

厚生労働科学研究費補助金

食品の安全性高度化推進研究事業

**バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に
関する研究**

平成16年度 総括・分担研究報告書

(H15－食品－003)

主任研究者 長尾 拓

平成17年3月

目次

I. 総括研究報告書

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究 長尾 拓	1
-----------------------------------	---

II. 分担研究報告書

1. 国際動向および組換え微生物の安全性に関する研究 遺伝子組み換え魚文献検索に関する研究 リスクコミュニケーションのあり方に関する研究 諸外国におけるリスク管理、ポストマーケティングに関する調査研究等 薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究 長尾 拓	9
2. 後代交配種等の安全性に関する研究 (1) ~ (4) 小関 良宏	81
3. 遺伝子組換え体の検知に関する調査研究 米谷 民雄	94
4. 新規タンパク質のアレルギー性評価に関する調査研究 手島 玲子	123
5. 遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発ガン性併用試験 菅野 純	141

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	153
---------------------	-----

IV. 分担研究報告書 (別冊)

1. 国際動向および組換え微生物の安全性に関する研究 (国際動向追加) 長尾 拓	155
2. 後代交配種等の安全性に関する研究 (5) 小関 良宏	157

厚生労働科学研究費（食品の安全性高度化推進研究事業）
総括研究報告書
バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究

主任研究者 国立医薬品食品衛生研究所長 長尾拓

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保に関する研究を遂行するため、1 主任研究者、4 分担研究者を中心として、18 機関にわたる研究グループを組織した。1) バイオテクノロジーを応用した食品のより一層の安全性確保のための科学的知見の蓄積、2) 安全性審査基準への反映、検査体制の確立を目的として、各種動向調査研究（GM 魚、GM 微生物、GM 薬用植物等の動向調査）ならびに、後代交配種に関する導入遺伝子の安定性検討、アレルギー性試験、慢性毒性試験等の実践的研究を行った。さらに、当該食品の検知に関する試験法の確立を行うとともに、リスクコミュニケーションに関する調査研究を行った。

分担研究者

小関良宏 東京農工大学工学部教授
米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部長
手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所
機能生化学部室長
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部長

る研究を小関班員、安全性確保に有用な試験方法の確立のための遺伝子組換え体の検知に関する研究を米谷班員、安全性評価方法の一層の検討、開発のための遺伝子組換え体のアレルギー性に関する研究を手島班員、遺伝子組換え体の慢性毒性試験に関する研究を菅野班員が担当し、主任研究者は、研究班全体の総括を行った。また、遺伝子組換え食品に関する開発・実用化の動向や安全性に関する調査研究の一環として、リスクコミュニケーションに関する調査、諸外国における遺伝子組換え食品に関するポストマーケティングの調査、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際動向の調査研究、遺伝子組換え魚、GM 薬用植物に関する文献調査について、三菱化学安全科学研究所、東京大学薬学部、国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部、筑波薬用植物栽培試験場並びに独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所で行われたものを主任研究者がとりまとめた。

研究目的

本研究は、厚生労働省医薬食品局食品安全部の強い依頼をうけ遂行されるもので、バイオテクノロジーを応用した食品の安全性確保のための科学的知見の蓄積、当該食品の検知に関する試験法の確立、安全性審査基準への反映並びにリスクコミュニケーション及び現在海外で開発されている組換え体の安全性評価状況等に関する調査研究を行うことを目的とする。

B.研究方法

植物中の遺伝子発現変動調査法の開発等による導入遺伝子の安定性に係る安全性評価に関する

C. 結果と考察

諸外国におけるリスク管理、ポストマーケティングに係る調査研究: 遺伝子組み換え作物・食品 (GMO) については、主要各国は既にそれらの生産、販売を許可しており、日本も一定の基準のもと輸入・販売を許可している。しかし消費者の行動は慎重で、国内の消費実績は依然限定的である。事実、大豆製品のほとんどは、非遺伝子組み換え (非 GM) 表示をしており、GMO は市場で十分受け入れられていない。

バイオテクノロジー応用食品 (以下、GM 食品) の長期摂取における安全性評価を目的とした Post Marketing Monitoring (以下、PMM) は、承認時の安全性評価を再確認する上で重要であり、一般国民の不安感を払拭する情報の一つとなることが指摘されているが、現在までに GM 食品の PMM を実施したという報告はほとんどない。今回、さまざまな情報源にあたり、諸外国における PMM の実施状況、PMM の是非についてどのような議論が行われてきたかを広範に調査した。

諸外国においては、飼料の食品への混入事件を除き、GM 食品の PMM を実施した例はなく、現在市場にある GM 食品については PMM の必要性は指摘されていない。しかし、今後、counterpart を同質でない新しいタイプのいわゆる第二、第三世代の GM 食品 (栄養状態を著しく変化させる可能性のあるものなど) については、PMM による安全性の監視が重要なツールとなりうると考えられている。PMM の実施にあたっては、実施可能性・評価可能性が問題となることが認識されており、イギリスではすでに実施可能性に関する調査が行われている。

本邦においては、特定の GM 食品の摂取集団が把握可能であり、PMM の実施が比較的容易と考え

られる例がある (A-HITBio「納豆のススメ」)。諸外国における議論を参考としつつ、PMM の是非、実施可能性・評価可能性について十分検討が行われるべきである。

リスクコミュニケーションに関する調査研究: 遺伝子組換え食品のリスクコミュニケーションのあり方に関して平成 12 年度に実施した保健所等に対するアンケート調査では、情報提供に関して多くの要望が出されている。本年度は遺伝子組換え食品に関するリスクコミュニケーションのあり方を検討する一助として、このアンケート調査で指摘された情報提供に関する要望事項に対する対応案を、既存のマニュアル等から整理した。また、分かり易い情報提供をどのように行えばよいかの例として、遺伝子組換え食品の健康影響評価の 1 例について、消費者向けの文案を作成した。今後の遺伝子組換え食品に関する情報提供に関しては、既存のマニュアル等で解説されているように、専門的な情報を消費者等に分かり易く伝えていくための工夫が必要であると考えられる。そのために、科学的専門家と情報提供の専門家の連携がますます重要になるものと考えられる。

