

potential sources of contamination with prohibited substances, genetically modified organisms or environmental contaminants.

TABLE 3: Ingredients of non-agricultural origin referred to in section 3 of these guidelines

3.4 Preparations of micro-organisms and enzymes

Any preparation of micro-organisms and enzymes normally used in food processing, with the exception of micro-organisms genetically engineered/modified or enzymes derived from genetic engineering.

TABLE 4: PROCESSING AIDS WHICH MAY BE USED FOR THE PREPARATION OF PRODUCTS OF AGRICULTURAL ORIGIN REFERRED TO IN SECTION 3 OF THESE GUIDELINES

Preparations of micro-organisms and enzymes

Any preparations of micro-organisms and enzymes normally used as processing aids in food processing, with the exception of genetically engineered/modified organisms and enzymes derived from genetically engineered/modified organisms.

Ref. 3: Extracts from the reports of the 24th and the 35th sessions

Opinions “for” labelling

1996 (24th CCFL): The Committee noted the opinions of many delegations and observers which called for the mandatory and comprehensive labelling of all foods prepared with the aid of biotechnology on the basis of the consumer's right to know the origin and nature of the foods which they purchased and the right to make informed choices based on a variety of considerations and personal values (42).

2007 (35th CCFL): Several delegations recalled that foods derived from biotechnology have to undergo a pre-market safety assessment in order to protect consumers' health and therefore the request for mandatory GM/GE labelling is not a food safety issue, but an issue related to consumer information. Some delegations expressed the view that labelling was also related to food safety in view of the potential risks to consumer's health. The Observer from 49P noted that a great proportion of GE foods being sold have not been subjected to any governmental safety assessments, and therefore labelling helped consumers make their own decisions about health and safety (108). Some delegations informed the Committee that serious concerns were expressed in their countries regarding the safety aspects of GM/GE foods, and also concerning the social and economic consequences of their use in agriculture, especially for small farmers (104). Several delegations indicated that, in their countries, consumers had no objections in principle to the use of GM/GE foods, but that mandatory labelling was necessary in order to provide clear information to consumers and to allow them to make an informed choice. These delegations and some observers stressed the fundamental right of consumers to know the nature of the food they were consuming (109).

2009 (37th CCFL): Many other delegations and several observers expressed the view that some progress had been made over time and emphasized that especially many developing countries looked to Codex for guidance on approaches for the labelling of GM/GE foods and that the proposed draft recommendations could prove useful in this respect. One Observer recalled that Codex had a dual mandate to not only protect the health of consumers but also to ensure fair practices in the food trade and thus a failure to label GM/GE foods could in itself be considered misleading.

Several delegations and observers expressed the need for mandatory labelling to allow consumer choice, noting that GM/GE foods were a sensitive issue for consumers in their respective countries and therefore stressed the importance of continuing this work. In addition many delegations and several observers expressed their view that one of the main conclusions of the work already carried out by several working groups was that several approaches for labelling of GM/GE foods were possible. One delegation indicated that their population preferred foods derived from GM/GE techniques because they were cheaper but while this was the case the consumers would still prefer the choice of being informed if the foods were derived from GM/GE techniques and therefore could not see the rationale for the discontinuation of this work (95).

Opinions “against” labelling

1996 (24th CCFL): Many other delegations and observers stressed that labelling should address the specific concerns of safety (including potential allergenicity), nutrition and food composition, all of which could be subject to scientific study and evaluation, and that labelling should be considered on a case-by-case basis taking these considerations into account. In such cases, the provision of consumer information other than that required for the purposes of safety, nutrition and food composition could be considered by means other than labeling (43).

2007 (35th CCFL): Several other delegations expressed the view that mandatory method of production labelling of foods derived from biotechnology was not justified on the grounds of food safety or fair trade practices, and that the consumer's right to know was not one of the objectives of Codex, and referred to the view expressed by the Executive Committee in 1996 to the effect that “the claimed right to know was ill-defined and variable and in this respect could not be used by Codex as the primary basis of decision-making on appropriate labeling” (ALINORM 97/3, para. 29). These delegations pointed out that governments had the possibility of requesting mandatory labelling in their national legislation if it fulfilled a legitimate objective but that it should not be imposed to all countries at the international level. In this respect, it was recalled that one of the Criteria for the Consideration of Other Factors Referred to in the Second Statement of Principles was that “some legitimate concerns of governments when establishing their national legislation are not generally applicable or relevant world wide” (111).

2009 (37th CCFL): Some delegations and some observers, were of the opinion that work on this issue should be discontinued noting that the matter had been discussed for almost two decades without consensus, that there was very little prospect of consensus in the future and considerable financial and human resources had been dedicated to this work over the years which could be better used to address more pressing health issues such as the implementation of the Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health currently under discussion in the Committee. One delegation recalled that the first priority of Codex was protection of consumer health and food safety as asserted by the 25th Session of the Commission¹³.

One delegation mentioned that Codex texts already gave sufficient guidance for the labelling of GM/GE foods and that identifying the method of production claims such as those related to GE should be a market driven decision of the private sector. One delegation noted that it was not clear that there is agreement within the committee on the nature of the work to be undertaken (93).

Ref. 4: Principles for the Risk Analysis of Foods Derived from Modern Biotechnology

19. Risk management measures may include, as appropriate, food labelling⁸, conditions for marketing approvals and post-market monitoring.
⁸Reference is made to the CCFL in relation to the Proposed Draft Recommendations for the Labelling of Foods and Food Ingredients obtained through certain techniques of genetic modification/genetic engineering(proposed Draft Amendment to the General Standard for the Labelling of Prepacked Foods) at Step 3 of the procedures.
16. Risk management measures for foods derived from modern biotechnology should be proportional to the risk, based on the outcome of the risk assessment and, where relevant, taking into account other legitimate factors in accordance with the general decisions of the Codex Alimentarius Commission (CAC) as well as the Codex Working Principles for Risk Analysis.
17. It should be recognized that different risk management measures may be capable of achieving the same level of protection with regard to the management of risks associated with safety and nutritional impacts on human health, and therefore would be equivalent.
18. Risk managers should take into account the uncertainties identified in the risk assessment and implement appropriate measures to manage these uncertainties.
25. A consistent approach should be adopted to characterise and manage safety and nutritional risks associated with foods derived from modern biotechnology. Unjustified differences in the level of risks presented to consumers between these foods and similar conventional foods should be avoided.

Ref. 5: STATEMENTS OF PRINCIPLE CONCERNING THE ROLE OF SCIENCE IN THE CODEX DECISION-MAKING PROCESS AND THE EXTENT TO WHICH OTHER FACTORS ARE TAKEN INTO ACCOUNT

1. The food standards, guidelines and other recommendations of Codex Alimentarius shall be based on the principle of sound scientific analysis and evidence, involving a thorough review of all relevant information, in order that the standards assure the quality and safety of the food supply.
2. When elaborating and deciding upon food standards Codex Alimentarius will have regard, where appropriate, to other legitimate factors relevant for the health protection of consumers and for the promotion of fair practices in food trade.
3. In this regard it is noted that food labelling plays an important role in furthering both of these objectives.
4. When the situation arises that members of Codex agree on the necessary level of protection of public health but hold differing views about other considerations, members may abstain from acceptance of the relevant standard without necessarily preventing the decision by Codex.

Criteria for the Consideration of the Other Factors Referred to in the Second Statement of Principle⁵¹

- . when health and safety matters are concerned, the Statements of Principle Concerning the Role of Science and the Statements of Principle Relating to the Role of Food Safety Risk Assessment should be followed;
- . other legitimate factors relevant for health protection and fair trade practices may be identified in the risk management process, and risk managers should indicate how these factors affect the selection of risk management options and the development of standards, guidelines and related texts;
- . consideration of other factors should not affect the scientific basis of risk analysis; in this process, the separation between risk assessment and risk management should be respected, in order to ensure the scientific integrity of the risk assessment;
- . recognized that some legitimate concerns of governments when establishing their national legislation are not generally applicable or relevant worldwide;⁵²
- . only those other factors which can be accepted on a worldwide basis, or on a regional basis in the case of regional standards and related texts, should be taken into account in the framework of Codex;
- . the consideration of specific other factors in the development of risk management recommendations of the Codex Alimentarius Commission and its subsidiary bodies should be clearly documented, including the rationale for their integration, on a case-by-case basis;
- . the feasibility of risk management options due to the nature and particular constraints of the production or processing methods, transport and storage, especially in developing countries, may be considered; concerns related to economic interests and trade issues in general should be substantiated by quantifiable data;
- . the integration of other legitimate factors in risk management should not create unjustified barriers to trade⁵³; particular attention should be given to the impact on developing countries of the inclusion of such other factors.

