

「組換え DNA 植物由来食品の安全性評価の実施に関するカイトライン案」¹⁾はステップ 8 に、進められ、この中で、アレルキ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)特異的アレルキ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。このカイトライン案は、平成 15 年 7 月にローマで開催された Codex 総会で、遺伝子組換え食品の安全性評価のカイトライン(ftp://ftp.fao.org/codex/alnorm03/al03_34e.pdf)として採択されている。組換え食品及び食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになり、食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準が平成 16 年 1 月に作定された。

本分担研究では、アレルゲン性の評価方法の一層の検討 開発等を目的として、(1)アレルゲン予測の解析法の検討、(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及び食物アレルゲンの人工胃腸液による分解性の検討、(4)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討の4点をとりあげ、研究を進めている。(1)のアレルゲン予測の解析法の検討では、B細胞エピトープの相同性も考慮に入れた既存アレルゲンと新規アレルゲンの相同性に関するハイオインフォーマティク手法の導入を検討し、(2)の動物を用いるアレルゲン性の検討では、マウスを用いる経口感作の方法について数種の系統の差違、及び投与時の溶媒の差違について検討を行い、経口感作の効率の高い感作法について検討を行った。また、ILSI HESI (the Allergy and Immunology Institute of the International Life Science Institute) 主催の動物モデルの国際的validation試験に参画し、各研究室で共通の抗原（食物アレルゲンとして知られているタンパク質2種(ピーナッツアレルゲン(Arah2), β ラクト

グロブリン(BLG))と、食物アレルゲンとして知られていないタンパク質2種(RUBISCO, Potato acid phosphatase)を用いて、各研究室特有の方法での感作を行い、データを収集し、よい経口感作モデル動物を探索するという研究に着手した。(3)新規産生タンパク質及び食物アレルゲンの人工胃腸液による分解性の検討では、昨年度のILSI-HESI主催のSGF(人工胃液)を用いる国際的validation試験のまとめを行うと同時に、アレルゲンの分解性試験の一環として、体内分解産物と患者血清との反応性の検討を行い、どの程度の分子量の分解産物まで、モニターすべきかというデータを得るため、卵白中の主要なアレルゲンであるオホムコイト(OVM)の人工胃液による分解産物と患者血清との反応性を詳細に検討し、分解によるアレルゲン性の変化を検討した。(4)の患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討については、昨年同様、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キ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)タンパク質及び除草剤クルホネート(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。また、患者血清との反応性においてエピトープ部位を考慮した検討を行うために、1種の新規タンパク質(Cry1Ac)と1種の既知アレルゲン(ABA-1)につき、エピトープ部位の可能性が想定される6個の連続したアミノ酸からなるヘプチトを合成し、ELISAの阻害試験を行った。

B 研究方法

(1) アレルゲン予測の解析法の検討

ハイオインフォーマティクス手法では、大量かつ質の高いデータセットを用意し、それに基づいて分類 予測のアルゴリズムを開発する。このことからアレルゲンに関して2つの側面から研究を進めなければならない。

第1に、アレルゲン、非アレルゲンのデータセットを用意する。質の違ういくつかの種類(エピトープが定義されて

いるアレルゲン、エピトープが分かっているアレルゲン、エピトープを含んでいるがアレルゲン性を示さない非アレルゲン、現状で分かっているエピトープの配列を含まない非アレルゲン)が存在しているので、これらを分類し、データセットとする。また、アミノ酸配列の類似性が高いタンパク質ペアは立体構造的にも機能的にも似ているということが分かっているので、そのような類似タンパク質を多く含むデータセットを用いると、偏った規則性が導かれる可能性が高い。従って、本研究では類似性30%以上のデータに対しては、代表的な配列を一つだけデータセットに採用するようにした。用いたデータセットは図1のとおりである。

第2に、アレルゲンの判別アルゴリズムをどう構成するかということが最も重要な問題である。エピトープの分子認識を実際に計算できればもっともよいが、配列上の特徴からアレルゲンの判別するのがもっとも現実的である。現在分かっているエピトープ自体に特に強い傾向が見当たらないことから、エピトープのアミノ酸配列をモチーフとして、文字の検索が行われている。この場合も、短距離効果を重視する方法と長距離効果を重視する方法とがある。(1) エピトープ中の6残基ないし8残基を検索し、タンパク質のアレルゲン性を判定するのか短距離効果を考慮した場合のもっとも普通のやり方である。8残基で取ればセレクトイビティは高いがセンシティブティが低く、6残基では逆となる。そこで6残基で検索し、ポジティブデータに対して配列の疎水性等でさらに正解率を上げるということも行われている⁶⁾。

(2) 長距離効果としては、ターゲット配列とすべてのアレルゲンタンパク質とを比較し、80残基のウインドウで35%以上の配列相同性があれば、アレルゲンと判別するというのがかなりの成績を上げている。このことは、分子認識に関わる配列は一つのエピトープだけではないということを示唆している。実際、エピトープ一つの場合はアレルゲンになりやすく、複数のエピトープがあると強いアレルゲンになりやすい。

以上の事実から、私たちは図1のような流れで研究を計画している。まず、アレル

ゲンおよび非アレルゲンのアミノ酸配列に対して、現在分かっているエピトープの出現傾向を調べる。アレルゲンの一部を完全に判別できる出現頻度を決定する。次に現在分かっているエピトープ配列を含まないアレルゲンで同しような出現頻度を実現するような高頻度配列を解析する。これによってエピトープの候補を探索し、アレルゲン予測精度を向上させる。さらに、このような解析から非アレルゲンにおける高頻度配列とアレルゲン高頻度配列の特徴を調べることによって、アレルゲン性のメカニズムを解明する。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

W/Wv (c kit及びマスト細胞欠損)⁴⁾マウス7週齢を用いて、代表的食物アレルゲンである卵白アルブミン(OVA)、オホムコイド(OVM)、 β -ラクトグロブリンを抗原として経口感作を行った。抗原 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を行い、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。

7週齢の雌性BALB/cマウスを用いた研究では、OVAを溶解する溶媒について検討を加えた。OVAを1mg/匹の割合で5回/週、3週間経口投与して感作した。感作には、生理食塩液溶媒対照群(S)、生理食塩液を溶媒としたOVA群(OVA/S)、リノール酸/レシチン(4:1)混合液溶媒対照群(LL)、リノール酸/レシチン混合液を溶媒としたOVA群(OVA/LL)を設定した。また、OVA/LL群の一部には2回/週の頻度でサリチル酸ナトリウム(2mg/匹)を腹腔内投与した群(SA/OVA/LL)を設定した。

[実験1] 感作投与開始の3週間後に各群6匹について血清中の抗OVA抗体価を測定した。また、各群17~20匹について、それぞれの群の感作時と同様の溶媒を用いて調製したOVAを100mg/匹の割合で経口投与して惹起し、全身性アナフィラキシー症状の観察を行い、そのうちの各群6匹について血漿中ヒスタミン濃度の測定を行った。全身性アナフィラキシー症状は、無症状を0、立毛や鼻こすりを1、吐き気を2、

