

国連食糧農業機関
世界保健機関

組換え DNA 動物由来食品の安全性評価に関する FAO/WHO 合同専門家会議

世界保健機関本部 ジュネーブ (スイス)

2007年2月26日 - 3月2日

報告書

本文書は、世界保健機関 (WHO) および国連食糧農業機関 (FAO) の公的な刊行物ではなく、両機関がその著作権を所有する。本文書の一部または全体を検討・抜粋・複製・翻訳することは自由であるが、本文書の販売や営利目的での使用は禁ずる。

本報告書に示す見解は合同専門家会議参加者の見解であり、WHO および FAO の意見を意味するものではない。

FAO and WHO 2007

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

目次

	ページ
要旨.....	3
1. 緒言.....	5
2. 背景.....	5
3. 適用範囲.....	6
4. マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子.....	7
4.1 緒言.....	7
4.2 主な考察.....	8
5. 非遺伝性のアプリケーション.....	13
5.1 緒言.....	13
5.2 背景.....	14
5.3 主な考察.....	15
6. 結論.....	26
6.1 マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子に関する結論.....	26
6.2 非遺伝性のアプリケーションに関する結論.....	26
7. 提言.....	27
7.1 マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子に関する提言.....	27
7.2 非遺伝性のアプリケーションに関する提言.....	28
8. 参考文献.....	30
9. 用語集.....	31
参加者一覧.....	33
文書一覧.....	34

要旨

2007年2月26日から3月2日まで、ジュネーブの世界保健機関（WHO）本部において、組換えDNA動物由来食品の安全性評価に関するFAO/WHO合同専門家会議が開かれた。会議の目的は、FAO/WHO およびその加盟国に対し、i) マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子、ii) 非遺伝性のアプリケーションという2組の質問事項についての科学的助言を行うことであった。これらの質問事項に関しては、事前にコーデックス・バイオテクノロジー応用食品特別部会から具体的な助言の要請があった。本会議は、魚を含む遺伝子組換え動物に由来する食品の安全性評価に関するFAO/WHO合同専門家会議（FAO/WHO、2004）の結論および提言に基づいて設けられたものである。

植物や実験動物には、各種のレポーター遺伝子や選択マーカー遺伝子が幅広く使用されており、今や食用動物にも用いられるようになってきている。現在、食用を意図した組換えDNA動物の生産に抗生物質耐性のないマーカー遺伝子およびレポーター遺伝子が用いられることはほとんどなく、また、その食品安全性に関する研究は行われていない。今後、抗生物質耐性のない新たな選択マーカー遺伝子の開発が望まれる。

DNA切出し系と呼ばれる、特定のDNA配列を効果的に除去する技術は、主に実験動物に用いられてきたが、食用動物でも次第に用いられるようになってきている。したがって、DNA切出し技術の継続的な妥当性確認と開発が強く推奨される。非意図的影響が生じる可能性を最小限に抑えるためには、導入したDNA切出し遺伝子が、食用を意図した組換えDNA動物内に残らないようにすることが必要である。非抗生物質耐性マーカー遺伝子およびDNA切出し系の食品安全性については、さらなる研究が必要である。

動物に導入される組換えDNA構成体には、遺伝性と非遺伝性のデザインがある。非遺伝性の構成体は、生産性や動物の健康を改善する目的で、あるいは組換えDNAワクチンの投与により疾患を予防する目的で用いられることもある。また、非遺伝性の構成体は、体細胞ゲノムに組み込まれることもある。

組換えDNA構成体の食品安全性に関する相違は、当該の構成体が遺伝性か非遺伝性かということではなく、それがゲノムに組み込まれているか、それともエピソームに保持されているかによって決まる。遺伝性および非遺伝性の構成体を含む組換えDNA動物がもつ食物消費リスクの主な質的相違は、非遺伝性の構成体の送達を促す賦形剤（excipient）が組換えDNA動物の体内に残存するか否かという点にある。

動物の健康および食物消費リスクの量的相違は、エピソームに保持されている構成体が水平遺伝子伝達に関与し、おそらくは組換えが行われて機能性のウイルス粒子を生成する可能性が高まることと関係がある。近年、非ウイルス性のエピソームベクターが開発されたことで、ウイルスをベースとしたベクター系にまつわる懸念の多くを払拭する手段が得

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

られたと言える。

構成体におけるウイルス配列の使用および水平遺伝子伝達の潜在的影響によって食品安全性が影響を受けるか否かを理解するには、さらなる研究の実施が求められる。ウイルス由来ベクターの安全な使用を含め、動物の健康にかかわる明確な問題に対処するために、ガイドラインを作成する必要がある。かかるガイドラインの作成にあたっては、国際獣疫事務局（OIE）の立場に立脚するのが適切であろう。

動物の健康と食品または飼料としての組換え DNA 動物の安全性との間には、相互的な関係が存在する。なかでも重要な問題のひとつは、非遺伝性の構成体の一種である組換え DNA ワクチンの適用によって浮上した動物の健康と食品安全性の問題であり、この問題は早急に詳しく採り上げる必要がある。FAO、WHO、OIE などの関連組織は相互に協力し合い、これらの問題の相互作用に適切に対処することが重要である。

1. 緒言

2007年2月26日から3月2日まで、ジュネーブの世界保健機関（WHO）本部において、組換えDNA動物由来食品の安全性評価に関するFAO/WHO合同専門家会議が開かれた。会議には合計18名の専門家が参加した。参加者の一覧を付録1に示す。

WHOのCluster of Sustainable Development and Healthy Environment〔持続可能な開発と健全な環境グループ〕で事務総長補佐を務めるSusanne Weber-Mosdorf氏が、事務総長に代わり、WHOおよび国連食糧農業機関（FAO）を代表して開会を宣言した。

開会の挨拶の中で、Weber-Mosdorf氏は、食品安全性全般の向上、ヒトの健康保護、食品供給の安全性に対する消費者の信頼強化を目標として、WHOとFAOが加盟国やコーデックス委員会に対して科学的助言および技術的指針を提供する立場にあることを改めて確認した。

さらに、Weber-Mosdorf氏は、モダン・バイオテクノロジーがヒトの健康増進と発展に直接・間接に貢献しうることを認める一方で、新たなテクノロジーの利用がヒトの健康および/または環境を潜在的な危険に曝す可能性があることを指摘し、したがって、モダン・バイオテクノロジー応用食品の安全性について首尾一貫した評価を促すためには、科学的証拠に基づく共通のシステムが必要であると述べた。

本会議では、Anne R. Kapuscinski教授を議長に選出し、報告担当者にLisa Kelly博士を任命した。また、会議内で2つの作業グループを設置することを決定し、レポーター遺伝子およびマーカー遺伝子の問題を重点的に扱う作業グループAと、非遺伝性のアプリケーションの問題を扱う作業グループBが設置された。

作業グループAについては、本会議でHeiner Niemann教授が司会者に、Kaare M. Nielsen教授が報告担当者に任命された。作業グループBについては、Larisa Rudenko博士が司会者に、Martin O. Makinde教授が報告担当者に任命された。

参加者はいずれも、FAOおよびWHOの規定に従い、利害関係の表明を行った。

2. 背景

コーデックス委員会は、第27回総会において、コーデックス・バイオテクノロジー応用食品特別部会（以下、「コーデックス特別部会」と呼ぶ）を再度設置し、モダン・バイオテクノロジー応用食品に関する規格、ガイドライン、その他の原則を適宜策定する作業を委託した。

コーデックス特別部会は、2006年11月27日～12月1日に開催された第6回会議において、「組換えDNA動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン原案」につい

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

で議論し、下記の 2 組の疑問について、FAO および WHO の科学的助言を仰ぐことで合意した¹。

- マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子

- ー レポーター遺伝子や選択マーカー遺伝子の開発・利用に関して、どのような進展があったか。
- ー 食品に含まれていてもヒトに対して安全であることが実証されている非抗生物質耐性マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子は存在するか。もしあるとすれば、それは何か。
- ー 特定の DNA 配列を除去したい場合、日常的に利用可能な、信頼できる安全な除去方法は存在するか。

- 非遺伝性のアプリケーション²

- ー 食品安全性の観点から見て、遺伝性の形質をもつ動物と非遺伝性の形質をもつ動物との間に違いはあるか。もしあるとすれば、それは何か。
- ー 遺伝性の形質をもつ動物と非遺伝性の形質をもつ動物に由来する食品の安全性を比較評価する際、特に検討すべき食品安全性に関する問題はあるか（ベクターの種類など）。

FAO および WHO は、魚を含む遺伝子組換え動物に由来する食品の安全性評価に関する FAO/WHO 合同専門家会議（FAO/WHO、2004）の有益な成果を認める一方で、コーデックス特別部会が進めてきた作業に直接関係する問題を一層深く掘り下げ、上記の具体的な質問事項に答えるために、本会議を招集することを決定した。

本会議の付託事項は、上記の質問事項への回答を提示すること、モダン・バイオテクノロジー応用動物食品の安全性評価に関する問題を科学的観点から検討することであった。

3. 適用範囲

会議では、コーデックス特別部会が提出した上記の質問事項が重点的に採り上げられ、その中で、マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子の既知の使用法と、ヒトの食品に供される可能性のある組換え DNA 動物における遺伝性および非遺伝性のアプリケーションの相違について検討が行われた。議論では、ニワトリや畜牛といった陸生の家畜や養殖魚に