⁵⁰Decision of the 21st Session of the Commission, 1995. ⁵¹Decision of the 24th Session of the Commission, 2001. ⁵²Confusion should be avoided between justification of national measures under the SPS and TBT Agreements and their validity at the international level. ⁵³According to the WTO principles, and taking into account the particular provisions of the SPS and TBT Agreements.

Ref. 5: WORKING PRINCIPLES FOR RISK ANALYSIS FOR APPLICATION IN THE FRAMEWORK OF THE CODEX ALIMENTARIUS
SCOPE

1. These principles for risk analysis are intended for application in the framework of the Codex Alimentarius.
2. The objective of these Working Principles is to provide guidance to the Codex Alimentarius Commission and the joint FAO/WHO expert bodies and consultations, so that food safety and health aspects of Codex standards and related texts are based on risk analysis.
3. Within the framework of the Codex Alimentarius Commission and its procedures, the responsibility for providing advice on risk management lies with the Commission and its subsidiary bodies (risk managers), while the responsibility for risk assessment lies primarily with the joint FAO/WHO expert bodies and consultations (risk assessors).

RISK ANALYSIS -GENERAL ASPECTS

4. The risk analysis used in Codex should be:

- . applied consistently;
- . open, transparent and documented;
- . conducted in accordance with both the Statements of Principle Concerning the Role of Science in the Codex Decision-Making Process and the Extent to Which Other Factors are Taken into Account and the Statements of Principle Relating to the Role of Food Safety Risk Assessment²⁴; and,

²⁴See Appendix: General Decisions of the Commission

- . evaluated and reviewed as appropriate in the light of newly generated scientific data.
5. The risk analysis should follow a structured approach comprising the three distinct but closely linked components of risk analysis (risk assessment, risk management and risk communication) as defined by the Codex Alimentarius Commission²⁵, each component being integral to the overall risk analysis.

²⁵See Definitions of Risk Analysis Terms Related to Food Safety.

6. The three components of risk analysis should be documented fully and systematically in a transparent manner. While respecting legitimate concerns to preserve confidentiality, documentation should be accessible to all interested parties²⁶.

²⁶For the purpose of the present document, the term "interested parties" refers to "risk assessors, risk managers, consumers, industry, the academic community and, as appropriate, other relevant parties and their representative organizations" (see definition of "Risk Communication")

7. Effective communication and consultation with all interested parties should be ensured throughout the risk analysis.
8. The three components of risk analysis should be applied within an overarching framework for management of food related risks to human health.
9. There should be a functional separation of risk assessment and risk management, in order to ensure the scientific integrity of the risk assessment, to avoid confusion over the functions to be performed by risk assessors and risk managers and to reduce any conflict of interest. However, it is recognized that risk analysis is an iterative process, and interaction between risk managers and risk assessors is essential for practical application.
10. When there is evidence that a risk to human health exists but scientific data are insufficient or incomplete, the Codex Alimentarius Commission should not proceed to elaborate a standard but should consider elaborating a related text, such as a code of practice, provided that such a text would be supported by the available scientific evidence.
11. Precaution is an inherent element of risk analysis. Many sources of uncertainty exist in the process of risk assessment and risk management of food related hazards to human health. The degree of uncertainty and variability in the available scientific information should be explicitly considered in the risk analysis. Where there is sufficient scientific evidence to allow Codex to proceed to elaborate a standard or related text, the assumptions used for the risk assessment and the risk management options selected should reflect the degree of uncertainty and the characteristics of the hazard.
12. The needs and situations of developing countries should be specifically identified and taken into account by the responsible bodies in the different stages of the risk analysis.

RISK ASSESSMENT POLICY

13. Determination of risk assessment policy should be included as a specific component of risk management.
14. Risk assessment policy should be established by risk managers in advance of risk assessment, in consultation with risk assessors and all other interested parties. This procedure aims at ensuring that the risk assessment is systematic, complete, unbiased and transparent.
15. The mandate given by risk managers to risk assessors should be as clear as possible.
16. Where necessary, risk managers should ask risk assessors to evaluate the potential changes in risk resulting from different risk management options.

RISK ASSESSMENT²⁷

²⁷Reference is made to the Statements of Principle Relating to the Role of Food Safety Risk Assessment: See Appendix: General Decisions of the Commission.

17. The scope and purpose of the particular risk assessment being carried out should be clearly stated and in accordance with risk assessment policy. The output form and possible alternative outputs of the risk assessment should be defined
18. Experts responsible for risk assessment should be selected in a transparent manner on the basis of their expertise, experience, and their independence with regard to the interests involved. The procedures used to select these experts should be documented including a public declaration of any potential conflict of interest. This declaration should also identify and detail their individual expertise, experience and independence. Expert bodies and consultations should ensure effective participation of experts from different parts of the world, including experts from developing countries.
19. Risk assessment should be conducted in accordance with the Statements of Principle Relating to the Role of Food Safety Risk Assessment and should incorporate the four steps of the risk assessment, i.e. hazard identification, hazard characterization, exposure assessment and risk characterization.
20. Risk assessment should be based on all available scientific data. It should use available quantitative information to the greatest extent possible. Risk assessment may also take into account qualitative information.
21. Risk assessment should take into account relevant production, storage and handling practices used throughout the food chain including traditional practices, methods of analysis, sampling and inspection and the prevalence of specific adverse health effects.
22. Risk assessment should seek and incorporate relevant data from different parts of the world, including that from developing countries. These data should particularly include epidemiological surveillance data, analytical and exposure data. Where relevant data are not available from developing countries, the Commission should request that FAO/WHO initiate time-bound studies for this purpose. The conduct of the risk assessment should not be inappropriately delayed pending receipt of these data; however, the risk assessment should be reconsidered when such data are available.
23. Constraints, uncertainties and assumptions having an impact on the risk assessment should be explicitly considered at each step in the risk assessment and documented in a transparent manner. Expression of uncertainty or variability in risk estimates may be

qualitative or quantitative, but should be quantified to the extent that is scientifically achievable.

24. Risk assessments should be based on realistic exposure scenarios, with consideration of different situations being defined by risk assessment policy.

They should include consideration of susceptible and high-risk population groups. Acute, chronic (including long-term), cumulative and/or combined adverse health effects should be taken into account in carrying out risk assessment, where relevant.

25. The report of the risk assessment should indicate any constraints, uncertainties, assumptions and their impact on the risk assessment. Minority opinions should also be recorded. The responsibility for resolving the impact of uncertainty on the risk management decision lies with the risk manager, not the risk assessors.
26. The conclusion of the risk assessment including a risk estimate, if available, should be presented in a readily understandable and useful form to risk managers and made available to other risk assessors and interested parties so that they can review the assessment.

RISK MANAGEMENT

27. While recognizing the dual purposes of the Codex Alimentarius are protecting the health of consumers and ensuring fair practices in the food trade, Codex decisions and recommendations on risk management should have as their primary objective the protection of the health of consumers. Unjustified differences in the level of consumer health protection to address similar risks in different situations should be avoided.

28. Risk management should follow a structured approach including preliminary risk management activities²⁸, evaluation of risk management options, monitoring and review of the decision taken. The decisions should be based on risk assessment, and taking into account, where appropriate, other legitimate factors relevant for the health protection of consumers and for the promotion of fair practices in food trade, in accordance with the Criteria for the Consideration of the Other Factors Referred to in the Second Statement of Principles²⁹.

²⁸For the purpose of these Principles, preliminary risk management activities are taken to include: identification of a food safety problem; establishment of a risk profile; ranking of the hazard for risk assessment and risk management priority; establishment of risk assessment policy for the conduct of the risk assessment; commissioning of the risk assessment; and consideration of the result of the risk assessment.

²⁹See Appendix: General Decisions of the Commission.

29. The Codex Alimentarius Commission and its subsidiary bodies, acting as risk managers in the context of these Working Principles, should ensure that the conclusion of the risk assessment is presented before making final proposals or decisions on the available risk management options, in particular in the setting of standards or maximum levels, bearing in mind the guidance given in paragraph 10.

