

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究 重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

## 組換えDNA食品遺伝子産物の慢性経口毒性評価モデルの確立

所 属 国立医薬品食品衛生研究所  
研究者 廣瀬 雅雄

### 分担研究者

- (1) 東京農工大学工学部 小関良宏、Bt 蛋白質の精製及び特異抗体の作成  
(2) 筑波大学生物科学系 鎌田 博、組換えトウモロコシ中の Bt 蛋白発現量の定量  
(3) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 鈴木幸雄、Bt タンパク質の免疫学的測定

### 要旨

消化管障害をもつヒトに対する組換え DNA 食品の安全性を評価するため、消化管障害モデルラットの確立をカテコール、硫酸デキストラン等の投与により試みた。またラットに投与するための Bt 蛋白を得るため、*B. thuringiensis* 菌から Cry 蛋白を精製する技術を確立した。

### 1. 研究目的

組換え DNA 技術応用食品は「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査の法的義務化に関する食品、添加物等の規格基準の一部改正について」（平成 12 年 5 月 1 日生衛発第 825 号-1 厚生省生活衛生局長通知）に基づき、許可されている。新たな遺伝子産物が食品に含まれる場合は、遺伝子産物が人工胃液及び人工腸液により分解されることが確認されれば、経口投与試験は免除されている。しかしながら、食品一般に用いられる穀物は消化管障害をもつヒトにおいては十分に消化されず遺伝子産物が消化器から血中に移行することが危惧される。例えば、卵白アルブミンで消化管アレルギーを惹起したラットでは、経口投与ラクトアルブミンが血中に移行する事が報告されている。当研究の目的はこのような場合の安全性を評価する消化管障害モデル動物を確立し、さらにその安全性を評価することである。また、本動物モデルの確立により、今後増加するであろう食品中の遺伝子産物のよりヒトに即した安全性評価が可能となる。

### 2. 研究方法

ラットの胃、小腸あるいは大腸に対する傷害モデルを確立するため、胃、特に幽門部に対する障害作用をもつカテコール、主に小腸に対する障害作用をもつインドメタシン、あるいは大腸に対する障害作用をもつ硫酸デキストランを各々雄の F344 ラットに 1 週間連続投与し、投与期間中の体重、摂餌量、摂水量を測定するとともに、投与期間終了時には動物を剖検し、消化管の肉眼的観察を行うとともに、常法に従って病理組織標本作製し、消化管障害の発生の程度を評価した。1 週間投与実験において、十分に消化管障害を誘発し、かつ連続投与に耐え得ると判断される投与量を求めた。次いで、慢性消化管障害モデルを確立する目的で、1 週間連続投与+1 週間休薬の 4 サイクル間歇投与した。投与量及び投与方法は、カテコール及びインドメタシンについては各々 0.5、0.015%濃度で餌に混じ、硫酸デキストランについては 1%濃度で飲水に混じて投与した。投与期間中の体重、摂餌量、摂水量を測定するとともに、投与期間終了時には動物を屠殺剖検した。

ラットに Bt 蛋白質を経口投与して安全性評価を行う際、大量摂取させようとする、すべての餌をトウモロコシ穀粒にしなければならない。しかし、ラットにトウモロコシ穀粒だけを投与すると栄養失調による健康弊害が起こる。このため、大量投与するために *B. thuringiensis* 菌による Cry 蛋白質の産生・精製の検討を行った。*B. thuringiensis* var. *aisawai* は東京農工大学大学院生物システム応用科学研究所の佐藤令一博士より分譲されたものを用いた。この菌を LB-G 固体培地にストリークし、30℃ で培養した。得られたコロニーを LB-G 液体培地に植菌し、30℃、210 rpm で旋回培養した。培養開始後、日を追って培養液の一部を顕微鏡下で観察し、*B. thuringiensis* 菌の生育と Cry 蛋白質結晶および芽胞の菌体内での蓄積、*B. thuringiensis* 菌の溶菌と Cry 蛋白質結晶および芽胞の培地への放出を観察した。次に Cry 蛋白質結晶の精製を行うため、3 週間培養してほぼ完全に溶菌した培養液を遠心し、Cry 蛋白質結晶および芽胞を沈澱させた。これに 50 mM NaCl を加えて沈澱を懸濁し、遠心によって沈澱させた。これを水に懸濁し、水層二相分配上層液 (0.3 g/L sodium dextran sulfate T500, 70.3 g/L polyethylene glycol (PEG) 600, 17.5 g/L NaCl) を加えて混ぜた。これに、水層二相分配下層液 (100 g/L sodium dextran sulfate T500, 70 g/L PEG 6000, 26.3 g/L NaCl) を加え、激しく混合した。混合後、静

