

200837004A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

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

平成20年度 総括・分担研究報告書

(H18-食品-004)

研究代表者 西島 正弘

平成21年3月

# 目次

## I. 総括研究報告書

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 西島 正弘	1
---------------------------------------	---

## II. 分担研究報告書

1. 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議論 組換え微生物の国際動向、安全性に関する研究 遺伝子組換え魚文献検索に関する研究 モダンバイオテクノロジー応用食品の国民への普及啓発媒体や方法の検討 遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究 薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究 西島正弘	8
2. 遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究 (1) ~ (3) 小関 良宏	70
3. 遺伝子組換え体の検知技術の開発に関する調査研究 穂山 浩	82
4. 遺伝子組換え体のアレルギー性評価に関する調査研究 手島 玲子	98

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	121
---------------------	-----

厚生労働科学研究費（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
総括研究報告書

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

研究代表者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

モダンバ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、3分担研究者を中心として、16機関にわたる研究グループを組織した。1)モダン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、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、各種動向調査研究（組換え魚、組換え微生物、組換え薬用植物等の動向調査）、ならびに、組換え魚、組換え微生物、組換え動物の安全性研究に資するためのモデル組換え体の開発、安全性評価へのポストゲノム手法の導入の検討、アレルギー性試験の実践的研究を行った。さらに、未承認組換え食品の検知に関する試験法の検討を行うとともに、リスクコミュニケーションに関する調査研究を行った。

研究分担者

小関良宏 東京農工大学工学部教授  
手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所  
代謝生化学部部長  
樋山浩 国立医薬品食品衛生研究所  
代謝生化学部室長

B. 研究方法

モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性評価のためのポストゲノム手法を用いる非意図的生成物の解析のための研究を小関班員、安全性確保に有用な試験方法の確立のための遺伝子組換え体の検知に関する研究を樋山班員、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が慶応大学商学部で、コーデックスの国際動向に関する調査、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する調査研究が厚生労働省食品安全部並びに国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部で、遺伝子組換え魚、遺伝子組換え薬用植物に関する文献調査が独立行政法人水産総合研究センターさけます研究部並びに独立行政法人医薬基盤研究所薬用

A. 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、第一世代のバイオテクノロジーを応用した食品の安全性に加え、第二世代のモダン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、当該食品並びに未承認組換え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。

植物資源研究センター筑波研究部で、遺伝子組換え動物の開発並びに調査研究が広島大学生物園科学研究科で行われ、主任研究者がとりまとめを行った。

## C. 結果およびD. 考察

### リスクコミュニケーションに関する調査研究:

本年度は、モダンバイオテクノロジー応用食品の研究成果を、広く国民に普及するための啓発媒体や啓発方法をコミュニケーション研究の視点から検討を行った。具体的には、研究成果の普及のためのわかりやすい資料とコミュニケーション技法について要点をまとめた。また、現在ある資料を分析して、よりよい表現にはどのようなものがあるのかを明らかにした。

モダンバイオテクノロジーに特化したコミュニケーション技法の検討はまだ十分ではないが、使用されている用語の使い方などに、問題があることが見いだせた。今後は、簡単な用語解説集の作成などが必要であると考えられた。また、図が多用されている資料が多かったが、項目の配置にもヒトの目の動きに配慮することが必要であると考えられた。

### コーデックスの国際動向に関する調査、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する調査研究:

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。2008年6月に開かれたコーデックス総会で、協力研究者の吉倉を議長として2007年9月24日から28日にかけて千葉の幕張メッセで開催されたコーデックスにおける組換え食品に関するタスクフォース(TFFBT)で議論された3つの指針が採択された。すなわち、組換え動物評価指

針、栄養改変植物評価指針、低レベルで存在する未承認組換え植物評価指針の3つの指針である。

「組換え動物」は倫理問題、「栄養改変」は議論が紛糾するコーデックス栄養部会との関係、「低レベル混入」は特に貿易に関わり、何れも非常に紛糾が予想される議題であったが、合意に至ることができた。なお、低レベル混入のリスク評価指針の適用は、即ち、どのレベルをもって低レベルとするかの判断は各国の判断に任されており、この指針の適用をリスク評価者が決めるのか、リスク管理者が決めるのかと云う問題が各国の判断に任される事になると思われる。

議論の残っている組換えワクチンについてもコーデックスでの議論が必要との意見があるが、OIE(国際獣疫事務局)が既にこの作業をしているので、今後のコーデックスでの議論を簡単にするのではないかとと思われる。OIEは動物の食品としての安全性は原則として取り扱わないが、「動物の健康状態」が「組み換え動物」指針で大きな位置を占めるので、補完的な解釈が可能ではないかと考えられる。

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検討を試みた。組換え微生物に関する国際的な議論では、組換え微生物を利用した食品の安全性を評価する上で、微生物において特に重要と思われる項目として、腸内菌叢に対する影響、組換え遺伝子の移行、ヒトや動物の免疫系への影響などがある。本年度は、モデル乳酸菌組換え体を用いて、実験動物における免疫系への影響を調べる評価系につき検討した。遺伝子産物である当該タンパク質の量が同じ場合、遺伝子組換えにより乳酸菌に組み込み発現させた場合と、乳酸菌と精製した当該タンパク質

を単純に混和した場合に於いて、その免疫誘導は異なり、細胞性免疫の誘導で、前者が相乗的に高い効果を示すことが明かとなった。これまで、組換え体の安全性評価では、宿主の性質に加えて、遺伝子組換えによりあらたに発現したタンパク質は、一般的には相加的に働くであろうという立場で安全性を評価してきた。本年度の研究により、遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、異種タンパク質の発現により乳酸菌がもつ炎症性サイトカイン産生を誘導する作用が低下したこと、その現象が異種タンパク質の間接的な働きによってもたらされたことが明らかとなった。組換え微生物の安全性評価に於いては、このような点を考慮する必要があると思われる。