組換え微生物の国際動向等に関する研究: 組換え微生物を利用した食品の安全性を評価する上で、他の組換え食品と比べ固有の問題として最も重要な点は、生きた組換え体がヒト腸管内に入り、増殖し生体に対して影響を与えることである。特に、腸内菌叢に対する影響、組換え遺伝子の漏出、ヒトの免疫系への影響については安全性を考える上で、最も考慮すべき事項であるが、残念ながらこれらの項目について安全性を評価する方法はまだ確立されていない。

そこで、我々はこれまでに開発した乳酸菌組換え体をモデル組換え体として、これら重要な 3 つ

の項目について、その安全性評価に関する研究を行い、具体的な安全評価を行いその手法を開発し、標準的な評価方法の提供を試みた。生きた組換え微生物を摂取した場合の腸管内での組換え微生物の挙動と生体への影響に関する基礎的な知見を示した。

これまでに、乳酸菌の菌体表層にタンパク質を固定化して発現させることの可能な発現系を開発し、乳酸菌を抗原運搬体とする経口粘膜ワクチンを多数開発してきた。さらに、同様な発現系を応用し、アレルギーの治療剤および固形癌の治療剤の作出を行ってきた。これらの組換え乳酸菌をモデル組換え体として用い、その安全性について以下の3点に関し、具体的な評価を試みた。

(i) 耐性遺伝子の腸内棲息菌への移行について検討し、通常の組換えに用いるプラスミドが、自然界に分布する接合伝達性プラスミドの働きにより、マウス腸内棲息菌に伝達されることをその試験法を示すと共に、*in vivo*においても定量的に実証した。16年度は、マウス腸管内で組換え微生物のプラスミドの腸内棲息菌への移行につき、遺伝子組換えの段階でどのような組み込み方法をとれば、遺伝子の漏出が最低限に抑えられるか検討を行った。組換え遺伝子をプラスミド上に組み込む場合と、宿主染色体上へ組み込む場合の比較を行った。

(ii) 免疫系に対する影響に関しては、作出した組換え乳酸菌ワクチンの効果を評価する過程で免疫系への影響やその評価方法の開発を行ってきた。細胞レベルでの評価系として、マクロファージ系継代細胞 JA-4 を用いた実験系と、ヒト腸管由来 Caco-2 細胞による評価系を開発した。16年度は、サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定したモデル組換え乳酸菌は、Caco-2 細胞に IL-8

産生を誘導し、組み込んだ遺伝子産物の“意図しない免疫系への影響”の存在があることを実証した。

(iii) 腸内菌叢への影響については、2段階連続流動培養システムの研究により、ヒトの腸内フローラを *in vitro* で再現する実験系を既に開発している。本年度は、腸内菌叢の分子生物学的方法による解析方法につき検討し、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法を試みた。

遺伝子組換え魚に関する文献調査：

遺伝子組換え魚に関する情報を文献検索、インターネット、特許、雑誌・新聞等を用いて収集を行った。

1990年代中頃から組換え魚介類を作出したという報告が多数発表されて以来、現在まで35種を超える魚介類で報告されるようになった。当初は組換え魚介類を作出したという報告が多かったものの、報告から10年近くたち、4から5世代へた時期になって、組換え魚の生理・生態学的研究の報告がなされるようになってきた。生殖、繁殖行動の比較、摂餌行動の比較、遊泳能力や酸素消費量の比較など多くの知見が集積しつつある。これらの知見は、組換え体が逃避した場合の生態系に及ぼす影響を評価する知見となり得る。

一方、食品としての評価はキューバのグループが報告した論文しかでていない。しかし、これはわずか5日間、組換えティラピアをヒトに食べさせ、その前後の血液性状の変化を観察したもので、組換え植物で行われているような慢性毒性やアレルギー性評価は行われていない。

中国の組換え魚介類作出に関する報告はきわめて少ない。2003年に報告された論文には中国健康省の規則に則り、安全性評価を行い、市場へ出荷する準備と政府の許可を求めている最中である、

となっている。この状況であれば、アメリカにおける A/F Protein 社と変わらない状況で、中国の動向についても注意が必要である。

組換え魚介類を作出した、という報告から、これら作出した組換え魚を用いて生理・生態学的研究を行った報告が出されるようになった。また、組換え魚類を用いてヒトへの移植医療の材料とする論文も出た。アメリカと中国ではすでに組換え魚類について許可待ちの状況である。組換え魚介類に対する安全性評価研究も実施できる体制にすることが重要である。

薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究：

この調査研究は、今年度から開始した研究で、最近、開発の進んできている薬用 GM 植物の実態調査並びに文献調査を行なったものである。薬用 GM 植物の範囲を、遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用 GM 植物に関する情報を文献データベース (Entrez PubMed, Chemical Abstracts)、インターネット検索 (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し分類した。薬用 GM 植物を用途・使用目的別に分類するカテゴリーとして、機能性食品、食用ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬の 7 種類が考えられ、それぞれの一覧表を作成した。その結果、それぞれのカテゴリー別に集計した研究・開発数は、機能性食品：32 件、食用ワクチン：32 件、食用医薬：12 件、ワクチン抗原：6 件、抗体医薬：10 件、治療薬：33 件、診断薬・試薬：7 件であり、薬用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品、食用ワクチン及び治療薬の開発が

盛んである状況が伺えた。本研究結果から、薬用 GM 植物による医薬品類の生産は、生産コストが安価であること、生産者・利用者双方にとって安全性が高いこと、複雑なタンパク質等の再構築が容易に行えることなどの理由から、最近ますます活発に開発・研究が行われている実態が明らかとなった。

導入遺伝子の安定性に係る安全性評価に関する研究：

(1) 後代交配種における導入遺伝子の安定性の検討

後代交配種における導入遺伝子の安定性を調査するため、MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列のクローニングを試みた。35S プロモーター領域の塩基配列に対するプライマーを合成して、環状化した MON810 ゲノム DNA をテンプレートとして inverse PCR 法によるクローニングを行ったが、トウモロコシ・ゲノム内に多数存在するレトロトランスポゾンおよび repetitive sequence にプライマーが結合してしまい、プライマーの 35S プロモーター領域への特異的な結合が阻まれたために 5' 近傍塩基配列は増幅されなかった。また、既報の MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 3' 挿入近傍塩基配列をもとに、イネ全ゲノム塩基配列からその挿入領域をスクリーニングし、そこで見いだされた塩基配列をもとに 5' 挿入近傍塩基配列を推定し、その領域に対するプライマーを設計して MON810 ゲノム DNA をテンプレートとして PCR 法によるクローニングを行ったが、挿入近傍塩基配列は