置し、水層二相分配上層液の表面に生じる白濁した泡（芽胞が含まれる）を吸い取り、再び激しく混合した後、静置し、水層二相分配上層液の表面に生じる白濁した泡を吸い取る操作を行なった。その後水層二相分配上層液と水層二相分配下層液を用いた操作を繰返した後遠心し、Cry 蛋白質結晶を沈澱させた。得られた沈澱に 50 mM NaCl を加え、沈澱を懸濁し、遠心によって沈澱させ、洗浄し、これを水に懸濁し、精製 Cry 蛋白質結晶とした。この結晶懸濁液に 10% SDS、 $\beta$ -メルカプトエタノールを加えて混ぜ、98 °C、5 分間加熱した。12,000 rpm、5 分間遠心し、不溶物を除いた上清を透析チューブに入れ、これを 50 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、10% Triton X-100 に 5 時間透析し、さらに 50 mM HEPES-KOH (pH 7.0)、0.5% Triton X-100 に一晚透析し、10 mM HEPES-KOH (pH 7.0) に 5 時間透析し、10 mM NaHCO<sub>3</sub> に 5 時間透析し、さらに一晚新たな 10 mM NaHCO<sub>3</sub> に透析した。透析チューブより蛋白質溶液を取り出し、これを液体窒素で凍結し、凍結乾燥を行なった。完全に乾燥した蛋白質を SDS-電気泳動サンプル緩衝液に溶解し、これを 12% SDS-アクリルアミド・ディスク・プレパラティブ電気泳動によって分離・精製し、Cry 蛋白質の含まれる画分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (8%) によって調べ、その画分を回収した。一方、*B. thuringiensis* 菌体からの蛋白質を抽出・定量するため、*B. thuringiensis* 菌体に蛋白質抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5% SDS) を加え、ただちに超音波破碎機で解凍しつつ破碎した。これに  $\beta$ -メルカプトエタノール (14 M) を加えて混ぜ、98 °C、5 分間加熱し、12,000 rpm、5 分間遠心し、上清を回収した。この *B. thuringiensis* 菌体からの蛋白質の抽出液および精製 Cry 蛋白質溶解液に 2 M 過塩素酸を加え、氷上に 10 分置き、蛋白質を析出させた。析出した蛋白質を遠心し、蛋白質を沈澱させた。沈澱した蛋白質に 1 M NaOH を加え、攪拌して蛋白質を溶解させ、改変 Lowry 法によって蛋白質濃度を定量した。また、定量した結果をもとに *B. thuringiensis* 菌体からの蛋白質の抽出液および精製 Cry 蛋白質を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分離し、クマジー・ブリリアント・ブルー R250 で染色して精製度を調べた。

