

Table 4 Summary of the contents of amino acid and phytate in corn (g/100g)

Amino acid	Non-GM	GM
Aspartic acid	0.60 ± 0.01	0.63 ± 0.04
Threonine	0.30 ± 0	0.32 ± 0.01
Serine	0.40 ± 0	0.42 ± 0.01
Glutamic acid	1.53 ± 0.01	1.60 ± 0.01
Proline	0.71 ± 0.01	0.74 ± 0.01
Glycine	0.29 ± 0	0.30 ± 0
Alanine	0.63 ± 0	0.66 ± 0
Valine	0.37 ± 0	0.39 ± 0.01
Isoleucine	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0
Leucine	1.07 ± 0.01	1.12 ± 0.01
Tyrosine	0.27 ± 0.01	0.30 ± 0.02
Phenylalanine	0.40 ± 0	0.42 ± 0.01
Histidine	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01
Lysine	0.24 ± 0	0.25 ± 0.01
Arginine	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01
Cystin	0.18 ± 0	0.18 ± 0
Methionine	0.17 ± 0	0.17 ± 0
Tryptophan	0.06 ± 0	0.06 ± 0
phytate	0.46 ± 0.06	0.44 ± 0.01

(n=2)

次いで、50%GM, NGM混餌飼料を摂取させたB10Aマウス、BNラットの体重及び餌の摂取量の13週間にわたる経時変化を示すが、体重、餌の摂取量とも両群で有意差はみられなかった(Fig 1,2)。

Fig.1 Changes in body weight

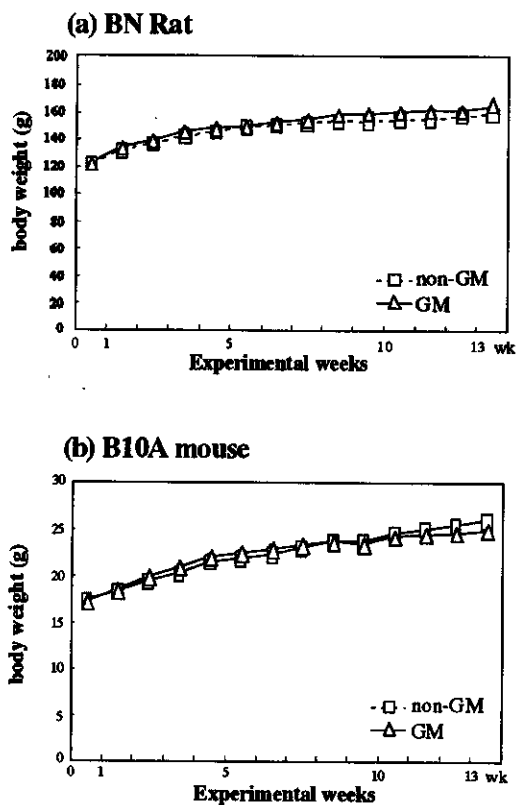


Fig.2 Changes in diet intake

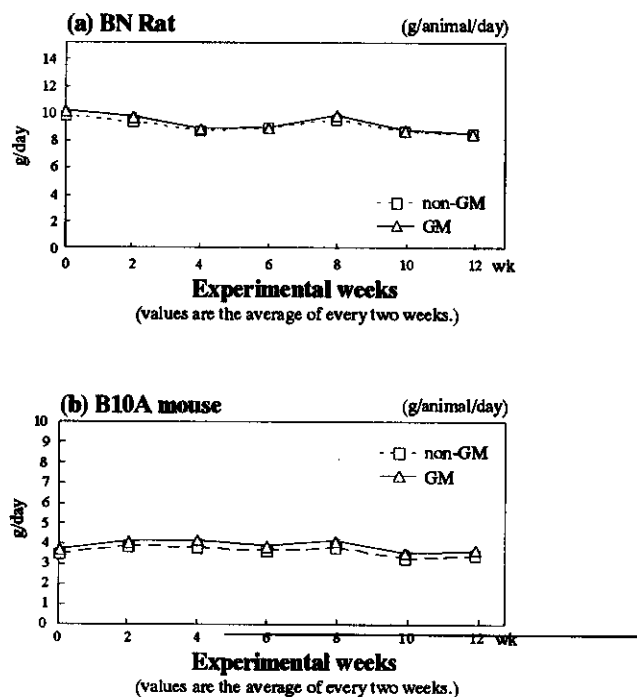


Table 5 Body and organ weight of BN rats and B10A mice

1) BN rats

	Groups	
	non-GM	GM
Body weight (g)	153.7 ± 6.970 ^{a)}	157.3 ± 6.302
Organ weight (g)		
Thymus	0.165 ± 0.027	0.177 ± 0.029
Spleen	0.266 ± 0.023	0.273 ± 0.022
Liver	3.833 ± 0.169	3.749 ± 0.204

^{a)}: Mean ± SD

(n=10)

2) B10A mice

	Groups	
	non-GM	GM
Body weight (g)	25.83 ± 1.789 ^{a)}	23.91 ± 1.544
Organ weight (mg)		
Thymus	43.75 ± 10.09	42.70 ± 7.409
Spleen	78.34 ± 20.62	73.42 ± 7.516
Liver	996.4 ± 147.6	930.9 ± 75.91

^{a)}: Mean ± SD

(n=10)

Table 6 Hematological changes in BN rats and B10A mice

	Groups	
	non-GM	GM
1) BN rats		
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	883.6 \pm 45.91a)	911.8 \pm 28.04
MCV (fL)	52.81 \pm 0.331	52.98 \pm 0.329
MCH (pg)	16.47 \pm 0.652	16.83 \pm 0.275
MCHC (g/dL)	31.19 \pm 1.232	31.78 \pm 0.507
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	23.00 \pm 6.912	21.63 \pm 14.84
Differential cell counts		
(%) Neut	17.96 \pm 14.12	20.61 \pm 11.82
Eosino	3.122 \pm 1.977	1.900 \pm 2.558
Baso	0	0
Lymph	77.26 \pm 14.25	76.19 \pm 12.55
Mono	1.667 \pm 1.000	1.300 \pm 0.949
Ebl	0	0
a) :Mean \pm SD		(n=10)
2) B10A mice		
	Groups	
	non-GM	GM
RBC ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	983.3 \pm 165.8a)	958.0 \pm 117.7
MCV (fL)	52.59 \pm 0.446	51.13 \pm 0.701
MCH (pg)	14.13 \pm 0.437	14.41 \pm 0.621
MCHC (g/dL)	27.38 \pm 0.824	28.15 \pm 1.133
WBC ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	24.60 \pm 5.177	26.00 \pm 4.243
a) :Mean \pm SD		(n=10)

