

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

目 次

課題番号

20030933A KH51041	臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究	梨井 康 …… 1
934A KH51042	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	廣瀬 雅雄 …… 5
935A KH51043	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦 善治 …… 10
936A KH51044	細胞内脂質輸送系に着目した血清脂質改善薬の開発のための基礎的研究	最上 知子 …… 16
KH51045	粘膜インフルエンザワクチンの実用化に関する研究	佐多 徹太郎 …… 21
937A KH51046	日本人糖尿病感受性遺伝子に基づく脂肪細胞を分子標的とした糖尿病・肥満の予防及び治療薬の開発	門脇 孝 …… 24
938A KH51047	呼吸器及び腸管粘膜免疫をターゲットとする新しいワクチン開発のための基礎研究	竹森 利忠 …… 27
939A KH51048	ノーウォークウイルスの超高感度核酸定量システム、及びベッドサイド抗原検出システムの開発	武田 直和 …… 31
940A KH51049	ワクチン創製の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島 朝人 …… 38
941A KH51050	食品および環境中の食中毒原因菌の病原因子に対する免疫学的高感度検出法に関する研究	五十君 静信 …… 43
942A KH51051	安全なアジュバントを用いた粘膜ワクチンの開発に関する研究	後藤 紀久 …… 48
943A KH51052	リポソーム表面結合型抗原のアレルギー予防・治療への応用に関する研究	内田 哲也 …… 55
944A KH51053	肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究	岡部 信彦 …… 61
945A KH51054	PPAR α をターゲットとした生活習慣病予防薬の開発	片山 茂裕 …… 64
946A KH51055	感染症領域における先端的遺伝子診断技術の開発に関する研究	薄井 貢 …… 68
947A KH51056	乳幼児下痢症の原因ウイルス検出法に関する研究	西尾 治 …… 71
948A KH51057	可溶性ウイルス受容体等によるウイルス吸着阻止を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口 文広 …… 77
949A KH51058	EPA・DHA含有エステル交換構造脂質の体脂肪蓄積抑制効果に関する研究	斎藤 衛郎 …… 86
950A KH51059	エネルギー消費調節機構に立脚した生活習慣病予防薬に関する基礎研究	大坂 寿雅 …… 89
951A KH51060	遺伝子解析によるヒトエンテロウイルス同定の標準化	清水 博之 …… 93
952A		

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

研究要旨

胃底腺部分切除あるいは胃酸分泌抑制剤である H2 ブロッカー持続投与により胃酸分泌低下モデルラットを確立し、精製 Bt 蛋白質の 28 日間混餌投与毒性試験を実施した。その結果、今回確立したモデルにおいて Bt 蛋白質の 28 日間投与による毒性学的影響はないと判断された。

分担研究者

東京農工大学工学部 生命工学科 小関良宏
三栄源エフ・エフ・アイ株式会社 学術部 鈴木幸雄

A. 研究目的

組換え DNA 技術応用食品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蛋白質や除草剤耐性酵素蛋白質の物理的安定性および消化性が審査される。遺伝子産物である蛋白質の毒性については動物実験により確認されるが、アレルゲン性については評価法が確立されておらず、アレルゲンとしての感作が起こる小腸に未消化のまま移行するか否かが問題とされるためである。現在、もっとも広く殺虫蛋白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 蛋白質である。この Bt 蛋白質は、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消化されるため、健康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、抗潰瘍剤の服用あるいは胃切除術を受けた場合、胃内 pH は上昇して Bt 蛋白質の消化が不十分なまま腸に移行すると考えられ、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、ラット胃酸分泌低下モデルを確立し、Bt 蛋白質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、消化器に疾患をもつ病態者を含むより幅広いヒトに即した安全性評価が可能となる。また、試験に際しては、遺伝子組換え食品そのものを継続的に投与することによる栄養学的偏りを排除するため、精製蛋白質を基礎飼料に混じて投与した。

