

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保  
及び高機能食品の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

(H12-食品-001)

主任研究者 首藤紘一

平成14年3月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究	
首藤 紘一	..... 1
II. 分担研究報告書	
1. 諸外国における遺伝子組換え食品に関する法則制度の調査	
抗生物質耐性遺伝子の移行性	
組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際動向の調査研究	
遺伝子組換え魚に関する文献調査	
首藤 紘一	..... 6
2. 安全性評価に関する研究(1)～(4)	
鎌田 博	..... 33
3. DNA組換え検体の検知に関する研究	
豊田 正武	..... 57
4. 組換え体のアレルギー性に関する研究	
手島 玲子	..... 76
5. 組換え体の慢性毒性試験に関する研究	
白井 智之	..... 84
6. クローン技術を用いた動物食品の安全性に関する研究	
熊谷 進	..... 95
7. リスク・コミュニケーションに関する研究	
加藤 順子	.....103
8. 高機能食品の開発に関する研究	
江崎 治	.....121
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....123

厚生科学研究費（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

総括研究報告書

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所長 首藤 紘一

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保及び、高機能食品の開発に関する研究を遂行するため、1 主任研究者、7 分担研究者を中心として、15 機関にわたる研究グループを組織した。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するため、各種調査研究ならびに、後代交配種に関する導入遺伝子の安定性検討、アレルギー試験、毒性試験等の実践的研究を行った。さらに、当該食品の検知に関する試験法の確立を行うとともに、国民受容に関する調査研究、並びに高機能食品の開発を行った。

分担研究者

鎌田 宏 筑波大学生物科学系教授

豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所食品部長

手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所

機能生化学部室長

白井智之 名古屋市立大学医学部教授

熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科  
教授

加藤順子 三菱化学安全科学研究所調査部長

江崎 治 国立健康・栄養研究所臨床栄養部長

体の検知に関する研究を豊田班員、組換え体のアレルギー性に関する研究を手島班員、組換え体の慢性毒性試験に関する研究を白井班員、クローン技術を用いた動物食品の安全性に関する研究については熊谷班員、リスク・コミュニケーションに関する研究については加藤班員、高機能食品の開発については江崎班員が担当し、主任研究者が総括を行った。また、諸外国における遺伝子組換え食品に関する法制度の調査、抗生物質耐性遺伝子の移行性、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際動向の調査研究、遺伝子組換え魚に関する文献調査について、京都大学医学部、国立感染症研究所並びに独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所で行われたものを主任研究者がとりまとめた。

A. 研究目的

本研究は、厚生労働省食品保健部の強い依頼をうけ遂行されるもので、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、当該食品の検知に関する試験法の確立及び国民受容に関する調査研究、並びに高機能食品の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

植物中の遺伝子発現変動調査法の開発等による安全性評価に関する研究を鎌田班員 DNA 組換え

C. 結果と考察

諸外国における遺伝子組換え食品に関する法制度の調査：遺伝子組換え食品に関する法制度を国際調和する試みには、世界保健機関（WHO）と国際連合食糧農業機関（FAO）の下に設けられている国際食品規格委員会（Codex Alimentarius

Commission; CAC) が取り組んでおり、主に、安全性評価を含む危険分析および食品表示の両面から議論が進んでいる。本研究では、2001 年度に食品保健に関する法制、なかんずく遺伝子組換え食品の取り扱いについて新たな動きのあった欧州共同体の状況を明らかにし、遺伝子組換え食品に関する法制度の国際調和の将来に与える影響などを考察した。

抗生物質耐性遺伝子の移行性：カナマイシン（ネオマイシン）耐性遺伝子 *nptII* は、特に組換え植物開発の初期に、組換え植物体選抜のためのマーカーとして利用された。現在でも *nptII* を用いた既存の組換え作物は依然として市場に供給され続けている。このような組換え作物から、可食部の摂食や不可食部の圃場への放置などにより *nptII* 遺伝子がヒト体内や環境中に放出され、正常菌叢を構成する微生物を自然形質転換して薬剤耐性を与えるという可能性は、一般社会においては依然として根強い懸念の対象であり、このような薬剤耐性遺伝子の拡散の可能性を正しく評価することが必要である。本研究では、*nptII* 遺伝子をマーカーとして持つ組換え植物 DNA が、実験的条件下で細菌を形質転換して薬剤耐性を与えるかどうかを調べる。本年度は、自然形質転換能を持つことで知られる枯草菌 (*Bacillus subtilis*) とアシネトバクター菌 (*Acinetobacter* sp.) を用いた自然形質転換系を確立した。

組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際動向の調査研究：バイオテクノロジー応用食品の安全性、特に遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向を調査するため、国際機関により開催される 3 つの関連会議に、協力研究者の五十君博士が出席し、その議論に参加した。参加した会議は FAO/WHO 共同専門家会議 (2001 年 9 月スイス、ジュネーブ)、CODEX 部会のドラフト案作成作業委員会 (2001 年 11 月米国、オークランド) および CODEX 部会 (2002 年 3 月日本、

横浜) である。吉倉は、CODEX 部会の議長としてこの部会の進行と取りまとめを行い、討議事項をステップアップする事が出来た。これら会議で取り上げられた遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性評価に必要と思われる項目で、特に重要と思われる、かつその試験法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いた検討を試みた。本年度は、組換え微生物の免疫系への刺激に関する評価法と、動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行について検討を行った。

遺伝子組換え魚に関する文献調査：本研究によって次のことが明らかにされた。現在までに組換え体魚類は 20 数種で作出されており、魚類以外にも貝類、エビ類で組換え体作出されている。さらに、これらの研究は実験室レベルのものとしてすでに大量に飼育されているものがある。また、アメリカでは、民間企業が組換え体大西洋サケを食品として利用する許可を FDA に申請中であるが、現段階で許可されていない。遺伝子組換え体ティラピアは発展途上国で技術が進んでおり、食品として利用されるのは、これらの国の方が早い可能性がある。しかし、これらの国の組換え体に関する情報は論文以外には乏しいのが現状である。

安全性評価に関する研究：我が国において既に食品としての安全性が確認されている遺伝子組換え農作物、特に、大量に輸入されているダイズとトウモロコシについて、導入遺伝子の後代交配種における安定性を中心に解析した。本年度集中的に調査したダイズにおいては、我が国に輸入されている穀粒の中に、頻度は低いものの、導入遺伝子の一部配列が欠落しているために導入遺伝子産物 (タンパク質) が発現していないものやプロモーター領域に変化が生じているもの等が見出された。現在、そのような事例について、導入遺伝子の塩基配列決定を進めており、その変化がどのような原因によって引き起こされたかを検討している。

一方、このような種子繁殖性植物ばかりでなく、ジャガイモ等の栄養繁殖性植物においても遺伝子組換え農作物が開発・利用されているため、栄養繁殖後代植物における導入遺伝子の安定性を調査するため、ジャガイモおよびサツマイモについて、植物個体再分化法や遺伝子導入法を検討し、形質転換体が育成できるようになった。次年度は、このような形質転換体の栄養繁殖後代植物について導入遺伝子の安定性を調査する予定である。

