

200501062A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

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17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18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 国際動向に関する研究 (Codex 組換え食品タスクフォース) 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	8
2. 後代交配種等の安全性に関する研究 (1) ~ (4) 小関 良宏	72
3. 遺伝子組換え体の検知に関する調査研究 米谷 民雄	87
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	118
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	140

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	155
---------------------	-----

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、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部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

A. 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わる安全性評価に関す

任研究者がとりまとめた。

### 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: バイオテクノロジー応用食品(以下GM食品)の安全性管理の方策として、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)の重要性が指摘されている。しかしながら、科学的根拠に基づく承認時審査が依然として主流であること、また PMM の実施体制が未整備であることなどから、これまで実現には至っていなかった。

本研究班では、GM 食品の PMM に関する動向調査をこれまで行ってきた。最終年度である本年度においては、GM 作物の商用栽培を巡る地理的および機能的拡大、またこれに伴う安全性リスクの顕在化が複数の事例において確認され、PMM に関する具体的な取り組みも幾つかみられた。また、安全性管理のための方策として、科学的根拠に基づく承認時審査だけでなく、疫学的調査に基づく PMM の意義が再認識されつつあることも確認された。今後は機能強化食品や特定の摂取集団における安全性管理を皮切りに PMM が随時行われていくものと予見されるが、実施可能性や評価手法に係る検討はいぜん不十分であり、当面は試行錯誤が続くものと予想される。本邦としては、GM 食品に対する世界的な市場開放圧力と国内における「安心」担保の高まりを十分に織り込み、高度化する GM 食品の把握と、対応法制度の検討などを進める時期に来ており、この一環として PMM を位置づけ検討を行っていく事が望まれる。

#### 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 年度に行った保健所等に対するアンケート調査結果を受けて、厚生労働省では平成 14 年度から「遺伝子組換え食品の安全性について」というパンフレットを作成して配布している。本年度は本パンフレットに対する一般女性の意見を聴取し、パンフレットの改良のための検討を行うと共に、これまでのリスク・コミュニケーションのあり方に関する研究の成果等を踏まえて、厚生労働省における GM 食品に関するリスク・コミュニケーションのあり方について再検討した。パンフレットに対する一般女性の意見聴取を通じて、かなりやさしく、分かり易く作成したつもりのパンフレットであっても、一般人には、堅く、詳しく感じられること、字が多いと読む気持ちがなくなることが明らかになった。一方、消費者が求めている情報ニーズと提供情報にずれが見られ、一般消費者の関心が、現在、消費者が直接接する食品に関する具体的な情報を求めているのに対して、提供側は一般的な知識や専門的な情報、正確さを期すための詳細を提供しようとする傾向が強いようであり、一般消費者の目線に立って情報提供することが重要であることが明らかになった。また、情報提供ツールの面でも、インターネットが普及したことから、ホームページとパンフレットの特性を踏まえた効果的な情報提供の必要性が明らかになった。一方、厚生労働省における情報提供やリスク・コミュニケーションの目標は必ずしも明確化にされていないことから、今後は、我が国における GM 食品に対するスタンス、食品安全委員会における情報提供、農林水産省における情報提供も視野に入れ、厚生労働省における GM 食品に関する情報提供及びリスク・コミュニケーションの目標を明確にし、PDCA (plan, do, check, act) のサイクルをまわ

すことにより、効果的なコミュニケーションを行っていくことが重要であると考えられる。

#### 組換え微生物の国際動向等に関する研究：

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。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。協力研究者の吉倉は2005年9月19日から23日にかけて千葉の幕張メッセで開催されたcodexにおける組換え食品のタスクフォースの議長を務めた。討議するガイドラインは組換え動物に決まったが、組換え植物指針を組換え動物指針に書き換えるに当たっては、植物と動物の基本的な生物学的な差（特に代謝経路の違い）に十分考慮すべきであることが確認された。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。具体的成果としては、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。モデル組換え乳酸菌のマウスへの免疫実験において、遺伝子組換えにより、抗原を菌体表層に固定発現することにより、免疫系への刺激が増大することを確認した。