30. In achieving agreed outcomes, risk management should take into account relevant production, storage and handling practices used throughout the food chain including traditional practices, methods of analysis, sampling and inspection, feasibility of enforcement and compliance, and the prevalence of specific adverse health effects.

31. The risk management process should be transparent, consistent and fully documented. Codex decisions and recommendations on risk management should be documented, and where appropriate clearly identified in individual Codex standards and related texts so as to facilitate a wider understanding of the risk management process by all interested parties.

32. The outcome of the preliminary risk management activities and the risk assessment should be combined with the evaluation of available risk management options in order to reach a decision on management of the risk.

33. Risk management options should be assessed in terms of the scope and purpose of risk analysis and the level of consumer health protection they achieve. The option of not taking any action should also be considered.

34. In order to avoid unjustified trade barriers, risk management should ensure transparency and consistency in the decision-making process in all cases.

Examination of the full range of risk management options should, as far as possible, take into account an assessment of their potential advantages and disadvantages. When making a choice among different risk management options, which are equally effective in protecting the health of the consumer, the Commission and its subsidiary bodies should seek and take into consideration the potential impact of such measures on trade among its Member countries and select measures that are no more trade-restrictive than necessary.

35. Risk management should take into account the economic consequences and the feasibility of risk management options. Risk management should also recognize the need for alternative options in the establishment of standards, guidelines and other recommendations, consistent with the protection of consumers' health. In taking these elements into consideration, the Commission and its subsidiary bodies should give particular attention to the circumstances of developing countries.

36. Risk management should be a continuing process that takes into account all newly generated data in the evaluation and review of risk management decisions. Food standards and related texts should be reviewed regularly and updated as necessary to reflect new scientific knowledge and other information relevant to risk analysis.

RISK COMMUNICATION

37. Risk communication should:

- i) promote awareness and understanding of the specific issues under consideration during the risk analysis;
- ii) promote consistency and transparency in formulating risk management options/recommendations;
- iii) provide a sound basis for understanding the risk management decisions proposed;
- iv) improve the overall effectiveness and efficiency of the risk analysis;
- v) strengthen the working relationships among participants;
- vi) foster public understanding of the process, so as to enhance trust and confidence in the safety of the food supply;
- vii) promote the appropriate involvement of all interested parties; and
- viii) exchange information in relation to the concerns of interested parties about the risks associated with food.

38. Risk analysis should include clear, interactive and documented communication, amongst risk assessors (Joint FAO/WHO expert bodies and consultations) and risk managers (Codex Alimentarius Commission and its subsidiary bodies), and reciprocal

communication with member countries and all interested parties in all aspects of the process.

39. Risk communication should be more than the dissemination of information. Its major function should be to ensure that all information and opinion required for effective risk management is incorporated into the decision making process.
40. Risk communication involving interested parties should include a transparent explanation of the risk assessment policy and of the assessment of risk, including the uncertainty. The need for specific standards or related texts and the procedures followed to determine them, including how the uncertainty was dealt with, should also be clearly explained. It should indicate any constraints, uncertainties, assumptions and their impact on the risk analysis, and minority opinions that had been expressed in the course of the risk assessment (see para. 25).
41. The guidance on risk communication in this document is addressed to all those involved in carrying out risk analysis within the framework of Codex Alimentarius. However, it is also of importance for this work to be made as transparent and accessible as possible to those not directly engaged in the process and other interested parties while respecting legitimate concerns to preserve confidentiality (see para. 6).

（ii）組換え微生物の国際動向、安全性に関する研究

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

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、細胞レベルでのサイトカイン産生誘導能の評価、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。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の性質を検討しその総和として（相加あるいは相乗的に働くであろうという立場で）安全性を評価してきた。

一方、我々はこれまでの研究により、遺伝子組換え微生物の免疫への反応では、組換えにより導入された形質が本来持つ免疫への刺激と宿主の持つ免疫への刺激の総和という形で免疫反応が起こらない場合があることを示してきた。単独では炎症性サイトカイン産生を誘導する作用を持つ異種タンパク質を遺伝子組換えにより乳酸菌に発現させると、宿主である乳酸菌がもつ炎症性サイトカイン産生能をむしろ低下させたことを観察し報告した。今年度は、2つの異なった抗原を共発現させたモデル組換え体进行评估することにより、宿主の持つ免疫刺激、発現させた抗原による免疫刺激、組換え体以外の共存するタンパク質による免疫刺激などが複雑に絡み合い免疫反応を示すことを実証した。組換え微生物の安全性評価特に、免疫影響評価に当たっては今後このような点を考慮する必要があると思われる。

さて、遺伝子操作により、細菌はどの程度遺伝子レベルでの変化が起こるかに関する知見はほとんどない。そこで乳酸菌を用いて、従来の育種方法として変異原物質を用いた育種を試み、同様な表現型を得るまでに遺伝子組換えによる育種では、ゲノムレベルでどの程度の変化が観察されるかを比較することにした。本年度は、乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM393 株と変異原物質を用いた育種株 KK378 株の全ゲノム解析を進めた。ヨーロッパから分与を受け、日本で継代・保存している菌株は元株と比べどの程度の遺伝子変異を受けているか（ベースラインの変異）と、変異原物質による通性嫌気性から偏性嫌気性へと育種した場合、ゲノムがどの程度変化するかを検討を進めた。

研究協力者

五十君静信（国立医薬品食品衛生研究所室長）

梶川揚申（同 研究所・流動研究員）

梶田和彌（同 研究所・研究生）

A. 研究目的

遺伝子組換え食品特に微生物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、モデル組換え体を用い、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. モデル組換え体の作出

モデル組換え体として、サルモネラの鞭毛抗原と外膜タンパク質をそれぞれ単独及び共発現するように組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。宿主の *Lactobacillus casei* IGM 393 株は、鞭毛抗原 (FliC)、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。このベクターでは組み込んだ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。今回実験に用いたモデル組換え乳酸菌のリストは Table 1 に示した。

2. 組換え乳酸菌の発現状況の確認

作出したモデル組換え体について、タンパクの発現は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で、菌体表層への発現は、特異的な免疫抗体および Alexa 488 でラベルした二次抗体を用い、FACS によって評価した。

3. 遺伝子組換え乳酸菌による IL-8 産生誘導

IL-8 産生誘導は、ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用いて評価した。モデル組換え体に 24 時間さらした後の培養上清中に産生された IL-8 量を、ELISA 法で測定した。

4. 遺伝子組換え乳酸菌のマウスへの免疫

遺伝子組換え乳酸菌を 8 週齢の雌 C3H/HeJ マウスへの免疫することにより、誘導される特異的 IgG 量を測定した。免疫は 10^7 cfu に調整した菌液を 3 回ずつ 2 週免疫し、ブースターとして 1 回追加免疫し 2 週間後の血中の特異的抗体価を測定した。特異的抗体価は、IgG のサブクラス別に ELISA 法により測定し、IgG1 と IgG2a 比を計算した。

5. ゲノム解析

IGM393 と KK378 株について、公開されているヨーロッパの元株である BL23 株のシーケンスを対照とし、高速シーケンサーにてゲノムのドラフト作成を試みた。

C. 研究結果

1. モデル組換え体の作出

モデル組換え体として、サルモネラの鞭毛抗原と外膜タンパク質をそれぞれ単独及び共発現するように組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。今回実験に用いたモデル組換え乳酸菌のリストは Table 1 に示した。宿主としては、ベクターを組み込んでいない宿主乳酸菌を用いた。サルモネラの鞭毛抗原のみを組み込んだ LCF、外膜タンパク質単独 LCS、鞭毛抗原=外膜蛋白の順 LCFS、外膜蛋白=鞭毛抗原の順 LCSF、さらにベクターのみを組み込んだ LCN につき、実験に用いた。

2. 組換え乳酸菌の発現状況の確認

作出したモデル組換え体について、タンパクの発現は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した (Fig. 1(a) (b))。菌体表層への発現は、FACS によって評価し、いずれも菌体表層に固定化されていることが確認された (Fig. 1(c) (d))。

3. 遺伝子組換え乳酸菌による IL-8 産生誘導

IL-8 産生誘導は、ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用いて評価し、その結果を Fig. 2 に示した。鞭毛では菌体表層に単独発現、SipC と共発現させ