努力呼吸やチアノーゼを3、死亡(24時間以内)を4としてスコアをつけて、発症の頻度と強度を評価した。

[実験2] 前日にOVAの経口投与によって感作の成立を確認した動物を用いて、以下の実験を行った。LL群、OVA/LL群、SA/OVA/LL群の各群の一組(n=6)を経口、もう一組を静脈内投与により再惹起して全身性アナフィラキシー症状の観察および血漿中ヒスタミン濃度の測定を行った。また、再惹起を行わなかったLL群、OVA/LL群、SA/OVA/LL群を対照として、再惹起後の各群の消化管の変化を、肉眼的観察および組織学的検索により調べた。

また、ILSI-HESI主催の食物アレルギー動物モデルのvalidation試験に関しては、食物アレルゲンとして知られているタンパク質2種(ピーナッツアレルゲン(Arah2)、 β -ラクトグロブリン(BLG))と、食物アレルゲンとして知られていないタンパク質2種(RUBISCO(ribulose-bis phosphate carboxylase/oxidase)、Poteto acid phosphatase)の、BALB/cマウスへの腹腔内投与(25ug protein/匹、every 10 days, 4 times)並びにW/Wvマウスへの経口感作を開始した(1mg/匹、every day for 9 weeks)(表3)。

(3)新規産生タンパク質及び食物アレルゲンの人工胃腸液による分解性の検討

本年度は、人工胃液(SGF)による食物アレルゲンの分解性試験を更にすすめるために、分解後の断片と、患者血清中IgE抗体との反応性を検討する実験を取り入れた。具体的には、卵白中の主要なアレルゲンであるオボムコイド(OVM)の人工胃液による分解産物と患者血清との反応性を詳細に検討し、分解によるアレルゲン性の変化を検討した。SGFによる分解に関しては、SGF中のpepsin濃度は、0.076%とし、pepsinと基質タンパク質の比率3、0.3、0.03、基質濃度250 μ g/ml、pH2.0で0-60分、37 $^{\circ}$ Cで培養し、分解の程度をSDS PAGE(10-20% Tricine gel使用)後の蛋白染色にて確認した。患者血清との反応性を検討するために、SDS-PAGEでタンパク質を分離後、ニトロセルロース膜に電気的に転写し、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。

(4)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討としては、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気的に転写し、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。

また、患者血清との反応性においてエピトープ部位を考慮した検討を行うために、1種の新規産生タンパク質(Cry 1Ac)と1種の既知アレルゲン(ABA-1)につき、エピトープ部位の可能性が想定される6個の連続したアミノ酸からなるペプチドを合成し、ELISAの阻害試験を行った。ペプチドとしては、表6に示すKleterらの論文6)に、既知のアレルゲンとの相同性比較において、6残基での比較後、ポジティブデータに対して配列の疎水性親水性の検索等を行うTwo-track approachによって選ばれた3種のものを用いた。回虫ABA-1タンパク質の部分ペプチドEKQKEKについては、ABA-1を固相抗原とし、抗ABA-1IgE抗体を有する患者血清を用いるELISA法を行う際の阻害ペプチドとして用い、GNAAPQとGSTGITIについては、アリゾナイトスギ花粉抗原Cupa1を固相抗原とし、抗Cupa1抗体を有する患者血清を用いてELISAを行う際の阻害ペプチドとして用いた。なお、Cupa1抗原

と、新規産生タンパク質である害虫毒素 Cry1Ac の交叉反応性を調べるために、大腸菌から精製した Cry1Ac タンパク質も阻害抗原として用いた。

C 研究結果および考察

(1) アレルゲン予測の解析法の検討
まず、アレルゲンと非アレルゲンの配列にエピトープ配列を貼り付けた例が、図2である。図のグラフは、アミノ酸配列のヒドロハシープロットである。非アレルゲンの例ではエピトープ配列が存在する場合を示してある。非アレルゲンの場合のエピトープ配列付近は比較的疎水性が高いように見えるが、統計的にはそれほど大きい差はなかった。それよりもアレルゲンのアミノ酸配列はエピトープ配列が高頻度で存在している場合が多い。図2の例でもエピトープが高頻度で見られる。

アレルゲンのタンパク質の大きさは様々なので、出現するエピトープの割合を指標としてヒストグラムを取ったのが図3である。上の図は1~100%の粗いヒストグラム、下の図は1~10%の拡大したヒストグラムである。アレルゲンでは、高頻度のエピトープを反映して、エピトープ配列の全体に対する割合が非常に高いものがある。これに対して、非アレルゲンでは、すべてエピトープ配列の割合が5%以下であった。

この閾値を用いてアレルゲンと非アレルゲンの配列を判別してみると(表1)、全体の3分の1ではあるが、排他的にアレルゲンを判別できることが分かった。残りの大半は現在分かっているエピトープの配列が見当たらないアレルゲンで、実際にはまた分かっているエピトープの配列が含まれていると考えられる。

そこで今後の方針として、エピトープの見つかっていないアレルゲンの配列の中に高頻度の断片の配列を探索し、エピトープ候補配列を推定することを計画している。アレルゲンの中には高頻度にあり、非アレルゲンにはないかもしくは少ないような断片を探索するのである。次年度以降の課題としている。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

表3に、種々のマウスを用いてOVAを9週間経口感作により感作させた時の血液

中OVA特異的IgE及びIgG1抗体価の測定結果、並びに、ASA誘導後の血中ヒスタミン濃度の測定を行った結果を示す。用いたマウスの中ではここに示されているように、W/W^vマウスが最も抗体価の上昇の程度が大きかった。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^vマウスでは29,000程度と、顕著であった。W/W^vマウスにおいて、マスト細胞を有さないため、ASA後の血中ヒスタミン濃度上昇は観察されなかったが、血中のPAF濃度の上昇が観察された。

表4に、OVA、オボムコイト(OVM)、βラクトグロブリンをW/W^vマウスに経口感作を行った後の、抗原特異的抗体価の上昇をELISA法で測定した結果を示すが、OVMの抗体価の上昇は軽度であったが、βラクトグロブリンは、OVAに続く経口感作能を有していた。

次いで、BALB/cマウスを用いて、溶媒影響を調べた結果を示す。[実験1] 3週間の感作投与後にS群、OVA/S群、LL群では全く抗OVA IgG1抗体価が認められなかったのに対して、OVA/LL群(12±49)およびSA/OVA/LL群(47±39, p<0.05 vs LL群)においては抗OVA IgG1抗体価の上昇が認められた。経口惹起を行った結果(図4)、OVA/S群やOVA/LL群に弱い全身性アナフィラキシー症状である鼻こすりや立毛が認められ、OVA/LL群では2つの症状を併発する個体数が増加した。一方、SA/OVA/LL群には明らかに強い全身性アナフィラキシー症状であるチアノーゼや努力呼吸が認められ、そのうち1例は死亡した。また、半数の個体が2~4つの症状を併発し、症状の認められなかった個体は20例中2例であった。経口惹起30分後においてS群、OVA/S群、LL群では血漿中へのヒスタミンの放出は認められなかったのに対して(0.5~11.4 ng/mL)、OVA/LL群(0.5~449 ng/mL)およびSA/OVA/LL群(3.3~953 ng/mL)に放出量の多い個体が認められた。[実験2] 感作の成立を確認した動物を用いて異なる2経路で再惹起した結果(図5)、OVA/LL群およびSA/OVA/LL群において、静脈内惹起に比べて経口惹起で全身性アナフィラキシー症状の頻度および強度とも高かった。また、血漿中へのヒスタミンの

