

## 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 広瀬 雅雄

### 分担研究者

- (1) 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 広瀬雅雄
- (2) 東京農工大学 工学部 生命工学科 小関良宏
- (3) 三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 学術部 鈴木幸雄

### 要旨

本研究にて確立した小腸障害モデルラットに胃酸分泌低下を負荷した状態で、精製 Bt タンパク質を 1 週間の 2 サイクル間歇混餌投与した。その結果、体重、摂餌量、血液学的検査、血清生化学的検査、病理学的検査等の結果において Bt タンパク質による著明な変化はみられなかった。

### 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。この安全性評価において動物を用いた試験以外に、導入した遺伝子由来の産物である殺虫タンパク質や除草剤耐性酵素タンパク質の物理的安定性および消化性が審査される。これは、アレルゲン性については通常の動物実験では確認できないため、アレルゲンとして感作が起こる小腸にタンパク質が完全分解されない形で到達するかどうかが問題とされるためである。現在、もっとも広く殺虫タンパク質として用いられているのは、*Bacillus thuringiensis* が有する *cry* 遺伝子から生産される Bt タンパク質である。この Bt タンパク質は、強酸性条件下でペプシンが作用すると数分以内にほぼ完全に分解されてしまうため、健常者が摂取しても腸に移行することはないと考えられている。しかし、消化管障害を持つヒトにおいては十分に消化されずに小腸に移行し、トリプシンによって消化されないため未消化のまま腸を通過してアレルゲンとして作用する可能性がある。当研究の目的は種々の消化管障害モデル動物を確立し、さらにその組換え遺伝子産物の安全性を評価することである。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

#### (1) 消化管傷害ラットモデルの確立

健常者が Bt タンパク質を摂取した際には、胃内の強酸性条件下でペプシンが作用して分解されてしまうため、腸に移行することはないと考えられている。しかし、胃酸分泌を低下させる抗潰瘍剤服用者や胃切除を受けたヒトについては、十分に消化されずに小腸に移行し、トリプシンによって消化されないため未消化のまま腸を通過してアレルゲンとして作用する可能性がある。また、腸に急性あるいは慢性の傷害をもつヒトにおいては、状況が更に複雑化する。本研究では、慢性消化管障害あるいは胃酸分泌低下ラットモデルを確立することを目的として検討を行った。

#### 1-1) 胃・小腸・大腸傷害物質の 1 週間連続投与 + 1 週間休薬による間歇投与実験 - 1

ラットの胃、小腸あるいは大腸に対する慢性障害モデルを確立するため、胃、特に幽門部に傷害作用をもつカテコール、主に小腸に対する傷害作用をもつインドメタシン、あるいは大腸に対する傷害作用をもつデキストラン硫酸を各々 F344 雄ラット 20 匹に 1 週間連続投与 + 1 週間休薬の 4 サイクルで間歇投与した。投与量および投与方法は、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%

濃度で基礎飼料に混じ、デキストラン硫酸については1.0%濃度で飲水に混じて投与した。インドメタシン群において、1サイクル目の投与期間中に20匹中4匹が死亡例したため、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。投与期間中の体重、摂餌量、摂水量を測定するとともに、4サイクル目の投与期間及び休業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を作製し、消化管障害の発生の程度を評価した。

### 1-2) 胃・小腸・大腸傷害物質の1週間連続投与+1週間休業による間歇投与実験-2

「1週間連続投与+1週間休業による間歇投与実験-1」においてインドメタシン0.015%投与群で過度の消化管障害による途中死亡例が発生したため、0.01%インドメタシンを同様のスケジュール、方法にてF344雄ラット10匹に投与した。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を作製し、消化管障害の発生の程度を評価した。

### 1-3) ファモチジンによる胃内pH調整実験

胃酸分泌能低下モデルとしてH2ブロッカーを用い、ラットの胃内pHの調整を行った。F344雄ラットを24時間絶食後、エーテル麻酔下で胃幽門部を結紮し(Shay's rat)胃酸分泌抑制薬であるファモチジンを10及び30mg/kg体重の濃度で腹腔内投与した。投与後3時間で胃を摘出し、胃液pHを測定した。

