

200837004B

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18～20年度 総合研究報告書

(H18-食品-004)

研究代表者 西島 正弘

平成21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. コーデックス組換え食品部会での決定に至る経過の文書化 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	11
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	82
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	96
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	122
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	137
IV. 研究成果の刊行物・別刷	140

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

研究代表者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

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 研究代表者、3 研究分担者を中心として、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。

研究分担者

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1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2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、研究代表者は、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及び慶応大学商学部で、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、研究代表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:

平成 18 年度は、第 2 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 1 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 2 世代の GM 食品としてゴールデンライスを例にとり、最近 FAO/WHO から発表されたマニュアルをもとに、第 2 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 2 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、およびそれを誰がになっていくかが、GM 食品の今後を考える上で重要であると考えられた。平成 19 年度は、機能性成分を高めたり健康増進効果を高めた GM 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。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 GM 食品についての説明、このような GM 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 GM 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くことがリスク・コミュニケーションのためにも最も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。平成 20 年度は、モダンバイオテクノロジー応用食品の研究成果を、広く国民に普及するための啓発媒体や啓発方法をコミュニケーション研究の視点から検討する為に行われた。具体的には、研究成果の普及のためのわかりやすい資料とコミュニケーション技法について要点をまとめた。また、現在ある資料を分析して、よりよい表現にはどのようなものがあるのかを明らかにした。

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。2008 年 6 月に開かれたコーデックス総会で、協力研究者の吉倉を議長として 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に関するタスクフォース (TFB) で議論された 3 つの指針が採択された。すなわち、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 つの指針である。「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が、合意に至ることができた。また、FAO/WHO コーデックス委

員会は国際的な食品の基準、指針を作成する場である。その文書は、文書の性質としてはあくまでも助言に止まるが、WTOのSPS協定のレファレンスとして使用されWTO係争裁定に当たって実質的に法的力を発揮する。そのような意味で、条文の正確な理解は不可欠である。しかし、コーデックスの決定は各国の相反する利害を纏めた妥協の産物であり、文面は必ずしもストレートではない。この為、正確な条文の理解には、議論の経過に戻って条文の真に意図する処を確認する必要がある。本年度はこの問題に対処する事を目的とした。FAO/WHOコーデックス委員会の組換え食品の会議の議論を通じ、合意形成の経過の文書化を行った。全てをCDROMにし、関係者に配付し、利用して貰う。特に、近年コーデックスにつき、博士論文等学術的調査研究の対象にする事例が増えているので、研究の為の資料としても役立つ事を期待している。

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。本分担研究では、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を明らかにした。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評価が行われてきた。本研究により遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、抗原の効果相乗的に働くことがあることを示した。更にモデル乳酸菌組換え体を用いた実験により、非意図的なサイトカイン誘導が観察されることがあること、また、組み込みを行った遺伝子産物単体の免疫への作用が組換え体でむしろ低減される場合があることについても示した。遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、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。今後、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。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から今年で24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、遺伝子導入した個体の生理・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。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すべて魚由来のプロモーターと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の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化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。また、新しい遺伝子組換え技術を用いた利用方法として、遺伝子組換え魚類を作出するのではなく、餌となる藻類に魚類成長ホルモンを発現するようにした遺伝子組換え藻類を作出し、それを与えることによって、間接的に魚類の成長を促進してきた論文が報告された。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。組換え魚介類の作出報告から、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されるようになったことによって、リスク評価を行う際に具体的などのような項目を調査した方がよいか、より具体

的な検討が可能な状況になってきた。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。さらに、2008年9月にアメリカのFDAが遺伝子組換え動物の利用に関する規制指針のパブリックコメントを求めることを公表し、2009年1月に最終指針が発表された。遺伝子組換え大西洋サケを生産している会社は早速これに反応し、2009年第4四半期には遺伝子組換え大西洋サケが市場に出ることを期待している。FDAが遺伝子組換え魚類の食用としての利用を許可するか不明であるが、この動きは今までアメリカの動向を探っていた中国にも影響を与え、すでに実用化されているコイなどで遺伝子組換え魚類の生産が開始されるかもしれない。日本にこれらの遺伝子組換え魚類が食品として輸出されることはないと思うが、事故等で紛れ込むことは十分考えられ、遺伝子組換え魚類に対する対応が求められる。

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、薬用及び環境浄化用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。米国における薬用及び環境浄化用GM植物の野外圃場栽培の認可面積は、2006年589.00エーカー、2007年811.08エーカー、2008年2650.5エーカーと最近急速に拡大している。