放出量も静脈内惹起に比べて経口惹起で高い傾向にあった(表5)。

再惹起後の消化管の変化を調べたところ、肉眼的観察では血管の明瞭化、腔の拡張といった所見が認められた。また、小腸の病理学的観察では絨毛の短縮、粘膜固有層における形質細胞やリンパ球の増加、粘膜固有層の毛細血管の拡張といった所見が認められたが、いずれも軽度の所見であった。これらの所見は惹起を行わない対照の組ではいずれの群においても認められなかった。肉眼的観察においては、経口惹起後の所見数かLL群2件、OVA/LL群5件、SA/OVA/LL群4件であったのに対して、静脈内惹起後の所見数はLL群0件、OVA/LL群0件、SA/OVA/LL群3件であった。

以上、食物アレルギーの動物モデルにおいて経口投与によって感作を成立させること、経口惹起によってアレルギー反応を誘導することは、モデルでの反応をヒトへ外挿する上で重要である。蛋白質抗原の通常の溶媒である生理食塩液に対して、リノール酸とレシチンの混合液を媒体として抗原を経口投与することによって、OVA/LL群に示されたように特異抗体価の上昇、血漿中へのヒスタミン放出および消化管の変化を伴う全身性アナフィラキシー症状を発現させることが可能となった。さらに、経口感作時にサリチル酸を併用したSA/OVA/LL群では反応が増強され、特に全身性アナフィラキシー症状においてはチアノーゼや努力呼吸、そして死亡といった重篤な症状を示した。これらのことから、SA/OVA/LL群は食物アレルギーモデルとなり得ると考えられた。

しかし、即時型アレルギー反応において重要な働きをする抗OVA IgE抗体価はELISAにおいてもPCA反応においても認められなかった。全身性アナフィラキシー反応はIgEノックアウトマウスにおいても認められることから、本モデルはIgEの関与しない反応である可能性が考えられた。一方、感作期間が3週間であることからIgE産生量自体が少ない可能性、感作投与後半に数例の動物の死亡が認められたことから感作期間中にIgEが消費されている可能性等も考えられた。また、LL群において若干の全身性アナフィラキシー症状が認められたか、これは使用した卵黄由来レンチ

ンに混入しているOVAを含めた蛋白質に起因しているものと考えられた。

一般的な動物試験における全身症状の発症は、静脈内に原因物質を投与した場合、最も強い反応が現れる。ASA試験の陽性反応を得るためのプロトコールでも、惹起時には抗原を静脈内投与し、全身性アナフィラキシー症状を観察する。これに反して、本モデル系では静脈内惹起に比べて、経口惹起での血清中へのヒスタミンの放出を伴う全身性アナフィラキシー症状の頻度および強度が明らかに高かった。また、惹起によって発現する消化管の所見も静脈内惹起に比べて、経口惹起で増加した。これらのことから、本モデル系では惹起による全身性アナフィラキシー症状の発現への消化管の関与が考えられた。

なお、動物モデルとして有用なイヌでのアレルギーモデルを確立することを目的に、幼若犬を用いてマウスと同様の実験系での検討を開始した。

(3) 新規産生タンパク質及び食物アレルギーの人工胃腸液による分解性の検討

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。SGFによる分解で、どの程度の断片まで、IgE抗体能を有するののかもまた、重要な情報となる。今回は、卵白アレルゲンOVMをとりあげた。OVMは、図6に示すように、分解を受ける前は、34-49kDaの分子量を示すが、SGFによる分解により、Fr 1 (23 5-2 8 5kDa)が生成し、次いで、Fr 2 (10kDa), Fr 3 (7kDa), Fr 4 (4 5kDa)が生成される。卵白患者血清24名分を用いて血清と、OVM抗原並びにその分解物との反応をウェスタンブロットで解析したが、患者血清の中には、低分子の断片(Fr 3やFr 4)と反応するケースもみられた(図6,表6)。低分子の断片に反応するIgE抗体を有する患者の場合、寛解しにくい傾向を有しており、人工胃液による分解性からアレルゲン性を評価する場合、断片の抗原性も考慮に入れた評価を行うことも必要であると思われる。

(4) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

今年度も、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20名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)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法で行ったが、陽性の血清は認められなかった。

次いで、エピトープ部位を考慮した検討を行うためにペプチドを用いて行った結果を図7,図8に示す。図7には、ABA-1を固相抗原とし、抗ABA-1IgE抗体を有する患者血清との反応の際に、ABA-1の部分ペプチド(EKQKEK)を阻害ペプチドとして用いたELISAの結果を示す。ELISAの阻害抗原として、ABA-1抗原そのものを用いた場合には、図に示すように、15nMから15 μ Mにかけて、用量依存性の抑制を示すが、ペプチドで阻害をかけても150 μ Mまで、全く阻害効果は見られなかった。ここには、1人の患者血清を用いて行った結果を示しているが、他の5名の回虫に対するIgE抗体を有する患者血清を用いても同様の結果がえられたため、このペプチド部位単独では、ABA-1抗原の中でのB細胞エピトープを形成していないものと考えられた。次いで、図8には、Cup a1を固相抗原として、抗Cup a1抗体を有する患者血清との反応の際に、Cup a1の中で、Cry1Acと同一性を有する2種の合成ペプチドを共存させ、ELISA阻害実験を行った結果を示す。対照として、Cup a1を阻害抗原として用いた場合には、0.05nMから50nMと低濃度で、用量依存性の阻害がかかるが、2種のペプチドを共存させても、50 μ Mでも全く阻害は認められなかった。他の5名のアリソナイトスキ患者血清を用いても、同様の結果が得られた。従って、この6残基のペプチド部位単独では、ABA-1抗原の場合と同様、B細胞エピトープを形成していないものと考えられた。なお、阻害抗原として、Cry1Acを用いた場合、高濃度(50nM)でも阻害が認められなかったことより、Cup a1とCry1Acとの交叉反応性も観察されなかった。

D. 結論

(1) アレルゲン予測の解析法の検討
B細胞エピトープの同一性も考慮に入れた既存アレルゲンと新規アレルゲンの同一性に関するバイオインフォーマティクス手法の導入を検討した。アミノ酸の疎水性、親水性だけでなく、エピトープの出現頻度も考慮にいった方法の有用性が示された。

(2)動物を用いるアレルゲン性の検討
マウスを用いる経口感作の方法について数種の系統の差違、及び投与時の溶媒の差違について検討を行った。経口感作モデルとして、W/Wv マウスが最も感受性が高いこと、また、BALB/c マウスを用いた経口感作で、経口惹起を行わせたと、サリチル酸の併用下、リノール酸とレシチンの混合液を溶媒として脂溶性を高めると、全身性アナフィラキシー症状の発現とそれに伴う消化管の変化が認められたことから、即時型の反応を示す食物アレルギーモデルとして利用できることが示唆された。

(3)新規産生タンパク質及び食物アレルゲンの人工胃腸液による分解性の検討
オボムコイトの人工胃液による分解産物と患者血清との反応性を詳細に検討し、分解によるアレルゲン性の変化を検討し、低分子の7kDa, 4 5kDaの断片に対しても、一部の患者のIgE抗体の結合が確認された

