中に終了させた。本研究では遺伝子改変体の作出研究から開始しているため、今後は既に先行している別の遺伝子改変ニワトリを用いた評価試験等も視野に入れ研究を進める必要があると思われる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Yamashita, Y., Tategaki, A., Ogawa, M.,

Horiuchi, H., Nishida, K., Akita, S., Matsuda, H. and Furusawa, S. Effect of novel monoclonal antibodies on LIF-induced signaling in chicken blastodermal cells. *Dev. Comp. Immunol.* 30: 513-522 (2006).

2) Horiuchi, H., Furusawa, S. and Matsuda, H. Maintenance of chicken embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol. Biol.* 329: 17-34 (2006).

3) 堀内浩幸, 山下裕輔, 西田憲正, 古澤修一, 松田治男, ニワトリにおける抗体エンジニアリングとトランスジェニックテクノロジー, FFIジャーナル 211: 948-955 (2006).

2. 学会発表

1) 中野幹治, 堀内浩幸, 山下裕輔 他, ニワトリ胚盤葉細胞の培養と維持, 日本分子生物学会2006ファールム, 2006.12.8名古屋

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

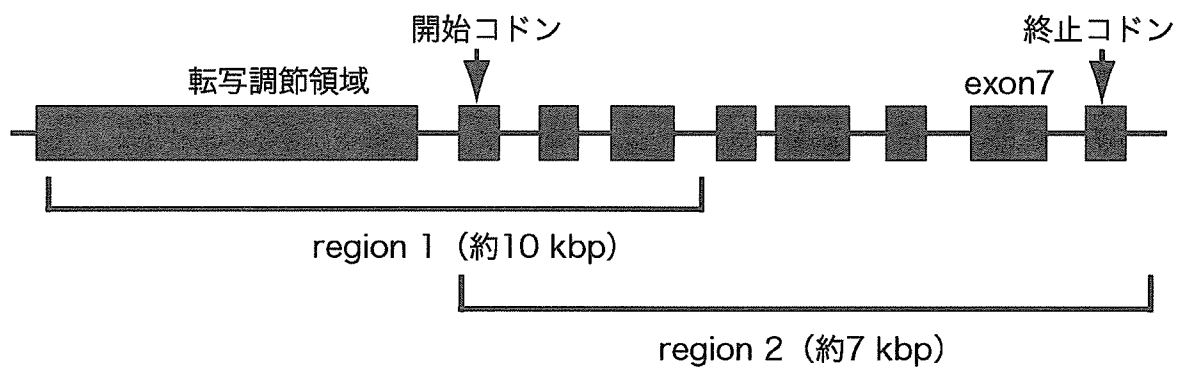


図1 オボムコイド遺伝子座の構成とクローニングした相同領域