

平成14年度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」  
分担研究報告書

アレルギー性に関する研究

分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部室長

研究要旨 平成14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、新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討、及び食物アレルギー動物モデルの検討を行った。患者血清を用いる研究では、国内外食物アレルギー患者血清等126種について、除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS), PAT, 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、ELISA法、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。新規産生タンパク質等の人工胃腸液による分解性の検討では、1995年のUSPの方法に基づいて行われることの多いin vitro分解性試験の改良、並びにvalidationを行うために研究を行った。Validation試験では、人工胃液(SGF)による分解性試験につきILSI主催の国際validation試験に参画した。9機関で、10種のタンパクの人工胃液による分解性を検討し、pH1.2の条件下の方が、pH2.0の条件下に比べよいvalidation結果が得られた。また、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結果から、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。動物を用いるアレルギー性の検討では、種々のマウスを用いる強制経口投与による感作条件の検討を行ったところ、W/Wvマウスで、経口感作能の高いことが判明し、このマウスの腸管リンパ球(IEL)中のTCR $\gamma\delta$ -T細胞の割合の顕著な減少と経口感作能との関連が示唆された。

協力研究者

澤田純一、穂山浩 (国立医薬品食品衛生研究所)

宇理須厚雄 (藤田学園大学坂文種報徳会病院)

河野陽一 (千葉大学医学部)

A. 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。安全性評価の国際的動向としては、1999年から2003年にかけて、コーデックス食品規格委員会(国連食糧農業

機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)では、バイオ食品特別部会が設置され、バイオ食品について必要な基準、指針あるいは勧告を策定することになっており、2002年3月に横浜で開催された第3回特別部会で採択された「組換えDNA植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン案」<sup>1)</sup>はステップ8に、進められ、この中で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付され議論されている。主な評価項目は、(1)新規産生タンパク質と、既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性(特にペプシン抵抗性)並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清または標的患者血清を用いる新規産生タンパク質に対するIgE抗体の存在の有無のスクリーニングがあげられ、検討項目として、動物モ

デルの使用の推奨等が述べられている。また、このガイドラインは、新規導入蛋白質が、グルテン感受性消化管炎を引き起こす可能性のある場合には適用されないこととなっている。

本分担研究では、アレルゲン性の評価に関する研究として、(1)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討、(2)動物を用いるアレルゲン性の検討、(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の3点をとりあげ、研究を進めている。(1)の患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討は、主にすでに承認されている組換え食品のフォローアップ的研究として、協力医療機関より提供された食物アレルギー患者血清中の除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS)、害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9C)タンパク質及び除草剤グルホシネート(ホスフィノスリシン)抵抗性蛋白質(PAT)に対するIgE抗体の有無の検討を、ELISA法及びウェスタンブロット法で行った。(2)動物モデルを用いた研究では、経口感作に伴う免疫を成立させるため、寛容の少ない動物を用いる必要があるが、本年度は種々のマウスを用いる強制経口投与による感作条件の検討を行った。(3)の人工胃腸液による分解性の検討では、1995年のUSPの方法<sup>2)</sup>に基づいて行われることの多いin vitro分解性試験の改良、並びにvalidationを行うために研究を行った。In vitro分解性試験法で、まだ、国際的に統一した規格となる方法は定められていない。遺伝子組換え食品中の新規産生蛋白質のアレルゲン性を評価するうえで、ペプシンを主体とする人工胃液(SGF)中での分解試験は、必須であることがコーデックスでも議論されている<sup>2)</sup>。そこで、SGFを用いる分解性試験法のILSI(the Allergy and Immunology Institute of the International Life Science Institute)主催の国際的validation試験に参画し、米欧日の9つの機関で10種の蛋白質に関し、同様の方法で分解性試験を行い、方法の再現性、妥当性について検討を行った。さらに、私共独自の研究として10種の蛋白質についての人工腸液による分解性の網羅的解析並びに最も一般的な加工法である加熱前処理のSGF及び

SIFでの分解性への影響を検討した。

## B. 研究方法

### (1) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

食物アレルギー患者血清中の新規産生タンパク質(CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9C またはPAT)に対するIgE抗体の存在の有無をELISA法、ウェスタンブロット法にて検討した。具体的には、CP4-EPSPS抗原としては、CP4-EPSPS遺伝子を組み込んだ大腸菌の培養上清を、Cry1Ab抗原としては、Btk菌から、結晶毒素として単離したものを、Cry9C, PAT抗原としては、Aventis社より供与された精製品を用いた。ELISA法は、抗原を結合させた96穴プレートに種々の食物アレルギー患者血清と反応させ、酵素標識抗ヒトIgE抗体を反応させ、次いで基質を加え、基質の発色から、抗原に特異的に反応するIgE抗体の有無を検討した。基質としては主にTMB (Tetramethylbenzidine)を用いた。ウェスタンブロット法はSDSポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)にてタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写し、種々の食物アレルギー患者血清と反応させ、コニカイムノステインによる発色から、これらタンパク質に特異的に反応するIgE抗体の存在の有無を検討した。

### (2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

BALB/cマウス<sup>3)</sup>及びW/W<sup>v</sup>(c-kit及びマスト細胞欠損)<sup>4)</sup>マウス7週令を用いて、代表的食物アレルゲンである卵白アルブミン(OVA)を抗原として経口感作を行った。OVA 0.1mgまたは、1mg/匹の用量で、9週間連日投与を行った。感作の成立は血清中抗原特異的抗体価で確認し、能動的全身アナフィラキシー(ASA)誘導は、9週目に抗原の腹腔内惹起で行い、体温変化及び血漿中PAF濃度測定を行った。また、感作動物の脾臓細胞を培養し、OVAでの再刺激後、細胞から産生されるサイトカインの測定を行った。さらに、抗原の経口感作時の溶媒を検討するため、BALB/cマウスへのOVA感作時に、リノール酸(25mg/animal)とレシチン(10 $\mu$ l/ animal)混液を溶媒として用いた場合との感作能の比較を行った。

### (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

10種の基質タンパク質としては、アレルゲンとしてピーナツアレルゲン(Arah2)、牛血清アルブミン(BSA)、 $\beta$ -ラクトグロブリン(BLG)、卵白アルブミン(OVA)、オボムコイド(Ovm)、soybean trypsin inhibitor (STI)、ConcanavalinA (ConA)を、陰性対象として HRP(horseradish peroxidase)、RUBISCO (ribulose-bisphosphate carboxylase/oxidase)及び PAT (phosphinothrin acetyltransferase)を用いた。SGF中の pepsin 濃度は、0.076%とし、pepsinと基質タンパク質の比率3、基質濃度 250 $\mu$ g/ml、pH1.2ないし2.0で0-60分、37°Cで培養し、分解の程度は SDS-PAGE (10-20% Tricine gel 使用)後の蛋白染色にて確認した。分解の程度の評価としては、SGFとの反応の結果、もとの分子量(完全長)を持つ基質タンパク質の消失が起きる時間、及び断片の出現並びにその消失の時間を用いた。上記実験は、ILSI主催の validation 実験(ring study)の条件に従ったものである。

私共独自の研究部分である加熱前処理の影響は、100°Cで5分間の基質タンパク質の前処理後、SGFによる分解試験を行い加熱処理を施さない場合との分解性の程度を比較検討を行った。

人工腸液による分解性は、1%pancreatin 溶液(SIF, pH6.8)を用い、100 $\mu$ g/ml濃度の基質蛋白質と37°Cで、0-120分反応させた。分解の程度は SDS-PAGE 後の蛋白染色にて確認した。さらに、SGFでの分解試験の場合と同様、基質の加熱前処理による分解性への影響を検討した。

### C.研究結果および考察

#### (1) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

遺伝子組換え食品のアレルゲン性を予知する上で、患者血清との交差反応性は重要なファクターである。我々は国内で採取された食物アレルギー患者血清および米国 Plasma Lab 社から購入した食物アレルギー患者血清を用いて、新規蛋白質との反応性の調査を行った。最初に新規蛋白質を固相とする ELISA 法を行い、陽性が疑われるものについて、