(4)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

1種の新規タンパク質(Cry 1Ac)と1種の既知アレルゲン(ABA-1)と患者血清との反応においてエピトープを考慮に入れた試験を行うために、6個の連続したアミノ酸の合成ペプチドによるELISAの阻害試験を行ったが、今年度合成したペプチドでの阻害はかからなかった。

E 参考文献

- 1) <http://www.mhlw.go.jp/topics/idsenshi/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, MD (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)
- 6) Kleiter GA, Peijnenburg AA, Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE-binding linear epitopes of allergens, *BMC Struct Biol* 2, 8 (2002)

F 研究発表

1 論文発表

- 1) Takagi K, Teshima R, Okunuki H and Sawada J Preheating increases the *in vitro* digestibility of several food allergens *Biol Pharm Bull*, 26(7), 969-973 (2003)
- 2) 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*, 44(2), 77-82 (2003)
- 3) 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)
- 4) Okunuki H, Teshima R, Harikai N, Sakai S, Akiyama H, Maitani T, Sawada J Oral sensitization of W/W(v) mice with Ovalbumin and possible involvement of the decrease in gammadelta-I cells *Biol Pharm Bull*, 26(9), 1260-1265 (2003)
- 5) 手島玲子、食物アレルギーの実験モデルとアレルギー性評価 *ImmunoTox Letter* 8(2), 9-10 (2003)
- 6) 新藤智子、金澤由基子、斎藤義明、臼見

- 憲司、小島幸一、手島玲子、経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル *ImmunoTox Letter* 8(2) 14 16 (2003)
- 7) Thomas, K, Teshima, R et al, A Multi-Laboratory Evaluation of a Common *In Vitro* Pepsin Digestion Assay Protocol Used in Assessing the Safety of Novel Proteins *Regulatory Toxicol Pharmacol* 39(2), 87-98 (2004)

2 学会発表

- 1) 第10回免疫毒性学会学術大会「食物アレルギーの実験モデルとアレルギー性評価」手島玲子 (2003 9)
- 2) 第10回免疫毒性学会学術大会「経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(1)」金澤由基子、新藤智子、斎藤義明、臼見憲司、小島幸一、手島玲子 (2003 9)
- 3) 第10回免疫毒性学会学術大会「経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(2)」新藤智子、金澤由基子、斎藤義明、臼見憲司、小島幸一、手島玲子 (2003 9)
- 4) 第53回日本アレルギー学会総会「W/Wv マウスにおけるOVA経口感作によるASA誘導とγδ T細胞について」手島玲子、奥貫晴代、澤田純一 (2003 11)
- 5) 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、穠山浩、米谷民雄、澤田純一 (2003 3)
- 6) 日本薬学会第124年会「組換え食品中の新規蛋白質と患者血清の反応性評価法に関する研究」高木加代子、奥貫晴代、手島玲子、澤田純一 (2004 3)
- 7) 日本薬学会第124年会「W/Wv マウスにおけるCpG oligodeoxynucleotide OVA経口感作による影響」奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、澤田純一 (2004 3)
- 8) 第76回日本生化学会大会「Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragment」高木加代子、手島玲子、奥貫晴代、伊藤さつき、川崎ナナ、川西徹、早川堯夫、澤田純一 (2003 10)
- 9) 第76回日本生化学会大会「Oral sensitization of W/Wv mice with ovalbumin and

possible involvement of the decrease in
TCR $\gamma\delta$ -T cells」奥貫晴代, 手島玲子, 佐藤
雄嗣、穉山浩, 米谷民雄, 澤田純一(2003 10)
10)お茶の水女子大生活環境センター—
食の安全性に関するシンポジウム part 1—
「遺伝子組換え食品とアレルギー」手島玲
子 (2003 12)
11)日本食品衛生協会シンポジウム—食品
の安全研究をめぐって—「組換えDNA食品
の安全性」手島玲子(2004 1)
12) 41st congress of the European Societies of

Toxicology , A multi-laboratory evaluation of
a Common in vitro pepsin digestion assay
protocol used in assessing the safety of novel
proteins, Esdaile D J et al (2003 9)
13)ILSI HESI/ILSI Japan タンパク質のア
レルギー誘発性に関するワークショップ
「人工胃液によるタンパク質の消化性—
ILSI-HESIリングスタディーの結果—」手
島玲子(2003.9)

図1 アレルゲン判別ツール開発に用いるデータセット

アレルゲンおよび非アレルゲンのタンパク質のデータセット

(1) Epitope エピトープ配列を含むタンパク質 16個

以下のデータベースからエピトープ配列をもつアレルゲンタンパク質を抜き出し、エピトープ配列がアミノ酸配列と合致したもののみを抽出。重複データは除いた。

※()内はエピトープ情報をもつタンパク質データの数。

SDAP (20 allergens)
Allergen Database (25 allergens)
PROTALL (11 allergens)

(2) アレルゲンタンパク質データ 779個

以下のデータベースからアレルゲンタンパク質データを得、Fragment 配列を除去、冗長性(配列相同性 100%)を除いた。※()内は非フラグメントであるアレルゲンタンパク質数。

SDAP (735 proteins)
Allergen Database (1119 proteins)
SwissProt allergen.txt (258 proteins)

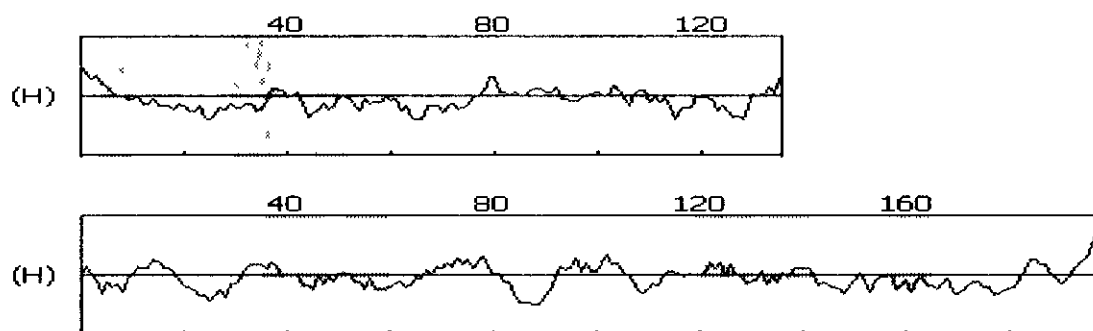
(3) 非アレルゲンタンパク質データ 539個

以下の論文から非アレルゲンタンパク質データを得、Fragment 配列を除去、冗長性(配列相同性 100%)を除いた。

Prediction of food protein allergenicity a bioinformatic learning systems approach In Silico Biology 2, 0048(2002)

図2 エピトープ配列の出現傾向の例

(1) アレルゲンタンパク質のアミノ酸配列とエピトープ配列 (色付けの領域)



(2) 非アレルゲンタンパク質のアミノ酸配列とエピトープ配列 (色付けの領域)