さらに、食用として通常利用している植物に由来する新規遺伝子を用いることで、新しいタイプのウイルス耐性植物を育成することに成功した。その種子繁殖後代における導入遺伝子の発現を調査したところ、遺伝子導入当代においては導入遺伝子が発現していたものの、種子繁殖第1代においては、調査した全ての系統において導入の発現が見られなくなった。導入遺伝子は変化せずに存在しているため、ジーンサイレンシングが起こったものと予想され、現在、その機構について解析を続けている。

組換え食品の検知法に関する研究：安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモNewleaf Plus、ならびに審査中であるNewleaf Yのそれぞれについて、定性分析法確立のための検討を行い、上記2品種を特異的に検知可能である定性PCR検知法を開発した。本法を用いジャガイモ加工原材料について調査を行った結果、調査に供した54検体については当該遺伝子組換えジャガイモの混入している検体がないことを示した。また、安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ(Newleaf Plus ならびにNew-leaf) については定量分析法開発のための検討を行い、その開発段階を進めた。

次に、食発第110号により通知された定量的PCR法に同等の別法を開発するため、マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステム(ライトサイクラーシステム、ロッシュ・ダイアグノスティック社製)を用いた定量分析法開発のための検討を行った。

また、確立した分析法を用いて8分析機関による内標比測定試験およびブラインドテストを実施し、前記の定量的PCR法に同等の良好な結果を得た。

次いで、遺伝子組換え食品とその加工品を対象とした検知技術の妥当性の評価を行った。食発第110号により通知されたDNA技術応用食品の検査方法には、定量分析法として酵素免疫検定法ならびに定量的PCR法が採用されている。これら2種の方法を用い、遺伝子組換えダイズを検体とした場合の測定値比較を行った。その結果、脱脂ダイズを検体とした場合には両測定法により得られる結果に相関性がなく、定量的PCR法を用いることで信頼性の高い値が得られることを明らかにした。また、表示義務制度施行以前、ならびに以後の市販豆腐を検体とし、定性ならびに定量的PCR法を用いた調査を行い、表示義務制度の与える影響についての検討を行った。さらに、食発第110号に記載の組換え食品の検査方法が、加工食品に適用可能かどうかの検証をおこなった。その結果、大豆加工品には適用可能であるが、トウモロコシ加工品においては、加工様式により影響を受ける可能性があることが示唆された。

組換え食品のアレルギー性に関する研究：本年度は、患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討、及び動物を用いるアレルギー性の検討、並びに新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討を行った。患者血清を用いる研究では、国内食物アレルギー患者血清117種について、除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS)、及び害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9C)タンパク質に対するIgE抗体の有無の検討を、ウェスタンブロット法でおこなったが、陽性の血清はみられなかった。動物実験では、人工胃液での分解性の悪い害虫毒素Cry9Cを導入したとうもろこしにつき免疫系への影響評価を行った。アレルギー高感受性のB10Aマウス及びBNラットを用い、亜急性毒性試験の期間(90日間)の、害虫抵抗性遺伝子(Cry9C)が導入された遺伝子組換

え(GM)とうもろこし摂取が、動物の免疫系に影響を及ぼすか否かの検討を行った。同等の栄養成分を有する近親(isoline)の非組換え(non-GM)とうもろこしを対照として用いた。GM, non-GMとうもろこし(50%及び5%)混餌飼料を摂取させたマウス、ラットとも両群の体重及び餌の摂取量に有意差はみられず、13週投与後の各種主要免疫臓器の重量並びに病理組織像においても、両群とも異常は認められず、またCry9Cに対するIgE抗体産生は両群において認められなかった。このことより、GMとうもろこしの比較的長期の摂取により即時型アレルギーを誘発する可能性はほとんどないと考えられた。人工胃腸液による分解性の検討では、タンパク質の加熱前処理による分解性の変化について検討したが、特に人工腸液(SIF)による分解性試験の場合に、加熱による分解性の著しい亢進のみられることが判明した。

慢性毒性試験に関する研究：本研究では遺伝子組み替え食品の安全性を検討する目的で、現在生産されている遺伝子組換えトウモロコシ(T25系統、除草剤耐性トウモロコシ)の90日反復毒性試験をおこなった。改良 NIH の飼料に含まれるトウモロコシを遺伝子改変のもの置き換える方法を取り、全量、1/4量、1/8量の3用量で置き換えた。なお飼料中の大豆についてはすべて非遺伝子組み替え大豆と置き換えた。その結果、雌雄とも体重増加、各種臓器重量に顕著な変化はなく、大きな影響はないものと結論された。なお生化学的データの読部で対照群に對比有意な変化項目があり、再測定を行うとともに病理組織学的検索も検討している。さらに、本試験結果を元に慢性毒性試験についても検討を加えた。

クローン技術を用いた動物食品の安全性に関する研究：我が国の都道府県や大学の試験研究機関等で育成中の体細胞クローン牛について、育成状況や繁殖能力といった各種データ収集するとともに、(社)畜産技術協会が行っている肉質や乳質の調査データ等を入手した。また、国外において報告され

ているデータについても入手、整理した。さらに体細胞クローン牛の筋肉中残留農薬測定を行うことによって、安全性の裏付けとなるデータをさらに集積した。また、と殺した体細胞クローン肥育牛の筋肉(横隔膜筋)の分与を受け、筋肉中の残留塩素系農薬(DDT、ディルドリン、ヘプタクロル)の分析を、厚生省通知による方法により行った((財)畜産生物科学安全研究所に依頼)。エストロゲン測定に供する体細胞クローン肥育牛のと殺時の血液、体細胞クローン搾乳牛と同肉用繁殖牛の血漿の分与を受けたが、測定は未だ完了していない。

これらデータに、体細胞クローン牛について食品としての安全性を懸念する科学的根拠は見い出されなかった。今後、さらに乳質や肉質についてのデータを含め、体細胞クローン牛の知見を収集することによって、食品としての安全性について検討を加える。

リスクコミュニケーションのあり方に関する研究：厚生労働省からの情報提供改善を目的としてインターネットを通じた情報提供システムの試作をおこなった。Webページの作成は、下記の点に留意した。市民に親しみやすく、市民の知りたいと思う情報が容易に得られること。情報のありかが容易にわかること。ウェブページをみることにより、基本的な知識が身に付くこと。厚生労働省の姿勢が見えること。より詳しい情報を知りたい人には詳しい情報を提供すること。先生と子供のページを作成し、情報提供のみでなく、学びの場を提供すること。他の情報源や関連した情報にリンクが張られていること。

市民に親しみやすい市民向きのページ構成とするために、トップページの中央に市民が知りたい情報へのアイコンを配置し、より詳しい情報への入り口はサイドバーに配置する構成とした。トップページ中央には、遺伝子組換え技術、安全性審査、表示、何に入っているか、Q&A、先生と子供

のページのアイコンを配置した。安全性審査のアイコンには、厚生労働省の主体的な姿勢が明確となるよう、「厚生労働省はこのように安全性を審査しています」と明記した。子供と先生のページでは総合学習の教材や学びの場が提供できるようにした。サイドバーでは、審議会のページ構成を工夫し、安全性審査の進行状況や、評価の概要書が容易にひきだせるようにした。また、サイト内検索やサイトマップを用意し、欲しい情報に容易にたどり着けるよう工夫した。さらに、基本的な知識が身に付くこと、ウェブページを詳しく読むことを狙ったクイズのページを作成した。