血清と反応させ、ウサギ抗ヒト IgE 抗体、酵素標識抗ウサギ抗体を順に反応させ、ウエスタンブロット法にて確認を行った。

昨年度までは、新規産生タンパク質として、CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9Cを対象に、ウエスタンブロット法で主に患者血清中 IgE 抗体との反応性を解析してきたが、この場合血清量として 100 $\mu$ l を必要とした。本年度は、用いる血清量が 10 $\mu$ l 程度で行える ELISA 法による検査法を第1次検査法として導入し、ELISA 法による測定の条件検討を行った。固相抗原としては、昨年までの対象抗原であった CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9Cに加え今年度から新たに PAT を検査対象抗原として加えた。以下、PAT を固相抗原として用いた ELISA 法の検討結果を記す。ELISA 法を行う際、患者血清を加えた後の洗浄を通常の 0.05%Tween 含有 PBS で3回行うという条件では、PAT に対して ELISA 法で陽性(正常者の平均値+5 SD を超える吸光度を示した場合)と判断される患者血清がみられた。この場合、PAT 抗原をあらかじめ患者血清と反応させる、いわゆる ELISA の阻害(特異的反応阻害)実験を行っても、測定値にほとんど減少が見られなかった。従って患者血清が、非特異的に固相抗原に結合している可能性が考えられたため、ELISA 反応の過程で、患者血清との反応後洗浄液に 1N-NaCl を添加したものをを用いる方法を導入した。この洗浄課程を導入することで、0.05%Tween 含有 PBS のみで洗浄をしていた時に陽性を示していた患者血清も正常血清と有意な差が見られなくなった。また、ウエスタンブロット法でも、PAT 抗原(分子量 21kDa)と反応する IgE 抗体の存在は、確認されなかったため、0.05%Tween 含有 PBS のみで洗浄をしていた時に PAT 抗原に陽性を示していた患者血清は、非特異的に ELISA 用の固相抗原と反応したものと判断した。また、以後の ELISA 法による測定では、患者血清反応後に 1N-NaCl 含有洗浄液で洗浄する過程を入れることとした。この方法で、PAT 抗

原に対する ELISA を、正常血清 9 検体、2001 年度採取された国内の患者血清 32 検体、同 2002 年度 32 検体、Plasma Lab 社から購入した患者血清 23 検体および PAT が導入される以前 (1990-92 年) のかび等のアレルギー患者血清 30 検体、合計 126 検体について実施した。結果は全て陰性であった (図 1)。なお、同血清を用いて、ELISA 法で、同様に CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9C に対する IgE 抗体の存在を確認したが、いずれも陰性との結果が得られた。

以上のように ELISA 法およびウエスタンブロット法による新規蛋白質と血清の反応性を調査する際には、まれに擬陽性の結果が出ることもあり、その反応が新規蛋白質と患者血清中の IgE 抗体との特異的なものかどうかを個別に確認する必要があった。今後さらに新規蛋白質の種類、患者血清の検体数を増やして反応性を検討し、アレルゲン性評価上の問題点を解決して行く必要があると思われる。

#### (2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

W/W<sup>v</sup> マウスへの OVA の 9 週間の経口感作により、血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体価が上昇した (表 1)。この抗体価の上昇の程度は、BALB/c マウスへの OVA の経口感作においてみられる経口感作による血清中の抗原特異的 IgE 及び IgG1 抗体価の上昇より大きかった。特に、IgG1 抗体価の上昇が、BALB/c マウスでは、0.1mgOVA/day 9 週投与で 600 程度であるが、W/W<sup>v</sup> マウスでは 29,000 程度と、顕著であった。W/W<sup>v</sup> マウスにおいて、経口感作後の抗原の腹腔内惹起により、急激な体温低下が認められ (図 2)、また血漿中 PAF 濃度の上昇が引き起こされ (図 3)、ASA の誘導が認められた。また、感作動物の脾臓細胞では、IL-4 の産生の上昇がみられ (図 4)、Th2 優位な免疫応答が起きていることが示された。マウスの種としては、他に、B10A マウス、INF- $\gamma$  ノックアウトマウス、アトピー性皮膚炎モデルマウスである Nc/Nga マウスに同様の OVA 経口感作を行ったが抗原特異的 IgG1 の上昇の程度は、4,400 程度、600 程度、2,200 程度で、W/W<sup>v</sup> マウスにおける抗体価の上昇より低かった。また、粘膜免疫に関与する細胞の解析

結果から、W/W<sup>v</sup> マウスでは、wild type (+/+) マウスに比べ、腸管リンパ球 (IEL) の中で、TCR $\gamma\delta$ -T 細胞の割合が顕著に減少していることが観察され、このリンパ球の群の減少が、W/W<sup>v</sup> マウスでの経口感作のされやすさを反映している可能性が示唆された。

以上、私達の行っている食物アレルギー動物モデルについて、結果を述べてきたが、W/W<sup>v</sup> マウスが経口感作モデルマウスとして有用かどうかについては、オバルブミン以外の他の抗原の感作も行い汎用性について確認する必要があると考える。また、BN ラットを用いた感作能<sup>4)</sup>及び、犬を用いた感作能<sup>5)</sup>との比較も行い、投与量、感作方法の検討、感度のよいバイオマーカーの探索など、進めてゆく必要があると思われる。

次いで、抗原感作時の溶媒の影響を検討するために BALB/c マウスへの OVA 経口感作時の溶媒として、リノール酸とレシチン混液を用い生食を溶媒とした場合の感作能の比較を行った結果を表 2 に示す。表に示すように、溶媒にリノール酸とレシチンの混液を用いた方が生食を溶媒にした場合に比較して OVA 特異的 IgG1 抗体価が顕著に上昇した。溶媒にリノール酸とレシチンの混液を用いて、高感度に感作をさせる有用性が示されたが、さらに多くのマウスを用いた再現性、並びに他のアレルゲンへの応用について検討を加えていく必要があると思われる。

#### (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

SGF による分解では、HRP, PAT, RUBISCO は、pH1.2, 2.0 の両方で、1 分以内に分解し、断片も確認されなかった (図 5)。BSA, Ovm は、完全長の蛋白の分解は早い、断片の分解に、60 分、10 分を要した (図 6)。BLG, STI は、60 分でも、全く分解がされず (図 7)、OVA, Con A は、完全長の分解が 30-60 分、断片の分解にも 30-60 分を要し、pH1.2 の場合の方が、pH2.0 の場合に比べ、分解が幾分早かった (図 8 A-D)。加熱前処理の影響は、BLG, STI では、ほとんどみられなかったが、Con A, OVA の分解は、著しく早くなった (表 3)。SIF による分解では、PAT は、1 分以内に分解し、BLG は 2 分程度で分解したが、

BSA, ConA, OVA, STI は、120 分でも安定であった (図 9)。加熱前処理により、ConA, OVA の分解は、著しく早くなったが、BSA, STI への分解には、ほとんど影響しなかった。以上、アレルゲンも含め、数種の蛋白質の SGF, SIF による分解性を検討したが、SGF, SIF による分解が、食物アレルゲンとして知られているものは、概して悪いこと、一部には、加熱による抵抗性を有しているものもみられた。以上、食物アレルギー試験の一環として SGF, SIF を用いる試験は有用であることが示された。これらの結果をまとめたものを表 3 に示す。

次に、米欧日 9 機関で得られた ILSI 主催の *in vitro* pepsin digestion assay の ring study の結果を表 4、5 に示す。

Ovm(分子量約 42kDa)の SGF による分解性を SDS-PAGE で確認する時、Ovm 蛋白の band の位置が pepsin の band の位置と重なるので、正確な分解時間を求めることができないため、9 機関での解析結果をまとめる際には、Ovm を除く 9 種の基質タンパク質の分解性の結果を、完全長のタンパク質及び断片の消失時間であらわした結果で示している。pH1.2 及び 2.0 どちらの条件下で SGF 分解性試験を行った場合も、各機関でよい合致率が得られた。特に完全長の消失時間についての各機関の解析結果では、かなりよい合致がみられ、pH1.2 で、91%、pH2.0 で、77%の数値が得られている。断片の消失時間については、幾分合致率がさがり、pH1.2 で、80%、pH2.0 で 75%であった。基質タンパク質の分解に要する時間は、pH1.2、2.0 どちらの条件下でも大きな差はみられなかった。以上、*in vitro* SGF digestion 実験の ring study の結果からは、pH1.2 を用いる方が、標準的な *in vitro* SGF digestion 試験として適していることが示された。

遺伝子組換え食品のアレルゲン性を評価する際には、挿入遺伝子産物のアレルゲン性および既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性、アレルギー患者血清中の IgE との反応性などとともに、消化に対する抵抗性が重要な指標とされる。一定の実験条件を用いた人工胃腸液による各種蛋白質の基礎的な分解性データはこの観点からも必要不可欠なものと考え