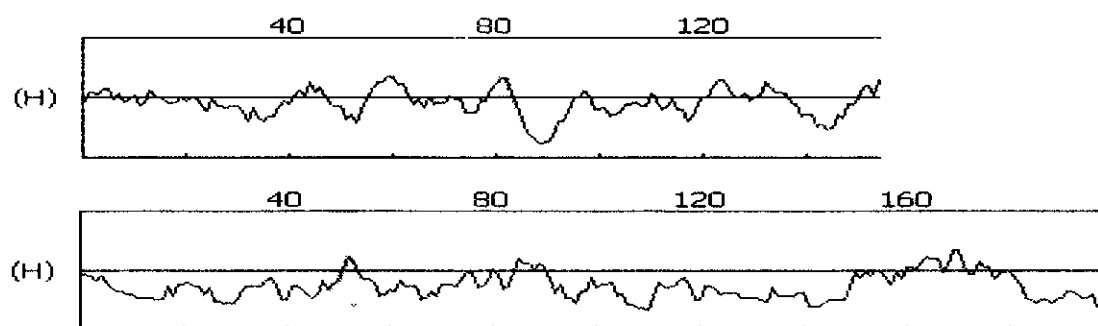


図3 アレルゲンと非アレルゲンにおけるエピトープ配列の割合

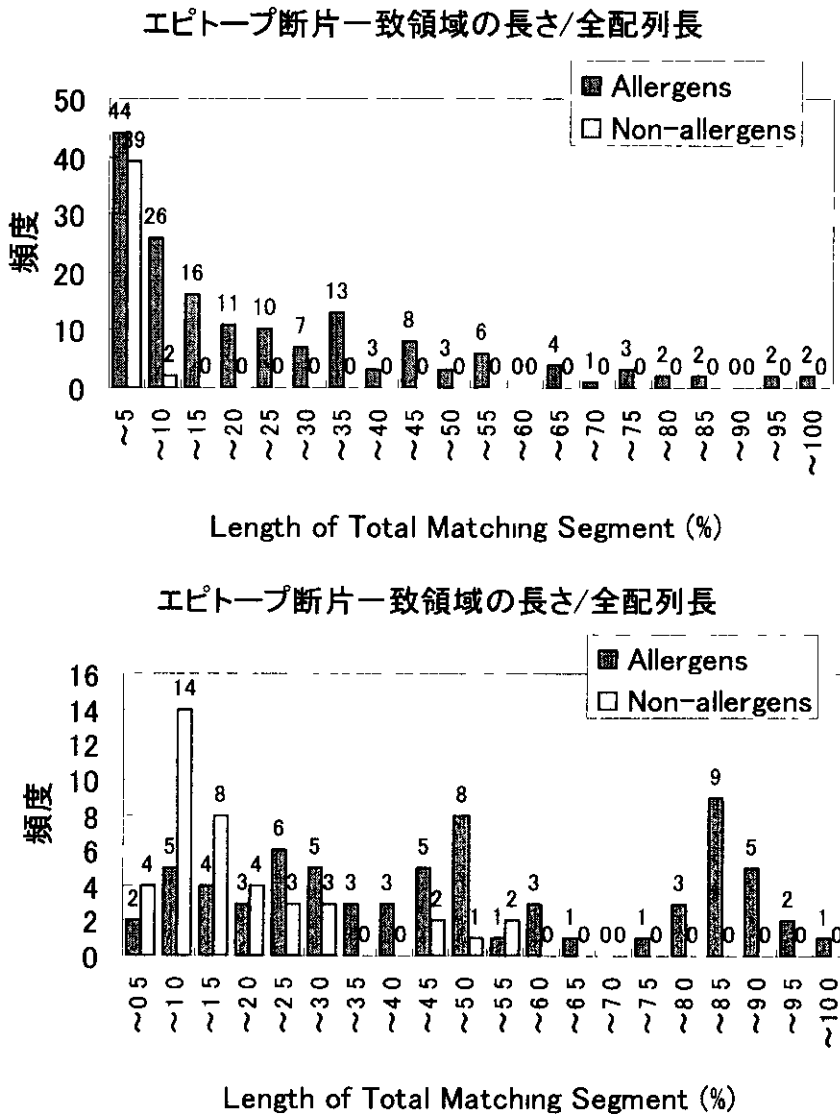


表1 エピトープ配列の割合55%で判別した

	一致領域長 \geq 55%	一致領域長 $<$ 55%	一致領域長=0%	Total
アレルゲン	261 (33.5%)	58 (7.4%)	460 (59.1%)	779
非アレルゲン	0 (0.0%)	43 (8.0%)	496 (92.0%)	539

表 2 ILSI-HESI の動物モデル検討のための validation 試験に用いられている
タンパク質

標準タンパク質	(1) アレルゲン性のあるもの AraH1, AraH2* (peanut) β-lactoglobulin* (11) アレルゲン性のないもの RUBISCO* Soy lipoxygenase*
投与量及び投与頻度	各ラホテ独自の感作を行う (7 機関)

*現在当所でマウスに感作中のタンパク質

表 3 種々のマウスの OVA 経口感作能の比較

Mice	OVA-IgE		OVA-IgG1		Histamine	
	0.1mg/day	1.0mg/day	0.1mg/day	1.0mg/day	0.1mg/day	1.0mg/day
ASK	+	±	++	±	++	±
B10A	+++	+	+++	++	+++	++
BALB/c	+	+	++	±	++	±
NC/Nga	+	++	++	+++	±	++
IFN-γKO	±	±	+	+	+	+
W/Wv	+	++	+++	++++	n d	n d

表 4 経口投与による抗原特異的抗体価(W/Wv マウス使用)

Antigen (1mg p o)	IgE	IgG1
Ovalbumin	274 ± 310	39407 ± 18120*
Ovomucoid	<50	183 ± 202
β-lactoglobulin	86 ± 43	3900 ± 4817

* Average ± SD
ELISA での測定結果 (n=10)

表5 惹起経路が血漿中へのヒスタミン放出へ与える影響

惹起経路	血漿中ヒスタミン濃度 (ng/mL)		
	LL	OVA/LL	SA/OVA/LL
経口惹起	3.2~14.0	3.9~10.92	4.0~32.6
静脈内惹起	1.9~29.2	6.0~30.0	4.0~24.4