¹ ALINORM 07/30/34

² 「非遺伝性のアプリケーション」とは、食品に供される動物の非生殖細胞組織内に核酸を直接導入することを指す。

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

これらの技術を用いた場合の科学的知見が検討された。非遺伝性のアプリケーションについては、リスク評価の初期のステップとして、各種アプリケーションの安全性評価アプローチを提示することに焦点が当てられた。特定のアプリケーションについて詳細なリスク評価を行うことはしなかった。

本会議では、遺伝子組換え動物に関する前回の専門家会議（FAO/WHO、2004）の成果に注目し、その結論と提言に基づいて議論を進めた。したがって、組換え DNA 動物の食品安全性評価に関する全般的なアプローチは、組換え DNA 動物とその適切な比較対象の安全性を比較評価するものであり、これには、食物摂取状況の評価、栄養学的・毒性学的な総合評価と、それに続く詳細なリスク特性の分析が含まれる。

会議では、マーカー遺伝子やレポーター遺伝子および非遺伝性の遺伝子構成体を用いた一部のアプリケーションによって生じうる問題が採り上げられた。その問題とは、組換え DNA 動物の健康や福祉に与える影響、もしくは組換え DNA 動物由来飼料（組換え DNA 魚から作られた魚粉など）が動物の健康面の安全性に及ぼす影響である。これらの問題は、本会議の適用範囲を超えてはいるものの、OIE や FAO など関連組織が採り上げるべき問題である。また、会議では、組換え DNA 動物由来飼料を与えた動物の食品安全性にも言及がなされたが、これも問題としては採り上げなかった。

本会議で用いられた重要な専門用語の定義を「用語集」の項に示す。

4. マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子

4.1 緒言

最初の組換え DNA 飼養動物が作出されたのは、20 年以上前のマイクロインジェクションにより接合子の前核に外来 DNA を注入したことに始まる。効率の悪さやランダムな組み込み、多様な発現パターンなど、重大な欠点があったにもかかわらず、農業や生物医学の分野では、応用が期待される有望なモデルが作出されてきた（Niemann et al., 2005）。マイクロインジェクション技術のもつ限界を克服するために開発されたさまざまな代替手法の中で、体細胞核移植（SCNT）は、組換え DNA 飼養動物の作出を質的にも量的にも大幅に改善する手段として、最も大きな可能性を秘めている。特にこれは、SCNT 前のトランスフェクト細胞の事前スクリーニング、および相対的組換えによる標的遺伝子改変の実現可能性に関係がある。これまでのところ、SCNT は 11 種類の動物種で成功している（Niemann and Kues, 2001; Niemann et al., 2005）。過去 10 年間に SCNT の技術は着実に進歩しており、今では、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジといった組換え DNA 動物の作出に利用されている。しかし、全般的な効率性はまだ満足できるものではなく、特にウシとヒツジでは、一定の割合のクローンに、移植した体細胞核のエピジェネティックな再プログラミングの失敗によると思われる病変が見られる（過大子症候群など）。クローン動物の子

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

孫には、こうした病変は見られない。

現在、既知の機能をもつ遺伝子を導入あるいは除去する複数の技術が利用可能であり、組換え DNA 飼養動物に由来する製品が食品流通に導入される時期がまもなく訪れると予想される。SCNT の登場により、精密なゲノム改変を可能にする分子レベルの手段が利用可能になった。こうした技術には、部位特異的 DNA 組換え酵素による標的染色体組み込みや、食品生産用の飼養動物内で導入遺伝子を時間的・空間的に制御しながら発現させる方法などがある。これら分子レベルの手段は、マウスなどの生物系を用いた広範な研究により、その詳細な特性が明らかになっている (Niemann and Kues, 2003)。一部の飼養動物 (イヌ、ウシ、ニワトリ、ウマなど) のゲノムについては、最初のドラフト配列がすでに明らかにされており、他の動物についてもまもなく公表されると予想される。

SCNT などの技術による組換え DNA 動物作出の成否は、適切なマーカー遺伝子および/またはレポーター遺伝子の利用に基づくトランスフェクト細胞の選択に大きく依存している。遺伝子組換え動物に関する前回の専門家会議 (FAO/WHO, 2004) では、「マーカー遺伝子も含め、遺伝子構成体に不必要な DNA 配列を用いないこと」が提言された。

本会議の目的は、上記の評価を拡大し、組換え DNA 動物を用いた食品生産に関する下記の問題を具体的に採り上げることであった。

- レポーター遺伝子および選択マーカー遺伝子に関する最近の進歩と、組換え DNA 動物由来食品の生産におけるこれらの遺伝子の利用
- 非抗生物質耐性マーカーやレポーター遺伝子の食品への利用可能性と、それらを食品に用いた場合のヒトへの安全性
- 特定の DNA 配列を除去する技術の信頼性および安全性

4.2 主な考察

4.2.1 レポーター遺伝子および選択マーカー遺伝子に関する最近の発展と、組換え DNA 動物におけるこれらの遺伝子の利用

組換え DNA 動物の作出には、種によってさまざまな方法が用いられる。これには、(1) 胚の前核または細胞質に DNA を直接注入する方法、(2) トランスポゾンまたはレンチウイルスベクターを用いて DNA を導入する方法、(3) DNA とともにインキュベートした精子により DNA を導入する方法、(4) 多能性細胞に DNA を導入し、キメラトランスジェニック動物を作出する方法、(5) トランスジェニック・クローン動物を作出するのに用いた体細胞に DNA を導入する方法がある。DNA 導入方法には、ランダムな遺伝子追加・置換および相同的組換えによる標的遺伝子の追加・置換の両方が考えられる。上記 1、2、3 の方法では、十分な組み込み効率が得られ、選択マーカー遺伝子が不要になる場合もある

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

が、標的遺伝子の追加・置換や、外来 DNA を導入する細胞が豊富に存在する場合には、選択マーカー遺伝子が必要不可欠である（4、5の方法）。

標的化遺伝子導入はまれであり、これには細胞のポジティブセクションとネガティブセクションが必要であることが多い。ポジティブセクションは、目的の遺伝子が組み込まれなかった細胞を除去するものであり、通常は抗生物質耐性マーカー遺伝子を用いて行われる。ネガティブセクションは、目的の遺伝子が意図した部位に特異的に組み込まれない細胞を除去するものであり、細胞毒性物質を発現する遺伝子によって促進される。

本会議では、以下の定義を用いた。

- a) **マーカー遺伝子**は、動物細胞への DNA 導入が成功したか否かを確認するのに用いられる。マーカー遺伝子は、選択および／またはスクリーニングに用いられる。
- b) **選択マーカー**とは、動物細胞に導入され、人工的選択に適した形質を生じる遺伝子をいう。選択マーカーは、一般に殺細胞作用や増殖阻害作用をもつ選択剤の作用から細胞を保護する働きをする。ポジティブセクションに用いる選択剤の中で、動物細胞に最も一般的に用いられるのは抗生物質である。ピューロマイシン、ハイグロマイシン、フレオマイシンなどがよく用いられる。単純ヘルペス由来チミジンキナーゼにより生成されるガンシクロビル誘導體やコレラ毒素サブユニット A などの細胞毒性物質は、ネガティブセクションに用いられる。

アンピシリンやクロラムフェニコールなどの抗生物質は、細菌ベクターを構築する際に頻繁に使用されるため、組換え DNA 動物には、これら抗生物質に耐性を生じるマーカー遺伝子も含まれていることがある。

- c) スクリーニングに用いられるマーカー遺伝子や**レポーター**として用いられるマーカー遺伝子は、定性的および／または定量的に容易に同定可能な産物をコードする。なかでも特によく知られているのは、グリーン蛍光タンパク質 (GFP)、 β -ガラクトシダーゼ (β -gal)、分泌型アルカリホスファターゼ (AP)、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)³などの蛍光タンパク質である。

³ CAT 遺伝子は、抗生物質クロラムフェニコールに対する耐性を細菌にもたすが、動物細胞ではレポーター遺伝子としてのみ用いられる。

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

別のクラスのレポーター遺伝子は、トランスジェニック・アプローチ〔形質転換〕により個体の色を変化させる遺伝子に関係している。脊椎動物では、皮膚や眼の中でメラニンの合成と分布が行われることで明らかな色素沈着が生じる。チロシナーゼは、メラニン細胞のメラニン産生経路に存在する酵素である。チロシナーゼ遺伝子の突然変異は、白皮症と呼ばれる、メラニン色素の欠如によりあらゆる脊椎動物に類似した表現型をもたらす疾患の一般的な原因となる。そのため、トランスジェニックマウスやウサギを用いた研究では、チロシナーゼ導入遺伝子によってチロシナーゼ活性が発現し、アルビノの表現型がきれいに修復されることが示されている (Beermann et al., 1990; Aigner and Brem, 1993)。

DNA や組換えタンパク質を導入した動物細胞を同定および／または識別するもうひとつの方法は、同定可能な固有の DNA またはタンパク質配列 (エピトープまたはポリヒスチジンタグ配列) を用いることである。