た組換え体で、どちらも Caco-2 からの炎症性サイトカイン IL-8 産生を誘導した。

4. 遺伝子組換え乳酸菌のマウスへの免疫

遺伝子組換え乳酸菌を 8 週齢の雌 C3H/HeJ マウスへの免疫することにより、誘導される特異的 IgG 量を測定した。ブースター 2 週間後の血中の特異的抗体価を測定した。SipC 特異的な IgG 抗体価と FliC 特異的な IgG 抗体価をそれぞれ別に測定した結果を Fig. 3 に示した。2 つの異なった抗原を遺伝子組換えにより菌体表層に固定して共発現させると、より外側に位置する抗原に対して特異的抗体産生が誘導される。

特異的抗体価は、IgG のサブクラス別に ELISA 法により測定し、IgG1 と IgG2a 比を計算した結果は、Table 2 に示した。乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM 393 株をマウスに免疫し、IgG1 と IgG2a 比により判断すると主に Th. 1 型の免疫誘導が起こるが、可溶性抗原を共存させると Th. 2 型、遺伝子組換えでは、発現させる抗原により混在型の免疫反応が観察される。

5. ゲノム解析

IGM393 と KK378 株について、公開されているヨーロッパの元株である BL23 株のシーケンスを対照とし、高速シーケンサーにてゲノムのドラフト作成を進めた。IGM393 株と KK378 株のドラフトは完成しつつあるが、部分的にはまだ解読が必要である。

E. 結論

サルモネラの鞭毛抗原は、TLR5 を介して自然免疫を誘導することが知られている。鞭毛と他の抗原を共発現させたモデル組換え体がどのような免疫反応を示すかを細胞レベルとマウス個体レベルで評価した。細胞レベルの検討では、鞭毛を菌体表層に単独発現、SipC と共発現させた組換え体で、どちらも Caco-2 からの炎症性サイトカイン IL-8 産生を誘導した。マウス個体レベルの免疫実験では、2 つの異なった抗原を遺伝子組換えにより菌体表層に固定して共発現させると、より外側に位置する抗原に対して特異的抗体産生が誘導される。乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM 393 株をマウスに免疫し、IgG1 と IgG2a 比により判断すると主に Th. 1 型の免疫誘導が起こるが、可溶性抗原を共存させると Th. 2 型、遺伝子組換えでは、発現させる抗原により混在型の免疫反応が観察される。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. Kajikawa A., Masuda K., Katoh M., and Igimi S.: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(1):43-48. (2010)
2. Kajikawa A., Ichikawa E., and Igimi S.: Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(2):375-382 (2010)
3. Kajikawa A. and Igimi S.: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine* 28(19):3409-3415 (2010)
4. 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開発の試み。日本臨床腸内微生物学会誌。11:34-40 (2009)

学会発表

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

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Strains	Characteristics	References
<i>Lactobacillus casei</i>		
IGM393	Plasmid-free host, subculture of ATCC 393 (pLZ15-)	Vaccine 25:3599 (2007)
LCF	Carrying pLP401::FliC, surface-display, Em ^r	Vaccine 25:3599 (2007)
LCS	Carrying pLP401::cSipC, surface-display, Em ^r	This study
LCFS	Carrying pLP401::FliC = cSipC, surface-display, Em ^r	This study
LCSF	Carrying pLP401::cSipC = FliC, surface-display, Em ^r	This study
LCN	Carrying pLPEmpty, non-expressing control strain, Em ^r	Vaccine 25:3599 (2007)
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis		
#40	Clinical isolate, source of genes and proteins	Biosci Microflora 25:117 (2006)
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	Cloning host Takara Bio Inc.	

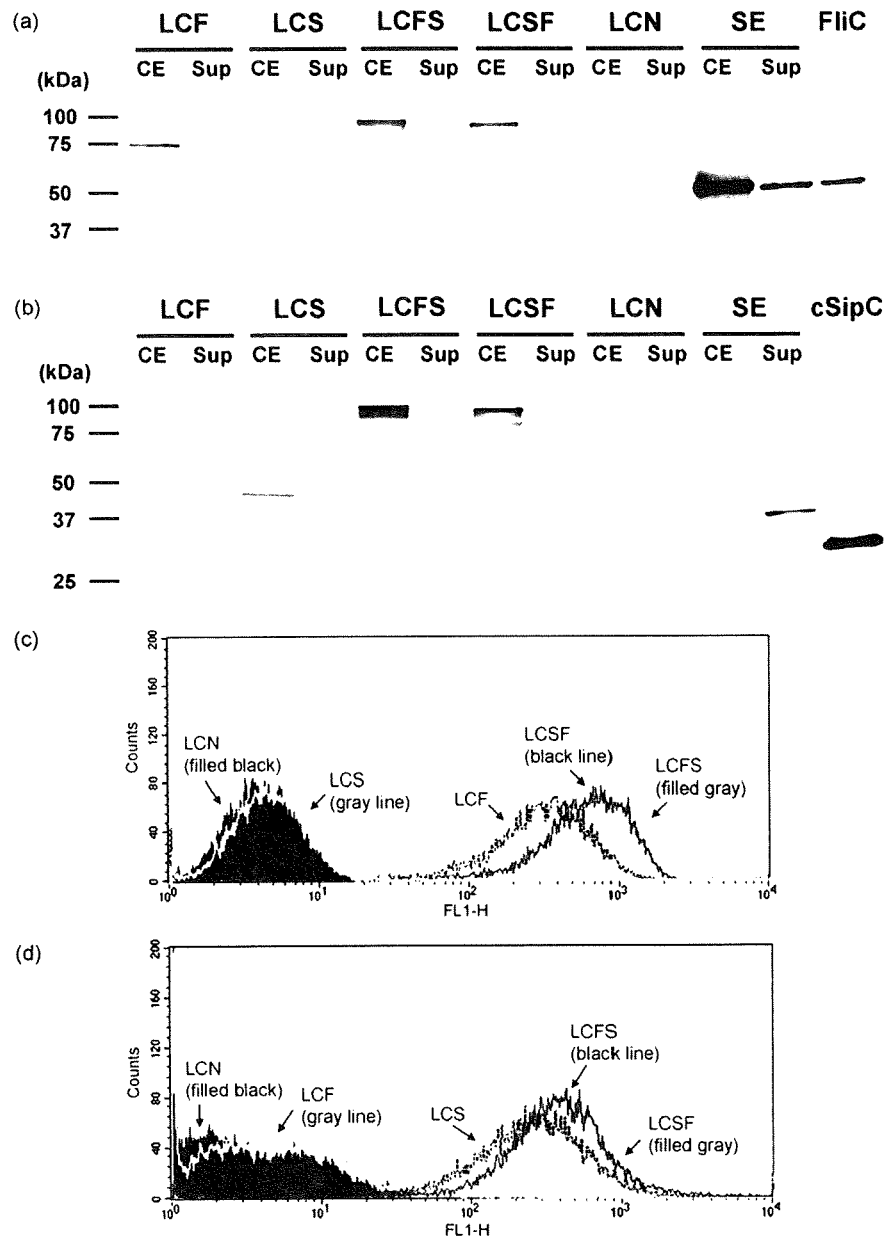


Fig. 1. Expression and surface-location of FliC-fusion antigens.

Expression of FliC (a) and/or cSipC (b) was detected by immunoblotting analysis. Approximate 108 cfu of cell extract (CE), 50-fold concentrated culture supernatant (Sup), 10 ng of purified FliC, or 25 ng of purified cSipC were loaded onto an acrylamide gel. Molecular sizes are shown on the left. Surface-located antigens were detected using FACS analysis. Five kinds of recombinant lactobacilli, LCF, LCS, LCFS, LCSF, and LCN, were conjugated with anti-FliC (c) or anti-cSipC (d) antibodies and Alexa 488-labeled anti-rabbit IgG or anti-mouse IgG. Ten thousand events were analyzed. The horizontal axis (FL1) represents the intensity of fluorescence, and the vertical axis represents the number of bacterial particles.

