

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

**モダン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18年度 総括・分担研究報告書

(H18-食品-004)

主任研究者 西島 正弘

平成19年3月

目次

I. 総括研究報告書

モダン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

西島 正弘 1

II. 分担研究報告書

1. 国際動向（Codex 組換え食品タスクフォース）に関する調査

組換え微生物の国際動向、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

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究

薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究

西島正弘 8

2. 遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究 (1) ~ (3)

小関 良宏 54

3. 遺伝子組換え体の検知技術の開発に関する調査研究

米谷 民雄 65

4. 遺伝子組換え体のアレルギー性評価に関する調査研究

手島 玲子 93

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 113

厚生労働科学研究費（食品の安心・安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

モダン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 西島正弘

研究要旨

モダン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、3 分担研究者を中心として、16 機関にわたる研究グループを組織した。1)モダン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（組換え魚、組換え微生物、組換え薬用植物等の動向調査）、ならびに、組換え魚、組換え微生物、組換え動物の安全性研究に資するためのモデル組換え体の開発、安全性評価へのポストゲノム手法の導入の検討、アレルギー性試験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

B.研究方法

モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性評価のためのポストゲノム手法を用いる非意図的生成物の解析のための研究を小関班員、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が三菱化学安全科学研究所で、Codex の国際動向に関する調査、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する調査研究が国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部で、遺伝子組換え魚、遺伝子組換え(GM)薬用植物に関する文献調査が独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所並びに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

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受け遂行されるもので、第一世代のバイオテクノロジーを応用した食品の安全性に加え、第二世代のモダン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。

波研究部で、遺伝子組換え動物の開発並びに調査研究が広島大学生物圏科学研究科で行われ、主任研究者がとりまとめを行った。

C.結果と考察

リスクコミュニケーションに関する調査研究:

第二世代の遺伝子組換え食品（GM 食品）の認可状況および認可の際の評価に関する情報を収集し、安全性の側面から第一世代とは異なるコミュニケーションが必要となった事例があるかどうかを検討した。また、現在開発中の第二世代の GM 食品としてゴールデンライス为例にとり、最近 FAO/WHO から発表されたマニュアルをもとに、第二世代の GM 食品のリスク・コミュニケーションの留意点について検討した。リスク・コミュニケーションでは、科学的側面のみでなく、それ以外の側面からのコミュニケーションも重要である。特に第二世代の GM 食品のリスク・コミュニケーションでは、リスクと便益の均衡も含めた幅広いコンテキストでのリスク・コミュニケーションが必要であり、マニュアルの原則に沿った戦略的アプローチが必要である。このような幅広いリスク・コミュニケーションを行うこと、およびそれを誰が担っていくかが、GM 食品の今後を考える上で重要であると考えられた。

Codex の国際動向に関する調査、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する調査研究:

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 2006 年 11 月 29 日から 31 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。昨年度の調査結果を利用することにより、主として科学的判断に準拠した組換え動物指針が Codex タスクフォースで合意の運びとなった。組換え動物の議論で、既存指針と過去の議論を適切に議論の場に持ち込む事が、合意形成上効果的な手法である事が実証された。栄養改変植物のリスク評価、及び未承認食用組換え植物の微量混入のリスク評価が来年度の Codex 組換え食品タスクフォース議長としての研究課題となった。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る、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。組換え微生物に関する国際的な議論では、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項目として、腸内菌叢に対する影響、組換え遺伝子の移行、ヒトや動物の免疫系への影響などがある。本年度は、モデル乳酸菌組換え体を用いて、実験動物における免疫系への影響を調べる評価系につき検討した。遺伝子産物である当該タンパク質の量が同じ場合、遺伝子組換えにより乳酸菌に組み込み発現させた場合と、乳酸菌と精製した当該タンパク質を単純に混和した場合に於いて、その免疫誘導は異なり、細胞性免疫の誘導で、前者が相乗的に高い効果を示すことが明らかとなった。これまで、組換え体の安全性評価では、宿主の性質に加えて、遺伝子組換えによりあらたに発現したタンパク質は、一般的には相加的に働くであろうという立場で安全性を評価してきた。本年度の研究成果は、遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、相乗的に働くことがあることを示し、組換え微生物の安全性評価に於いては、このような点を考慮する必要があると思われた。

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。

1985年に最初の遺伝子組換え魚類に関する論文が報告されて、今年で22年目を迎える。この間、35種を超える魚介類で遺伝子組換えの報告がされた。研究当初は組換え魚介類を作出したという報告が多かったが、最初の報告から20年以上が過ぎて、成長の促進を確認したという報告から、遺伝子導入された個体の生理・生態学的研究が報告されるようになった。生殖生理、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り、最近では遺伝子組換え魚類を用いたマイクロアレイの結果も報告された。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予測する知見となるなど、遺伝子組換え魚のリスク評価の基礎となるものである。

しかし、食品としての遺伝子組換え魚介類を評価したという報告は少ない。今までにキューバのグループが報告した遺伝子組換えティラピアを食べさせたボランティアの血液性状の変化を観察した報告と中国で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、という報告だけである。

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てきたことにより、リスク評価を行う際に、具体的にどのような項目を調査した方がよいか、より具体的な検討がなされる状況になってきた。

今後、引き続き新しい遺伝子組換え魚介類の作出に関する情報を収集するとともに、市場に出回ることが想定される成長ホルモン遺伝子を導入した魚介類の安全性について情報を収集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：

薬用遺伝子組換え (GM) 植物の範囲を、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、2005 年の 82.00 エーカーから 2006 年の 198.36 エーカーへと 2.4 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、ペニバナ、イネ、オオムギ、エンドウが含まれていた。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 種類を設定し、それぞれの一覧表を作成した。2006 年に公表・出版された論文等をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、機能性食品 18 件、食用ワクチン 17 件、食用医薬 3 件、ワクチン抗原 6 件、抗体医薬 12 件、治療薬 3 件であり、薬用 GM 植物研究開発の中でも、特に機能性食品、食用ワクチンの開発が盛んである状況が伺え、食用ワクチン開発研究の多くは、日本近隣の台湾、中国、韓国の 3 カ国の研究であった。本研究結果から、薬用 GM 植物による医薬品類の生産は、特に機能性食品及び食用ワクチンが活発であり、欧米だけ