## (2) Btタンパク質の精製

遺伝子組換えトウモロコシにおいて*B. thuringiensis* subsp. *aisawai* および *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の導入遺伝子によって生産されるBtタンパク質生産を目的とした。一般的に遺伝子組換え食品に含まれるBtタンパク質は0.3~5 $\mu$ g/g穀粒新鮮重程度であるため、ラットに大量投与するためには、すべての餌をトウモロコシ穀粒にしなければならないが、栄養失調による健康被害が起こる。このため、Btタンパク質を大量生産、精製し、基礎飼料に混合する必要がある。Btタンパク質の大量生産のためには、*B. thuringiensis* 菌による大量生産および*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が考えられる。そこで、水相二層分配法により*Bacillus thuringiensis*培養液Btタンパク質を精製した。さらに*B. thuringiensis* 菌からBtタンパク質遺伝子を大腸菌発現性ベクターにクローニングし、その全塩基配列を決定した。

### 2-1) *B. thuringiensis* 菌の生育・溶菌とBtタンパク質結晶の産生

*B. thuringiensis* subsp. *aisawai* 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℃、210rpmで旋回培養した。

### 2-2) Btタンパク質結晶の精製

3週間培養してほぼ完全に溶菌した培養液を遠心し、Btタンパク質結晶および芽胞を沈澱させた。これに50mM NaClを加えて沈澱を懸濁し、遠心により沈澱させた。これを水に懸濁し、水層二相分配上層液(0.3g/ℓ sodium dextran sulfate T500, 70.3g/ℓ polyethylene glycol (PEG) 600, 17.5g/ℓ NaCl)を加えて混ぜ、水層二相分配下層液(100g/ℓ sodium dextran sulfate T500, 70g/ℓ PEG 6000, 26.3g/ℓ NaCl)を加えて、激しく10分間混合した。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)を吸い取った。その後、水層二相分配上層液あるいは水層二相分配下層液を交換しつつ激しい混合、静置を繰り返して、Btタンパク質結晶を含む水層二相分配下層液回収した。これに水を加えて遠心し、Btタンパク質結晶を沈澱させた。得られた沈澱に50mM NaClを加えて沈澱を懸濁し、遠心によって沈澱させ、洗浄した。これを水に懸濁し、精製Btタンパク質結晶とした。

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℃、5分間加熱した後遠心し、不溶物を除いた上清を透析チューブに入れ、50mM HEPES-KOH (pH 7.0)、10% Triton X-100に5時間透析し、さらに50mM HEPES-KOH (pH 7.0)、0.5% Triton X-100に一晩透析し、10mM HEPES-KOH (pH 7.0)に5時間透析し、10mM NaHCO<sub>3</sub>に5時間透析し、さらは一晩新たな10mM NaHCO<sub>3</sub>に透析した。透析チューブよりタンパク質溶液を取り出し、凍結乾燥を行った。完全に乾燥したタンパク質を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、Btタンパク質の含まれる画分をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって調べ、その画分を回収した。

### 2-3) 精製 Bt タンパク質の SDS-アクリルアミド電気泳動による精製度の検定

*B. thuringiensis* 菌体からのタンパク質の抽出液および精製 Bt タンパク質溶解液に 2 M 過塩素酸を加え、氷上に置き、タンパク質を析出させた。析出したタンパク質を遠心し、タンパク質を沈澱させた。沈澱したタンパク質に 1M NaOH を加え、攪拌してタンパク質を溶解させ、改変 Lowry 法によってタンパク質濃度を定量した。さらに、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。

### 2-4) *B. thuringiensis* 菌からの核 DNA の単離

*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* を LB-G 固体培地にストリークして培養し、得られた約 1mm の大きさのコロニーを楊子で掻き取り、GTC 液 (5 M グアニジンチオシアネート, 25 mM クエン酸三ナトリウム (pH 7.0), 140 mM  $\beta$ -メルカプトエタノール, 0.5% ラウロイルザルコシル) に懸濁し、溶菌させた。フェノールを加え、エッペンドルフ遠心管にて上下に震盪して均一化させた。これにクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加えて激しく震盪し遠心した後、水層を取り、これに 300  $\mu$ l のイソプロパノールを加え、穏やかに震盪した後、5 分間静置した。遠心によって DNA を沈澱させ、TE を加えて DNA を溶解した後、エタノール沈澱した。