増幅されなかった。

(2) 遺伝子組換えにおけるポストゲノム解析

遺伝子組換え作物の後代交配種における導入遺伝子及び内在性遺伝子の発現産物の変動と変動の幅を解析することを目的として、大豆のプロテオーム、トランスクリプトームの検討を開始し、また、非タンパク性成分（低分子代謝産物）の組成と含量を比較し、遺伝子組換えによって作物の栄養素の増減、あるいは有害成分の増加などが起こっているかどうかを判別するための、メタボローム（代謝産物動態）の一斉解析基盤の整備を開始した。まず、プロテオームに関しては、遺伝子組換え作物の後代交配種における導入遺伝子及び内在性遺伝子の発現産物の変動と変動の幅を解析することを目的として、本年度は各種非遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析を行い、遺伝子組換えダイズのプロテオーム解析を行う上での基礎データを集積した。第二に、トランスクリプトーム解析の予備的な調査として、解析の障害となる大豆種子からの RNA の抽出とその RNA の質的量的ばらつきを検討を昨年から継続して行なった。今年度は国産品種を用いて品種間でどの程度データのばらつきがあるか検討するため抽出法を検討した。大豆の RNA 抽出にあたっては大豆種子の個体差、抽出方法による差、ロット差をそれぞれ消すために、開発が進んできた多検体破碎機を使用し、多数の標品を同時に用いた。その結果、多検体破碎機使用によって多くの個体から一度にそれぞれの RNA を抽出することが可能となり、品種により抽出効率の差があることが明らかになった。RNA 抽出にあたって当初の条件

（安全性試験のための再現性、多検体処理が可能、簡便、安価）の目標は満たされたと考えられる。第3に、メタボローム解析としては、昨年度と同様、超高精度・超高感度の質量分析器であるフーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置（FT-ICRMS）を用いた組換え作物の代謝産物の一斉解析を行なった。FT-ICRMS 法では、試料抽出物に含まれる成分を未精製のまま一斉分析することが出来るため、後代交配種等の安全性評価のためのメタボローム情報を迅速に取得することが可能である。昨年度、FT-ICRMS を用いた組換え作物のメタボローム解析に着手し、代謝成分抽出法、エレクトロスプレーイオン化（ESI）法による FT-ICRMS 分析、マススペクトルデータ（質量数と各ピーク強度）の高速処理と多変量解析の実験系を整備した。今年度は、国内産ダイズ 2 品種（フクユタカ、ムラユタカ）および米国産ダイズ 2 品種（Benson, Binton）の合計 4 品種の種子を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。ダイズ種子の代謝成分はメタノールで抽出し、フィルター濾過・蒸発乾固の後、50%（v/v）アセトニトリルに溶解し FT-ICRMS にて分析した。それぞれの試料において観測した約 600 の分子イオンについて多変量解析を行った。主成分分析の結果は、日本産ダイズ品種と米国産ダイズ品種のそれぞれを特徴づけるメタボロームの差が無いことを示していた。また、各品種のメタボロームにおいて、第一主成分の寄与率が 90%以上となった。この結果は、この分析法によって解析したダイズ品種メタボロームは、それぞれの品種に特徴的に存在する代謝産物によって形成されるものではなく、同一品種内におけるサンプル間の代謝産物

組成と含量の差によるものと推測された。今後は、整備したメタボロミクス実験プラットフォームをもとにして、遺伝子組換え作物と非組換え作物の代謝成分の迅速な比較が可能となった。

組換え食品の検知法に関する研究：

1) 遺伝子組換え作物(ダイズ)を含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討

加工食品に含有される遺伝子組換え作物の定量検知を目的とし、現行公定法に規定されている定量PCR法を実施した場合、直接の測定対象となるDNAが加工処理による様々な影響を受けているため、正確な定量値を求めることが困難とされている。本研究においては、遺伝子組換えダイズを対象とし、加工処理の影響を極力受けることのない新規定量系の開発を試み、さらに、モデル加工食品を用いた基礎的検討をおこなった。その結果、遺伝子の種類により加工処理に対する感受性が異なることを明らかにし、さらに、より広範な加工食品を対象に精度良く定量分析を行うためには、加工処理の影響を極力受けず、かつ、その大きさの等しい2種の定量系を組み合わせる必要があることを示した。また得られた結果に基づき、加工影響を推定し、これを用いた算術式により定量値を求めることが可能となるよう、解析方法の開発を試みた。

(2) 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発

遺伝子組換えトウモロコシを両親として交配させることにより、複数の遺伝的特性を併せ持たせた、新たな遺伝子組換えトウモロコシ品種(スタック品種)の開発が進められている。平成17年3月現在、国内において流通可能なスタック品種には7品種が挙げられ、今後もその数が増加すると

予測されている。これらが混入した粉碎混合試料を検体として定量試験を実施した場合、1粒中に複数のrecombinant DNA配列が含まれているため、重量換算で求められる遺伝子組換え作物の混入率を過剰評価する可能性が高い。この過剰評価を避けるためには、1粒毎に遺伝子組換えであるか否かを判別し、粒数として混入率を算出する事が有効であると考えられる。本研究においては、昨年度にひきつづき、粒数に基づき混入率を評価するために必要となる迅速かつ簡便な検知法を開発することを目的に、1粒毎の試料調製法、DNA抽出法、遺伝子組換えトウモロコシ粒の判別法、また、スタック品種の同定法について検討を行った。さらに今年度は、開発された方法を用いてモニタリング調査研究を実施した。