Table 7 Serum biochemistry in BN rats

	Groups	
	non-GM	GM
Total protein (g/dL)	5.410 \pm 0.534a)	5.150 \pm 0.366
A/G	2.530 \pm 0.231	2.520 \pm 0.220
a) :Mean \pm SD		(n=10)

Table 8 Determination of plasma serum Histamine

	Groups	
	non-GM	GM
1) BN rats		
serum histamine (nM)	58.69 \pm 17.80	64.16 \pm 20.80
		(n=8)
2) B10A mice		
	Groups	
	non-GM	GM
serum histamine (nM)	85.26 \pm 59.8	62.28 \pm 42.0
		(n=8)

また、13週投与後の肝臓、脾臓、胸腺重量において、両群に差は見られなかった (Table 5)。両群の血液検査において、血球数測定 (Table 6) において有意差はみられず、血清の検査項目である総タンパク量、アルブミン/グロブリン比 (A/G値)、ヒスタミン濃度においても有意差はみられなかった (Table 7, 8)。さらに、肝臓、脾臓、胸腺、腸管膜リンパ節、パイエル板、各臓器の病理組織像において、構成される細胞成分や構造における異常は認められず、また、小腸粘膜上皮のクリプトやゴブレット細胞の出現の頻度に異常は認められなかった。このことにより、今回の実験では、GMとうもろこし摂取による免疫系組織への影響を示す病理学的また、生化学的所見は観察されなかった。次いで、GMとうもろこしを投与したラット、マウス血清中のCry9Cに対する抗体価をELISAで調べた結果について、Table 9に示す。Cry9C蛋白質に対する即時型アレルギーの指標となるIgE抗体価は、GM, NGMとうもろこし摂取群とも50以下で、Cry9Cに対するIgE抗体産生はみられなかった。抗原性の残留の有無を確認するためにCry9C蛋白質に対するIgG1抗体価も測定したところ、BNラットのGMとうもろこし摂取群において、抗体価500を越える動物が10匹中6匹でみられ、抗体価の平均も、560となった。B10AマウスのGMとうもろこし摂取群も含め、他の群では、Cry9Cに対するIgG1抗体価は、すべて500以下で、抗体産生の上昇は、観察されなかった。なお、5%スターリクとうもろこし混餌飼料を、13週間摂餌させたBNラットでは、Cry9Cに対するIgG1抗体価の上昇は観察されなかった (data not shown)。50%とうもろこし混餌投与したBNラットでみられたIgG1抗体価の微小な上昇は、後述するように、Cry9C抗体の潜在的抗原性を調べるために、Cry9C 5 μg を腹腔内に強制的に投与した場合に得られる、Cry9Cに対するIgG1抗体価 (300,000程度) に比べ、1/500とはるかに低く、アレルギーに対して問題になるレベルとは考えられない。なお、Cry9Cタンパクそのものは、GMとうもろこし摂取群においても、血液中からは、全く検出されなかった。

Table 9 Cry 9C-specific-IgE and IgG1 production in BN rats and B10A mice fed with ground GM-corns or non-GM-corns

1) BNrats		
Group	ELISA-titer (n=10)	
	Cry9C-IgE	Cry9C-IgG1
GM-corn	<50	560 ± 74 [†]
non-GM-corn	<50	<500

[†]: Values are means ± S.D.

2) B10A mice		
Group	ELISA-titer (n=10)	
	Cry9C-IgE	Cry9C-IgG1
GM-corn	<50	<500
non-GM-corn	<50	<500

以上をまとめると、レクチン遺伝子を導入した組換えポテトを投与したラットの免疫系に影響がみられるというEwen S.W.R.らの報告(The Lancet 354, 1353, 1999)にみられるような腸管などの免疫系への影響は、今回のGM(スターリンク)とうもろこし投与したラット、マウスの群においては観察されなかった。また、導入タンパク質であるCry9Cに対するIgE抗体はBNラット、B10Aマウスどちらにおいても産生されなかったこと、また、血清中ヒスタミン含量の上昇も全く認められなかったことより、これら動物において、即時型アレルギーを誘発している所見はえられなかった。小腸内容物中に残っているCry9Cの測定をELISA法で行った時、えさとして投与した量の最大で0.1%程度が残っているという結果が得られ、Western blot法で55kDaの分解途中のタンパクが検出された。従って、一部小腸に残っているCry9Cがパイエル板等のリンパ組織で抗原提示され、IgG抗体の産生が起きた可能性が考えられた。従って、今回の動物実験の結果から、Cry9Cタンパク質は、小腸に入っても、一部抗原性は残っている状態で存在しており、低濃度のCry9C特異的抗体産生が起きたものと思われるが、低濃度の抗原特異的IgG抗体が、即時型アレルギーに促進的に働くという報告はない。一般に、抗原特異的IgG抗体の増加は、アレルゲンに対しIgEと競合し、blocking antibody (阻止抗体)として働く⁶⁾ことから、即時型アレルギーには、抑制的に働くと考えられている。一方で、抗原特異的IgG抗体が、アレルギーに促進的

に働く例としては、沈降抗体を生じるほど高濃度で存在する時、抗原抗体複合体を介するアルサス(III)型皮膚反応等を引き起こす例が報告されているのみである⁷⁾。今回のGM(スターリンク)とうもろこしを摂取させた動物実験では、抗原特異的IgE抗体は産生されず、血液学的検査及び主要免疫臓器の病理組織像においても異常は認められないことより、GMとうもろこしの比較的長期(亜急性毒性の期間)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る。

(ii)Cry9Cの潜在的抗体産生能の検討

1) ELISA法によるCry9C蛋白質に対する抗体の作成の確認

Table 10に示すように、B10AマウスにCry9CをAlumと共に腹腔内投与し、Cry9Cに対するIgE抗体の産生を調べたところ、5µg及び25µg Cry9Cをi.p.投与した群で、IgE抗体の産生がみられ、25µg投与群の方が幾分抗体価は高かった。また、IgG1抗体については5µg Cry9C投与で30,000以上、25µg Cry9C投与で63,000と比較的高い抗体価が得られた。同じ条件下で、B10AマウスにOVA 5µgを投与した場合、抗原特異的IgE抗体価としては、420の値が得られており、