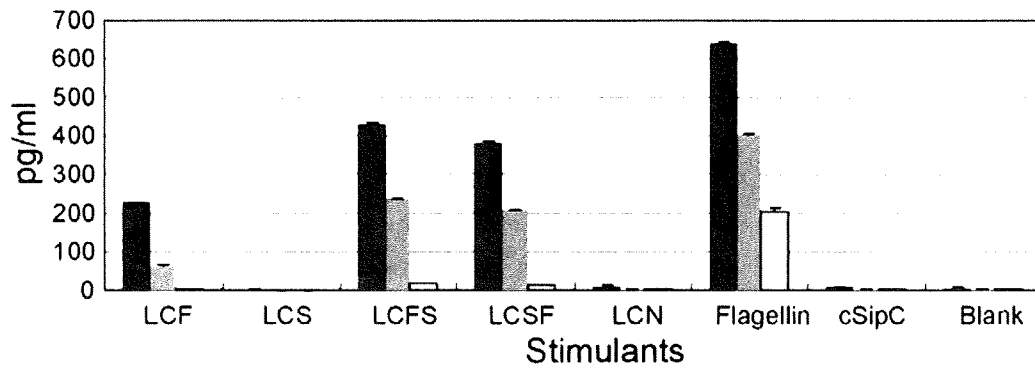


Fig. 2. Quantification of human IL-8 secreted by Caco-2 cells.

The culture of Caco-2 cells was stimulated with recombinant lactobacilli (1000, 100 and 10 γ g/ml) or purified proteins (100, 10, 1 ng/ml). Values represent mean+SEM (n = 3). Results are representative of at least three independent experiments. Black bar: 1000 γ g/ml or 100 ng/ml. Gray bar: 100 γ g/ml or 10 ng/ml; open bar: 10 γ g/ml or 1 ng/ml.

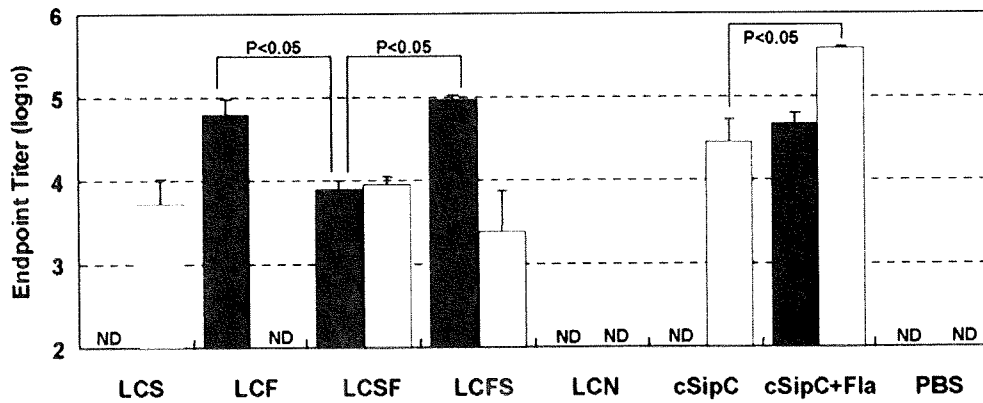


Fig. 3. IgG titer in serum of immunized mice.

Endpoint titers of antigen-specific IgG are given as $-\log_{10}(\text{dilution factor}) + \text{standard deviation (SD)}$. The types of immunization are shown at the bottom. Open bars represent cSipC-specific IgG titer and gray bars designate the titer of FliC-specific IgG. Significant differences ($P < 0.05$) were analyzed between groups LCS, LCF, LCSF, LCFS, LCN, and PBS, or between cSipC, cSipC + Fla, and PBS. ND: not detected.

Table 2. Antigen-specific IgG1/2a ratio.

(a)		
Immunization group	IgG1/2a ratio	
LCS	0.56 ± 0.16	} <i>P</i> <0.05
LCFS	0.58 ± 0.15	
LCSF	0.63 ± 0.26	
cSipC	1.28 ± 0.17	
cSipC+FliC	1.06 ± 0.02	

(b)		
Immunization group	IgG1/2a ratio	
LCF	1.07 ± 0.04	} <i>P</i> <0.05
LCFS	0.95 ± 0.04	
LCSF	0.79 ± 0.17	
cSipC+FliC	1.11 ± 0.05	

The ratios of cSipC-specific (a) or FliC-specific (b) IgG1/2a were calculated from endpoint titers (\log_{10}) of the specific IgG1 and IgG2a titers. Values represent mean ± SD.

平成 21 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）
第 3 世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と
リスクコミュニケーションに関する研究
分担研究報告書（平成 21 年度）

(iii) 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

2009 年 1 月に FDA は「遺伝性の組換え DNA 構成体を含む遺伝子操作動物についての規制」について産業界向けガイダンスを公表した。その内容は今まで動物医薬品として取り扱っていた遺伝子組換え魚類を食品として取り扱うとする記述があることから、遺伝子組換え魚類の食用として利用についても対応を取ることが考えられる。FDA は申請中の案件については途中経過を公表しない、としていることから未だに何も報告されていない。一方、申請を提出した AquaBounty Technologies 社はホームページ上で FDA から請求された研究資料は全て提出し、許可がおりるのを待っている状態であることを公表している。同社は許可がおり次第、商業規模での試験養殖をする計画を立てていることも公表している。

2009 年に公表された遺伝子組換え魚に関する論文はサケ科魚類やコイを用いた報告以外に前年に引き続き、微細藻類に牛由来のラクトフェリン遺伝子を導入し、この遺伝子組換え微細藻類を餌として与えたあと、攻撃試験を行って耐病性が付与されたことを確認した、といった新しい取組みの論文が報告された。中国で行われた遺伝子組換えコイを用いた報告もされているが、中国における遺伝子組換え魚の制度上の進捗状況に関する情報は見つけられなかった。

研究協力者
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。調査は遺伝子組換え大西洋サケを食品として申請している AquaBounty Technologies 社のホームページを中心に調査し、2009 年に報告された文献のうち、組換え魚類について検索を行った。また、これまで発表されている遺伝子組換え大西洋サケについて整理した。

C. 研究結果

遺伝子組換え大西洋サケを 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 AquaB

ounty Technologies 社 (<http://www.aquabounty.com/>) が FDA に申請中であつた。FDA は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が、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い、翌年 1 月に正式なガイダンスを発表した。この中で、食用を目的とした遺伝子組換え魚類についての記述のあることから、AquaBounty Technologies 社が申請している遺伝子組換え大西洋サケについても食品として検討することになったと思われる。同社ホームページ上の 11 月 22 日付けのプレスリリース画面上では FDA が要求する研究資料は全て提出したこと、2010 年中には許可がおりることを予想していること、商業規模で野外試験を行うため遺伝子組換え大西洋サケの受精卵を提供する準備をしていること、などが報告されている。同社のホームページ上の情報では販売を計画している遺伝子組換え大西洋サケは全雌 3 倍体 (XXX 型) にして販売すること、不凍化タンパクは産生していないこと、成長ホルモンも野生種と比べてレベルが増加することはないことを報告している。しかし、中国の遺伝子組換えコイを用いた研究では血清中の成長ホルモン量は野生種が季節変化があるのに対し、成長ホルモン遺伝子を導入

したコイでは季節変化が無く、その量は野生種に比べ54倍から256倍高かったことが報告されている。

遺伝子組換え大西洋サケに関する論文では成長促進作用の確認、代謝や遊泳能力を比較して、酸素吸収量は野生種と比べ1.7倍高いこと、遊泳能力は大差がないこと、摂餌行動は野生種に比べ活発であるが、捕食者が存在する場合にも摂餌行動を取ることから捕食される可能性が高いことなどが報告されている。また、野生種の2倍体と3倍体の遊泳力を比較し、有意差が無かったことも報告されている。導入した遺伝子について調べた結果、組織特異的発現はなかったことなどが報告されている。これらの文献については資料として、その要旨を添付する。

前年に引き続き、台湾の研究者が微細藻類に牛由来のファクトフェリン遺伝子を導入した遺伝子組換え微細藻類を作出し、これを餌として食べられたメダカを用いて病原菌で攻撃試験を行い、耐病性が付与されたことを確認した報告を出した。

D. 考察

微細藻類に遺伝子を導入して、その遺伝子導入微細藻類を餌として動物プランクトンを培養し、それを餌として魚類を飼育することによって、結果的に魚類に遺伝子を導入しなくても目的の形質を付与することが可能である、という論文は注目してよい研究である。ただし、遺伝子導入微細藻類の環境への拡散が懸念されることから今後の給餌方法等の情報が望まれる。

遺伝子組換え大西洋サケの代謝や遊泳能力、2倍体と3倍体の比較をした結果の論文では成長や酸素吸収量などで組換え魚が優位に高かった報告があるが、捕食者が存在しても摂餌行動を取ることから捕食者に捕まる可能性も高いことを考えると、これらの遺伝子組換え大西洋サケが自然界に逃避した場合に特に優位な生態的位置を占めるとは考えにくい。

