

200734016A

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19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20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等）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 9

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)～(2)

小関 良宏 58

3. 遺伝子組換え体の検知技術の開発に関する調査研究

穂山 浩 71

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 92

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 111

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 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

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、未承認組換え食品の検知に関する試験法の検討を行うとともに、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
手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部部長
穂山浩 国立医薬品食品衛生研究所
代謝生化学部室長

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、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、当該食品並びに未承認組換え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

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穂山班員、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、コーデックス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厚生労働省食品安全部並びに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さけます研究部並びに独立行政法人医薬基盤研

研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部で、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. 結果およびD. 考察

リスクコミュニケーションに関する調査研究:

本研究では機能性成分を高めたり健康増進効果を高めた遺伝子組換え食品について、安全性評価事例、コーデックスによる安全性評価指針案、およびわが国における機能性食品に対する規制制度の検討を行い、その結果に基づいて、厚生労働省の「遺伝子組換え食品の安全性について」を機能性を高めた遺伝子組換え食品もカバーするように改定する案を作成した。わが国における健康食品ブームを見ると、遺伝子組換え食品であっても消費者が過度に期待して、過剰摂取により問題を生じる可能性もないとはいえないと考えられる。そのため、パンフレットの改定案では「遺伝子組換えによって機能性を高めた食品とは？」という項目の中に、機能性を高めた遺伝子組換え食品についての説明、このような遺伝子組換え食品の安全性評価の説明とともに、「表示を良く見て、摂取量・摂取方法を守って摂取すること」を記述することとした。今後、消費者メリットのある有用な遺伝子組換え食品が開発された時点で、消費者の疑問に答え、安全を確保するための十分な体制と情報整備ができていることがリスク・コミュニケーションのためにも最重要なことであると考えられる。そのためにも、開発側である農林水産省の担当部局や健康食品や食品表示の担当部局との早期の連携が重要になるものと考えられた。

コーデックス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2007年9月24日から28日にかけて千葉の幕張メッセで開催されたコーデックスにおける組換え食品のタスクフォース(TFFBT)の議長を務めた。このタスクフォースで、組換え動物評価指針、栄養改変植物評価指針、低レベルで存在する未承認組換え植物評価指針の3つの指針が議論され、何れも議論が尽くされタスクフォースとして採択された。「組換え動物」は倫理問題、「栄養改変」は議論が紛糾するコーデックス栄養部会との関係、「低レベル混入」は特に貿易に関わり、何れも非常に紛糾が予想される議題であった。これがほぼ一回の議論で合意に達したのは、作業グループでの効率的な議論と加盟国の指針を完成したいと云う強い意志があった為と考えられる。今後の作業としては完全には合意に至っていないがコーデックスにおいてもOIE(国際獣疫事務局)と共に組換えワクチンの問題を扱うことが考えられる。

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。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、

昨年と同様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。これまでに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を明らかにした。一方、組換え体の安全性評価では、これまで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評価してきた。昨年度の研究成果は、遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、抗原の効果が相乗的に働くこと、及び非意図的なサイトカイン誘導がみられることを示した。一方、本年度は組み込んだ遺伝子産物単体の作用が遺伝子組換え技術で微生物に導入された場合、むしろ低減するように働く場合があることを示した。組換え微生物の安全性評価に於いては、これらの点を考慮する必要があると思われる。

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。

遺伝子組換え魚が各国で作出されるようになって10年以上が経過した。研究初期には成長ホルモン遺伝子を導入した研究が主だったが、成長ホルモン遺伝子から耐病性の付与、栄養成分の改変、不妊化を目的としたものまで多様になってきた。さらには異種移植を目的とした研究も行われている。また、米国・カナダや中国では遺伝子組換え魚を食品として認めてもらおうと、行政部局

に申請をしている動きもある。そこで、本研究では各国で行われている遺伝子組換え魚の作出研究を文献検索、インターネット、特許、雑誌・新聞等を用いて収集を行い、遺伝子組換え研究の現状について調べた。本年度は2007年度に報告された文献や、特に、中国で今までに報告されている遺伝子組換え魚に関する文献の検索を行った。その結果、2007年度に報告された論文では遺伝子組換え魚の生態的研究や遺伝子の発現パターンの変化といった生理的研究が報告された。また、論理面や環境へのリスク研究といった報告もされた。中国における遺伝子組換え魚作出の研究は1980年代から始められ、鯉を中心に研究が進められてきた。ヒト由来の遺伝子の導入からプロモーターも含め、すべて魚由来の遺伝子を導入した組換え魚について研究が行われている。導入遺伝子は成長ホルモン遺伝子や耐病性を付与するためにヒトラクトフェリン遺伝子などを導入している。これらの組換え魚の不妊を目的として生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子の逆向きの遺伝子（アンチセンス）を導入し、生殖腺の発達を抑える研究も行っている。さらに、これまでの研究は導入遺伝子がどこにはいるか予想できないような導入方法であったが、最初の導入位置は決めることができないものの、組換え酵素とその認識部位を入れておくことによって、特定の位置に遺伝子を導入する研究も始まった。これらのことから、遺伝子組換え魚の実用化レベルは中国と米国・カナダとは全く同一で米国・カナダで食品としての遺伝子組換え魚の許可が停止している現状では中国で実用化の許可が早い可能性もある。薬用遺伝子組換え植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究：