でなく、アジアでも盛んとなっていることが伺えた。

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究

平成18年度は、ニワトリを本研究の遺伝子組換え動物のモデルとして、鶏卵成分中のアレルゲンタンパク質を改変した遺伝子組換えニワトリを作出するために必要なターゲティングベクターの開発を行った。具体的には、鶏卵成分中の食物アレルギー誘発頻度が最も高く、また物理化学的安定性が高く変性除去が困難なオボムコイドを標的とし、このタンパク質を遺伝的に除去(ノックアウト)もしくはアレルゲンエピトープを改変するためのベクターの作出を行った。ベクターの構築のために、ニワトリゲノムからオボムコイド遺伝子座のクローニング、コンティグを作成後、null型(開始コドンに変異)改変配列の準備、またオボムコイドのアレルギー反応に最も重要とされる2箇所のアミノ酸残基に変異を導入したエピトープ改変配列を準備した。さらにこれらの配列には、薬剤耐性遺伝子配列と改変配列を視覚的に追跡できるようにEGFP(緑色蛍光タンパク質)をそれぞれ付加した配列を準備し、最終的にこれらの配列をDT-A(ジフテリア毒素A鎖)遺伝子配列を付加したベクターに挿入し、最終的なターゲティングベクターを構築した。

遺伝子組換え体の安全性に関するポストゲノム手法導入のための調査研究:

(1) 遺伝子組換え体のトランスクリプトーム解析手法の検討

現在実用化されている遺伝子組換え食品は農作物が主であるが、その他の畜産物も上梓されるのも目前に迫っており、それらについても安全性評価の検討が必要である。現在の安全性評価において用いられている標的を定めた特定成分の分

析に対し、遺伝子組換えによる非意図的影響をより広範に分析する方法として、近年ポストゲノム技術として著しい進歩を遂げた標的を定めないプロファイリング技術による網羅的な分析をする方法が期待される。本研究では、実際に栄養改変型遺伝子組換え植物由来の食品、遺伝子組換え動物由来の食品を入手してポストゲノム手法であるトランスクリプトーム、プロテオームおよびメタボローム解析を行い、遺伝子組換えによる非意図的遺伝子組影響をこれら手法を用いて解析するための導入条件を検討することを目的としている。今年度は、遺伝子組換えあまごをモデル体として研究を行った。まず、トランスクリプトーム解析結果について記す。あまごからのRNA抽出法について検討した後に、非組換え体1年齢、2年齢、組換え体1年齢各4個体のあまごの背肉からRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行った。DNAチップはその他の遺伝子組換え魚についても汎用的に用いることができるかもあわせて検討するために、魚類のモデル生物であるゼブラフィッシュのものを用いた。搭載遺伝子数は42,065、プローブ長は60塩基であった。マイクロアレイの結果、すべての遺伝子についてシグナルが得られ、あまごサンプルにおいて統計学的な解析が十分可能であると考えられた。非遺伝子組換え体1年齢、2年齢、遺伝子組換え体1年齢において遺伝子発現量の多寡に偏りは無く、遺伝子組換えによって遺伝子発現に劇的な変化が起こっている可能性は非常に低いことが示唆された。

(2) 遺伝子組換え体のプロテオーム解析手法の検討

さけ成長ホルモンをコードする遺伝子を導入したあまごと非遺伝子組換えあまごを用いて、それぞれの発現タンパク質の違いをプロテオーム

解析により比較検討を行った。トランスクリプトーム解析の時と同様、非組換え体1年齢、2年齢、組換え体1年齢それぞれ各4個体を1つのグループとし、3つのグループ間のプロファイルの比較検討を行った。遺伝子組換えアマゴのグループと、非組換えグループの間で、89.5%のスポットが共通して検出され、残りの10.5%に相当するスポットが遺伝子組換えアマゴのグループのみで検出された。これら遺伝子組換え体のみで検出されたタンパク質が特定の発達ステージに発現するタンパクである可能性も考えられ、遺伝子を組換えることにより、新たな遺伝子発現を誘発したかどうかについては、より詳細なプロファイリングをする必要があると考えられた。

(3) 遺伝子組換え体のメタボローム解析手法の検討

メタボローム解析としては、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) を用いた組換えアマゴの代謝産物の一斉解析を行なった。

具体的には、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、遺伝子組換えアマゴ (1年齢) と非組換えアマゴ (1年齢、2年齢) のメタボロームを ESI 陰イオンモードおよび陽イオンモードで比較した。組換え・非組換えによるメタボロームの差はみられなかったが、遺伝子組換えアマゴ (1年齢) と非組換えアマゴ (2年齢) のメタボロームには類似性が認められた。すなわち、成長遺伝子の組換えによりアマゴの成長が促進され、遺伝子組換え1年齢アマゴ肉は非組換え2年齢アマゴの肉に類似した成分構成となっていると推察された。

組換え食品の検知法に関する研究：

多様な遺伝子組換え食品の検知技術の開発を行い、検知技術の応用性、適用性について検討を行うために、以下の6項目につき研究を行った。

(1) 安全性未審査遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) を対象とした検知技術の開発

安全性審査に諮られていない遺伝子組換えコメ (LLRice601 系統) を対象とした検知技術として、コメに特化した簡便な DNA 抽出法を開発した。また、開発会社から提供された real-time PCR の原理に基づく方法の改良及び、新規の結果判定法の開発により、LLRice601 系統を正確に検知することが可能となった。さらに、本技術の妥当性を2分析機関による共同試験によって確認した。

(2) 中国産安全性未審査遺伝子組換えコメ (Bt rice) の検知技術の検討

EU で中国産安全性審査遺伝子組換えコメがビーフン等の加工品に流通していた事実が報道された。そこで遺伝子組換えコメが使われているビーフンを手し、DNA 抽出法、DNA 解析を行った。その結果、当該ビーフンには GM Shanyou 63 系統である Bt コメが混入されていることが明らかとなった。またその解析結果をもとに PCR 法を用いた米粉及び米を含む加工品中の Bt63 米の定性検知法を開発した。

(3) LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法の確立

LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシ定量分析法について改良を行った。分析試料であるゲノミック DNA に超音波処理および制限酵素処理を組み合わせることで、プラスミド DNA とゲノミック DNA の PCR 効率を一致させることが可能となった。さらに PCR 試薬、

PCR 温度条件の検討と併せて検討し、繰り返し再現性良く遺伝子組換えトウモロコシ(MON810)を定量可能な分析法を確立した。

(4) 試験所間試験による遺伝子組換えダイズ定性試験法の妥当性確認

GM ダイズ 1 系統 (RRS) の定性検知技術について、その妥当性を確認することを目的とした。国内 14 機関の参加の下、試験所間試験を行い、その結果を集計・解析したところ、RRS の定性分析法の検知下限は 0.1%であることが示され、妥当性の検証がなされた。

(5) 既知遺伝子組換え作物に関するデータベースの整備

インターネット上に公開されているデータベースを精査することにより、これまでに開発された遺伝子組換え作物の作物種、付与された形質の種類、作出方法及び、形質発現のために使用されたシスエレメントの種類に関する様々な情報を整理、蓄積した。

(6) トウモロコシ加工食品からのDNA抽出精製法の検討

DNA抽出精製法の効率化を目的とし、現行のトウモロコシ加工食品の試料調製法について比較検討を行った。その結果、乾燥状態のトウモロコシ加工食品については、試料調製法に厚労通知法の乾式法を適用することにより、作業効率の改善が可能となった。また、DNA抽出精製法については、厚労-Gtip法を種々のトウモロコシ加工食品に適用することにより、抽出操作の簡略化および経費削減が可能となった。

