

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 所長

研究要旨

遺伝子組換え魚が各国で作出されるようになって 10 年以上が経過した。研究初期には成長ホルモン遺伝子を導入した研究が主だったが、成長ホルモン遺伝子から耐病性の付与、栄養成分の改変、不妊化を目的としたものまで多様になってきた。さらには異種移植を目的とした研究も行われている。また、米国・カナダや中国では遺伝子組換え魚を食品として認めてもらおうと、行政部局に申請をしている動きもある。そこで、本研究では各国で行われている遺伝子組換え魚の作出研究を文献検索、インターネット、特許、雑誌・新聞等を用いて収集を行い、遺伝子組換え研究の現状について調べた。本年度は 2007 年度に報告された文献や、特に、中国で今までに報告されている遺伝子組換え魚に関する文献の検索を行った。その結果、2007 年度に報告された論文では遺伝子組換え魚の生態的研究や遺伝子の発現パターンの変化といった生理的研究が報告された。また、論理面や環境へのリスク研究といった報告もされた。中国における遺伝子組換え魚作出の研究は 1980 年代から始められ、鯉を中心に研究が進められてきた。ヒト由来の遺伝子の導入からプロモーターも含め、すべて魚由来の遺伝子を導入した組換え魚について研究が行われている。導入遺伝子は成長ホルモン遺伝子や耐病性を付与するためにヒトラクトフェリン遺伝子などを導入している。これらの組換え魚の不妊を目的として生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子の逆向きの遺伝子（アンチセンス）を導入し、生殖腺の発達を抑える研究も行っている。さらに、これまでの研究は導入遺伝子がどこにはいるか予想できないような導入方法であったが、最初の導入位置は決めることができないものの、組換え酵素とその認識部位を入れておくことによって、特定の位置に遺伝子を導入する研究も始まった。これらのことから、遺伝子組換え魚の実用化レベルは中国と米国・カナダとは全く同一で米国・カナダで食品としての遺伝子組換え魚の許可が停止している現状では中国で実用化の許可が速い可能性もある。

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
一さけますセンター さけます研究部
遺伝資源研究室）

A. 研究目的

遺伝子組換え魚介類の作出は、多くの国で報告されている。その中で、成長ホルモン遺伝子を導入した大西洋サケやコイで、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がある。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。

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。調査は 2007 年に報告された

文献および中国で作出されている組換え魚類について検索を行った。

C. 研究結果

インターネットを用い、遺伝子組換え大西洋サケを販売しようとしている A/F Protein 社 (<http://www.afprotein.com/>) および遺伝子組換え大西洋サケを審査している米国食品医薬品局 (FDA: <http://www.fda.gov/>) のホームページ上で遺伝子組換え魚の食品としての許可状況を調べたが、特に進展は無かった。実際に遺伝子組換え魚を飼育・管理している会社は A/F Protein 社の関連会社で Aquabounty technologies 社 (<http://www.aquabounty.com/>) という会社である。この会社が扱っている遺伝子組換え魚については米国の特許情報を調べると特許番号 5545808 に詳細が記載されている。これらの情報から導入遺伝子の簡単な模式図と検出プライマーを図 1 に示した。

次に 2007 年に報告された遺伝子組換え魚に関する論文を調べた。メダカ、ゼブラフィッシュを

用いた論文が多数検索されるが、これらの魚種を用いた研究は遺伝子の機能を解析するために用いられる場合が多く、必ずしも食用を目的とした実験ではない。従って、メダカ・ゼブラフィッシュ以外の魚種で組換え魚に関する論文を中心に収集、分析した。その結果、18編の論文が検索された。成長ホルモン遺伝子を導入した組換え魚に関する論文が多く、成長ホルモン遺伝子を導入した魚のエネルギー収支(早く成長することの理論付け)、生理機能、体成分、代謝および遺伝子発現の比較などが行われている。また、実験水槽を用いた生態学的観察の実験結果が示された。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、ティラピアを用い、糖尿病への異種移植を想定した、食品としての利用以外の研究も報告されていたが、本年度は無かった。また、遺伝子組換え魚の論理面について考察した論文やリスク評価について考察した論文が報告された。

今年度は中国の研究について詳細に調べた。その結果、参考文献として24編収集できた。中国では金魚を用いて、1980年代からマウスメタロチオネインプロモーターの下流にヒトの成長ホルモン遺伝子を導入した研究から始まった。やがて実験対象魚として金魚から鯉を用いるようになり、導入遺伝子も2001年にプロモーターおよび成長ホルモン遺伝子の両方とも魚由来の遺伝子(彼らはall-fish recombinantと呼んでいる)を導入するようになった。ヒト由来の遺伝子としては成長ホルモン遺伝子の他に魚に耐病性を付与する目的でヒトのラクトフェリン遺伝子を導入し、耐病性に有効であったことを報告している。

また、遺伝子組換え魚は一般に3倍体にされ、不妊化して利用することを想定している。しかし、大量に3倍体化処理をすると、3倍体化されずに2倍体のまま生存する個体があることが知られている。そのため、より確実に不妊化する方法の開発が望まれている。中国の研究者は不妊化の手法として性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)のアンチセンスの配列約300bの配列を鯉βアクチンプロモーターの下流につなげ、遺伝子導入して生殖腺の発達を観察した。その結果、生殖腺の発達が認められなかった個体を観察し、不妊化に有効な方法であることを報告した。魚類の場合、ホルモンを投与することによって人為的に成熟させることが可能なので、このように遺伝的に不妊化した個体から子供をとる場合は、次世代の子供をとる個体だけに成熟ホルモンを投与し、成熟させることを考えている。

魚類の場合、相同性組換え法が開発されておら

ず、導入遺伝子の挿入部位を予め決めて遺伝子導入することは不可能である。従って、遺伝子導入魚を作出した後に個体を調べて、挿入部位、コピー数などが調べていた。挿入部位がいつも異なったり、コピー数が異なっていると、その表現型を比較・解析するとき、複雑になる。そこで、Cre(組換え酵素の一種)とloxP(その認識配列)を用いたシステムが魚類でも試みられた。最初の実験は2004年にゼブラフィッシュで行われた。中国の研究者もこのシステムを用いてゼブラフィッシュで実験を行った。その結果、予め遺伝子導入した緑色の蛍光色素遺伝子導入部位に赤色の蛍光色素遺伝子を導入することに成功した。