全て生産する個体は3倍体であることをホームページ上で述べているが、全ての個体をチェックすることをしなければ現在の技術で2倍体が混在していないことを証明することは難しい。実際に養殖された場合には、これらのチェック体制も必要であると思われる。

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、審査中である。途中経過が公表されないことから、申請会社である AquaBounty Technologies 社のホ

ームページに今後とも注意していく必要がある。

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.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 (2009 年以降に報告された主な論文)

1. Devlin, R. H., Sakhrani, D., Tymchuk, W. E., Rise, M. L. and Goh, B., 2009. Domestication and growth hormone transgenesis cause similar changes in gene expression in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). PNAS, 106(9), 3047-3052.
2. Duan, M., Zhang, T., Hu, W., Sundstroem, L. F., Wang, Y., Li, Z., Zhu, Z., 2009. Elevated ability to compete for limited food resources by 'all-fish' growth hormone transgenic common carp *Cyprinus carpio*. J. Fish Biol., 75(6), 1459-1472.
3. Dunham, R. A., 2009. Transgenic fish resistant to infectious diseases, their risk and prevention of escape into the environment and future candidate genes for disease transgene manipulation. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 32, 139-161.
4. Higgs, D. A., Sutton, J. N., Kim, H., Oakes, J. D., Smith, J., Biagi, C., Rowshandeli, M. and Devlin, R. H., 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, 127-137.
5. Le Curieux-Belfond, O., Vandelac, L., Caron, J. and Séralini, G.-É., 2009. Factors to consider before production and commercialization of aquatic genetically modified organisms: the case of transgenic salmon. Environ. Sci. Policy, 12, 170-189.
6. Leggatt, R. A., Raven, P. A., Mommsen, T. P., Sakhrani, D., Higgs, D., Devlin, R. H., 2009. Growth hormone transgenesis influences carbohydrate, lipid and protein metabolism capacity for energy production in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Comp. Biochem. Physiol. B, 154(1), 121-133.
7. Li, D., Hu, W., Wang, Y., Zhu, Z. and Fu, C., 2009. Reduced swimming abilities in fast-growing transgenic common carp *Cyprinus carpio* associated with their morphological variations. J. Fish Biol., 74, 186-197.
8. Li, S. and Tsai, H., 2009. Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. Fish Shellfish Immunol., 26, 316-325.
9. Novoa, B., Bowman, T. V., Zon, L. and Figueras, A., 2009. LPS response and tolerance in the zebrafish (*Danio rerio*). Fish Shellfish Immunol., 26, 326-331.
10. Rehbein, H. W., Devlin, R. H., 2009. No evidence for enhanced parvalbumin concentration in light muscle of transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Eur. Food Res. Technol. 229(4), 579-584.
11. Tymchuk, W. E., Beckman, B. and Devlin, R. H., 2009. Altered expression of growth hormone/insulin-like growth factor I axis hormones in domesticated fish. Endocrinology, 150(4), 1809-1816.
12. Tymchuk, W., Sakhrani, D., Devlin, R., 2009. Domestication causes large-scale effects on gene expression in rainbow trout: Analysis of muscle, liver and brain transcriptomes. Gen. Comp. Endocrinol., 164(2-3), S., 175-183.
13. Zhong, S., Wang, Y. -P., Pei, D. -S., Luo, D. -J., Liao, L. -J., Zhu, Z. -Y., 2009. A one-year investigation of the relationship between serum GH levels and the growth of F-4 transgenic and non-transgenic common carp *Cyprinus carpio*. J. Fish Biol., 75(5), 1092-1100.

遺伝子組換え大西洋サケに関する論文

1. 全て魚類由来の長ホルモン遺伝子構築物の使用による遺伝子組換え大西洋サケの成長促進 ; S. J. Du, Z. Gong, G. L. Fletcher, M. A. S., M. J., King, D. R. I, C. L. Hew, Bio/Technology 10, 176-181 (1992)

マスノスケの成長ホルモン cDNA クローンと連結したゲンゲの不凍タンパク質遺伝子 (AFP) プロ

モーターを使用し、「全魚類」成長ホルモンキメラ遺伝子構築物を開発した。卵門を通して大西洋サケの受精卵に微量注入し、遺伝子組換え大西洋サケを作出した。特別なオリゴヌクレオチドプライマーを使用したPCR反応により組換え遺伝子の存在を検出した。このような遺伝子組換え大西洋サケの多くは成長速度が劇的に向上した。1歳時点において、遺伝子組換え大西洋サケは平均して2~6倍の成長を遂げ、遺伝子組換え大西洋サケの最大のもは平均的な非組換えの対照大西洋サケの13倍の大きさに達した。

2. 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおける呼吸代謝および遊泳能力 ; E. D. Stevens, A. Sutelin, T. Cook, Can. J. Fish. Aquat. Sci. 55, 2028-2035 (1998)

本論文では、成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケの酸素吸収量は、同程度の大きさを有する対照大西洋サケと比較して通常の養殖環境において、また強制遊泳時においてより高いことを示す。成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケはまた、酸素吸収を抑制する臨界酸素水準が若干高い。しかし、臨界遊泳速度に関しては差異が見られない。12~13°Cで生育した成長ホルモン遺伝子組換え大西洋サケ *Salmo salar* は、遺伝子組換え F1 の雌と非遺伝子組換え雄の精子を用いて作出した F2 世代を用いた。遺伝子組換え大西洋サケは試験期間を通し、対照サケと比較して3倍の早さで成長した。通常の養殖環境においては、遺伝子組換え大西洋サケと対照大西洋サケの両方とも、酸素吸収量について日内周期を示した。しかし、遺伝子組換え大西洋サケの酸素吸収量は一日のどの時点においても対照サケの1.7倍に達した。10mg/Lを超える酸素濃度の場合、いずれの大西洋サケにおいても酸素濃度と酸素吸収量に関係は見られなかった。すなわち、臨界酸素吸収水準は遺伝子組換え大西洋サケでは6mg/Lであり、対照大西洋サケでは4mg/Lであった。酸素量が減少した場合、遺伝子組換え大西洋サケと対照大西洋サケは同水準の低い酸素濃度において体の均衡を失った。遊泳トンネル内では、遺伝子組換え大西洋サケの酸素吸収量は遊泳速度にかかわらず対照大西洋サケの1.6倍であった。臨界遊泳速度は遺伝子組換え大西洋サケ、対照大西洋サケのいずれも変わらず、サケ科についての文献値と同様である。

3. 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおけるスマルト発達 ; R. L. Saunders, G. L. Fletcher, C. L. Hew, Aquaculture 168, 177-193 (1998)

スマルト発達に関する本研究では、ゲンゲ (*Macrozoarces americanus*) の不凍タンパク質遺伝子プロモーターおよびマスノスケ (*Oncorhynchus tshawytscha*) の成長ホルモン遺伝子より構成される遺伝子構築体を用いて作出した成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) を使用した。1995年11月、遺伝子組換え F₁ の精子と通常雌の卵を用いて F₂ 世代の遺伝子組換え大西洋サケを作出し、1996年1月に孵化し2月には摂餌活動を開始した。当初高水温 (16°C) で飼育し、気温と照光時間を様々に変えて操作することで、遺伝子組換え大西洋サケは6月にはスマルトサイズ (16cm) に近づいた。通常の大西洋サケは10cmに達していなかった。遺伝子組換え大西洋サケの大部分は6月に塩分濃度 3.5‰の海水に直接放流後 96時間以上生き延びた。一方、通常の大西洋サケの生存時間は24時間を下回った。遺伝子組換え大西洋サケはエラの Na⁺/K⁺-ATP アーゼの作用水準が高く、6月後半には低下に転じたが、これはスマルトの状態を示唆するものである。7月初めに海水に移した後、様々な温度と照光時間に適応させた遺伝子組換えサケは急速に成長し、1996年10月に観測を中止するまでの間、死亡率も低水準であった。高温 (16°C) で飼育した場合、非遺伝子組換え大西洋サケにおいては Na⁺/K⁺-ATP アーゼの作用の発達あるいは高い水準での作用の維持が妨げられたが、遺伝子組換え大西洋サケにおいてはエラの ATP アーゼの作用水準はわずかに低くなるにとどまった。遺伝子組換え大西洋サケは海水中で4カ月にわたり生存し、順調に生育した。同様に、定常光 (LD:24) を照射した別の実験では、非組換え大西洋サケでは正常なスマルト発達が阻害されたが、組換え大西洋サケではスマルトの発育が阻害されたりスマルト後の発育や海水での生育に悪影響が生じたりすることはなかった。実験の種類にかかわらず、遺伝子組換え大西洋サケは生後6カ月でスマルトが終わり、海水中で十分に生存・成長することが結論付けられた。成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケの成長に差別的な温度・照光時間で非組換えサケを飼育した場合、正常なスマルト発達およびスマルト後の能力に阻害が生じると思われる。