#### 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

ーネットを用いて収集を行った。米国、カナダにおいて Aqua Bounty Technologies Inc.が食品として申請している遺伝子組換え魚類について、許可はおりていない。また、中国においても食品として遺伝子組換え魚類の安全性評価をしている、との論文が報告された。また、セルフクローニングした autotransgenic の魚も作られているようである。中国からは種苗も生きたまま入る可能性があるため、今後とも開発動向に関して注意が必要である。

#### 薬用GM植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究：

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。米国における薬用GM植物野外圃場栽培面積は、2004年の45.35エーカーから2005年の78.45エーカーへと1.7倍に増加し、作付けが行われた作物には、食用作物でもあるトウモロコシ、ベニバナ、イネ、オオムギが含まれていた。薬用GM植物に関する国際学会（Conference on Plant-made Pharmaceuticals 2005）で植物工場グループとして紹介されている企業の研究開発内容を、各社HP及び公表論文・特許を基に調べた結果、米国5社、カナダ2社、EU12社、その他の国4社、計23社が食用作物（アマ、アルファルファ、イチゴ、イネ、ウキクサ、エンドウ、オオムギ、キュウリ、ササゲ、サトウキビ、ジャガイモ、ダイズ、トウモロコシ、トマト、ナタネ、マクワウリ、バナナ、ベニバナ、レタス、

ワタ)を用いた薬用GM植物開発を行っており、その中の12社で食用を目的とする薬用GM植物-機能性食品、食用医薬、食用ワクチン-開発研究が確認できた。国内では2006年度に花粉症緩和米の圃場栽培と、収穫された米を用いての前臨床及び臨床試験が計画されている。前年度までのカテゴリ別の研究・開発数と今年度の研究開発数を集計した結果、機能性食品44件、食用ワクチン39件、食用医薬17件、ワクチン抗原17件、抗体医薬16件、治療薬58件、診断薬・試薬16件であり、特に機能性食品、食用ワクチン、治療薬の開発が活発である現状が伺えた。

#### 導入遺伝子の安定性に係わ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 3' 挿入近傍塩基配列情報および内生遺伝子である starch synthase isoform zSTSII-2 (*SSIIb*) 遺伝子の 3' 側塩基配列情報をもとに作成したプライマー対を用いて、MON810 穀粒から一単位ずつ抽出したゲノム DNA をテンプレートと 3' オープン・リーディング・フレームから 3' 非翻訳領域の塩基配列の増幅を試みた。その結果、*SSIIb* 遺伝子においては、MON810 に塩基配列の異なる 2 つの遺伝子がヘテロの状態に入っているために、塩基配列の解読ができなかった。これに対して、導入遺伝子について、68 個の穀粒から増幅された DNA 断片について塩基配列を決定したところ、ラウンドアップ・レディー・ダイズよりもさらに安定で変異率が低いことがわかった。

##### (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行なった。

まず、トランスクリプトーム解析については、予備的な調査として、大豆種子からの RNA 発現について解析の障害となる質的量的ばらつきの検討を一昨年から継続して行なっているが、今年度は輸入した遺伝子組換え品種を用いて個体間での程度 RNA 発現にばらつきがあるか検討した。大豆の RNA 抽出にあたっては破砕機を使用し、市販キットによる RNA 抽出の後、大豆遺伝子の DNA アレイを用いて種子毎に RNA 発現を解析した結果、同一品種を用いた今回の実験でも 5%程度は有意に 2 倍以上(あるいは 1/2 以下)の発現変動が見られたが、これらの遺伝子群には共通の特徴が見あたらないため、遺伝子発現には全体的なばらつきがあるものと考えられた。次にプロテオーム解析であるが、遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズそれぞれ 4 個体について、プロテオーム解析を行い、遺伝子組換えダイズ 4 個体と非遺伝子組換えダイズ 4 個体をそれぞれ 1 つのグループとし、2 つのグループ間のプロファイルの比較検討を行ったが、数%のグループ特異的スポットが検出された。このようなスポットが検出される要因については、さらに個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解

析する必要があると考えられる。

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。一昨年度、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。昨年度は、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。今年度は、遺伝子組換えダイズ種子と非組換えダイズ種子のメタボロームを比較したところ、組換え体と非組換え体の間ではメタボロームに差が認められないことが明らかとなった。