組換え食品のアレルギー性に関する研究：

平成18年度は、モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関するアレルギー性評価に関

する調査研究として、(1)成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごを用いたアレルギー試験、(2)食物アレルギー動物モデルを用いた評価、(3) エピトープ情報を加味したバイオインフォマティクス手法によるタンパク質のアレルギー性を予測するためのデータ解析手法の検討、並びにアレルギーデータベース(ADFS)の更新を行った。具体的には、(1) 成長ホルモンを導入した遺伝子組換えあまごと非組換えあまごを用いて、アレルギー蛋白質の量的、質的変動をアレルギー特異的抗体並びに魚アレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。主要アレルギーである parvalbumin (12kD), collagen(140kD)に組換えに伴う量的、質的変動はみられず、GAPDHと思われる41kDタンパクにもアレルギー性に変化はみられなかった。

(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ギー(卵白アルブミン)、非アレルギー物質(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い、アレルギー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、遺伝子組換えおよび非組換えあまごの感作実験から、抗原特異的 IgG1 抗体の検出頻度は同等であり、両者のアレルギー性は同等であると考えられた。(3)アレルギー予測の解析法では、(i) 既知のアレルギーとの相同性の比較方法 -既知のアレルギーに特徴的なアレルギーユニーク断片(AUF)のインデックスを用いたアレルギーエピトープ予測法の検討を開始した。(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ギーデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新

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 1366, エピトープ既知のアレルゲン 82 種を搭載した。また、タンパク質のアレルゲン予測機能である、FAO/WHO 法 (Hileman らの方法) と motif-based 法 (Stadler らの方法) の更新を行った。

D. 結論

第二世代にあたるモダン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、安全性評価に資するための研究として、成長ホルモンを導入した遺伝子組換えアマゴを用いて、非意図的影響を知るためのポストゲノム手法並びにアレルギー性に関する安全性評価手法の高度化を図った。また、遺伝子組換え食品の検知については、安全性未審査の遺伝子組換え作物 (LLRice601、中国産BT63米) の定性試験法を開発した。リスクコミュニケーションに関する調査研究では、第二世代のGM食品のリスクコミュニケーションのあり方につき検討を行った。さらに、組換え微生物を用いた食品や遺伝子組換え魚、遺伝子組換え動物、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、第一世代 GM 食品ばかりでなく、第二世代 (いわゆるモダンバイオテクノロジー応用) GM 食品の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。

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、組換え動物、栄養改変植物のリスク評価、未承認食用組換え植物の微量混入のリスク評価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。

分担研究報告書（平成 18 年度）

国際動向（Codex 組換え食品タスクフォース）に関する調査

分担研究者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨：昨年度の調査結果を利用することにより、余り科学から離れない組換え動物指針が Codex タスクフォースで合意の運びとなった。組換え動物の議論で、既存指針と過去の議論を適切に議論の場に持ち込む事が、合意形成上効果的な手法である事が実証された。栄養改変植物のリスク評価、未承認食用組換え植物の微量混入のリスク評価が来年度の Codex 組換え食品タスクフォース議長としての研究課題となった。

協力研究者

吉倉 廣（Codex組換え食品タスクフォース議長）

A. 研究目的

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と云う判断であったが、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る事を昨年報告で指摘した。本年は動物由来組換え食品を含む Codex 組換え食品タスクフォースへの取り組みの為に種々の調査を行った。

B. 研究方法

Web サイト及び関係総説を利用した文献検索と考察。

（倫理面への配慮）

本調査には、倫理に関する内容は含まれない。

C. 研究結果

1. 組換え動物由来食品の安全性議論については、昨年度の調査を 2 回に亘る作業グループの議論に反映させ（初回会合で動物と植物の代謝経路の違いに関するプレゼンテーションをした）、動物由来組換え食品安全指針として、科学的にあまり問題のない所でタスクフォースの合意に至った。唯一議論として残されたのは、抗生物質耐性マーカーに関する数パラグラフである。これは、FAO/WHO のコンサルテーション結果を待って議論すべし、と云う強い欧州連合の意見によるものである。実際、

抗生物質耐性マーカーが組換え動物個体で発現すると、例えば、汎用されているネオマイシン耐性遺伝子産物はネオマイシンを不活性化するので、組換え動物にはこのような抗生物質が効かなくなる可能性がある。

2. 組換え動物の議論で、倫理等の議論が難航したが、OIE 指針と植物指針での過去の議論を議長として適切に指摘する事により、効率的な合意形成が可能となった。既存指針と過去の議論を適切に議論の場に持ち込む事は、合意形成上効果的な手法である事が実証された。

D. 考察

タスクフォースで新たに提起されたテーマとしては、栄養改変植物と未認可組換え植物由来食品の微量混入の 2 つがある。栄養改変植物は、従来食品に加えてどのような組換え固有の問題があるか、現在の植物指針で何処が不足か、と云う点が明確でなく議論の迷走が予想される。微量混入は、輸出国側、輸入国側いずれも問題を抱えており、情報交換と基本条項に限ったリスクアセスメントのバランスのバスターを本体とする提案がどの位合意に達するかは予断を許さない。来年度の研究テーマとして考えたい。

E. 結論

昨年度の調査結果を利用することにより、あまり科学から離れない組換え動物指針が Codex タスクフォースで合意の運びとなった。栄養改変植物のリスク評価、未承認食用組換え植物の微量混入のリスク評価が来年度の研究課題である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書（平成 18 年度）

組換え微生物の国際動向、安全性に関する研究

分担研究者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨：組換え微生物に関する国際的な議論では、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項目として、腸内菌叢に対する影響、組換え遺伝子の移行、ヒトや動物の免疫系への影響などがある。本年度は、モデル乳酸菌組換え体を用いて、実験動物における免疫系への影響を調べる評価系につき検討した。遺伝子産物である当該タンパク質の量が同じ場合、遺伝子組換えにより乳酸菌に組み込み発現させた場合と、乳酸菌と精製した当該タンパク質を単純に混和した場合に於いて、その免疫誘導は異なり、細胞性免疫の誘導で、前者が相乗的に高い効果を示すことが明かとなった。これまで、組換え体の安全性評価では、宿主の性質に加えて、遺伝子組換えによりあらたに発現したタンパク質は、一般的には相加的に働くであろうという立場で安全性を評価してきた。本年度の研究成果は、遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、相乗的に働くことを示し、組換え微生物の安全性評価に於いては、このような点を考慮する必要があると思われる。

協力研究者

吉倉 廣（Codex組換え食品タスクフォース議長）
五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所室長）

A. 研究目的

遺伝子組換え食品に関する国際的な議論に関する情報収集を行い、組換え体の安全性に関する国際的な動向を掌握すると共に、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、組換え遺伝子の移行、ヒトや動物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検討し、標準的な評価方法の提供を試みる。