食用の組換え DNA 動物では、マーカー遺伝子の利用が次第に普及しつつある。最近の適用例には、以下のようなものがある。

ー 適切な組換え DNA ドナー細胞を選択した結果、乳汁中の β -カゼインおよび κ -カゼインの組成が変化した組換え DNA ウシが作出された (Brophy et al., 2003)。同様の方法は、組換え DNA ブタの作出にも用いられており、この場合には、脂肪酸のパターンが変化し、多価不飽和脂肪酸が大幅に増加した (Lai et al., 2006)。さらに、プリアン遺伝子をノックアウトした乳牛も作られている。

ー 選択遺伝子 (ネオマイシンまたはピューロマイシン耐性遺伝子) とマーカー遺伝子 (GFP 遺伝子) を含む遺伝子構成体をニワトリの始原生殖細胞 (PGC) にトランスフェクトした。選択した細胞をニワトリの初期胚に注入した結果、蛍光を発する個体が生まれた (van de Lavoie et al., 2006)。組換え DNA ニワトリの作出に初めて成功したこの方法は、農業分野における家禽類への応用を可能にするものである。

ー サケのメラニン凝集ホルモン (MCH) 遺伝子をレポーター遺伝子として用い、MCH の発現を増強することで、白い体色をもつ組換え DNA メダカの作出が行われた (Kinoshita et al., 2001)。MCH は下垂体で産生される環状ヘプタデカペプチドで、メラニン細胞中のメラニン顆粒を濃縮し、魚類の体色を薄くする働きをする。同様に、チロシナーゼマーカー遺伝子を用いた組換え DNA 魚の作出にも成功している (Hyodo-Taguchi et al., 1997; Inagaki et al., 1998 年)。

4.2.2 非抗生物質耐性マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子の食品への利用可能性とヒトへの安全性

4.2.2.1 利用可能性

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

2004年の遺伝子組換え動物に関する専門家会議では、マーカー遺伝子も含め、不必要なDNA配列を遺伝子構成体に使用しないことが提言された（FAO/WHO, 2004）。しかし、抗生物質耐性遺伝子のもつ明らかな有用性と一貫した成果から、これまでのところ、トランスフェクト細胞の同定やポジティブセレクションが可能な代替マーカー遺伝子の開発努力はさほどなされていない。現在、スクリーニング可能な一連のマーカー遺伝子（レポーター遺伝子）が利用可能であり、これを用いれば、DNAを導入した動物細胞の同定は可能だが、ポジティブセレクションは不可能である。

特によく知られているのは、グリーン蛍光タンパク質（GFP）、 β -ガラクトシダーゼ（ β -gal）、分泌型アルカリホスファターゼ（AP）、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）などの蛍光タンパク質である。GFP遺伝子は、*in vivo* または *in vitro* において特定の波長の光を当てると蛍光を放つタンパク質をコードする。これは細胞を損傷することはない。ルシフェラーゼは一般的に用いられているが、基質を必要とする。ルシフェラーゼは、細胞抽出物や無傷な細胞、さらには組織に用いられることもある。一方、 β -ガラクトシダーゼ活性の検出には、分析対象となる組織の固定と破壊を要するのが普通である。

4.2.2.2 安全性に関する検討事項

組換えDNA動物由来食品の安全性評価における重要な検討事項のひとつは、新規発現タンパク質の安全性である。これには、生物体内に残留するマーカー遺伝子によって発現するタンパク質も含まれる。一般に、非抗生物質耐性マーカー遺伝子の場合には、評価の焦点は発現タンパク質の安全性に絞られると思われるが、これについては個別に判断する必要がある。発現タンパク質に関する知識の如何によって、こうした評価は、組換えDNA動物内における当該タンパク質とその発現の生化学的機能に関する入手可能なデータの限定的評価から、実証データの少ないタンパク質の場合には、動物試験を含む広範な毒性試験までさまざまである（FAO/WHO, 2004）。次に、この情報を全般的な安全性比較評価に採り入れ、当該の組換えDNA動物由来食品の安全性について結論を下すことになる。

新規発現組換えタンパク質の標準的な食品安全性評価には、以下の項目が含まれる。

- 当該タンパク質の生化学的組成および機能
- 組換えDNA動物内における当該タンパク質の発現（発現部位、発現レベル、発現タンパク質の完全性）
- 熱、加工、消化に対する当該タンパク質の安定性
- 毒性評価
- アレルギー誘発性

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

評価結果によっては、さらなる試験が必要な場合もある（免疫学的試験など）。

レポーター遺伝子である GFP ファミリーの場合には、組換え DNA 植物の研究など複数の研究が入手可能であり、そこから食品安全性に関する情報を外挿することも可能である。GFP 毒性に関する発表データは、量が限られている。トランスフェクト動物細胞（GFP 遺伝子を発現するプラスミド）を用いた一部の実験では、GFP に細胞毒性のあることが示唆されている（Liv et al., 1999）。GFP 遺伝子を発現する動物系は、形質転換が可能な動物種のほとんどで得られている。これらの動物系はいずれも、目に見える有害な影響もなく生存した。*in situ*にて観察された GFP の細胞毒性は、必ずしも経口投与時にこのタンパク質が有毒であることを意味するものではない。純粋な GFP または GFP 遺伝子を発現するカノーラを 26 日間ラットに与えた実験では、発達など複数のパラメータに関して、対照個体との間に有意差は見られなかった。GFP は、ペプシン存在下で速やかに分解され、ラットによってほぼ完全に消化された。GFP 配列と既知のアレルゲンの間に、アミノ酸配列の有意な類似性は認められなかったが、比較が行われたのは既知のアレルゲンの約半数にすぎないことが、専門家会議で指摘された。この研究では、GFP 遺伝子は抗生物質耐性選択遺伝子に代わる重要な代用品のひとつであると結論づけられている（Richards et al., 2003）。ただし、本会議では、組換え DNA 食用動物における GFP の安全性に関して確かな結論を導き出すには、動物組織内での GFP の生化学的機能と発現に関してさらなる研究が必要であるという点で、参加者の意見が一致した。

本会議では、組換え DNA 食用動物内で発現する β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、CAT、ルシフェラーゼの食品安全性に関しても、入手できる研究がなかったため、確かな結論は得られなかった。これらのマーカー遺伝子が組換え DNA 食用動物の作出に用いられるとすれば、かかるタンパク質の安全性についてデータが必要なことは言うまでもない。

当該の組換えタンパク質に固有の識別子／タグとして遺伝子構成体に組み込まれるペプチド配列に関しては、分離されたペプチド配列だけでなく、融合タンパク質全体について、かかる配列の安全性を調べる研究が必要であるというのが、本会議の認識である。

4.2.3 特定の DNA 配列を除去する技術の信頼性および安全性

各種の細菌および真菌系に由来する特異的組換え系についてはよく知られており、これらの系では、Cre、フリッパーゼ、R などの酵素が、それぞれ lox、FRT、RS といった特異的標的配列に作用する。こうした系は、他の生物系に適応するように作られており、すでに組換え DNA 植物の生産に一定の役割を果たしている。そして、食品生産用の組換え DNA 動物を作出する目的で、動物細胞にも利用され始めている。一般に、こうした組換え系は、2 対の短い DNA 配列（部位特異的組換え配列）と特異的酵素、すなわち部位特異的組換え酵素という 3 つの主成分からなる。組換え酵素媒介性の DNA 再編成には、部

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

位特異的切出し、組み込み、逆位、染色体間組換えなどがあり、幅広い適用が可能である。このように、不必要な DNA 配列を除去するための機能的系の利用が可能であり、動物細胞にも適用が可能である。

Cre-lox 組換え酵素系の機能については、データが公表されている。他の部位特異的組換え酵素の機能に関するデータはきわめて限られており、有効性や安全性の評価を実施するのは不可能である。かかる系の利用をめぐるひとつの懸念は、オフターゲット効果である。これは、組換え酵素の発現レベルが高いために、隠れた標的部位でゲノム再構成が生じるものである。Cre-lox の利用に伴う最も重要なオフターゲット効果は、組換え酵素により、哺乳類ゲノムの隠れた lox 部位間で組換えが誘発される傾向があることである。高レベルの組換え酵素活性は、染色体異常を伴っていた (Loonstra et al., 2001; Schmidt et al., 2000)。さらに、非常に大きな DNA 断片が間違っ て切り出されると、望ましくない種々の副作用が新たに生じるおそれがある。こうした非意図的影響は、他の部位特異的組換え系でも生じる可能性がある。

組織特異的なプロモーターエレメントと DNA 組換え酵素である Cre を組み合わせることで、ある種の細胞や組織の遺伝子ノックアウトを制限することができる。したがって、今後特定の食料品を生産する際には、この方法が何らかの役目を果たすはずである。実際、最近の研究では、Cre 組換え酵素遺伝子に誘導プロモーター (テトラサイクリン誘導系など) を用い、また誘導活性型の Cre 組換え酵素 (4-ヒドロキシタモキシフェンなどで誘導) を用いることで、遺伝子切出しをより正確に制御できることが示されている。