### 2-5) *cryIAb* 遺伝子の単離とクローニング

*cryIAb* 遺伝子の塩基配列については Silva-Werneck et al. (Can. J. Microbiol. 45:464-471(1999)) によって発表されており、この塩基配列から 1st メチオンおよびストップ・コドンに対応する塩基配列を見だし、以下のプライマーを合成した; BT5Bam, ATAGGATCCGATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGC; BT5Nde, ATACATATGGATAACAATCCGAACATCAATGAATGC; BT3Xho, GTGCTCGAGTTCCTCCATAAGAAGTAATCCACGCT。PCR 反応液として、水で 100 倍に希釈した核 DNA 液 1  $\mu$ l, 10  $\times$  TaKaRa LA-Taq 緩衝液 2  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 混合液 2  $\mu$ l, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 液 2  $\mu$ l, 2 pmol/ $\mu$ l の BT5Bam もしくは BT5Nde 2.5  $\mu$ l, 2 pmol/ $\mu$ l の BT3Xho 2.5  $\mu$ l, 水 7  $\mu$ l を加え 19  $\mu$ l とした。98°C 1 分間加温した後、92°C に下げ、この状態でホールドし、0.1units/ $\mu$ l の LA-Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa Biochem 社) を加え PCR 反応 (92°C 30 秒  $\rightarrow$  58°C 45 秒  $\rightarrow$  72°C 3 分, 35 サイクル, 72°C 10 分,  $\rightarrow$  4°C) を行った。この PCR 反応液より常法に従いフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行なった。これに BT5Bam を 5'側のプライマーとしたものについては BamHI と XhoI を各々 20 units ずつ、BT5Nde を 5'側のプライマーとしたものについては NdeI と XhoI を各々 20 units ずつ加え、37°C 3 時間制限酵素処理を行った。また、同時に大腸菌発現性ベクターである pET-22b (Novagen 社) についても同上に BamHI と XhoI および NdeI と XhoI で 37°C 3 時間制限酵素処理を行った。反応終了後、エタノール沈澱を行い、TE を加えて DNA を溶解し、アガロース電気泳動で分離した。PCR によって増幅されたバンドおよび pET-22b のバンドの部分を切り出し、グラスミルク (BI0101 Systems 社) 法によって、アガロースゲルから DNA を回収し、さらにフェノール/クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い、最終的に TE に溶解した。DNA 量をアガロースゲルを用いて定量した。pET-22b に対し、モル比で 5 倍の PCR で増幅された DNA 断片となるように TE を加え、TaKaRa Ligation Kit var2 I 液を加え、16°C 30 分間反応させた。反応終了後、コンピテント・セルにトランスフォーメーションした。得られたコロニーから無作為に 10 コロニーを選び、2YT 培地 (50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む) に植菌し、一晚培養したものを改変ボーリング法によりプラスミドを抽出し、これを BamHI と XhoI もしくは NdeI と XhoI で切断し、アガロース電気泳動にかけ、インサートが含まれるクローンを確認した。

### 2-6) PCR で増幅した *cryIAb* 遺伝子の塩基配列の決定

インサートが確認されたプラスミド、Bt21 (BT5Bam プライマーと BT3Xho プライマーによって得られた DNA 断片をクローニングしたもの) および Bt27 (BT5Nde プライマーと BT3Xho プライマーによって得られた DNA 断片をクローニングしたもの) について、BamHI もしくは NdeI と XhoI とともに EcoRI, EcoRV, HindIII, KpnI, NspI, PvuII, SacI, SacII, XbaI を用いて制限酵素地図を作成した。この制限酵素地図をもとに、BamHI もしくは NdeI と EcoRV で得られる約 730 bp のフラグメント、EcoRV で得られる約 760 bp のフラグメント、HindIII で得られる約 760 bp のフラグメント、KpnI で切断した後に HindIII で切断することによって得られる約 600 bp と約 500 bp のフラグメント、HindIII で切断した後に XhoI で切断することによって得られる約 750 bp のフラグメント、SacI で切断した後に XhoI で切断することによって得られる約 2.2 kbp のフラグメント、XbaI で切断した後に XhoI で切断することによって得られる約 1 kbp と約 1.8 kbp のフラグメント、これらをアガロー