一方、食品一般に用いられる穀物に含まれる Bt 蛋白質の安全性評価を行う際、組換え植物体の各器官における Bt 蛋白質の発現量を把握しておくことは重要なポイントである。そこで今回、組換えトウモロコシ植物体の各器官における Bt 蛋白質発現量の定量を試みた。トウモロコシの品種は 3 種類 (Event 176 Corn、Event Bt11 Corn、Control Corn) を用いた。前 2 者は Bt (*Cry1Ab*) の遺伝子を持った遺伝子組換えトウモロコシであり、用いた promoter などに違いがあるが、既に我が国において食品としておよび飼料用としての安全性が確認されているものである。後者は非遺伝子組換えトウモロコシであり、前 2 者とはある程度近い系統のものとして対照実験用に Novartis 社より入手したものである。トウモロコシ種子は直径 15 cm の黒ビニルポットに 4 粒ずつクレハ培養土 (呉羽化学) に播種し、25°C、16 時間明期/8 時間暗期の長日条件、約 3,000 lux の白色蛍光灯下の栽培室内で栽培した。Bt 遺伝子の有無を PCR 法によって確認した植物個体を用い、葉が 5 枚展開した時点の播種後約 4 週間目に、各器官を切り分けてサンプリングした。また、播種後 1 週間目の芽生えに関しては、タッパーウェア (10 x 15 x 5 cm) にパーミキュライトを入れて播種し、各器官に切り分けてサンプリングした。PCR 法による Bt 遺伝子の確認は、JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル、基本操作編」(農林水産消費技術センター、平成 13 年 4 月) に従った。PCR 用の DNA primer は、ニッポンジーン社のものを購入して用いた。Bt 蛋白質は GMO™ Bt Maize Test Kit (Strategic Diagnostic Inc., DE, USA) [ <GMO>™ Bt1 コーンキット (アヅマックス株、輸入販売) ] を用いてエライザ反応に用いて検出した。

### 3. 研究成果

ラットの胃、小腸あるいは大腸に対する傷害モデルを確立するための予備実験として行った 1 週間連続投与において、カテコールは 0.5% 濃度での混餌投与により、体重が減少あるいは著明に増加抑制を示したが、1 週間の休薬により急速に回復傾向を示した。また、カテコールの 1 週間投与で胃の幽門部に潰瘍及び再生上皮あるいは粘膜過形成がみられた。インドメタシンを 0.0075% 濃度で 1 週間混餌投与した予備実験においては、病理組織学的に小腸を含む消化管に対する影響は全く認められなかったが、0.030% 濃度での投与により一部の動物が死亡し、0.015% 濃度での投与により体重の減少が認められた。インドメタシンの 0.015% 及び 0.030% 群いずれにおいても、胃の胃底腺粘膜壊死及び穿孔/穿通性潰瘍がみられた。また、空腸、回腸、盲腸あるいは結腸にも穿孔/穿通性潰瘍がみられ、好中球を主体とした炎症性細胞浸潤あるいは再生上皮を伴っていた。硫酸デキストランの 1% 濃度での飲水投与においては、体重等に対する影響は認められなかったが、結腸、特に下行結腸に好中球を主体とした炎症性細胞浸潤及び粘膜下水腫がみられ、しばしば再生上皮を伴っていた。慢性消化管障害モデルを確立する目的で行った 1 週間連続投与 + 1 週間休薬の 4 サイクル間歇投与実験において、カテコール 0.5% 投与及び硫酸デキストラン 1% 投与においては、対照群と比較して体重増加抑制傾向がみられたが、極めて軽度のものであった。剖検時には、硫酸デキストラン投与により結腸に軟便の貯留がみられたが、カテコール投与による影響はみられなかった。一方、インドメタシン 0.015% 投与により、1 サイクル目の投与～休薬期間中に 20 匹中 4 匹の動物が死亡したた

め、2サイクル目から投与量を 0.01%に減じて実験を継続した。2サイクル目の投与5日目に同群の動物がさらに1匹死亡した。しかし、インドメタシン投与による体重減少あるいは増加抑制は明らかであり、摂餌量及び摂水量も減少した。死亡あるいは状態悪化の原因は小腸、特に空腸における穿孔性潰瘍であったが、生存例でも剖検時に小腸の線維性相互癒着が観察され、強い障害作用が示された。現在、標本を作製し、病理組織学的評価を進行している。