これらの工夫により、従来の情報羅列型の web ページから、市民の方を向いた、わかりやすい、親しみやすい web ページへの改良がなされたと考えられる。来年度は、主婦および小学校教師へのグループインタビューを行い、新たな web ページおよびさらなる改良点について意見を求める予定である。また、本年度内に十分対応できなかった冊子体を通じた情報提供については、次年度に具体的な提案を行う予定である。

**高機能食品の開発：**ヒトは、n-3 系列脂肪酸の $\alpha$ -リノレン酸と n-6 系列脂肪酸のリノール酸を de novo 合成できず、それぞれ食事から摂取する必要がある。また、これらの脂肪酸を相互に代謝変換することもできない。よって、生活習慣病予防に効果が期待される n-3 系列脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)は直接摂取するか、前駆体である $\alpha$ -リノレン酸から生合成する必要がある。そこで本研究では、日本人の主食であるイネに $\alpha$ -リノレン酸を効率よく発現させる遺伝子改変作物を作出し、疾病予防や健康の維持増進に役立つ高機能食品の開発を最終目標とした基礎的研究を継続している。本年度は、リノール酸から $\alpha$ -リノレン酸への変換酵素であるイネ $\omega$ -3 fatty acid desaturase (OsFAD3) を酵母内に効

率良く発現させ、酵素活性を測定できる実験系を確立した。

#### D. 結論

バイオテクノロジー応用食品については、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国民受容に関する研究等を持続するとともに、開発研究の透明性を確保する必要があると考えられる。

#### E. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究  
諸外国における遺伝子組換え食品に関する法制度に関する研究

主任研究者 首藤紘一 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

遺伝子組換え食品に関する法制度を国際調和する試みには、世界保健機関（WHO）と国際連合食糧農業機関（FAO）の下に設けられている国際食品規格委員会（Codex Alimentarius Commission; CAC）が取り組んでおり、主に、安全性評価を含む危険分析および食品表示の両面から議論が進んでいる。本研究では、2001年度に食品保健に関する法制、なかんずく遺伝子組換え食品の取り扱いについて新たな動きのあった欧州共同体の状況を明らかにし、遺伝子組換え食品に関する法制度の国際調和の将来に与える影響などを考察した。

協力研究者

宮城島 一明（京都大学大学院医学研究科  
社会健康医学系健康政策管理学 助教授）  
里村 一成（京都大学大学院医学研究科  
社会健康医学系健康政策管理学 助手）

に設けられている国際食品規格委員会（Codex Alimentarius Commission; CAC）が取り組んできている。国際食品基準委員会はローマで開いた1999年の総会において、遺伝子組み換え食品の安全性に関する事柄についての国際ルールの策定を進めるため、遺伝子組み換え食品の安全性を評価する際の手続などを議論する部会を設置した。

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用食品、なかでも組換えDNA 生物由来の食品（以下、遺伝子組換え食品という）の安全性については、これが従来型の食品に比べて本質的に劣るという科学的証拠はない。しかしながら、その安全性について消費者が多額の関心を抱いていることから、多くの国においては、上市前の安全性審査や当該食品への表示が義務づけられたりしている。

遺伝子組換え食品に関する法制度を食品保健の視点から国際調和する試みには、世界保健機関（WHO）と国際連合食糧農業機関（FAO）の下

バイオテクノロジー応用食品特別部会（議長国：日本）では、2002年3月までに、遺伝子組換え食品の危険分析に関する原則案と植物由来の遺伝子組換え食品の安全性評価に関するガイドライン案に合意する一方、組換え微生物由来の食品の安全性評価に関するガイドラインの策定も順調に進んでいる。一方、同じCACの食品表示部会における遺伝子組換え食品の表示規定に関する国際ルール策定の作業は進んでいない。

本研究では、2001年度に食品保健法制全体、なかんずく遺伝子組換え食品の取り扱いについ

て新たな動きのあった欧州共同体の状況を明らかにし、遺伝子組換え食品に関する法制度の国際調和の将来を考察するための一助とする。

## B. 研究方法

文献調査ならびに国内外で開催された国際会議での聞き取りによった。

(倫理面への配慮)

該当しない。

## C. 研究結果および考察

### C-1. 欧州食品法典の制定

欧州食品法典<sup>1</sup>は 2002 年 2 月 1 日に欧州共同体官報に掲載され、一部規定を除いて、同月 21 日に発効した。欧州共同体における食品行政の大改革の端緒を開いた 2000 年 1 月の食品保健白書<sup>2</sup>の発表から 2 年後のことである。

欧州食品法典の主たる意義は以下の通りである。

- 1) 食品保健に関する基本原則の樹立
- 2) 欧州食品安全庁 (European Food Safety Authority) の新設
- 3) 食品と飼料に関する緊急警報システム
- 4) 欧州委員会への緊急介入権限付与
- 5) 食品・獣医衛生・植物衛生に関する常設委員

<sup>1</sup> Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety

<sup>2</sup> White Paper on Food Safety, COM(1999)719 final.

## 会の統合

上記のうち、「食品保健に関する基本原則」の重要な点について解説を加える。

第一に、食品保健に関する主要な概念の定義がおかれた。「食品 (food)」の定義は、添加物や水、チュウインガムなども含む広いもので、CAC の食品の定義とほとんど同じである。これにより、加盟国間で若干の差異のあった食品の定義が統一された。

危険分析 (risk analysis) に関する一連の定義もおかれており、これらも CAC の定義を一言一句参照したことは明らかだが、細部に変更がある。たとえば、危険管理 (risk management) の定義では、その他の正当な要因 (other legitimate factors; OLF) に言及している。

注目すべきは、可追溯性 (traceability) の定義も置かれたことである (表 1)。可追溯性の定義は、ISO 8402 のそれとは異なるものを採用した点で、2000 年時点の欧州委員会の作業文書<sup>3</sup>からは考え方に変化が見られる。

表 1. 危険管理と可追溯性の定義 (下線は筆者)

‘risk management’ means the process, distinct from risk assessment, of weighing policy alternatives in consultation with interested parties, considering risk assessment and other legitimate factors, and, if need be, selecting appropriate prevention and control options;  
‘traceability’ means the ability to trace and follow a food, feed, food-producing animal or substance intended to be, or expected to be incorporated into a food or feed, through all stages of production, processing and distribution;

第二に、食品法典の目的として、EC 域内の食品と飼料の自由な移動の確保および消費者の健

<sup>3</sup> Advance Copy of Working Document of the Commission Services on Traceability and Labelling of GMOs and Products Derived from GMOs

康とその他の利益の擁護が謳われた。しかしながら、動物福祉や植物衛生、環境保護の観点も適宜考慮するとしている（第5・8条）。

第三に、食品保健の根幹を為すものとして、科学的な危険分析を位置づけた。しかしながら、危険管理においては、危険評価の結果だけでなく、OLF も考慮に入れるとしている（第6条）。食品法典を含む EC 法における OLF と CAC など国際的な場における OLF は名称こそ同じであるが必ずしも同義にとどまらない可能性があり、将来の WTO 等における紛争処理を複雑にする原因になるかも知れない。

第四に、予警主義（precautionary principle）の立場が明確にされた（第7条）。その基本的な考え方は従来の主張<sup>4</sup>と変わらない（表2）。

表2. 予警主義（第6条）

1. In specific circumstances where, following an assessment of available information, the possibility of harmful effects on health is identified but scientific uncertainty persists, provisional risk management measures necessary to ensure the high level of health protection chosen in the Community may be adopted, pending further scientific information for a more comprehensive risk assessment.