ス電気泳動で分離した後、グラスミルク法によって DNA フラグメントを回収し、これを該当する制限酵素サイトで切断した pBluescriptSK+ にクローニングした。なお、NdeI サイトは pBluescriptSK+ がないので、これについては T4 DNA ポリメラーゼを用いて fill-in 反応を行った後、pBluescriptSK+ の EcoRV サイトにクローニングした。これらについて、LI-COR DNA シーケンサーを用いて、T7 および T3 プライマーにより、両方向から塩基配列の決定を行った。

### (3) 消化管傷害モデルにおける Bt タンパク質の安全性評価

(1)で確立した小腸障害モデルとファモチジンによる胃酸分泌能低下モデルを組合わせたモデルを用いて、(2)で精製して得られた Bt タンパク質の安全性試験を行った。

#### 3-1) 小腸障害+胃酸分泌能低下ラットによる Bt タンパク質の短期経口投与毒性試験

「1週間連続投与+1週間休薬による間歇投与実験」において確立した小腸障害モデルを基礎として、0.008%インドメタシンを雄の F344 ラットに1週間連続投与し、1週間の休薬期間に毎日朝夕の2回ファモチジンを 30 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与した。インドメタシンの休薬期間（ファモチジンの投与期間）に Bt タンパク質を餌に混じり1週間の連続投与を2サイクル行った。Bt タンパクの濃度は、餌が全てトウモロコシ殻粒と仮定した際 Bt タンパク質が殻粒中に発現する重量に対する割合として 0.001%とした。投与期間中の体重、摂餌量を測定するとともに、投与期間終了時にはエーテル麻酔下で腹部大動脈より採血し、血液学的及び血清生化学的検査を行った。採血終了後動物を放血屠殺した後、諸臓器を肉眼的に観察し、脳、胸腺、肺、心臓、脾臓、肝臓、腎臓、副腎、精巣については重量測定後に、その他の臓器は摘出後常法に従って病理組織標本を作製し、病理学的検索を行った。

## 3. 研究成果

### (1) 消化管傷害ラットモデルの確立

胃傷害物質としてカテコール、小腸傷害物質としてインドメタシン、大腸傷害物質としてデキストラン硫酸を用いて、各慢性障害ラットモデルを確立した。また、胃酸分泌低下モデルを H2 ブロッカーであるファモチジンを用いて確立した。

#### 1-1) 胃・小腸・大腸傷害物質の1週間連続投与+1週間休薬による間歇投与実験-1

インドメタシン 0.015%群において、1サイクル目の投与期間中に20匹中4匹が死亡したため、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サイクル目の投与期間中に同群でさらに1匹が死亡例した。他の群での死亡例はみられなかった。

体重：インドメタシン群において体重が減少したが、1週間の休薬により回復傾向を示した。

摂餌量、摂水量：インドメタシン群で摂餌量及び摂水量が明らかに減少した。休薬期間中は各々回復傾向を示した。また、デキストラン硫酸群で投与1週目及び2週目に摂水量の増加がみられた。摂餌量あるいは摂水量から算出した0.5%カテコール群、0.015(0.01)%インドメタシン群及び1.0%デキストラン硫酸群における実平均投与量は各々、322, 4, 1600 mg/kg 体重であった。

剖検所見：インドメタシン群の死亡例では、空腸の穿孔/穿通及び小腸の線維性癒着がみられた。生存例においても小腸の線維性癒着がみられた。また、デキストラン硫酸群においては、結腸に軟便の貯留がみられた。

病理組織所見：カテコール群では投与期間終了後に胃の幽門部にびらん及び幽門腺過形成が認められた。インドメタシン群では空腸あるいは回腸において投与期間及び休薬期間終了後に穿孔/穿通性潰瘍がみられた。デキストラン硫酸群においても投与期間及び休薬期間終了後に結腸、特に下行結腸に炎症性細胞浸潤及び粘膜萎縮がみられた。