4. 成長促進遺伝子導入大西洋サケの採食行動および捕食者に対する行動 ; M. V. Abrahams, A. Suttelin, Anim. Behav. 58, 933-942 (1999)

捕食リスクを伴う摂餌行動に影響する主要なパラメーターとして成長速度が用いられてきた。遺伝子操作により、成長ホルモン導入遺伝子を持ち後世に伝えるよう生育された遺伝子組換え大西

洋サケは、非組換え大西洋サケと比較し成長速度が大幅に高くなった。このような成長促進遺伝子導入大西洋サケを使用し、相対的な成長速度は補足者に対する暴露リスクを負うことに対する積極性と関連があるという仮説を検証するために直接試験を実施した。大きさの合致する遺伝子組換え大西洋サケおよび対照大西洋サケに対し、大西洋サケが安全に食料を確保できる場所と捕食者のいる場所で合わせて2回の実験を行った。最初の実験ではプラキシガラスの仕切の裏に捕食者を追いやり（死のリスクはない）、2回目の試験では大西洋サケに対し、捕食者と同じ仕切りの中で採食しなければならないようにした（明らかな死のリスクがある）。これらの実験中、遺伝子組換え大西洋サケは対照大西洋サケと比べて採食速度がおおよそ5倍速く、また動く速度が対照大西洋サケと比べて約2倍であった。遺伝子組換え大西洋サケは捕食者のいる中で採食に費やす時間が有意に長く、またその場所で消費する食物の量も明らかに多かった。実際に捕食される危険がある場合、対照大西洋サケはほとんどの場合危険な場所を回避した。遺伝子組換え大西洋サケは危険な場所でもより控えめではあったが採食活動を続けた。これらのデータは、遺伝子組換えにより成長を促進した場合、採食活動中に大西洋サケが自ら受けるリスクが高まることを示している。成長速度を高めるために必要な遺伝子操作が進化的変化により実現可能であるならば、大西洋サケの成長速度を捕食リスクに応じて最適化できる可能性があることを以上の実験は示唆している。

5. ウィンターフラウンダーの不凍タンパク質遺伝子を導入された遺伝子組換え大西洋サケの肝臓特異的・季節的発現 ; Hew, C., Poon, R., Xiong, F., Gauthier, S., Shears, M., King, M., Davies, P. And Fletcher G., Transgenic Res., 8(6), 405-414 (1999)

ウィンターフラウンダーの不凍タンパクを導入した遺伝子組換え大西洋サケの継承と導入遺伝子の発現を調べた。主要肝臓型の不凍タンパク遺伝子(wf1AFP-6)由来の2A-7クローンが大西洋サケゲノム中に導入された。遺伝子導入が確認された個体からF3が作出された。サザンブロット解析でF3遺伝子組換え大西洋サケの特異的な部位に1コピーだけが導入されていることが示された。導入部位がクローニングされ、調べられた。ノーザン解析では不凍タンパク mRNA が肝臓だけで発現し、しかも季節的变化があることが示された。F3個体全ての血清中で不凍タンパク前駆体タンパクが同程度のレベルで含まれ、また、血清は不

凍活性の存在を示す特徴的な六方晶氷結晶パターンを示した。更に不凍タンパク前駆体レベルは11月に最も高く、5月に最も低いという季節によって変わることが明らかにされた。この研究は遺伝子組換え大西洋サケ1469個体全てのF3で不凍タンパクの組織特異的で安定的な発現を示した。

6. 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおける消化管の形態 ; E. D. Stevens, G. N. Wagner, A. Sutterlin, J. Fish Biol. 55, 517-526 (1999)

12~13°Cで生育した成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ *Salmo salar* はF₂世代にあたり、遺伝子組換え F₁ 世代雌の卵と非組換え雄の精子を用いて受精させて作出した。組織の採取時、遺伝子組換えサケは対照サケと比較して1.6倍早く成長していた。遺伝子組換え大西洋サケには対照大西洋サケのものよりも長い腸の折り目が数多く見られた。そのため、遺伝子組換え大西洋サケは前小腸（対照サケと比べて表面積1.5倍）および幽門垂（対照サケと比べて表面積1.2倍）の両方について、消化管の表面積はより大きかった。ほとんどの場合、遺伝子組換え大西洋サケの腸および幽門垂は形態学的に対照大西洋サケと比較して大きいという特徴が見られた。特に、前小腸の表面積は成長速度の違いと一致していた。

7. 成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおける消化管の形態 ; E. D. Stevens, A. Suttelin, Environ. Biol. Fishes 54, 405-411 (1999)

成長促進遺伝子導入大西洋サケの呼吸器系の形態学的特徴として、多くの場合同様のサイズの対照大西洋サケと比べて大きいことが挙げられる。成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ *Salmo salar* は、遺伝子組換え F₁ 雌の卵と非組換え雄の精子を用いて作出した F₂ 世代にあたる。エラの組織を採取した時点で、遺伝子組換え大西洋サケは非組換えの対照大西洋サケと比べて生育速度が2.1倍早く、また対照大西洋サケと比べて酸素吸収速度が約1.6倍早かった。本研究では、遺伝子組換え大西洋サケにおける呼吸に利用可能なエラの表面積は対照大西洋サケと比べて約1.24倍であり、酸素吸収速度の1.6倍には及ばないことを示す。エラの呼吸面積が増加するのは、主に各エラの繊維が比較的均一に増加するためである。

8. 食物欠乏が成長促進遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) の酸素消費および身体形成に対し及ぼす影響 ; J. T. Cook, A. M. Suttelin, M. A. McNiven, Aquaculture 188, 47-63 (2000)

F₂世代成長促進遺伝子導入大西洋サケにおいて食物欠乏が酸素消費速度およびエネルギー備蓄の利用・活用速度に対し及ぼす影響について、スマルト前の体重8gから55gまで間隔をおいて非組換え大西洋サケとの比較を行った。食物欠乏を経験した8週間のうちほとんどの期間において、遺伝子組換え大西洋サケは対照大西洋サケと比較して酸素消費速度が早かっただけでなく、飢餓が進行するにつれて酸素消費量の減少も急速であった。その結果、当初の体重および食物欠乏の期間の長さによっては、遺伝子組換えサケの酸素消費速度は対照大西洋サケの酸素消費量と同等あるいはそれ以下の水準にまで減少した。遺伝子組換え大西洋サケは対照大西洋サケと比べて、より急速に体のタンパク質、乾燥物、脂質、エネルギーを使い果たした。さらに、両グループにおいて、脂質はタンパク質よりも早く異化された。非組換え大西洋サケでも観察されるのと同様に、遺伝子組換え大西洋サケは飢餓時に代謝速度を低下させる能力を示すが、高い代謝速度を維持する傾向があり、さらに最初の内因性エネルギー備蓄量の低さも合わさって、非組換え大西洋サケと比較し、成長促進遺伝子導入大西洋サケが集約的な養殖環境外で最大限に生育する、あるいはそもそも生存しうる可能性は低い可能性があると考えられる。

9. 成長促進遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) の成長速度、身体形成、食物の消化能力および転換能力 ; J. T. Cook, M. A. McNiven, G. F. Richardson, A. M. Sutterlin, *Aquaculture* 188, 15-32 (2000)

成長促進遺伝子導入大西洋サケにおいては成長速度の劇的な改善が見られたが、本技術の商業利用を実施する前に、商業的に重要な数々の生産特性を生み出す生理学に関して一層の情報を得る必要がある。そのため、F₂世代成長促進遺伝子導入大西洋サケの成長速度、食物の消化能力、食物の転換能力、身体形成について、スマルト前の8~55gの成長段階で間隔をおいて非組換え大西洋サケとの間で比較した。成長促進遺伝子導入大西洋サケは、研究対象とした体重間隔において非組換え大西洋サケと比較し成長速度が2.62倍から2.85倍に達した。当該体重間隔における遺伝子組換え大西洋サケの一日の食物消費量は、対照大西洋サケと比較して2.14倍から2.62倍に達した。遺伝子導入によってもタンパク質およびエネルギーの吸収範囲には影響は生じず、いずれも比較可能な体重間隔で測定した消化係数は遺伝子組