(3) 各種定量PCR機器により得られる定量値の同等性評価

現行公定法においては、遺伝子組換えダイズ1系統、遺伝子組換えトウモロコシ5系統を対象とする定量分析法として、TaqMan Chemistry を応用した定量PCR法が規定されている。これまでの研究の成果として、各分析法に使用可能な定量PCR機器として、ABI PRISM 7700、7900(96ならびに384 well)、7000、5700を定めてきた。これら各機種を使用して得られる定量値の妥当性については、すでにコラボレーション試験により評価されているが、機種毎に得られる定量値の同等性については明らかにされていなかった。そこで本研究においては、各機種により得られる定量値の同等性を検証することを目的とし、試験を行った。その結果、全ての機種により得られる定量値には機種依存的な偏りは認められず、いずれの機種を比較した場合にも同等の結果が得られると判断された。

組換え食品のアレルギー性に関する研究：平成16年度は、(1)アレルゲン予測の解析法の検討、(2)食物アレルギー動物モデルの開発、(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分解性試験、(4)血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性について検討を行った。具体的には、(1)アレルゲン予測の解析法では、(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法 -アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討を行い、エピトープになりやすいアミノ酸の分布が存在することが示唆された。(ii) 衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の立ち上げを行なった。ADFS では、独自に調査した結果も含めエピトープ既知のアレルゲン42種、エピトープ配列数306種を搭載した。(2)食物アレルギー動物モデルの開発では、マウスを用いる経口感作の方法について数種のアレルゲン(卵白アルブミン、ラクトグロブリン、ウシ血清アルブミン)、非アレルゲン物質(ペプシン)を用いて、BALB/c マウスに投与時の溶媒の差違について検討を行った。アレルゲンの溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、経口での感作、経口での惹起が可能であった。(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分解性試験では、GM とうもろこし (Mon810, Bt11) を用いて新規産生タンパク質 (Cry1Ab) の人工胃液による分解の程度をウェスタンブロット法にて検討し、精製品を用いる場合と同様、ほぼ1分以内に消失することを確認した。(4)血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性については、新たに29検体の食物アレルギー患者血

清を用いて、PAT, CP4-EPSPS, Cry1Ab に対するIgE抗体の産生をELISA法で検討したが、いずれの抗原に対する抗体産生も認められなかった。

慢性毒性試験に関する研究：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、脂肪酸組成を分析した結果に差がなく、カビ毒の既知毒成分も検出限界以下であり、遺伝子非組換えトウモロコシの遺伝子検査を行い遺伝子混入も許容範囲以下で、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ための根本的な飼料成分材料としての的確な被験物質が得られた。

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%すべてを遺伝子組替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。これによる総蛋白質量は減少したが、飼料としての最低必要量を上回った。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/Ducrj (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、2年目の最終解剖時には生存する動物を対象に、血液学、血液化学検査等を行った。引き続きデータの集計とともに全例についての病理組織学的検査を行う。

これまでの検査データの解析結果から、雌の H 群で摂餌量のわずかな減少を伴う軽度の体重増加抑制が見られたが、その他に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に意義のある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。

D. 結論

バイオテクノロジーを応用した食品のより一層の安全性確保のための科学的知見の蓄積に関して、わが国に流通する遺伝子組換え植物の遺伝的安定性についての確認、アレルギー性に関する安全性評価手法の高度化を図るとともに、消費者の意向にも配慮し、ラットを用いた慢性毒性試験が実施された。また、遺伝子組換え食品の検知については、最近、開発の進んでいる遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発、並びに遺伝子組換え作物(ダイズ)を含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討を開始した。リスクコミュニケーションに関する調査研究では、以前実施した保健所等に対するアンケート調査で指摘された情報提供に関する要望事項に対する対応案を、既存のマニュアル等から整理した。さらに、組換え微生物を用いた食品や遺伝子組換え魚、GM薬用植物の諸外国での開発動向、各国の規制状況等についても調査が行われ、今後の国際的ガイドライン作成に向けた準備状況等の調査も行われた。

バイオテクノロジー応用食品については、安全性に関する研究を中心に、当該食品の検知に関する試験法の確立及びリスクコミュニケーション

に関する研究等を持続するとともに、透明性を確保しつつ、より一層の安全確保、消費者の不安解消に努める必要があると考えられる。ポストマーケティングのあり方に関する調査研究は、今後第二世代の組換え食品の開発が進めば、ますます重要になってくると思われる。なお、平成 17 年度から、新たにコーデックスの新バイオテクノロジー応用食品特別部会の設置がされ、クローン動物や生理活性物質等が議論されることになると思われるが、バイオ特別部会への情報提供をするという意味でも、本研究班は重要な位置付けを持っていると思われる。

E. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進事業）
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究
国際動向および組換え微生物の安全性に関する研究
分担研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する国際的な動向の情報を収集すると共に、国際機関により開催される関連会議に出席し、その議論に参加した。協力研究者の吉倉が議長を務めた codex における組換え食品のタスクフォースは、前年度までにリスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の3つのテキストで合意に達した。さらに Codex 総会に於いて、2005 年から、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、再び日本政府が議長国として進めることとなった。現在、吉倉が原案を作成し、厚生労働省で最終案とし、その活動計画を関係国と調整中である。研究としては、遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性評価に重要と思われ、かつ、その試験法が確立していない項目について検討を試みた。作成済みのモデル組換え体を用い、遺伝子の漏出、免疫系に対する影響、腸内菌叢への影響について、その安全性評価に関する研究で、具体的な安全評価を行いその手法を開発し、標準的な評価方法の提供を試みた。

協力研究者

吉倉 廣 国立感染症研究所 前所長
五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所
食品衛生管理部 室長

A. 研究目的

遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向について情報を収集すると共に、国際機関により開催される遺伝子組換え食品の安全性に関する関連会議に出席し、その議論に参加し、バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する要件を明らかにする。吉倉は、2005 年より再び開始される

codex 部会の議長として、その検討議題の調整を行い、参加国の意見の調整と議事進行を行う。実験としては、組換え微生物応用食品の安全性確保に必要な検査法について、モデル組換え微生物を用い検討する。

B. 研究方法

国際機関により開催される遺伝子組換え食品の安全性に関する関連会議に出席し、情報収集および情報交換を行う。この議論で明らかとなったバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に必要な要件のうち、その試験検査法が確