#### 1-2) 胃・小腸・大腸傷害物質の1週間連続投与+1週間休薬による間歇投与実験-2

実験期間を通して死亡例はみられなかった。

体重：インドメタシン 0.01%群において体重の減少が認められたが、1週間の休薬により回復傾向を示した。

摂餌量、摂水量：インドメタシン 0.01%群で投与期間中の摂餌量及び摂水量が明らかに減少したが、

休薬期間中は各々回復傾向を示した。摂餌量及び摂水量から算出したインドメタシン 0.01 群における実平均投与量は 5.5 mg/kg 体重であった。

剖検所見：インドメタシン 0.01%群において小腸の線維性癒着がみられた。

病理組織所見：インドメタシン 0.01%群において空腸及び回腸に穿孔/穿通性潰瘍がみられた。

### 1-3) ファモチジンによる胃内 pH 調整実験

胃内 pH を測定した結果、ファモチジンを投与しなかった対照群において  $1.1 \pm 0.4$  であったのに対し、ファモチジン 10, 30 mg/kg 群において各々  $3.8 \pm 0.5$ ,  $4.8 \pm 0.1$  であり、特に 30 mg/kg 群が 10 mg/kg 群と比較してより酸性度が高かった。

## (2) Bt タンパク質の精製

水相二層分配法によって、*Bacillus thuringiensis* 培養液 240 ml から約 93% 程度の精製度で 78.9 mg の Bt タンパク質を得た。さらに *B. thuringiensis* 菌から Bt タンパク質遺伝子を大腸菌発現性ベクターにクローニングし、その全塩基配列を決定した。

### 2-1) *B. thuringiensis* 菌の生育・溶菌と Bt タンパク質結晶の産生

*B. thuringiensis* 菌を 80 Mℓ の LB-G 液体培地 (500 Mℓ 三角フラスコ) に植菌し、30 °C, 210 rpm で巡回培養したところ、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り、その時点で、芽胞とともに Bt タンパク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 Bt タンパク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タンパク質を抽出し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によってタンパク質を分析したところ、培養 3 日目においては Bt タンパク質の蓄積量は非常に少ないのに対し、培養 21 日目の *B. thuringiensis* 培養沈澱物においては大量の Bt タンパク質が存在していることがわかった。

### 2-2) Bt タンパク質結晶の精製

培養 21 日目の *B. thuringiensis* 培養液から研究方法に記した水相二層分配法によって Bt タンパク質の結晶を精製した。その結果、芽胞などの不純タンパク質は水相二層分配法によってほとんど除去されたが、それでも若干の不純タンパク質が混在していることがわかった。デンスitom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、Bt タンパク質の精製度は約 93% であることがわかった。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 Bt タンパク質が得られた。さらに、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結果、ほぼ 100% に近いところまで精製できた。

### 2-3) PCR で増幅した *cryIAb* 遺伝子のクローニングおよび塩基配列の決定

pET-22b にクローニングするために、ペリプラズム輸送ペプチドを結合した形でクローニングするための BT5Bam プライマーと BT3Xho プライマー、ペリプラズム輸送ペプチドを除去した形でクローニングするための BT5Nde プライマーと BT3Xho プライマー、これらを用いて *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* から抽出した核 DNA をテンプレートとして PCR を行ったところ、*cryIAb* 遺伝子として期待される約 3.5 kbp の長さのバンドが得られた。この PCR 産物を各々の制限酵素で切断した後、pET-22b にクローニングし、10 コロニーずつピック・アップして、ミニプレップによってインサートを確認したところ、BT5Bam プライマーと BT3Xho プライマーを用いたものから 9 クローン、BT5Nde プライマーと BT3Xho プライマーを用いたものから 1 クローン、期待されるインサート長の DNA を含むクローンが得られた。前者の中から 1 クローンをピック・アップし、これを Bt21 とし、後者の 1 クローンを Bt27 とし、これらのプラスミドから BamHI もしくは NdeI と XhoI を用いてインサートを切り出し、これをさらに EcoRV, HindIII, KpnI, SacI, XbaI を用いて切断し、得られたフラグメントをサブ・クローニングしてその塩基配列を決定したところ、Bt21 について、アクセション番号 AF059670 として公開されている塩基配列 3,468 bp と比較したところ、133 番目の T が C に、1,882 番目の T が C になっており、さらに 3,435 番目の G が欠失していることがわかった。この 3,435 番目の G の欠失によってフレーム・シフトが生じ、His-tag に translation fusion されず、ストップ・コドンが入らないことが判明した。一方、Bt27 については AF059670 と比較したところ、1,291 番目の A が G に、1,882 番目の T が C になっていることがわかった。1,291 番目の A が G に変わる