2006-2009年1月末に公表・出版された論文等179件をそれぞれのカテゴリー別に集計した結果、機能性食品・嗜好品：44件、経口ワクチン：35件、食用医薬：9件、ワクチン抗原：20件、抗体医薬：23件、治療薬：22件、診断薬・試薬：5件、環境浄化：21件であり、薬用及び環境浄化用GM植物研究開発の中でも、特に機能性食品・嗜好品および経口ワクチンの開発が盛んである状況が伺えた。また、国別の件数では、米国：51件、日本：45件に次ぎ、中国：21件であった。さらに作物別に集計した結果、タバコ60件についてイネ18件、トマト12件であった。

遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究：

本研究では、モダンバイオテクノロジー応用食品のひとつとして、遺伝子組換え動物の生産物の安全性評価系を構築することを目的に、遺伝子改変(GM)ニワトリを実験モデルとして研究を行った。研究内容は、ニワトリ胚性幹(ES)細胞からGMモデルニワトリを作出し、安全性評価(小関良宏研究員・分担)、アレルギー性試験(手島玲子研究員・分担)及び未承認組換え食品の検知に関する試験方法(堀内浩幸研究員)の開発である。平成18年度には、GMモデルニワトリを作出するために必要なES細胞の準備並びベクター開発を行い、平成19年度には、遺伝子導入ES細胞の樹立と遺伝子導入キメラ胚の作出を行い、PCR法による外来遺伝子の検知系を構築した。平成20年度には、実際に作出したGMニワトリの可食組織を研究分担者へ供与するとともに、その可食組織を用いて正確性もしくは簡便性に重点をおいた外来遺伝子の検出系を構築した。

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

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、栄養改変型遺伝子組換えコメ、ダイズ、また、遺伝子組換えアマゴおよび遺伝子組換えニワトリを用いて、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体における遺伝子発現の変化についてトランスクリプトーム解析を用いた安全性評価の可能性を探った。ダイズ、アマゴについては問題なくトランスクリプトームに供することができるだけのRNAが抽出されたが、コメやニワトリ各組織からRNA抽出を行ったところRNAの分解が認められた。このことから材料によっては流通に回った可食部からはトランスクリプトーム解析に用いることができる品質のRNAが得られないことが明らかになった。しかし、材料採取の際に時間をおかず直ちに急速冷凍したサンプルを用いることで、マイクロアレイに供する純度のRNAが抽出できることが分かった。遺伝子組換えダイズ、アマゴ、ニワトリ各組織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各組織間の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、栄養改変型遺伝子組換え植物である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、ペニザケの成長ホルモンをコードする遺伝子を導入したアマゴおよび発光クラゲの蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子を導入した遺伝子組換えニワトリを用いて、遺伝子組換え体と非遺伝子組換え体における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。

(3) 遺伝子組換え体のメタボローム解析手法の検討

遺伝子組換えによる食品素材中の栄養素の増減、あるいは有害成分蓄積などを判別するための基礎データ取得を目指して、遺伝子組換えと非組換えのアマゴ、イネ種子 (コメ) およびニワトリ肉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析装置 (FT-ICR/MS) による高分解能マスペクトル測定によって代謝成分の一斉分析を行った。

FT-ICR/MS 法では、試料抽出物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 18 年度は、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) について、代謝成分抽出法、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、各試料のメタボロームを比較した。組換え、非組換えによるメタボロームの差は見られなかったが、1 年齢の組換えアマゴと 2 年齢の非組換えアマゴのメタボローム

に類似性が認められたことから、遺伝子組換えによる成長促進の結果と推察された。平成 19 年度は、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、代謝成分抽出法、FT-ICRMS 分析、多変量解析による実験系によってメタボロームを比較した。主成分分析では、明確に異なるメタボロームクラスターが形成されたが、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解析を行ったところ HW-5 と日本晴のメタボロームに差異は認められず、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 以外には、HW-5 と日本晴の間には顕著な差がないことがわかった。平成 20 年度は、遺伝子組換えニワトリ肉 (GM) と非組換えニワトリ肉 (nonGM) について、代謝成分抽出法、FT-ICR/MS 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。GM と nonGM の筋肉組織中のメタボロームクラスターには顕著な差はなかったが、表皮組織抽出液の分析では、脂質組成の差に由来するメタボロームの相違が見られた。

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13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入手し、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。これに関して文献情報と 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。また、この領域から、新規検知法開発に必要な同カセットの未知領域を導き出すため、Inverse PCR, Adaptor-Ligation PCR 法を検討した。これと並行して文献情報を収集し、このトリプシンインヒビター近傍領域を予想、プライマーを設計して定性 PCR を実施した。Inverse PCR にて既知領域の上流 135 塩基の検出に成功し、文献情報より設計したプライマーによる定性 PCR にて検出された配列と一致した。

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によりプラスミド 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。さらに、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. 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。