#### 組換え食品の検知法に関する研究：

##### (1) 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ（Bt10系統）を対象とした検知技術の開発

遺伝子組換えトウモロコシ（Bt10系統）が、2001年から2004年までの4年間に亘り米国において誤って栽培され、さらには流通していた事実が報道された。しかし、Bt10系統は安全性審査に諮られていないことから、国内流通が禁止されている。そこで、Bt10系統特異的検知技術の開発と標準化を試み、定性分析法を作製した。

##### (2) 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした検知技術の検討

2005年4月13日に公開された環境保護団体の報告により、中国湖北省において安全性審査に諮られていない遺伝子組換えコメが流通していた事実が明らかになった。本報告に依れば、当該安全

性未審査遺伝子組換えイネは、すでに安全性審査を終了している遺伝子組換えワタ等にも導入されているCry1Acタンパク質を発現している。そこで、Cry1Acタンパク質を標的タンパクとして開発されていたラテラルフロー法が、コメを対象とした検知に適用可能であるかの検討をし、適用可能であることを確認した。

##### (3) LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法の改良

安全性審査を終了した遺伝子組換え作物を対象とした定量分析法として、定量PCR法が開発されてきた。LightCycler systemは多機関検証試験を経て、本定量PCR法に適用可能な定量PCR機器の1機種に定められてきた。しかし、その後の検討により分析結果の安定性に問題が認められたため、定量分析法について改良を行った。分析試料となるDNAを抽出する方法、試薬の種類及びサーマルサイクラー条件を含むPCR条件について検討した結果、繰り返し再現性良く遺伝子組換えダイズを定量可能な分析法が開発された。

##### (4) ABI PRISM 7500を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とした定量分析法の開発

遺伝子組換え作物を対象とした定量PCR法の適用可能機種の拡大を目的に、複数挙げられる定量PCR機器のうち比較的安価なABI PRISM 7500を用い、遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とする定量PCR法について開発を検討し、繰り返し再現性良く定量分析が可能であることを明らかにした。

##### (5) 新たに安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ(3系統)を対象とした定量分析法の開発とT25系統を対象とした定量分析法の改良

2001年以降に安全性審査を終了したMON863、

NK603及び、TC1507系統に、T25系統を加えた計4系統の遺伝子組換えトウモロコシを対象とした定量PCR法について検討した。その結果、定量PCR機器の如何を問わず良好な再現性をもって分析が可能であることを明らかにした。

(6) シリカベースレジソタイプキットを用いたダイズからのDNA抽出法の改良

現行公定分析法には、遺伝子組換えダイズを対象とした定量PCR法に供されるDNAを抽出するための方法として、2種の方法が規定されている。これらのうち、シリカベースレジソタイプキットを用いた方法は、他の方法に比較して操作が簡便であるもの、長時間を要し、また高価であることが指摘されていた。このため、シリカベースレジソタイプキット法をより短時間かつ安価に実施可能とすることを目的に改良を検討した。

組換え食品のアレルギー性に関する研究：平成17年度は、(1)アレルギー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)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)アレルギー予測の解析法では、(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討において、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、立体構造も加味したエピトープ部位の解析を行い、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、更新を行なった。ADFSでは、独自に調査した結果も含めアレルゲン数1280、エピトープ既知のアレルゲン74種を搭載した。

タンパク質のアレルゲン予測機能については、FAO/WHO法(Hilemanらの方法)とmotif-based法(Stadlerらの方法)を登載した。(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アレルゲン(卵白アルブミン)、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。また、Balb/cマウス、W/Wvマウスにおける他の食物抗原オボムコイド(OVM)の経口感作において、抗原-油脂 emulsionの投与により、感作能の上昇がみられた。(3)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36検体の食物アレルギー患者血清を用いて、新規産生タンパク質であるPAT, CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9C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)を飼料に配合し、慢性毒性・発がん性併用試験を行った。F344/Ducrj (SPF)ラット雌雄各群60匹にこの配合飼料を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。これまでの検査データの解析結果から、雌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、用量依存性のない死亡率の増加が雌雄で見られ、剖検所見では雌の肝などごく一部の臓器に於いて肉眼的な微小病変の有意な増加が観察されたが、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明らかな異常所見は観察されなかった。剖検時の所見から、本検体は、重大な毒性（発がん等）引き起こさないと考えられた。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、並びに安全性未審査の遺伝子組換え作物（ダイズ、コメ）の定性試験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った。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及び高機能食品の開発に関する研究