薬用遺伝子組換え植物の範囲を、遺伝子組換え

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、薬用遺伝子組換え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、カテゴリ別に整理し分類した。米国における薬用遺伝子組換え植物の野外圃場栽培は、2007年においては、ほぼ前年と同じ811.08エーカーの栽培が認可され、実際には176.08エーカーに、イネ、オオムギ、タバコ、トウモロコシが作付けされた。作付け面積の増減は、2005年から2006年は2.2倍の増加、2006年から2007年は0.97倍の減少であった。2007年の薬用遺伝子組換え植物に関する論文等のカテゴリ別の件数は、機能性食品：15件、食用ワクチン：6件、食用医薬：5件、ワクチン抗原：5件、抗体医薬：2件、治療薬：7件、診断薬・試薬：3件であった。国別集計では、日本12件、米国11件に次ぎ、中国7件であった。2007年に収集した中国での薬用遺伝子組換え植物開発は、サツマイモ（機能性食品）、レタス（機能性食品）、イネ（食用ワクチン）、トマト（食用ワクチン）の食用作物が用いられていた。

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究：

平成19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、遺伝子組換えニワトリに導入される外来遺伝子を標的とした検出系の開発を行った。検出する外来遺伝子には、ニワトリ胚性幹（ES）細胞の選抜に利用されるピューロマイシン耐性遺伝子（*Puro^r*）とレポーター遺伝子として利用される緑色蛍光蛋白質遺伝子（*EGFP*）を選択した。まず遺伝子導入ES細胞か

ら抽出したゲノムをもちいてPCRによる各種遺伝子の検出条件の検討を行った。次に確立した検出条件をもとに、遺伝子組換えニワトリ胚を用いた検出実験を行い、いずれの遺伝子も検出可能であることを確認した。さらに胚生殖線から得たゲノムを用いて*EGFP*の検出を行ったところ非特異的な増幅が複数検出されることがわかった。そこでnested PCRを組み合わせた検出系を導入したところ、極めて明瞭に外来遺伝子が組込まれた個体を検出できることがわかった。

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み換え食品は農作物が主であり、薬剤耐性遺伝子などの元の宿主には無い遺伝子を導入することが行われている。最近では遺伝子を組換えて栄養価を高めることなどが行われている。これら栄養改変型の遺伝子組換え植物においては内在性の代謝を遺伝子工学的手法によって変化させるため、内在性の遺伝子発現や代謝が変化することが考えられる。近い将来それら栄養改変遺伝子組換え食品が実用化されると目され、これらについて安全性評価の検討が必要である。本研究では栄養改変遺伝子組換え植物である、高トリプトファン米と、アラキドン酸合成ダイズについてプロテオーム及びメタボローム解析による遺伝子発現の分析の可能性を検討するために、その第一段階にあたるトランスクリプトーム解析についての検討を行い安全性評価の可能性を探った。コメからのRNA抽出法について検討した結果、SDS-フェノール法とイオン交換体を用いた精製でマイクロアレイに供する純度のRNAが抽出できた。しかしながら、遺

伝子組換え米のサンプルにおいては RNA の分解が認められ、サンプルの収穫時期・保存方法について検討が必要であることがわかった。遺伝子組換えダイズを用いた遺伝子発現解析の結果、遺伝子組換え体と非組換え体において発現プロファイルに顕著な差は認められず、遺伝子組換えによって遺伝子発現が大きく異なる可能性は低いことが示された。

(2) 遺伝子組換え体のプロテオーム解析手法の検討

今後実用化が見込まれる栄養改変した組換え食品や組換え魚、動物などについて対応するための、ポストゲノム手法導入のための分析法の開発やデータ整備を行うことを目的とし、本年度は栄養改変型遺伝子組換え植物として、改変型アントラニル酸合成酵素 α サブユニットをコードする遺伝子を導入した高トリプトファン含有イネおよび糸状菌由来の $\Delta 5$, $\Delta 6$ 不飽和化酵素遺伝子を導入したアラキドン酸蓄積ダイズを用いて、非遺伝子組換え体と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した。その結果、栄養改変型遺伝子組換え植物において、個体差以上の発現タンパク質の変化は認められなかった。

(3) 遺伝子組換え体のメタボローム解析手法の検討

遺伝子組換えによってイネ種子（コメ）の栄養素の増減、あるいは有害成分の蓄積などが起こっていないかどうかを判別するための基礎データ取得を目指して、遺伝子組換えイネと非組換えイネ種子組織中の非タンパク性成分（代謝成分）の総和（メタボローム）をメタボロミクスによって比較・検討した。本研究では、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置（FT-ICR/MS）による高分解能マススペクトル測定によって代

謝成分の分析を行った。FT-ICR/MS 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、食品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。