#### 遺伝子組換え魚に関する文献調査：

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。これまで最初に市場に出回る遺伝子組換え動物は魚類であると言われていたが、実際に市場に出回ることにはなかった。しかし、2008年9月にアメリカのFDAが遺伝子組換え動物の利用に関する規制指針のパブリックコメントを求めることを公表し、2009年1月に最終指針が発表された。遺伝子組換え大西洋サケを生産している会社は早速これに反応し、2009年第4四半期には遺伝子組換え大西洋サケが市場に出ることを期待している。一方、新しい遺伝子組換え技術を用いた利用方法として、遺伝子組換え魚類を作出するのではなく、餌となる生物に魚類成長ホルモンを発現するようにした遺伝子組換え藻類を作出し、それを間接的に与えることによって、結果的に魚類の成長を促進できた論文が報告された。FDAが遺伝子組換え魚類の食用としての利用を許可するか不明であるが、この動きは今までアメリカの動向を探っていた中国にも影響を

与え、すでに実用化されているコイなどで遺伝子組換え魚類の生産が開始されることが考えられる。日本にすぐこれらの遺伝子組換え魚類が食品として輸出されることはないと思うが、事故等で紛れ込むことは十分考えられ、遺伝子組換え魚類に対する対応が求められる。

#### 薬用遺伝子組換え植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究：

薬用遺伝子組換え (GM) 植物の範囲を、GM植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用及び環境浄化用 GM 植物に関する情報を、文献データベース (Entrez PubMed、Chemical Abstracts)、インターネット検索 (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し分類した。2008年に米国で認可された薬用及び環境浄化用 GM 植物野外栽培面積は、2650.5 エーカーで、イネ、ペニバナ、トウモロコシの作付けが行われた。2007年の認可面積は811.08 エーカーであり、2008年は対前年度 327%であった。2008-2009年1月末に公表・出版された論文等73件をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：13件、経口ワクチン：14件、食用医薬：3件、ワクチン抗原：10件、抗体医薬：8件、治療薬：13件、診断薬・試薬：2件、環境浄化：10件であり、薬用及び環境浄化用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品・嗜好品および経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、国別の件数では、米国：28件、日本：18件に次ぎ、中国：5件、韓国：4件であった。遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究：

平成20年度は、遺伝子改変 (GM) ニワトリを

実験モデルとして、ポストゲノム手法による安全性評価（小関良宏研究員・分担）、アレルギー試験（手島玲子研究員・分担）及び平成19年度にニワトリ胚で実施した外来遺伝子検出系を実際の可食組織に適応させ、簡易検出系の評価試験を行った。検出する外来遺伝子には、ニワトリ胚性幹（ES）細胞の選抜に利用するピュロマイシン耐性遺伝子（*Puro<sup>r</sup>*）とレポーター遺伝子として利用する緑色蛍光蛋白質遺伝子（*EGFP*）を選択した。遺伝子導入ES細胞からGMニワトリを作出後、可食部位である肝臓、胃、筋肉、表皮を採取し、一部は研究分担者へ供与し、各種実験に供試していただいた。また本研究では同組織からゲノム抽出を行い、昨年度実施した方法を一部改変して外来遺伝子の検出を行った。その結果、*EGFP* は first PCR から目的の遺伝子が検出されたが、*Puro<sup>r</sup>* は検出のためには nested PCR（2回のPCRの操作が必要）が必要であることがわかった。次に煩雑なゲノム抽出の操作なしに目的の外来遺伝子を検出する（簡易法）方法の開発を行い、S社のPCR緩衝液とN社のDNA polymeraseを組み合わせることで、非常に少量の組織溶解液もしくは組織そのものを用いて、2つの外来遺伝子が first PCR で検出できることがわかった。この手法は、実際の検疫などの現場で非常に有効な手法となることが期待される。

#### 遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究：

##### (1) 遺伝子組換え体のトランスクリプトーム解析手法の検討

現在実用化されている遺伝子組換え食品は農作物が主であるが、最近では組換え畜産物についての研究もなされており、これらが実用化されるのも目前に迫っているため、それらについての安

全性評価方法の検討が必要である。中でも遺伝子組換えニワトリは鶏卵のアレルギー低減や、鶏卵を用いたワクチンの産生のための遺伝子組換えについて研究がなされており、近い将来それら遺伝子組換え動物が数多く作出され広く用いられると目される。そこで、本研究では遺伝子組換え動物のモデルとして、緑色蛍光タンパク質(GFP)を導入した遺伝子組換えニワトリを材料として、プロテオーム及びメタボローム解析による遺伝子発現の分析の可能性を検討するために、その第一段階にあたるトランスクリプトーム解析についての検討を行い安全性評価の可能性を探った。ニワトリ個体より通常の方法により各組織を切り分け凍結したサンプルから RNA 抽出を行ったところ RNA の分解が認められた。このことから屠殺後、流通に回った可食部からはトランスクリプトーム解析に用いることができる品質の RNA が得られないことが明らかになった。しかし、材料採取の際に時間をおかず直ちに急速冷凍したサンプルを用いることで、マイクロアレイに供する純度の RNA が抽出できることが分かった。遺伝子組換えニワトリと非組換えニワトリの筋肉・胃・肝臓とを用いた遺伝子発現解析の結果、遺伝子組換え体と非組換え体において各組織間の発現プロファイルに顕著な差は認められず、遺伝子組換えによって遺伝子発現が大きく異なる可能性は低いことが示された。

##### (2) 遺伝子組換え体のプロテオーム解析手法の検討

今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とし、本年度は遺伝子組換え動物のモデルとして、発光クラゲ蛍光

タンパク質(EGFP)遺伝子を導入した遺伝子組換えニワトリを用いて、非遺伝子組換え体との発現タンパク質の違いをプロテオーム解析により比較検討した。その結果、発現タンパク質の個体差が非常に大きく、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体の発現タンパク質の特異的な変化は検出できなかった。

### (3) 遺伝子組換え体のメタボローム解析手法の検討

遺伝子組換えによってニワトリ肉の栄養素の増減、あるいは有害成分蓄積などを判別するための基礎データ取得を目指して、遺伝子組換えと非組換えニワトリ肉の組織中の非タンパク性成分(代謝成分)の総和(メタボローム)をメタボロミクスによって比較・検討した。本研究では、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置(FT-ICR/MS)による高分解能マスマスペクトル測定、およびLC-Linear-Trap-TOF/MSの2種類の質量分析(2種の溶媒、正・負それぞれのイオンモード)によって鶏肉部位別のメタボローム解析を行った。FT-ICR/MS法では、試料抽出物に含まれる成分を未精製のまま一斉分析することが出来るため、食品の安全性評価のためのメタボローム情報を迅速に取得することが可能である。また、FT-ICR/MSによる迅速なメタボローム評価は、LC-Linear-Trap-TOF/MSによって再確認するスキームを採用した。