国際動向および組換え微生物の安全性に関する研究

主任研究者 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。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。協力研究者の吉倉は2005年9月19日から23日にかけて千葉の幕張メッセで開催されたcodexにおける組換え食品のタスクフォースの議長を務めた。討議するガイドラインは組換え動物に決まったが、組換え植物指針を組換え動物指針に書き換えるに当たっては、植物と動物の基本的な生物学的な差（特に代謝経路の違い）に十分考慮すべきである。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、参加国の意見の調整と議事進行を行う。実験としては、組換え微生物を利用した食品の安全性を評価する上で、微生物において特に重要と思われる、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、具体的な安全性評価やその手法を提供し、標準的な評価方法の提供を試みる。

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、あるいは

公開される資料の収集を行い、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。分担としては主に微生物組換えを対象とした。

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。*in vitro*での伝達は、Sasakiらの方法を基に検討し、高頻度に伝達を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、免疫については、マウスを用いて個体レベルの評価を行った。モデル組換え体としては、昨年度作出した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。組換えにより発現した遺伝子産物の生体への影響と、精製した蛋白と宿主乳酸菌の共存による生体影響を比較することにより、遺伝子組換えによると思われる生体影響の評価を試みた。

(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

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。協力研究者の吉倉は、2005年9月19日から23日にかけて千葉の幕張メッセで開催された codex における組換え食品のタスクフォースの議長を務めた。この会議では、このタスクホースで議論するテーマにつき議論し、まず遺伝子組換え動物のガイドライン作りを行うことが決まった(吉倉は別に報告書を作成した)。

遺伝子の漏出に関する検討: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 $\beta$ 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。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、すべての組換え体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。マウス免疫系への影響は、モデル組換え体をマウスに投与し、生体への影響につき調べた。組換えにより発現した遺伝子産物の生体への影響と、精製した蛋白単独、あるいは宿主乳酸菌の共存による生体影響を比較することにより、遺伝子組換えによると思われる生体影響の評価を試みた。

#### D. 考察

codex 総会に於いて、組換え食品に関するタスクフォースを再開し、日本政府が議長国として提案文書を作成する事となり、吉倉はこのタスクフォースで議長として活動を開始した。第一回の会議では、組換え動物についてガイドライン作成を行うことが決まった。動物固有の問題があり、これまでの植物や微生物ガイドラインと同様な議論が可能であるかどうかといったところから検討がされる(別途報告書作成)。

一方、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、組換え植物と異なり、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。組換え微生物のガイドラインでは、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。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、これ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、他の腸内生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。

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継続した。宿主遺伝子上への組み込みには、相同組換えによる方法を試みた。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、 $2.8 \times 10^{14}$  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。従って、宿主に相同組換えで組み込んだクローンについては、現在の試験系では、プラスミド単独組込のクローンと同様に検出限界以下と判定され、両者の差を確認することは出来ない。遺伝子組換え方法の違いによる遺伝子伝達を比較する場合の様な超低頻度で起こる遺伝子移行をどの様に評価するかは、依然定量的に測定することは困難で、今後新たな評価システムの構築が望まれる。

免疫系に対する影響に関しては、作出したモデル組換え乳酸菌の免疫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これまでに開発してきた。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、主にマウス免疫への影響について調べた。組換え乳酸菌は、組み込んだ遺伝子産物を菌体に結合して発現させてある。組換え体に発現している抗原とほぼ等しい量の精製した蛋白、その 10 倍量の蛋白で免疫を行い、組換えにより菌体に結合させたことによる免疫効果の違いについて評価を行ったところ、免疫効果は高まることが示された。