B. 研究方法

(1) *B. thuringiensis* 菌の大量培養と Bt 蛋白質結晶の精製および抗体の作成

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科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(10 g / ℓ バクトトリプトン, 5 g / ℓ イーストエキストラクト, 10 g / ℓ NaCl, 1 g / ℓ グルコース, 2.5 ml / ℓ 1 M NaOH 液, 15 g / ℓ 寒天末) にストリークし, 30 °C で培養した。得られたコロニーを 1 ℓ 三角フラスコに入れた 200 ml の LB-G 液体培地 100 本, 合計 20 ℓ に植菌し, 30 °C, 210 rpm で 21 日間旋回培養した。培養後, ほぼ完全に溶菌した培養液 20 ℓ を 8 本の 500 ml 遠心管に入れ, 10,000 rpm, 10 分間遠心し, Bt 蛋白質結晶および芽胞を沈澱させ, 培地を捨てた後の遠心管に残りの培養液を入れ, 同上の遠心により Bt 蛋白質結晶および芽胞を沈澱させて沈澱に積み上げ, すべての培養液を遠心して Bt 蛋白質結晶および芽胞を沈澱として回収した。各々の遠心管に 200 ml の 50 mM NaCl を加え, 沈澱を懸濁し, 4 本の遠心管にまとめ, 同上の遠心によって沈澱させた。さらに 4 本の遠心管に 100 ml の 50 mM NaCl を加え, 沈澱を懸濁し, 1 本の遠心管にまとめ, 同上の遠心によって沈澱させた。これを 100 ml の水に懸濁し, 500 ml 分液ロートに移し, これに 100 ml 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, 250 ml 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) を加えて, 激しく 10 分間混合した。混合後, 5 分間静置し, 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) をピペットで吸い取り, さらにキムワイプで細かい泡を吸い取った。フタを締め, 再び激しく 10 分

間混合した後、5 分間静置し、水層二相分配上層液の表面に生じる白濁した泡をピペットで吸い取り、さらにキムワイプで細かい泡を吸い取る操作を行なった。この操作を白濁した泡が生じなくなるまで、さらに5 回繰り返した。その後、水層二相分配下層液を分液ロートのコックを開けて回収し、水層二相分配下層液の半分を別の 500 ml 分液ロート 2 本に分注した。各々の分液ロートに 100 ml の水層二相分配上層液を加えて混合し、さらに 250 ml 水層二相分配下層液を加えてフタを締め、激しく 10 分間混合した。混合後、水層二相分配下層液を分液ロートのコックを開けて回収し、各々の分液ロートの水層二相分配下層液の半分を別の 500 ml 分液ロート 2 本に分注した。各々の分液ロートに 100 ml の水層二相分配上層液を加えて混合し、さらに 250 ml 水層二相分配下層液を加えてフタを締め、激しく 10 分間混合した。混合後、10 分間静置し、水層二相分配下層液を分液ロートから回収した。これに 3 倍容の水を加え、水層二相分配下層液を希釈した後、8 本の 500 ml 遠心管に入れ、10,000 rpm, 10 分間遠心し、Bt 蛋白質結晶を沈澱させた。さらにこの遠心管に希釈した水層二相分配下層液を入れ、同上の遠心によって残りの Bt 蛋白質結晶を沈澱を積み上げるようにして回収した。得られた沈澱に 400 ml の 50 mM NaCl を加え沈澱を懸濁し、同上の遠心によって沈澱させ、洗浄した。最後に 1 本の遠心管にすべての沈澱を 400 ml 50 mM NaCl に懸濁してまとめ、遠心によって沈澱させ、これを 100 ml の水に懸濁し、精製 Bt 蛋白質結晶とした。

この結晶懸濁液に 10 ml 10% SDS, 2 ml β -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 5 l の 50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 10% Triton X-100 に 5 時間透析し、さらに 5 l の 50 mM HEPES-KOH (pH 7.0), 0.5% Triton X-100 に一晚透析し、5 l の 10 mM HEPES-KOH (pH 7.0) に 5 時間透析し、5 l の 10 mM NaHCO₃ に 5 時間透析し、さらに一晚新たな 5 l の 10 mM NaHCO₃ 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 50 ml フタ付遠心管に入れ、液体窒素で凍結した。その後フタを緩め、凍結乾燥を行なった。完全に乾燥した蛋白質を秤量した。

Bt 蛋白質に対する抗体については、これとは別に大腸菌に *cry* 遺伝子を導入し大量発現させ、これを精製してマウスに免疫することによって抗 Bt 蛋白質抗体を得た。