2. Measures adopted on the basis of paragraph 1 shall be proportionate and no more restrictive of trade than is required to achieve the high level of health protection chosen in the Community, regard being had to technical and economic feasibility and other factors regarded as legitimate in the matter under consideration. The measures shall be reviewed within a reasonable period of time, depending on the nature of the risk to life or health identified and the type of scientific information needed to clarify the scientific uncertainty and to conduct a more comprehensive risk assessment.

第五に、食品と飼料の安全を確保する一義的責

(ENV/620/2000).

<sup>4</sup> Communication from the Commission on the Precautionary Principle COM(2000)1.

任を負うのは食品業者・飼料業者であることが明確にされた（第19・20・21条）。

第六に、国際基準を正当に考慮することと国際基準策定作業に協力することが表明された（第5条3項・第13条）。

## C-2. 遺伝子組換え食品・飼料に関する規則案

欧州委員会（European Commission）は2001年7月25日に、遺伝子組換え食品・飼料の認可と表示に関する規則案<sup>5</sup>と遺伝子組換え生物とその加工品の可追溯性に関する規則案<sup>6</sup>を採択し、両者は2002年2月14日付でWTOに対しSPS通報<sup>7</sup>された。どちらの規則案も、欧州議会ならびに閣僚理事会での採択を2002年12月頃と予定している。

まず、遺伝子組換え食品・飼料の認可と表示に関する規則案は、前節（C-1）で述べた食品法典のもとで最初の個別法となることが期待されている規則案である。

この規則案によれば、遺伝子組換え生物またはその製品についての危険評価（risk assessment）は欧州食品安全庁が一元的に行う。その危険評価は、食品安全性評価、環境安全性評価、検知法の確認を含む。実際の確認手続は EC 加盟国内の検査機関への委託が想定されている。欧州食品安全庁は、申請から6ヶ月以内に危険評価に関する意見を具申することとされている。

<sup>5</sup> Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on Genetically Modified Food and Feed, COM(2001)425 final.

<sup>6</sup> Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council concerning Traceability and Labelling of Genetically Modified Organisms and Traceability of Food and Feed Products Produced from Genetically Modified Organisms and amending Directive 2001/18/EC, COM(2001)182 final.

欧州食品安全庁による危険評価をもとに危険管理（認可か不認可の決定）を行うのは欧州委員会である。その決定に際しては OLF も考慮される。認可の当初有効期間は 10 年間であるが、上市後モニタリングが必要とされた場合はその結果によってはこの限りでない。

現在までに認可されている遺伝子組換え食品については移行措置が用意されており、規則施行後 6 ヶ月以内に検知法その他の危険評価に関する追加資料を提出すればよいとされている。

認可後も、遺伝子組換え食品・飼料が人や動物の健康あるいは環境に悪影響を及ぼす懸念があると考えられるに至った場合は、緊急の介入措置がとられることになる。

認可されていない遺伝子組換え生物の混入許容限界は 1%とされている。

遺伝子組換え食品の表示義務は、DNA や蛋白質の検知が可能かどうかにかかわらず、すべての遺伝子組換え由来の食品に拡大される。

上記の規則案を補完し、正確な表示およびそれを通じて消費者の自由な選択を可能にするのが、遺伝子組換え生物とその加工品の可追溯性に関する規則案である。この規則案は、現行の EC 指令<sup>7</sup>には遺伝子組換え生物の可追溯性を全ての流通段階で確保する義務を定めているものの、可追溯性自体の定義や目的、実施形態に関する規定がないことに対応したものである。

可追溯性の定義は食品法典に述べられているので省略する。規則案による可追溯性の目的は、

正確な食品表示、環境モニタリング、製品リコールを容易にするためとされている。

この規則案によれば、食品の流通に携わる業者は、製品の仕入れ元と供給先を確認しうる手段を導入するとともに、製品が遺伝子組換え生物由来であるかないか、遺伝子組換え生物由来である場合にはその素性に関する情報を製品とともに伝達し、さらに、その情報を 5 年間保存することになる。一方、可追溯性を達成できさえすれば、その具体的手段は問わない、としている。

可追溯性に関して必要な情報の内容は目的により異なる。遺伝子組換え生物由来の製品の可追溯性に関しては、遺伝子組換え生物由来であるかないかの情報で足りるが、遺伝子組換え生物のリコールや環境影響評価に関する可追溯性においては、遺伝子組換え生物の個別の素性に関する情報が要求される。個別の遺伝子組換え生物は、Biosafety Clearing House あるいは OECD の Unique Identifier (Code)により識別される見込みである。

この規則案の実施により、食品表示が容易になり、表示が正しいかどうかの監視も容易になると考えられている。

以上、ふたつの規則案の概要を述べたが、いずれも発効すれば、欧州共同体のみならず、欧州経済圏 (European Economic Area) において適用されることになる。

### C-3. 遺伝子組換え生物の国際移動に関する規則案

欧州委員会は 2002 年 2 月 18 日に、遺伝子組換え生物の国際移動に関する規則案<sup>9</sup>を採択した。

<sup>7</sup> G/SPS/N/EEC/149. G/SPS/N/EEC/150.

<sup>8</sup> Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the Deliberate Release into the Environment of Genetically Modified Organisms and Repealing Council Directive 90/220/EEC.

<sup>9</sup> Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on the Transboundary Movement of

この規則案は、生物多様性条約のカルタヘナ議定書を近い将来に EC が批准することを前提に、その規定を EC に適用するためのものである。

主な内容は、生きた組換え生物を EC 域外に輸出しようとする者に一定の義務を課すものである。

#### D. 結論

欧州共同体が導入しようとしている新たな法制は、遺伝子組換え食品の表示義務の拡大、可追溯性の本格的な実施などを含む大きな改革である。

米国をはじめとする、遺伝子組換え食品の表示を法的に義務づけていないか、あるいは限定的な義務としている国にとって、欧州共同体の新制度は無視できない非関税障壁として映る可能性が高い。

また、可追溯性の問題、検知法とその確認についても国際的に共通な理解が存在するとは言いがたく、これらも国際的に大きな波紋を投げかけることと思われる。

EC による WTO 通報に対する各国の意見提出の期限は 2002 年 2 月末であり、同年 3 月以降、世界貿易機関の SPS 委員会における議論が活発化するものと思われる。