ラットに Bt 蛋白質を投与してその安全性を評価するため、*B. thuringiensis* 菌から Cry 蛋白質結晶の産生・精製するための実験では、*B. thuringiensis* 菌を LB-G 液体培地に植菌し、旋回培養したところ、3日目に *B. thuringiensis* 菌の生長はほぼ定常状態に入り菌数の増加は認められなくなった。培養3日目の *B. thuringiensis* 菌において、すでに芽胞とともに Cry 蛋白質の結晶が菌体内に見られた。さらに培養を続けたところ、3週間後にほとんどの菌が溶菌しており、若干の細胞壁の残留は見られたものの、ほとんどが培地中に放出された Cry 蛋白質の結晶と芽胞から成ることがわかった。これらの培養液の沈澱における総蛋白質を抽出し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって蛋白質を分析したところ、培養3日目においては Cry 蛋白質の蓄積量は非常に少ないことがわかった。これは培養3日目においては Cry 蛋白質は合成・蓄積が開始したところであり、*B. thuringiensis* 菌体内のその他の蛋白質が多量に存在していることを示すものである。しかし、培養21日目の *B. thuringiensis* 培養沈澱物においては大量の Cry 蛋白質が存在していた。培養21日目の *B. thuringiensis* 培養液 (240mL) から水相二層分配法によって Cry 蛋白質の結晶を精製した結果、芽胞などの不純蛋白質は水相二層分配法によってかなり除去されていることがわかった。しかし未だに他の不純蛋白質が混在していることがわかった。デンストメーターによってこのポリアクリルアミド・ゲルをスキャンして定量したところ、Cry 蛋白質の精製度は 90-93%であった。この標品を凍結乾燥によって乾燥標品としたところ、78.9 mg の Cry 蛋白質が得られたことがわかった。そこで、この凍結乾燥標品をさらに精製するために 12% SDS-アクリルアミド・ディスク・プレパラティブ電気泳動で精製を行なった。その結果、ほぼ 100% に近いところまで精製できたことがわかった。

組換えトウモロコシ植物体の各器官における Bt 蛋白質発現量を定量するために行った実験では、トウモロコシが 3,000 lux の光条件では、播種後約 4 週間までの生育が限界であり、それ以降になると植物体が倒伏して成長が著しく悪化したため、今回は播種後約 4 週間目に留めた。これは、絶対的な光量が不足するためと考えられた。種子から発芽したトウモロコシの植物体に Bt 遺伝子が存在するかどうかについて確認する実験を PCR 法を用いて行った結果、Bt11 Corn と Event 176 Corn それぞれに特異的な DNA のバンドが見られ、Bt 遺伝子が全 DNA に存在することが示された。ポジティブ・コントロールとして行った全てのトウモロコシでバンドが得られる内在性の種子貯蔵蛋白質 Zein に相当するバンドも確認できた。今回の実験に用いたトウモロコシには、予想通りの Bt 遺伝子が組み込まれていることが確認できた。続いて、トウモロコシの各器官における Bt 蛋白質の量をエライザ法で検出した。Bt 蛋白質を発現しない Control Corn に於いても高い値が出ており、これらはエライザのシステムの非特異的な抗原抗体反応と発色反応などに由来するバックグラウンドと考えられた。Control Corn の非特異的な反応の値はトウモロコシの器官毎に異なっており、特に 4 週間目の植物の葉で高い値を示した。Bt 蛋白質の量は、Bt11 Corn では全ての器官で同程度に含まれる傾向があり、Event 176 では葉で多い傾向があった。Control Corn の値を差し引いた結果より、Bt11 Corn では、全ての器官で高い値を示したのに対し、Event 176 では、4 週間目の植物の葉で発現量が多い傾向が示された。同じ葉においても Bt11 Corn の方が Bt 蛋白質の含量が高い傾向が示された。また、4 週間目の植物においては、葉、茎、根の器官において先端側と基部側とで切り分けたが、Bt 蛋白質の含量に対しては特に大きな差は見られなかった。4 週間目の地上部においては、一般に生物活性が落ちていると考えられる古い葉 (第 1 葉) が最も高い値を示したことは特徴的であった。

#### 4. 考 察

消化管障害を有するヒトに対する遺伝子産物の安全性評価を行うことを目的として、消化管障害ラットに Bt 蛋白質を経口投与しその影響を検討する消化管障害ラットモデルの確立を試みた。