中国で報告されている遺伝子導入魚作出に用いたベクターの模式図や、その論文に記述されている検出のためのプライマーを図2から5に整理した。

D. 考察

最近では新しい魚種で遺伝子組換え魚を作出したという報告は少なくなった。今までに作出した組換え魚を用いて、コントロールと比較した実験の報告がなされるようになった。

FDAがAquabounty Technologies社が申請している成長ホルモン遺伝子を導入した大西洋サケを食品としてでなく、医薬品として扱っている限り、許可はおりそうもない。中国では遺伝子組換え魚をどのように扱っているか、詳しく書いた論文はない。ただ、食品として、日本の厚生労働省に相当する機関に許可を申請中であり、そのための研究について書かれた論文が1報ある。このような論文はキューバで遺伝子組換えティラピアを作出し、安全性研究を行った、という論文も出ているが、その結果について中国もキューバも続報が出てこない。

中国の伝統的養殖形態は草魚のように植物を餌とする魚を飼育し、その排泄物を利用して植物プランクトンが自然に繁殖し、その植物プランクトンを餌とする魚、あるいは植物プランクトンを食べて増えた動物プランクトンを利用する魚を混合養殖する、といったものである。これらの魚は止水で養殖することが可能であり、他の水系とは独立に飼育できることから、遺伝子組換え魚も比較的簡単に導入、飼育できると思われる。

日本において淡水魚を食品として利用するのは一般に広く行われていないが、地方によっては利用されているところもある。また、中国産のシジミを日本産と偽って販売していた、との報道もある。シジミなどを生鮮輸入する場合、鯉科魚類の卵が混じって入ってくることも否定できない。

一方、サケ科魚類を食品として利用する場合は

ほとんどがフィレーあるいは切り身の状態で輸入されている。成長ホルモン遺伝子を導入したサケは成育の期間が短くなるだけで、最大体長は非組換え魚と変わらない。従って、フィレー・切り身のような形態になった商品を外見から組換え魚と非組換え魚を判断することは不可能である。

このような理由から、今後も各国における遺伝子組換え魚の作出情報や、それらの作出に用いた導入遺伝子の情報などを調べていくことは重要であると思われる。

来年度は遺伝子組換え魚の作出が行われているティラピアの情報について収集したいと考えている。

E. 結論

米国・カナダにおいて遺伝子組換え魚が食品として許可された、という情報は無い。遺伝子導入魚を作出したという報告から組換え魚の生態的、生理的特徴について調べた論文が報告されている。また、論理面、環境リスクなどについて考察した論文もでた。導入技術についても、いろいろな工夫を行っている論文もでた。中国における遺伝子組換え魚の情報の収集の結果から欧米以上に注意を払う必要性を感じた。

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). 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.*

参考文献

2007年に報告された遺伝子組換え魚に関する文献

- 1) Alimuddin, G. Yoshizaki, *et al.* (2007). Expression of masu salmon Δ 5-desaturase-like gene elevated EPA and DHA biosynthesis in zebrafish. *Marine biotechnology* 9: 92-100.
- 2) Alvarez, M. C., J. Béjar, *et al.* (2007). Fish ES cells and applications to biotechnology. *Marine Biotechnology* 9: 117-127.
- 3) Brooks, C., G. Hwang, *et al.* (2007). Transgene activity following somatic transgenesis in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 70(supplement B): 234-247.
- 4) Davison, J. M., C. M. Akitake, *et al.* (2007). Transactivation from gal4-vp16 transgenic insertions for tissue-specific cell labeling and ablation in zebrafish.

- Developmental Biology 304: 811-824.
- 5) de Azevedo Figueiredo, M., C. F. C. Lanes, et al. (2007). Improving the production of transgenic fish germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genetics and Molecular Biology* 30(1).
 - 6) Eppler, E., A. Caelters, et al. (2007). Insulin-like growth factor I (IGF-I) in a growth-enhanced transgenic (GH-overexpressing) bony fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*): indication for a higher impact of autocrine/paracrine than of endocrine IGF-I. *Transgenic Research* 16: 479-489.
 - 7) Fu, C., D. Li, et al. (2007). Growth and energy budget of F2 'all-fish' growth hormone gene transgenic common carp. *Journal of Fish Biology* 70: 347-361.
 - 8) Hallerman, E. M., E. Mclean, et al. (2007). Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aquacultured fishes: a review identifying research needs. *Applied Animal Behaviour Science* 104: 265-294.
 - 9) Leggatt, R. A., C. J. Brauner, et al. (2007). The glutathione antioxidant system is enhanced in growth hormone transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. comp. physiol. B* 177: 413-422.
 - 10) Liu, W., Y. Wang, et al. (2007). Site-directed gene integration in transgenic zebrafish mediated by cre recombinase using a combination of mutant lox sites. *Marine Biotechnology* 9: 420-428.
 - 11) Millar, K. and S. Tomkins (2007). Ethical analysis of the use of GM fish: emerging issues for aquaculture development. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* 20: 437-453.
 - 12) Mori, T., I. Hiraka, et al. (2007). Changes in hepatic gene expression related to innate immunity, growth and iron metabolism in GH-transgenic amago salmon (*Oncorhynchus masou*) by cDNA subtraction and microarray analysis, and serum lysozyme activity. *General and Comparative Endocrinology* 151: 42-54.
 - 13) Napier, J. A. (2007). Perspective transgenic plants as a source of fish oils: healthy, sustainable and GM." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 87: 8-12.
 - 14) Oakes, J. D., D. A. Higgs, et al. (2007). Influence of ration level on the growth performance and body composition of non-transgenic and growth-hormone-transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture* 265: 309-324.
 - 15) Rasmussen, R. S. and M. T. Morrissey (2007). Biotechnology in aquaculture: transgenics and ployploidy. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6: 2-16.
 - 16) Sundström, L. F., M. Löhmus, et al. (2007). Dispersal potential is affected by growth-hormone transgenesis in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ethology* 113: 403-410.
 - 17) Sundström, L. F., M. Löhmus, et al. (2007). Gene-environment interactions influence ecological consequences of transgenic animals. *PNAS* 104(10): 3889-3894.
 - 18) Zang, X.-N., B. Liu, et al. (2007). Transformation and expression of *Paralichthys olivaceus* growth hormone cDNA in *Synechocystis* sp. PCC6803. *Aquaculture* 266: 63-69.
- 中国で報告された遺伝子組換え魚に関する文献
- 19) Zhu, Z., G. Li, et al. (1985). Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L. 1758). *Ichthyology* 1: 31-34.
 - 20) Khoo, H., L. Ang, et al. (1992). Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into zebrafish. *Aquaculture* 107: 1-19.
 - 21) Cui, Z. and Z. Zhu (1993). Hormonal replacement therapy in fish: human growth hormone gene function in hypophysectomized carp. *Fish Physiology and Biochemistry* 12(2): 161-169.
 - 22) Jiang, Y. (1993). Transgenic fish - gene transfer to increase disease and cold resistance. *Aquaculture* 111: 31-40.
 - 23) Lu, R. and H. Chen (1993). Advances in fish cell engineering in china. *Aquaculture* 111: 41-50.
 - 24) Xie, Y., D. Liu, et al. (1993). Gene transfer via electroporation in fish. *Aquaculture* 111: 207-213.