られた。

#### D. 結論

(1) 患者血清を用いる研究では、国内外食物アレルギー患者血清等126種について、除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS), PAT 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、ELISA法及び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) 動物を用いるアレルゲン性の検討では、種々のマウスを用いる強制経口投与による感作条件の検討を行ったところ、W/Wvマウスで、経口感作能の高いことが判明し、このマウスの腸管リンパ球(IEL)中のTCR $\gamma\delta$ -T細胞の割合の顕著な減少と経口感作能との関連が示唆された。また、溶媒にリノール酸とレシチンの混液を用いた方が生食を溶媒にした場合に比較して経口による感作能の高いことが示された。

(3)人工胃腸液による分解性の検討では、*in vitro*分解性試験の改良、並びに validationを行うために研究を行った。ILSI主催の国際Validation試験では、人工胃液による分解性試験で、pH1.2の条件下の方が、pH2.0の条件下に比べよい validation結果が得られた。また、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結果から、特に人工胃腸液(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。

#### E. 参考文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/idsnshi/codex/codex.html>
- 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) 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. 78,1-5 (2001)
- 4) Okunuki, H., Teshima, R., Sakushima, J.,

Akiyama, H., Goda, Y., Toyoda, M and Sawada J., Induction of active systemic anaphylaxis by oral sensitization with ovalbumin in mast-cell-deficient mice. *Immunol.Lett.* 74, 233-237 (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) Buchanan, B. B., Frick, D.L., The dog as a model for food allergy. *Ann.NY Acad. Sci.* 964,173 (2002)

## F. 研究発表

### 1.論文発表

1) 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), 68-73, 2002

2) Teshima R., Watanabe T., Okunuki H., Isuzugawa K., Akiyama H., Onodera H., Imai T., Toyoda M. and Sawada., Effect of subchronic feeding of genetically modified corn (CBH351) on immune system in BN rats and B10A mice. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J.Food. Hyg.Soc. Japan)* 43 (5), 273-279, 2002

2) Takagi K., Teshima R., Okunuki H. and Sawada J. : Preheating increases the *in vitro* digestibility of several food allergens. *Biol. Pharm. Bull.*, (submitting)

4) Okunuki H., Akiyama H., Teshima R., Hino A., Goda, Y. and Sawada J., Toyoda M. and Maitani T., Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvyl shikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS. *J. Food Hygienic. Soc. Japan*, (in press).

5) Takagi K., Nakamura R., Teshima R. and Sawada J. Application of human FcεRI α-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE. *Biol. Pharm. Bull.*, 26 (2), 252-255 (2003).

### 2.学会発表

1) 第9回免疫毒性学会学術大会「食物アレルギー誘発性試験の一環としての*in vitro* 分解性試験」手島玲子、高木加代子、奥貫

晴代、中村亮介、蜂須賀暁子、澤田純一 (2002.9)

2) 第 39 回全国衛生化学技術協議会「遺伝子組換え食品並びに食品のアレルギーのリスク評価について」手島玲子(2002.10)

3) 第 52 回日本アレルギー学会総会「W/Wv マウスの卵白アルブミン(OVA)経口投与による ASA 誘導について」手島玲子、奥貫晴代、澤田純一(2002.11)

4) 日本薬学会第123年会「W/Wv マウスにおけるOVA 経口感作によるASA 誘導とγδ-T 細胞の減少」奥貫晴代、手島玲子、張替直輝、酒井信夫、穂山浩、米谷民雄、澤田純一(2003.3)

5) 日本薬学会第 123 年会「食物抗原の人工胃腸液分解性に及ぼす加熱処理の影響」高木加代子、奥貫晴代、中村亮介、手島玲子、澤田純一(2003.3)

6) 日本薬学会第123年会「遺伝子組換えとうもろこしCBH-351 のラット並びにマウスへの90 日間混餌投与による免疫系への影響」手島玲子、渡邊敬浩、奥貫晴代、穂山浩、今井俊夫、澤田純一、豊田正武 (2003.3)

7) *Amer. Acad. Allergy Asthma Immunol.* 60th Anniversary, A multi-laboratory evaluation of an *in vitro* pepsin digestion assay : variables affecting the reproducibility of a method for novel protein safety assessment, Privalle L. et al.(2003.3)

図1 PAT 抗原と患者血清中 IgE 抗体との反応の ELISA による解析結果

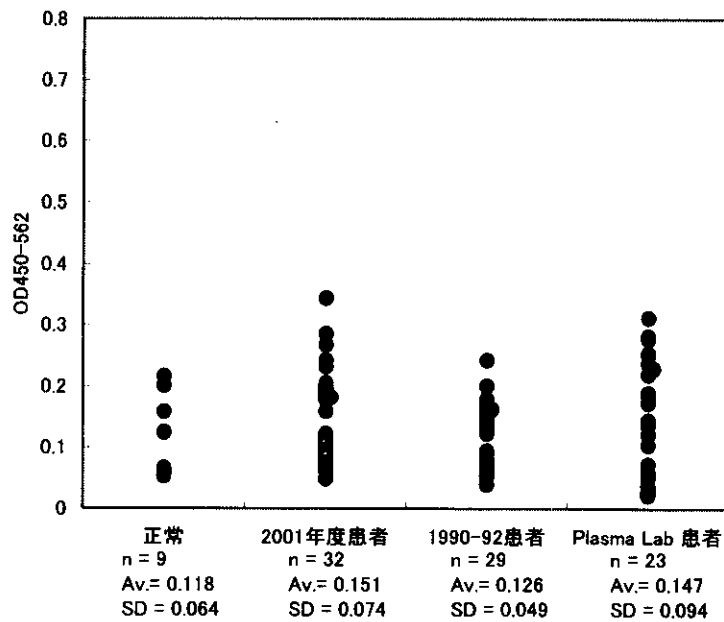
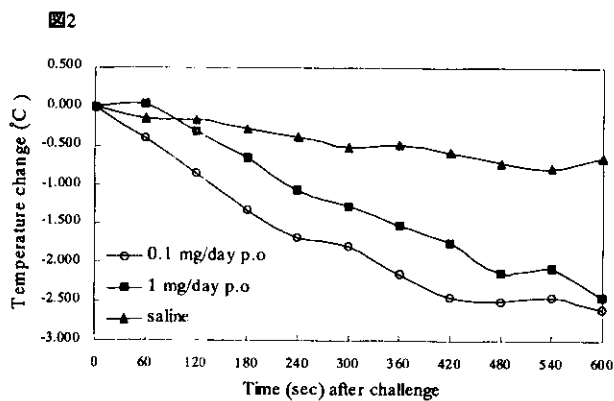


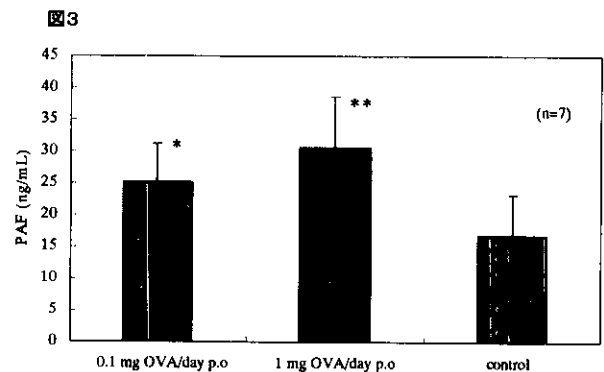
表1 Serum OVA-specific antibody of W/W<sup>v</sup> mice orally-sensitized with OVA

Group	OVA-specific antibody (ELISA titer)				
	IgE	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgA
0.1 mg per day p.o.	74.42±89.78	29179±23402	157.6±186.2	180.0±167.1	391.6±160.4
1.0 mg per day p.o.	351.8±537.2	47000±7937	150.0±223.6	<50	343.0±193.0
control	<50	<50	<50	<50	<50

n=7

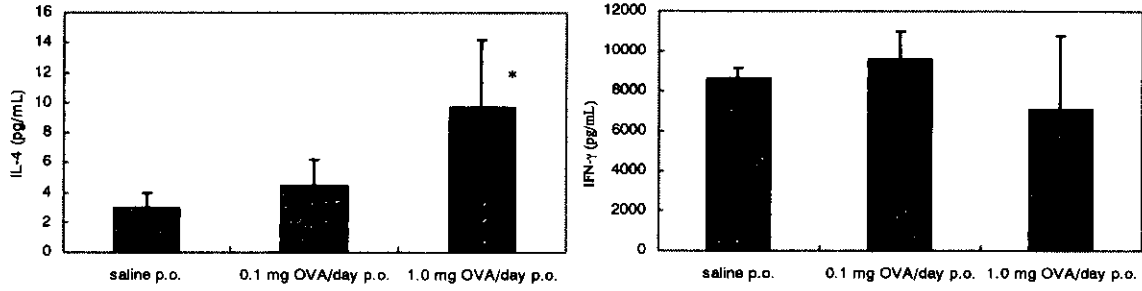


Changes in body temperature after ASA. Body temperature was monitored every minute after challenge with OVA. Each value represents the mean ± S.D. for seven mice.