一方では、CAC の一般原則部会および輸出入証明部会における可追溯性をめぐる議論の推移、食品表示部会における議論の推移を注意深く見守る必要がある。

#### E. 健康危険情報

該当しない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

無い。

##### 2. 学会発表

無い。

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

無い。

##### 2. 実用新案登録

無い。

##### 3. その他

無い。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究  
抗生物質耐性遺伝子の移行性に関する研究

主任研究者 首藤紘一 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

カナマイシン（ネオマイシン）耐性遺伝子 $npdII$ は、特に組換え植物開発の初期に、組換え植物体選抜のためのマーカーとして利用された。現在でも $npdII$ を用いた既存の組換え作物は依然として市場に供給され続けている。このような組換え作物から、可食部の摂食や不可食部の圃場への放置などにより $npdII$ 遺伝子がヒト体内や環境中に放出され、正常菌叢を構成する微生物を自然形質転換して薬剤耐性を与えるという可能性は、一般社会においては依然として根強い懸念の対象であり、このような薬剤耐性遺伝子の拡散の可能性を正しく評価することが必要である。本研究では、 $npdII$ 遺伝子をマーカーとして持つ組換え植物DNAが、実験的条件下で細菌を形質転換して薬剤耐性を与えるかどうかを調べる。本年度は、自然形質転換能を持つことで知られる枯草菌(*Bacillus subtilis*)とアシネトバクター菌(*Acinetobacter* sp.)を用いた自然形質転換系を確立した。

研究協力者 荒川宜親、岩城正昭  
（国立感染症 細菌・血液製剤部）

A. 研究目的

カナマイシン（ネオマイシン）耐性遺伝子 $npdII$ は、遺伝子組換え植物体を作成する際のマーカーとして広く利用されてきた。最近商品化される組換え作物の多くは $npdII$ の代わりに除草剤耐性遺伝子などをマーカーとして用い[1]、抗生物質を使わないで作出されるようになってきているが、 $npdII$ を含む組換え作物は依然として市場に存在し、ニューリーフプラス・ジャガイモの無届け輸入や未認可の55-1パパイヤの輸入監視などが話題になっている。

$npdII$ を含む組換え作物による懸念は次の2つの可能性に分けられる。

1.  $npdII$ 遺伝子が、自然形質転換によってヒトや家畜の腸管内の細菌叢に取り込まれ、耐性菌が出現する可能性  
ヒトや家畜に対してカナマイシンは臨床使用されている。ヒトに対する利用の機会が少なくなったとはいえ、耐性菌出現による危険を無視することはできない。
2. 組換え植物体が圃場などの土壤中で分解され、DNAが露出して土壤細菌

菌を自然形質転換する可能性

自然環境中には、様々なアミノグリコシド耐性菌がすでに存在しているため、仮に組換え植物DNAによって新たに耐性菌が出現しても、それが環境全体に対して破壊的な影響を確実に与えるとは言えないが、実験的データをもとに影響の大きさを見積もる必要がある。

これらの点を検討するため、本研究では遺伝子組換え作物中または遺伝子組換え植物由来食品中に残留するカナマイシン耐性遺伝子が、*in vitro*あるいは*in vivo*で細菌にどの程度の頻度で取り込まれ、発現して細菌にカナマイシン耐性を与えるのか検討する。

本年度は、自然形質転換能を持つことで知られる枯草菌(*Bacillus subtilis*)とアシネトバクター菌(*Acinetobacter* sp.)を用いた自然形質転換系を確立した。具体的には、昨年度収集した菌株の一部を用いてプラスミドDNAによる自然形質転換の条件検討を行ない、自然形質転換が起こりうる事が確認された条件のもとで、PCR法で調製した $npdII$ 遺伝子を用いて、カナマイシン感受性から耐性への自然形質転換が起こるかどうかを解析した。

## B. 研究方法

**菌株**：*Bacillus subtilis* ATCC39087 (168TT株)、ATCC39620 (PSL1株 (*recE*))と、*Acinetobacter* sp. ATCC33305 (BD413株)を用いた。

**プラスミドDNAの調製**：グラム陽性菌にカナマイシン耐性を与える広宿主域プラスミドpUB110は、このプラスミドを保持する*B. subtilis* 菌体からlysozyme-SDS法[2]で調製した。また、広い範囲のグラム陰性菌にカナマイシン及びストレプトマイシン耐性を与えるプラスミドpKT230 (RSF1010由来)[3]は、このプラスミドを保持する大腸菌菌体からQiagen Midi kitで調製した。

**pKT230Km<sup>s</sup>の構築**：pKT230プラスミドはTn903由来のカナマイシン耐性遺伝子を有している。この遺伝子の内部には、このプラスミド上唯一のHindIII切断部位が存在する。このプラスミドをHindIIIで切断し、DNA polymerase I Klenow fragmentで平滑化後再連結することにより2塩基対の挿入とそれに伴う読み取り枠のずれを生じさせる（フレームシフト）ことによってカナマイシン耐性遺伝子を不活化した（図1）このようにして構築したプラスミドをpKT230Km<sup>s</sup>と名付けた。

***Bacillus subtilis*の形質転換**：TSA (Trypticase Soy Agar)寒天平板培地上で一晩培養して、培地上に生じた菌の一部を翌日新しいTSA平板培地に植え継ぐことを3回繰り返して得た*B. subtilis*の前培養を、無機塩類、クエン酸、グルコース、カザミノ酸、トリプトファンで構成されるC I培地で振とう培養し、30分ごとにODを測定して得た増殖曲線から定常期初期になったと判断されたところで遠心集菌して、C I培地とは成分の比率が若干異なるC II培地に再懸濁してさらに30分間振とう培養した。このとき菌は菌体外のDNAを取り込むいわゆる"competent"な状態になっているので、この状態の菌懸濁液100  $\mu$ lに900  $\mu$ lのC II培地と1  $\mu$ gのDNAを加えさらに90分ゆっくり振とうしながらDNAを菌体に取り込ませ、その後カナマイシンを含むLB寒天平板上に塗布して一晩培養し、出現した形質転換体のコロニー数を計測した。

***Acinetobacter* sp.の形質転換**：あらかじめエレクトロポレーションによってpKT230Km<sup>s</sup>を導入した*Acinetobacter* sp. ATCC33305 (BD413)株を、15  $\mu$ g/mlのストレプトマイシ

ンを含むLB液体培地で30℃一晩培養し、翌日新鮮な同じ培地100mlに1mlを植え継ぎ30℃で5時間培養すると、定常期初期の菌体を得られる。これを遠心集菌後グリセロールに懸濁して5mlの培養に相当する分ずつ凍結保存し、以後の実験に使用した。

凍結保存した菌体は融解後遠心してグリセロールを除き、それぞれ0.25mMのMgCl<sub>2</sub>とCaCl<sub>2</sub>を含むLB培地10mlに再懸濁した。0.1~1  $\mu$ gのDNAを加えて30℃90分振とうしてDNAを取り込ませ、適当に希釈または遠心集菌してから15  $\mu$ g/mlのカナマイシンを含むLB平板培地に塗布し、形質転換体を選択した。

## C. 研究結果と考察

### *B. subtilis*を用いた自然形質転換系の構築

文献から予想される形質転換頻度が昨年度までに得られなかった原因として、形質転換に厳密に適した成育相の菌を用いることができなかった可能性が考えられる。本年度は、最適の条件を決定して「組換え植物由来DNAが薬剤耐性を与えるかどうか」について検討した。具体的には、*B. subtilis* 158TT(*rec+*) および*B. subtilis* PSL1 (*recE*)株を用い、以下の条件を変動させることにより、昨年度報告したよりも高頻度の自然形質転換系の構築を試みた。

(1) *B. subtilis*の自然形質転換頻度は菌の成育相に大きく依存することが知られているので、培養中の菌を対数増殖期後期から30分ごとにサンプリングして、静止期に入る前後の異なる成育相の菌体を得た。菌体は凍結保存し、一部を取って枯草菌プラスミドで自然形質転換を行なって頻度を比較した。