B. 研究方法

モデル乳酸菌組換え体を用いて、実験動物における免疫系への影響を調べる評価系の開発を検討した。

1. モデル組換え体の作出

モデル組換え体として、サルモネラの鞭毛抗原を組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。宿主の *Lactobacillus casei* ATCC393 株は、サルモネラ鞭毛抗原 (FliC) をコードする遺伝子 *fliC* を組み込んだ pLP401 ベクターを用い、エレクトロポレーション法にて形質転換した (Fig. 1)。このベクター

を用いると、鞭毛抗原は乳酸菌菌体表層に固定化して発現するが、菌体表層への発現は、鞭毛抗原特異的な抗体を用いた facs による評価の後、western-blot 法により、精製鞭毛抗原を対照として定量的に発現量を評価した (Fig. 2)。サルモネラ鞭毛抗原は、遺伝子供給元のサルモネラ・エンテリティディス SE40 株を LB 培地で増菌後、定法により鞭毛を回収、精製した。

2. モデル組換え体のマウスへの投与による特異的抗体誘導の評価

モデル組換え体および精製抗原等は、Fig. 3 に示した投与スケジュールで免疫を行い、投与開始から 8 週間後に血液と糞便を採取し、ELISA 法により、鞭毛抗原特異的抗体の評価を行った。精製した鞭毛抗原に混入するおそれのある LPS の影響を受けないように、マウスは C3H/HeJ、8 週齢の雌を用いた。投与群は、Fig3. に示した 8 群で、各群 5~6 頭とした。

3. モデル組換え体のマウスへの投与による細胞性免疫誘導の評価

モデル組換え体および精製抗原等は、Fig. 4 に示した投与スケジュールで免疫を行い、投与開始から 8 週間後に腸間膜リンパ節と脾臓を摘出し、それぞれを細胞レベルまで分離し培養した。鞭毛抗原刺激の有無で 2 群に分け、72 時間培養した後、ELISA 法により、IFN- γ の産生量を測定した。

(倫理面への配慮)

免疫系への評価には実験動物を用いる。実験動

物を用いた実験は、動物愛護の精神に則り、必要最小限の実験に絞り、国立医薬品食品衛生研究所の実験動物に関する指針に従い実験を行った。

C. 研究結果

1. モデル組換え体の作出

モデル組換え乳酸菌は、鞭毛抗原を菌体表層に固定化し発現していることは、facsの結果（データ略）および、western-blotにより確認された。発現した鞭毛抗原は、培養上清には検出されず、ほぼすべてが菌体と結合していた（Fig. 2）。濃度を変えた精製抗原による比較から、モデル組換え乳酸菌は、 10^8 細胞当たり、25~50 ngの鞭毛抗原を発現していた。

2. モデル組換え体のマウスへの投与による特異的抗体誘導の評価

Fig. 3に示した免疫により、マウス糞便中に誘導された鞭毛特異的な分泌型IgAの測定結果は、Fig. 5に示した。精製した鞭毛抗原50 μ g投与群では、個体差は認められるものの、明らかな鞭毛抗原特異的分泌型IgAの抗体価上昇が観察された。組換え乳酸菌投与群では、菌数依存的な分泌型IgAの誘導の傾向が見られたが、抗体価のはっきりとした上昇はみられなかった。

血中の鞭毛抗原特異的IgGの誘導も、精製した鞭毛抗原50 μ g投与群で顕著に認められたが、その他の投与群では、抗体価の上昇はわずかであった（Fig. 6）。

3. モデル組換え体のマウスへの投与による細胞性免疫誘導の評価

Fig. 4に示した免疫により、マウスにおける細胞性免疫の誘導を評価した。鞭毛抗原特異的と思われるIFN- γ は、脾臓細胞（Fig. 7）と腸間膜リンパ節細胞（Fig. 8）共に、組換え乳酸菌で強く誘導された。腸間膜リンパ節細胞では、脾臓細胞に比べ、精製した鞭毛抗原でもIFN- γ を強く誘導した。

D. 考察

1. モデル組換え体の作出

モデル組換え乳酸菌は、サルモネラ・エンテリティディスの鞭毛抗原を菌体表層に固定化し発現しており、 10^8 細胞当たり、25~50 ngの抗原を発現していることが確認できた。マウスに経口投与で持ち込める乳酸菌数は、およそ 10^{10} 個程度であるので、経口投与で2.5~5 μ g程度の鞭毛抗原を持ち込めることが期待される。一方、一般的な精製抗原を経口投与した場合、100 μ g~ミリグラム程度のタンパク質がないと腸管局所に有効な

分泌型IgAの誘導や血中IgGの誘導は難しい。サルモネラの鞭毛は、抗原性が高く抗体の誘導が比較的良好であり、50 μ g程度で、抗体価の上昇が期待される。今回宿主に用いた乳酸菌*Lb. casei* ATCC393株には、菌体表層のペプチドグリカンに、免疫賦活化作用が報告されており、これまでに抗原量2.5~5 μ g程度相当の組換え乳酸菌 10^{10} 個の経口投与で、サルモネラに対する感染防御に必要な免疫誘導が得られるという結果が得られている。感染防御獲得には、抗体誘導や細胞性免疫の誘導に乳酸菌のペプチドグリカンによる相加効果では不十分で、相乗効果が働かないと免疫効果が得られないと思われた。

2. モデル組換え体のマウスへの投与による特異的抗体誘導の評価

マウス糞便中に誘導された鞭毛特異的な分泌型IgAの測定結果は、Fig. 5に示した様に鞭毛抗原投与群で明らかに上昇している。この群において、分泌型IgA誘導はマウス個体間のばらつきは大きい。これまでの経口ワクチンのマウス投与実験から、一般に経口免疫における分泌型IgAの誘導は個体間のばらつきが大きいことは知られており、抗原量の少ない場合、この程度のばらつきは一般的である。経口投与による鞭毛抗原の分泌型IgA誘導は、抗原量として50 μ g程度は最低必要で、安定した誘導はさらに多くの抗原量を必要とすることが確認された。組換え乳酸菌投与群では、投与菌数 10^{10} 個で、鞭毛抗原量は推定2.5~5 μ g程度であり、糞便中における分泌型IgAの誘導ははっきりしなかった。

血中の鞭毛抗原特異的IgGの誘導も、精製した鞭毛抗原50 μ g投与群で顕著に認められたが、その他の投与群では、抗体価の上昇はわずかである（Fig. 6）が、糞便中のIgAと比べ、さらに低いレベルの抗体誘導が特異的抗体価として測定されている。

今回免疫に用いた菌数の経口投与では、抗体価の誘導に関して、明かな相乗効果は確認されなかった。精製した抗原における抗体価の上昇から判断すると、経口投与による糞便中分泌型IgA抗体価および血中IgG抗体価に関しては、絶対量として鞭毛抗原50 μ g以上が必要であり、抗体誘導に関しては、持ち込む抗原量をさらに高めないと評価が難しいと思われた。