以下に示す例は、Cre-lox 系が組換え DNA 動物内の選択マーカー遺伝子を除去できることを示している。体細胞内の PRNP および免疫グロブリン遺伝子の 2 つの対立遺伝子 (Mu) をノックアウトし、これを SCNT に用いて、これら標的遺伝子を発現しない組換え DNA ウシを作出した。lox 配列をフランキング配列とするポジティブセレクションマーカー遺伝子 2 個とネガティブセレクション遺伝子 1 個を用い、SCNT 用の細胞を得た。ポリメラーゼ連鎖反応法を実施した結果、部位特異的組換え系により当該のマーカー遺伝子が効率的に除去されたことが確認された (Kuroiwa et al., 2004)。その後、ウシの検査も行ったが、この組換え系に起因する健康への悪影響は認められなかった (Richt et al., 2007)。

5. 非遺伝性のアプリケーション

5.1 緒言

遺伝性の構成体 (HC) や非遺伝性の構成体 (NHC) を用いた組換え DNA 食用動物の作出は、ここ何年かの間に大きな発展を遂げた。

遺伝性の構成体をもつ組換え DNA 動物は、初期胚や配偶子、体細胞核移植 (クローニ

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

ング) に用いる体細胞に組換え DNA 構成体を導入することで作られる。一方、非遺伝性の組換え DNA 食用動物は、動物の体細胞に核酸を直接導入することで作られる。これら 2 つのクラスの構成体には異なる構成要素や技術が用いられるため、それによってもたらされる危害の種類も異なり、したがって、それぞれに異なる食品安全性評価戦略が必要であると考えられる。

本報告書の「適用範囲」の項で述べたように、本会議では、遺伝性の構成体をもつ食用動物と非遺伝性の構成体をもつ食用動物では食品安全性リスクが異なるのか、もし異なるとすれば、どのような違いがあるのか、という点を検討した。

本会議では、遺伝性・非遺伝性の構成体をもつ組換え DNA 食用動物の現行の作出方法について、現在ある科学的エビデンスを検討し、さらにコーデックス特別部会が策定中の「組換え DNA 動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン原案」に示された各種の方法を分析することで、HC や NHC を用いて作出される組換え DNA 動物に種々の食品安全性評価が必要か否かを明らかにしようと試みた。

5.2 背景

遺伝性のアプリケーションと非遺伝性のアプリケーションには、同じような分子的手段や遺伝子成分を用いることができるが、そこにはいくつか重要な違いがある。

一般に、HC を用いた組換え DNA 動物は、初期胚へのマイクロインジェクション、トランスジェニックドナー細胞の体細胞核移植、配偶子（通常は精子）への組換え DNA 導入という、大きく分けて 3 つの方法のうちのいずれかを用いて作出される (Smith, 2002; Lavitrano, et al., 2003; Sorrell et al., 2005; Wheeler, 2007)。多くの場合、HC を有する動物の作出は、成長などの生産特性を高め、栄養学的要件を改変し、屠体の組成や乳および羊毛生産を改良し、飼料変換効率や創傷治癒、治療効果を高め、動物疾患（ヒトに食物媒介性疾患を誘発するものも含む）に対する抵抗性を作るために行われる (レビュー: Kopp et al., 2004; Sun et al., 2006; Kochhar and Evans, 2007; Wheeler, 2007)。

NHC を用いた組換え DNA 動物は、物理的・化学的手段（マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、遺伝子銃 [バイオリスティック] 法、リポソームなど）によって作出が可能である。こうした方法のほとんどが、送達の際に賦形剤 (excipient、媒体の役割をする物質) の存在を必要とする。例えば、リポソーム媒介性のトランスフェクションなどの化学的手段には、言うまでもなくリポソームが含まれている。遺伝子銃は、多くの場合、金粒子に組換え DNA 構成体を付着させて送達する方法である。こうした NHC を有する組換え DNA 動物を用いたアプリケーションは、HC を有する組換え DNA 動物のアプリケーションと類似しており、その目的は生産特性や治療、動物疾患に対する抵抗性の発現などにある (Draghia-Akli et al., 1997; Southwood et al., 2004; Thacker et al.,

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

2006; Richt et al., 2007)。

生物学的方法には、パッケージング、細胞内導入、核ターゲティング機能に伴うウイルス配列の利用がある。こうしたウイルス配列は、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス由来のものが最も一般的である（表 1 を参照）。さらに最近では、食用動物に組換え DNA を導入するための非ウイルス性ベクターも開発されている（Manzini et al., 2006）。

組換え DNA ワクチンは、NHC の一種とみなすことができる。組換え DNA ワクチンの遺伝物質は、目的の病原体由来の抗原ペプチドをコードする DNA 断片、プラスミド、あるいはウイルスベースのベクターで構成される（Pachuk et al., 2000）。ワクチンの一般的な意図は、動物内に抗原特異的な細胞免疫応答または液性免疫応答を惹起することにある（Jecklinger, 2006）。組換え DNA ワクチンの効果的な送達方法は現在まだ開発中であるが、有望な方法として、経皮的噴霧剤、エレクトロポレーション、リポソームの利用が挙げられる。例えば、ウシに組換え DNA ワクチンを投与する方法として、筋肉内注射はあまり効率的ではないことが示されている（Hurk et al., 1998）。一方、高圧ジェット式の皮内投与は、筋肉内注射に比べると効率的であると思われる（Carter and Kerr, 2003）。Jecklinger ら（2006）は、組換え DNA ワクチンを投与した動物の組織内で、ワクチンが一定時間エピソームにとどまることを示している。

5.3 主な考察

質問事項では、遺伝性と非遺伝性の「形質」と表現されているが、この考察では、遺伝性または非遺伝性の「構成体」と呼ぶ方がより適切である。その理由は、FAO の定義する「形質」が表現型、すなわち生物を規定する多くの特性のうちのひとつを指しているのに対し、今回の分析は、実際の組換え DNA 遺伝子自体に関する検討に基づいているからである。遺伝性の構成体（HC）は、ゲノムに安定的に組み込まれ、世代から世代へと伝えられる構成体と定義される。一方、非遺伝性の構成体（NHC）は、体細胞ゲノムには組み込まないが、垂直伝達はしないと予想される。

組換え DNA 構成体を動物に導入すると、さまざまな影響が生じる可能性がある。多くの場合、こうした影響は「意図的」、「非意図的」、または「直接的」、「間接的」なものとして特徴づけられる。意図的および非意図的な影響は、改変の目的に基づいて結果を分類するものである。意図的な影響には、組換え DNA 構成体の導入と予測されるその遺伝子産物によって故意にもたらされる組換え DNA 動物の変化が含まれる（成長速度の上昇、感染症に対する抵抗性など）。こうした変化は、食品安全性に直接的・間接的な影響を及ぼすこともあれば、及ぼさないこともある。非意図的な影響は、組換え DNA 構成体やその遺伝子産物と当該動物の生理的状態との相互作用により、組換え DNA 動物にさまざまな変化が生じた結果もたらされる。こうした変化は、食品安全性に直接的・間接的な影響を及ぼ

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

すこともあれば、及ぼさないこともある。

食品安全性に関する懸念をもたらす直接的な影響とは、組換え DNA 構成体やその遺伝子産物を含む組換え DNA 動物由来の食品をヒトが消費することで生じる有害な結果とみなすことができる。有害な間接的影響は、食用動物の生理状態を攪乱する構成体や遺伝子産物によって生じた有害物質が含まれている組換え DNA 動物由来の食品をヒトが消費することで生じるものと考えられる。例えば、求めている栄養素の合成に影響を及ぼすものや、組換え DNA 動物にとって危険なものではないが、ヒトの食物消費にとって危険なものとなりうる金属封鎖タンパク質の濃度変化などはその例である。あるいは、こうした間接的な影響は、組換え DNA 動物には有害であっても、ヒトの食物消費に関しては特に危険はないということもある（非可食部の組織に局所刺激を惹起するが、食物摂取によるヒトへの曝露はないため、ヒトにとって危険ではないという場合など）。