立していない項目について、モデル組換え体を用いて検査法の検討を試みた。

遺伝子の漏出に関する検討: マウス腸管内で組換え微生物のプラスミドの腸内棲息菌への移行につき、遺伝子組換えの段階でどのような組み込み方法をとれば、遺伝子の漏出が最低限に抑えられるか検討を行った。組換え遺伝子をプラスミド上に組み込む場合と、宿主染色体上へ組み込む場合の比較を行った。宿主染色体上への組み込みは、相同組換えにより行った。*in vitro*での伝達は、Sasakiらの方法を基に検討し、高頻度に伝達が観察できる改良フィルターメーティング法により行った。

免疫系に対する影響: 細胞レベルでの評価系として、ヒト腸管由来 Caco-2 細胞による評価系を開発した。モデル組換え体としては、サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定した組換え乳酸菌を用いた。増殖させた Caco-2 細胞に、これらの組換え乳酸菌を加え、菌の取り込みと、培養上清中へのサイトカインの産生を調べた。

腸内菌叢への影響: 腸内菌叢の分子生物学的方法による解析方法につき文献的に整理し、DGGE法につき検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要となる部分は含まれない。実験動物としてマウスを使用するが、動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物管理規程に従い実行し、動物愛護の精神で必要最小限の動物を用いて実験を行った。

C. 研究結果 (実験結果には考察を含む)

組換え微生物の国際的な動向に関しては、遺伝子組換え微生物食品の安全性に関する会議に参加し、討論に関わった。協力研究者の吉倉が議長を務めた codex における組換え食品の

タスクフォースは、2003 年リスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の3つのテキストで合意に達した。この成果は高く評価され、同年6月の codex 総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が提案文書を作成する事となった。2005 年から次のタスクフォースが開始されるが、現在、議長の吉倉が中心となり討議する議題の調整中である。

遺伝子の漏出に関する検討の成果: 検討した遺伝子伝達を調べる試験法の改良を行った。昨年までの実験の成果を基にさらに部分的な変更を加え、組換え微生物の特定の遺伝子の腸内棲息菌への移行につき、試験管内でも、マウス腸管内でも定量的に移行を観察する実験系をほぼ確立した。昨年までの成果では、組み込みに用いられる遺伝子は、組み込みに用いられる一般的なプラスミド上にある限り、そのプラスミド自身に伝達能が無くても、自然界に存在する pAM β 1 の様な強力な接合伝達性プラスミドにより他の菌へ伝達されてしまうことを定量的に示した。これは、試験管内でも、マウス腸管内でも観察可能である。そこで、遺伝子漏出の対策として、遺伝子組換えの段階でどのような組み込み方法をとれば、遺伝子の漏出が最低限に抑えられるか検討を行った。理論的には、組み込む先をプラスミド上から、宿主菌の染色体上にすれば、当該遺伝子が移行するためには遺伝子が何らかの作用で切り出される必要があり、プラスミド上に比べ遺伝子漏出が抑えられることが期待される。そこで、相同組換えにより宿主染色体上に遺伝子を組み込んだ組換え体の作成を試みた。現在、超低頻度で起こる遺伝子移行をどの様に評価するかの新しい方

法を検討中である。ちなみにプラスミド上に組み込んだモデルであるプラスミド自体が伝達能を持たない *Lc. lactis* (pDL278) においても、プラスミドの移行頻度は非常に低く、これまでの試験法では、すべての実験系において検出限界以下であった。

免疫系に対する影響:細胞レベルでの評価系として、ヒト腸管由来 Caco-2 細胞による評価系を試みた。用いたモデル乳酸菌としては、サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定し発現させた。培養した Caco-2 細胞に乳酸菌および組換え体を添加し、細胞への取り込みと、培養上清中へのサイトカイン産生を定量した。乳酸菌と組換え体では細胞への接着・取り込みに差は認められないが、培養上清中の IL-8 産生は、組換え体のみで観察された。鞭毛は、細菌における運動器官であることは知られているが、IL-8 を誘導することは、本来の機能としては考えられていない。

腸内菌叢への影響:培養による腸内細菌叢の検査法は、現在急速に分子生物学的方法による評価法に移行しつつある。文献的に分析法を調べ、腸内菌層への影響を見る試験法としての適当と思われる検査方法を整理した。この中で DGGE 法について試験法の検討を試みた。

D. 考察

これまでに開催された codex 総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が議長国として提案文書を作成する事となった。2005 年から再び議長を務めることになった吉倉はこのタスクフォースで活動計画案を作成し、厚生労働省で最終案とし、関係国と調整中である。魚などの動物の組換え体の提案もあるが、環境影響

の問題がクリアされないと codex が環境影響評価の場になりかねないので、十分な検討が必要である。特に、養殖中個体が産出する幼生魚の封じ込めが難しい事、組換え魚の維持には交配相手を常に変えて行く必要がある事など、食品としての安全性を考える前の技術的な問題があるようである。むしろ、クローン技術は組換え動物作出に不可欠であるので、この辺りからアプローチするのが賢明かも知れない。又、次のタスクフォースとしては、今迄の作業の上に立ってつぎの活動を考えた方がよいとの考えがあり、例えば、栄養促進組換え植物、組換え植物食品の成分分析、非食用組換え植物の問題を取り上げては、と云う考えもある。

既に codex のガイドラインが作成された組換え微生物ガイドラインについては、実際に安全性評価を行う上でその試験法が十分に確立していないため評価が困難な部分がある。組換え微生物は、生きたまま摂取することにより、動物あるいはヒト消化管内で増殖することから、これまでの組換え食品と異なり、生きた微生物に固有と考えられるいくつかの問題点が指摘されている。同時に多くの重要な項目において、安全性評価法が未だ確立されていない。ガイドラインでは、今後そのような方面の研究が進むことにより、早急にその評価手法が確立されることが必要であることが明記されている。特に、実質的同等性の適用方法、消化管内での組換え遺伝子の移行、腸内フローラへの影響、免疫系への刺激等の問題について研究することは重要である。昨年までに、ヒト腸管内における組換え遺伝子の腸内棲息菌への移行に関し、マウス腸管内で定量的に遺伝子の移行を観察できるというたいへん重要な知見を示した。今年度は引き続きこの問題に関し実験を行

い、用いた実験系を広く安全性評価に用いることの出来る方法とする目的で、さらに検討を加えた。試験管において高感度に遺伝子移行を定量的に評価する評価法、マウス腸管内において定量的にかつ高感度で遺伝子伝達を検出できる肛門閉鎖マウスの実験系はほぼ確立した。