3. モデル組換え体のマウスへの投与による細胞性免疫誘導の評価

抗体価の誘導と異なり、細胞性免疫のメルクマールとして用いたIFN- γ は、脾臓細胞と腸間膜リ

ンパ節細胞共に、組換え乳酸菌で強く誘導されていた。マウス感染モデルにおいて、サルモネラの感染防御は主に細胞性免疫によると考えられているが、今回行った組換え乳酸菌の経口投与量で、感染防御効果は既に確認されている（データ未掲載）。この感染防御効果は、今回行った IFN γ の誘導結果により支持されるものと思われる。脾臓細胞、腸間膜リンパ節細胞において、いずれも乳酸菌投与群と精製鞭毛投与群共に、濃度依存的に IFN γ の誘導結果が得られた。

脾臓細胞においては、組換え乳酸菌投与群で顕著な IFN γ の誘導が観察された。組換え乳酸菌 10¹⁰ 個では、鞭毛抗原は、2.5~5 μ g 程度である。鞭毛抗原を発現していない乳酸菌と精製鞭毛 5 μ g を混和した群の IFN γ の誘導結果は、鞭毛抗原を発現していない乳酸菌投与群と精製鞭毛抗原 5 μ g 投与群の IFN γ の誘導結果の和にほぼ等しく、相加的な細胞性免疫誘導といえる。一方、組換え乳酸菌 10¹⁰ 個投与群では、これらにくらべ、有意に高い IFN γ の誘導の上昇がみられ、相乗的な細胞性免疫の誘導といえる。腸間膜リンパ節細胞においては、鞭毛抗原を発現していない乳酸菌と精製鞭毛 5 μ g を混和した群に比べ、組換え乳酸菌 10¹⁰ 個投与群では、約 5 倍の IFN γ の誘導がみられ、相乗効果と思われる免疫増強がより強く認められた。

E. 結論

モデル乳酸菌組換え体を用いて、実験動物における免疫系への影響を調べる評価系につき検討した。遺伝子産物である当該タンパク質の量が同じ場合、遺伝子組換えにより乳酸菌に組み込み発現させた場合と、乳酸菌と精製した当該タンパク質を単純に混和した場合に於いて、その免疫誘導は異なり、細胞性免疫の誘導で、前者が相乗的に高い効果を示すことが明かとなった。これまで、組換え体の安全性評価では、宿主の性質に加えて、遺伝子組換えによりあらたに発現したタンパク質は、一般的には相加的に働くであろうという立場で安全性を評価してきた。本年度の研究成果は、遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、相乗的に働くことがあることを示し、組換え微生物の安全性評価に於いては、このような点を考慮する必要があると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Igimi S, Yamasaki M, Yamamoto S and Amano F. An anti-*Salmonella* antibody prevents the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from infecting a human intestinal epithelial cell line, Caco-2, by interacting with flagella. *Bioscience & Microflora*. 25:117-119. 2006.
2. 五十君 静信。これからのプロバイオティクス：遺伝子組換え微生物の利用と安全性。アレルギーの臨床。26 巻 10 月号 (No. 351) : 855-860. 2006.
3. Kajikawa A, Satoh E, Leer RJ, Yamamoto S, Igimi S. Intragastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vaccine* in press
4. 五十君 静信。微生物における遺伝子組換え研究の意義と直面する問題。平成 18 年度日本農学会シンポジウム成果概要書。日本農学会。印刷中

学会発表

1. 梶川揚申、佐藤英一、山崎学、金台運、天野富美夫、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 10 回腸内細菌学会。2006 年 6 月