平成 19 年度は、FT-ICR/MS を用いた玄米成分比較のため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-ICR/MS 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。分析には、遺伝子組換えイネ〔トリプトファン（Trp）高含有米、HW-5 系統〕と非組換えイネ（日本晴）を供試し、両サンプルのメタボロームを ESI 陰イオンモードおよび陽イオンモードで比較した。HW-5 と日本晴の玄米の低分子成分組成を主成分分析によって解析したところ、明確に異なるメタボロームクラスターが形成され、両者のメタボロームが異なることを示していた。HW-5 のメタボロームデータから、Trp と Trp 付加イオンを除いて主成分分析を行ったところ、HW-5 と日本晴のメタボロームに差異は認められなかった。

以上の結果は、今回の分析条件下では、遺伝子操作によって意図的に増加させた Trp 以外の低分子成分には、HW-5 と日本晴の間で顕著な差はなかったことを示している。以上、FT-ICR/MS 分析とメタボローム解析によって、Trp 高含有米と日本晴の低分子成分組成の迅速な比較が可能であった。今後、個体間の差や産地の差などの情報を加味して比較するための実験計画が必要と思われる。

組換え食品の検知法に関する研究：

未承認組換え食品の検知法の開発を主体に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) リガーゼ連鎖 (LCR) 反応を利用した広範囲の遺伝子組換え農作物を検出する技術の開発

従来の PCR 法に加え LCR 法を遺伝子組換え検知技術に新たに導入した。本研究で開発した技術は広範囲の遺伝子組換え農作物の高感度な定性検出を効率的に実施可能な点で有用であると思われる。今後、本研究で分析に供した遺伝子組換えトウモロコシ、遺伝子組換えダイズ系統以外の遺伝子組換え植物の検出に関する実証データの取得を行う予定である。

(2) シリカベースレジソタイプキット法を用いたパパイアからの DNA 抽出精製法の検討

遺伝子組換えパパイア検知のための DNA 抽出精製法として、新たに Promega Wizard DNA Clean-Up Resin System を用いたパパイア生試料およびパパイア凍結乾燥試料からの DNA 抽出精製法 (WCR 法) を検討した。WCR 法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、WCR 法は、シリカゲル膜タイプキット法および CTAB 法よりも DNA 収量が著しく高く、様々な熟し度合いのパパイアからも、定性 PCR 用として十分な濃度の DNA 試料原液を得ることが可能となった。

(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改良

LightCycler system を用いた遺伝子組換えトウモロコシの改良定量分析法が他の機種においても適用可能であるか、ABI7500 を用いて検証を行ったが、ゲノムの前処理による PCR 効率の顕著な差は認められなかった。

(4) 中国産遺伝子組換えトマト及びピーマンの検知法の確立と調査

トマトおよびピーマンを原料に用いた加工食

品からの DNA 抽出を行ったところ、Stool mini kit 法によって、定性 PCR に供するための DNA が確実に得られた。いずれの試料においても内在性遺伝子である CP0 は全て検出された。特にトマトを原料に用いた食品にはレトルトのソース類など加工度の高いものが多いことから、Stool mini kit 法は有効な抽出精製法と考えられた。市場で購入したトマトおよびピーマンを原料に用いた加工食品 22 検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

(5) 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

既に輸入ピーマン検体から GM Shanyou 63 系統と同じ特異的構造を有する Bt コメ (Bt63)、および GM Shanyou 63 系統の特異的構造と異なる Bt コメ (未知 Bt 系統) の混入を明らかにしている。本年度は、文献情報と DNA データベース情報に基づいた解析により、輸入もち米から未知 Bt 系統の混入を同定した。またその未知 Bt 系統混入もち米検体から、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター発現領域も新たに検出した。さらにこの領域から、新規検知法を開発するために必要な同カセットの未知領域を導き出す Inverse PCR 法と、Adaptor-Ligation PCR 法を検討した。

(6) 三成分同時発光酵素免疫アッセイによる未承認遺伝子組換えパパイア検知の検討

イクオリン (Aq), ビオチン化ルシフェラーゼ (b-Luc) 及び西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) の三酵素同時発光検出法を用いた、三成分同時発光酵素免疫アッセイによる遺伝子組換えパパイアの検知法を確立した。

組換え食品のアレルギー性に関する研究 :

平成19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)高トリプトファン含有遺伝子組換えイネ(コメ)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ゲン性を予測するためのデータ解析手法の検討、並びにアレルゲンデータベース(ADFS)の更新を行った。

具体的には、(1)高トリプトファン含有遺伝子組換えコメと非組換えコメを用いて、アレルゲン蛋白質の量的、質的変動をアレルゲン特異的抗体並びにコメアレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。主要アレルゲンであるRAG2(14kD)、Glyoxalase 1(33kD)についてポリクローナル抗体との反応性から組換えに伴う量的、質的変動はみられず、コメアレルギー患者血清IgEと反応するタンパク質もGM, non-GM間で大きな差はみられなかった。