## E. 結論

吉倉は、再度 codex 部会の議長として、新しく開始された部会で最初に検討するテーマを組換え動物のガイドライン作成とした。

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。モデル組換え乳酸菌のマウスへの免

疫実験において、遺伝子組換えにより、抗原を菌体表層に固定発現することにより、免疫系への刺激が増大することを確認した。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 五十君静信。(2005) 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。
- (2) 五十君静信。(2006) 組換え微生物の安全性と乳酸菌。乳酸菌ニュース。No. 451新年号：7-10。
- (3) 五十君静信。微生物および食品添加物としての安全性評価。新しい遺伝子組換え体 (GMO) の安全性評価システムガイドブック 食品・医薬品・微生物・動植物。エヌ・ティー・エス。P274-280。2005年4月。東京
- (4) 五十君静信、梶川揚申、浅井美里、佐藤英一。乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン。P. 149-155。光岡知足編 腸内フローラと感染・免疫。学会出版センター。2005年10月

2. 学会発表

- (1) 五十君静信。組換え微生物の安全性を考える。第9回腸内細菌学会特別講演。2005. 5. 27東京
- (2) Kajikawa A, Asai M, Satoh E, Yamasaki M, Kim T, Yamamoto S, and Igimi S. Protective immunity against *Listeria monocytogenes* by recombinant *Lactobacillus casei* expressing listeriolysin O. 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria. 2005. 8. 28. The netherlands.
- (3) 梶川揚申、佐藤英一、山崎学、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信。サルモネラ鞭毛抗原を発現する組換え乳酸菌による感染防御免疫の誘導。第79回日本細菌学会総会。2006年3月29日。金沢市。