組換え乳酸菌 *Lc. lactis* (pDL278) が、動物腸管内に多量に入ってきたとしても、組換え体自身からプラスミドが直接移行する頻度は、我々の開発した高感度の検査法においても検出限界以下であり、非常に低いことが確認された。従って、腸内で組換え体から腸内棲息菌への移行が起こるとすると、昨年までに我々が検討を行って移行を実証することが出来たトリペアレンタルトランスファーが重要となってくる。すなわち、自然界に存在する接合伝達性プラスミドをもつ菌が存在し、この菌から接合伝達により組換え体へのプラスミドの接合伝達が起こる。すると同一乳酸菌内に組換えプラスミドと接合伝達性プラスミドが共存する。2つのプラスミドの共存する乳酸菌から、接合伝達性プラスミドが再び、他の腸内棲息菌へ伝達して行くと、組換えプラスミドは一定の割合で接合伝達性プラスミドと共に腸内棲息菌は移行してしまう。大腸菌のR因子では、この現象をトリペアレンタルトランスファーと呼んでいる。グラム陰性菌である大腸菌とグラム陽性菌の接合伝達は異なるが、これに類似するプラスミドの移行がグラム陽性菌でも起こっているのである。

この伝達では、自然界に分布する接合伝達性プラスミドと組換えプラスミドが遺伝子に相同性を持たない場合でも観察される。すなわち、プラスミドのように宿主のゲノムから分離して存在するレプリコンは、動物腸管内で他の棲

息菌へ、その頻度の差こそあるが、トリペアレンタルトランスファーなどにより移行すると考えられる。従って、組換え微生物特に、プラスミド等の宿主遺伝子とは独立して存在するレプリコンを用いて組換え体を作成すれば、遺伝子の移行は常に起こりうるし、条件を整えば、それを定量的に確認することが可能である。今回確立した実験法は、その移行頻度を確認する最も有用な手法である。

肛門閉鎖マウスは、あらかじめ供与菌と受容菌を投与し、人工的に肛門閉鎖を行ったのち、マウスを一晩飼育することにより、直腸内に糞便が圧縮状態で蓄積する。したがって、*in vitro* のフィルターメーティング法と同様な理由で、接合伝達に適する状態が期待される実験法である。ただ、大変興味深いことは、フィルターメーティング法と、肛門閉鎖法でその伝達頻度がほぼ同じ値で示される *Ec. faecalis* に対し、フィルターメーティング法では、十分に伝達を確認されるのに *in vivo* の肛門閉鎖法での伝達を確認できない *Lactobacillus* の様な菌があることが示されたことである。この結果には再現性があり、原因はまだ不明であるが、少なくとも *in vitro* の結果のみから腸管内での *in vivo* の伝達頻度を推定することはまだ出来ないようである。

本年度は、組み込む遺伝子をプラスミド上から宿主遺伝子上に移した場合に、腸内棲息菌への伝達の可能性がどの程度変化するかを検討を開始した。宿主遺伝子上への組み込みには、相同組換えによる方法が可能であるが、問題はこれを作成したあと、どの様にして超低頻度で起こりうる遺伝子の移行を定量的に測定するかの方法論が出来ていないことにある。組換え遺伝子をプラスミド上から宿主遺伝子上に移

すと、宿主染色体からその遺伝子が切り出されることが必要であり、プラスミド上に遺伝子がある場合に比べ、当然その移行頻度が大幅に低下することが期待される。現在の方法による検出限界は、実験系に用いる菌数の逆数に相当する頻度が検出限界である。この実験系で実質的に、 10^9 から 10^{10} 程度が扱える菌数の最大値であるため、この逆数が、理論的に検出限界となる。昨年までに推定したプラスミド上にある遺伝子の推定伝達頻度は、 2.8×10^{14} 個に 1 個であるので、これより遙かに低いと推定される宿主染色体上に組み込んだ遺伝子の伝達頻度を推定することは容易ではない。今後、宿主遺伝子から遺伝子が切り出される頻度を何らかの方法で推定しなくてはならない。この値が推定できれば、遺伝子を宿主染色体に組み込む事により、遺伝子の伝達の頻度が推定可能と思われる。

免疫系に対する影響に関しては、作出した組換え乳酸菌ワクチンの効果を評価する過程で免疫系への影響やその評価方法の開発を行ってきた。細胞レベルでの評価系として、マクロファージ系継代細胞 JA-4 を用いた実験系と、ヒト腸管由来 Caco-2 細胞による評価系を開発した。本年度は、サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定したモデル組換え乳酸菌を用いて、Caco-2 細胞と、組換え乳酸菌の反応性を調べた。組換え乳酸菌は、Caco-2 細胞への接着や取り込みに有意さは認められなかったが、18 時間後の培養上清中に IL-8 産生を誘導した。腸管上皮細胞から IL-8 が誘導されると、周辺に炎症性の反応が誘導されることが予想される。鞭毛抗原は本来細菌の運動器官と考えられているが、このような反応を引き起こす事は、通常は予想出来ない。従って、今回の反応は

組み込んだ遺伝子産物の“意図しない免疫系への影響”の存在があることを実証した事になる。これまで報告しているマクロファージ系の JA-4 細胞に対するリステリオリジン 0 の反応は、免疫担当細胞への直接的な作用により TNF を誘導したが、今回はこれとは異なるシステムである。すなわち腸管上皮細胞に IL-8 を誘導し、その結果として免疫担当細胞を集め、炎症に結びつく事が予想される。

腸内菌叢への影響については、2 段階連続流動培養システムの研究により、ヒトの腸内フローラを *in vitro* で再現する実験系を既に開発している。本年度は、腸内菌叢の分子生物学的方法による解析方法につき文献調査、海外の情報収集を行い、培養法に変わる腸内細菌検査法につき検討を行った。この中で、検体から個々の菌を分離することなく、菌叢の変化を示すことの出来る方法として、DGGE 法を試みた。