Table 10. Cry9C 及びOVA投与B10Aマウス IgE 及びIgG1 抗体産生

	Antibody titer	
	Antigen-specific-IgE	Antigen-specific-IgG1
Cry9C (25 µg i.p)	547 ± 343	63,300 ± 22,100
Cry9C (5 µg i.p)	222 ± 31	36,300 ± 27,000
OVA (5 µg i.p)	421 ± 286	> 500,000
control	< 50	< 5,000

Table 11. Cry9C 及びOVA投与BNラットIgE 及びIgG1 抗体産生

	Antibody titer	
	Antigen-specific-IgE	Antigen-specific-IgG1
Cry9C (25 µg i.p)	395 ± 332	173,300±108,000
Cry9C (5 µg i.p)	505 ± 237	339,300±167,000
OVA (5 µg i.p)	720 ± 607	> 500,000
control	< 50	< 5,000

Cry9C蛋白質のIgE産生能としては、OVAと同程度と思われる。同様の結果は、Table11に示すようにBNラットを免疫した場合にも得られた。なお、BNラットでCry9Cの抗原濃度を下げて、腹腔感作も行ったが、Cry9C 0.5µgでは、5µgの投与時の1/10程度の抗体価の上昇が観察され、0.05µgでは、全く抗体価の上昇は観察されなかったため、最低感作濃度は、0.5µg程度であると考えられる(data not shown)。

(3)新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討

除草剤耐性CP4-EPSPS, 害虫毒素Cry1AbのSGFによる分解は、早く、1分以内で、すべて分解された。この分解は、基質タンパク質の加熱前処理により幾分早まった。一方、SIFによる分解は、2時間程度を要したが、加熱により分解時間は短くなり、数分程度に短縮された。

D. 結論

(1) 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検討したが、陽性の血清はみられなかった。

(2) 動物実験では、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、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。

(3)人工胃腸液による分解性の検討では、特に人工腸液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がみられた。

E. 参考文献

- 1) WHO: "Evaluation of allergenicity of genetically modified foods" Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on foods derived from biotechnology: 2225 January (2001) URL <http://www.who.int/fsf/GMfood/ConsultationJan2001/report20.pdf>
- 2) Board of Trustees(ed.). Test solutions, pp2053 in the United States Pharmacopeia 23, The National Formulary 18. United States Pharmacopeial Convention, Inc., Rockville, M.D. (1995)
- 3) Teshima, R., Akiyama, H., Okunuki, H., Sakushima J., Goda, Y., Onodera, H., Sawada, J. and Toyoda M., Effect of GM and nonGM-soybean on the immune system of BN rat and B10A mice. J. Food Hyg. Soc. Japan, 41, 188-193 (2000)
- 4) Knippels L.M.J., Penninks A.H., Spanhaak S. and Houben G.F., Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. Clin. Exp. Allergy, 28, 368-375 (1998)
- 5) Kimber I. and Dearmann R.J., Toxicol. Lett. 120, 165-170 (2001)
- 6)伊藤幸治訳: WHO見解書、アレルギー免疫療法: アレルギー疾患の治療ワクチン、アレルギー 47, 749-794 (1998)
- 7) Anderson J.A., Allergic reactions to foods., Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 36(S):S19-S38 (1996)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiyama H., Teshima R., Sakushima J., Okunuki H., Goda Y., Sawada J. and Toyoda M., Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice. Immunol. Lett., 78, 15 (2001)

- 2) 手島玲子、組換え食品の安全性とその

評価、農林水産技術研究ジャーナル 24, 34-39 (2001)

3)手島玲子、生活環境中のアレルギー原因物質について、国立医薬品食品衛生研究所報告 119, 27-39

4)Okunuki H., Teshima R., Shigeta T., Sakushima J., Akiyama H., Goda Y., Toyoda M. and Sawada J. , Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J.Food. Hyg.Soc. Japan) 43 (2), 2002 (in press)

2.学会発表

- 1)日本食品衛生学会第81回学術講演会「遺伝子組換え食品導入蛋白質(CP4-EPSPS等) の熱感受性並びにin vitro分解性試験」奥貫晴代、手島玲子、重田輝子、佐久嶋順一郎、穂山浩、合田幸広、豊田正武、澤田純一(2001.5)
- 2)第8回免疫毒性学会学術大会「遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験」手島玲子(2001.9)
- 3)第8回免疫毒性学会学術大会「食物アレルギーの臨床」河野陽一 (2001.9)

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

慢性毒性試験に関する研究

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部教授

研究要旨

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み替えトウモロコシ（T25、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、雌雄ともに体重増加、各種臓器重量には突起すべき変化は認められなかった。ただ2、3の生化学的データに対照群と比して有意をもって変化する項目があったが、これについては現在再測定を行っている。また病理組織学的検索は現在検討中である。

研究協力者

井上 達 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター長

いてはその施行そのものに疑問を投げかける意見があるが、安心意識の向上のためにも安全であるとの科学的根拠を構築する必要がある。その意味から、化審法に基づく90日間の反復投与毒性試験を行う意義は大きい。本研究では除草剤耐性目的に作られた遺伝子組み替えトウモロコシ（T25, Hoechst Schering AgrEvo GmbH, ドイツ）について行った。

A. 研究の目的

バイオテクノロジー技術によって作り出されている遺伝子組み替え食物が農業を使用しない安全な食品として、世界的に生産されつつあり、実際にヒトが日常摂取する食品中に素材として混入し、実際にヒトが曝露している可能性が高い。しかし、その安全性については多くの議論がなされているところである。この安全性についてはまだ歴史が浅いこともあって十分な科学的データが不足している現在、国民の安心意識の向上のためにもできる限りの研究を進める必要がある。発がん性を含めた長期毒性試験につ

B. 研究方法

研究対象の遺伝子組替え食物として除草剤耐性目的に作られた遺伝子組替えトウモロコシ（T25, Hoechst Schering AgrEvo GmbH, ドイツ）を選択した。実験計画を立てるに当たって、まず文献的考察を行い、その結果、T25の濃度を既存の基礎飼料に用いられている24.5%

するのが、適切との結論に至った。この濃度一般発がん性ないし毒性試験で許容されている検体濃度である 10%を遙かに越える高濃度であるが、飼料に用いられているトウモロコシを置き換えるという意味で、意義があり、問題ないと判断した。下記に述べるように、基礎食として何を用いるについても、検討対象が食品の中で重要な因子であるがゆえに、慎重に検討した。組成が公開されている改良 NIH 飼料 (表 1) を用いることとした。