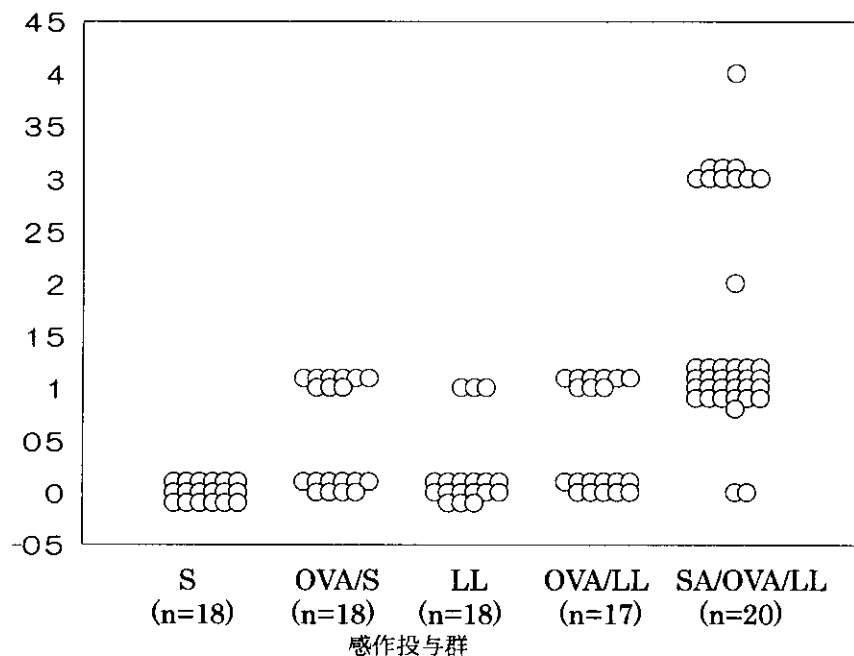


図4 経口感作および経口惹起によって発現した全身性アナフィラキシー症状

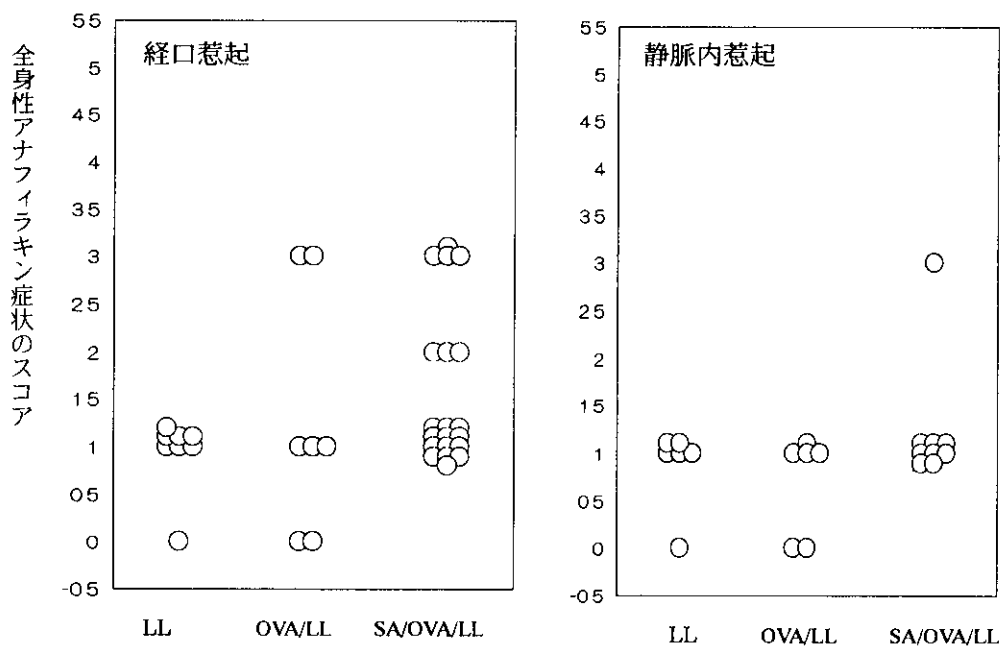


図5 全身性アナフィラキシー症状の発現における経口惹起と静脈内惹起の比較

图 6

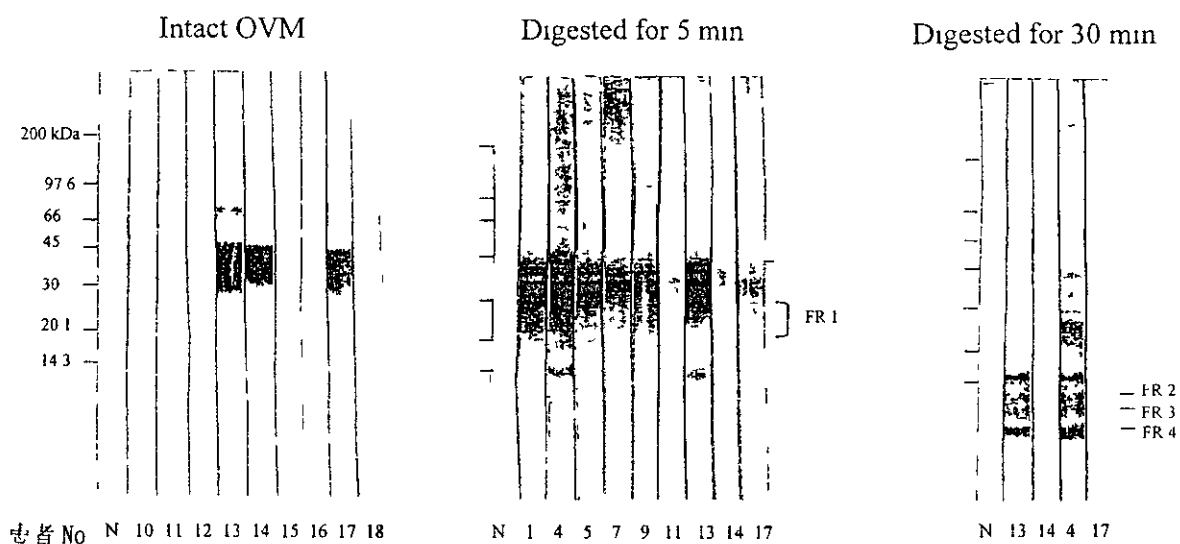


表 6 Reactivity of allergic sera with OVM and pepsin fragments by Western blotting

No	IgE content (IU/ml)		reactivity with OVM and fragments				
	total	egg white specific	intact OVM	FR 1	FR 2	FR 3	FR 4
1	3700	>100	+++	++			
2	402	3.74	+	nd ¹	nd	nd	nd
3	251	6.85	+	nd	nd	nd	nd
4	6510	>100	+++	+++	+	+	++
5	2060	>100	++	++			
6	1240	12.4	++	nd	nd	nd	nd
7	4180	31.3	++	++	-	-	-
8	56	20.1	±	nd	nd	nd	nd
9	1355	50.7	++	++		-	
10	22810	2.11	+	nd	nd	nd	nd
11	1463	4.65	+	-	-		-
12	14230	2(score)	±	nd	nd	nd	nd
13	8000	>100	+++	+++	+	+	++
14	22490	1.05	+++	±	-		
15	934	66.3	+	nd	nd	nd	nd
16	345	20.1	+	nd	nd	nd	nd
17	1500	80	++	+	-		
18	3300	>10		nd	nd	nd	nd
19	20500	26.8	+++	++	±	±	±
20	138	45.4	++	+	-		
21	940	2.44	+	+	-		
22	91	2(score)	+	±	-		
23	828	0.9	++	+	-		-
24	21	3(score)		nd	nd	nd	nd
positive/tested			22/24 ² (92%)	13/14 ³ (93%)	3/14 ³ (21%)	3/14 ³ (21%)	3/14 ³ (21%)

*1 nd not done

*2 egg white positive samples

*3 intact OVM positive samples

表7 今回の実験に用いた6mer アミノ酸配列

アミノ酸配列	該当タンパク質	この配列を含むGM植物	既知アレルケンの名前	既知アレルケンの由来生物
EKQKEK	コットンバク質 (ウイルス殻タンパク質)	リングスポットウイルス 抵抗性ハハイ7 (55-1, 63-1)	ABA-1	カイチュウ
GNAAPQ- GSTGITI	殺虫遺伝子 Cry1Ac	Bt 綿	Cup a1 Jun a1 Jun c1 ABA-1	スキ花粉 ヒノキ花粉 ヒノキ花粉 カイチュウ