- 25) Cui, Z., Z. Zhu, et al. (1996). Food consumption and energy budget in MThGH-transgenic F2 red carp (*Cyprinus carpio* L. red var.). Chinese Science Bulletin 41(7): 591-596.
- 26) Fu, C., Y. Cui, et al. (1998). Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. Journal of Fish Biology 53: 115-129.
- 27) Chen, S., H. Zhao, et al. (2000). Nuclear transplantation with early-embryonic cells of transgenic fish. Progress in natural science 10(12): 925-930.
- 28) Fu, C., Y. Cui, et al. (2000). Whole-body amino acid pattern of F4 human growth hormone gene-transgenic red common carp (*Cyprinus carpio*) fed diets with different protein levels. Aquaculture 189: 287-292.
- 29) Sun, Y., S. Chen, et al. (2000). The onset of foreign gene transcription in nuclear-transferred embryos of fish. Science in China (Series C) 43(6): 597-605.
- 30) Wang, Y., W. Hu, et al. (2001). Genetic analysis of all-fish growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation. Chinese Science Bulletin 46(14): 1174-1178.
- 31) Zeng, Z. and Z. Zhu (2001). Transgenes in F4 pMThGH-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.) are highly polymorphic. Chinese Science Bulletin 46(2): 142-148.
- 32) Zhong, J., Y. Wang, et al. (2002). Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. Aquaculture 214: 93-101.
- 33) Guo, Q., Y. Wang, et al. (2003). Transgene for growth hormone in common carp (*Cyprinus carpio* L.) promotes thymus development. Chinese Science Bulletin 48(16): 1764-1770.
- 34) Wu, G., Y. Sun, et al. (2003). Growth hormone gene transfer in common carp. Aquat. Living Resour. 16: 416-420.
- 35) Fu, C., Y. Wang, et al. (2005). Developments in transgenic fish in the people's republic of china. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 24(1): 299-307.
- 36) Sun, Y., S. Chen, et al. (2005). Cytoplasmic impact on cross-genus cloned fish derived from transgenic common carp (*Cyprinus carpio*) nuclei and goldfish (*Carassius auratus*) encleated eggs. Biology of Reproduction 72: 510-515.
- 37) Wu, B., Y. Sun, et al. (2005). Characterization of transgene integration pattern in F4hGH-transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). Cell Research 15(6): 47-454.
- 38) Hu, W., Y. Wang, et al. (2006). A perspective on fish gonad manipulation for biotechnical applications. Chinese Science Bulletin 51(1): 1-7.
- 39) Wang, W., Y. Wang, et al. (2006). Effects of the all-fish growth hormone transgene expression on non-specific immune functions of common carp, *Cyprinus carpio* L. Aquaculture 259: 81-87.
- 40) Fu, C., D. Li, et al. (2007). Growth and energy budget of F2 all-fish growth hormone gene transgenic common carp. Journal of Fish Biology 70: 347-361.
- 41) Hu, W., S. Li, et al. (2007). Antisense for gonadotropin-releasing hormone reduces gonadotropin synthesis and gonadal (*Cyprinus carpio*). Aquaculture 271: 498-506.
- 42) Liu, W., Y. Wang, et al. (2007). Site-directed gene integration in transgenic zebrafish mediated by cre recombinase using a combination of mutant lox sites. Marine Biotechnology 9: 420-428.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 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

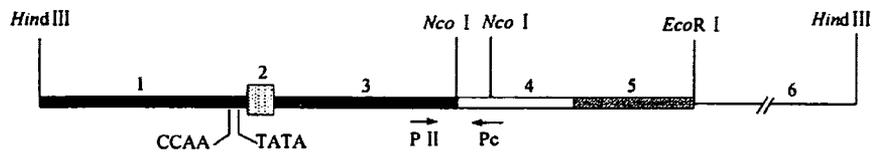


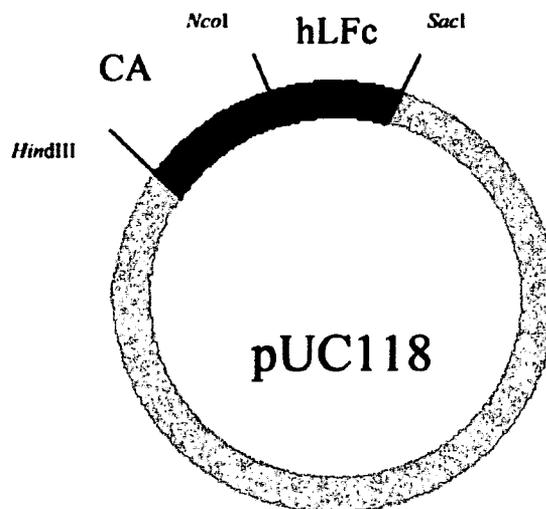
Fig. 1. Structure of pCAgcGHc. 1, 5' flanking sequence of common carp β -actin gene; 2, first exon of common carp β -actin gene; 3, first intron of common carp β -actin gene; 4, cDNA sequence of grass carp GH gene; 5, 3' flanking sequence of grass carp GH gene; 6, pUC118; P II/Pc, primers for PCR amplification.