ことよって、報告されているアミノ酸配列ではセリンであるところがグリシンに、1,882番目のTがCに変わることよって、フェニルアラニンがロイシンに変わっていることがわかった。

### (3) 消化管傷害モデルにおける Bt タンパク質の安全性評価

インドメタシンによる小腸障害モデルとファモチジンによる胃酸分泌能低下モデルを組合わせたモデルを用いて、*Bacillus thuringiensis* 培養液から精製して得られた Bt タンパク質の1週間混餌にて2サイクル投与した安全性試験を行った。Bt タンパク質の投与量は、餌が全てトウモロコシ殻粒とした際に飼料中に含有される Bt タンパク質の濃度として0.001%としたが、Bt タンパク質投与による影響は認められなかった。

#### 3-1) 小腸障害+胃酸分泌能低下ラットによる Bt タンパク質の短期経口投与毒性試験

体重：インドメタシン群及びインドメタシン+Bt タンパク群において体重の増加抑制が認められたが、1週間のインドメタシンの休薬により回復傾向を示した。Bt タンパク単独投与による体重変化は見られなかった。

摂餌量：インドメタシン群及びインドメタシン+Bt タンパク群において明らかに減少したが、インドメタシンの休薬期間中は回復傾向を示した。Bt タンパク単独投与による摂餌量変化はみられなかった。摂餌量から算出したインドメタシン群、Bt タンパク単独群及びインドメタシン+Bt タンパク群における各々の実平均投与量は5, 0.7, 6+0.8 mg/kg 体重であった。

剖検所見：インドメタシン群及びインドメタシン+Bt タンパク群の各々8匹中1匹に小腸の軽度の癒着がみられた。その他の群では明らかな変化は認められなかった。

臓器重量：明らかな群間の差はみられなかった。

血液学的検査：明らかな群間の差はみられなかった。

血液学的検査：著明な変化はみられなかった。

血清生化学的検査：Bt タンパク単独群、インドメタシン群及びインドメタシン+Bt タンパク群においてA/Gが対照群に対して有意に高く、インドメタシン+Bt タンパク群においては総蛋白が有意に低かった。Bt タンパク単独群及びインドメタシン+Bt タンパク群ではGOT値が有意に低い値を示した。

## 4. 考察

### (1) 消化管傷害ラットモデルの確立

消化管障害を有するヒトに対する食品中の組換え遺伝子産物の安全性評価を行うことを目的として、消化管障害ラットモデルの確立を試みるとともに、確立した消化管障害ラットにより Bt タンパク質の短期経口投与毒性試験を行った。

胃粘膜障害を誘発する化学物質として、幽門腺領域に潰瘍を発生させるカテコールを用いた検討を行った。0.5%カテコールの1週間混餌投与+1週間休薬を4サイクルの間歇投与実験において体重変化は認められず、80%の動物で幽門部のびらんがみられ、しばしば幽門腺過形成を伴っていたことから、カテコールの間歇投与が慢性胃障害モデルとして応用できるものと思われた。