7. リガーゼ連鎖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 GM 検知技術に新たに導入した点で有意義であり、また、本研究で開発した技術は広範囲の GM 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。今後、本研究で分析に供した GM トウモロコシ、GM ダイズ系統以外の GM 植物の検出に関する実証データの取得が望まれる。また、標的となる組換え DNA 領域を新たに反応に追加することで、検出可能な GM 農作物の拡充が期待される。

8. シリカベースレジソタイプキット法を用いたパパイヤからの DNA 抽出精製法の検討

遺伝子組換え(GM)パパイヤ検知のための DNA 抽出精製法として、新たに Promega Wizard DNA Clean-Up Resin System を用いたパパイヤ生試料およびパパイヤ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ヤからも定性 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。

9. 中国産 GM 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 を確実に得られた。いずれの試料においても内在性遺伝子である CPO 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。

10. 三成分同時発光酵素イムノアッセイによる未承認遺伝子組換えパパイヤ検知の検討

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イムノアッセイによる GM パパイヤの検知法を確立した。

11. リアルタイム PCR アレイ分析法を利用した未承認遺伝子組換え農作物推定法の開発

リアルタイム PCR アレイ分析の結果として得られる遺伝子組換え(GM)農作物に共通性が高い組換え DNA セグメント及び承認 GM 系統特異的検出の結果に加え、承認 GM 系統が有する組換え DNA セグメントの情報を総合的に判断することで、未承認 GM 農作物の混入が推定可能であることを見出した。また、リアルタイム PCR アレイの分析結果を入力するだけでこの推定プロセスを簡便に実施可能なソフトウェアを開発した。

12. 赤トウガラシの DNA 抽出方法・精製及び検知法の検討

未承認 GM 赤唐辛子のための DNA 抽出精製法として、Genomic-tip 20/G を用いた方法及び Plant Kit 法について検討を行った。Genomic-tip 20/G を用いた方法は迅速であり、抽出操作も簡便である。また、Plant Kit 法よりも DNA 収量が高く、精製度についても良好な DNA 試料原液を得ることができた。次に市販の乾燥トウガラシの実態調査を行った。トウガラシから種子のみを採取して試料とし Genomic-tip 20/G による抽出精製法で、定性 PCR 及びリアルタイム PCR を用いた定性 PCR

に供するための高純度及び高収量の DNA が得られた。いずれの試料においても赤トウガラシ内性遺伝子は検出された。市場で購入した赤トウガラシ6検体から組換え遺伝子は検出されなかった。

13. GM 魚の検出法の確立と調査

マダイの魚類検体について3種類のキットを用いてDNA抽出を試行したところ、厚労通知 Genomic tip 20/G 法により収量・精製度ともに良好な結果が得られた。白鮭、銀鮭、アトランティックサーモン、紅鮭、トラウトサーモン、マサバの6検体を用いて動物(魚類)検知用プライマー対を用いて得られた DNA が PCR 法にて検出可能であるか検討した。並行して成長ホルモン付加型の遺伝子組換え魚の構造特異的配列プライマー対を用いて実態調査を行った。

組換え食品のアレルギー性に関する研究：

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) 栄養改変型遺伝子組換えコメ、また、遺伝子組換えアマゴおよび遺伝子組換えニワトリを用いてアレルゲンの抗体結合性を指標にしたアレルゲン性試験、(2) 食物アレルギー動物モデルを用いた組換え生物のアレルゲン性試験、(3) エピトープ情報を加味したパ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、(4) アレルゲンデータベース(ADFS)の更新の4項目について検討を行った。具体的には、(1) 組換えによるアレルゲンタンパク質の量的、質的変動をアレルゲン特異的抗体並びに食物アレルギー患者血清を用いて解析する手法を検討した。遺伝子組換えアマゴ、遺伝子組換えニワトリの筋肉及び栄養改変コメ抽出物のアレルゲン解析の結果、遺伝子組換え体と非組換え体において抗体との結合性

に顕著な差は認められず、遺伝子組換えによってアレルゲン性が大きく異なる可能性は低いことが示された。(2) 食物アレルギー動物モデル(BALB/cマウス)を用いた組換え生物の経口感作並びに経口惹起の研究においても、組換え体と非組換え体でアレルギー反応に関与する抗原特異的IgG1抗体産生及びアナフィラキシー症状に差がみられなかったことより、組換えによってアレルゲン性が大きく異なる可能性は低いことが示された。(3) エピトープ情報を加味したパ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では、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)のインデックスに加えタンパク質立体構造の揺らぎ(配列の動的構造)を考慮することが、エピトープ部位の予測に有用であることが示唆された。(4) 平成17年より衛研ホームページ上へ立ち上げを行った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)の更新を3年続けて行った。3年間で文献検索より得られたエピトープ既知のアレルゲン33種を新たにADFSに搭載し、平成21年3月時点で、搭載されているアレルゲン数1339本、エピトープ既知のアレルゲン数76種となった。平成18年度は、コンフォメーションエピトープの追加、平成19年度は糖鎖情報の追加、平成20年度は、ADFSのアレルゲンデータをビューレビューを経たAOLのデータに原則統合する作業並びにタンパク質の相同性検索ツールのMotif-based法の信頼性の調査研究を行い、良好な結果が得られた。