平成20年度は、FT-ICR/MSを用いた鶏肉成分比較のためのメタボローム解析に着手し、代謝成分抽出法、エレクトロスプレーイオン化(ESI)法によるFT-ICR/MS分析、マスマスペクトルデータ(質量数と各ピーク強度)の高速処理と多変量解析の実験系を整備した。分析には、遺伝子組換えニワトリ肉(GM)と非組換えニワトリ肉(nonGM)を供試し、両サンプルのメタボロームをFT-ICR/MSにおけるESI陰イオンモ

ードおよび陽イオンモードで比較した。GMとnonGMの筋肉組織中の低分子成分組成を主成分分析によって解析したところ、陰イオンモードおよび陽イオンモードともに顕著に異なるメタボロームクラスターは形成されなかった。一方、表皮組織抽出液の分析では、明らかなメタボロームの相違が見られ、その差は脂質組成の差に由来することがわかった。

今回の分析条件下で、GMとnonGMの間には、代謝成分に明確な差異が認められることが明らかになった。供試試料の由来、操作された遺伝子に関する情報は無いので、代謝成分の変化が遺伝子操作とどのような関連性を持つかは不明である。以上、FT-ICR/MS分析、LC-Linear-Trap-TOF/MS分析、とメタボローム解析によって、GMニワトリ肉の低分子成分組成の迅速な比較が可能であった。今後、個体間の差や加齢などの情報を加味した実験計画も必要と思われる。

### 組換え食品の検知法に関する研究：

未承認組換え食品の検知法の開発を主体に多様な遺伝子組換え食品の検知技術の開発を行い、検知技術の応用性、適用性について検討を行うために、以下の4項目につき研究を行った。

(1) リアルタイムPCRアレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発  
リアルタイムPCRアレイ分析の結果として得られる遺伝子組換え(GM)農作物に共通性が高い組換えDNAセグメント及び承認GM系統特異的検出の結果に加え、承認GM系統が有する組換えDNAセグメントの情報を総合的に判断することで、未承認GM農作物の混入が推定可能であることを見出した。また、リアルタイムPCRアレイの分析結果を入力するだけでこの推定プロセスを簡便に実施可能なソフトウェアを開発した。

(2) 赤トウガラシのDNA抽出方法・精製及び検知法

## の検討

未承認 GM 赤唐辛子のための DNA 抽出精製法として、Genomic-tip 20/G を用いた方法及び Plant Kit 法について検討を行った。Genomic-tip 20/G を用いた方法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、Plant Kit 法よりも DNA 収量が高く、精製度についても良好な DNA 試料原液を得ることができた。次に市販の乾燥トウガラシの実態調査を行った。トウガラシから種子のみを採取して試料とし Genomic-tip 20/G による抽出精製法で、定性 PCR 及びリアルタイム PCR を用いた定性 PCR に供するための高純度及び高収量の DNA が得られた。いずれの試料においても赤トウガラシ内在性遺伝子は検出された。市場で購入した赤トウガラシ6 検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

### (3).GM 魚の検出法の確立と調査

マダイの魚類検体について 3 種類のキットを用いて DNA 抽出を試行したところ、厚労通知 Genomic tip 20/G 法により収量・精製度ともに良好な結果が得られた。白鮭、銀鮭、アトランティックサーモン、紅鮭、トラウトサーモン、マサバの6 検体を用いて動物(魚類)検知用プライマー対を用いて得られた DNA が PCR 法にて検知可能であるか検討した。並行して成長ホルモン付加型の遺伝子組換え魚の構造特異的配列プライマー対を用いて実態調査を行った。

### (4) 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメの遺伝子解析の検討

未知 Bt 系統混入もち米検体解析中に、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター発現領域を新たに検出している。この領域から、新規検知法開発に必要な同カセットの未知領域を導き出すため、Inverse PCR、Adaptor-Ligation PCR 法を検討した。これと並行して文献情報を収集し、このトリプシンインヒビター近傍領域を予想、プライ

マーを設計をして定性 PCR を実施した。Inverse PCRにて既知領域の上流 135 塩基の検出に成功し、文献情報より設計したプライマーによる定性 PCR にて検出された配列と一致した。

### 組換え食品のアレルギー性に関する研究：

平成 20 年度は、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アレルギー性評価に関する調査研究として、(1)GFP 導入組換えニワトリ筋肉中アレルゲンの抗体結合性を指標にしたアレルゲン性試験、(2)食物アレルギー動物モデルを用いた GFP 導入組換えニワトリのアレルゲン性試験、(3) エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討、(4)アレルゲンデータベース(ADFS)の更新を行った。具体的には、(1) GFP 導入ニワトリと対象ニワトリの筋肉を用いて、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動をアレルゲン特異的抗体並びに鶏肉アレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。主要アレルゲンである chicken serum albumin (69kD)についてポリクローナル抗体との反応性から組換えに伴う量的、質的変動はみられず、鶏肉アレルギー患者血清 IgE と反応するタンパク質も GM, non-GM 間で大きな差はみられなかった。(2)食物アレルギー動物モデル(BALB/c マウス)を用いた、GFP 導入ニワトリのアレルギー性試験では、アレルゲン反応に関与する抗原特異的 IgG1 抗体産生及びアナフィラキシー症状は組換え、非組換えニワトリどちらの筋肉抽出タンパクを経口投与した場合でも差がみられなかったことから、組換えニワトリのアレルギー性は非組換えニワトリの場合と同等であると予想された。また、本実験系で用いたマウスを用いる経口感作の成立過程において、抑制性



T(Treg)細胞が関与している可能性が考えられた。(3)アレルゲン予測の解析法では、(i)既知のアレルゲンとの相同性の比較方法 - 既知のアレルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスとタンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)を考慮したアレルゲンエピトープ予測法の検討を行った。(ii)新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新作業としては、新たに6種のアレルゲンについて線形及びコンフォメーションエピトープ情報を加え、さらに6種の糖自体がエピトープ活性を持つアレルゲンについても情報を加えた。また、ADFSのアレルゲンデータセットをネブラスカ大学AllergenOnline(AOL)のそれと比較し、ADFSのアレルゲンデータをピアレビューを経たAOLのデータに原則統合することとした。さらに、タンパク質の相同性検索ツールのMotif-based法の有用性に関するバリデーションを行った。