E. 結論

吉倉は、再度 codex 部会の議長として、新しい部会の討議テーマの選定を開始した。

組換え体の遺伝子漏出に関しては、組込先を宿主染色体上にした場合の有用性につき検討を行った。組換え微生物のヒト腸管細胞への影響を調べる細胞レベルの実験系を示し、“意図しない影響”の存在を示した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, Tamaoki H, Shirahata T, Igimi S and

- Makino S-I. Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. J Appl Microbiol. 96:1347-1353. (2004)
- (2) Tanaka Yasuhito, Takizawa Makiko, Igimi Shizunobu, and Amano Fumio. 2004. Enhanced Release of Prostaglandin D2 during Re-incubation of RAW 264.7 Macrophage-Like Cells after Treatment of Both Lipopolysaccharide and Non-steroidal Anti-inflammatory. Drugs. Biol. Pharm. Bull. 27(7): 985-991.
- (3) 五十君静信、梶川揚申、浅井美里、金台 運。乳酸菌ベクターワクチン。獣医畜産新報。57:No. 9:748-752. (2004)
- (4) 五十君静信。乳酸菌組換えとその応用。バイオインダストリー。22巻1号：38-45。(2005)
- LACTOBACILLUS CASEI* EXPRESSING LISTERIOLYSIN O. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.
- (3) Igimi S., Kajikawa A., Kim T.W., Okutani A., Satoh E. and Makino S-I. DEVELOPMENT OF LISTERIA VACCINE USING RECOMBINANT LACTIC ACID BACTERIA. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.
- (4) 五十君静信。組換え乳酸菌を用いた感染症予防の試み。日本学術会議、日本乳酸菌学会、日本農芸化学会共催シンポジウム。“－乳酸菌と健康－乳酸菌を用いた健康増進・疾病予防の試み”。2004.12.17
- (5) 五十君静信。組換え乳酸菌の機能とその応用。愛知免疫アレルギーを語る会。2005.2.18

2. 学会発表

- (1) 五十君静信。乳酸菌ベクターワクチン。シンポジウム「ワクチン研究の新展開：多様な手法が切り開く‘ワクチン’の可能性」。第137回日本獣医学会学術集会。2004年4月2日。
- (2) Kajikawa A., Asai M., Satoh E., Okutani A., Okada Y., Yamasaki M., Yamamoto S., and Igimi S. PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST LISTERIA MONOCYTOGENES BY RECOMBINANT

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

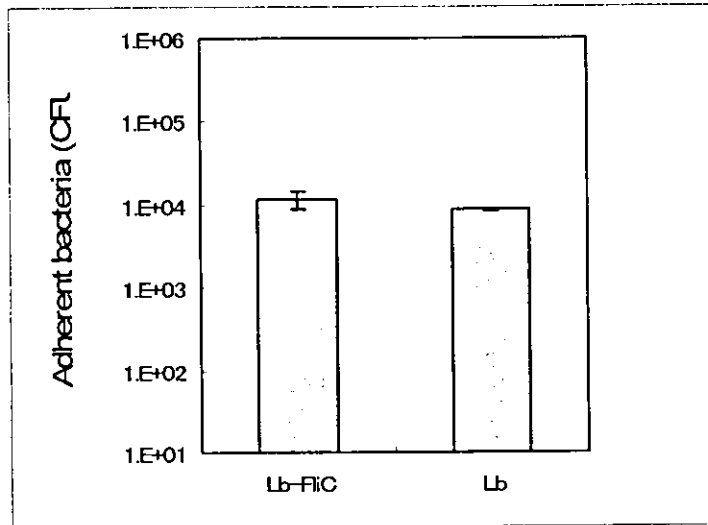


図1. Caco-2細胞に付着した菌数(4°C、1時間)

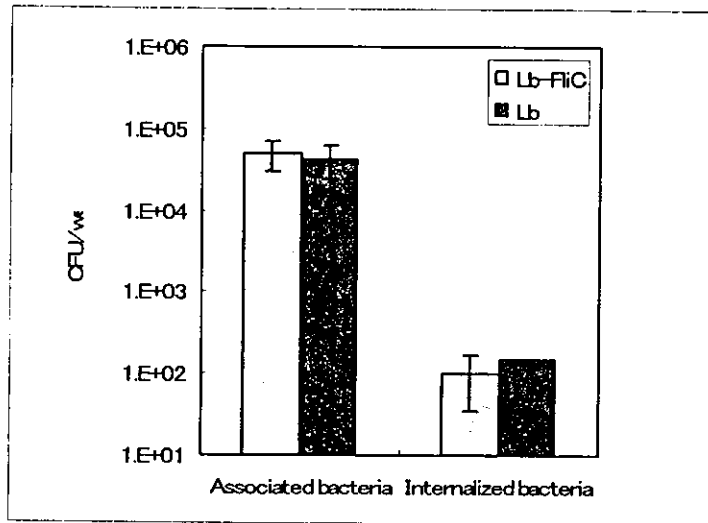


図2. Caco-2細胞に接着・侵入した菌数(37°C、1時間)

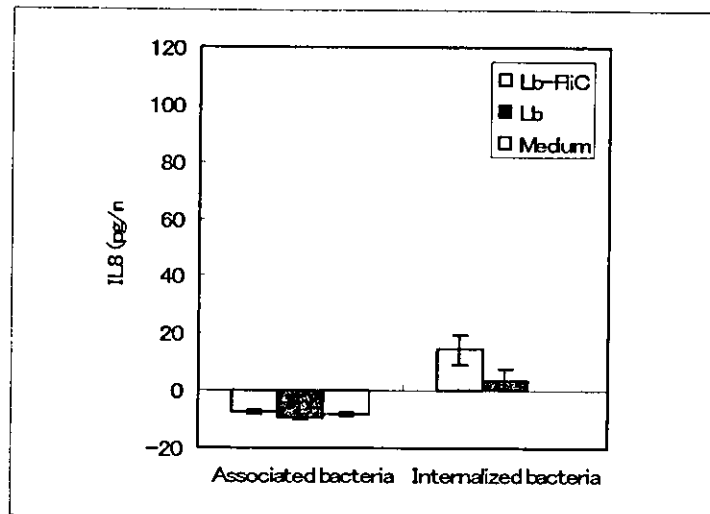


図3. Caco-2細胞から分泌されたIL-8(37°C、1時間)