(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マウス投与時の感作の違いについてその作用機作の解析を行い、両者でパイエル板における免疫細胞の抗原認識が異なる可能性を見出した。また、本モデルを用いて、遺伝子組換え高トリプトファンコメ(GMR)および非組換えコメ(NGR)抽出蛋白質のアレルギー性を比較し、アレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体は、GMR群においてNGR群と同等以下であったことから、遺伝子組換え高トリプトファンコメのアレルギー性は非組換えコメと同等以下であると予想された。

(3)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 - 既知のアレ

ルゲンに特徴的なアレルゲンユニーク断片(AUF)のインデックスとタンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)B因子を用いたアレルゲンエピトープ予測法の検討を行った。(ii)新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の更新作業としては、新たに9種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、キーワード検索機能の強化、タンパク質の相同性検索ツールにPSI-BLASTの追加、アレルゲンの糖鎖修飾の有無の検索機能の追加を行った。

E. 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、高トリプトファン含有遺伝子組換えコメを用いて、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(中国産BT63米、パパイヤ、ピーマン、トマト)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つき検討を行い、パンフレットへの反映を検討した。さらに、組換え微生物を用いた食品や遺伝子組換え魚、遺伝子組換え動物、遺伝子組換え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、第一世代遺伝子組換え食品ばかりでなく、第二世代(いわゆるモダンバイオテクノロジー応用)遺伝子組換え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継続するとともに、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 年度から行なわれた、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で、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案が平成 19 年度に特別部会としての合意が得られた。部会での審議に本研究班は重要な位置付けを持つことができたと思われる。

F. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

平成 19 年度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」
分担研究報告書（平成 19 年度）

国際動向(Codex 組換え食品タスクフォース等)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

FAO/WHO codex alimentarius の組換え食品の会議の議論を通じ、合意形成の過程での国際機関間の協調につき検討した。

協力研究者

吉倉 廣（厚生労働省食品安全部企画情報課、
codex 組換え食品タスクフォース議長）

A. 研究目的

バイオテクノロジーの安全性評価に関する国際的議論に貢献し、我が国の組換え食品の安全性管理に資する事を目的とする。本年度の報告では、2006 年 9 月の codex 組換え食品タスクフォースの議論と、今後の作業として完全には合意に至っていない組換えワクチンの問題を扱う。

B. 研究方法

FAO/WHO codex alimentarius、OECD、OIE 関係会議への参加並びに資料検索に依った。

C. 研究結果および D. 考察

①FAO/WHO codex alimentarius

2006 年の codex バイオテクノロジータスクフォースで、組換え動物評価指針、栄養改変植物評価指針、低レベルで存在する未承認組換え植物評価指針の 3 つの指針が議論され、何れも議論が尽くされタスクフォースとして採択した。「組換え動物」は倫理問題、「栄養改変」は議論が紛糾する codex 栄養部会との関係、「低レベル混入」は特に貿易に関わり、何れも非常に紛糾が予想される議題であった。これがほぼ一回の議論で合意に達したのは、作業グループでの効率的な議論と加盟国の指針を完成したいと云う強い意志があった為と考えられる。

特に「低レベル混入」については、輸出側の米国、輸入側の EU、何れの側も（特に関係産業界）regulatory cost の面から問題を抱えており、早急にルールが欲しいと考えていた状況がある。又、EU の“co-existence”の導入はこの問題を避けて通れない状況にした。

②OECD

「低レベル混入」指針のポイントは、「低レベル

混入をリスク管理ではなくリスク評価として捉え、必要な項目についてのみ評価する」と同時に「生産者（国）は組換え作物の必要なデータを提供する」と言う 2 つの要素からなっている点である。従って、「低レベル混入」指針の合意には情報提供が必須であった。OECD は BIOTRACK ONLINE の作業の中で加盟国が認可した組換え穀物にコード番号（unique identifier）を付け、産物に関するコンタクトポイントの情報も含め web ベースのデータベースを提供していた。このシステムは、ほぼ codex で提案した内容そのものであった為、FAO がこのシステムを利用し、web ベースのデータベース提供を行う事となった。2 つの性質の異なる国際機関の協力として記念すべきものとなる。

③OIE

OIE は動物の健康に関する国際機関であるが、「組換え動物」指針で「動物の健康状態」が重要な評価点の一つとなった事等から、animal welfare 等の難しい問題の議論を OIE に委ねる事が可能になり、議論の整理が出来た。又、組換えワクチンについても codex での議論が必要との意見があるが、OIE が既にこの作業をしている事は、今後の codex での議論を簡単にするのではないかとと思われる。OIE は動物の食品としての安全性は原則として取り扱わないが、「動物の健康状態」が「組換え動物」指針で大きな位置を占めるので、補完的な解釈が可能ではないかと考えられる。

OIE の組換えワクチンに関する既存文書は以下の 2 つ。

1. Draft Guidelines for Veterinary Plasmid DNA Vaccines (Biological Standard Commission/September 2007)
2. Classification of biotechnology-derived

vaccines, Release of live rDNA products.
Chapter 1.1.7 – Principles of veterinary
vaccine production (OIE Terrestrial Manual
2008)