## E. 結論

第二世代にあたるモダン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、安全性評価に資するための研究として、GFP導入組換えニワトリを用いて、非意図的影響を知るためのポストゲノム手法並びにアレルギー性に関する安全性評価手法の高度化を図った。また、遺伝子組換え食品の検知については、安全性未審査の遺伝子組換え作物(中国産BT米、赤トウガラシ、サケ等魚類)の定性試験法を開発した。リスクコミュニケーションに関する調査研究では、研究成果の普及のためのわかりやすい資料とコミュニケーション技法について要点をまとめた。さらに、組換え微生物を用いた食品や遺伝子組換え魚、遺

伝子組換え動物、遺伝子組換え薬用植物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。

バイオテクノロジー応用食品については、第一世代遺伝子組換え食品ばかりでなく、第二世代(いわゆるモダンバイオテクノロジー応用)遺伝子組換え食品の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継続するとともに、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。

なお、平成17年度から行なわれた、コーデックスの新バイオテクノロジー応用食品特別部会(TFFBT)で、組換え動物、栄養改変植物のリスク評価、未承認食用組換え植物の微量混入のリスク評価案が平成20年度のコーデックス総会での合意が得られた。これらの評価案の作成にあたり、本研究班は重要な位置付けを持つことができたと思われる。

## F. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

平成 20 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）  
「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」  
分担研究報告書（平成 20 年度）

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議論

研究代表者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

FAO/WHO codex alimentarius の組み換え食品の会議の議論を通じ、合意形成の過程での国際機関間の協調につき検討した。

協力研究者

吉倉 廣（厚生労働省食品安全部企画情報課、  
codex組換え食品タスクフォース議長）

A. 研究目的

バイオテクノロジーの安全性評価に関する国際的議論に貢献し、我が国の組み換え食品の安全性管理に資する事を目的とする。本年度の報告では、2006年9月のcodex組み換え食品タスクフォースの議論と、今後の作業として完全には合意に至っていない組み換えワクチンの問題を扱う。

B. 研究方法

FAO/WHO codex alimentarius、OECD、OIE 関係会議への参加並びに資料検索に依った。

C. 研究結果およびD. 考察

1. FAO/WHO codex alimentarius

2006年のcodexバイオテクノロジータスクフォースで、組み換え動物評価指針、栄養改変植物評価指針、低レベルで存在する未承認組み換え植物評価指針の3つの指針が議論され、何れも議論が尽くされタスクフォースとして採択した。「組み換え動物」は倫理問題、「栄養改変」は議論が紛糾するcodex栄養部会との関係、「低レベル混入」は特に貿易に関わり、何れも非常に紛糾が予想される議題であった。これがほぼ一回の議論で合意に達したのは、作業グループでの効率的な議論と加盟国の指針を完成したいと云う強い意志があった為と考えられる。

特に「低レベル混入」については、輸出側の米国、輸入側のEU、何れの側も（特に関係産業界）regulatory costの面から問題を抱えており、早急にルールが欲しいと考えていた状況がある。又、EUの"co-existence"の導入はこの問

題を避けて通れない状況にした。

2. OECD

「低レベル混入」指針のポイントは、「低レベル混入をリスク管理ではなくリスク評価として捉え、必要な項目についてのみ評価する」と同時に「生産者（国）は組み換え作物の必要なデータを提供する」と言う2つの要素からなっている点である。従って、「低レベル混入」指針の合意には情報提供が必須であった。OECDはBIOTRACK ONLINEの作業の中で加盟国が認可した組み換え穀物にコード番号(unique identifier)を付け、産物に関するコンタクトポイントの情報も含めwebベースのデータベースを提供していた。このシステムは、ほぼcodexで提案した内容そのものであった為、FAOがこのシステムを利用し、webベースのデータベース提供を行う事となった。2つの性質の異なる国際機関の協力として記念すべきものとなる。

3. OIE

OIEは動物の健康に関する国際機関であるが、「組み換え動物」指針で「動物の健康状態」が重要な評価点の一つとなった事等から、animal welfare等の難しい問題の議論をOIEに委ねる事が可能になり、議論の整理が出来た。又、組み換えワクチンについてもcodexでの議論が必要との意見があるが、OIEが既にこの作業をしている事は、今後のcodexでの議論を簡単にするのではないかと思われる。OIEは動物の食品としての安全性は原則として取り扱わないが、「動物の健康状態」が「組み換え動物」指針で大きな位置を占めるので、補完的な解釈が可能ではないかと考えられる。

OIEの組み換えワクチンに関する既存文書は以下の2つ。

1. Draft Guidelines for Veterinary Plasmid DNA Vaccines (Biological Standard

Commission/September 2007)

2. Classification of  
biotechnology-derived vaccines, Release of  
live rDNA products. Chapter 1.1.7 -  
Principles of veterinary vaccine production  
(OIE Terrestrial Manual 2008)

後の方は今後改訂の予定。

尚、OIEには前のcodex議長スロラックが座長  
をしている食品関係のタスクフォースが動き  
始めている。

#### E. 結論

国際的な枠組みの中で、専門性の異なる国際機  
関を上手く利用し、合意形成を図る事は国際合意  
を得る上で重要である。なお、低レベル混入のリ  
スク評価指針の適用は、即ち、どのレベルをもっ  
て低レベルとするかの判断は各国の判断に任せ  
られている。個々の組み換え植物により、摂取量、  
食品としてのリスクも異なることから、低レベル  
は何パーセン以下と云うような取り決めはして  
いない。

しかし、この指針は混入量の判定を各国に任せる、  
つまり、国際的に一定の値を設置しないと云う事  
を推奨したことになり、組み換え食品の表示で議  
論の対象となる表示の閾値の議論にも微妙に影  
響するかも知れない。また、この指針はリスク評  
価指針であり、リスク管理指針ではない。つまり、  
混入の判断は、WTOのTBT協定ではなくSPS協定  
の枠で考える事を提案している点は注目して良  
い。