小腸粘膜障害を誘発する化学物質として、インドメタシンを用いた検討を行った。インドメタシンを0.015%の濃度で1週間混餌投与+1週間休薬を4サイクルの間歇投与実験を行ったところ、1サイクル目の投与～休薬期間中に死亡例がみられたため、投与量を0.01%に減じたが2サイクル目で更に死亡例が発生した。これは投与1週目の重篤な消化管障害が原因と考えられたため、1サイクル目から0.01%の濃度での実験を再度試みた。その結果死亡例は発生しなかったものの、体重減少あるいは増加抑制が起った。摂餌量および摂水量の減少もみられたが、休薬期間では体重、摂餌量及び摂水量が共に回復傾向を示した。また、肉眼的に小腸の線維性癒着がみられ、病理組織学的には潰瘍がみられた。これらの結果から、0.01%インドメタシンの間歇投与は慢性小腸粘膜障害モデルとして応用するには過量であり、0.008%程度が適切と思われた。

大腸障害を誘発する化学物質として、結腸炎起因物質として知られているデキストラン硫酸を用いた検討を行った。デキストラン硫酸(MW36,000~44,000)を1.0%の濃度で1週間混水投与+1週間休薬を4サイクル行う間歇投与実験の結果、体重及び摂餌量の変化は認められなかったが、軟便及び下

痢がみられ、それに伴い摂水量は増加した。病理組織学的には下行結腸において炎症を伴う粘膜の顕著な萎縮がみられた。また、休業期間終了後は、炎症を伴う個体は半数程に減少した。これらの結果より、デキストラン硫酸の間歇投与は慢性大腸障害モデルとして応用できるものと思われた。

胃酸分泌能低下モデルとして H2 ブロッカーであるファモチジンを 10 及び 30 mg/kg 体重の用量で腹腔内投与し胃液 pH を測定したところ、対照群の平均 1.1 に対して各用量で 3.8 及び 4.8 を示したことから、30 mg/kg 体重程度のファモチジン投与により十分な胃酸分泌低下モデルが作製できることが示された。

## (2) Bt タンパク質の精製

*B. thuringiensis* において Bt タンパク質を生産させ、これから Bt タンパク質を精製することを考えたところ、水相二層分配法によって、*B. thuringiensis* 培養液 240 ml から 78.9 mg の Bt タンパク質を得ることができた。この点において、この方法は病態ラットに Bt タンパク質を大量摂取させる目的のために大量の Bt タンパク質を生産し、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、約 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タンパク質量は約 5 - 10 mg であるため、約 80 mg のタンパク質をすべて精製するにはアクリルアミド・ディスク・プレパラティブ電気泳動を 8 回行なわねばならず、これ以上の精製を行なうのは非常に労力と時間がかかることがわかった。そこで、次に精製のための His-tag を付加する形で *B. thuringiensis* 菌から PCR 法によって *cryIAb* 遺伝子をクローニングした。ペリプラズムに輸送されるタイプのコンストラクトについて、ランダムに選んだ 10 クローンのうち 9 クローンにおいてインサートが確認されたのに対し、大腸菌細胞内に発現蓄積されるタイプのコンストラクトについてはランダムに選んだ 10 クローンのうち 1 クローンにおいてのみインサートが確認されたにすぎなかった。これは Bt タンパク質が大腸菌細胞内で蓄積すると大腸菌にとって毒性が生じるために、インサートを含む大腸菌数が少なく、一方、これが大腸菌外のペリプラズムに蓄積される形においては、その毒性が回避されるためにインサートを含む大腸菌数が多くなったと考えられる。しかし、ペリプラズムに輸送されるタイプのコンストラクトについて、9 クローンのポジティブ・クローンの中からランダムに選んだ 1 クローンである Bt21 において、塩基配列の置換とともにフレーム・シフトが生じていた。アクセション番号 AF059670 の塩基配列 3,468 bp と比較して、1,882 番目の T と C の相違は Bt21 および Bt27 において共通に見られたことから、今回用いた *B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* 菌においては、この塩基配列が、AF059670 の塩基配列決定に用いられた菌と異なっていることがわかった。しかし、AF059670 と比較して、Bt21 における 133 番目の T と C の相違、Bt27 における 1,291 番目の A と G の相違、これらの相違は Bt21 および Bt27 特異的であることから、LA-Taq DNA ポリメラーゼの複製ミスによるものと考えられる。今回、このような Taq DNA ポリメラーゼの複製ミスを回避するため、TaKaRa 社の LA (Long & Accurate)-Taq DNA ポリメラーゼを用いたのであるが、複製ミスが生じていることがわかった。さらに Bt21 において生じていたフレーム・シフトは間違いなく LA-Taq DNA ポリメラーゼの複製の際のスリップ現象であり、運悪くフレーム・シフトしているものを選択してその塩基配列を決定してしまったものであり、他のクローンにおいては、フレーム・シフトしていないものが存在するものと考えられる。