後の方は今後改訂の予定。尚、OIE には前の
codex 議長スロラックが座長をしている食品関係
のタスクフォースが動き始めている。

E. 結論

国際的な枠組みの中で、専門性の異なる国際機
関を上手く利用し、合意形成を図る事は国際合意
を得る上で重要である。なお、低レベル混入のリ
スク評価指針の適用は、即ち、どのレベルをもつ
て低レベルとするかの判断は各国の判断に任され
ている。個々の組換え植物により、摂取量、食品
としてのリスクも異なることから、低レベルは何
パーセン以下と云うような取り決めはしていない。

しかし、この指針は混入量の判定を各国に任せ
る、つまり、国際的に一定の値を設置しないと云
う事を推奨したことになり、組換え食品の表示で
議論の対象となる表示の閾値の議論にも微妙に影
響するかも知れない。また、この指針はリスク評
価指針であり、リスク管理指針ではない。つまり、
混入の判断は、WTO の TBT 協定ではなく SPS
協定の枠で考える事を提案している点は注目して
良い。

この指針が総会で採択された場合、この指針の
適用をリスク評価者が決めるのか、リスク管理者
が決めるのかと云う問題が各国の判断に任される
事になる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

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

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、昨年と同様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。これまでに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を明らかにした。一方、組換え体の安全性評価では、これまで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評価してきた。昨年度の研究成果は、遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、抗原の効果が相乗的に働くこと、及び非意図的なサイトカイン誘導がみられることを示した。一方、本年度は組み込んだ遺伝子産物単体の作用が遺伝子組換え技術で微生物に導入された場合、むしろ低減するように働く場合があることを示した。組換え微生物の安全性評価に於いては、これらの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）

梶川揚申（国立医薬品食品衛生研究所）

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を試み、安全性評価に有用と思われる基礎的な知見を蓄積することを目的とした。

B. 研究方法

モデル乳酸菌組換え体を用いて、細胞レベルでの免疫系への影響を調べる評価を試みた。

1. モデル組換え体の作出

モデル組換え体として、サルモネラの外膜タンパク質を組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。宿主の *Lactobacillus casei* ATCC 393 株は、外膜タンパク質抗原（OmpC）をコードする遺伝子 *ompC* 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。このベクターを用いると、OmpC タンパク質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、OmpC 特異的な抗体を用いた FACS による評価の後、western-blot 法により、精製抗原を対照とし定量的に発現量を評価した。サルモネラ外膜タンパク質抗原は、PCR により増幅した SE40 株の *ompC* 遺伝子断片を pQE31 ベクターに挿入し、His-tag 組換えタンパク質として大腸菌に産生させた。

2. モデル組換え体で刺激した細胞の免疫応答

OmpC 抗原および OmpC 発現組換え乳酸菌が持つ免疫誘導作用を調べるため、マウス由来マクロファージ様細胞 RAW264.7 を用いて評価を行なった。まず、RAW264.7 細胞を接着させたマイクロプレート上に、精製した組換え OmpC 単独あるいは乳酸菌体と混合したものを含む培地を加え、24 時間インキュベートした後に培養上清を回収した。この培養上清中に含まれる炎症性サイトカイン TNF- α を ELISA により定量した。組換え乳酸菌の生菌、加熱死菌体についても同様の試験を行い、TNF- α の誘導を調べた。さらに、サイトカイン産生誘導に関わる成分を特定するため、組換え乳酸菌の細胞壁やプロトプラストを調製し、それぞれの刺激による RAW264.7 細胞からの TNF- α 産生量を測定した。

3. 消化酵素感受性の評価

組換え乳酸菌の細胞壁消化作用に対する感受性を評価するため、N-アセチルムラミダーゼによる

処理を行なった。OmpC 発現または非発現組換え菌体を N-アセチルムラミダーゼを含む緩衝液中でインキュベートした後、SDS を加えて溶菌する度合を濁度の変化によって測定した。

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、OmpC 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 (Fig. 1) および、western-blot (Fig. 2) により確認された。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、10 ng 程度の OmpC 抗原を発現していた。

2. モデル組換え体で刺激した細胞の免疫応答

組換え乳酸菌体で刺激した RAW264.7 細胞の培養上清中に含まれる TNF- α を ELISA により定量したところ、OmpC 濃度依存的に TNF- α 産生量が増大することが確認された (Fig. 3)。さらに、OmpC を発現しない乳酸菌を共存させることで、TNF- α 誘導は増強された。一方、OmpC を発現する乳酸菌で同細胞を刺激したところ、OmpC を発現しない乳酸菌株よりも TNF- α 産生量が低下していた。組換え乳酸菌から調製した細胞壁とプロトプラストについて、同様の試験を行なったところ、細胞壁で刺激した場合に高い TNF- α 産生誘導が見られ、OmpC 発現株と非発現株との差が顕著であった。一方、プロトプラストで刺激した場合、培養上清中の TNF- α 量は僅かであった (Fig. 4)。