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

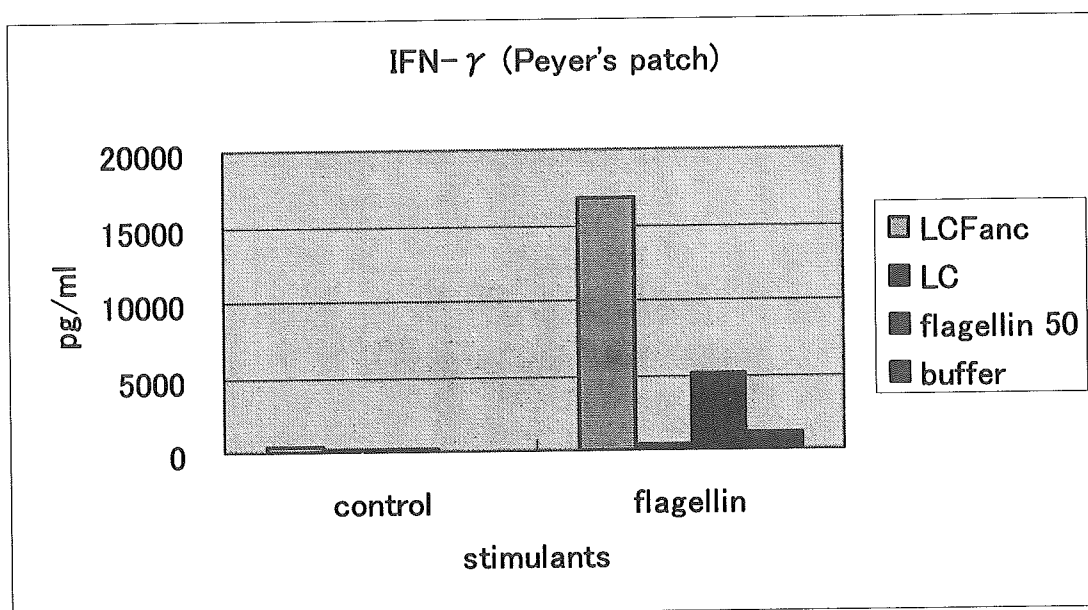
2. 実用新案登録

なし

3. その他

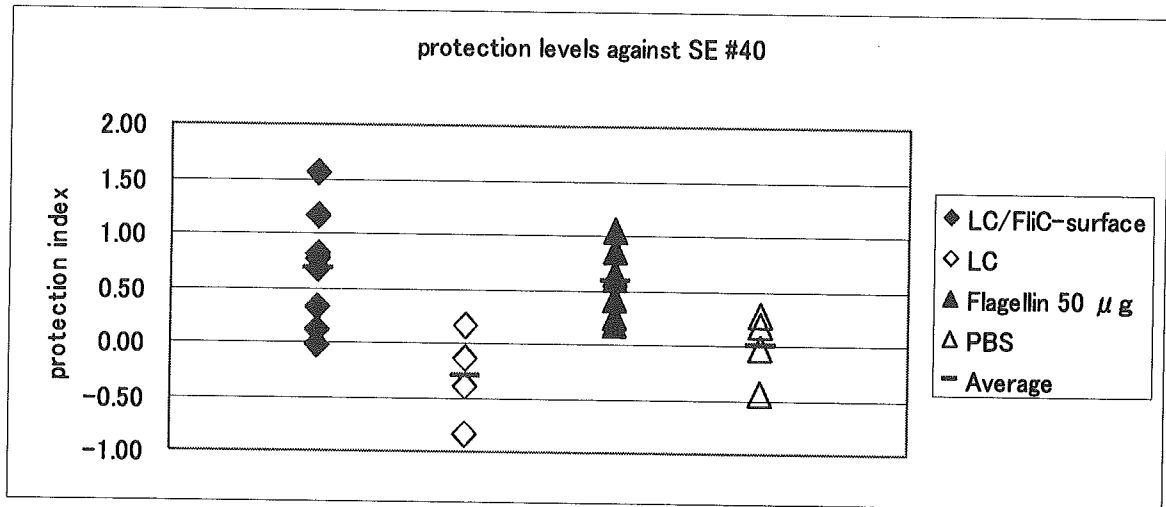
なし

図1. 組換え乳酸菌の免疫による IFN $\gamma$  誘導



マウスを免疫後、パイエル氏板を取り出し培養後、精製抗原で抗原刺激を行い、細胞からの IFN $\gamma$  の産生を調べた。免疫は、鞭毛抗原発現乳酸菌、宿主乳酸菌、精製鞭毛 50 マイクログラム、緩衝液のみの 4 群で行った。左は、刺激を与えないコントロール、右は精製鞭毛で刺激後の IFN $\gamma$  誘導を示す。組換え乳酸菌菌体表層に固定化した鞭毛抗原は、推定タンパク量の 10 倍相当の精製鞭毛で免疫した場合より、はるかに強い IFN $\gamma$  産生を示した。

図2. マウスへの組換え乳酸菌の免疫によるサルモネラ感染予防効果



マウスに、サルモネラ鞭毛を菌体表層に固定発現させた組換え乳酸菌、宿主乳酸菌、鞭毛精製抗原および緩衝液のみの4群につき、胃内投与により免疫した。免疫後、サルモネラ強毒株を胃内投与により感染させ、感染6日目に脾臓内の菌数により感染防御効果を調べた。防御計数は、非免疫群の菌数の対数－免疫群の菌数の対数で示した。菌体に固定化した鞭毛抗原は、その10倍量の精製抗原とほぼ同等の免疫効果が得られた。



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  
国際動向に関する研究（Codex 組換え食品タスクフォース）  
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

Codex 組換え食品タスクフォースで組換え動物の指針を作成する事となった。FAO/WHO エキスパートコンサルテーションは動物の指針は組換え植物指針と基本的に同じに作成してよいと云う判断であったので、その検証を行った。結果、植物と動物との生物学的な違いを反映し、非意図的改変の影響内容は大きな違いがあり、再考の必要のある事がわかった。

協力研究者

吉倉 廣 国立感染症研究所 前所長

力はない。植物の作った炭水化物、脂肪、蛋白質を、そのまま、或いは、変換し、利用するだけである。

A. 研究目的

組換え動物の食品安全性指針作製の為の基礎調査と指針作成への提言を行う。

3. ビタミンの由来: ビタミンは動物から由来するものも含め、最終的には植物又は腸内微生物に由来する（ビタミンAやビタミンDは夫々植物のカロテンやエルゴステリンが動物体内で変換され出来たもの）。