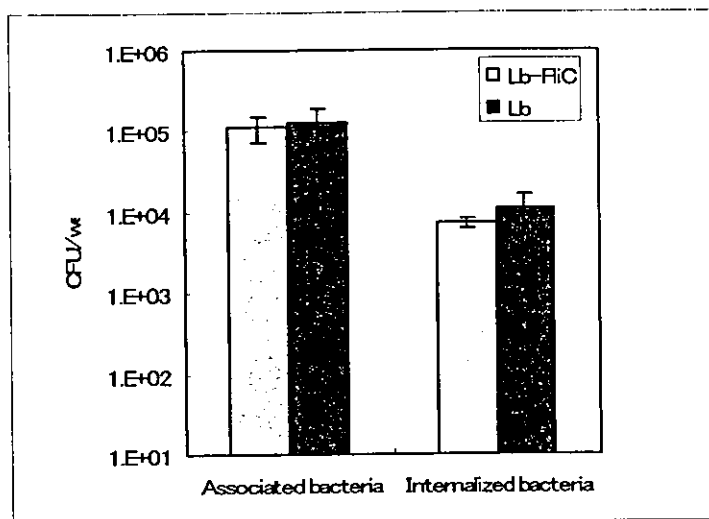


図4. Caco-2細胞に接着・侵入した菌数(37°C、1晩)

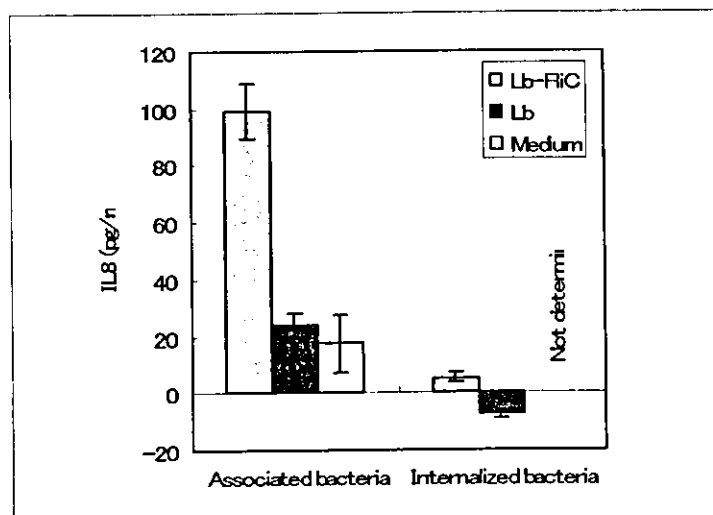


図5. Caco-2細胞から分泌されたIL-8(37°C、1晩)

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）
（分担研究報告書）

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究
遺伝子組換え魚文献検索に関する研究
分担研究者 長尾拓 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

遺伝子組換え魚に関する情報を文献検索、インターネット、特許、雑誌・新聞等を用いて収集を行った。1990年代中頃から組換え魚介類を作出したという報告が多数発表されて以来、現在まで35種を超える魚介類で報告されるようになった。当初は組換え魚介類を作出したという報告が多かったものの、報告から10年近くたち、4から5世代へた時期になって、組換え魚の生理・生態学的研究の報告がなされるようになってきた。生殖、繁殖行動の比較、摂餌行動の比較、遊泳能力や酸素消費量の比較など多くの知見が集積しつつある。これらの知見は、組換え体が逃避した場合の生態系に及ぼす影響を評価する知見となり得る。一方、食品としての評価はキューバのグループが報告した論文しかでていない。しかし、これはわずか5日間、組換えティラピアをヒトに食べさせ、その前後の血液性状の変化を観察したもので、組換え植物で行われているような慢性毒性やアレルギー性評価は行われていない。中国の組換え魚介類作出に関する報告はきわめて少ない。2003年に報告された論文には中国健康省の規則に則り、安全性評価を行い、市場へ出荷する準備と政府の許可を求めている最中である、となっている。この状況であれば、アメリカにおけるA/F Protein社と変わらない状況で、中国の動向についても注意が必要である。組換え魚介類を作出した、という報告から、これら作出した組換え魚を用いて生理・生態学的研究を行った報告が出されるようになった。また、組換え魚類を用いてヒトへの移植医療の材料とする論文も出た。アメリカと中国ではすでに組換え魚類について許可待ちの状況である。組換え魚介類に対する安全性評価研究も実施できる体制にすることが重要である。

協力研究者
名古屋博之
独立行政法人 水産総合研究センター
養殖研究所 育種グループ
主任研究官

な文献を4頁以降に示す。最近の組換え魚に関する論文は組換え魚を作出およびその方法に関する報告から、作出した組換え魚に関する生理・生態学的な研究の報告が多くなってきた。また、食品としての利用以外にも医学への応用を考えた研究も報告されるようになってきた。以下、その一部を紹介する。

組換え魚介類を食品として評価した論文はGuillénet al. (1999)で、キューバにおいて、遺伝子組換えティラピアをボランティアに食べさせ、そのボランティアから採血を行い、血液性状の変化について調べたというもので、この論文によれば、22人（24～46歳）を11人ずつ2つのグループに分けて、それぞれ1日2回、5日間にわたって成長ホルモン遺伝子導入ティラピアを食べてもらい、実験前と実験後に採血した血液成分（ヘモグロビン、総血清タンパク量、グルコース、クレアチニン、コレステロール、白血球、赤血球）を測定したが、血液成分には実験前後で差がなかったという報告である。

組換え魚の生理・生態学的研究としてはBessey et al. は成長ホルモン遺伝子導入組換えギンザケとふ化場に遡上してきたふ化場ギンザケおよび研

A. 研究目的

現在までに組換え魚類は世界で35種類以上作出されている。また、魚類以外にも貝類、エビ類で組換え体が作出されている。成長ホルモン遺伝子を組み込んだ太平洋サケについては、米国の民間会社が既に実用化に向け、FDAに対して食品利用を申請中である。このため、各国でのGM魚に関する安全性評価状況等の調査を行い、我が国での安全性評価基準作成の一助とする。

B. 研究方法

遺伝子組換え魚に関する情報を文献データベース、インターネット、特許情報、新聞等を用いて調査した。

C. 研究結果

文献検索によって、2004年度に報告された主