この指針が総会で採択された場合、この指針の適  
用をリスク評価者が決めるのか、リスク管理者が  
決めるのかと云う問題が各国の判断に任される  
事になる。

#### 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

## 組換え微生物の国際動向、安全性に関する研究

研究代表者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

### 研究要旨

組換え微生物に関する国際的な議論では、組換え微生物を利用した食品の安全性を評価する上で、微生物において特に重要と思われる項目として、腸内菌叢に対する影響、組換え遺伝子の移行、ヒトや動物の免疫系への影響などがある。本年度は、モデル乳酸菌組換え体を用いて、実験動物における免疫系への影響を調べる評価系につき検討した。遺伝子産物である当該タンパク質の量が同じ場合、遺伝子組換えにより乳酸菌に組み込み発現させた場合と、乳酸菌と精製した当該タンパク質を単純に混和した場合に於いて、その免疫誘導は異なり、細胞性免疫の誘導で、前者が相乗的に高い効果を示すことが明らかとなった。これまで、組換え体の安全性評価では、宿主の性質に加えて、遺伝子組換えによりあらたに発現したタンパク質は、一般的には相加的に働くであろうという立場で安全性を評価してきた。本年度の研究により、遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、異種タンパク質の発現により乳酸菌がもつ炎症性サイトカイン産生を誘導する作用が低下したこと、その現象が異種タンパク質の間接的な働きによってもたらされたことが明らかとなった。組換え微生物の安全性評価に於いては、このような点を考慮する必要があると思われる。

### 協力研究者

吉倉 廣（厚生労働省食品安全部企画情報課、

codex組換え食品タスクフォース議長）

五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所室長）

梶川揚申（国立医薬品食品衛生研究所）

### A. 研究目的

遺伝子組換え食品に関する国際的な議論に関する情報収集を行い、組換え体の安全性に関する国際的な動向を掌握すると共に、組換え微生物を利用した食品の安全性を評価する上で、微生物において特に重要と思われる、腸内菌叢に対する影響、組換え遺伝子の移行、ヒトや動物の免疫系への影響について、具体的な安全性評価やその手法を検討し、標準的な評価方法の提供を試みる。

### B. 研究方法

モデル乳酸菌組換え体を用いて、実験動物における免疫系への影響を調べる評価系の開発を検討した。

#### 1. モデル組換え体のバイアビリティ評価

昨年度、モデル組換え体として、サルモネラの外膜タンパク質を組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。宿主の *Lactobacillus casei* ATCC 393 株は、外膜タンパク質抗原 (OmpC) をコードする遺

伝子 *ompC* を組み込んだ pLP401 ベクターを用い、エレクトロポレーション法にて形質転換した。このベクターを用いると、OmpC タンパク質抗原は乳酸菌菌体表層に固定化して発現する。この OmpC 発現組換え菌体のバイアビリティを LIVE/DEAD BacLight Bacterial Counting and Viability Kit を用いて判定した。

#### 2. 食細胞による組換え乳酸菌の取込み

昨年度、OmpC 発現組換え乳酸菌が持つ免疫誘導作用を調べたところ、マウス由来マクロファージ様細胞 RAW264.7 から放出される炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の量が OmpC を発現しない乳酸菌体よりも少なくなることを報告した。TNF- $\alpha$  産生が RAW264.7 細胞表層からの刺激によって誘導されるのか、ファゴソームに取込まれた後の刺激によって誘導されるのかを、ファゴサイトーシスを阻害するサイトカラシン D を添加することによりしらべた。また、RAW264.7 細胞による組換え菌体の取込み効率に差があるかどうかを調べた。FITC ラベルした乳酸菌体を RAW264.7 細胞に取込ませ、FACS 解析により、取込まれた菌体量を経時的に測定した。

#### 3. 細胞壁画分による TNF- $\alpha$ 産生誘導

TNF- $\alpha$  産生誘導に重要な菌体成分が細胞壁に存在するかどうかを調べるために組換え乳酸菌菌体から細胞壁と細胞壁を除去した画分を調製した。

それぞれの菌体成分で RAW264.7 細胞を刺激し、産生された TNF- $\alpha$  産生量を測定した。

## C. 研究結果

### 1. モデル組換え体のバイアビリティー評価

OmpC 発現乳酸菌は、液体培地への接種 8 時間後においては明確な差が見られなかったものの、培養 24 時間後においては、顕著なバイアビリティーの低下が認められた (Fig. 1)。比較対照の OmpC を発現しない乳酸菌体においては、ダメージを受けている菌体は 8 時間後において 0.7%、24 時間後においては 0.1% に留まったのに対し、OmpC 発現菌体では 8 時間後において 1.3%、24 時間後においては 8.3% に上った。

### 2. 貪食細胞による組換え乳酸菌の取込み

培養液中にサイトカラシン D を添加した場合、組換え乳酸菌によって刺激した RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  産生が抑制された (Fig. 2a)。FITC ラベルした OmpC 発現乳酸菌と非発現乳酸菌の RAW264.7 細胞による取込みを経時的に調べた結果、どの時間においても両者の間に差は見られなかった (Fig. 2b)。

### 3. 細胞壁画分による TNF- $\alpha$ 産生誘導

細胞壁と細胞膜を除去した画分でそれぞれ RAW264.7 細胞を刺激した結果、細胞壁で刺激した場合において高い TNF- $\alpha$  産生誘導が見られた (Fig. 3)。また、細胞壁においては OmpC 発現株と非発現株の間で顕著な差がみられたが、細胞壁を除去した画分において明確な差はみられなかった。

## D. 考察

### 1. モデル組換え体のバイアビリティー評価

OmpC の発現によって組換え乳酸菌の細胞膜/壁が損傷を受けることが示唆された。本研究で用いた発現ベクターによる外来遺伝子の発現が、必ずしも宿主菌体に対して有害なものでないことは、これまでの実験データや過去の研究報告でも明らかである。つまり、この OmpC 発現による宿主菌体の傷害は、OmpC 特有の働きによるものであると考えられる。OmpC はサルモネラの外膜タンパク質であり、疎水性を示す。従って、菌体表層へ固定化される際、乳酸菌の細胞膜にも干渉する可能性がある。昨年度の研究報告において菌体表層の OmpC をフローサイトメトリーによって解析したところ、検出されたシグナルは比較的弱いものであった。この結果も、OmpC が乳酸菌体の細胞膜を通過し、完全には菌体の外側まで到達しにくいこ