3. 消化酵素感受性の評価

OmpC 発現組換え体と非発現株における免疫誘導作用の違いが、RAW264.7 細胞へ取込まれた後の、消化作用耐性の違いによるものか否かを、N-アセチルムラミダーゼ感受性によって評価した。その結果、OmpC 発現株では非発現株よりも N-アセチルムラミダーゼに対する感受性が高かった (Fig. 5)。OmpC 発現株と非発現株を一定時間 RAW264.7 細胞に取込ませ、過剰な菌体を除去した後、経時的に TNF- α 産生量を測定したところ、OmpC 発現株による刺激では、TNF- α 誘導の持続時間が短くなっていった (Fig. 6)。

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 OmpC 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、10 ng 程度の抗原を発現していることが確認できた。OmpC はサルモネラが持つ porin として知られており、外膜上で微

細な孔を形成して金属イオン等の輸送を行っている。本研究において、このタンパク質を乳酸菌体の表層に発現させたが、グラム陰性菌であるサルモネラの薄い外膜上で機能する OmpC が、グラム陽性菌である乳酸菌の厚い細胞壁上で機能するとは考えにくい。よって、OmpC は特別な機能を持たないタンパク質抗原として乳酸菌体表層に存在しているものと思われる。過去の研究により、乳酸菌体表層に固定化した抗原は乳酸菌体の免疫賦活作用により精製抗原よりも効率よく免疫応答を惹起させることが示されている。従って、OmpC 発現乳酸菌においても、精製 OmpC よりも高い免疫原性を持つことが予想された。

2. モデル組換え体で刺激した細胞の免疫応答

精製 OmpC により刺激した RAW264.7 細胞は OmpC 濃度依存的に TNF- α 産生を誘導した。これは OmpC 自体が炎症応答を誘導する抗原であることを示している。また、同細胞を精製 OmpC と乳酸菌非発現株の混合物で刺激したところ、それぞれ単独で刺激した場合より多く TNF- α を産生した。さらに、その量は単独刺激による TNF- α 産生量の和よりも大きかった。この結果は、乳酸菌が共存したことによる免疫賦活作用であると考えられ、その効果は相加的ではなく相乗的であった。一方、OmpC 発現乳酸菌で RAW264.7 細胞を刺激したところ、非発現乳酸菌で同細胞を刺激した場合より TNF- α 産生量が少なかった。上述の通り、OmpC 自体には本来 TNF- α 産生を誘導する効果があり、組換えで乳酸菌表層に発現した OmpC が炎症応答を抑制したとは考えにくい。そもそも、細胞培養液に加えた菌体に含まれる OmpC 量は 1 ng 未満と微量なため、乳酸菌体の免疫賦活作用を考慮しても OmpC の影響は小さいと思われる。さらに、タンパク質をほとんど除去した細胞壁によって RAW264.7 細胞を刺激した場合でも、OmpC 発現株由来の細胞壁は非発現株由来のものより TNF- α 産生量が少なかった。以上のことから、OmpC の発現によって乳酸菌体の免疫原性は低下するが、OmpC が直接的に関与している可能性は低いものと思われる。

3. 消化酵素感受性の評価

マクロファージ等の食食系細胞は細菌などを取込んだ後、ファゴソーム内で消化することが知られている。その際、消化作用に抵抗するものほど炎症応答が強く誘導されることが示されている。そこで、OmpC 発現乳酸菌が非発現株より消化作用耐性が弱いかな否かを調べた。乳酸菌の強固な細胞壁を溶解する酵素として N-アセチルムラミ

ダーゼが知られている。この酵素によってそれぞれの乳酸菌体を消化し、SDSによって溶菌が起こる度合を調べた。その結果、OmpC 発現乳酸菌では同酵素による消化作用に対する感受性が高くなっており、非発現株よりも容易に消化され得ることを示唆した。一定量の乳酸菌体を取込ませた RAW264.7 細胞の、経時的な TNF- α 誘導を観察した結果、OmpC 発現乳酸菌では TNF- α 産生誘導の持続時間が短くなっていることが明らかとなった。この結果から、OmpC 発現乳酸菌の免疫原性が低下した理由は細胞壁構造に OmpC が何らかの影響を与え、消化作用に対する感受性が上がったためと思われた。

E. 結論

遺伝子組換えにより乳酸菌へ異種遺伝子の導入・発現を行ったときの免疫系に与える影響について評価した。今回、異種タンパク質の発現により乳酸菌がもつ炎症性サイトカイン産生を誘導する作用が低下したこと、その現象が異種タンパク質の間接的な働きによってもたらされたことが明らかとなった。これまで、抗原を付加することにより乳酸菌の免疫作用が相加・相乗的に増強されることは知られていたが、低下することは殆ど知られていない。本年度の研究成果は、遺伝子組換え微生物の細胞への反応において、負の変化が生じる場合があることを示したことである。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. Akinobu Kajikawa, Eiichi Satoh, Rob J. Leer, Shigeki Yamamoto, Shizunobu Igimi. (2007) Intra-gastric immunization with recombinant *Lactobacillus casei* expressing flagellar antigen confers antibody-independent protective immunity against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Vaccine 25:3599-3605.