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

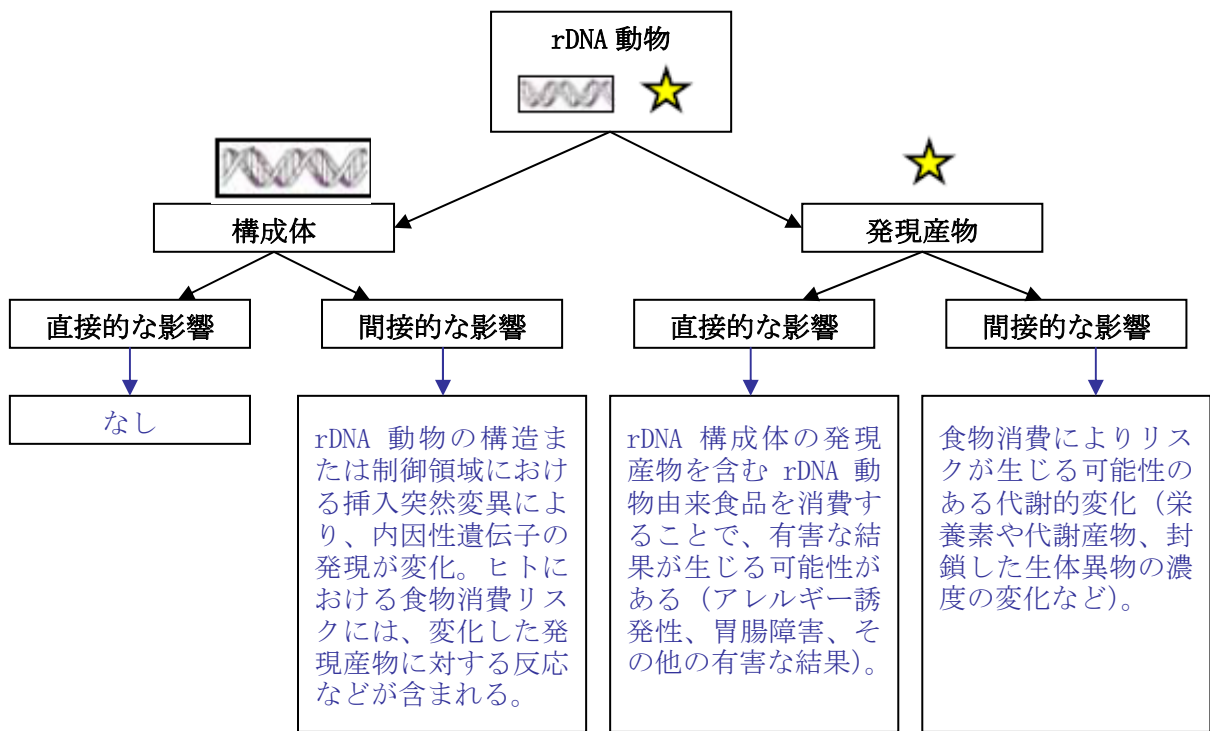


図 1. 遺伝性の構成体を含む組換え DNA (rDNA) 動物の食品安全性評価における検討事項の概要

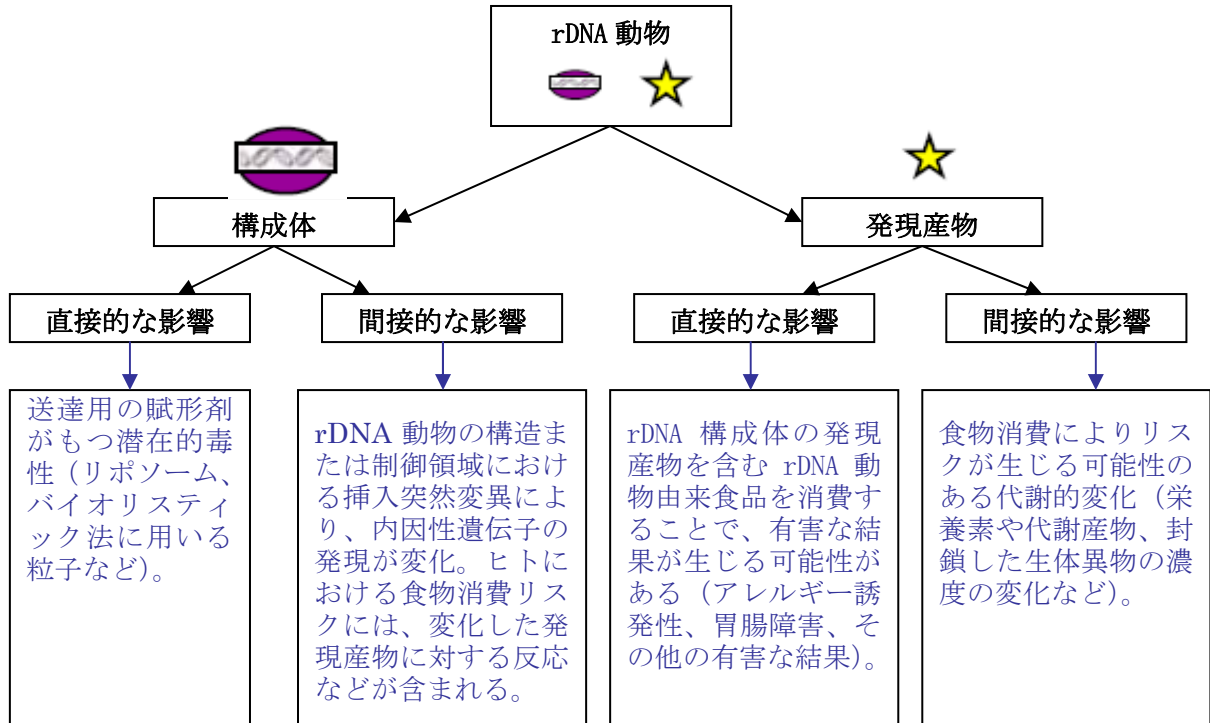


図 2. 非遺伝性の構成体を含む組換え DNA (rDNA) 動物の食品安全性評価における検討事項の概要

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

図 1 および 2 は、それぞれ、HC および NHC を含む組換え DNA 食用動物の消費によって生じうる危害およびリスクの同定方法を考案する際の思考プロセスをまとめたものである。これは、詳細な危害の同定や包括的なリスク評価を示したものではない。図では、組換え DNA 構成体自体に由来する影響とその発現産物による影響を区別し、それぞれ直接的な影響と間接的な影響に分けた。

HC および NHC がヒトに対してそれぞれ異なる食物消費リスクをもたらすか否かを判断するには、使用する構成体の種類、結果的に得られる組換え DNA 動物内での当該構成体の動態および存続、その発現プロファイル、それが組換え DNA 動物自体にもたらす潜在的危険の特性を明らかにすることが重要である。これら組換え DNA 動物に由来する実際の食品を消費しない限り、ヒトの健康へのリスクは生じない。表 1 は、こうしたアプリケーションで現在用いられている主な HC および NHC の種類をまとめたものである。ただし、注意しなければならないのは、ここに示した NHC の分析が主にヒト遺伝子療法の経験に基づいているということであり、食用動物に直接外挿してはいるものの、これについては経験的実証が必要であるということである。食物消費によるヒトへの潜在的危険の同定に関して、表 1 では、図 1 および 2 に示した方法を考慮に入れている。

NHC を含む組換え DNA 動物の消費に伴う食物消費リスクのひとつとして、「賦形剤の影響」が挙げられる。賦形剤の影響とは、こうした物質を含む組織を消費することで生じうる直接的・間接的な毒性をいう。消費される組織や、組換え DNA 動物内における組換え DNA 構成体とその賦形剤の分布および動態によって、曝露量はゼロから組換え DNA 動物への全投与量にまで及ぶ。

表 1 に示すように、多くの NHC は体細胞染色体に組み込まれるという点に注意すべきである。例えば、レトロウイルス由来の NHC やトランスポゾンはその例である (Kay によるレビュー、2001)。エピソームにとどまる NHC には、アデノウイルスやヘルペスウイルス由来の NHC がある (Thomas によるレビュー、2003)。一般に、アデノ随伴ウイルス由来の組換え DNA 構成体はエピソームに取り込まれるが、組み込みを示すエビデンスも得られている (Recchia et al., 1999)。

こうした情報の大半はヒト遺伝子療法から得られたものだが、重要なのは、こうした技術の開発に伴い、これらウイルス由来ベクターが「できる限り安全」であるように国際的に一致した努力が払われているという点である。この点については、米国遺伝子治療学会 (<http://www.asgt.org/>) および欧州遺伝子・細胞治療学会 (<http://www.esgt.org/>) による概要がある。内因性ウイルスによる相同的組換えの程度を制限することも、こうした国際的な努力のひとつである。内因性ウイルスによる相同的組換えは、(1) 成長や発達に影響を及ぼすゲノム領域への挿入、(2) 活動性の感染ウイルス粒子の再構成をもたらす組換え、(3) 組み込まれた構成体の不安定などをもたらす恐れがある。重要な研究開発テーマ

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

となっているもうひとつの問題は、炎症反応を惹起する可能性のあるウイルスタンパク質発現の除去である。組換え DNA 食用動物に用いられるベクターについても、同様の努力がなされることを期待する（セクション 7「提言」の項を参照）。

前回の専門家会議（FAO/WHO, 2004）で示された組換え DNA 動物の定義では、組換え DNA 動物が遺伝性の構成体を含む動物のみを指しているように書かれているが、これは混乱を招く元である。現在は、食用その他の目的で NHC を用いた動物も作出されている。遺伝性の構成体を用いた組換え DNA 動物と非遺伝性の構成体を用いた組換え DNA 動物の食物消費リスクの性質や程度に関する主な相違点は、レシピエント動物に NHC を導入する際に賦形剤を用いる点と、組換え DNA 構成体がエピソームにとどまることを意図している点にある。最近の科学的エビデンスによれば、組換え DNA ワクチンは、投与した動物の組織内で、一定期間エピソームにとどまることが示されている（Jecklinger et al., 2006）。

表 2 は、HC を含む組換え DNA 動物と NHC を含む組換え DNA 動物の違いを、食品安全性評価の観点からまとめたものである。この表の目的は、両動物間で異なる主要な構成体の特性を明示することにある。構成体の特性が異なると、食品安全性評価の実施方法が異なる可能性がある。重要なのは、この表が、組換え DNA 動物に生じうる潜在的な食物消費リスクを明示したのではなく、それぞれの構成体を含む組換え DNA 動物について、食物消費に関する安全性評価の方法を変えるべきか否かを明示しているという点である。

セクション 6 と 7 では、上述の HC を含む組換え DNA 動物と NHC を含む組換え DNA 動物の違いに基づき、非遺伝性のアプリケーションに関する結論と提言をそれぞれに示す。