Determination of plasma PAF concentrations in W/W<sup>v</sup> mice after ASA. Plasma PAF concentrations in 0.1 or 1.0 mg OVA-gavaged mice after ASA were determined according to the method described in Section 2. Each value represents the mean ± S.D. for seven mice; \*, indicate significant differences from the control group (\*, P<0.05; \*\*, P<0.01).

図4



IL-4 and IFN- $\gamma$  production by splenocytes from W/W<sup>v</sup> mice in response to re-stimulation with 100  $\mu$ g/mL of OVA for 3 days was measured, as described in Section 2. Each value represents the mean  $\pm$  S.D. for seven mice.

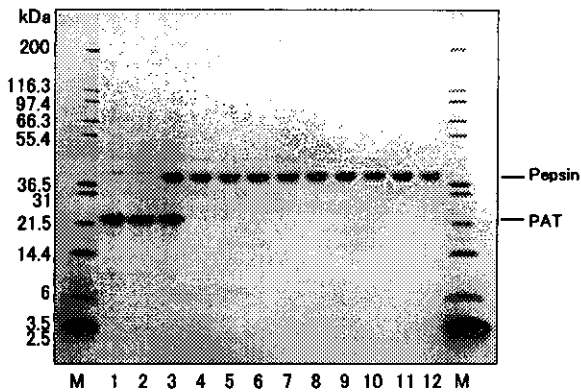
表2 BALB/c マウスのOVA経口感作への溶媒の効果

OVA-specific IgG1 titer (ELISA) (n=6)	
OVA in saline (1 mg per day p.o. 4wk)	77 $\pm$ 159
OVA in linoleic acid+lecithin* (1 mg per day p.o. 4wk)	8470 $\pm$ 9694

\*Linoleic acid 0.04 mL and lecithin 0.01 mL/animal/day was used as a vehicle.

図5

PAT/SGF (pH 2.0) による分解



<SDS-PAGEパネルの説明>

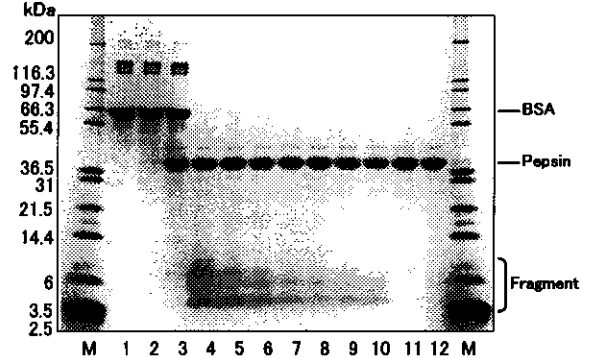
SGF												
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Time (min)	0	60	0	0.5	2	5	10	20	30	60	0	60
Protein							+					
Solution	SGF						SGF					
	-pepsin											

SIF													
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Time (min)	0	120	0	2	5	10	20	30	60	90	120	0	120
Protein							+						
Solution	SIF						SIF						
	-pancreatin												

M: Molecular weight markers

図6

A BSA/SGF (pH 1.2) による分解



B BSA/SGF (pH 2.0) による分解

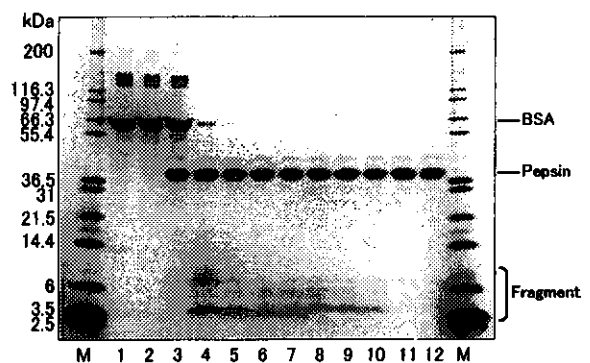




図 7

STI/SGF (pH 1.2) による分解

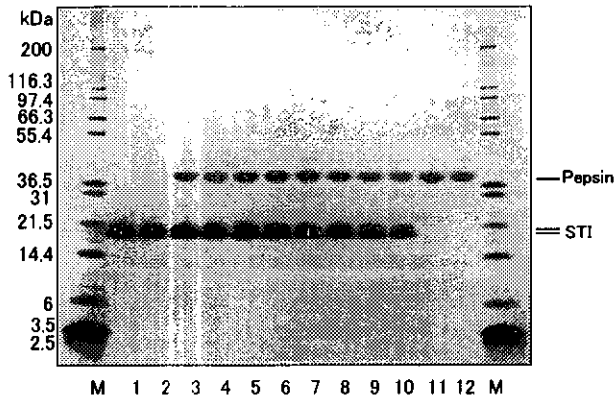
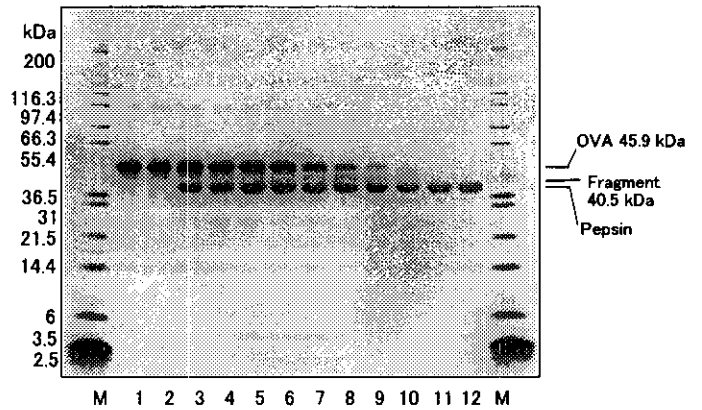
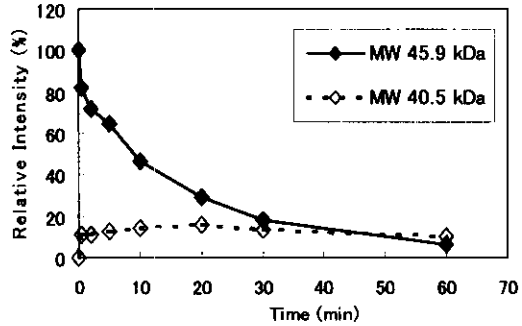