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

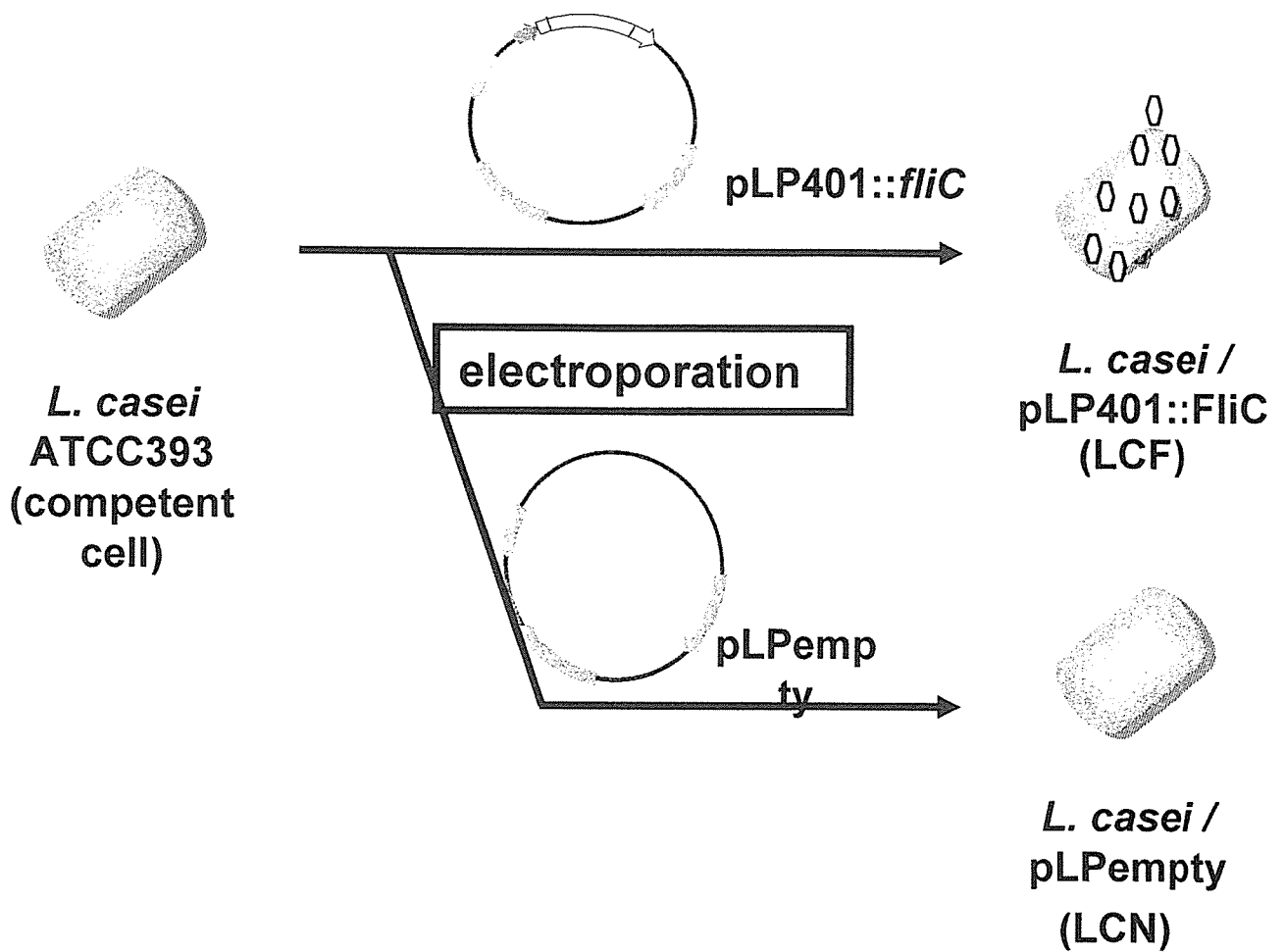


Fig.1. Transformation of *L. casei* ATCC393

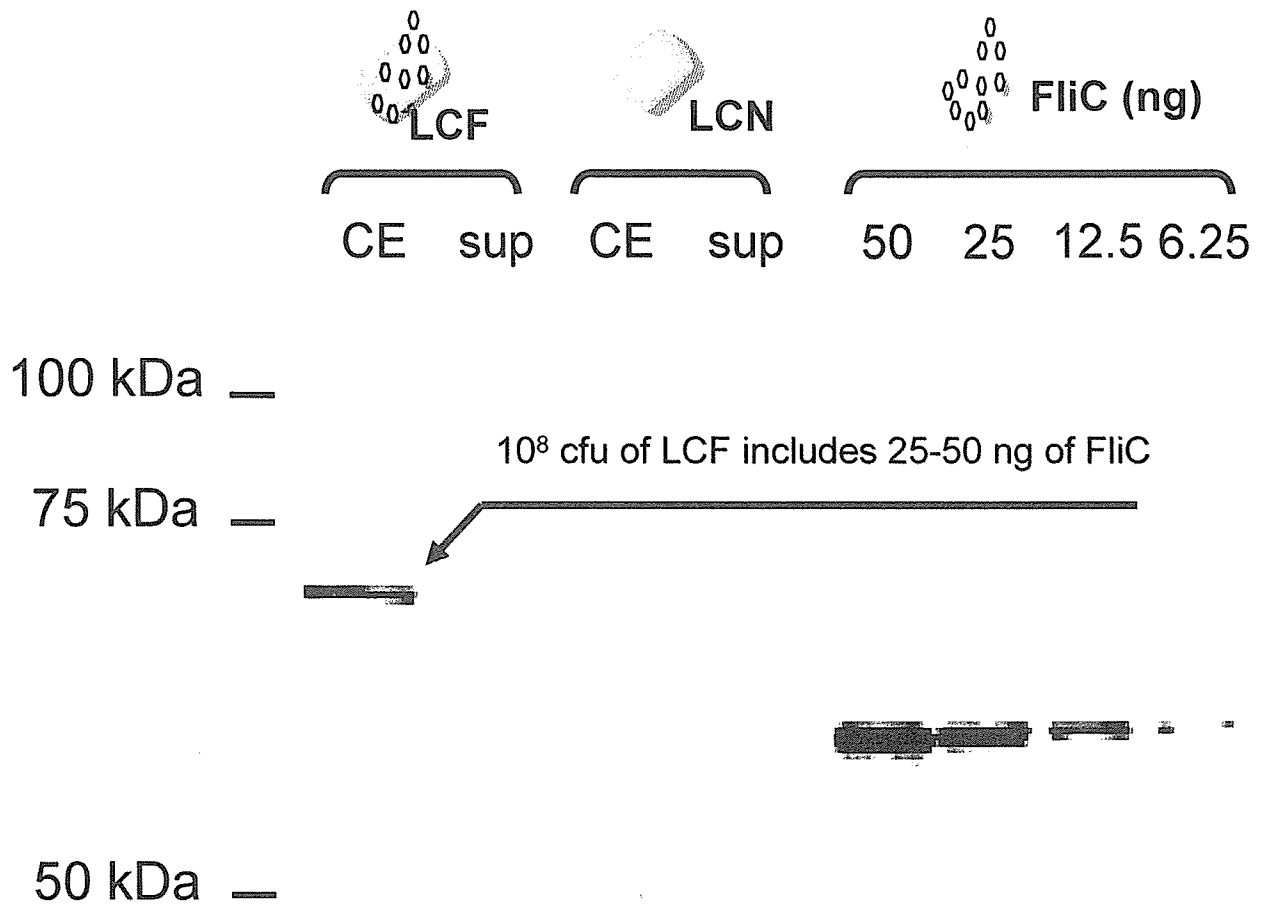


Fig.2. Detection of FliC-production

Detection: anti-FliC (rabbit) + anti-rabbit IgG (alexa 488-conjugated)

CE: cell extract (5×10^7 cfu/lane), sup: culture supernatant ($20 \times$ concentrated)