F344 雌雄ラット 80 匹 (日本チャースルリバー) を用いる。動物は雌雄各 4 群すなわち遺伝子組み替えトウモロコシ (T25) 高濃度群 (24.5%)、中濃度群 (8.2%)、低濃度群 (2.8%)、および対照群 (0%) である。全体のトウモロコシの量を各群間で同一 (全量を 24.5%) にするために、遺伝子組み替えトウモロコシで補正した (すなわち高濃度群から対照群それぞれ 0, 16.3, 21.7 および 24.5%混じる)。いずれのトウモロコシも粉末基礎飼料にミキサーにて適切濃度で混入攪拌し、実験に用いる。雌雄とも各群 10 匹のラットを用いた。5 週令の動物を購入し、一週間の観察の後、実験に供した。実験飼料は 90 日間自由摂取させた。実験は GLP 対応の施設で行った。各群における遺伝子改変トウモロコシの濃度とそれに対応する非遺伝子組み替えトウモロコシの濃度は表 2 に示すごとくである。基礎食に用いるオリエンタル酵母製の改良 NIH オープン・フォーミュラは表 1 に示すごとく脱脂大豆が 11.75%含まれており、この中に遺伝子組み替え大豆が約 50%含まれている。したがって、実験を正確に行うためにはこの大豆を非遺伝子組み替えのものに特別に調

合した。

倫理面での配慮：動物愛護の観点を十分に配慮した実験をおこなう。

C. 研究結果

実験は終了し、現在病理標本作成中である。図 1 に全群の体重増加曲線を示している。雌雄とも遺伝子組換えトウモロコシの投与による体重増加抑制あるいは体重増加促進は認められなかった。遺伝子組換えトウモロコシの摂取量は摂餌量 (図 2) から換算したが、図 3 に示すように総摂取量は当初の設定どおりであった。最終体重および各臓器の平均重量を表 3、4、5 に示したが、いずれのデータも各群間に差は認められなかった。表 6 から 11 には生化学的データを示す。血清学的所見のなかで、アルカリホスファターゼや総ビリルビン値 (表 9) を始め、電解質の一部 (表 10, 11) や無機リン (表 12) に統計学的有意差を示すものが認められた。これらの有意差は雄の高濃度群に多く見られた。

D. 考察

現在の遺伝子組換え食品の安全性に関する試験法の基準プロトコールはなく、本試験が適切であるかどうかは今後の検討を待つ必要がある。今回のラットに対する 90 日反復投与においてはまた病理組織学的な結果は出ていないものの、肉眼的には何ら異常な観察されておらず、各種臓器重量も変動していないことが明らかとなっており、大きな影響はなかったと結論つけることができる。ただし生化学データの一部に統計学的差異を認めるものがあつたが、この生物学的意義については不明な点が多い。現在再度残

りの検体を用いて測定中であり、その結果と病理組織学的所見を合わせて、最終結論を得たい。

E. 結論

遺伝子組換えトウモロコシT25のYZ3のラットを用いた90日反復投与毒性試験を行った。現在のところ生化学的データの大部分を除き異常所見は認められていない。そこで、本試験結果を踏まえ、更に慢性毒性試験についての検討を進めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kawabe, M., Cui, L., Kimoto, N., Sano, M., Hirose, M., Shirai, T.: Modifying effects of propolis on MeIQx promotion of rat hepatocarcinogenesis and in a female rat two-stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. *Nutrition and Cancer*. 37: 179-186, 2000.

Hokaiwado, N., Asamoto, M., Cho, Y.-M., Imaida, K., Shirai, T.: Frequent c-Ha-*ras* gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Cancer Lett.* 163: 187-190, 2001.

Imaida, K., Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H., Shirai, T.: Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 22: 467-472, 2001.

Ogawa, K., Nakanishi, H., Takeshita, F., Futakuchi, M., Asamoto, M., Imaida, K., Tatematsu, M., Shirai,

T.: Establishment of rat hepatocellular carcinoma cell lines with differing metastatic potential in nude mice. *Int. J. Cancer*. 91: 797-802, 2001.

Hagiwara, A., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., Hirose, M., Ito, N., Shirai, T.: Dose-dependent induction of glandular stomach preneoplastic and neoplastic lesions in male F344 rats treated with catechol chronically. *Toxicol. Pathol.* 29: 180-186, 2001.

Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Takahashi, S., Ikeda, Y., Imaida, K., Shirai, T.: Prostate carcinomas developing in transgenic rats with SV40 T antigen expression under probasin promoter control are strictly androgen dependent. *Cancer Res.* 61: 4693-4700, 2001.

Imaida, K., Sano, M., Tamano, S., Asamoto, M., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T.: Organ dependent enhancement of rat 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) carcinogenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP): positive effects on the intestine but not the prostate. *Carcinogenesis*. 22: 1295-1299, 2001.

Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Ikeda, Y., Takahashi, S., Shirai, T.: Metastasizing neuroblastomas from taste buds in rat transgenic for the simian virus 40 large T antigen under control of the probasin gene promoter. *Toxic. Pathol.* 29: 363-368, 2001.

Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.: Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Lett.* 171: 17-25, 2001.

Mori, T., Imaida, K., Tamano, S., Sano, M., Takahashi, S., Asamoto, M., Takeshita, M., Ueda, H., Shirai, T.: Beef tallow, but not perilla or corn oil, promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Jpn. J. Cancer Res.* 92: 1026-1033, 2001.

Imaida, K., Kuzutani, K., Wang, J., Fujiwara, O., Ogiso, T., Kato, K., Shirai, T.: Lack of promotion of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-initiated mouse skin carcinogenesis by 1.5 GHz electromagnetic near fields. *Carcinogenesis*. 22: 1837-1841, 2001.

G. 知的所有権の取得状況

なし

表1.