胃粘膜障害を誘発する化学物質として、カテコールを用いた検討に着手した。カテコールを 0.5%濃度で 1 週間混餌投与した予備実験において明らかな体重増加抑制がみられたため、その後に実施した 1 週間投与 + 1 週間休薬の間歇投与実験では体重に対する影響が懸念されたが、休薬期間を設けることで体重に対する影響は殆ど認められなかった。病理組織学的には、1 週間混餌投与した予備実験において幽門部の潰瘍及び再生上皮がみられていることから、1 週間投与 + 1 週間休薬による長期間投与による慢性胃傷害モデルの確立が期待される。

小腸粘膜障害ラットモデルを確立し得る化学物質として、混餌投与による実験の実績を有するインドメタシンで実験を開始した。インドメタシンを 0.0075%濃度で 1 週間混餌投与した予備実験においては、病理組織学的に小腸を含む消化管に対する影響は全く認められなかったが、次いで実施した 0.015 及び 0.030%濃度での実験では、

0.030%群のみならず0.015%群においても体重減少がみられ、インドメタシンの混餌投与による小腸傷害モデル作製に際しては、至適用量の幅が狭いことが懸念された。その後実施した1週間投与+1週間休薬の間歇投与実験では、1サイクル目の投与～休薬期間中の0.015%群において死亡例がみられたため用量を0.010%に減じた。現在、生存動物の病理組織学的評価の結果待ち状態であるが、今後はインドメタシンの投与量を減じた混餌による間歇投与、インドメタシンの皮下投与あるいは他の化学物質による小腸傷害モデルの確立が必要となる可能性がある。

大腸、特に結腸障害モデルとして、近年、結腸炎の発癌に及ぼす修飾作用を検索する目的でしばしば用いられている硫酸デキストランを用いた実験を行った。硫酸デキストランを1%濃度で1週間飲水投与した予備実験において、病理組織学的にしばしば上皮の再生像を伴う急性結腸炎が観察された。同様の処置を反復することにより炎症が慢性化し、ヒトの潰瘍性大腸炎に類似した病変が発生することが期待される。1週間投与+1週間休薬による長期間投与による慢性大腸傷害モデルの病理組織学的評価を継続する。

消化管傷害モデルを確立した後、ラットに Bt 蛋白質を経口投与してその安全性を評価するため、*B. thuringiensis* 菌に Cry 蛋白質を生産させ、これから Cry 蛋白質を精製することを行なった。その結果、水相二層分配法によって、*B. thuringiensis* 培養液 240 ml から 78.9 mg の Cry 蛋白質を得ることができた。この点において、この方法はラットに Cry 蛋白質を大量摂取させる目的のために大量の Cry 蛋白質を生産し、精製する方法としては優れていることがわかった。しかし、水相二層分配法のみでは精製度が不十分であり、90-93%程度の精製度しか得られなかった。このため、アクリルアミド・ディスク・プレパラティブ電気泳動で精製を行なったところ、ほぼ 100% に近いところまで精製できたが、1回のアクリルアミド・ディスク・プレパラティブ電気泳動で精製できる蛋白質量は 5-10 mg であるため、精製には非常に労力と時間がかかることがわかった。そこで、今後は *B. thuringiensis* 菌からクローニングした Cry 遺伝子を導入した組換え大腸菌による大量生産、もしくは遺伝子組換えトウモロコシからクローニングした改変 Cry 質遺伝子を導入した *P. laticaudatus* もしくはバキュロウイルスによる大量生産を検討する必要があると考えられる。

組換えトウモロコシ植物体の各器官における Bt 蛋白質発現量の定量を試みた実験では、研究方法の項に示した条件で 3 種類のトウモロコシの栽培試験を行ったが、播種後 4 週間目以降は植物体の生育が停止することが明らかとなった。トウモロコシの栽培には強い光が必要であることが知られていることから、栽培試験においてはさらに強力な人工照明を用いるか、または、天然光の温室を用いることが重要であると考えられる。そこで、次年度以降は天然光の隔離温室（網室）で栽培することを検討する。これは、今回試験に用いることができなかった器官や組織である花や花粉、若い果実などにおける Bt 蛋白質の定量を行うためにも必要である。