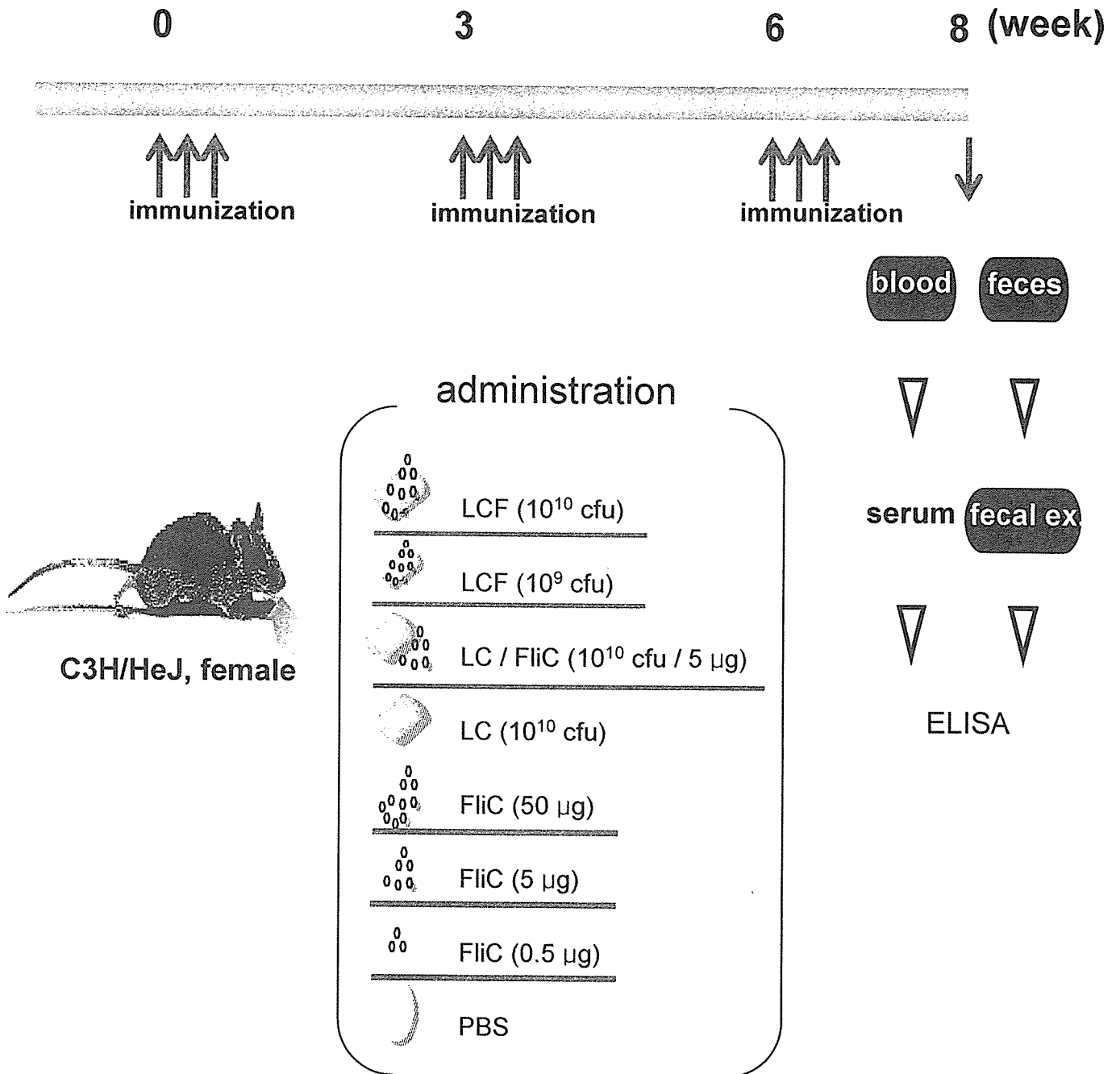


Fig.3. Immunization and sampling 1

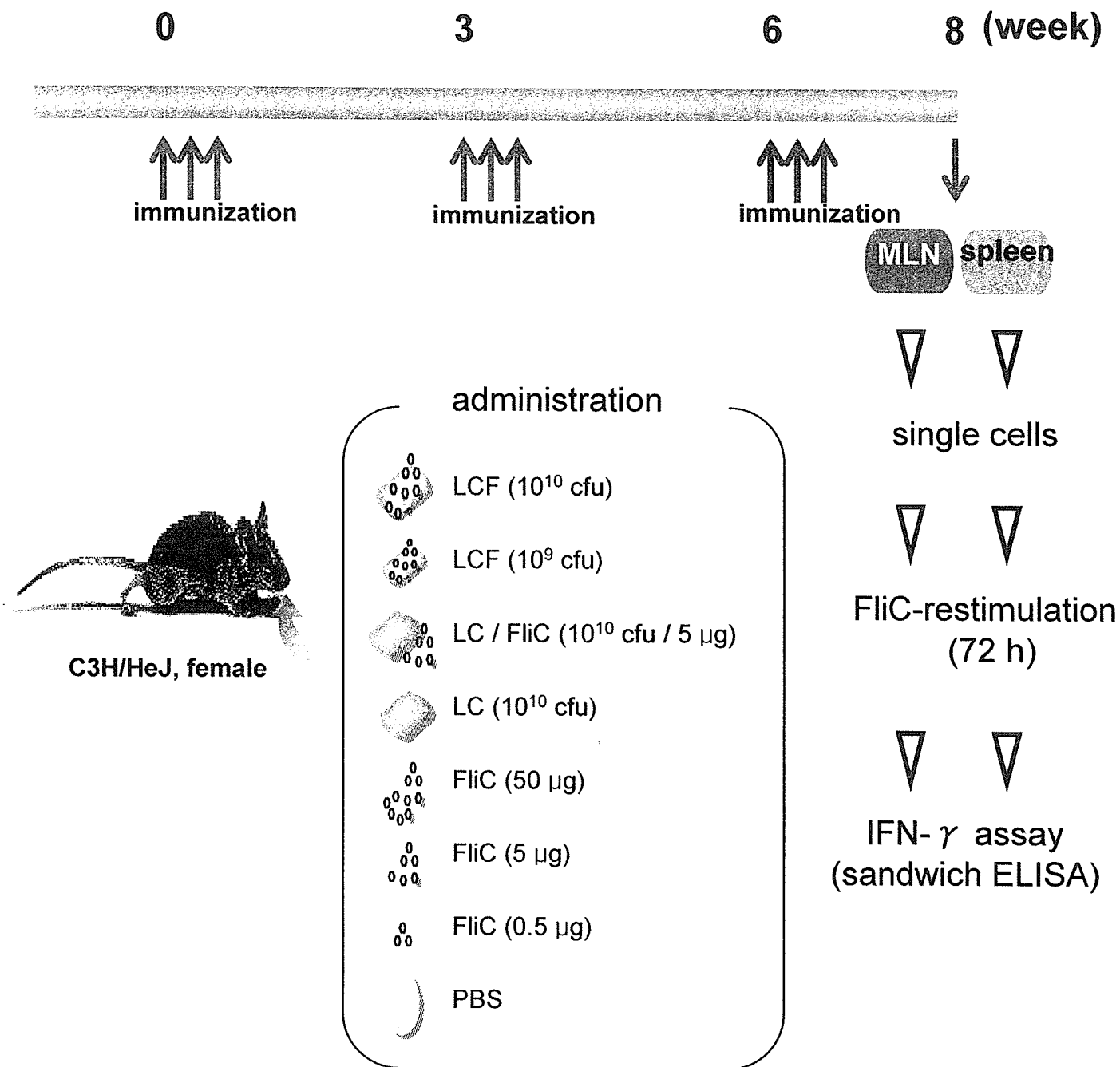


Fig.4. Immunization and sampling 2