検出のためのプライマー

P II: 5' -TGGCGTGATGAATGTCG-3' (β アクチン配列由来)

Pc: 5' -AACACGTATGACTGC-3' (草魚 cDNAGH 配列由来)

図 3. pCAgcGH ベクター模式図と検出プライマー (Wang *et al.* (2001)から)



検出のためのプライマー

5' -TGGCGTGATGAATGTCG-3' (β アクチン配列由来)

5' -CTGTTTTCCGCAATGGC-3' (ヒトラクトフェリン cDNA 配列由来)

図 4. pCAhLFC ベクター模式図と検出プライマー (Zhong *et al.* (2002)から)

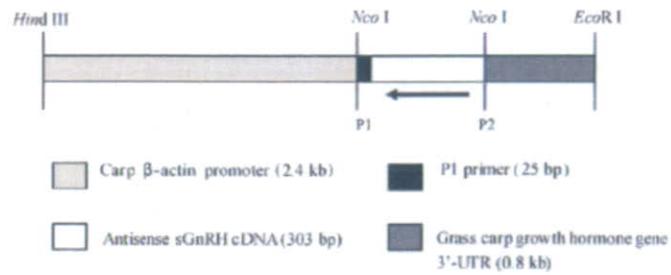


Fig. 1. The linear map of CAsGnRHpc-antisense recombinant gene. P1 and P2 were specific primers for the assay of transgenic carp and the expression analysis of antisense CAsGnRHpc recombinant gene.

検出のためのプライマー

P1: 5' -CCATGGCGTATCGATGTCGAC-3' (βアクチン配列由来)

P2: 5' -CATGGCTTTGCCAGCATTGG-3' (antisense GnRH 配列由来)

図 5. CAsGnRHpc-antisense ベクター模式図と検出プライマー (Hu, W. *et al.* (2007)から)

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：本研究では機能性成分を高めたり健康増進効果を高めた GM 食品について、安全性評価事例、コーデックスによる安全性評価指針案、およびわが国における機能性食品に対する規制制度の検討を行い、その結果に基づいて、厚生労働省の「遺伝子組換え食品の安全性について」を機能性を高めた遺伝子組換え食品もカバーするように改定する案を作成した。わが国における健康食品ブームを見ると、GM 食品であっても消費者が過度に期待して、過剰摂取により問題を生じる可能性もないとはいえないと考えられる。そのため、パンフレットの改定案では「遺伝子組換えによって機能性を高めた食品とは？」という項目の中に、機能性を高めた GM 食品についての説明、このような GM 食品の安全性評価の説明とともに、「表示を良く見て、摂取量・摂取方法を守って摂取すること」を記述することとした。今後、消費者メリットのある有用な GM 食品が開発された時点で、消費者の疑問に答え、安全を確保するための十分な体制と情報整備ができていくことがリスク・コミュニケーションのためにも最重要なことであると考えられる。そのためにも、開発側である農林水産省の担当部局や健康食品や食品表示の担当部局との早期の連携が重要になるものと考えられる。

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て以来、GM 食品の数は増加し、平成 20 年 2 月 12 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 88 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。実際、農林水産省は平成 20 年 1 月に発表した「遺伝子組換え農作物等の研究開発の進め方に関する検討会」最終とりまとめの中で、健康増進効果のある機能性成分を高めた農作物を今後 5 年以内に実用化することを目標に掲げている²。

このような、機能性成分を高めた農作物は、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が、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。コーデックス委員会のバイオテクノロジー応用食品に関する政府間タスクフォースは 2007 年 9 月に千葉市で開催した会合において、栄養改変組換え植物あるいは健康増進効果を狙った組換え植物の食品安全性評価に関する指針案の検討を行い、この結果は 2008 年 6 月-7 月に開催されるコーデックス委員会本会議で採択される見通しである³。

本年度はこのような機能性を高めた GM 食品の安全性評価を取り巻く状況を概観し、リスク・コミュニケーションの観点から特に留意すべき点について検討を行い、厚生労働省が作成しているパンフレット「遺伝子組換え食品の安全性について」の改定提案を行った。

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基づいて実施した。

調査対象とした文献等は下記である。

- ① 機能性を高めた GM 食品に関する各国政府等の認可に際する評価文書
- ② コーデックス委員会バイオテクノロジー応用食品に関する政府間タスクフォースによる栄養改変組換え植物あるいは健康増進効果を狙った組換え植物の食品安全性評価に関

する指針案

③ 厚生労働省による保健機能性食品、およびいわゆる健康食品に対する対応⁴

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. 研究結果および考察

1. 各国政府による機能性を高めた GM 食品の評価

機能性を高めた GM 食品として各国で認可されているものとしては、昨年度の報告書でも挙げた、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、豪州、日本で認可されている高リシントウモロコシがある。昨年度の報告書以降、新たに認可されたものはなかった。

1) 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機能性成分を高めた GM 食品の代表的なものである。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、通常、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低い。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⁵。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⁶。

わが国においては高オレイン酸ダイズは従来のものと組成、栄養価等が著しく異なることから、高オレイン酸大豆およびその加工食品に対して「特定遺伝子組換え農作物」として JAS 法の下で「大豆(高オレイン酸遺伝子組換え)」等の表示が義務付けられている⁷。

2) 高リシントウモロコシ

モンサント社の高リシントウモロコシは、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。またオーストラリアでは 2007 年、わが国でも 2007 年 4 月に認可されている。

この GM トウモロコシは高リシン含量とすることが意図されており、実際リシン含量は有意に高

かった。しかし、FDA はリシンは 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行っていないようである。また、リシンの他にリシンの 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、特段の考慮は払われていない⁸。

わが国においてはリシンおよび上記 2 つの代謝物の摂取量に基づく評価が行われており、リシンについてはすべてのトウモロコシが高リシントウモロコシに置き換えられた場合であっても、リシンの摂取量が 1 日摂取量のうち数パーセントしか占めないこと、代謝物については、1 日摂取量がマウスの急性毒性試験で毒性を与えなかった量の 10^{-6} 以下であることから問題ないと評価されている⁹。

なお、高リシントウモロコシも「特定遺伝子組換え農作物」として JAS 法の下で義務表示の対象となっている⁷。また、オーストラリアにおいても、通常の GM 食品に対する表示に加えて、高レベルのリシンを含む旨の表示をすることを義務づけている¹⁰。

2. コーデックスにおける安全性評価に関する検討

コーデックスのバイオテクノロジー応用食品に関する政府間タスクフォースにおいては、2005 年 9 月の会合で、栄養または健康増進のために改変した組換え DNA 植物に由来する食品の安全性評価に関する指針を、従来の指針のアネックスとして作成することが決定され¹¹、2007 年 9 月の会合において、このアネックスの文章がほぼ固まった。この後、2008 年のコーデックス委員会における討議により最終決定される見通しである³。