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

表 1 : 組換え DNA (rDNA) 動物作出方法と食物消費における潜在的危険の特性 (Thomas et al. 2003 より改変)

構成体の種類	組み込み/ エピソーム	一次送達方法	伝達可能性**	動態/持続		動物への危害	食物消費に よる危害
				構成体	産物		
レトロウイルス/レン チウイルス由来* (Kay et al., 2001, Park et al. 2000; Naldini et al. 1996)	組み込み	レトロウイルス には分裂細胞が 必要、レンチウイ ルスには分裂細 胞は不要。	標的細胞以外へ の伝播はないと 予想される。	標的細胞内では 安定だが、標的細 胞が除去される 可能性あり。	サイレンシング により、時間とと もに減少するこ とがある。	標的細胞における構成 体の挿入突然変異 発現産物との相互作用 による局所または全身 毒性	ベクターによる危害なし。 発現産物または動物の生理状 態の攪乱による直接的・間接的 危害
トランスポゾン由来*	組み込み	化学的または物理 的導入のみ 分割細胞または 静止細胞	標的細胞以外へ の伝播はないと 予想される。	標的細胞内では 安定だが、標的細 胞が除去される 可能性あり。	サイレンシング がなければ、多く は安定。 細胞が除去され る可能性あり。	標的細胞における構成 体の挿入突然変異 発現産物との相互作用 による局所または全身 毒性	構成体による危害なし、賦形剤 の存続による危害の可能性あ り。 発現産物または動物の生理状 態の攪乱による直接的・間接的 危害
Naked DNA ***	組み込み	化学的または物理 的導入のみ 分割細胞または 静止細胞	標的細胞以外へ の伝播はないと 予想される。	標的細胞内では 安定だが、標的細 胞が除去される 可能性あり。	サイレンシング がなければ、多く は安定。 細胞が除去され る可能性あり。	標的細胞における構成 体の挿入突然変異 発現産物との相互作用 による局所または全身 毒性	構成体による危害なし、賦形剤 の存続による危害の可能性あ り。 発現産物または動物の生理状 態の攪乱による直接的・間接的 危害
アデノウイルス由来* (Kafri et al. 1998)	エピソーム	受容体経由 分裂または非分 裂細胞	標的細胞以外へ の伝播はないと 予想される。	長期安定性は実 証されていない。 細胞からの除去 や細胞が除去さ れる可能性あり。	サイレンシング がなければ、構成 体の存続次第。	挿入突然変異なし 発現産物との相互作用 による局所または全身 毒性 ウイルスタンパク質に 対する潜在的に重大な 免疫応答の可能性	使用したウイルス由来送達ベ クターを含む食品を摂取した 場合の(経口曝露による)一過 性の免疫原性(賦形剤の影響)。 rDNA 構成体、発現産物、また は動物の生理状態の攪乱によ る直接的・間接的危険

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

表 1 : 組換え DNA (rDNA) 動物作出方法と食物消費における潜在的危険の特性 (Thomas et al. 2003 より改変)

AAV 由来* (Nakai et al. 2001)	90%エピソーム／10%組み込み †	受容体經由分裂または非分裂細胞	標的細胞以外への伝播はないと予想される。	長期安定性は実証されていない。細胞からの除去や細胞が除去される可能性あり。	サイレンシングがなければ、構成体の存続次第。	挿入突然変異なし 発現産物との相互作用による局所または全身毒性 アデノウイルス由来パッケージングベクターよりも低炎症性	使用したウイルス由来送達ベクターを含む食品を摂取した場合の（経口曝露による）一過性の免疫原性（賦形剤の影響）。 rDNA 構成体、発現産物、または動物の生理状態の攪乱による直接的・間接的危険
ヘルペスウイルス由来*	エピソーム	強い神経親和性	なし	存続	サイレンシングがなければ、構成体の存続次第。	挿入突然変異なし 発現産物との相互作用による局所または全身毒性 ウイルスタンパク質の存続による炎症の可能性	神経由来組織を摂取した場合に限られる。 これら組織中の rDNA 構成体、発現産物、または動物の生理状態の攪乱による直接的・間接的危険
人工染色体	該当なし	通常は、核移植ドナー用細胞に導入。	周辺細胞にはなし、遺伝性の場合あり。	存続	サイレンシングがなければ、存続次第。	挿入突然変異なし 発現産物との相互作用による局所または全身毒性	ベクターによる危険なし。 発現産物または動物の生理状態の攪乱による直接的・間接的危険
遺伝性の構成体		新規動物を作出することが必要。	該当なし	失われなければ安定	サイレンシングがなければ安定	標的細胞における構成体の挿入突然変異 発現産物との相互作用による局所または全身毒性	発現産物または動物の生理状態の攪乱による直接的・間接的危険

* ベクター作製時にウイルス複製能力が除去されると仮定。

** 標的細胞／組織から周辺の細胞／組織へ

*** DNA は化学的・物理的手段（リボソーム、トランスフェクション、バイオリスティック法など）によって送達され、複製に必要な構造を含まないと仮定（「人工染色体」を参照）。

† ここに示した特性の多くは、ヒトでの観察所見に基づいている（Thomas et al. 2003）。個々の参考文献は、その種類のベクターに特有の特性について特に記述があるものを示す。

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

表 2：遺伝性の構成体（HC）を有する rDNA 動物と非遺伝性の構成体（NHC）を有する rDNA 動物との相違の概要：食品安全性評価における意義			
rDNA 構成体の特性	HC	NHC	食品安全性評価における意義
構成体の性質	通常は、制御領域と目的の遺伝子を含む線状 DNA 増殖ベクターバックボーンの配列も含む場合がある（複製元、選択マーカー、その他原核細胞・真核細胞の配列など）。	線状 DNA、自律複製単位など（表 1 を参照） 増殖ベクターバックボーンの配列も含む場合がある（複製元、選択マーカー、その他原核細胞・ウイルス・真核細胞の配列など）。	違いなし
構成体の導入方法	リポソームや他の非生物ベクターまたはマイクロインジェクションにより直接導入。	生物由来ベクターを用いる場合もあるが、リポソームや他の非生物ベクターにより直接導入する場合もある。	NHC を含む rDNA 動物に用いる賦形剤が、直接的・間接的な食品安全性リスクとなる場合がある。
構成体を導入する初期細胞	生殖細胞、胚、または核移植ドナー細胞	あらゆる体細胞	違いなし。 HC か NHC かにかかわらずなく、ゲノムに導入された場合には、制御配列またはコーディング配列の切断により、間接的に有害な結果が生じる可能性がある。 エピソームに保持されている NHC については、こうした影響はないと予想される。
rDNA 動物内での構成体の存在場所、安定性、分布	全細胞 安定化した後は（ごく一部の欠失や再構成が生じない限り）不変。	全細胞ではない（焦点的～散在的、導入経路および方法によって異なる）。	NHC の場合には、動物内における rDNA 構成体の存在場所や量に差が生じる可能性があるが、当該の構成体自体に関連した直接的な食物消費リスクはないため、食物消費リスクに違いはない。
構成体の発現：細胞の種類、発現量、発現期間	あらゆる細胞で発現可能だが、細胞・組織・発生段階特異的に発現。 同一系統の rDNA 動物では発現量は一定であることが多い。 発現期間は安定していることが多い。	一部の細胞のみ。 非特異的プロモーターを用いる場合には、異所性発現の可能性がある。 細胞／組織、動物によって発現量が異なる可能性がある。	HC でも NHC でも、rDNA 動物内における発現産物量の推定は可能だが、分散は NHC の方が大きいと考えられるため、これがサンプリング要件を左右する。 一部の細胞、組織、器官には構成体は全く含まれず（NHC）、構成体の発現も見られない（組織特異的 HC または NHC）。
rDNA 動物の増産	繁殖または核移植	NHC の導入（表 1 を参照）。	<u>HC を含む rDNA 動物</u> ：当該のゲノムが確立すれば、同一「ゲノム」をもつ rDNA 動物の増加はメンデルの予測値に従うはずであり、食品安全性評価は、「原型」となる rDNA 動物に基づいて実施することができる。 <u>NHC を含む rDNA 動物</u> ：各個体はそれぞれ固有の存在とみなしうするため、プロトコルを厳密に管理し、あるプロトコルに従って作出したすべての個体について最悪の場合を想定するのでなければ、個々に食品安全性評価を行う必要がある。

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

表 3 は、遺伝性と非遺伝性の構成体をもつ組換え DNA 動物に関する 2 つの質問事項について、本会議の主な結論をまとめたものである。ほとんどの点に関しては、組換え DNA 構成体を生殖細胞に組み込むか否かによって食品安全性の問題に大きな差が生じることはない結論づけられた。むしろ問題は、組換え DNA 構成体、その〔染色体への〕組み込みの有無、対応する産物に関係したものであり、したがって、食品安全性をめぐる相違は、組換え DNA 構成体が〔染色体に〕組み込まれるか、組み込まれないか（エピソームにとどまるか）という点にある。食品安全性に関して、HC を含む組換え DNA 動物と NHC を含む組換え DNA 動物の間に大きな違いをもたらすのは、導入遺伝子ではなく、非遺伝性のアプリケーションにおいて組換え DNA 構成体を導入するのに用いた賦形剤の存在である。なぜなら、この一次動物は食品の流れに導入され、その食品を摂取したヒトが賦形剤に曝露される可能性があるからである。表 3 では、図 1、2 および表 1、2 に示す方法に基づき、食品安全性に関する潜在的問題を動物への危害、食物消費における危害、食物消費リスクのレベルに分けてまとめた。