(2) 胃酸分泌低下ラットモデルの確立

F344 雄ラットを用いた胃酸分泌低下モデルとして、胃底腺部分切除及び H2 ブロッカーであるファモチジン持続投与モデルを確立した。

2-1) 胃底腺部分切除

文献的には、ラット胃底腺の 2/3~3/4 を切除することにより、胃酸の酸度が無処置ラットの平均 48.1 に対して 7.7mEq/l まで低下することが報告されている (Tatsuta et al., Gastroenterology 72: 78-81, 1977)。本研究においては、原則的にこの文献に示された方法に準じて胃底腺切除を行った。6 週齢の F344 ラット (日本チャールズリバー) を 1 昼夜絶食後、エーテル麻酔下にて開腹して胃を露出した。噴門部より侵入する血管を結紮し、大弯側より胃底腺を 1/2~2/3 切除した後、断端を縫合した。手術後は 1 週間、飲水の代わりに経腸栄養剤であるラコール (大塚製薬) を与えて維持し、更に 1 週間基礎飼料である CRF-1 (オリエンタル酵母) を与えて回復させた後実験に供した。予備実験において、無処置ラット 3 匹及び回復期間の終了した胃底腺切除ラット 6 匹を 24 時間絶食後、エーテル麻酔下で胃幽門部を結紮し (Shay's pyloric ligation), 3 時間後に胃を摘出して胃液 pH を測定した。その結果、無処置ラットでは平均 1.4±0.4 であったのに対して、胃底腺切除ラットでは 4.3±0.8 で有意な (p<0.01) 胃液 pH の上昇が認められた。

2-2) ファモチジンの持続投与

H2 ブロッカーであるファモチジン (和光純薬) は ALZET 浸透圧ミニポンプ (DURECT, 米国) に 30µg/µl の濃度で充填して背部皮下に埋植することにより、最大 2.5µl/hr (最大 7~11 mg/kg 体重) で 28 日間持続投与を可能とした。予備実験において、無処置ラット 3 匹及び浸透圧ミニポンプの皮下埋植 7~28 日後に 24 時間絶食し、エーテル麻酔下で胃幽門部を結紮した (Shay's pyloric ligation) 3 時間後に胃を摘出して胃液 pH を測定した。その結果、無処置ラットでは平均 1.4±0.4 であったのに対して、胃底腺切除ラットでは 4.6±0.9 で有意な (p<0.01) 胃液 pH の上昇が認められた。

(3) 精製 Bt 蛋白質の胃酸分泌低下モデルラットにおける 28 日間混餌投与毒性試験

(2) で確立した胃底腺部分切除及びファモチジン持続投与モデルを用いて、精製 Bt 蛋白質の 28 日間混餌投与による毒性試験を行った。投与

した Bt 蛋白質の濃度は、餌が全て組換え作物（トウモロコシ穀粒）とした際、穀粒中に含まれる Bt 蛋白量をもとに 10ppm とした。投与期間中、毎週 1 回、体重及び摂餌量を測定した。投与終了時には深麻酔下で腹部大動脈より採血し、血液学及び血清生化学的検査、血中ガストリン、ヒスタミン濃度、Bt 蛋白質に対する IgE、IgG 抗体価測定を行った。採血後放血屠殺し、全身諸臓器を肉眼的に観察、摘出後、主要臓器の重量測定を行い、下記に示す臓器については常法に従って HE 染色標本を作製して病理学組織学的検索を行った。

病理組織学的検索対象臓器：肝臓、脾臓、腎臓、肺、膵臓、舌、心臓、大腿筋、リンパ節、唾液腺、脳、眼球、ハーダー腺、甲状腺、上皮小体、気管、食道、胸腺、皮膚、乳腺、副腎、下垂体、三叉神経、坐骨神経、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、尿道球腺、膀胱、鼻腔、脊髄、大腿骨、胸骨、骨髄

(4) 胃底腺部分切除ラットにおける Bt 蛋白質の分解、消化性の検討

(2) で確立した胃底腺部分切除モデル及び無処置ラット各 3 匹に対して 10ppm 濃度で精製 Bt 蛋白質を混じた飼料を 3 日間与えた。投与期間終了後、全ラットを深麻酔下にて放血致死させた後、胃、十二指腸、回腸から内容物を採取した。胃、十二指腸、回腸内容物及び 10ppm 濃度で Bt 蛋白質を混じた飼料につき、その重量に対して 2 倍量の SDS-サンプル緩衝液を加え、エッペンドルフ遠心管内でハンド・ドリルを用いてつぶして蛋白質を抽出した。これを 2 枚の SDS-アクリルアミド電気泳動にかけ、1 枚については CBB 染色を行い、もう 1 枚についてはドライ・プロット法によって分離した蛋白質を Nytran-P メンブレンに転写した。メンブレンをブロッキング液に入れ、2 時間室温で振とうした後、Bt 蛋白質を検出するため 1 次抗体として 5,000 倍希釈したマウス由来の抗 Bt 抗体を一晩反応させた。シグナルの検出には ECL 発光検出キットを用いた。