改良NIH (Open Formula)

トウモロコシ	24.5 %*
脱脂粉乳	5.0 %
北洋魚粉	10.0 %
脱脂大豆	11.75 %**
アルファミール	4.0 %
グルテンミール	3.0 %
小麦粉	32.87 %
ビール酵母	2.0 %
糖質	0.75 %
大豆油	2.5 %
食塩	0.33 %
リン酸2カルシウム	1.25 %
ミネラル混合	1.05 %
ビタミン混合	1.0 %

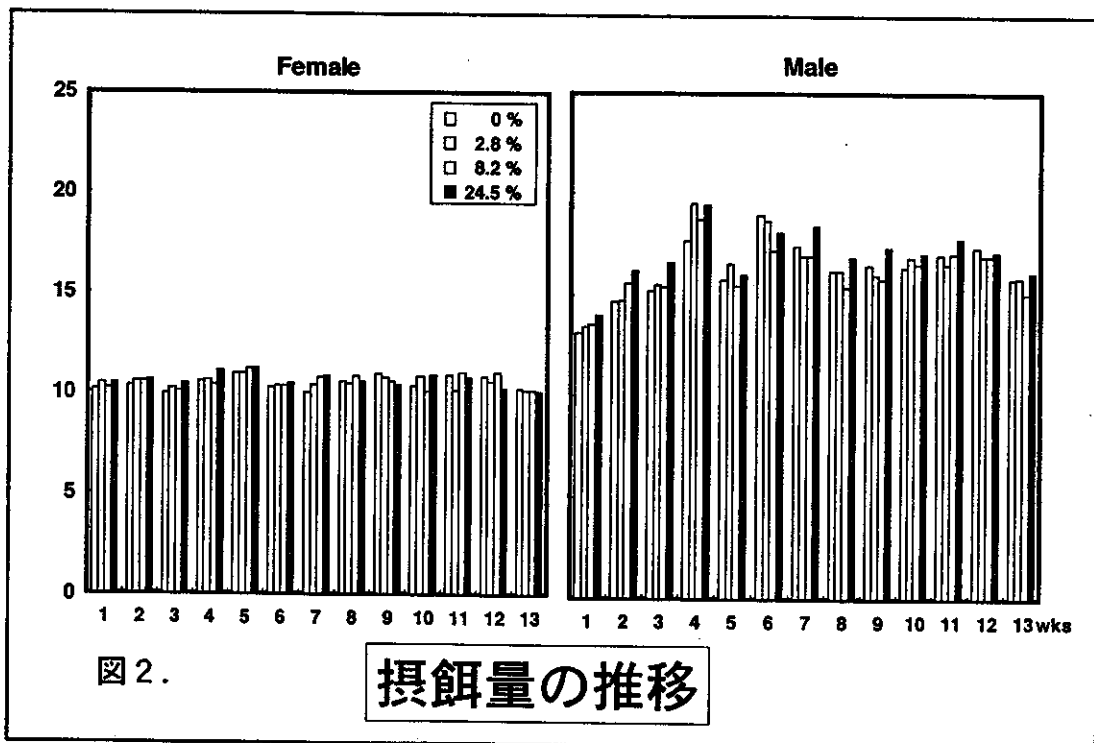
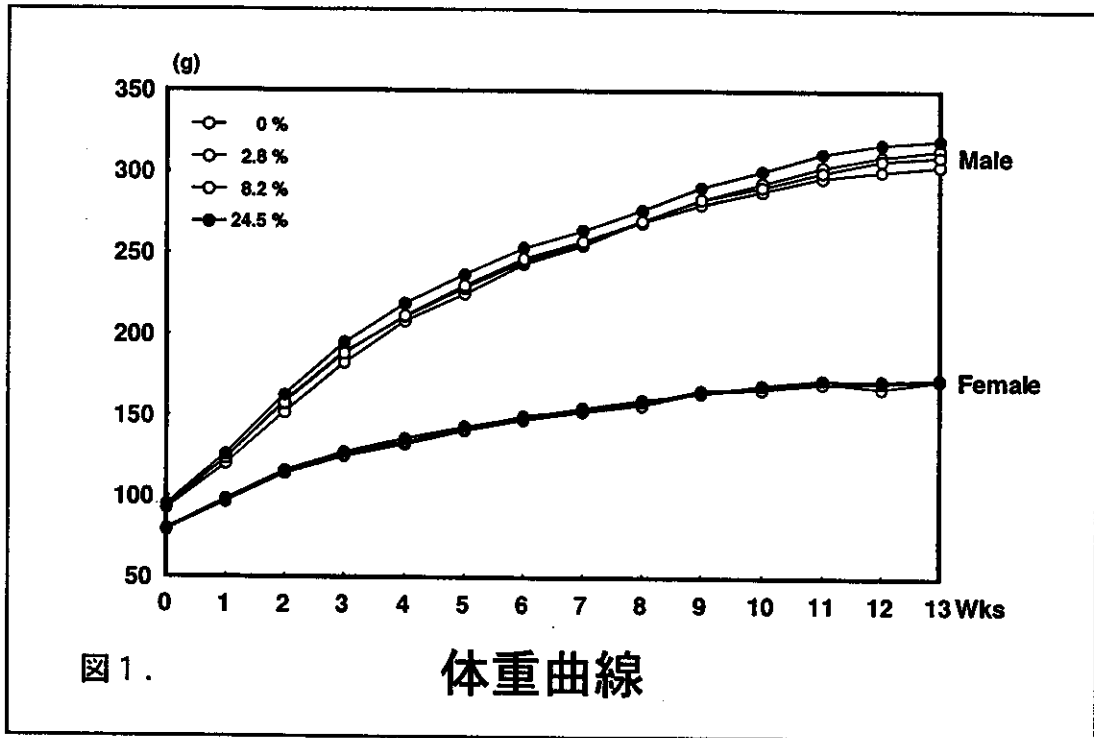
* : 計画にそって遺伝子組換トウモロコシに置き換える

** : 非遺伝子組換のものと完全に置き換える

表2.

T25の90日試験の実験群構成

	遺伝子組換 トウモロコシ	非遺伝子組換 トウモロコシ	合計
1群 (高濃度)	24.5 %	0 %	24.5 %
2群 (中濃度)	8.2 %	16.3 %	24.5 %
3群 (低濃度)	2.8 %	21.7 %	24.5 %
対照群	0 %	24.5 %	24.5 %