食品安全性に影響を及ぼす可能性のある動物への危害に関して、HC を含む組換え DNA 動物と NHC を含む組換え DNA 動物の主な相違点は、(1) エピソームに保持されている構成体は挿入突然変異を惹起しないということ、および (2) 賦形剤の存在に起因する問題にある。ここで相互に関係のある問題として、水平遺伝子伝達と組換えという事象が、動物における新たな危害を拡大させる 2 つの理論的経路であるという点が挙げられる。エピソームとして保持される組換え DNA 構成体は、染色体に組み込まれる構成体よりも水平遺伝子伝達の事象を生じやすいと考えられるが、かといって、染色体に組み込まれる構成体に水平遺伝子伝達の可能性がないわけではない。また、組換えの可能性は、組換え DNA 構成体内に存在するウイルスや細菌その他の配列に関係していると考えられる。

食物消費における危害に関しても、HC を含む組換え DNA 動物と NHC を含む組換え DNA 動物の相違は、(1) 構成体の組み込み、および (2) NHC を含む組換え DNA 動物における賦形剤の影響によるものである。NHC と HC では、組換え DNA 発現産物のレベルが異なると考えられるが、食品安全性における意義は、組換え DNA 構成体が遺伝性か否かによって変わるわけではない。NHC を含む組換え DNA 動物に用いられる賦形剤は、食物消費をめぐる直接的・間接的な危害をもたらす可能性がある。なぜなら、賦形剤は複数の世代を経て徐々に消失していくと考えられるため、HC を含む組換え DNA 動物に比べ、NHC を用いた場合には賦形剤に曝露される可能性が高いからである。ここでも相互に関係のある問題として、水平遺伝子伝達と組換えという事象が、動物における新たな危害を拡大させる 2 つの理論的経路であるという点が挙げられる。エピソームとして保持される組換え DNA 構成体は、染色体に組み込まれる構成体よりも水平遺伝子伝達の事象を生じやすいと考えられるが、かといって、染色体に組み込まれる構成体に水平遺伝子伝達の可能性がないわけではない。

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

食物消費リスクをめぐる唯一の質的相違は、HC を含む組換え DNA 動物よりも NHC を含む動物由来食品の方が賦形剤への曝露の確率が高いという点である。賦形剤に関係したリスクが生じるのは、食品として摂取される細胞や組織に賦形剤が含まれている場合に限られており、上述のように、HC を含む動物には賦形剤は含まれていない。食物消費リスクをめぐる量的相違は、構成体のもつ遺伝性ではなく、その発現パターンと量によって生じると考えられる。

表 3. 遺伝性の構成体 (HC) および非遺伝性の構成体 (NHC) を含む組換え DNA (rDNA) 動物における危害とリスクの要約		
	類似点	相違点
動物への危害	<p>組み込まれた rDNA 構成体に関する挿入突然変異 発現産物による危害 組換えとその後遺症を含む局所的な影響 (NHC および HC の導入に同じようなウイルスベクターが用いられた場合) 水平遺伝子伝達および組換えによる有害な結果の発生確率を左右する主な要因は、構成体のもつ遺伝性ではなく、構成体に含まれる配列の由来である (細菌、ウイルス、その他真核細胞の配列など)。</p>	<p>エピソームに保持されている NHC については、挿入突然変異はない。 賦形剤の影響</p>
食物消費における危害	<p>rDNA 動物内の挿入突然変異に起因する危害の可能性 NHC と HC では発現産物のレベルが異なる場合があるが、質的には同じである。 水平遺伝子伝達および組換えによる有害な結果の発生確率を左右する主な要因は、構成体のもつ遺伝性ではなく、構成体に含まれる配列の由来である (細菌、ウイルス、その他真核細胞の配列など)。</p>	<p>エピソームに保持されている NHC については、挿入突然変異はない。 NHC を含む rDNA 動物に用いられる賦形剤は、食物消費をめぐる直接的・間接的な危害をもたらす可能性がある。NHC を含む場合には、「希釈効果」により、HC を含む rDNA 動物よりもベクターに曝露される確率が高くなる。</p>
食物消費リスク	<p>rDNA 構成体のもつ遺伝性ではなく、その発現パターンと量によって異なる。</p>	<p>賦形剤に関係したリスクは、曝露の潜在的可能性 (食品として摂取される細胞や組織に賦形剤が含まれているか否か) に依存している。 NHC を含む場合には、「希釈効果」により、HC を含む rDNA 動物よりもベクターに曝露される確率が高くなる。</p>

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

6. 結論

6.1 マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子に関する結論

- レポーター遺伝子や選択マーカー遺伝子の開発・利用に関してどのような進展があったか。
 - － 外来 DNA を動物細胞に首尾よく導入するために、スクリーニングおよび／または選択には少なくとも 3 種類の主要なマーカー遺伝子が用いられている。
 - － これら 3 種類のマーカーの代表的なものは、そのほとんどが基礎研究の手段として開発されたものである。現時点では、これらのマーカー遺伝子を用いた組換え DNA 動物の食品安全性については十分な情報が得られていないが、他の種から得られた情報を出発点として、マーカー遺伝子の安全面に関する研究を推し進めることは可能である。
 - － 組換え DNA 食用動物の作出において、ポジティブセレクションおよびネガティブセレクションに用いるマーカー遺伝子は、体細胞または多能性細胞核移植とともに、今後ますます重要なものとなるであろう。
- 食品に含まれてもヒトに対して安全であることが実証されている非抗生物質耐性マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子は存在するか。もしあるとすれば、それは何か。
 - － 非抗生物質耐性マーカー遺伝子またはレポーター遺伝子は数多く存在するが、現在、食用を目的とした組換え DNA 動物作出に利用されているものは少ない。
 - － 実験動物モデルの研究から、これらのマーカー遺伝子の有用性、安定性、性能に関する経験的知識が得られているが、組換え DNA 食用動物における非抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性については限られた数の研究しか行われておらず、その結果もまちまちである。
- 特定の DNA 配列を除去したい場合、日常的に利用可能で信頼できる安全な除去方法は存在するか。
 - － 部位特異的組換え系は、オフターゲット効果を最小限に抑える手段があれば、マーカー遺伝子の除去に役立つ機能的手段となりうる。
 - － 食用動物に用いられる部位特異的切出し系の食品安全性については、限られた数の科学的情報しか得られていない。

6.2 非遺伝性のアプリケーションに関する結論

- 食品安全性の観点から見て、遺伝性の形質をもつ動物と非遺伝性の形質をもつ動物と
(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

の間に重要な違いはあるか。もしあるとすれば、それは何か。

- 組換え DNA 動物によってもたらされる食物消費をめぐる危害の違いは、(a) 構成体のもつ遺伝性ではなく、[染色体への] 組み込みの有無（および配列の由来と組成）、および (b) 賦形剤の影響によるものである。NHC を含む組換え DNA 動物では、賦形剤の影響を検討する必要がある。
 - 構成体が染色体に組み込まれた場合には、危害やリスクの性質に関して、遺伝性の構成体と非遺伝性の構成体との間に質的な違いはない。
 - 遺伝性の組換え DNA 構成体と非遺伝性の組換え DNA 構成体を比較した場合、これらの構成体を含む組換え DNA 動物由来食品の安全性における量的な違いは、その遺伝性ではなく、発現パターンと発現量に起因すると考えられる。
 - 水平遺伝子伝達が生じる可能性は、組換え DNA 構成体のもつ遺伝性ではなく、それがレシピエント細胞のゲノムに組み込まれるか、それともエピソームにとどまるかによって決定される。組換え DNA（遺伝性および非遺伝性）がエピソームである場合には、染色体に組み込まれた組換え DNA に比べ、組換え DNA 動物由来食品を摂取した動物やヒトの体細胞あるいは細菌に取り込まれやすく、伝播しやすいと考えられる。これは、動物の健康にとってリスクとなる可能性があるが、かかる潜在的な水平遺伝子伝達が、食物消費リスクを通してヒトの健康にどの程度リスクをもたらすかは明らかではない。
- 遺伝性の形質をもつ動物と非遺伝性の形質をもつ動物に由来する食品の安全性を比較評価する際、特に検討すべき食品安全性に関する問題はあるか（ベクターの種類など）。
 - 遺伝性または非遺伝性の組換え DNA 構成体を含む組換え DNA 動物由来食品の安全性における量的な違いは、当該ベクターがどの程度ウイルス配列を含んでいるかによると考えられる。この場合、内因性ウイルス配列の組換えが生じると、それが組換え DNA 動物の健康リスクにつながる可能性がある。こうした動物の健康リスクがヒトにどの程度の食物消費リスクをもたらすかは、特に、結果的に組換えが生じたウイルスの宿主範囲によって決定される。

7. 提言

7.1 マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子に関する提言

- 組換え DNA 動物内の特定の DNA 配列が適正に除去されるようにするには、遺伝子切出し系の継続的な妥当性確認と開発が強く推奨される。これは、2004 年の