学会発表

1. Kajikawa A. and Igimi S. Construction and evaluation of recombinant lactobacilli expressing Salmonella antigens for development of vaccines. PP. International

Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld2007). 2007. 11. 30. Seville (Spain)

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

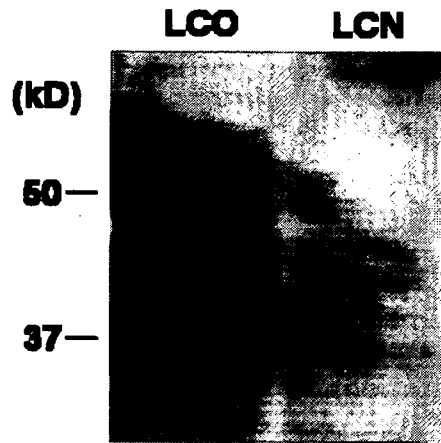


Fig. 1 OmpC 発現乳酸菌のウェスタンプロット解析
 OmpC 発現乳酸菌 (LCO)
 非発現乳酸菌 (LCN)

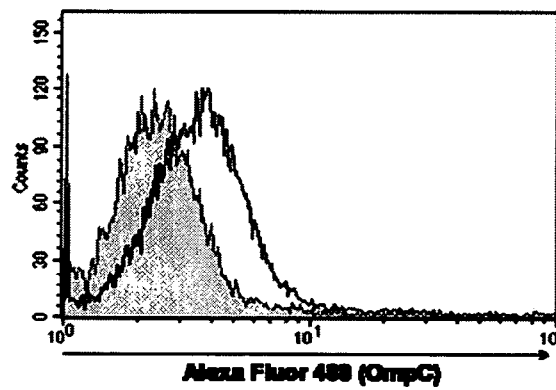


Fig. 2 OmpC 発現乳酸菌の FACS 解析
 OmpC 発現乳酸菌 (実線、塗潰し無し)
 非発現乳酸菌 (塗潰し領域)

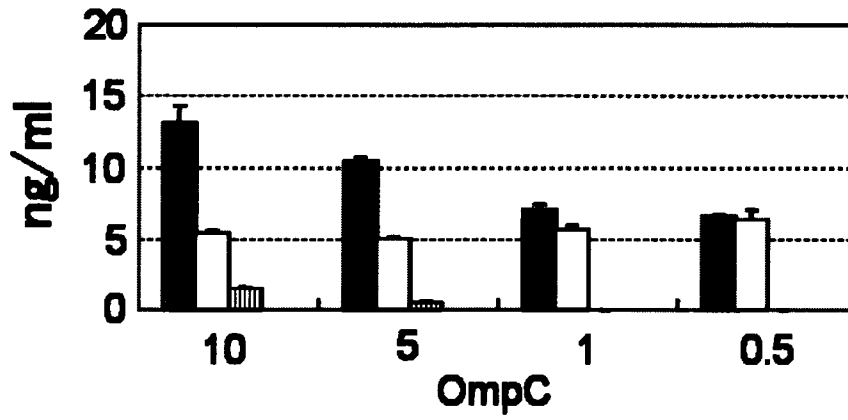


Fig. 3 精製 OmpC 刺激による TNF- α 産生誘導
 精製 OmpC (ストライプ)、非発現乳酸菌 (白)、
 精製 OmpC+非発現乳酸菌 (グレー)
 菌体濃度 : 10 μ g/ml 一定
 OmpC 濃度 : 10, 5, 1, 0.5 μ g/ml

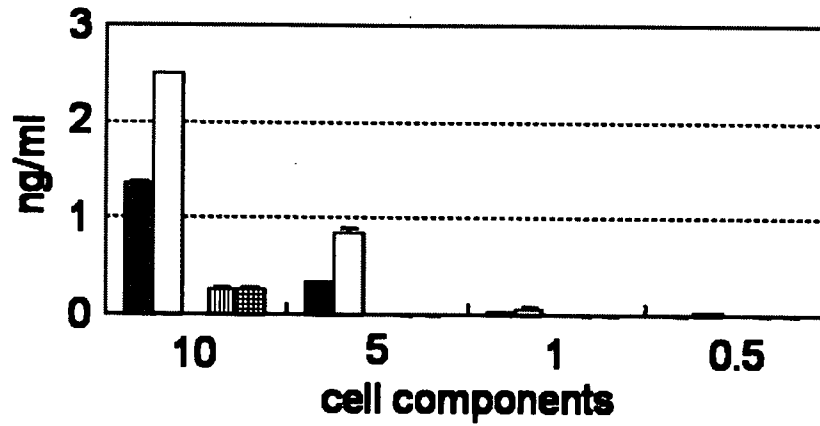


Fig. 4 細胞壁およびプロトプラストの刺激による TNF- α 産生誘導
 OmpC 発現乳酸菌細胞壁 (グレー)、非発現乳酸菌細胞壁 (白)、
 OmpC 発現乳酸菌プロトプラスト (ストライプ)、
 非発現乳酸菌プロトプラスト (格子)
 菌体 10, 5, 1, 0.5 μ g/ml 相当から調製された菌体成分を添加