換え大西洋サケではそれぞれ88%および81%、対照大西洋サケではそれぞれ90%、84%であった。しかし、総飼料転換効率については遺伝子組換え大西洋サケは対照大西洋サケと比較し10%の改善が見られた。遺伝子組換え大西洋サケの体内のタンパク質、乾燥物、灰分、脂質、エネルギーは対照大西洋サケと比べて有意に少なく、一方水分は有意に多かった。本研究で使用した遺伝子導入実験対象の大西洋サケは、大西洋サケの通常の範囲を超えて成長を加速させるのに必要な生理的可塑性を有しており、食欲が高まり、体が細くなることを除けばほとんど影響は見られない。

10. スマルト前の成長促進遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) の代謝速度 ; J. T. Cook, M. A. McNiven, A. M. Sutterlin, *Aquaculture* 188, 33-45 (2000)

遺伝子組換え大西洋サケの代謝速度がより早くなるか調べるために、スマルト前の体重8~55gの段階で間隔をおいて成長促進遺伝子導入大西洋サケの定常酸素消費速度を非組換えサケと比較した。食物摂取による熱量増加も含めた遺伝子組換え大西洋サケの定常酸素消費速度 (mg O₂/時) は、対照大西洋サケと比べて1.54~1.70倍に達した。しかし、最初の食物摂取からスマルトサイズに達するまでの時間全体でみると、遺伝子組換え大西洋サケはスマルトサイズに達するまでに、非組換えの対照大西洋サケと比べて酸素の実際の総消費量は42%少なかった。摂餌後状態(24時間の飢餓状態)においては、遺伝子組換え大西洋サケの同条件における酸素消費速度は通常の大西洋サケと比べて1.58~2.30倍高かった。スマルトを生産する側にとっては、このような成長促進された魚類の活発な代謝を支えるために短時間でより多くの水あるいは酸素が必要になるという新たなデメリットはあるものの、スマルトの生産に必要な時間の短縮という利益を考えれば妥当なものと思われる。

11. 二倍体および三倍体の遺伝子組換え大西洋サケ (*Salmo salar*) の血液学 ; A. T. Cogswell, T. J. Benfey, A. M. Sutterlin, *Fish Physiol. Biochem.* 24, 271-277 (2002)

本研究は、大西洋サケの代謝速度と血液学の相互作用について明らかにするために、二倍体および三倍体遺伝子導入大西洋サケおよび非組換え大西洋サケの赤血球の高さおよび長さ、ヘマトクリット、血中総ヘモグロビン濃度、平均細胞ヘモグロビン量を調べたものである。いずれの遺伝子型

についても、三倍体遺伝子導入大西洋サケ赤血球は二倍体赤血球と比較して有意に長く、それと比例して薄い。このような形態上の差異により、三倍体大西洋サケの赤血球は幅が長さの 53%程度と楕円形の外見であるのに対し、二倍体大西洋サケの赤血球は幅が長さの 62%程度とより丸型である。同様に、二倍体および三倍体遺伝子導入大西洋サケの赤血球は、非導入サケの赤血球と比べて有意に短く薄い ($P < 0.0001$)。有意な差異ではないが、チャンネル式コールターカウンターを使用した観察により、遺伝子組換え大西洋サケの赤血球は同倍数の非組換え大西洋サケの赤血球と比べて総数は多く、サイズは小さいことが示された。遺伝子組換え大西洋サケは活発な代謝速度に対応できるよう、体積に対し表面積が大きい赤血球を生成するものと思われる。同一倍数体の遺伝子組換え大西洋サケと非組換え大西洋サケの間に、その他の大きな血液学上の差異は見出されなかった。

12. 二倍体および三倍体大西洋サケの耐久遊泳 ; S. P. Cotterell, C. S. Wardle, J. Fish Biol., 65(Supplement A), 55-68 (2004)

体長 33.0 ± 1.4 cm の二倍体 (平均 \pm s. e. 体長は記号 L_F で表す) および三倍体 (体長 35.3 ± 0.5 cm) の大西洋サケ *Salmo salar* の集団が、念入りに監視された直径 10m の円形タンクの中で制御された速度で遊泳を強制された場合、魚が好気呼吸の能力限界で遊泳する最大持続的遊泳速度 (記号 U_{ms} 、200 分持続可能な速度) には有意な差は見られなかった。二倍体は 1 秒当たり体長の 2.99 倍の速度 (単位 $bl\ s^{-1}$) ($0.96\ m\ s^{-1}$) を持続し、三倍体は $2.91\ bl\ s^{-1}$ ($1.02\ m\ s^{-1}$) の速度を維持した。試験実施にあたり魚を選択する際には、タンクの半径に沿って回転するガントリーから映し出された動くパターンに沿って遊泳できることを基準としており、選択手順には倍数により有意な差があるとは認められなかった。有意な差は、継続的な遊泳速度における耐久時間で測った魚の嫌気能力の違いに見られた。実験の最中、魚による自発的な遊泳速度は高まり、魚群行動は改善された。タンクの曲がり角が魚の遊泳速度に与える影響について計算した (タンクの曲がり角の影響を取り除くことで、二倍体・三倍体いずれに対しても速度は 5.5% 増加した)。三倍体大西洋サケの養殖に関連して、耐久時間および速度の有する意味合いについて検討する。

13. スモルト後の成長ホルモン導入大西洋サケ *Salmo salar* における呼吸循環器系の変化および

限界 ; E. J. Deitch, G. L. Fletcher, L. H. Petersen, I. A. S. F. Costa, M. A. Shears, W. R. Driedzic, A. K. Gamperl, J. Exp. Biol. 209, 1310-1325 (2006)

近年、成長ホルモン遺伝子導入がどのように魚の生態に影響を与えるかについて関心が高まっている。しかし、遺伝子組換え魚類と非組換え魚類の生育環境・生育歴は非常に異なるため、研究結果の解釈は大変困難であることも多い。本研究では成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケの呼吸循環器系の生態について包括的に調べるため、対照大西洋サケと共有のタンクで生育した ($10^{\circ}C$ で最大 9 ヶ月間) 大きさの合致する成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケ (*Salmo salar*) の安定発現系統を使用したものであり、同時形態形成理論の新しい試験として位置づけられる。成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケは成長速度が 3.6 倍早く、また質量特異的な定常酸素消費量および標準酸素消費量 (M_{O_2}) はそれぞれ 21%、25% 高かった。しかし、最大 M_{O_2} には同時増加が見られず、その結果遺伝子導入大西洋サケの代謝範囲は 18%、臨界遊泳速度は 9% 減少した。遺伝子導入大西洋サケの心臓が 29% 大きく、質量特異的な最大 *in situ* 心臓拍出量が 18% 高く、ストレス後の血中ヘモグロビン濃度が 14% 高く、赤色筋および心臓の好気性酵素 (クエン酸シンターゼまたはシトクロームオキシダーゼ) の作用が 5~10% 活発であり、静止状態でのカテコラミン水準は 2 倍、ストレス後のカテコラミン水準は 1.7 倍高いことを考えると、このような代謝能力・効率の低下は驚くべきことであった。しかし、呼吸循環器系に関する指標のうちエラの表面積のみは拡大しておらず、我々の有するデータではエラからの酸素移動は限定的であることが示唆されている。全体的には、本研究では以下の点が確認された。(1) この大西洋サケの系統において成長ホルモン遺伝子導入により有意な代謝面コストが生じることが示された。(2) 成長ホルモン遺伝子導入により心機能が增强される直接の証拠が初めて示された。(3) 同時形態形成により示唆されるような、スモルト後 (成魚) に成長ホルモン遺伝子導入大西洋サケにおいて呼吸循環器系の生理機能の全般的な発現増加は見られない。(4) 動脈を通じた酸素移動に関する差異 (心臓拍出量や血液酸素運搬能など) は、異なる種間の好気呼吸に関する差異を決定づける重要な要因であるが、同じ種の中で代謝・遊泳能力の大幅な改善を実現するには拡散律速過程を増進させる必要があるという考え方が支持された。