B. 研究方法

Web サイト及び関係総説を利用した文献検索。

4. 植物代謝経路: 植物又は微生物の代謝産物は、一次代謝産物 primary metabolites と二次代謝産物 secondary metabolites に分けられる。一次代謝産物とは全ての植物に共通して存在し、植物に基本的なものである。これに対し二次代謝産物は、植物の自己防衛や繁殖に関わるもので、植物毒は自己防衛に、植物色素や香料は繁殖に寄与する。しかし、一次、二次代謝産物は代謝経路を共有し得るので、代謝系に関与する遺伝子の導入は毒性のある二次代謝産物の発

C. 研究結果及び考察

1. 植物と動物の成分の違い: 植物と動物では構成成分が大きく異なる（表: 成分表）。植物では炭水化物が7割(大豆では30%)であるが、動物では1%以下である。
2. 植物と動物の代謝経路の違い: 植物は、光合成を利用し、炭水化物、脂肪、蛋白質を合成 (synthesis) するが、動物にはその能

現増加があり得る。動物にはこれらに該当する代謝経路はない。

5. 動物の毒:動物は有機重金属や変異原物質、発がん物質(そのまま或は代謝修飾)を蓄積する。これを食すればこれらの物質による障害が現れる。又、食物連鎖の下流にある動物ではその蓄積が大であり、より食品としてのリスクは高くなる。ふぐ毒や貝毒は共生微生物が産生する毒素が肝臓卵巣等に蓄積したものである。Western Colombiaに生息する毒蛙(*Phylllobates terribilis*)は猛毒のBatrachotoxinを体表から分泌するが、この毒素を産生する植物を食った蟻その他の昆虫を蛙が捕食した為(隔離して飼うと毒素を出さなくなる)で、本来は植物由来である。動物が有する有毒物質は動物が摂取した物質そのもの、或は、その代謝産物である。植物の二次代謝産物由来の毒物のように体内の複雑な合成経路を経て産生されたものではない。

6. 動物のホルモン:3種類の化学的に異なるものがある。蛋白質・ポリペプチド性のもの(ACTH、成長ホルモン、甲状腺刺激ホルモン等多数)、アミノ酸誘導体(サイロキ

シンなどの甲状腺ホルモン、カテコラミン、エピネフリン、ドパミン、等)、ステロイドホルモンである。動物を食する場合、蛋白質・ポリペプチドホルモンは消化酵素によりアミノ酸に分解されるが、ステロイドホルモンは脂質として吸収され、アミノ酸誘導体ホルモンも吸収され安全性評価の対象となり得る。

#### E. 結論

組換え植物指針を組換え動物指針に書き換えるに当たっては、植物と動物の基本的な生物学的な差(特に代謝経路の違い)に十分考慮すべきである。

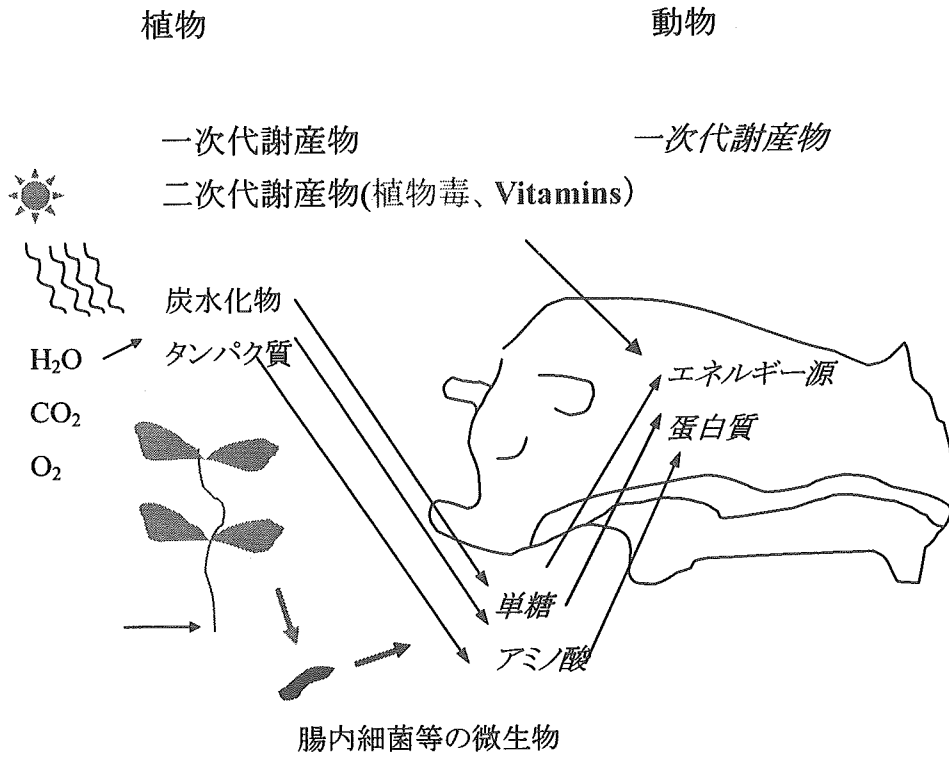
#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