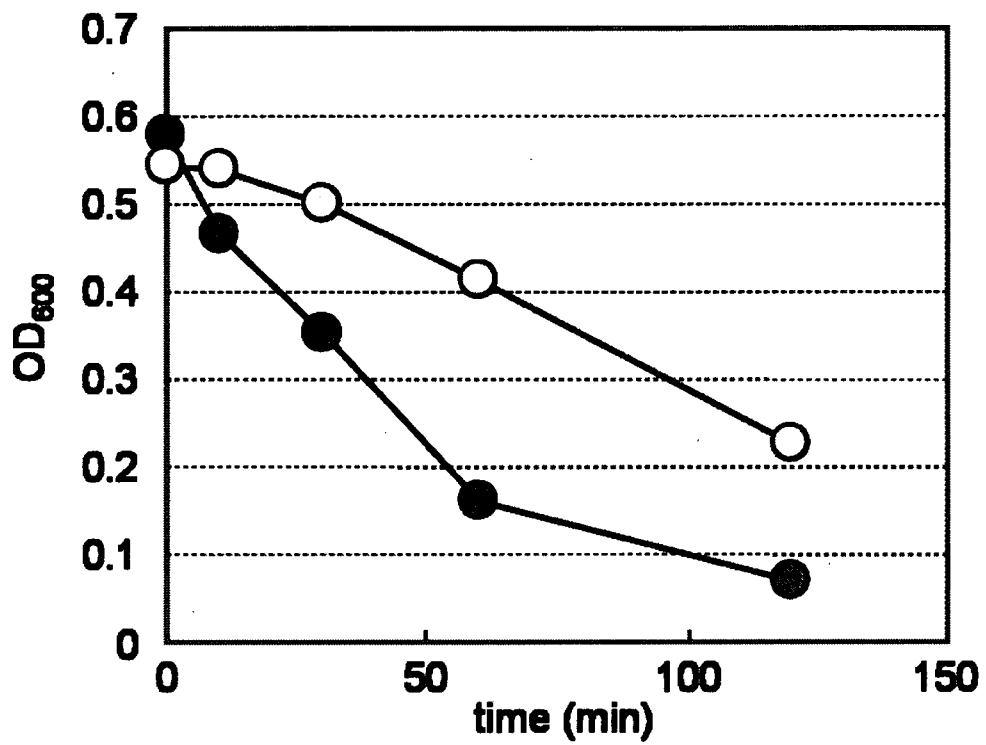


Fig. 5 N-アセチルムラミダーゼ感受性試験
OmpC 発現乳酸菌 (グレー)
非発現乳酸菌 (白)

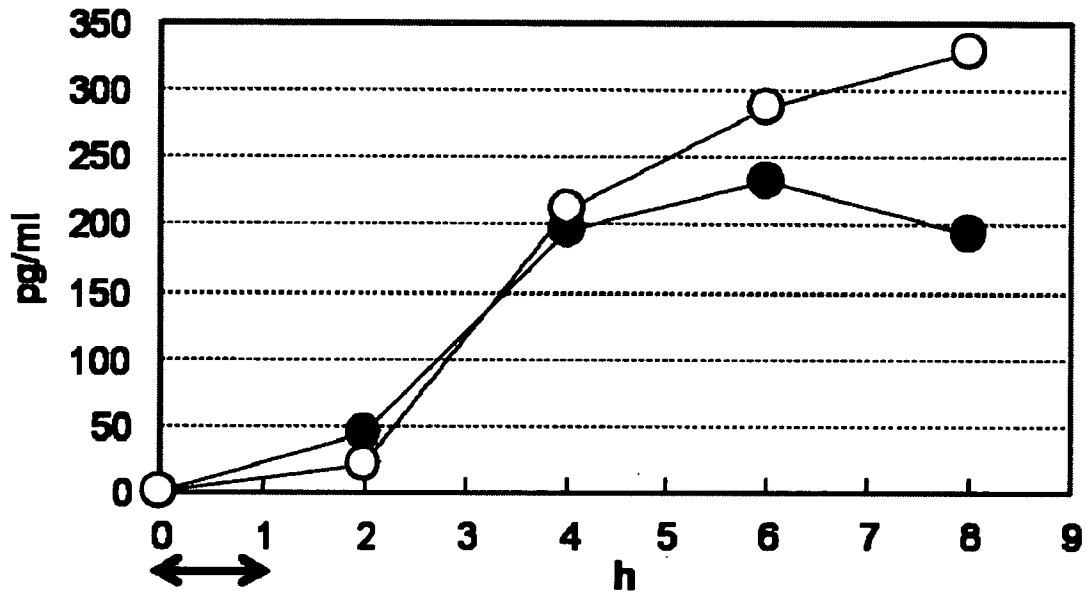


Fig. 6 TNF- α 誘導の持続時間における違い

OmpC 発現乳酸菌 (グレー)

非発現乳酸菌 (白)

↔ : 菌体を共存させた時間