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

FAO/WHO 合同専門家会議の成果を踏まえたもので、2004 年の会議では、マーカー遺伝子も含め、遺伝子構成体に不必要な DNA 配列を用いないことが提言された (FAO/WHO、2004)。

- 非抗生物質耐性マーカー遺伝子および遺伝子切出し系の安全性を評価するには、組換え DNA 動物由来食品に関連した研究を中心に、今後さらなる研究が必要である。
- トランスジェニック細胞の効率的なポジティブセレクションおよびネガティブセレクションを促す新たな非抗生物質耐性マーカーを開発することが望ましい。
- オフターゲット効果の可能性を最小限に抑えるために、食用を目的とした組換え DNA 動物には、導入した遺伝子切出し系が含まれていないことが必要である。

7.2 非遺伝性のアプリケーションに関する提言

- ウイルス配列の利用に伴う潜在的な動物の健康危害がいくつか同定されており、これには、組換えとそれに続く発現の可能性、病原性の変化、RNA ウイルス配列の逆転写などが含まれている。動物の健康と作出のために、非遺伝性のアプリケーションにおけるウイルス由来ベクターの安全利用についてガイドラインを作成する場合には、こうした問題に基づいて作成することが必要である。近年、非ウイルス性のエピソームベクターが開発されたことで、ウイルスベースのベクター系にまつわる懸念の多くを払拭する手段が得られた。ガイドラインでは、ヒト遺伝子療法のガイドラインに示された原則を考慮すべきである。かかるガイドラインの作成にあたっては、OIE の立場に立脚するのが適切であろう。
- 原核細胞生物への水平遺伝子伝達により組換え DNA 動物に健康リスクをもたらす有害事象の発現確率を最小限に抑えるには、組換え DNA 動物のゲノムに組み込む組換え DNA 構成体遺伝子のコーディング領域にイントロンが含まれていることが必要である (細菌にはイントロンをスプライスアウトする細胞機構がないため、水平遺伝子伝達が生じても機能的産物を産生することができない)。
- さらに、安全な食品を開発する過程で、組換え DNA 動物の健康が損なわれることのないように注意すべきである。クローン動物に関する OIE のガイドラインと同様に、組換え DNA 動物の健康に関するガイドラインも、動物の健康をめぐる問題に基づいて作成する必要がある。
- 食品安全面の危害が下記の項目の影響を受けるか否かを解明するために、今後さらに直接的な研究を実施することが推奨される。
 - a. 原核細胞または真核細胞への水平遺伝子伝達の可能性
 - b. NHC に含まれるウイルス配列で作られた組換え DNA (組換えウイルスなど)

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

- NHC を含む組換え DNA 動物では、個体間で組換え DNA 構成体の発現産物のばらつきが大きい場合があるため、NHC を含む組換え DNA 動物由来食品の摂取による潜在的曝露やリスクを評価するために、統計的に適切なサンプリング戦略についてガイドラインを確立することが必要である。かかるガイドラインの作成にあたっては、動物の健康や食品安全性に関する国際的な規格設定機関（FAO、WHO、OIE など）の立場に立脚するのが適切であろう。
- FAO/WHO など適切な国際政府間組織が、公共利用が可能な包括的なデータベースを設置し、組換え DNA 生物由来食品の消費に関するあらゆる報告結果を収めたデータベースを維持管理することが必要である（報告後の調査研究の結果も含む）。
- 遺伝性および非遺伝性の組換え DNA 構成体の動物への導入方法については、OIE などの関連国際組織が、公共利用が可能な包括的なデータベースを設置し、維持管理することが必要である（詳細な文献目録を含む）。
- 生産用に NHC を用いた動物の健康と食品安全性についての評価や組換え DNA ワクチンを投与した動物の食品安全性の評価には、組換え DNA 動物の食品安全性評価に適用されるガイドライン案⁴の原則や方法を採用し、これに賦形剤とエピソームに関する警告を加えるのが適切であろう。
- 組換え DNA ワクチンが提起する動物の健康と食品安全性の問題は複雑であり、なおかつ重要であるため、これらの問題については、FAO/WHO/OIE 合同専門家グループによる検討が必要である。

⁴ 「組換え DNA 動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン原案」は、現在コーデックスのステップ 3 および 4 にて策定が行われている（ALINORM 07/30/34 を参照）。

（正確な記述に関しては原文をご参照ください）

8. 参考文献

8.1 マーカー遺伝子およびレポーター遺伝子

8.2 非遺伝性のアプリケーション

<省略>

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

9. 用語集

既存の対応物 (conventional counterpart) とは、食品として安全に利用されてきた既知の歴史をもち、当該の組換え DNA 動物系の由来となった動物品種、および最終的に食品として用いられる動物を作出するのに用いた繁殖用動物、および／またはかかる動物由来の食品を意味する。

構成体 (construct) とは、細胞や組織内への導入に用いられる DNA を意味する。構成体は、目的の遺伝子、マーカー遺伝子、および適切な制御配列からなる 1 個のパッケージの形をとることもある。繰り返し使用される構成体は、「カセット」と呼ばれることもある。

エピソーム (episome [episomal]) とは、染色体とは独立に細胞内で保持されるが、宿主染色体に組み込まれうる染色体外遺伝因子 (大腸菌の F 因子など) を意味する。組み込みステップはさまざまな因子によって支配されるため、「エピソーム」という用語はあまり用いられなくなり、より広い意味をもつ「プラスミド」という用語が用いられることが多い。

賦形剤 (excipient) とは、非遺伝性の構成体を送達するための媒体として用いる物質をいう。例として、リポソーム、バイオリスティックなアプリケーションで用いられる金粒子、トランスフェクションに用いるリン酸カルシウムなどが挙げられる。

賦形剤の影響 (excipient effect) とは、賦形剤への曝露により直接あるいは間接的に生じる影響をいう。

発現産物 (expression product) とは、タンパク質配列とその結果得られるタンパク質をコードする特定の RNA 分子をいう。RNA の中にはタンパク質をコードせず、制御機能や生物学的機能をもつものもある。

遺伝子組換え動物 (GM animal / genetically modified animal) は、組換え DNA 動物と同義に用いられる用語である。

水平遺伝子伝達 (horizontal gene transfer) とは、通常の生殖過程とは独立に、細胞に DNA 分子が取り込まれることを指す。

遺伝性の構成体 (heritable construct) とは、安定的にゲノムに組み込まれ、世代から世代へと伝えられる構成体をいう。

マーカー遺伝子 (marker gene) は、動物細胞への DNA 導入が成功したか否かを確認するのに用いられる。マーカー遺伝子は、選択および／またはスクリーニングに用いられる。

非遺伝性の構成体 (non-heritable construct) とは、体細胞ゲノムには組み込みうるが、垂直伝達はしない、すなわち世代から世代へと受け継がれることはないと思われる構成体をいう。

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

組換え DNA 動物 (recombinant-DNA animal) とは、組換えデオキシリボ核酸 (DNA) や組換えリボ核酸 (RNA)、細胞や細胞内小器官への直接的な核酸注入など、*in vitro* 核酸技術により遺伝物質を変化させた動物を意味する。

組換え酵素 (recombinase) とは、DNA 配列の並び方を部位特異的に変えることのできる酵素群をいう。これら酵素の中には、特定の DNA 認識部位間にある DNA セグメントを除去する働きをするものもある。

レポーター遺伝子 (reporter gene) とは、容易に試験可能な産物をコードする遺伝子をいう。細胞や器官、組織に導入遺伝子を取り込まれていることを確認するためのマーカーとして、また特定のプロモーターの効率性をテストする手段として用いられる。

体細胞核移植 (somatic cell nuclear transfer) (SCNT) とは、体細胞をドナーゲノムとし、ドナー動物の遺伝子コピーを産生するように再プログラムした生物の無性生産をいう。

形質 (trait) とは、生物を規定する多くの特性のうちのひとつである。表現型とは、1 つ以上の形質を記述したものである。同義語：特性 (character)。

導入遺伝子 (transgene) とは、生物の生殖細胞系に組み込まれた遺伝性の遺伝子構成体を指す。

トランスジェニック (transgenic) とは、構成体を含む生物を指す。

トランスフェクション (transfection) とは、核酸構成体を無傷のまま、その機能を保った状態で細胞に導入することをいう。

ベクター (vector) とは、プラスミドやウイルス、細菌など、レシピエント動物または細胞に組換え DNA 構成体を導入するための媒体を指す。

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)

参加者一覧

<省略>

付録 2

文書一覧

Application of genetic engineering for livestock and biotechnology products [畜産物およびバイオテクノロジー応用製品における遺伝子工学の適用] (Anne MacKenzie)

Latest developments in relation to the use of reporter and selectable genes in animal biotechnology [動物バイオテクノロジーにおけるレポーター遺伝子および選択可能な遺伝子の利用に関する最近の発展] (Louis-Marie Houdebine)

Heritable and non-heritable traits [遺伝性および非遺伝性の形質] (Larisa Rudenko)

non-heritable applications of r-DNA animals [r-DNA 動物に関する非遺伝性のアプリケーション] (2006 年コーデックス特別部会第 6 回会議用に配布された会議文書 [CRD 2、2~21 ページ])

(正確な記述に関しては原文をご参照ください)