図7 Anti-ABA-1 ELISA Inhibition

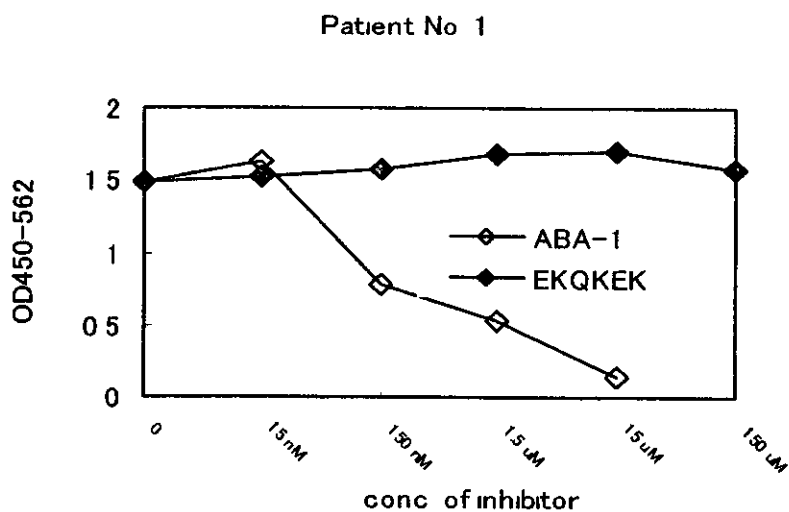
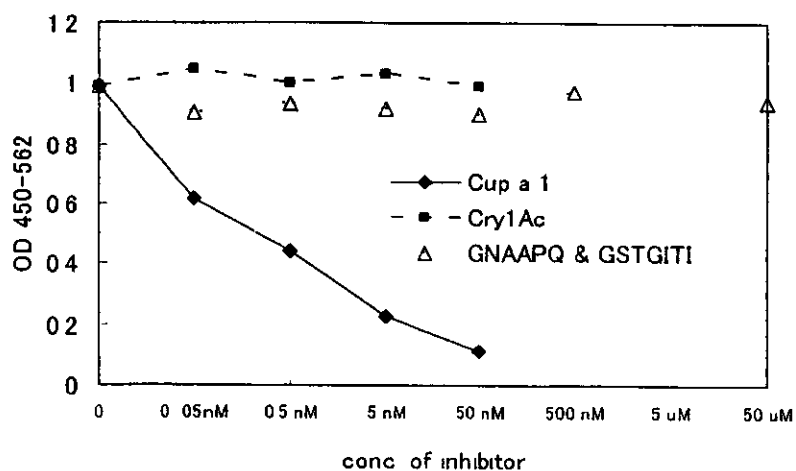


図8 Anti-Cup a 1 ELISA Inhibition



厚生労働科学研究費補助金（食品安全確保研究事業）
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的要望に対する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購入し、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、カビ毒の分析、遺伝子非組換えトウモロコシの遺伝子検査を行い、これらを飼料に添加し、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、F344/Ducry (SPF)ラット雌雄各群 60 匹に 2 年間投与し、体重と摂餌量を測定するとともに、1 年目に各群 10 匹を対象に、血液学、血液化学検査等を行った。引き続きこれらの病理組織学的検査を行い、2 年目には残存する動物を対象に、同様の検査を行う。

1 年目までの検査結果では、遺伝子組換えトウモロコシを摂取したためと考えられる毒性学的異常所見は観察されていない。

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、国民的要望に対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、斉藤実、松島裕子、
山本雅也（国立医薬品食品衛生研究所毒性部）

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、ダイスは脱脂ダイス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。

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、生し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、取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

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。また、カビ毒等の既知毒性成分の分析を行った。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 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、遺伝子組換え大豆の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、問題とならないことを確認した。

飼料中の総トウモロコシの配合量を合計して 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 のみを配合した。

この配合による飼料を用いて、F344/Ducrlj (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 年目に各群 10 匹を対象に、血液学、血清生化学的検査等を行った。今後、1 年目の対象動物の病理組織学的検査を行うとともに、2 年目には残存する動物を対象に、同様の検査を行う。

(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

上記組成による 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、68 週が経過した。雌雄の全動物に一般状態の異常は見られていない。

途中死亡の発生状況は、35 週で雄 H 群 1 例、45 週で雌の対照群 1 例、51 週で雄 L 群 1 例、61 週で雄 M 群 1 例、67 週で雌 L 群 1 例であった。51 週の雌 M 群 1 例は採尿時の事故負傷のため、67 週雄の対照群 1 例は門歯の嚙合異常により摂餌困難に陥り衰弱したため屠殺し、実験より除外した(表 1)。

体重では(図 1 と 2)、雄各群および雌の L・M 群の体重は対照群との間に差がなく、雌の H 群では 4 週から 52 週において対照群との間に有意の差が認められたが、その後有意差は消失した(68 週観察時点まで有意差は見られていない)。摂餌量は、大きな差は観察されていない。

尿検査(表 2)において、雌雄の各群に対照群との間に差はなかった。

1 年目(52 週)検査の血液学的検査(表 3 と 4)では、雌の H 群の MCH および MCHC に有意の高値が見られたが、赤血球数系の指標におけるヘモグロビンの高値が反映されたもので、毒性学的に問題となるものではなかった。

血清生化学的検査(表 5 と 6)では、雌雄の各群に対照群との間に差はなかった。

剖検所見(表 7)では、雄の対照群と M 群に片側性の精巣の浮腫および精巣上体の萎縮、雌の M と H 群の肝臓に黄白色斑、雌の対照群の腎臓に白色結節、雌の全群の卵巣に卵巣嚢腫、雌の子宮では L 群にのう胞、M 群に肥大、雌の対照群の下垂体に血腫、雌の L 群の甲状腺に肥大が認められた。

器官重量(表 8 と 9)において雄の各群に対照群との間に差は見られないが、雌では対照群に対して H 群の脳、肝臓および脾臓の実重量に低値、M 群の脾臓の実重量、L および M 群の肝臓および脾臓の比重量にわずかながら有意の低値が見られた。しかし、H 群の脳、肝臓および脾臓の実重量における有意の低値は比重量においては見られなかった。

D. 結論

被験物質として遺伝子組換えトウモロコン (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、およびカヒ毒等の既知毒成分、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、いずれも問題となら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。

一般状態、体重、摂餌量、1 年目(52 週)の尿、

血液学、血清生化学的検査あるいは器官重量などのデータからは、遺伝子組換えトウモロコシを摂取させたことによると思われる影響は現段階では観察されていない。途中死亡の発生状況については例数が少ないため、今後例数の集積を行った後、剖検所見については病理組織学的検査を行った後に解析を行う予定である。

遺伝子組換えトウモロコン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、国民的要望に対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