とを示唆している。おそらく細胞膜近傍に OmpC が蓄積することにより、細胞膜/壁が脆弱になったものと考えられる。

### 2. 貪食細胞による組換え乳酸菌の取込み

RAW264.7 細胞からの TNF- $\alpha$  産生は主にファゴソームに取込まれた乳酸菌からの刺激によるものであることがわかった。そこで、取込まれる乳酸菌体量に差があるかどうかを調べたところ、OmpC 発現の有無に関わらず取込み効率に違いは見られなかった。従って、OmpC 発現による TNF- $\alpha$  産生誘導能の低下は、免疫細胞への取込み効率が低下するためではないことがわかった。従って、取込まれた乳酸菌体ひとつひとつの刺激が OmpC 発現によって弱くなっていると考えられる。

### 3. 細胞壁画分による TNF- $\alpha$ 産生誘導

細胞壁と細胞膜を除去した画分を比較したところ、主に細胞壁に TNF- $\alpha$  誘導能があり、OmpC 発現株と非発現株との差も、細胞壁において見られることが明らかとなった。乳酸菌の細胞壁を構成する分子は免疫担当細胞上の TLR2などを介して免疫応答を誘導することが知られている。OmpC を発現した乳酸菌においてはこれらの免疫刺激作用を司る分子に質的あるいは量的な変化が起こっている可能性がある。1の実験において、OmpC 発現乳酸菌の細胞壁/膜が脆弱化していることもこれに関連があるものと思われる。

## E. 結論

異種遺伝子の導入・発現が乳酸菌本来の免疫原性に与える影響について評価した。今回、異種タンパク質の発現により乳酸菌がもつ炎症性サイトカイン産生を誘導する作用が低下したこと、その現象が異種タンパク質の間接的な働きによってもたらされたことが明らかとなった。これまで、抗原を付加することにより乳酸菌の免疫原性が相加・相乗的に増強されることは知られていたが、低下することは殆ど知られていない。本年度の研究成果は、遺伝子組換え微生物の細胞への反応において、負の変化が生じる場合があることを示したことである。組換え微生物の安全性評価に於いては、このような点を考慮する必要があると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

1. Kim TW, Igimi S, Kajikawa A, Kim HY. Display of heterologous proteins on the surface of *Lactococcus lactis* using the H and W domain of PrtB from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as an anchoring matrix. J Appl Microbiol. 104(6):1636-1643. 2008.
2. Toyota-Hanatani Y., Inoue M., Ekawa T., Ohta H., Igimi S., and Baba E. Importance of the major Fli C antigenic site of *Salmonella* Enteritidis as a subunit vaccine antigen. Vaccine. 26(33):4135-4137. 2008.
3. Kajikawa A., and Igimi S. Reduction of TNF- $\alpha$  inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* caused by the expression of Salmonella OmpC. Appl. Environ. Microbiol. 2009 Epub ahead of print.

#### 学会発表

1. 五十君静信。遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発。日本微生物資源学会第15回大会。2008.7。千葉
2. Kajikawa A., and Igimi S. Expression of Salmonella OmpC in recombinant *Lactobacillus casei* induced an attenuated pro-inflammatory response of RAW264.7 cell. 9th Symposium on Lactic acid bacteria. 2008.8.31-9.4. Egmond aan Zee (The Netherlands)
3. 五十君静信。遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン。第11回日本臨床腸内微生物学会。2008.9。東京

#### 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

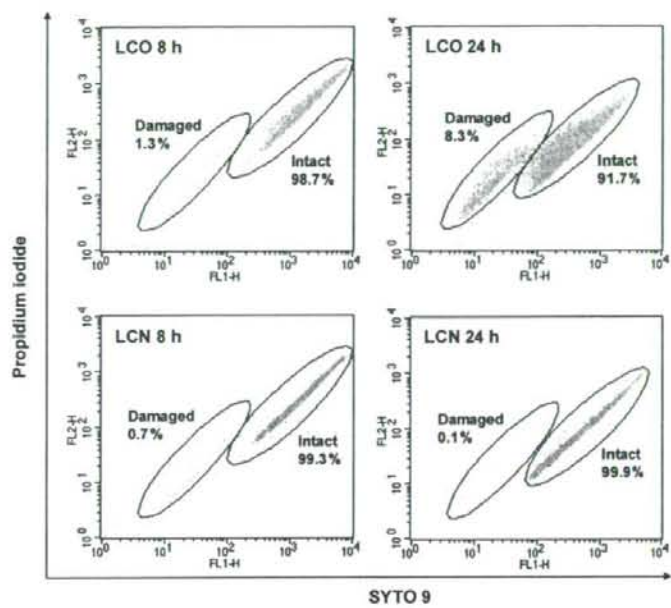


Fig. 1

OmpC 発現乳酸菌のバイアビリティ評価

OmpC 発現乳酸菌 (LCO)

非発現乳酸菌 (LCN)