この指針のアネックスでは、概略下記のことを記されている³。

1. Codex General Principles for the Addition of Essential Nutrients to Foods (CAC/GL 09-1987) および Codex Plant Guidelines が全般的には適用できるため、アネックスでは追加して検討が必要な事項について論じる。
2. 栄養または健康増進のために改変した組換え DNA 植物に由来する食品は、一部の人には大変有益なものである可能性がある一方で、一部の人にはリスクをもたらす可能性の

あるものである。

3. 従来食品との比較により新たなハザードあるいは変化したハザードを確認することが安全性評価の中心となる。これらの作物では栄養素が従来作物に比べて有意に変化する可能性があるため、適切な比較対照 (comparator) の選択が重要である。
4. 必要に応じて栄養素の摂取上限値を考慮する必要がある。このレベルを超過することの公衆衛生上の意味を検討する必要がある。
5. 類縁物質については摂取上限値および必要に応じてその他の数値を考慮してケース・バイ・ケースで検討する。
6. 科学的に評価された摂取上限値がない場合については、暴露量がこれまでの経験と大きく変わらない場合は、安全な利用経験も考慮する。
7. 特性の明らかな化学物質を特定量添加して強化する場合と異なり、植物中の栄養素の量は栽培条件等によっても変化し、変化する物質も一つに限らない。場合によっては植物体中の物質の化学形や類縁物質に関する情報も必要になる。
8. 必要な場合は、改変された栄養素等の生物利用度を明らかにすべきである。
9. 生物利用度の評価ではヒトを用いた研究がより意味のある情報を提供すると考えられる。

3. わが国における機能性食品に対する規制

現在、わが国において市販が認められている、機能性を高めた GM 食品は、高オレイン酸大豆および高リシントウモロコシであるが、前者は現在、市場には出回っていないようである。また、後者については、飼料用であることから、やはり一般市民が購入する状況にはなっていない。

しかし、今後、このような機能性を高めた GM 食品がわが国で流通するようになると考えた場合、これらの製品がどのような規制の下でどのような表示をつけて流通するようになるかは、リスク・コミュニケーションを考える上でも重要である。

わが国では国が機能性を高めた食品として認める食品 (保健機能食品) は以下の2つに分類される。

- ① 特定保健用食品：保健用途上の有効性、安全性について、個別に許可を受ける。疾病低減表示を行うことができる。
- ② 栄養機能食品：栄養素の補給のために使用される食品で、規格基準に従っている場合は個別の許可は不要である。栄養機能表示を行うことができる。

それ以外のいわゆる健康食品については、疾病低減表示を行うことができないのはもとより、健康保持増進効果等について虚偽誇大広告を行うことが禁止されている。

なお、同じ植物由来でも漢方薬成分等については医薬品として扱われる。

以下にいくつかの機能性および健康増進効果を高めた GM 食品の例について、食品としての取り扱いの検討を試みた。

1) 医薬品としての効能を付与した GM 食品

例えば花粉症緩和米¹²のように、医薬品としての効能を有する成分を導入した GM 食品は、その成分が医薬品に当たると考えられ、食品としてではなく、医薬品として扱われる。その場合は、通常の食品と同じ形態をしてはいるが、医薬品として、薬事法の下で、有効性、安全性の確認はもとより、その他の医薬品に適用される諸規制を受けた上で、用法、用量も明確に規定されて販売される。

2) 医薬品成分を導入していないが健康増進効果を付与するように改変された GM 食品

例えば高オレイン酸ダイズのケースを考える。オレイン酸は、悪玉コレステロールを下げる効果があるとされている。高オレイン酸ダイズを、このような保健の用途を表示して販売しようとする場合は、特定保健用食品として個別の許可を受けなければならない。特定保健用食品として許可を受けるためには、関与成分の疾病低減効果が医学的・栄養学的に確立されていることが必要であり、有効性・安全性に関する科学的データの提出が必要である。なお、特定保健用食品では1日当たりの摂取目安量や摂取方法、摂取をする上での注意事項等を表示することが義務付けられている。

疾病リスク低減効果を標榜せずに販売する場合には、通常の GM 食品としての表示義務 (特定遺伝子組換え農作物としての表示を含む) の範囲で処理されるものと考えられる。

3) 特定の栄養成分を加えた GM 食品

ゴールデンライス¹³がこのカテゴリーに含まれる。ゴールデンライスをわが国で販売しようとする場合、ビタミンAによる疾病低減効果を標榜して販売しようとする場合は、やはり特定保健用食品としての個別許可を受ける必要がある。

一方、疾病リスク低減効果を標榜せずに販売する場合は、ゴールデンライスの場合は特定遺伝子組換え農作物として、「高ビタミンAイネ」等の表示が義務付けられるものと考えられる。

なお、ゴールデンライスは、栄養素補給のための食品ということもできるが、上記の栄養機能食品からは生鮮食品は除外されているため、栄養機

能食品として栄養機能表示を行うことはできない。一方、ビタミンAについて栄養成分表示により、「補給ができる」旨の表示ができる可能性はある。

なお、保健機能食品以外の「いわゆる健康食品」に対しては、一日当たりの摂取目安量、摂取の方法、摂取をする上での注意事項、バランスの取れた食生活の普及啓発を図る文言を表示するよう、指針が出されている¹⁴。

4. パンフレットの検討

以上にみたように、今後わが国で機能性を高めたGM食品が開発された場合には、特定保健用食品として個別の許可を受けるか、あるいは「いわゆる健康食品」として流通するかのいずれかになると考えられる。

わが国での高リシントウモロコシの評価事例およびコーデックスの指針案を見る限り、このような機能性を高めたGM食品の安全性評価では、意図的に高めた成分およびそれに関連して含量が高まった成分についても評価が行われている。これまでに評価されたものについては、摂取量について注意喚起する必要性はなかったが、今後は摂取量について注意喚起する必要性が生じるものも出てくる可能性があり、そのようなものは「いわゆる健康食品」ではなく、「特定保健用食品」として、1日当たりの摂取目安量や摂取方法、摂取をする上での注意事項等の義務表示もつけて流通するようになるものと予想される。

このような予想に基づいて、機能性を高めた遺伝子組換え食品もカバーするように、厚生労働省の現在のパンフレット「遺伝子組換え食品の安全性について」の改定案を作成した。

現在のパンフレットの構成を以下に示す。

- ①遺伝子組換えとはどんなものですか（技術の説明）
- ②遺伝子組換え食品にはどんなものがありますか（製品の説明）
- ③わが国ではどのように安全性のチェックをしているのですか（仕組み、チェックポイント、輸入時の検査）
- ④遺伝子組換え食品を食べても大丈夫ですか（Q&A）
- ⑤食品を買うときに遺伝子組換え食品を見分けることはできますか（表示）