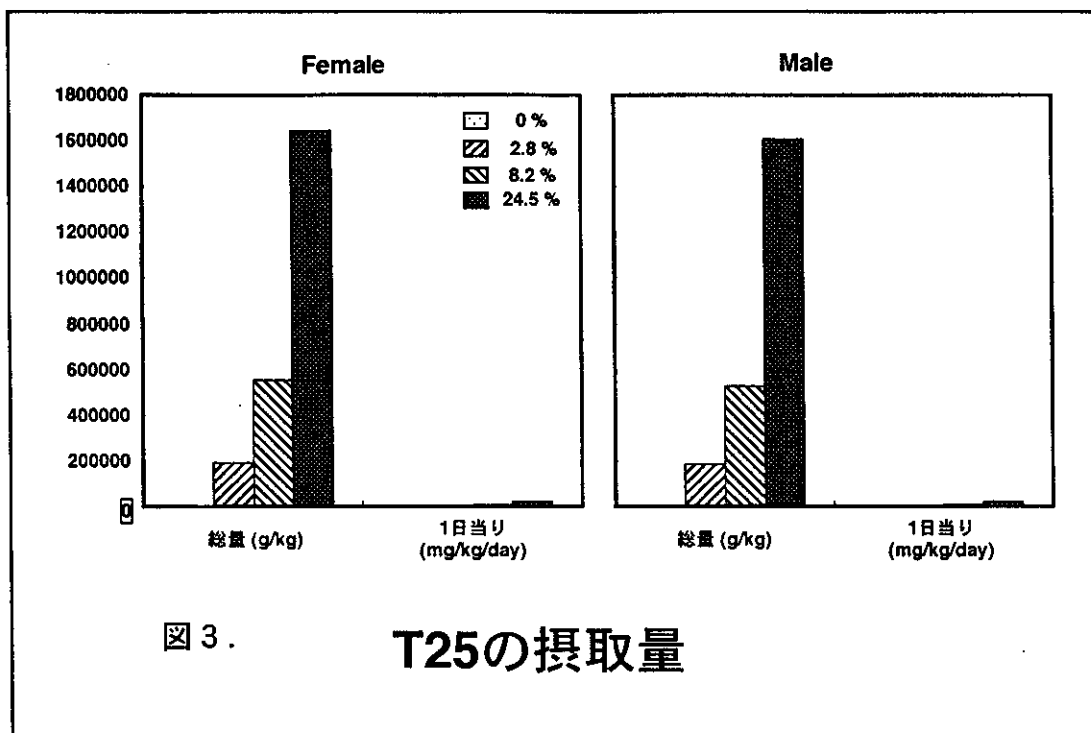


図 3. T25の摂取量

表 3. 体重および主要臓器重量 (1)

Sex	Group No.	Level (%)	No. of Examined	Final B.W.	Liver	Kidneys	Lung	Heart	Brain
Female	1	0	10	162.8 ± 6.5	3.80	1.12	0.70	0.51	1.78
	2	2.8	10	162.5 ± 5.6	3.75	1.11	0.69	0.54	1.76
	3	8.2	10	164.6 ± 4.3	3.84	1.12	0.70	0.54	1.77
	4	24.5	10	164.0 ± 4.1	3.77	1.13	0.70	0.53	1.78
Male	5	0	10	301.1 ± 9.1	7.79	1.98	0.97	0.89	1.90
	6	2.8	10	293.1 ± 13.8	7.50	1.96	0.97	0.88	1.89
	7	8.2	10	299.1 ± 14.2	7.61	1.93	1.00	0.89	1.92
	8	24.5	10	308.5 ± 13.5	8.01	2.04	0.02	0.93	1.92

表 4. 体重および主要臓器重量 (2)

Sex	Group No.	Level (%)	No. of Examined	Final B.W.	Spleen	Thymus	Adrenals	Pituitary	Thyroids
Female	1	0	10	162.8 ± 6.5	0.39	0.15	0.04	0.01	0.01
	2	2.8	10	162.5 ± 5.6	0.37	0.15	0.04	0.01	0.01
	3	8.2	10	164.6 ± 4.3	0.38	0.16	0.05	0.01	0.01
	4	24.5	10	164.0 ± 4.1	0.39	0.14	0.04	0.01	0.01
Male	5	0	10	301.1 ± 9.1	0.60	0.17	0.04	0.01	0.02
	6	2.8	10	293.1 ± 13.8	0.59	0.17	0.04	0.01	0.02
	7	8.2	10	299.1 ± 14.2	0.60	0.17	0.04	0.01	0.02
	8	24.5	10	308.5 ± 13.5	0.61	0.18	0.04	0.01	0.02

表 5. 体重および主要臓器重量 (3)

Sex	Group No.	Level (%)	No. of Examined	Final B.W.	Prostate (Ventral)	Seminal Vesicle	Uterus	Ovaries / Testes	Salivary Glands
Female	1	0	10	162.8 ± 6.5	—	—	0.36	0.08	0.31
	2	2.8	10	162.5 ± 5.6	—	—	0.50	0.08	0.30
	3	8.2	10	164.6 ± 4.3	—	—	0.52	0.09	0.31
	4	24.5	10	164.0 ± 4.1	—	—	0.41	0.08	0.30
Male	5	0	10	301.1 ± 9.1	0.42	0.78	—	3.07	0.47
	6	2.8	10	293.1 ± 13.8	0.43	0.79	—	2.97	0.47
	7	8.2	10	299.1 ± 14.2	0.42	0.85	—	3.02	0.47
	8	24.5	10	308.5 ± 13.5	0.46	0.83	—	2.99	0.51

表 6.

13 WEEK FEEDING STUDY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISM CORN (T-25) IN RATS

NO. OF EXAMINED	WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)		RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)		HB (g/dl)		HT (%)	
10	49.1	± 9.1	817.0	± 32.4	15.63	± 0.52	44.00	± 1.58
10	47.1	± 5.9	808.4	± 31.2	15.49	± 0.37	43.00	± 1.36
10	46.2	± 5.3	823.5	± 26.0	15.55	± 0.33	44.19	± 1.71
10	48.2	± 9.3	834.1	± 35.1	15.75	± 0.50	44.55	± 1.83
10	62.1	± 12.1	903.3	± 32.4	15.57	± 0.40	45.33	± 1.42
10	61.4	± 9.5	908.7	± 17.8	15.60	± 0.36	45.51	± 1.47
10	57.5	± 7.9	899.8	± 20.2	15.38	± 0.36	44.93	± 1.05
10	59.8	± 6.9	910.9	± 19.0	15.52	± 0.42	45.55	± 1.03

表 7.

13 WEEK FEEDING STUDY OF GENETICALLY MODIFIED ORGANISM CORN (T-25) IN RATS

NO. OF EXAMINED	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	PLATELET ($\times 10^4/\mu\text{l}$)				
10	53.88	± 1.37	19.13	± 0.76	35.51	± 1.43	62.49	± 2.59
10	53.23	± 1.30	19.18	± 0.55	36.04	± 1.13	58.67	± 4.17
10	53.66	± 1.19	18.88	± 0.55	35.24	± 1.33	60.37	± 6.23
10	53.43	± 1.33	18.90	± 0.64	35.38	± 1.28	62.09	± 4.56
10	50.21	± 0.70	17.24	± 0.39	34.35	± 0.61	62.81	± 3.23
10	50.09	± 0.83	17.17	± 0.26	34.29	± 0.75	61.67	± 4.49
10	49.92	± 0.49	17.12	± 0.33	34.22	± 0.76	59.62	± 3.38
10	50.02	± 0.82	17.04	± 0.30	34.07	± 0.92	62.96	± 2.68

表 8.