図 8

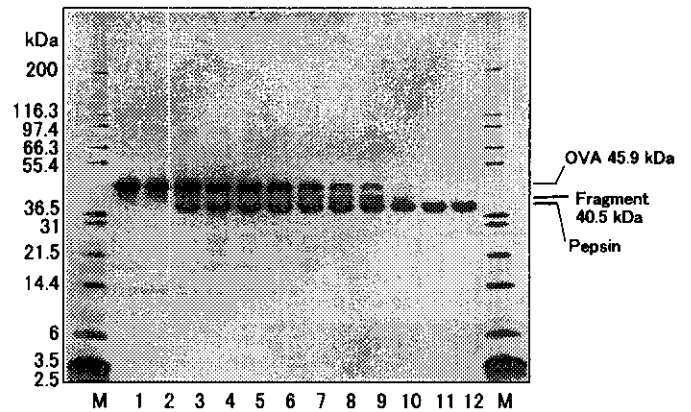
A OVA/SGF (pH 1.2) による分解



B



C OVA/SGF (pH 2.0) による分解



D

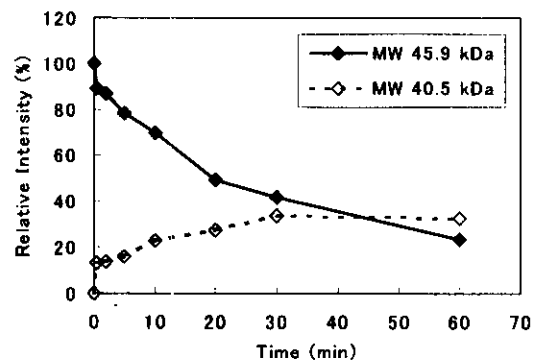


図 9

OVA/SIF による分解

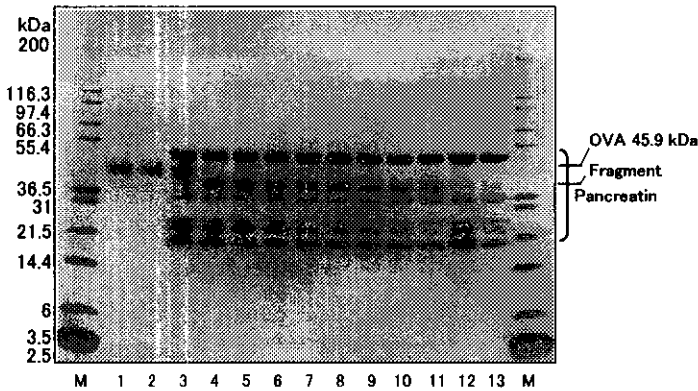


表 3 SGF, SIF による分解性試験まとめ

Protein	Judgment				
	SGF pH 1.2	SGF pH 2.0	SGF (boiled) pH 2.0	SIF	SIF (boiled)
<b>Allergen</b>					
BSA	2	2	2	5	5
BLG	5	5	5	2	ND
OVA	5	5	2	5	1
OVM	2	2	1	ND	ND
STI	5	5	5	5	5
ConA	5	5	2	5	2
Ara h 2	2	2	ND	1	ND
<b>Non-Allergen</b>					
HRP	1	1	1	ND	ND
RUBISCO	1	1	ND	ND	ND
PAT	1	1	ND	1	ND

Judgment: 1. Rapidly digested less than 0.5 min in SGF or 2 min in SIF  
 2. Rapid with fragment  
 3. Intermediately labile  
 4. Intermediately labile with fragment  
 5. Stable  
 ND: Not Done

表 4 Concordance of SGF digestibility between laboratories, pH 1.2

<b>Full-length Protein<sup>^</sup> pH 1.2</b>								
Last Time Detected	0	0.5	2	5	10	20	30	60
Ara h 2	8*		1					
BLG								9*
BSA	8*		1					
ConA							7*	2
HRP	9*							
Ova						1	6*	2
PAT	9*							
RUBISCO	9*							
STI								9*
Sum of labs in agreement*	74 (out of 81 possible)							
Percent agreement	91 %							
<b>Protein Fragment(s) pH 1.2</b>								
Last Time Detected	0	0.5	2	5	10	20	30	60
Ara h 2	2			1	1			5*
BLG	9*							
BSA	2	1						6*
ConA							1	8*
HRP	6*						1	2
Ova							1	8*
PAT	8*							1
RUBISCO	6*					1	1	1
STI	9*							
Sum of labs in agreement*	65 (out of 81 possible)							
Percent agreement	80 %							

- Results of the number of laboratories reporting the indicated time (minutes) as the last observed time-point for each protein at pH 1.2.
- <sup>^</sup> Ovomucoid was not included in this evaluation due to the interference caused by the lysozyme contamination and the poor resolution of the full-length protein.
- \* The maximum number of laboratories in agreement regarding the last time each specific protein, or fragments of the specific protein were visible was summed in each experiment to calculate the percent agreement based on 81 (nine laboratories times 9 proteins).

表 5 Concordance of SGF digestibility between laboratories, pH 2

<b>Full-length Protein<sup>^</sup> pH 2</b>								
Last Time Detected	0	0.5	2	5	10	20	30	60
Ara h 2	8*						1	
BLG								9*
BSA	6*	2	1					
ConA							6*	3
HRP	2	5*	2					
Ova						1	3	5*
PAT	7*	1	1					
RUBISCO	8*	1						
STI								9*
Sum of labs in agreement*	63 (out of 81 possible)							
Percent agreement	77 %							
<b>Protein Fragment(s) pH 2</b>								
Last Time Detected	0	0.5	2	5	10	20	30	60
Ara h 2	2			1			1	5*
BLG	9*							
BSA	2	1	1					5*
ConA							1	8*
HRP	5*			1				3
Ova								9*
PAT	7*	1						1
RUBISCO	4*					2	1	2
STI	9*							
Sum of labs in agreement*	61 (out of 81 possible)							
Percent agreement	75 %							

- Results of the number of laboratories reporting the indicated time (minutes) as the last observed time-point for each protein at pH 2.
- <sup>^</sup> Ovomuroid was not included in this evaluation due to the interference caused by the lysozyme contamination and the poor resolution of the full-length protein.
- \* The maximum number of laboratories in agreement regarding the last time each specific protein, or fragments of the specific protein were visible was summed in each experiment to calculate the percent agreement based on 81 (nine laboratories times 9 proteins).

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

遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発がん性併用試験

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

**研究要旨**

本研究は、遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発がん性併用試験を国民の意向も考慮して行政的観点から実施するものである。

遺伝子組換えトウモロコシ(MON810 Event: Pioneer 33P67 株)、遺伝子非組換えトウモロコシ(Pioneer 33P66 株)をアメリカ合衆国(イリノイ州の同一地域)より、それぞれのトウモロコシを単一生産する農家から購入した。粗蛋白質量や粗脂質量などの食品成分組成、アミノ酸組成、脂肪酸組成、カビ毒等を分析し、遺伝子非組換えトウモロコシの遺伝子検査を行った。その結果、遺伝子組換えおよび遺伝子非組換えトウモロコシを飼料に添加し、慢性毒性・発がん性併用試験を遂行する上でなんら問題がないことを確認した。

改良 NIH Open Formula の飼料配合を元とし、ここで配合されるトウモロコシ 24.5%すべてを遺伝子組換えに置きかえたものを最高用量群とした。改良 NIH Open Formula の配合成分中の脱脂大豆およびグルテンミールは、遺伝子組換え成分の混入を排除できないので、これを小麦粉に置きかえた。これにより起こる栄養価あるいは栄養バランスの変更は、飼料として問題になるようなものでないことを確認した。慢性毒性・発がん性併用試験では、この配合による飼料を用いて、F344/Ducrj (SPF)ラット雌雄各群 60 匹に投与し、体重と摂餌量を測定するとともに、1 年目には各群 10 匹、2 年目には残存する動物を対象に、血液学、血液化学、病理組織学的検査等を行う。

遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発がん性併用試験は、国の内外を問わずこれまで行われたことがない。本研究は、国民の意向も考慮して行政的に実施が計画・決定されたものである。

**協力研究者**

小川幸男、関田清司、斎藤実、松島裕子、川崎靖（国立医薬品食品衛生研究所毒性部）

**A. 研究目的**

本試験は、遺伝子組換え農作物の安全性確保のため、ラットに遺伝子組換えトウモロコシを 2 年間繰り返し経口投与し、生じ得る毒性あるいは発がん性についてのデータを収集することを目的とする。導入遺伝子産物の毒性は別途に評価済みであるが、ここでは国民の強い要望に応え、前年度までに実施された 90 日間反復投与毒性試験に引き続き、敢えて最終生産形態での試験を実施するものである。

遺伝子組換え農作物の実験の候補としてトウモロコシ、ダイズ、ジャガイモが挙げられたが、動物実験に際して、飼料成分としての含有量が最も高いトウモロコシを取り上げたものである。

すなわち、ラット・マウス用飼料の材料としてジャガイモは使用されず、ダイズは脱脂ダイズとして添加量が通常 12%前後であるのに対し、トウモロコシ添加量が 24.5%の飼料が既に存在することから本実験の検体として選んだものである。

**B. 研究方法**

被験物質である遺伝子組換え(GM)トウモロコシ(MON810 Event: Pioneer 33P67 株)は、BT 菌の蛋白質毒素を生産する遺伝子を組み込み、害虫である蛾の幼虫から植物を守ることをコンセプトに作られた製品である。その対照として遺伝子非組換え(non-GM)トウモロコシ(Pioneer 33P66 株)を用いた。両者とも、アメリカ合衆国(イリノイ州)の、同一地域で、組換えあるいは非組換えトウモロコシを単一生産する農家から購入した。トウモロコシの粗蛋白質量、