機能性を高めたGM食品についての言及は、現在のパンフレットの②から⑤の項目に入れ込むことができる。しかし、機能性を高めたGM食品が主力

ではない現時点では、そのような改定は複雑になりすぎ、読者にもわかりにくいものとなると考えられる。そのため、①から⑤はそのままにして、⑥として「遺伝子組換えによって機能性を高めた食品とは？」という項目を加えて対処することとした。また、内容としては、機能性を高めたGM食品についての説明、このようなGM食品の安全性評価の説明とともに、リスク・コミュニケーションの観点から最も重要な、「表示を良く見て、摂取量・摂取方法を守って摂取すること」を記述することとした。

その文例を別添に示す。

D. 考察

本研究では機能性成分を高めたり健康増進効果を高めたGM食品について、安全性評価事例、コーデックスによる安全性評価指針案、およびわが国における機能性食品に対する規制制度の検討を行い、その結果に基づいて、厚生労働省の「遺伝子組換え食品の安全性について」を機能性を高めた遺伝子組換え食品もカバーするように改定する案を作成した。

現時点においては、まだ機能性を高めたGM食品の評価事例が少ないため、現時点でパンフレットの改定案を作成することには、おのずと限界がある。しかし、農林水産省がそのようなGM農作物の開発に積極的に乗り出していること、また欧州での研究ではあるが、消費者にメリットのあるGM食品に対しては、消費者の購買意欲が高まる可能性が示唆されていることから¹⁵、そのようなGM食品に関するリスク・コミュニケーションについてあらかじめ検討しておくことが必要であると考えられる。わが国における健康食品ブームを見ると、GM食品であっても消費者が過度に期待して、過剰摂取により問題を生じる可能性もないとはいえないと考えられる。そのため、安全性評価においても、リスク・コミュニケーションにおいても、コーデックスのタスク・フォースが記しているように、「栄養または健康増進のために改変した組換えDNA植物に由来する食品は、一部の人には大変有益なものである可能性がある一方で、一部の人にはリスクをもたらす可能性のあるものである」ということを踏まえることが重要となる。

本研究ではこの点を踏まえて従来のパンフレットに「遺伝子組換えによって機能性を高めた食品とは？」という項目を加えて、この点についてのコミュニケーションに役立てることを検討した。

現時点における検討は、まだ事例も少なく、不確実な点が多い段階での検討である。しかし、今後、この分野の研究が積極化する前に、機能性食品を対象とした規制制度との関連も含めて、どの

ような GM 食品がどのような規制の対象となり、どのような義務付けが行われるのか、また安全性確保の観点から新たな対応が必要となる場合がありうるのか、といった検討も必要になるものと考えられる。このためにも、開発側である農林水産省の担当部局や、健康食品や食品表示の担当部局との早期の連携が重要になるものと考えられる。消費者メリットのある有用な GM 食品が開発された時点で、消費者の疑問に答え、安全を確保するための十分な体制と情報整備ができていくことがリスク・コミュニケーションのためにも最も重要なことであろう。

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

なし

1. 特許所得

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 文献

¹ : 安全性審査の経たされた遺伝子組換え食品及び添加物一覧

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/list.html>)

² : http://www.s.affrc.go.jp/docs/committee/gm/last_summary/pdf/summary.pdf

³ : <http://www.codexalimentarius.net/download/report/693/al31-34e.pdf>

⁴ : <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/hokenkinou/index.html>

⁵ : <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

⁶ : <http://www.foodstandards.gov.au/standardsdevelopment/applications/applicationa387foodd937.cfm>

⁷ : http://www.maff.go.jp/j/jas/hyoji/pdf/kijun_03.pdf

⁸ : <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/bnfm087.html>,
http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/gmf-agm/appro/nf-an129decdoc_e.html

⁹ : <http://www.fsc.go.jp/hyouka/hy/hy-tuuchi-foodly038-171209.pdf>

¹⁰ : Food standards Australia New Zealand: Final Assessment Report. Application A549. Food derived from high lysine corn LY038. 8-06. 13 December 2006.

¹¹ : http://www.codexalimentarius.net/download/report/653/al29_34e.pdf

¹² : <http://www.nias.affrc.go.jp/gmo/simple.html>

¹³ : <http://www.goldenrice.org/>

¹⁴ : 厚生労働省医薬食品局食品安全部長：「いわゆる健康食品」の摂取量及び摂取方法等の表示に関する指針について。食案発第 0228001 号。平成 17 年 2 月 28 日

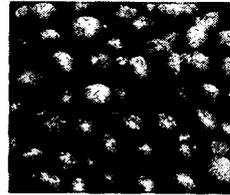
¹⁵ : Mills S. et al.(2006) Attitudes towards genetically modified food with a specific consumer benefit in food allergic consumers and non-food allergic consumers. Journal of Risk Research, 9, 801-813.

遺伝子組換えによって 機能性を高めた食品とは？

遺伝子組換えによって機能性を高めた食品が作られています

高オレイン酸ダイズ

オレイン酸は悪玉コレステロールだけを減らします。



ビタミンA含量を高めたおコメ

ビタミンAが不足すると視覚障害がおきます



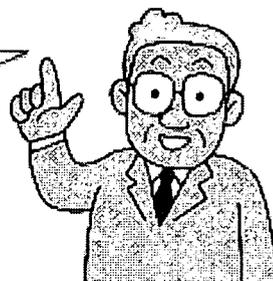
このような食品は、一般の人の健康維持や、栄養欠損のある人の病気を減らす等の効果を持つことが期待されています。

安全性はどのように調べていますか？

安全性のチェックの仕方は基本的に通常のGM食品と同じです (p.6-9を見てください)。

ただし、機能性を高めた食品の場合は、摂取量によってはかえって健康に害となる場合がありますので、この点も詳しく調べて安全性のチェックをしています。

多すぎては
いけないんだよ
「過ぎたるは及ばざるが
ごとし」ってね



食べても大丈夫ですか？

もちろん、安全性のチェックを受けたものは食べても大丈夫です。

ただし、健康食品と同じように、食べ方には注意が必要です。



健康食品の食べ方は？

国が機能性を高めた食品として認める食品(保健機能食品)には様々な表示や注意書きがあります。

それ以外の健康食品についても、摂取量や摂取方法等の表示に関する指針が定められています。



パッケージ表示例

特定保健用食品

商品名〇〇〇

名称:

原材料名:

賞味期限:

内容量:

許可表示:

栄養成分表示

1日あたりの摂取目安量:

摂取方法:

摂取する上での注意事項:

調理又は保存の方法:

製造者:

「食生活は、主食、主菜、副菜を基本に、食事のバランスを。」



機能性を高めた食品は、
表示を良く見て、摂取量・摂取方法を
守って食べることが重要です

健康食品に関する詳しい情報はホームページをご覧ください。

(<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/hokenkinou/index.html>)

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究

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：平成 19 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、遺伝子組換えニワトリに導入される外来遺伝子を標的とした検出系の開発を行った。検出する外来遺伝子には、ニワトリ胚性幹（ES）細胞の選抜に利用されるピューロマイシン耐性遺伝子（*Puro^r*）とレポーター遺伝子として利用される緑色蛍光蛋白質遺伝子（*EGFP*）を選択した。まず遺伝子導入 ES 細胞から抽出したゲノムをもちいて PCR による各種遺伝子の検出条件の検討を行った。次に確立した検出条件をもとに、遺伝子組換えニワトリ胚を用いた検出実験を行い、いずれの遺伝子も検出可能であることを確認した。さらに胚生殖線から得たゲノムを用いて *EGFP* の検出を行ったところ非特異的な増幅が複数検出されることがわかった。そこで nested PCR を組み合わせた検出系を導入したところ、極めて明瞭に外来遺伝子が組込まれた個体を検出できることがわかった。

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 助教）

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、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。また平成 19 年度の CODEX 委員会では、「組換え DNA 動物由来食品の安全性評価ガイドライン」に関し、抗生物質耐性マーカー遺伝子の利用は禁止する提言が成されており、これに対応した安全性と検出系の評価方法の確立が必要である。そこで本研究では、魚類の次ぎに遺伝子改変技術により、食品・医薬品市場を睨んだ広範な商品開発が予想されるニワトリにおいて、それらの産物の安全性評価及び検出系を構築することを目的とし、本年度は遺伝子組換え動物に導入される外来遺伝子検出系の構築を行った。

B. 研究方法と結果

1) 遺伝子導入 ES 細胞の選抜

ニワトリ ES 細胞に対して pCAGIpuro ベクター（ベクター内にニワトリ β アクチンプロモーターで制御される *EGFP* 遺伝子と *Puro^r* 遺伝子を持つ、

図1-1) をエレクトロポレーション法により導入後、ピューロマイシンにより選抜し安定的に外来遺伝子が導入されたES細胞を作出した(図1-2)。次に選抜したES細胞を受精卵胚(レシピエント胚)に移植し、移植した受精卵を孵卵することにより、移植したES細胞のレシピエント胚内での種々の組織への分化を誘導した。その結果、レシピエント胚の至るところでモザイク状にEGFPの発現が観察された(図1-3)。そこでこの遺伝子導入ES細胞並びにキメラ胚(遺伝子導入ES細胞とレシピエント胚の細胞のキメラ)を用いて以下の実験に供試した。

2) 遺伝子導入ES細胞を用いた外来遺伝子検出条件の検討

遺伝子導入ES細胞から抽出したゲノムをもちいたゲノムPCRにより、ES細胞に導入されたEGFP遺伝子とPuro^r遺伝子の検出条件の検討を行った。

EGFP遺伝子の検出には、図2に示したプライマー及び条件によりゲノムPCRを行い、遺伝子導入ES細胞から得られたゲノムのみからEGFP遺伝子が検出できることがわかった(図3-1)。次に鋳型に使用するゲノムの検出量を調べるために、10倍段階希釈したゲノムを鋳型にしたゲノムPCRを実施した。その結果、図3-2に示したように、EGFP遺伝子は $1.25 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ (12.5 pg) のゲノム量まで検出可能であることがわかった。

Puro^r遺伝子の検出には、Puro^r遺伝子がGCリッチな配列(GCの占める割合が74%)であることを考慮し、複数種のDNA polymeraseを用いてゲノムPCRを行った。その結果、図4に示したようにPuro^r遺伝子を増幅することが可能なものが2種存在することがわかった。しかしいずれのDNA polymeraseも初期条件では、非特異的なバンドが

多く検出されたことから、DNA polymerase (B)を用いて検出系の最適化を行った。その結果、図5に示したようにアニーリング温度とサイクル数を変更することによって、非特異的なバンドが出現しない条件を決定することができた。次に鋳型に使用するゲノムの検出量を調べるために、10倍段階希釈したゲノムを鋳型にしたゲノムPCRを実施した。その結果、図6に示したように、Puro^r遺伝子は $1.25 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ (12.5 ng) のゲノム量まで検出可能であることがわかった。

3) キメラ胚ゲノムを用いた外来遺伝子の検出

2) で決定したゲノムPCRの条件で実際にモザイク状に導入されたES細胞由来外来遺伝子の検出が可能であるかどうか、キメラ胚ゲノムを用いた外来遺伝子の検出を試みた。1) で作出したキメラ胚からゲノムを抽出し、ゲノムPCRを行ったところ、2) で決定した条件によってEGFP遺伝子とPuro^r遺伝子ともにキメラ胚のみで特異的に検出できることがわかった(図7)。

4) キメラ胚組織ゲノムを用いた外来遺伝子の検出

遺伝子組換えニワトリから実際に外来遺伝子を検出する場合、種々の組織から抽出されたゲノムを鋳型にして外来遺伝子を検出することが必要となる。そこで本研究ではその予備検討実験として、キメラ胚から回収した生殖腺組織ならびに各種可食組織及びキメラ雛から回収した同組織を用いて、2) で決定したゲノムPCRの条件で外来遺伝子の検出を試みた。その結果、キメラ胚生殖腺ゲノムを用いたPCRでは、図8上に示したようにEGFP遺伝子の検出において、非特異的なスミアなバンドが多く検出された。そこで一次PCR

産物を鋳型とした nested PCR を実施したところ、非特異的な増幅のないクリアな *EGFP* 遺伝子の増幅バンドが検出できることがわかった (図 8 下)。次にキメラ雛組織ゲノム (A) もしくはキメラ胚組織 (B と C) を用いて外来遺伝子の検出を試みた。検出組織には、可食部位である表皮、腸、筋肉、胃、肝臓、心臓を用い、ゲノム抽出前に各組織の重量を測定した (表 1)。これらの組織から抽出したゲノムを用いて、*EGFP* 遺伝子の検出を行ったところ、各組織で *EGFP* 遺伝子の増幅を示すバンドが検出された (図 9-1)。次に *EGFP* 遺伝子が検出された組織からランダムにいくつかを選択し、*Puro^r* 遺伝子の検出を行ったところ、すべての組織で *Puro^r* 遺伝子が検出されることがわかった。