## (3) 消化管傷害モデルにおける Bt タンパク質の安全性評価

Bt タンパク質が人工胃液で分解することが確認されれば、経口摂取した場合に腸へ移行することはないと考えられている。一方、ヒトにおいて消化管障害により胃酸分泌能が低下した場合には摂取した Bt タンパク質が十分に消化されないと考えられる。そこで、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目的で、確立した消化管障害モデルラットを用いて Bt タンパク質を混餌投与し、その影響を評価した。モデルとしては、まず Bt タンパクの吸収部位となる可能性が考えられる小腸の障害モデルを用いることにした。その際に、胃酸で分解されずに傷害された小腸に遺伝子産物が到達することを想定し、Bt タンパクの摂取期間は胃酸分泌抑制薬であるファモチジンを毎日朝夕の

2回腹腔内投与した。また、Btタンパクの濃度は、餌が全てトウモロコシ穀粒と仮定した際 Btタンパクが穀粒中に発現する割合を乗じて0.001%とした。投与時期はインドメタシンの1週間投与が終了した1週間の休薬期間とし、投与期間は2サイクルの合計14日間とした。体重においてインドメタシン投与による増加抑制がみられたが、Btタンパクの影響はみられなかった。摂餌量においても、インドメタシン投与期間中に減少したが、Btタンパク投与期には回復した。臓器重量においてもBtタンパクの影響は見られなかった。一方、血清生化学的検査において、インドメタシン群およびインドメタシン+Btタンパク群でA/G値が高く、インドメタシン+Btタンパク群で総蛋白量が低かった。また、Btタンパク単独群、インドメタシン群およびインドメタシン+Btタンパク群でGOTが低値を示した。A/G値の低下については、アルブミン値に変動が見られなかったことからグロブリン値の軽度の低下によるものと考えられたが、血液学的検査において白血球系パラメータに全く変化が見られず、その毒性学的意義は明らかではなかった。Btタンパク投与によるGOT値低下については毒性学的意義は小さいものと考えられた。今回の結果から、Btタンパクの経口摂取による明らかな影響は認められなかった。しかし、ファモチジン投与が朝夕1日2回であったことから、ラットの主な摂餌時間には胃酸分泌低下が十分ではなかった可能性も考えられるため、持続的な胃酸分泌低下モデルなどを用いた検討を行う必要があると思われた。また、Btタンパク質が十分に消化されないで小腸に到達し、さらに吸収されて組織内に分布しているか否かを明らかにするため、今後は特異抗体を用いた免疫組織化学あるいはELISA等を行う必要がある。更に、Btタンパク質がアレルゲンとして作用しているか否かを明らかにするため、血清中の免疫グロブリン及びヒスタミン値についても測定する必要があると考えられた。

## 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、胃に対する障害を持つカテコール、小腸に対する障害をもつインドメタシンあるいは大腸に対する障害をもつデキストラン硫酸を各々雄性F344ラットに1週間連続投与+1週間休薬の间歇投与を4サイクル繰り返すことにより、慢性消化管モデルを確立し得る結果が得られた。ファモチジンによる胃酸分泌能低下に加えてインドメタシンによる小腸粘膜障害を負荷したラットにBtタンパク質を1週間の2サイクル间歇混餌投与したところ、肉眼所見、血液学的検査および血清生化学的検査等の結果においてBtタンパク質による著明な変化は認められなかった。

## 6. 研究発表

荒川史博，小笠原健，小関良宏。ELISA法による食品中のアレルゲンタンパクの分析。日本食品化学学会第8回総会・学術大会（平成14年6月）。

## 7. 知的所有権の取得状況

該当なし。