培地の変更、培養中の通気条件の改良、DNAと菌の接触時間を長くするなどの条件検討の結果、10<sup>2</sup>のオーダーで形質転換体を得ることができるようになった(表1)。

(2) 細菌の自然形質転換には、菌体内でのDNA組換えに関与する*rec*遺伝子群が重要な役割を果たしており、組換え植物由来DNAによる自然形質転換にもこれらの遺伝子が重要であると考えられる。遺伝学的な知見が蓄積し変異株が多数記載されている*B. subtilis*の*rec*遺伝子変異株を用いて自然形質転換実験を行なうことにより、分子レベルでの解析を目指した。

*Bacillus subtilis* ATCC39087 (168TT株)とATCC39620 (PSL1株 (*recE*))の2株を、枯草

菌プラスミドpUB110で自然形質転換することを試みた。表1に示すように、*recE*変異株であるPSL1株では、*rec*遺伝子に関して野生株である168TT株に比べて形質転換頻度が低かった。自然形質転換の実験には、168TT株を用いるのが適当であると思われる。

(3) 一般に、自然形質転換には、細菌の細胞が持つDNA取り込み機構が必須であるが、この機構を経ずに細菌細胞内に「強制的に」組換え植物由来のDNAを導入した場合に、形質転換体が出現するかどうかに ついても調べた。*B. subtilis* 168TT株について、プラスミドpUB110による自然形質転換とelectroporationの頻度の比較を行なったところ(表1)、Electroporationは自然形質転換に比べて頻度が1オーダー低く、高効率の遺伝子導入系としては不適當であった。*Acinetobacter* sp.を用いた自然形質転換系の構築

*Acinetobacter* sp. (旧名 *A. calcoaceticus*) は、培養中の一定の時期(定常期初期)に、外来のDNAを積極的に取り込む。取り込まれた外来DNAは、染色体あるいはすでに菌が保持しているプラスミドに相同な領域があればそれを「受容体DNA」として相 同的組換えにより組み込まれ、さらに、適 当なプロモーターがあれば組み込まれた遺 伝子が発現する。

この機能により遺伝子組換え植物由来の DNAが*Acinetobacter* sp.を自然形質転換しう ることがすでに示されている[4, 5, 6]。

今回我々は、「受容体DNA」として、変 異を導入して不活化したカナマイシン耐性 遺伝子を有するプラスミドを*Acinetobacter* sp.に保持させ、このプラスミドの親プラス ミドpKT230 DNAで菌を処理して、外来の 無傷のカナマイシン耐性遺伝子が菌体内プ ラスミド上の不活性なカナマイシン耐性遺 伝子と相 同的組換えで置き換わることで、 自然形質転換により菌がカナマイシン耐性 を獲得するかどうかを調べた。

(1) 受容体DNAプラスミドの調製  
広い範囲のグラム陰性菌で複製保持される いわゆる「広宿主域ベクター」pKT230を材 料に用いた。pKT230は、グラム陰性菌の自 然プラスミドRSF1010の複製開始点と、カ ナマイシン、ストレプトマイシン耐性遺伝 子を持つプラスミドである(図1)[3]。

このプラスミドのカナマイシン耐性遺伝子 の内部には唯一のHindIII切断部位がある。 プラスミドをHindIII切断後、DNAポリメー ラーゼIのKlenowフラグメントで平滑末端化し て再結合することにより2塩基対を挿入し、 フレームシフトによるカナマイシン耐性遺 伝子の不活化を行なった(図1)。得られ たプラスミドpKT230Km<sup>s</sup>がストレプトマイ シン耐性をコードしているがカナマイシン 耐性を失ったことを大腸菌の形質転換実験 で確認し、親プラスミドpKT230とほぼ同じ 大きさであることをアガロースゲル電気泳 動で確認した(data not shown)。

(2) 受容体プラスミドpKT230Kmsを保持 する*Acinetobacter* sp.の作成  
*Acinetobacter* sp. BD413(ATCC33305)株に pKT230Kmsプラスミドをエレクトロポレー ション法で導入し、ストレプトマイシン耐 性、カナマイシン感受性で、pKT230Km<sup>s</sup>と 同じ大きさのプラスミドを保持するクロー ンを得た。

(3) 受容体プラスミドpKT230Km<sup>s</sup>を保持 する*Acinetobacter* sp.の自然形質転換  
pKT230Km<sup>s</sup>を保持する*Acinetobacter* sp. ATCC33305(BD413)株を、「研究方法」に 記した方法で、受容体プラスミドの親プ ラスミドであるpKT230(Kmr) 0.1 μgにより形 質転換したところ、8×10<sup>6</sup>/μgDNA以上の 高頻度でカナマイシン耐性のコロニーが出 現した。DNAを加えない陰性対照では、μ gDNAあたり10個以下の頻度でカナマイ シン耐性コロニーが出現するのみであっ た。また、受容体プラスミドを持たない *Acinetobacter* sp. BD413株を宿主として、 pKT230(Kmr) 0.1 μgを用いて同様の形質転 換実験を行なったところ、得られたカナマ イシン耐性コロニー数はやはり陰性対照と 同様で、*Acinetobacter* sp. BD413株の自然形 質転換には受容体DNAが菌体内に存在す ることが決定的に重要であることが示され た。

#### D. 結論

本年度は、*Bacillus subtilis*と*Acinetobacter* sp. 菌株について、自然形質転換系の構築を 試み、*B. subtilis*ではμgDNAあたり10<sup>2</sup>の 頻度で、*Acinetobacter* sp.では8×10<sup>6</sup>/μg DNA以上の高頻度で形質転換体を得るこ とに成功した。これらの実験から得られた結 果をもとに、来年度は、特に*Acinetobacter*

sp.では不活化した*nptII*遺伝子を有するプラスミドを保持する菌株を作成して同様の自然形質転換系を構築し、組換え植物DNAを用いて、*B. subtilis* 168株および*Acinetobacter* sp. BD413株の形質転換体が出現するかどうかを調べる。それらの実験を通じて、組換え植物にマーカーとして用いられているカナマイシン耐性遺伝子が、拡散を通じてヒトの健康および環境に及ぼす影響を検討する。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 参考文献、URL

- 1 <http://www.nbiap.vt.edu/indexmain.cfm>
- 2 Tanaka, T., Kuroda, M., and Sakaguchi, K. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 1487-1494.
- 3 Bagdasarian, M. *et al.* (1981) *Gene* 16, 237-247.
- 4 Gebhard, F., and Smalla, K. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1550-1554.
- 5 de Vries, J. *et al.* (2001) *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 211-215.
- 6 de Vries, J. and Wackernagel, W. (1998) *Mol. Gen. Genet.* 257, 606-613.