エライザ法によって行った Bt 蛋白質の検出は、Bt 蛋白質の標品を用いていないことから、全てが相対値である。定量を行うためには Bt 蛋白質の標品を用いる必要があるが、今回購入したエライザ法による測定キットには、混入比率の異なるトウモロコシ粉末が添付されていたのみであったことなどから、今回はデータとして抗原抗体反応の程度を発色で示したエライザ反応の吸光度の数値を表示した。さらに、今回のエライザ反応は吸光度の結果としても測定限界である 4 に近いものが多いことから、定量性の信頼度もそれほど高くないものと考えられる。さらに、今回のサンプルの測定値は、エライザのキットに標準品として添付されている混入比率の異なるトウモロコシ粉末に比べて数倍以上の強い値を示したものがあり、定量的な抗原抗体反応の範囲を超えている可能性が高い。また、今回報告するデータは 1 回の実験の結果であり、再現性を含めて改めて検討すべき予備的な実験結果である。しかし、今回のデータでも十分に示された重要な知見として、植物 promoter の違いが Bt 蛋白質の発現量に決定的な違いをもたらしていることが明らかとなった。JAS 分析試験ハンドブック「遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル、定量的 PCR 編」によると、Bt11 Corn は CaMV35S promoter を用いた *CryIA(b)* 遺伝子を、Event 176 Corn は PEPC promoter と CDPK promoter を一つずつ用いた 2 組の *CryIA(b)* 遺伝子を導入した組換えトウモロコシであり、トウモロコシに組み込まれたこれらの Bt 蛋白質遺伝子はこれら 3 種の promoter にそれぞれ支配された発現様式（植物体のいつ、どこで、どの程度発現するか）を示すことが予想される。CaMV35S promoter は、カリフラワーモザイクウイルスから単離された植物分子生物学研究で最も広く用いられる構成的かつ発現量の多い promoter であり、これを接続した遺伝子は、植物体のどこでも、いつでも、多量に発現することが期待される。今回行った Bt11 Corn における Bt 蛋白質の検出結果は、測定した全ての器官における Bt 蛋白質の存在を示唆しており、CaMV 35S promoter の発現様式とほぼ一致した結果を示すものと考えられた。一方、Event 176 Corn においては、4 週間目の植物体の葉と茎においてのみ Bt 蛋白質が検出された。これは、Event 176 Corn で Bt 遺伝子の発現に使用された PEPC promoter と CDPK promoter の性質に由来するものであると考えられた。PEPC は光合成の重要な酵素であり、光合成の盛んな葉で最も強く発現し、また、茎などの光合成を行う能力のある緑色組織においてもある程度の発現が見られる。Event 176 Corn の Bt 蛋白質を検出した結果は PEPC promoter の発現様式を良く反映した結果であると考えられた。一方、CDPK 遺伝子は細胞内情報伝達に関係する遺伝子ファミ