(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 (承認番号 D07-19) 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から外来遺伝子を検出するため

の条件検討試験を実施した。

遺伝子導入 ES 細胞ゲノムを用いた条件検討では、ES 細胞に導入された *EGFP* 遺伝子と *Puro^r* 遺伝子の両方を特異的に検出する条件を決定することができたが、*Puro^r* 遺伝子の検出条件では検出限界が鋳型ゲノムの重量で $1.25 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ と感度が *EGFP* 遺伝子の検出感度 ($1.25 \times 10^{-5} \mu\text{g}$) と比較して低いことがわかった。この点は今後さらに検出条件の再検討や nested PCR の導入など検出感度を高める方法を検討しなければならない。

遺伝子組換えニワトリから実際に外来遺伝子を検出する場合、種々の組織から抽出されたゲノムを鋳型にして外来遺伝子を検出することが必要である。本研究では、その予備検討試験として、キメラ胚や雛から抽出した組織ゲノムを標的とした外来遺伝子の検出を試みた。その結果、胚生殖腺ゲノムを用いた *EGFP* 遺伝子の検出では、非特異的なバンドが多く検出されてしまった。これは選抜が終了した遺伝子導入 ES 細胞とは異なり、キメラ組織では遺伝子導入 ES 細胞由来細胞の組織内に占める割合が個体によりばらつきがある (モザイク状) ためと考えられた。実際に本条件を適応させる遺伝子組換えニワトリでは、モザイク状とはならずほぼ全ての細胞に外来遺伝子が組込まれているため検出には問題ないとも予想されるが、より正確に組換え体と非組換え体組織を区別できるように、nested PCR を実施した。その結果、非特異的な増幅がない検出が可能となった。この手法は、検出感度を上昇させる意味でも、極めて有効な方法であり、他の外来遺伝子の検出でも有効となることが示唆された。しかし、nested PCR の欠点として、2 回の PCR が必要であり検出までに時間がかかってしまう。今後は検出感度を維持または上昇させた条件下で検出までの時間を短縮させ

た手法（例えば real time PCR など）の検討が必要であると考えられた。

D. 結論

平成19年度では、遺伝子組換えニワトリから簡便に外来遺伝子を検出するための条件検討試験を行い、計画したほぼすべての内容を実施期間中に終了させた。今後は考察で述べたいくつかの問題点を解決するとともに、実際に誕生させた遺伝子組換えニワトリの可食組織を用いて本検出系の適応を計ることを計画している。また同班研究員と協力して外来遺伝子導入によるこれらの組織における遺伝的・蛋白的およびアレルゲンの変異などの実際に食品として安全性に着目した点での評価を行う。

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

1) 横山聡美, 秋田幸子, 西本真樹 他, ニワトリ Nanog 様遺伝子 (*Sachi-1*) の同定と発現解析。第30回日本分子生物学会年会, 平成19年12月11-15日, パシフィコ横浜 (横浜市)

2) 中野幹治, 西本真樹, 鎌田綾 他, 新規ニワトリ胚性幹細胞株の樹立とその特徴。第30回日本分子生物学会年会, 平成19年12月11-15日, パシフィコ横浜 (横浜市)

3) 西本真樹, 田村篤彦, 中野幹治 他, 新規ニ

ワトリ ES 細胞株群の分子生物学的特徴と多能性評価。第30回日本分子生物学会年会, 平成19年12月11-15日, パシフィコ横浜 (横浜市)

4) 有澤謙二郎, 中野幹治, 田村篤彦 他, ニワトリ ES 細胞株への GFP 遺伝子の導入、およびキメラ胚による多能性の評価。第30回日本分子生物学会年会, 平成19年12月11-15日, パシフィコ横浜 (横浜市)

5) 山下裕輔, 堀内浩幸, 中野幹治 他, ニワトリ ES 細胞の多能性維持における LIF シグナルの役割。第30回日本分子生物学会年会, 平成19年12月11-15日, パシフィコ横浜 (横浜市)

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

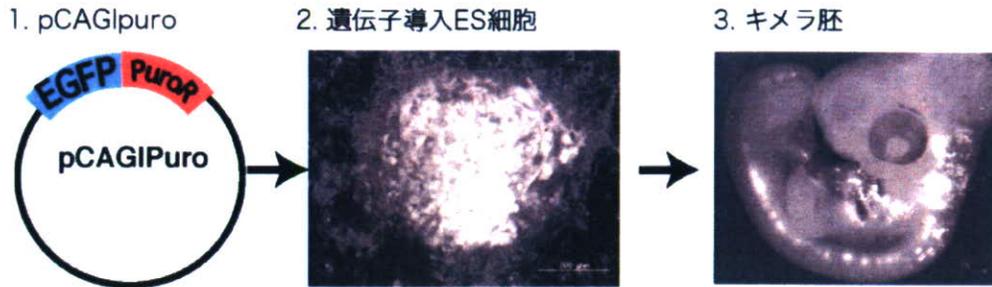


図1 遺伝子導入ES細胞の選抜からキメラ胚の作出

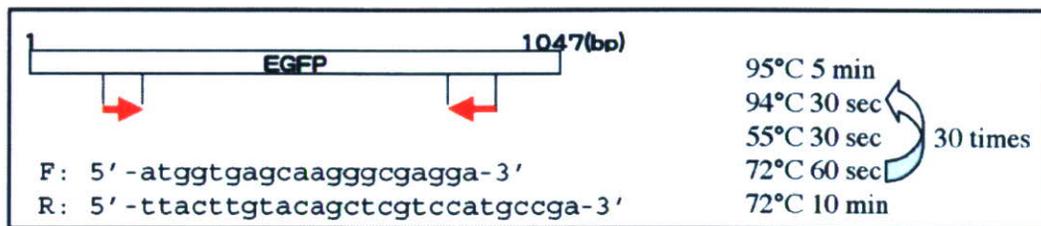


図2 EGFP遺伝子検出のためのPCRプライマーと条件



図3 遺伝子導入ES細胞を用いたEGFP遺伝子検出