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	AST (U/l)	ALT (U/l)	ALP (IU/l)	γ-GTP (IU/l)	T-BIL (mg/dl)
FEMALE	1	0	10	92.3 ± 12.5	43.3 ± 4.3	2280 ± 298	1.02 ± 0.23	0.028 ± 0.011
	2	2.8	10	88.0 ± 14.7	41.4 ± 2.3	2274 ± 23.2	1.13 ± 0.39	0.028 ± 0.004
	3	8.2	10	88.3 ± 15.4	44.1 ± 5.2	2433 ± 203	1.09 ± 0.15	0.032 ± 0.004
	4	24.5	10	90.7 ± 8.3	45.8 ± 4.1	2363 ± 209	1.06 ± 0.23	0.030 ± 0.008
MALE	5	0	10	91.2 ± 24.2	47.7 ± 8.8	3054 ± 34.5	0.62 ± 0.24	0.019 ± 0.003
	6	2.8	10	84.9 ± 11.3	47.6 ± 6.8	3080 ± 27.6	0.53 ± 0.28	0.026 ± 0.007*
	7	8.2	10	88.7 ± 18.9	47.3 ± 8.7	3123 ± 39.4	0.70 ± 0.28	0.022 ± 0.008
	8	24.5	10	93.2 ± 19.4	48.7 ± 8.5	3369 ± 156*	0.88 ± 0.34	0.016 ± 0.005

*: Significantly different from control group at P<0.05.

表 9.

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	BUN (mg/dl)	CRE (mg/dl)	GLU (mg/dl)	T-CHO (mg/dl)	PL (mg/dl)
FEMALE	1	0	10	22.29 ± 2.41	0.52 ± 0.04	127.6 ± 16.3	67.6 ± 8.9	135.9 ± 15.7
	2	2.8	10	21.63 ± 1.10	0.53 ± 0.05	121.3 ± 11.6	68.8 ± 5.0	138.4 ± 11.1
	3	8.2	10	22.67 ± 2.02	0.54 ± 0.05	126.1 ± 19.5	72.3 ± 3.5	145.7 ± 5.6*
	4	24.5	10	23.13 ± 1.56	0.54 ± 0.05	126.1 ± 14.7	66.9 ± 7.8	136.6 ± 14.9
MALE	5	0	10	21.44 ± 1.57	0.47 ± 0.05	144.6 ± 12.6	50.9 ± 6.2	103.4 ± 11.0
	6	2.8	10	21.48 ± 3.04	0.47 ± 0.05	140.8 ± 18.4	50.4 ± 6.7	99.6 ± 14.5
	7	8.2	10	21.49 ± 2.05	0.49 ± 0.03	145.5 ± 18.8	52.9 ± 7.3	106.5 ± 14.5
	8	24.5	10	22.43 ± 0.98	0.50 ± 0.00	159.8 ± 8.4*	51.9 ± 3.9	107.1 ± 4.7

*: Significantly different from control group at P<0.05.

表10.

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	CA (mg/dl)	MG (mg/dl)	NA (mEq/l)	K (mEq/l)	CL (mEq/l)
FEMALE	1	0	10	9.28 ± 0.53	2.15 ± 0.16	132.74 ± 7.06	4.528 ± 0.235	101.99 ± 2.85
	2	2.8	10	9.45 ± 0.28	2.19 ± 0.11	135.18 ± 2.77	4.401 ± 0.327	101.64 ± 3.69
	3	8.2	10	9.82 ± 0.21 **	2.25 ± 0.29	138.16 ± 2.56	4.576 ± 0.739	103.05 ± 0.69
	4	24.5	10	9.64 ± 0.44	2.32 ± 0.32	137.62 ± 4.07	4.727 ± 0.551	103.75 ± 1.66
MALE	5	0	10	9.31 ± 0.99	1.96 ± 0.21	130.32 ± 7.94	4.188 ± 0.378	98.24 ± 3.13
	6	2.8	10	9.45 ± 0.99	2.00 ± 0.21	131.76 ± 5.80	4.224 ± 0.293	99.15 ± 1.85
	7	8.2	10	9.86 ± 0.74	2.08 ± 0.15	135.91 ± 5.21	4.210 ± 0.367	100.40 ± 2.16
	8	24.5	10	10.26 ± 0.28 **	2.16 ± 0.10 *	140.78 ± 1.87 **	4.385 ± 0.285	102.25 ± 2.79 **

*, **: Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

表11.

SEX	GROUP NO.	LEVEL (%)	NO. OF EXAMINED	TG (mg/dl)	TP (g/dl)	ALB (g/dl)	A/G	IP (mg/dl)
FEMALE	1	0	10	20.6 ± 6.1	5.48 ± 0.37	2.52 ± 0.15	0.853 ± 0.021	5.18 ± 0.55
	2	2.8	10	20.9 ± 5.3	5.65 ± 0.20	2.56 ± 0.07	0.828 ± 0.026 *	4.94 ± 0.76
	3	8.2	10	23.5 ± 6.4	5.82 ± 0.18 **	2.68 ± 0.09 **	0.853 ± 0.023	5.50 ± 1.03
	4	24.5	10	25.4 ± 6.1	5.69 ± 0.27	2.62 ± 0.15	0.853 ± 0.031	5.63 ± 0.87
MALE	5	0	10	78.6 ± 15.1	5.62 ± 0.61	2.46 ± 0.28	0.777 ± 0.020	5.60 ± 0.43
	6	2.8	10	67.4 ± 20.1	5.66 ± 0.69	2.47 ± 0.29	0.775 ± 0.024	5.64 ± 0.62
	7	8.2	10	76.4 ± 19.4	5.92 ± 0.58	2.58 ± 0.21	0.773 ± 0.039	5.90 ± 0.54
	8	24.5	10	78.3 ± 18.3	6.14 ± 0.16 **	2.67 ± 0.08	0.769 ± 0.023	6.19 ± 0.34 *

*, **: Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

厚生科学研究補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

分担研究報告書

クローン技術を利用した動物性食品の安全性について

分担研究者 熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

我が国で成育中の体細胞クローン牛について報告されている各種データおよび国外において報告されているデータを入手し、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。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。