表1. *Bacillus subtilis*の形質転換 - natural transformationとelectroporationの比較 (strainは特に示さない限り 168TT、DNA = pUB110 ccc)

方法	形質転換に用いたDNA量 ( $\mu$ g)	得られた形質転換体の数	形質転換頻度 (形質転換体/ $\mu$ gDNA)
実験1 natural transformation	1.0	81	$8.1 \times 10^1$
実験1 natural t. (PSL1 ( <i>recE</i> ) 株)	1.0	0	0
実験2 natural transformation	1.0	100	$1.0 \times 10^2$
実験3 electroporation	1.0	8	$8.0 \times 10^0$

表2. *Acinetobacter* sp. BD413/pKT230Km<sup>S</sup>の形質転換

DNAの種類	形質転換に用いたDNA量 ( $\mu$ g)	得られたコロニーの数	コロニー出現頻度 (コロニー/ $\mu$ gDNA)
pKT230 (Km <sup>r</sup> )	0.1	854 (1000倍希釈時)	$8.5 \times 10^6$
なし (陰性対照)	0.0	2	$2.0 \times 10^0$
pKT230 (Km <sup>r</sup> ) (宿主はプラスミドを保持しないBD413株)	0.1	5	$5.0 \times 10^1$

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究  
組換え微生物の国際動向等に関する研究

主任研究者 首藤紘一 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品の安全性、特に遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向に関する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。参加した会議は、3つの会議で、FAO/WHO 共同専門家会議（2001年9月スイス、ジュネーブ）、CODEX 部会のドラフト案作成作業委員会（2001年11月米国、オークランド）および CODEX 部会（2002年3月日本、横浜）である。吉倉は、CODEX 部会の議長としてこの部会の進行と取りまとめを行い、討議事項をステップアップする事が出来た。これら3つの国際会議で取り上げられた遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性評価に必要なと思われる項目のうち、特に重要と思われる、かつその試験法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いた検討を試みた。本年度は、組換え微生物の免疫系への刺激に関する評価法と動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行について検討を行った。

協力研究者

吉倉 廣

国立感染症研究所 所長

五十君 静信

国立感染症研究所 食品微生物室長

挿入遺伝子は *Listeria monocytogenes* の主要な病原因子 Listeriolysin O (LLO)、発現様式は菌体表層に結合して発現させた組換え乳酸菌を用いた。この組換え体を、マウスマクロファージ系継代細胞 JA-4 細胞に加え、その接着、取り込み、生存およびサイトカイン産生を調べた。

動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行については、BALB/c マウスを用い、肛門閉鎖系によりモデル組換えプラスミドが腸内生息菌へ移行する頻度を、定量的に調べた。

（倫理面への配慮）

本研究では、倫理面への配慮が必要となる部分は含まれない。

A. 研究目的

遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向に関する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、バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に必要な要件を明らかにする。吉倉は、CODEX 部会の議長として参加国の意見の調整と議事進行を行う。さらに、組換え微生物応用食品の安全性確保に必要な検査法について、モデル組換え微生物を用い検討する。

B. 研究方法

国際機関により開催される遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する関連会議に出席し、情報収集および情報交換を行う。この過程で明らかとなったバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に必要な項目のうち、その試験検査法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いて検査法の検討を試みる。モデル組換え体の宿主乳酸菌には、*Lactobacillus casei* を用い、

C. 研究結果

国際的な動向は、遺伝子組換え微生物食品の安全性に関する会議に参加し、討論及びドラフト作成に関わった。吉倉は、CODEX 部会の議長として議事の進行を行った。

1. FAO/WHO 共同専門家会議（2001年9月スイス、ジュネーブ）

専門家会議では、組換え微生物を応用した食品の安全性は、既にガイドライン作成の進んでいる組換え植物に関する議論をふまえ、組換え微生物に固有の問題点を中心に議論された。実質的同等性を適用する妥当性、組換え微生物の動物腸管内で

の増殖定着の問題、それに伴う遺伝子の漏出の問題などを中心に討議された。ガイドラインの適用範囲は、最後まで議論され、専門家会議のガイドラインとしては、組換え体の宿主および組み込む遺伝子の供給元を食経験のある微生物に限ることで合意した。安全性の評価については、組換え微生物と最終生産物である食品の両者について行うことが合意された。専門家会議の内容は、ガイドラインとして公開された（文献リスト(1)）。

## 2. CODEX 部会のドラフト案作成作業委員会（2001年11月米国、オークランド）

2002年3月に横浜で開かれた CODEX 部会のたたき台として、アメリカが中心となり、ドラフトの作成を行った。ジュネーブでの専門家会議のガイドラインを基に、議論が行われた。ここでもガイドラインの適応範囲が長時間にわたり議論され、食経験のある微生物に限定するべきであるとされたが、再三の WHO の強い要望で、横浜で開催される部会には、食経験のない物については、安全性が確保されることを条件とする修正案を提出する事になった。作業委員会のドラフト（文献リスト(2)）は、公開されたのち、これに関する各国からの意見が集められた。

## 3. CODEX 部会（2002年3月日本、横浜）

植物組換え体食品の安全性に関するガイドライン、およびアレルギー評価法を中心に議論を行い、これらは合意された。組換え微生物に関しては作業委員会案が基本的に認められ、合意され step5 に進んだ。来年予定されている部会で、再度詳しく討議される予定である。

## 4. 組換え微生物が免疫系にどのような刺激を与えるかに関する試験系の検討

上述の専門家会議や委員会で組換え体の安全性を評価する場合に重要と思われるが、評価系が確立していない項目がいくつか指摘された。この中から、免疫系への刺激について、実証的な検討を行った。乳酸菌で既に作出済みのモデル組換え体を用いて、組換え微生物が、免疫系にどのような刺激を与えるかを検討するモデル評価系の検討を行った。LLO を発現したモデル乳酸菌は、マクロファージへの接着には影響を与えなかったが、その取り込みおよび生存を促進した。さらに、LLO を発現したことにより、マクロファージからの TNF $\alpha$  の産生を促進した。

## 5. 動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行の検討

肛門閉鎖系を用いることで、モデル乳酸菌 *Lactococcus lactis* から、マウス腸内フローラ構成菌である *Enterococcus faecalis* への組換えプラスミドの移行を接合伝達性プラスミドの共存下で、

定量的に観察できた。

## D. 考察

3つの国際会議では、いずれも組換え微生物を用いた食品に関するガイドライン作成は重要であるというコンセンサスがあり、具体的なガイドライン作りが行われた。既に議論が進んでいる植物ガイドラインと同様、その安全性評価は、実質同等性を適用することにより行うことが同意された。組換え微生物においては、生きたまま摂取することにより、動物あるいはヒト消化管内で増殖することから、組換え植物応用食品と異なった、組換え微生物に固有と考えられる問題点が指摘された。同時に、多くの重要な項目において、安全性評価法が未だ確立されていないことが示された。ガイドラインでは、今後そのような方面の研究が進むことにより、早急にその評価手法が確立されることが必要であることが明記された。特に、消化管内での組換え遺伝子の伝達、腸内フローラへの影響、免疫系への刺激等の問題について研究される必要があると結論された。実質的同等性の適用方法、免疫系への刺激、組換え微生物からの遺伝子の漏出の問題は重要と思われた。そこで、この中から、免疫系への刺激および組換え微生物からの遺伝子の漏出に関する評価系の検討を試みた。免疫系への刺激に関する研究では、LLO という免疫系にインパクトの強い病原体の主要な病原因子を導入した乳酸菌がどのような挙動を示すかを明らかにすると共に、この結果から、その評価を行うことの出来る実験系の確立を試みた。LLO を組み込んだ組換え乳酸菌は、親株と異なる免疫系細胞への反応性を示し、用いた実験系で定量的に免疫系への刺激を評価することが可能であることを示した。即ち、今回検討した手法は、組換え体の免疫担当細胞への刺激を定量的に観察できる試験法となりうることを示した。