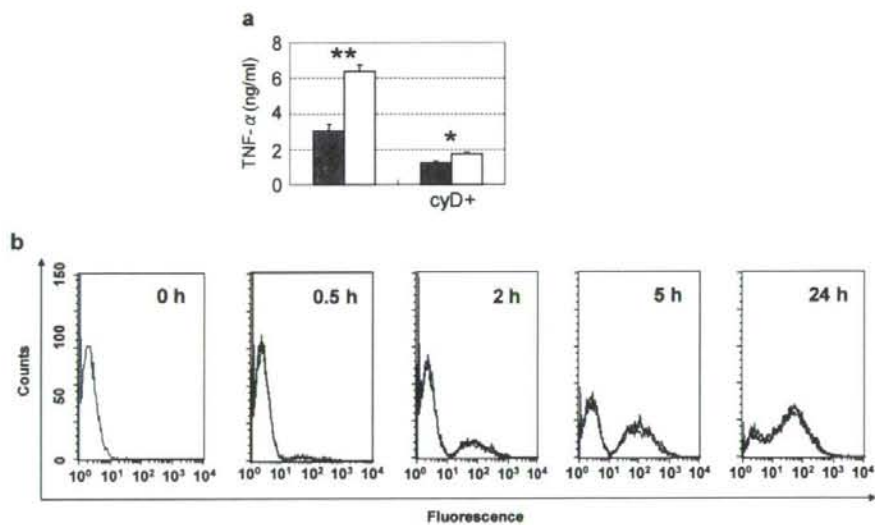


Fig. 2

a) TNF- $\alpha$  産生誘導におけるファゴサイトーシスの重要性

グレー：OmpC 発現乳酸菌 白：非発現乳酸菌

CyD：サイトカラシン D 添加

b) RAW264.7 細胞により取込まれた菌体の経時的変化



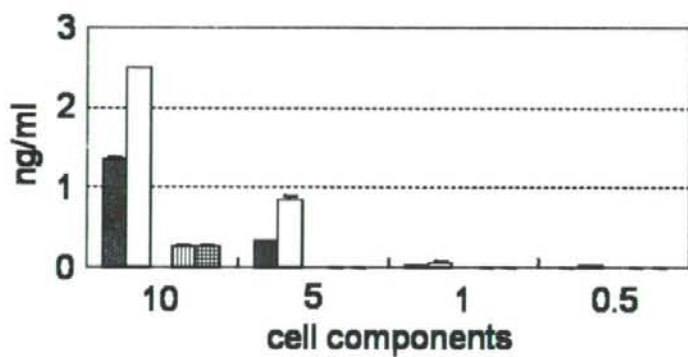


Fig. 3

細胞壁およびプロトプラストの刺激による TNF- $\alpha$  産生誘導

OmpC 発現乳酸菌細胞壁 (グレー)、非発現乳酸菌細胞壁 (白)、OmpC 発現乳酸菌プロトプラスト (ストライプ)、非発現乳酸菌プロトプラスト (格子)  
菌体 10, 5, 1, 0.5  $\mu$ g/ml 相当から調製された菌体成分を添加

## 遺伝子組換え魚文献検索に関する研究

研究分担者 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。これまで最初に市場に出回る遺伝子組換え動物は魚類であると言われていたが、実際に市場に出回ることにはなかった。しかし、2008 年 9 月にアメリカの FDA が遺伝子組換え動物の利用に関する規制指針のパブリックコメントを求めることを公表し、2009 年 1 月に最終指針が発表された。遺伝子組換え大西洋サケを生産している会社は早速これに反応し、2009 年第 4 四半期には遺伝子組換え大西洋サケが市場に出ることを期待している。一方、新しい遺伝子組換え技術を用いた利用方法として、遺伝子組換え魚類を作出するのではなく、餌となる生物に魚類成長ホルモンを発現するようにした遺伝子組換え藻類を作出し、それを間接的に与えることによって、結果的に魚類の成長を促進できた論文が報告された。FDA が遺伝子組換え魚類の食用としての利用を許可するか不明であるが、この動きは今までアメリカの動向を探っていた中国にも影響を与え、すでに実用化されているコイなどで遺伝子組換え魚類の生産が開始されることが考えられる。日本にすぐこれらの遺伝子組換え魚類が食品として輸出されることはないと思うが、事故等で紛れ込むことは十分考えられ、遺伝子組換え魚類に対する対応が求められる。

### 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  
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

前年度に引き続き、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 2007～2008 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

遺伝子組換え魚類に関してはすでに 90 年代から食品として出荷することができるようにアメリカ・カナダに本拠を置く A/F Protein 社の関連会社 Aqua Bounty Technologies 社 (<http://www.aquabounty.com/>) が FDA に申請中であった。ところが、FDA は今まで遺伝子組換え動物を医薬品の一種として取り扱い、食品として遺伝子組換え魚類を扱うことはなかった。しかし、2008 年 9 月に遺伝子組換

え動物を食品として扱う規制の指針案を公表し、一般からの意見を募るため、パブリックコメントを求める発表を行った。この中で、遺伝子組換え動物を開発目的によって、6 つのクラスに分類し、成長を促進するような改良を加えた形質を付与した食料用の動物、というクラスを設定した。現在、成長を促進する遺伝子組換え動物は魚類が主で、ほ乳類でも成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換え動物が作られているが、効果はあまり認められていない。魚類では成長促進が生産効率を上げるため、公表されている遺伝子組換え魚類のうち、ほとんどが成長ホルモン遺伝子を導入したものである。そして、2009 年 1 月に遺伝子組換え動物を食品として利用する際の手続きを定めた最終指針が公表された。今後はこの指針によって安全性が評価され、食品としての出荷できるかどうか検討されると思われる。前述の Aqua Bounty Technologies 社の 2008 年 9 月に発表した中間決算書にも、FDA のパブリックコメントに関する記述があり、2009 年第 4 四半期に同社が開発した Aqua Advantage Salmon (成長ホルモン遺伝子を導入した大西洋サケ) が市場に出ることを期待する、と述べている。次に 2008 年に報告された遺伝子組換え魚に関する論文を調べた。新しく作出された魚種はなかった。しかし、今まで報告していなかった魚種でアユを用いて成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換えアユの作出が台湾の研究者によって報告されていることが判明した。論文によれば、コイ

の $\beta$ -actin 調節領域の下流にニジマスの成長ホルモン遺伝子 cDNA を繋げたプラスミッドを導入し、体重で2倍、体長で1.3倍の成長促進を示す遺伝子組換えアユが作出された、とある。

また、韓国で遺伝子組換えドジョウを作出している Nam 博士が遺伝子組換え魚類について総説を書いた。この中で、少なくとも35種で成長ホルモン遺伝子を導入して成長促進する遺伝子組換え魚類が作出されていること、そのうちの数種類は商業的に養殖することを想定していることなどが書かれている。遺伝子組換え魚類の研究の当初は哺乳類やウイルス由来の配列を用いていたが、現在ではプロモーターも遺伝子も全て魚類由来の配列を用いる研究が主流であり、さらに、異種由来の配列を用いた遺伝子組換え "allotransgenic" 魚と全て同種由来の配列 (プロモーターと遺伝子の組み合わせが正常なものとは異なる組み合わせを用いた) を用いた遺伝子組換え "autotransgenic" 魚という言葉が使われていることを報告している。研究の方向性として、異種由来の遺伝子の配列を導入する研究から同種由来の遺伝子を用い、プロモーターと遺伝子は組み合わせを変えた配列を導入する傾向があると指摘している。