(倫理面への配慮) 動物の取り扱いは、国立医薬品食品衛生研究所の規定に基づいて行った。なお、動物の屠殺はエーテル深麻酔下、動脈からの脱血により行ない、動物へ苦痛を与えないよう留意した。

C. 研究結果

(1) *B. thuringiensis* 菌の大量培養と Bt 蛋白質結晶の精製

B. thuringiensis 菌を合計 20 l の LB-G 液体培地で培養することによって、約 670 mg の Bt 蛋白質を得ることができた。その精製度については平成 13 年度に 240 ml の小スケールで精製した場合とほぼ同様であった。

(2) 精製 Bt 蛋白質の胃酸分泌低下モデルラットにおける 28 日間混餌投与と毒性試験

精製 Bt 蛋白質の胃底腺部分切除及びファモチジン持続投与モデルラットによる 28 日間混餌投与による毒性試験を行った結果、以下の結果が得られた。

体重、摂餌量：いずれの群においても Bt 蛋白質投与による影響はみられなかった。

血液学的検査：胃底腺部分切除群では、手術時の出血等による影響と考えられる MCV、MCH、MCHC の低下がみられたが、Bt 蛋白質投与による影響はみられなかった。

血液生化学的検査：胃底腺部分切除及びファモチジン持続投与群では TG の低下が、胃底腺切除群では更に TC 及び ALT の低下がみられたが、Bt 蛋白質投与による影響はみられなかった。

血中ガストリン濃度：胃底腺部分切除及びファモチジン持続投与群において、胃酸分泌低下を示唆する血中ガストリン値の有意な ($p < 0.01$) 増加がみられた。

血中ヒスタミン濃度、Bt 蛋白質に対する IgE 及び IgG 抗体価：Bt 蛋白質投与による影響はみられなかった。

剖検所見：胃底腺切除群において、胃底腺の 1/2 ~ 2/3 部分切除が確認された。Bt 蛋白質投与による影響はみられなかった。

病理組織学的検索：胃底腺切除群において、手術による影響と考えられる胃の所見（肝臓への癒着、炎症性の細胞浸潤、前胃あるいは腺胃粘膜の増殖性変化）が認められた。Bt 蛋白質投与による影響はみられなかった。

(3) 胃底腺部分切除ラットにおける Bt 蛋白質の分解、消化性の検討

胃底腺部分切除ラット及び無処置ラットの胃、十二指腸、回腸内容物ならびに飼料中に含まれる Bt 蛋白質を検出するため、抗 Bt 一次抗体で反応後、二次抗体としてウサギ由来の抗マウス IgG 抗体を反応させ、さらにこれに三次抗体として検出用の HRP 結合抗ウサギ IgG 抗体を用いることにより 1 レーン当たり 0.1 ng の Bt 蛋白質の検出を可能とした。また、この時、

Bt 蛋白質以外に 85 kDa および 68 kDa のところに非特異的な 2 本のバンドが見られた。これらのバンドは、もっと高濃度の蛋白質量でウェスタンを行い、二次抗体として HRP 結合抗マウス IgG 抗体を用いて検出した時にも見られ、しかし一次抗体なしのコントロールでは見られなかった。従って、この非特異的な 2 本のバンドは今回用いた一次抗体である抗 Bt 蛋白質抗体自体の問題であることがわかった。

胃底腺部分切除ラット及び無処置ラットの胃、十二指腸、回腸内容物及び飼料中に含まれる Bt 蛋白質を検出した結果、飼料中の Bt 蛋白質は検出されたが、胃底腺部分切除ラットおよび未処理のラットの胃内容物については、検出限界以下となっていた。十二指腸、回腸の内容物に対しては、スミアに反応するバンドが見られ、これが Bt 蛋白質が検出されるバンド位置のところに重なってしまっているため、Bt 蛋白質が存在するかどうか判定できないが、胃においてすでに検出限界以下となっていることから、すでに胃で分解されてしまっているものと考えられた。