動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行の検討では、特に伝達能を持たない遺伝子組換え用のプラスミドが、自然界に存在する接合伝達性プラスミド pAM $\beta$ 1 の働きにより、*in vivo* で腸内生息菌へ移行することが示された。この結果は、遺伝子組み換えに用いるプラスミドは、いずれも腸内生息菌へ移行する可能性があることを実証しており、安全性を考えるときに、伝達能の無いプラスミドを用いたとしても、遺伝子が移ることを前提に議論することが必要であることを示した。さらにマウス肛門閉鎖実験系は、非常に高頻度に遺伝子移行を観察することが可能であり、*in vivo* におけるプラスミドの移行を定量的に

調べる実験手法を提供することができた。

#### E. 結論

国際機関により開催される遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する関連会議に出席し、情報収集および情報交換を行うことが出来た。組換え微生物の安全性のために必要とされる情報の内、その試験法が確立していない免疫系への刺激に関する具体的な試験法とマウス腸管内で遺伝子移行を観察する実験系を示すことが出来た。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms.

Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. 24-28 September 2001.

(2) Proposed draft guideline for the conduct of food safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms.

CODEX ad hoc Intergovernmental task force on foods derived from biotechnology. November 2001.

(3) Igimi S. 2001. Development of the recombinant vaccines with Lactic Acid Bacteria as antigens delivery vehicles for mucosal immunization. *Journal of Intestinal Microbiology*. 14:67-73.2001.

(4) Tanaka Y, Igimi S and Amano F. 2001. Inhibition of Prostaglandin Synthesis by Nitric Oxide in RAW 264.7 Macrophages. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 391:207-217.

##### 2. 学会発表

(1) 五十君静信。組換え乳酸菌による感染防御の可能性。シンポジウム“細菌感染症に対する新しいタイプのワクチン開発”。第74回日本細菌学会総会。2001年4月2日。岡山。

(2) 五十君静信、佐藤英一、山崎学、天野富美夫、山本茂貴。Listeriolysin O関連遺伝子を発現した組換え乳酸菌のマウスへの免疫効果。第74回日本細菌学会総会。2001年4月3日。岡山。

(3) Satoh E, Miyoshi Y, Igimi S, Leer RJ and Pouwels PH. Binding of mucus adhesion protein from *Lactobacillus reuteri* to human epithelium Caco-2 cells. *Euro LAB*. 2001.6

(4) Kim TW, Park SH, Igimi S and Kim HY. Use of a continuous culture system as a model for evaluating the characterization and population of Korean intestinal bacteria. *International Conference of Intestinal bacteriology*. 2001.7.5-6. Tokyo.

(5) Igimi S and Satoh E. Development of antigens delivery vehicles for mucosal immunization with *Lactobacillus casei*. *International Conference of Intestinal bacteriology*. 2001.7.5-6. Tokyo.

(6) 河野享子、山田靖子、五十君静信、加納康正。ピフィズス菌 hup 遺伝子の構成発現の解析と hup プロモーターに融合したペロトキシン I 型 B サブユニットの発現。日本乳酸菌学会。2001年7月11日。名古屋。

(7) 五十君静信、佐藤英一、村上和雄、山崎学、井上智、山本茂貴。リステリオリジン O 関連遺伝子を組み込み発現した *Lactobacillus casei* のマウスへの免疫。日本乳酸菌学会。2001年7月11日。名古屋。

(8) 五十君静信、佐藤英一、浅井美里、近藤美佳、佐藤美弥子、村上和雄、山崎学、井上智、天野富美夫、山本茂貴。Listeriolysin O 関連遺伝子を発現した組換え乳酸菌のマウスへの免疫効果。第132回日本獣医学会。2001年10月6-8日。盛岡。

(9) 五十君静信、近藤美佳、浅井美里、佐藤英一、山崎学、中野有実子、斎藤典子、村上和雄、山本茂貴、天野富美夫。菌体表面に Listeriolysin O を発現させた乳酸菌組換え体のマクロファージへの取り込み。日本農芸化学会。2002年3月25日。仙台。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

ガンマ インターフェロン (IFN $\gamma$ ) 産生誘導剤 (2001年8月申請)

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究  
遺伝子組換え魚に関する文献調査

主任研究者 首藤紘一 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

遺伝子組換え体魚類の作出に関する研究は1980年代中頃から始まっている。これらの研究では基礎研究用の実験動物として用いられているメダカやゼブラフィッシュなどと同時にニジマスやその他の産業対象種においても、ほぼ同時並行的に行われてきた。

本プロジェクト研究において文献調査対象は組換え体安全性に関する情報ということから、産業対象種を用いた組換え実験に関する文献を収集することにする。

水産生物において産業対象種とは観賞用と食用とに分類できる。観賞魚を用いて組換え体が報告されているものはキンギョとゼブラフィッシュがある。キンギョに関しては基礎研究用として組換え体を作成しており、ゼブラフィッシュも水中の汚濁物質をモニターする研究用として報告されているが、ゼブラフィッシュは体色を変える組換え体ということから、いつでも観賞用に対応可能であるといえる。

一方、産業対象種において、無脊椎動物ではアワビ、カキ、エビで組換え体が報告されている。魚類では大西洋サケ、ギンザケ、マスノスケ、ニジマスなどのサケ・マス類、ティラピア、コイ、ナマズ、ドジョウなどの淡水魚の他に、海産魚のマダイの一種でも報告されている。

これら産業対象種を用いた組換え体は基礎研究と高成長、耐病性付与といった研究に用いられている。導入された遺伝子は魚類以外のプロモーター・遺伝子から魚類のプロモーター・遺伝子を導入する傾向にある。

組換え体研究を行っている国としてはフランス、アメリカ、カナダ、イギリスといった国以外に韓国、中国、キューバ、イスラエル、ニュージーランド、フィンランド、スウェーデンと多岐に渡っている。

現在、実用化に最も近い種類として、サケ・マス類とティラピアがある。アメリカとカナダに会社を置くA/F Protein社がアメリカ食品医薬品局(FDA)に許可を申請中である。ティラピアに関してはキューバは自国での消費、イギリスが発展途上国に対する技術支援として研究を行っている。

日本においても1990年前後からメダカ等を用いて組換え体の研究が行われてきた。しかし、飼育条件の規制が厳しく、サケ・マス類のような流水系で飼育するような魚類の研究は行えなかった。しかし、飼育技術の発展に伴い、現在の規制の中でも飼育できる施設ができ、研究が行われるようになった。

協力研究者

名古屋博之

独立行政法人水産総合研究センター

養殖研究所遺伝育種部細胞工学研究室

主任研究官

近年、遺伝子組換え魚の作出に関する研究が各国から報告されるようになった。組換え体魚類は一度作出されると、精子の数や卵の数が多いことから、組換え体動物で最初の食品になるのではないかとされている。そこで、遺伝子組換え魚に関する各国の情勢等を文献、インターネット等で調査し、研究の現状を把握するこ

A. 研究目的