粗脂質量、アミノ酸組成、脂肪酸組成などの成分測定の結果、有意な差は見られなかった (Fig.1-3)。また、カビ毒等の既知毒性成分の分析を行った (Table1)。結果、GM および non-GM トウモロコシに何ら問題がないことを確認した。non-GM トウモロコシ 2kg を抜き取り、更に 3 ポイントから 100g ずつ抽出、粉末化し、その 1g を用いて遺伝子検査を行った。2 ポイントからは検出されなかったが、1 ポイントからは MON810 遺伝子が 0.35% 検出 (検出限界 0.1%) された。これはトウモロコシが風媒植物であるため、近隣 GM トウモロコシの花粉が低頻度ながら受粉した結果と思われた。陰性対照として、同一地域で栽培された近縁株のトウモロコシを選択する以上、この程度の混入は避けがたいと考えられた。

改良 NIH Open Formula の飼料配合を元とし、ここで配合されるトウモロコシ 24.5% すべてを GM に置きかえたものを最高用量群とした。改良 NIH Open Formula の飼料配合成分中の脱脂大豆 (11.75%) およびグルテンミール (3.0%) は、遺伝子組換え成分の混入を排除できないので、これを小麦粉に置きかえた結果、小麦粉の混合比率は 32.87% から、47.62% となった。そのため、総蛋白質含有量は、3% ほど低下し、25% となったが、最低必要量の 12% を上回っており、問題とらないことを確認した (Table2)。

飼料中の総トウモロコシの配合量を合計で 24.5% に保ちつつ、GM トウモロコシ含有率 24.5% を最高に、公比 3 により 8.2 および 2.8% を配合、non-GM をそれぞれ 16.3 および 21.7% 加え、対照飼料には non-GM のみを 24.5% 配合した (Table3)。

この配合による飼料を用いて、F344/Ducrj (SPF) ラット雌雄の各群 60 匹に 2 年間投与する慢性毒性・発がん性併用試験を行っている。

慢性毒性・発がん性併用試験は、体重と摂餌量を測定するとともに、1 年目には各群 10 匹、2 年目には残存する動物を対象に、病理組織学的検査、血算、血清生化学的検査等を行う。

#### (倫理面への配慮)

当所内の動物実験倫理委員会が定めた規定に則り、動物に苦痛を与えないため、採血および屠殺処分に際しては麻酔を行うなど細心の注意を払っている。

#### C. 研究結果及び考察

上記組成になる GM および non-GM トウモロコシ配合ラット用飼料を製造し、慢性毒性・発がん性併用試験を開始した。13 週が経過し、雌雄の全動物に死亡や一般状態の異常は見られず、雌雄各群の体重は正常域内にあり、摂餌量においても大きな増減は観察されず、順調に経過中である (Fig.4)。

#### D. 結論

被験物質として遺伝子組換えトウモロコシ (MON810 Event: Pioneer 33P67 株)、その対照として遺伝子非組換えトウモロコシ (Pioneer 33P66 株) をアメリカ合衆国イリノイ州の、同一地域で、GM あるいは non-GM を単一生産する農家から調達することができた。GM および non-GM を飼料に添加することに対し、栄養学的、およびカビ毒等の既知毒成分、あるいは non-GM への GM 遺伝子産物の混入を検討した結果、2 年間の長期試験を遂行するにあたり、いずれも問題としないことを確認した。それにより、2 年間の長期試験を遂行するための、根本的な飼料成分でもある材料としての的確な被験物質が得られたと考えている。

遺伝子組換えトウモロコシそのものを用いた慢性毒性・発がん性併用試験は、国の内外を問わずこれまで行われたことがない。本研究は、国民の意向も考慮して行政的に実施が計画・決定されたものである。従って、本試験の結果は、社会的に意義の大きいものである。

#### 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

### トウモロコシの栄養成分の分析

Fig.1

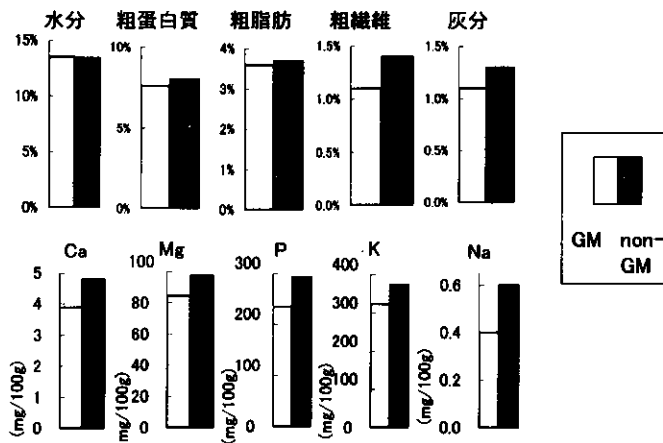


Fig.2

### トウモロコシのアミノ酸組成

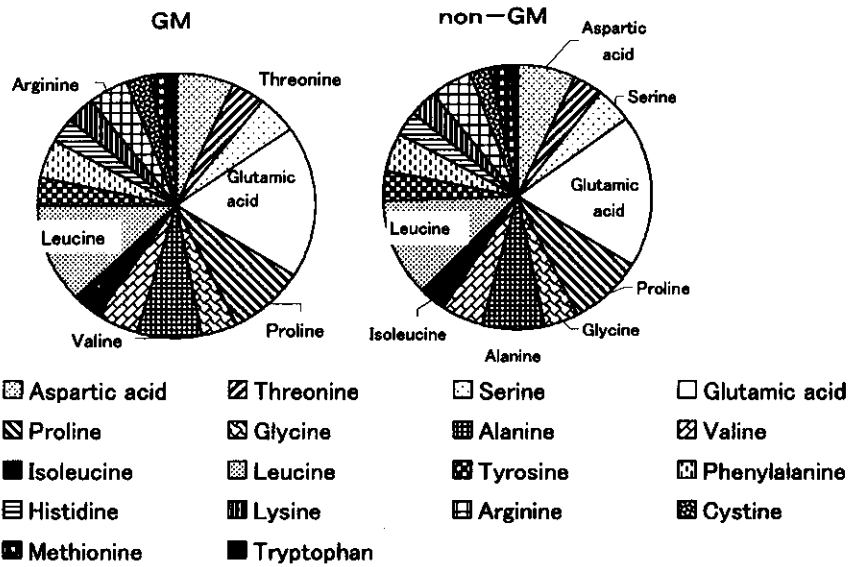


Fig.3

### トウモロコシの脂肪酸組成

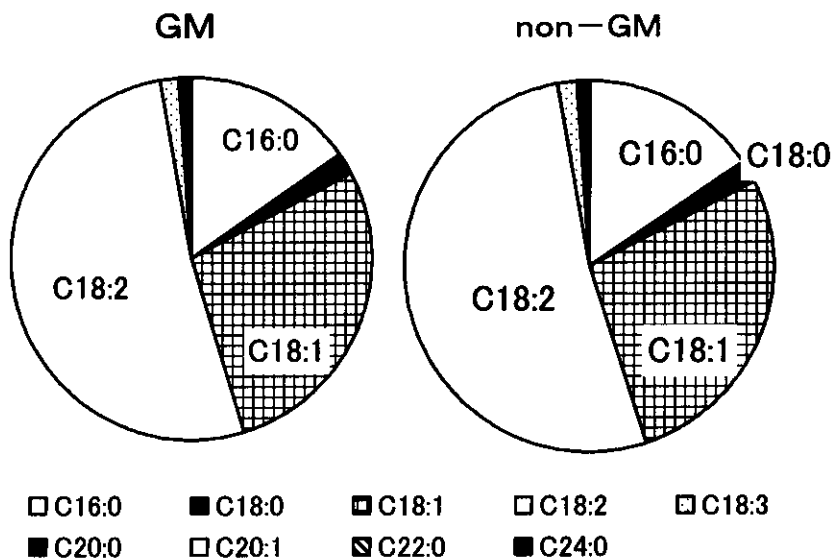


Table1

トウモロコシのカビ毒分析			
項目	GM	non-GM	検出限界
アフラトキシンB1	—	—	5ppb
アフラトキシンB2	—	—	5ppb
アフラトキシンG1	—	—	5ppb
アフラトキシンG2	—	—	5ppb
ニバレノール	—	—	0.05ppm
デオキシニバレノール	—	—	0.05ppm
オクラトキシン A	—	—	0.05ppm
ステリグマトシステン	—	—	0.2ppm
フモニシンB1	—	—	0.05ppm
フモニシンB2	—	—	0.05ppm
ゼアラレノン	—	—	0.02ppm