リーの一つであることから、その発現量は光合成の酵素に比べるとかなり低いことが予想されるため、Event 176 Cornにおける今回の Bt 蛋白質の検出の結果にどのように反映しているのかは不明である。数ある CDPK 遺伝子の中には、病虫害や傷害に対する応答機構に関与するものがあることから、Event 176 Corn に用いられた CDPK の promoter は傷害などを受けた場所で局所的に機能して Bt 蛋白質を局所的に蓄積する可能性も考えられる。なお、Event 176 Corn では、Control Corn の測定値を差し引くと、芽生えの器官と 4 週間目の根における数値がマイナスを示す。これは、Event 176 Corn のトウモロコシの系統には Control Corn よりも非特異的な抗原抗体反応を起こさない傾向があることを示唆する。これは今回用いた 3 系統のトウモロコシが比較的近縁の品種ではあるが、同一の遺伝的背景を持つ物ではないためと考えられる。しかし、その結果、Event 176 Corn と Bt11 Corn の数値を直接比較することは難しいと判断されるため、Event 176 Corn と Bt11 Corn のいずれがより Bt 蛋白質を多く含有するののに関し、葉以外の組織では Bt11 Corn が高いことは確実としても、葉では Event176 Corn の方が Bt 蛋白質の含量が多い可能性も否定できない。さらに、CaMV promoter が構成的に発現する強い promoter であること、この promoter が制御する Bt 遺伝子を組換えた Bt11 Corn 植物において全ての器官で Bt 蛋白質が同程度検出されたこと、さらに、今回用いた中で最も古い組織である第 1 葉の値が 4 週間目の植物の葉の中では最も高いエライザの値を示したことから、Bt 蛋白質がトウモロコシ植物組織の中では比較的安定であり、特定の組織で分解を受ける傾向が低い可能性が示された。特に、第 1 葉において Bt 蛋白質の含量が高いことは予想外の結果であり、興味深い。通常、古い葉では蛋白質は分解される傾向にあり、その分解物が新しい葉へと転流される。Bt 蛋白質はトウモロコシにとっては外来の蛋白質であることから、トウモロコシの蛋白質分解系では処理されにくい性質を持つ可能性、トウモロコシの細胞の中で分解されにくいような形で局在化している可能性等が考えられる。今回のエライザ法による測定キットは、主に食品を中心とした Bt 蛋白質の含量の低いものに対し、その混入の程度を予備的に測定するものであり、植物組織に特有の非特異的な反応をどの程度排除できるかについて検討されたものではない。そのために正確な定量が期待できない可能性がある。今後、Bt 蛋白質の定量を進めるためには、Bt 蛋白質に対する特異的な抗体を自ら調製し、植物組織に特有の非特異的な反応を考慮した測定系を構築する必要があるものと考えられる。

## 5. まとめ

消化管障害をもつヒトに対する組換え DNA 技術応用食品の安全性評価を可能にするための消化管障害モデル動物の確立を試みた。その結果、胃に対する障害作用をもつカテコール、あるいは大腸に対する障害作用をもつ硫酸デキストランを各々雄の F344 ラットに 1 週間連続投与し、その後 1 週間の休薬期間を設ける実験デザインを 4 サイクル程度繰返すことにより、亜慢性あるいは慢性消化管モデルを確立し得る結果が得られた。小腸障害モデルについては、実験デザインの再検討が必要である。一方、組換え DNA 技術応用食品である組換えトウモロコシに含まれる Cry 蛋白質を大量生産することができた。しかし、その精製度は 90-93% であり、さらなる精製方法を検討するとともに、別の方法としてクローニングした Cry 遺伝子を導入した組換え大腸菌もしくは *Picia* やバキュロウイルスによる大量生産を検討することが考えられた。来年度は高純度の Bt 蛋白質を大量生産・精製し、確立した消化管障害モデルおよび正常ラットを用いた Bt 蛋白質の亜急性試験ないし亜慢性試験による安全性評価に着手する。組換えトウモロコシ Bt 11 Corn と Event 176 Corn を室内で 4 週間目まで栽培し、乾燥種子、発芽初期の芽生え、4 週間目の植物の各器官(葉、茎、根)から総蛋白質を抽出し、エライザ法により Bt 蛋白質の検出を行った結果、トウモロコシの種類により Bt 蛋白質の検出部位が異なることが明らかとなり、それぞれの組換えトウモロコシを作成する際に導入した Bt 遺伝子の promoter の性質を反映した結果と考察された。今後、より正確な Bt 蛋白質の定量を行うと共に、さらに進んだ生育ステージの植物の各器官における Bt 蛋白質の定量等を行うため、Bt 蛋白質の標準品の調製、Bt 蛋白質の定量を行うための特異的抗体の作成、開花・結実に至る栽培環境の整備などが必要である。

## 6. 研究発表

鎌田博. 遺伝子組換え植物の安全性研究の現状と展望. 研究ジャーナル 24, 5-12 (2001).

鎌田博. 序にかえて 一遺伝子組換え実験の歴史と安全確保の考え方. 遺伝 55, 24-28 (2001).

鎌田博. 遺伝子組換え作物の食品としての安全性. 遺伝 55, 46-52 (2001).

鎌田博. 遺伝子組換え食品の安全性. 現代化学 10, 16-23 (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).

---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

---

印刷 株式会社 ソーラン社