A. 目的

体細胞クローン牛については、食品としての安全性を懸念する科学的根拠はないが、新しい技術であるため消費者に対する信頼性確保の上から、安全性の裏付けとなるデータを集積することが望まれる。これらデータの集積に資するため、種々の成育や乳肉質のデータを収集するとともに、体細胞クローン牛の肉中における残留塩素系農薬濃度および同牛のステロイドホルモン（エストロゲン）濃度の測定を行う。これら体細胞クローン牛の成育や同牛由来の乳肉の品質を含めたデータに基づいて、食品としての安全性について考え方を求めることが本研究の目的である。

B. 研究方法

都道府県や大学等の試験研究機関において生産された体細胞クローン牛の成育状況や繁殖能力について、既に報告されている文献を収集するとともに、農林水産省の協力の下に情報を収集するとともに、その他国内外の体細胞クローン牛関連の文献も収集し、それらの中から関連する知見を抜き出し整理した。（社）畜産技術協会が行っている肉質や乳質の調査データを入手した。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。

C. 研究結果

体細胞クローン牛について成13年12月末日時点で、試験研究機関において、合計272頭の生産が報告されており、うち飼養中の個体が124頭、うち18頭は平成10年に生まれた牛である。病死等による死亡は43頭、そのうちの多くが2ヶ月齢未満に見られ、2ヶ月齢以上の月齢での死亡例は7例でその死亡原因は肺炎、肺気腫、衰弱死、臍帯周辺部の炎症、特定できず、等であった。表1には平成13年9月30日現在の集計結果を示した。表中の60日未満の病死例の多くは、生後数日以内の死亡例であった。生後直死と60日未満死亡例の割合は、出産時体重が40kg 以上の場合に40kg 未満の場合と比べて高い傾向が認められた(表2)。また、移植から分娩までの日数が269日以下の牛では、死産の割合が比較的高いことが認められた(表2)。

6頭の体細胞クローン肥育牛について、通常のと畜検査が行われた

が、体細胞クローン技術に特有と思われる異常所見は報告されていない。

一部体細胞クローン牛については、15か月齢までの体重変化の記録を入手できたので、データをもとに図示した。黒毛和種雄牛においては、発育が比較的悪い個体が見られたが、いずれも15か月齢まで体重が増加し続けることが認められている。

既に、計5頭の体細胞クローン牛の精子により、39頭の子牛が出生している。計26頭の体細胞クローン雌牛が子牛を分娩している。それら子牛の多くは育成中である。(以上、農林水産省調査)

2頭の体細胞クローン雄牛の精子による人工受精を、それぞれ12頭の雌牛に対して行った結果、受胎率はそれぞれ67%および50%、分娩し産子が生産されたのは50%および42%と、繁殖性の上で問題が無いことが報告されている(鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第6号42~45(2001))。

現在までにと殺された4頭の体細胞クローンについて筋肉中の残留塩素系農薬を測定した結果、いずれも検出限界未満であり、総 DDT 濃度は<0.05ppm、ディルドリンは<0.02ppm、ヘプタクロルは<0.02ppm であった(表3)。また、

対照としての同一農場で育成された肥育牛 3 頭についても検出限界未満であった。体細胞クローン牛の血漿中のエストロゲン濃度は現在測定中である。

その他、体細胞クローン牛を対象として、テロメアの解析、プロゲステロンや黄体形成ホルモン (LH) 等のホルモン分泌測定、ブドウ糖とインシュリン負荷試験、死亡牛臓器の病理組織学的検査等の試験検査が行われているが、現時点まで食品としての安全性を懸念すべき知見は得られていない (International Workshop in Tsukuba, "Current status and perspectives in cloning and related studies. 2001 October". Program and Abstract)。

米国において、育成した体細胞クローン牛 24 頭 (1~4 才) について検査を行った結果が報告されている。すべての牛が、体温、脈拍、呼吸数、心臓と肺の聴診、直腸壁から腹部の触診は正常であった。集団内行動と習性も正常であった。人工受精後の受胎率は 87.5%、2 頭が出産した子牛も正常であった。血液と尿の検査によっても、正常値から大きく外れた例は無かったことが認められている (Science, 2001, Vol.294, 1893-4)。

D. 考察

今年度までに蓄積された体細胞クローン牛の成育データにより、すでに報告したように、流死産や生後直死、奇型等の産子の異常の出現率が大きいことが認められた。その理由として、核の初期化が不完全または不適切であることの可能性、ドナー細胞核の遺伝子の一部に不可逆的変化が生じることの可能性が考えられており (前前年度厚生科学研究 (特別研究) 報告)、DNA のメチル化の異常の関与も示唆されている (Nature Genetics, 2001, Vol.28, 173-177; Genetics, 2001, Vol.30, 45-50)。しかし、現在までに、体細胞クローン牛の食品としての安全性を懸念すべき知見は、死亡牛臓器の病理組織学的検査によっても得られていない。また、生育した個体の一部は既に妊娠し分娩しており、雄牛についてもその精子により雌牛が受胎している。その他育成した牛の生理機能についても特段の異常は報告されていない。

と畜場法で定められたと畜検査で把握できず、予め確認をとっておいた方がよいと考えられた筋肉中の残留農薬についても今のところ、とくにその値が高いことは認められず、脂溶性の環境汚染物質を残留しやすいということがないものと考えられ

た。

以上、今年度得られた知見からしても、安全性について特段懸念されることはないものと考えられる。すなわち、受精卵クローン牛や体細胞クローン牛においては、流死産や生後直死の発生頻度が従来技術によって生産された牛に比して高い傾向が認められているが、順調に生育する牛も多数存在し、それら個体については各種生理機能を含め際立った異常が認められていないこと、ほ乳類や鳥類については、その構成成分であるタンパク質が一部のヒトにアレルギーを招来することはあっても、ヒトが食品として食した場合に、構成成分自体がヒトに毒性や病原性を発現することは知られていないこと、体細胞クローン牛において、構成成分として新規に毒性物質や病原物質が生産される可能性を示すような科学的知見は得られていないこと、が考えられる。

次年度は、畜産技術協会が進めている我が国で得られた体細胞クローン牛の乳と肉の成分分析と消化試験およびラットへの給餌試験などの成績が示されてから、それを含め内外の知見に基づいて、食品としての安全性を再度検討する。

E. 結論

農林水産省と地方自治体等で成育中の体細胞クローン牛について報告されている各種データおよび国外において報告されているデータ、さらに本研究で実施した体細胞クローン牛の筋肉中残留農薬測定値などに基づいても、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ず、前前年度報告書において考察した内容を修正する必要がないものと考えられた。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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録

なし