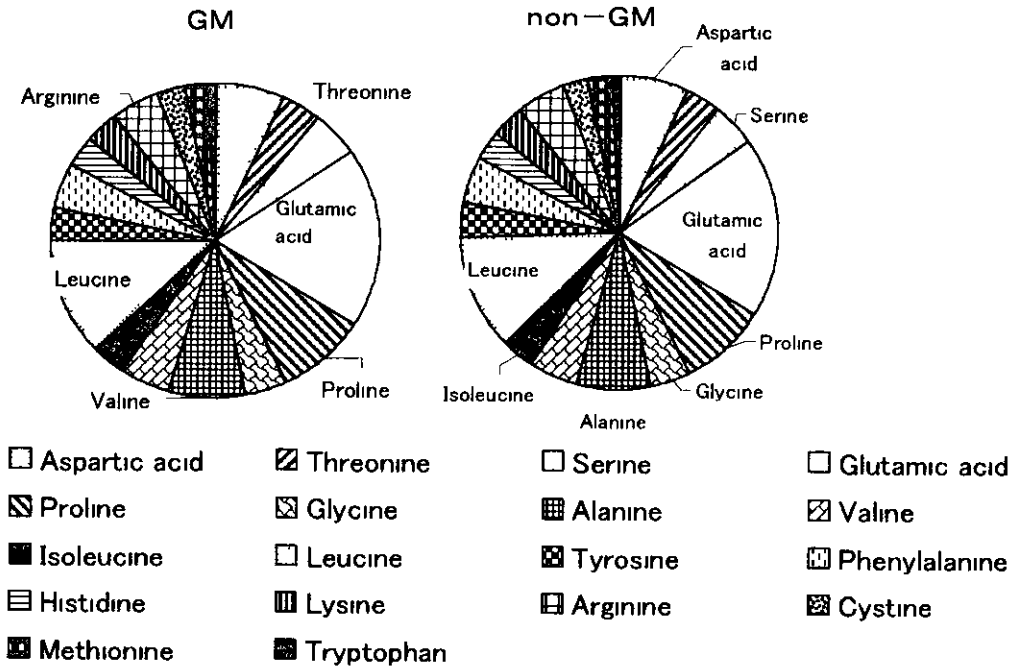
F 研究発表

なし

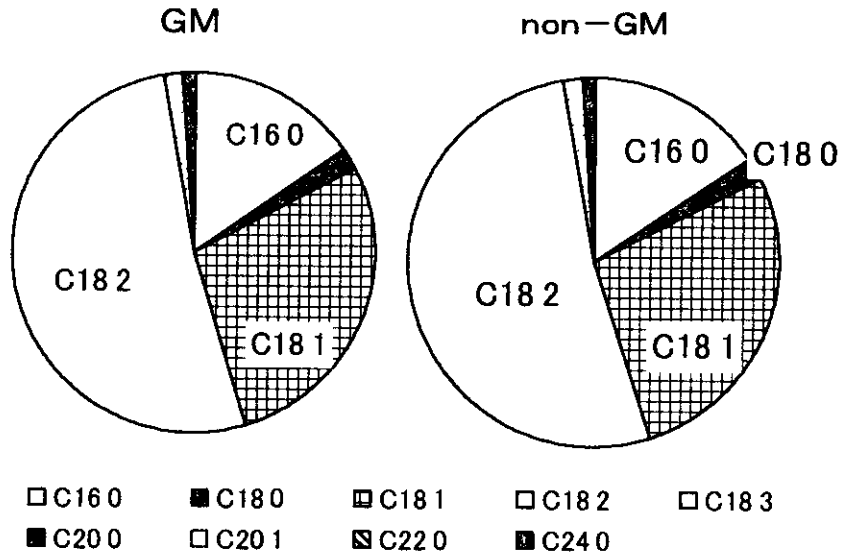
G 知的財産権の出願・登録状況

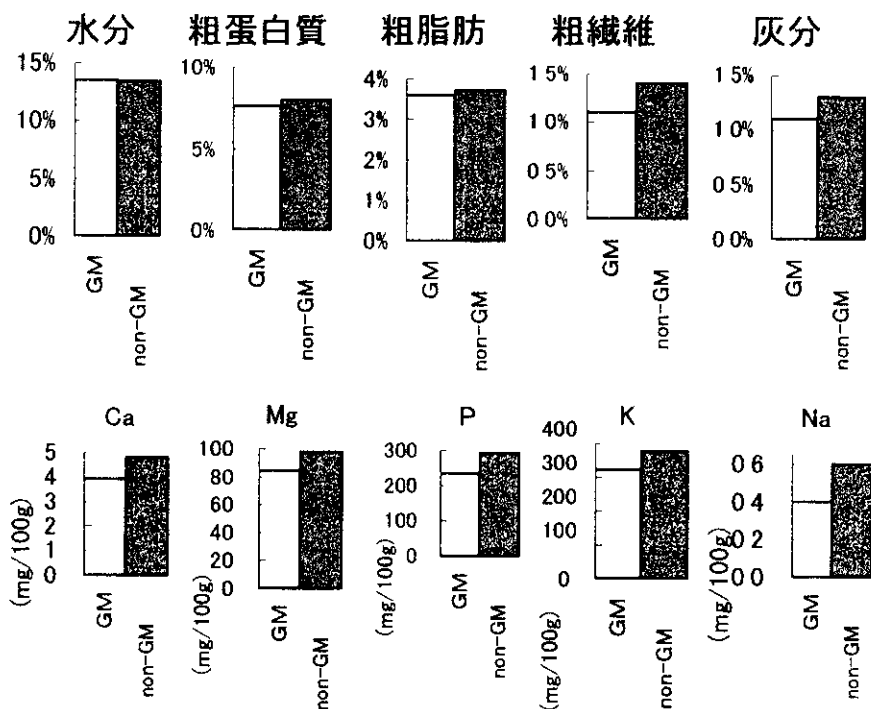
なし

トウモロコシのアミノ酸組成



トウモロコシの脂肪酸組成





トウモロコシの栄養成分等の分析

実験開始時のトウモロコシのカビ毒分析

2002 10 11

項目	GM	non-GM	検出限界	分析法
アフラトキシンB1	—	—	5ppb	HPLC
アフラトキシンB2	—	—	5ppb	HPLC
アフラトキシンG1	—	—	5ppb	HPLC
アフラトキシンG2	—	—	5ppb	HPLC
ニバレノール	—	—	0.05ppm	HPLC-MS
デオキシニバレノール	—	—	0.05ppm	HPLC-MS
オクラトキシン A	—	—	0.05ppm	HPLC
ステリグマトシスチン	—	—	0.2ppm	飼料分析基準 [#]
フモニシンB1	—	—	0.05ppm	HPLC
フモニシンB2	—	—	0.05ppm	HPLC
ゼアラレノン	—	—	0.02ppm	飼料分析基準 [#]

平成7年7畜B第1660号、飼料分析基準の制定による方法

実験開始1年目のトウモロコシのカビ毒分析

2003 12 10

項目	GM	non-GM	検出限界	分析法
アフラトキシンB1	—	—	5ppb	HPLC
アフラトキシンB2	—	—	5ppb	HPLC
アフラトキシンG1	—	—	5ppb	HPLC
アフラトキシンG2	—	—	5ppb	HPLC
ニバレノール	—	—	0.05ppm	HPLC-MS

飼 料 組 成

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%
ヒール酵母	2.0%	ヒール酵母	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

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