## 飼料組成

Table2

改良NIH Open Formula		実際の混合比率	
トウモロコシ	24.5%	トウモロコシ	24.5%
脱脂粉乳	5.0%	脱脂粉乳	5.0%
北洋魚粉	10.0%	北洋魚粉	10.0%
脱脂大豆	11.75%		
アルファルファミール	4.0%	アルファルファミール	4.0%
グルテンミール	3.0%		
小麦粉	32.87%	小麦粉	47.62%
ビール酵母	2.0%	ビール酵母	2.0%
糖蜜	0.75%	糖蜜	0.75%
大豆油	2.5%	大豆油	2.5%
食塩	0.33%	食塩	0.33%
リン酸2カルシウム	1.25%	リン酸2カルシウム	1.25%
ミネラル混合	1.05%	ミネラル混合	1.05%
ビタミン混合	1.0%	ビタミン混合	1.0%

## 遺伝子組替トウモロコシの慢性毒性・発がん性併用試験

Table3

## 実験計画

## 動物

F-344/Ducrj SPFラット 5週齢(日本チャールスリバー)

一群動物数 雄：60匹 雌：60匹

群	GM添加量(%)	non-GM添加量(%)
1 対照群	0	24.5
2 L群	2.8	21.7
3 M群	8.2	16.3
4 H群	24.5	0

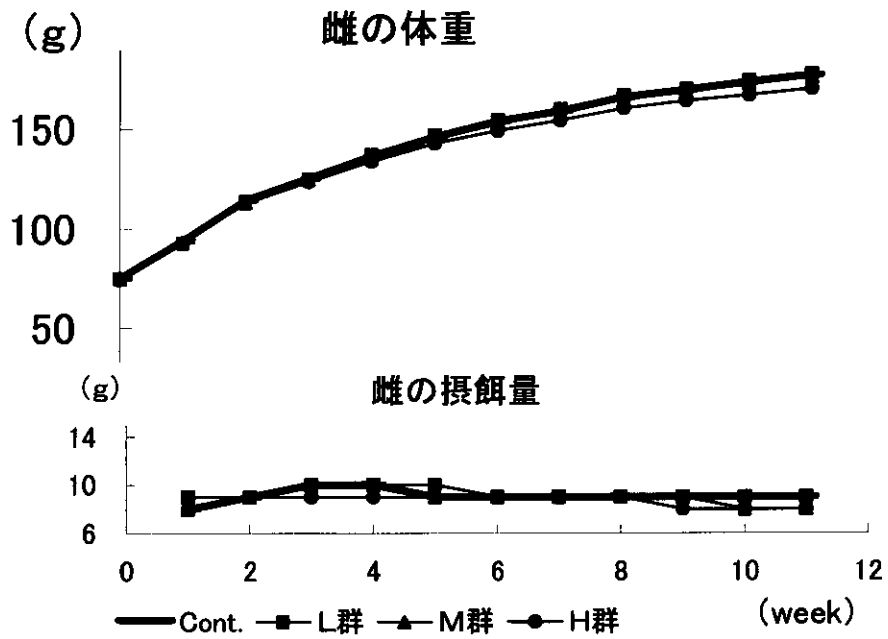
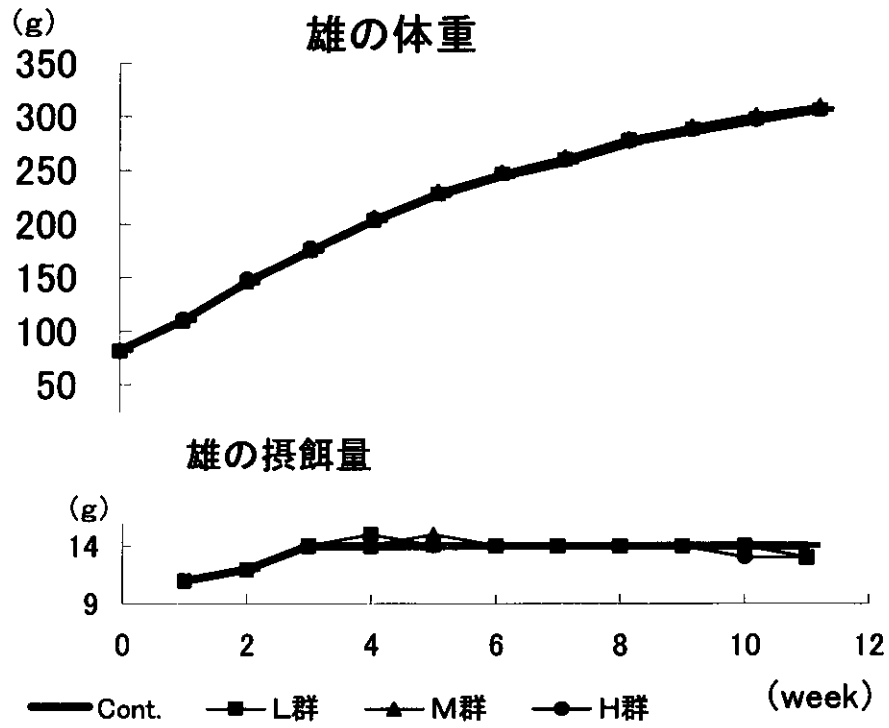
## 検査時期、検査及び測定項目

1) 検査時期 52週：10匹、104週：残存全例

2) 観察、測定、検査

- (1)一般状態の観察 (2)体重測定 (3)摂餌量測定 (4)尿検査 (5)血液学的検査  
(6)血液化学的検査 (7)剖検 (8)器官重量測定 (9)病理組織学的検査

Fig.4





厚生労働科学研究費補助金(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」

分担研究報告書

クローン牛の食品としての安全性

分担研究者 熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科

研究要旨

国内外でこれまでに得られている知見は、生後1ヶ月以上生存した体細胞クローン牛個体は、一般牛と同程度に正常に生育し、一般牛と差異のない生理機能をもつことを示している。したがって、一般牛に比べ、クローン牛個体が、ヒトを含めほ乳動物に対して生物作用をもつ物質を多量に産生したり、新規な生物活性物質を産生していることは考えがたい。

クローン牛の肉と生乳についての構成成分に関する知見は、それら乳肉の構成成分が一般牛と異なること、ならびに栄養機能の点において一般牛の肉や生乳と類似していることを示している。さらに動物への給餌試験の結果は、ヒトが通常摂取している量に十分匹敵する量のクローン牛の肉または生乳をラットに給餌しても、健康を損なうことがないことを示しており、栄養的にも一般牛の肉や生乳と同等の機能をもつことを示している。

したがって、受精卵クローン牛や体細胞クローン牛については、従来技術により産生された牛にはない特有の要因によって食品としての安全性が損なわれることは考えがたい。ただし、クローン技術は新しい技術であるために、クローン牛由来の食品の安全性については、慎重な配慮が必要である。クローン牛の人獣共通感染症等疾病への罹患、あるいは同牛由来の乳肉における有害化学物質の残留などによって、安全性が損なわれることのないような慎重な対応が必要である。こうした配慮の下に、その安全性を危惧させる要因が新たに検知された場合には、速やかにその要因を排除できる対応が必要である。

協力研究者

入谷 明(近畿大学生物理工学部)、今井 裕(京都大学大学院農学研究科)、小野憲一郎(東京大学大学院農学生命科学研究科)、鎌田 博(筑波大学生物科学系)、高橋清也(独立行政法人農業技術研究機構畜産草地研究所)、角田幸雄(近畿大学農学部)、土井邦雄(東京大学大学院農学生命科学研究科)、山内一也((財)日本生物科学研究所)、吉倉廣(国立感染症研究所)

A. 研究目的

平成11年度中間報告書において以下の結論を得ている。

(1)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調べた限りにおいては各種生理機能を含め特段の

異常がこれまで認められていない。(2)植物や微生物、は虫類以下の動物の中には、極めて微量または少数でヒトに対して毒性や病原性を発現し、食品として摂取した場合にヒトに危害を招来するものが少なからず存在する。しかし、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。(3)受精卵クローン牛や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。