MLN: mesenteric lymph node

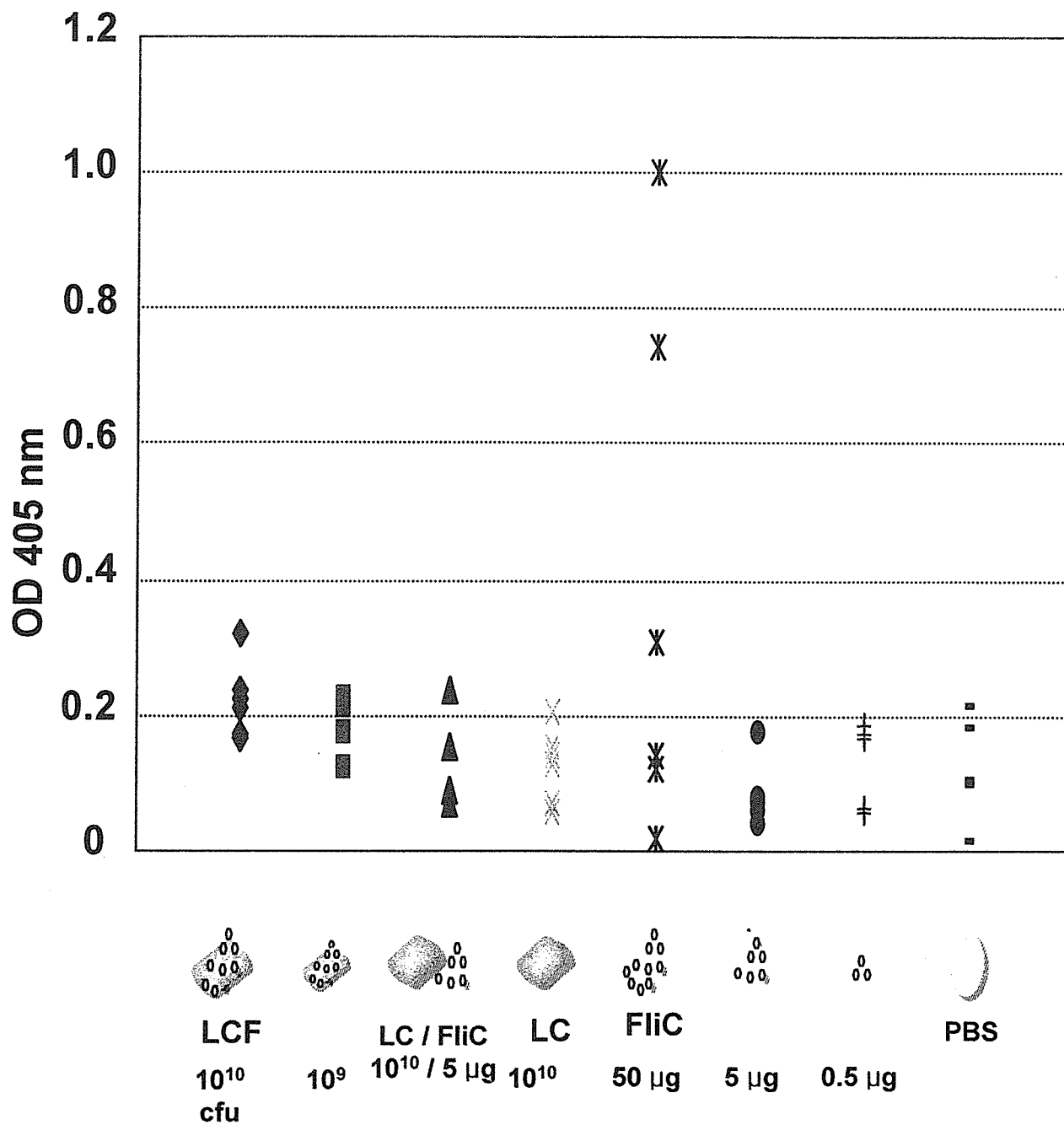


Fig.5. FliC-specific IgA in feces

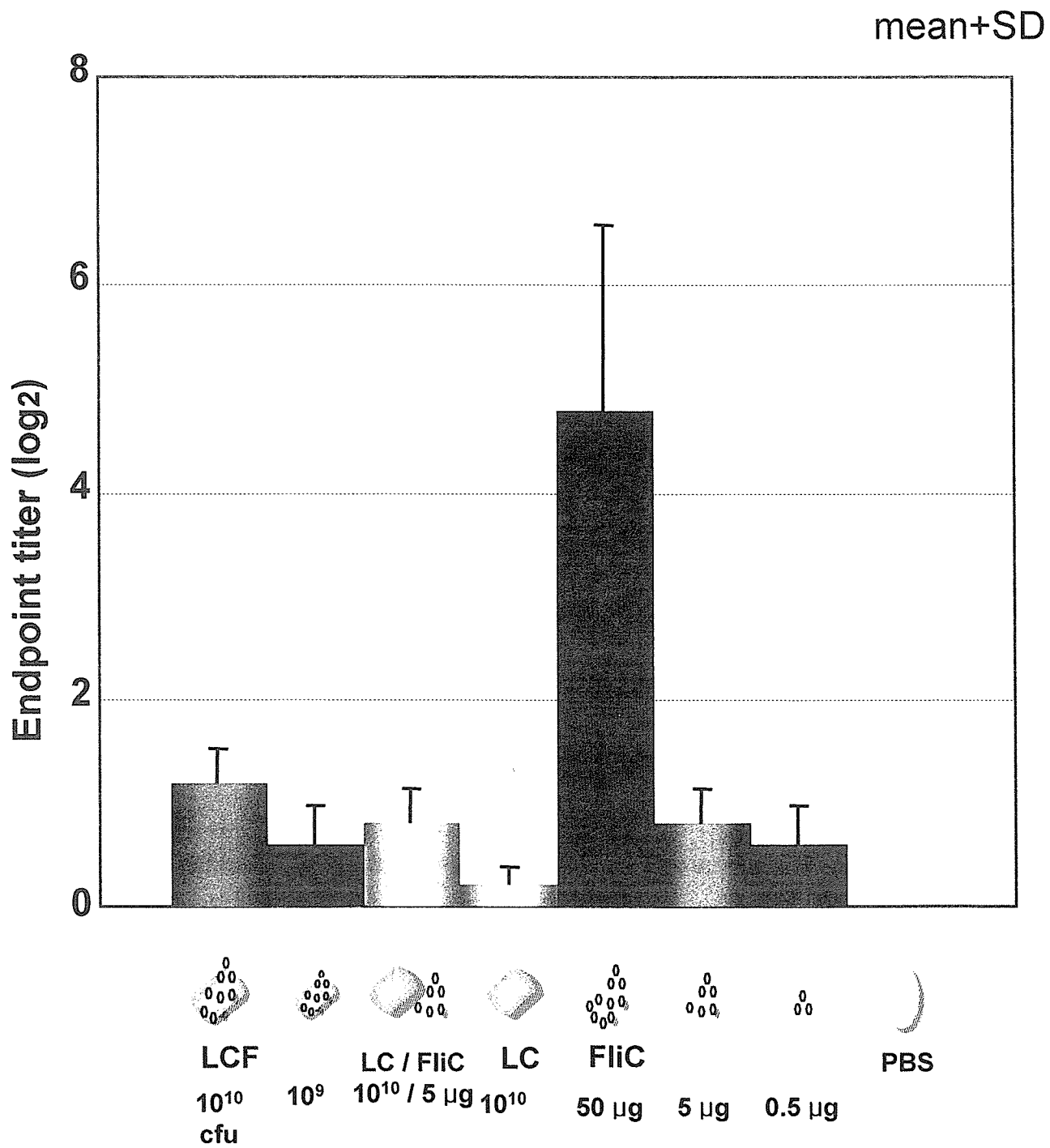


Fig.6. FliC-specific IgG in serum