特になし

# 栄養サイクル図



平成 17 年度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、インターネットを用いて収集を行った。米国、カナダにおいて Aqua Bounty Technologies Inc. が食品として申請している遺伝子組換え魚類について、許可はおりていない。また、中国においても食品として遺伝子組換え魚類の安全性評価をしている、との論文が報告された。また、セルフクロニングした autotransgenic の魚も作られているようである。中国からは種苗も生きてままする可能性があるため、今後とも開発動向に関して注意が必要である。

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

A. 研究目的

昨年度までにサケ・マス類の遺伝子組換え魚作出の研究を中心に紹介してきた。その中で、発展途上国や社会主義国の情報は論文以外に収集するのが難しいことがわかった。しかし、これらの国々の中にも遺伝子組換え魚の研究を行っている国があり、その代表例として、キューバと中華人民共和国（以下、中国と呼称）があげられる。キューバではアフリカ原産であるティラピアに成長ホルモン遺伝子を導入した遺伝子組換えティラピアを作出しており、中国ではコイやドジョウを使って遺伝子組換え魚類の研究を行っている。ティラピアは日本でも養殖している業者があったが、最近の生産量は低下している。また、キューバのティラピアが日本に輸入されることは無いと思われるので、問題になることはないのではないか。一方、中国からは淡水魚を輸入していることから、非意図的に混入することなども考えられ、情報を収集しなければならない。そこで、中国を中心に遺伝子組換え魚の研究を調査する。また、遺伝子組換え大西洋サケについても引き続き情報を収集する。

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

1) 遺伝子組換え大西洋サケに関する情報

Aqua Bounty Technologies Inc. は不凍性タンパクプロモーターの下流にマスノスケの成長ホルモン cDNA 遺伝子をつなげた発現ベクターを使って大西洋サケを中心にサケ・マス類、ティラピアに導入し遺伝子組換え魚を作っている会社である。数年前までは Aqua Bounty Farms という呼称で呼んでいたが、最近社名を変更して、それまでに別個で呼称していた研究所や養殖場をそれぞれ Aqua Bounty Pacific と Aqua Bounty Canada とし、まとめて Aqua Bounty Technologies Inc. と変更したようである。引き続き A/F Protein 社の子会社として存在し、遺伝子組換え魚の飼育・維持を行っている。同社で飼育している遺伝子組換え大西洋サケは 1989 年にマイクロインジェクションによって作出したもので 1991 年に非組換え大西洋サケと交配して F1 を作出して以来、3 年で世代交代を繰り返し、現在 F5 世代になっているということである。同社はすでに米国とカナダで遺伝子組換えサケの商業利用を申請している。米国では FDA の Center for Veterinary が新規動物医薬品と見なし、審査を実施している。カナダでは Health Canada と Canadian Food and Inspection Agency が新規食品としてカナダ食品医薬品条令のもとで、食品としての安全性を審査している。また、環境に対する安全性は Environment Canada と Department of Fisheries and Oceans Canada がカナダ環境保護条令のもとで審査を実施しているとのことである。遺伝子組換え大西洋サケに関しては米国特許（特許 NO. 5545808）の中に詳しく記述されている。本特許情報によると下記の 4 種類のプライマーで