D. 考察

害虫に対する抵抗性獲得を目的として遺伝子組換え農作物に導入された *B. thuringiensis* の *cry* 遺伝子から生成される Bt 蛋白質の多くは、ヒトなど哺乳類が経口摂取しても胃内の強酸性条件下にペプシンが作用し、ほぼ完全に消化される (Okuniki et al., *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 43: 68-73, 2002)。しかし抗潰瘍剤の服用あるいは胃切除術により、胃内 pH は上昇して Bt 蛋白質の消化が不十分なまま腸に移行すると考えられ、その毒性あるいはアレルギー性が懸念される。本研究では、F344 雄ラットを用いて胃底腺部分切除あるいは胃酸分泌抑制剤である H2 ブロッカーの持続投与により胃酸分泌低下モデルを確立し、精製 Bt 蛋白質の 28 日間混餌投与毒性試験を実施した。

胃酸分泌低下モデルとしての確立を試みた胃底腺部分切除ラット及びファモチジン持続投与ラットの予備実験において、胃酸分泌低下の程度を確認する目的で胃液 pH を測定した。その結果、いずれのモデルラットにおいても無処置対照ラットと比較して有意な胃液 pH の上昇が認められ、胃酸分泌低下モデルとして確立したことを確認した。更に、精製 Bt 蛋白質を 28 日間

混餌投与した本実験でも、胃底腺部分切除ラット及びファモチジン持続投与ラットともに有意な血中ガストリン濃度の増加を示したことから、所期の胃酸分泌低下条件下にて実験を行ったことを確認した。

食品に含まれる組換え遺伝子由来の蛋白質の毒性試験を実施するにあたり、動物に一定量の蛋白質を摂取させるためにトウモロコシなど農作物自体を大量に与える場合には、栄養学的な偏りが実験の信頼性に影響を及ぼすことが懸念される。従って本研究においては精製 Bt 蛋白質を用いて実験を行った。投与した Bt 蛋白質の濃度は、餌が全て組換え作物 (トウモロコシ穀粒) とした際、穀粒中に含まれる Bt 蛋白質量をもとに 10ppm とした。

確立した胃酸分泌低下モデルラットを用いた精製 Bt 蛋白質の 28 日間混餌投与毒性試験を行った結果、体重、摂餌量、血液学的検査、血清生化学的検査、血中ヒスタミン濃度、Bt 蛋白質に対する IgE 及び IgG 抗体価、剖検所見及び病理組織学的所見のいずれにおいても Bt 蛋白質投与によると考えられる変化は認められなかった。従って、今回用いた胃底腺部分切除ラットモデル、ファモチジン持続投与モデルのいずれにおいても、Bt 蛋白質の 28 日間連続投与による毒性学的影響はないと判断された。

さらに、胃底腺部分切除ラット及び無処置ラットに精製 Bt 蛋白質 3 日間投与した後に採取した、胃、十二指腸、回腸内容物についてウェスタン法で Bt 蛋白質の検出を試みた。その結果、胃底腺部分切除ラット及び無処置ラットのいずれにおいても、胃の内容物において、検出限界以下であった。人工胃液、人工腸液を用いた研究において、Bt 蛋白質は人工胃液で消化されるが人工腸液では消化されにくいことが示されている。このことから考えると、胃底腺を部分切除したラットにおいて、胃液の分泌が減少することにより投与した Bt 蛋白質は未消化のまま胃で検出され、さらに腸液では消化されにくいことから十二指腸や回腸においても検出されると予測されたが、今回の結果では、すでに胃において検出限界以下にまで分解されていることが明らかとなった。但し、経口摂取された飼料以外の飲水により Bt 蛋白質が希釈された結果、検出限界以下になった可能性も否定できない。これらの可能性について明確にするには、より titer が高く、しかも特異性の高い抗体を作成し、さらに Bt 蛋白質の投与量を増やして検討する必要があると考えられた。

E. 結論

胃酸分泌低下モデルとして確立した胃底腺切除ラット及びファモチジン持続投与ラットを用いて精製 Bt 蛋白質の混餌投与による 28 日間毒性試験を実施した結果、検索したいずれの項目においても Bt 蛋白質投与による影響は認められなかった。従って、今回確立した胃酸分泌低下モデルにおいて、Bt 蛋白質の 28 日間混餌投与による毒性学的影響はないと判断された。

F. 研究発表

小野瀬淳一，今井俊夫，蓮村麻衣，上田誠，瀧澤保，広瀬雅雄：消化管障害モデルラットを用いた Bt 蛋白質の経口投与毒性試験．第 30 回日本トキシコロジー学会学術年会（平成 15 年 7 月）。

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

平成15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

健康寿命延伸・予防診断・治療法の開発に関する研究

平成16年9月30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