したがって、受精卵クローン牛や体細胞クローン牛に特有な、食品としての安全性を懸念する科学的根拠はない。しかし、その時代時代における科学的知見には自ずと限界があり、新しい技術については多面的な角度からのデータの集積によって安全性を確認する努力が払われるべきである。成長した受精卵クローン牛や体細胞クローン牛の両者には本質的な差はなく、現時点で得られている限りの知見からは食品としての安全性を危惧する根拠はないが、より多数のクローン牛について、生理的・機能的データおよび乳肉に関するデータをとることによって安全性の裏づけを得ることが望まれる。

この報告書以降現在までに国内外で多数の知見が得られている。本分担研究では、それのうち特に食品としての安全性に関連する知見に基づいて、クローン牛の食品としての安全性について考えを求めることが本研究の目的で

ある。以下、①クローン牛の食品としての安全性、②家畜繁殖技術研究の歴史的展開、③クローン牛の食品としての安全性におけるミトコンドリアの問題、④核の初期化と発生異常について考察する。

## 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。

## C. 研究結果及び考察

### ①クローン牛の食品としての安全性について

#### 1. クローン牛の生育に関する知見

農水省は、我が国の試験研究機関によるクローン牛の開発状況をとりまとめている。

体細胞クローン牛は、平成14年8月14日時点で、出生頭数は312頭である (Table 1)。そのうち育成または試験中で生存している牛が140頭(44.9%)、死産と生後直死の合計が97頭(31.1%)、病死等が53頭(17.0%)、事故死が1頭(0.3%)、試験と殺が21頭(6.7%)である。

病死等の時期としては、生後まもない時期の死亡が多く、53頭のうち1ヶ月齢以後での病死等は16頭(30.2%)で、そのうち6ヶ月齢以上での病死は1頭のみである。試験と殺21頭のうち原因が報告されている例数は4頭で、そのうち3頭は4ヶ月齢未満であった。事故死例は5ヶ月齢の牛に認められている。図1の「死亡年齢と頭数」に、病死および試験と殺(以上が報告されている例およびと殺理由が報告されて

いない例)の年齢と頭数を示した。生存牛の頭数(図2「生存年齢と頭数」)を考え合わせると、1ヶ月齢以降の死亡頻度は極めて少ないといえる。

特定された病死等の原因は、免疫不全、下痢による衰弱死、腸炎、肺炎、敗血症、リンパ系組織の形成不全、起立不能、臍帯周辺部の炎症、消化不良、および肺炎・肺気腫であった。平成14年9月14日時点で生存している140頭のうち、約40頭が3歳以上で、そのうち数頭は4歳に達している。

受精卵クローン牛の状況については、平成14年8月14日時点で、出生頭数が663頭である。そのうち育成または試験中で生存している牛が126頭(19.0%)、死産と生後直死の合計が100頭(15.1%)、病死等が91頭(13.7%)、事故死が20頭(3.0%)、試験と殺が24頭(3.6%)であった。死産、生後直死および病死の事例の全体に占める割合は、体細胞クローン牛の場合よりも小さかった。

食肉として処理されたことが確認された頭数は202頭(30.4%)であった。

体細胞クローン牛の子牛については、平成14年9月の時点で、52頭の子牛が人工授精によって妊娠した体細胞クローン雌牛から生まれ、これらのうち最高齢の子牛は1歳9ヶ月齢に達している。52頭のうち死産は3例、1ヶ月齢未満での病死が3例で認められた。体細胞クローン雄牛9頭の子牛については、それらの精子により合計49頭の子牛が生まれ、最高齢の子牛は1歳10ヶ月齢に達している。それらのうち、1例で死産が記録されている。

Paceら(Biol.Reprod., 67, 334-339, 2002)は、

胎児または成熟個体由来の細胞をドナーとしたクローン胚2170個のうち、535個が着床し、106頭の子牛が生まれ、82頭が5-29ヶ月齢で健全に生存していること、雌牛は約10-11ヶ月齢で春季発動を示し、人工授精を受けた22頭の全てが妊娠したことを報告している。

Fairburnら(Current Biol., 12, R68-70, 2002)によれば、着床前のクローン牛の胚が、体外受精胚に比べ異常なDNAメチル化パターンを示すことが見出されており、こうした欠陥が発育異常と低出生率の原因の一部となっているらしいが、DNAメチル化パターンの異常がクローン胚における異常な転写の原因となっていることを示す直接的な証拠は得られていない。

最近、一部の受精卵クローン牛や体細胞クローン牛において、ドナー細胞のミトコンドリアDNAが検出され、2種類以上のミトコンドリアが混在する状況(ヘテロプラスミーとよぶ)が生まれうることを示唆されている(Biol. Reproduct., 68, 159-166, 2003; Genetics, 162, 823-829, 2002)。しかし、自然界の牛にもヘテロプラスミーが存在していることから、また、マウスにおけるミトコンドリアと核との相互関係に関する報告などから、進化的に極めて近縁の動物種のみ由来するクローン牛の場合、核とミトコンドリアの適合性は高いと予想され、表現型への影響も少ないと考えられている(本報告著「ミトコンドリアの関与」参照)。

久保は、我が国において産出された体細胞死亡クローン牛について病理学的検索を行った。1ヶ月齢以上の時点で死亡した10例の牛の病理所見として、骨格筋の変性(2例)、免

疫系組織形成不全(7例)、気管支肺炎(1例)、貧血(1例)、股関節形成不全(1例)、肺炎(1例)、糸球体腎症(1例)、白筋症(1例)、下垂体性小児症(1例)、コクシジウム感染(1例)などが認められているが、クローン牛に特有な新規の病理所見は認められなかったとしている。この知見は、体細胞クローン牛の病理学的異常を、従来のと畜検査で摘発できることを示唆している。

Heymanら(Biol.Reprod., 66, 6-13, 2002)は、成熟個体由来体細胞クローン胚、胎児由来体細胞クローン胚および受精卵クローン胚の発育を比較した研究において、雌牛に移植されたそれらの胚が発育して出生に至った割合は、それぞれ 6.8%(9/133)、15.0%(6/40)、34.3%(23/67)であり、人工授精胚の 49.0%(25/51)より低いことを報告している。成熟個体由来体細胞クローン牛9頭のうち、3頭は1ヶ月齢以前に死亡したが、6頭は正常に発育したことが認められている。

生育に伴う体重については、8ヶ月齢までの2頭の体細胞クローン牛の体重を追跡した結果、一般牛と差異のない成長が認められている(Sakaguchi et al., J. Reprod. Develop., 46, 265-269, 2000)。4頭の体細胞クローン牛の1歳時の体重を、それぞれのドナー牛および36頭の一般牛の平均体重と比較した報告によれば、4頭のうち3頭においては、一般牛平均体重およびドナー牛体重に比して低値であったが、その差は育成環境や試験時期の相違によると考えられている(鹿児島県肉用牛改良研究所研究報告第6号20-23(2001))。

以上の知見は、(1)とくに体細胞クローン

牛において、流死産および生後直死の頻度が高いこと、(2)現時点で、このような発生以上の原因は不明であること、(3)しかし、生後1ヶ月齢までに死亡を免れた個体は、雌雄ともにその後順調に成育し仔を産することができること、(4)そのような個体の死亡例に、クローン牛特有の病理所見は認められないことを示している。

## 2. クローン牛の生理機能に関する知見

Chavatte-Palmer ら ( Biol.Reprod., 66, 1596-1603, 2002) は、体細胞クローン牛の内分泌機能等を、人工授精子牛と体外授精子牛から成るコントロール牛群と比較した。クローン牛においては、臨床症状は認められないけれども、コントロールよりも体温が高かった。しかし、クローン牛の血漿中甲状腺ホルモン(T4)濃度は、15日齢まではコントロールよりも低かった。IGF-I 濃度は両群間で差がなく、IGF-II 濃度には有意差が認められたが、大きな差ではなく、20日齢以後、有意差は認められていない。IGFBP にも著しい差異は認められていない。レプチン濃度は、1週齢時まではクローン牛の方が有意に高いが、最も高い時点での平均濃度は約2.5倍にすぎず、15日齢以後は差が認められていない。成長ホルモン濃度および ACTH によるコルチゾール分泌にも差は認められていない。

Enright らは ( Biol.Reprod., 66, 291-296, 2002) 、4頭の体細胞クローン雌牛と4頭の同年齢同体重コントロール雌牛を用いて繁殖機能を比較している。春季発動はクローン牛の方が有意に遅いが、発情周期の長さや成熟卵胞径には差異がなく、LH、FSH、エストラジオ