直接遺伝子組換え魚を作出するのではなく、Chenn et al. (2008) は藻類の1種である *Nannochloropsis oculata* に魚類由来の GH 遺伝子にヒートショックプロテインのプロモーター70A と RUBISCO SSU 2 プロモーターを繋げたプラスミッドを導入し遺伝子組換え藻類を作出した。50世代以上継代したものを使用し、熱処理をして GH を発現させた後アルテミアに食べさせ、このアルテミアをティラピアの餌料とすることによって、ティラピアの成長を促進できたことを確認した、と報告した。

本年度は遺伝子組換えティラピアに関する文献を収集した。その結果、遺伝子組換え魚類の作出に関しては2つのグループが主に開発を行っている。1つはイギリスの Southampton 大学の Maclean 博士のグループ、もう1つはキューバの研究者のグループがある。イギリスのグループは遺伝子組換えティラピアをイギリスで生産、消費することが目的ではなく開発途上国で食用として利用することを念頭に置いている。実際にバングラディッシュなどの発展途上国出身の研究者と共同研究を行っている。もう一方のキューバのグループも食用を目的として研究を行っている。10年前の1999年にはボランディアに遺伝子組換えティラピアを食べてもらい、健康への影響を調査した論文が報告されている。

研究初期では他の遺伝子組換え魚の研究と同様にマウス由来のプロモーターとラット由来の成長ホルモン遺伝子を導入して作出したが、現在では

イギリスのグループは前述の Aqua Bounty Technologies 社の大西洋サケで使用しているプラスミッドと同じもの、すなわち、ocean pout 抗凍結タンパクプロモーターにマスノスケ GH の cDNA を繋げた OPAPesGH を導入したものである。しかし、彼らは他にティラピア由来のゲノム GH、L18 (ribosomal protein) プロモーター、 $\beta$ -actin 調節領域などの配列や活性について調べた論文も報告しており、all-tilapia GH construct も作成している。一方、キューバの研究者グループはヒト CMV プロモーター下流にティラピア GHcDNA を繋げたものを使用している。これ以外のプラスミッドに関する報告は見あたらない。

ティラピアを用いた遺伝子組換え魚の論文については文献と要旨を添付しておいた。キューバ、イギリスのグループ以外では台湾、日本でも報告があったが、中国 (中華人民共和国) の研究者が遺伝子組換えティラピアを作出したという論文を見つけることはできなかった。中国ではティラピア生産が2008年に180万トン (日刊水産通信、2009年1月28日) あり、米国向けに今後も成長を続ける、とある。

#### 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論文は少なくなった。アユの遺伝子組換え作出という論文は見落としていたもので、すでに2002年に報告されていた。アユは1年で世代交代を繰り返す魚種ですでに7世代以上継代されていることになる。台湾は鰻など、日本をターゲットに生産する魚種が多く、アユも日本人に食品として人気のある魚種で、台湾から日本へのアユの輸出実績などを調べる必要がある。

遺伝子組換え魚作出の研究として、異種由来のプロモーター、遺伝子由来の "allotransgenic" 魚を使わず、同種由来のプロモーター、遺伝子の組み合わせを変え、作出する "autotransgenic" 魚を作出する傾向があるとの論文が出た。現在の遺伝子組換えの定義ではこの autotransgenic 魚は遺伝子組換え魚とは認定されず、今後、このような autotransgenic animal が生産されてきた場合、問題となると思われる。

ティラピアは雑食性で植物プランクトンを池中で繁殖させて、それを食べさせることによって養殖もできることから発展途上国などで人気のある魚種である。また、肉質も良く、欧米でも食べられている魚である。日本でもマダイの代用品として一時登場したことがあったが、その後、マダイの値段が下がったため、あまり食卓にあがらなくなった。市場にはそのままの形で出回ることはなく、フィレの状態か、それをフライなどにした加

工品の形で出回っている。

さらに新しい遺伝子組換え技術を用いた手法として、餌となる藻類にGHを導入し、その餌を食べさせることによって、魚類の成長を促進した、という報告が出てきた。これは直接遺伝子組換え魚類を利用するのではないので、すぐにでも養殖業界で応用可能な技術である。ただし、遺伝子組換え藻類を与える場合、止水環境では問題ないが、流水で飼育しているような環境では、環境中への放出はさけられず、それらの遺伝子組換え藻類の自然界への拡散が心配される。

## E. 結論

米国において、遺伝子組換え動物を正式に食品として申請することができる指針が整備された。この動きは、すでに実用化段階にある中国においても影響を及ぼすことが考えられる。今後、遺伝子組換え魚類を作出する国々の研究動向に注意し、どのようなプロモーター、遺伝子配列を使用しているか情報を収集することがますます重要になると思われる。

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.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&section=A/F%20Protein%20-%20Purified%20Gene%20and%20Growth%20Hormone](http://www.genesis.mun.ca/research/index.php?includefile=includes/af_protein.html&section=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（2008年以降に報告された主な論文）

- 1). Higgs, DA, Sutton, JN, Kim, H, Oakes, JD, Smith, J, Biagi, C, Rowshandeli, M, Devlin, RH (2009). Influence of dietary concentrations of protein, lipid and carbohydrate on growth, protein and energy utilization, body composition, and plasma titres of growth hormone and insulin-like growth factor-1 in non-transgenic and growth hormone transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *Aquaculture* 286, 127-137.
- 2). Guan, B, Hu, W, Zhang, TL, Wang, YP, Zhu, ZY (2008). Metabolism traits of 'all-fish' growth hormone transgenic common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture* 284, 217-223.
- 3). Raven, PA, Uh, M, Sakhrani, D, Beckman, BR, Cooper, K, Pinter, J, Leder, EH, Silverstein, J, Devlin, RH (2008). Endocrine effects of growth hormone overexpression in transgenic coho salmon. *General and Comparative Endocrinology* 159, 26-37.
- 4). Lohmus, M, Raven, PA, Sundstrom, LF, Devlin, RH (2008). Disruption of seasonality in growth hormone-transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and the role of cholecystokinin in seasonal feeding