D. 結論

第2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、栄養改変型遺伝子組換えコメ、ダイズ、また、遺伝子組換えアマゴおよび遺伝子組換えニワトリを用いて、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BT米、LLRice6-1系統、パパイヤ、ピーマン、赤トウガラシ、サケ等魚類)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2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すると共に、研究成果の普及のためのわかりやすい資料とコミュニケーション技法について要点をまとめた。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1世代遺伝子組換え食品ばかりでなく、第2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(TFFBT)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 20 年度のコーデックス総会での合意が得られた。これらの評価案の作成にあたり、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。

E. 研究発表

個別の研究報告書並びに研究成果の刊行に関する一覧表に記載

コーデックス組換え食品部会での決定に至る経過の文書化

研究分担者 西島 正弘 国立医薬品食品衛生研究所 所長

研究要旨

FAO/WHO コーデックス委員会は国際的な食品の基準、指針を作成する場である。その文書は、文書の性質としてはあくまでも助言に止まるが、WTO の SPS 協定のレファレンスとして使用され WTO 係争裁定に当たって実質的に法的力を発揮する。そのような意味で、条文の正確な理解は不可欠である。しかし、コーデックスの決定は各国の相反する利害を纏めた妥協の産物であり、文面は必ずしもストレートではない。この為、正確な条文の理解には、議論の経過に戻って条文の真に意図する処を確認する必要がある。本年度はこの問題に対処する事を目的とした。FAO/WHO コーデックス委員会の組換え食品の会議の議論を通じ、合意形成の経過の文書化を行った。全てを CDROM にし、関係者に配付し、利用して貰う。特に、近年コーデックスにつき、博士論文等学術的調査研究の対象にする事例が増えているので、研究の為の資料としても役立つ事を期待している。

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

FAO/WHO コーデックス委員会は国際的な食品の基準、指針を作成する場である。その文書は、文書の性質としてはあくまでも助言に止まるが、WTO の SPS 協定のレファレンスとして使用され WTO 係争裁定に当たって実質的に法的力を発揮する。そのような意味で、条文の正確な理解は不可欠である。しかし、コーデックスの決定は各国の相反する利害を纏めた妥協の産物であり、文面は必ずしもストレートではない。この為、正確な条文の理解には、議論の経過に戻って条文の真に意図する処を確認する必要がある。本年度はこの問題に対処する事を目的とした。

B. 研究方法

2008 年度研究では、コーデックス組換え食品部会 7 回の部会報告書、作成途中及び完成された文書、各国コメント、その他議論の上で重要な役割を果たした文書を電子ファイルで集め、各パラグラフにつき、修正過程とその為の議論をつけ、一読して夫々のパラグラフがどう云う議論を経て最終文書に至ったかが分かるようにした。対象は、組換え食品のリスクアナリシス原則、植物由来組

替え食品のリスクアセスメント、微生物由来食品のリスクアセスメント、動物由来組換え食品のリスクアセスメント、以上 3 アセスメント文書へのアネックスとなるアレルギー評価法、植物由来組換え食品のリスクアセスメント文書へのアネックスとなる栄養改変組換え植物由来食品のリスクアセスメント、微量に存在する組換え植物由来物質のリスクアセスメント、の 7 つに加え、部会で議論のあった precautionary principle/approach、traceability/product tracing に関する 2 つの議論である。

C. 研究結果

全てを CDROM にし、関係者に配付し、利用して貰う。特に、近年コーデックスにつき、博士論文等学術的調査研究の対象にする事例が増えているので、研究の為の資料としても役立つ事を期待している。

D. 考察

(1) コーデックスには、政府代表の他に企業或いは消費者 NGO が出席する。NGO には投票権が与えられていないが、発言権はほぼ同等である。コーデックスの決定は投票ではなくコンセンサスであるので、NGO の合意過程への影響は政府代表と同じ位になり得る。お互い利害の異なる者達のネゴシエーションであるから、コーデックスの条文も修正に修正を加えたものとなり、普通なら読み飛ばし

てしまうような文言でも、その解釈で結果が大きく変わり得るものがある。

このような事から、コーデックスでは、指針の解説書を作るべきと云う意見が出ている。しかし、一旦解説を始めれば、完全な議論の蒸し返しにもなりかねず、解説書作成には反対も多い。そのような意味で、本研究で行った各パラグラフの修正過程を分かるようにした文書作成は有用なのではないかと考える。

コンセンサスに至るには長い議論が必要で、これがコーデックスの作業を遅らせているとの批判がある。しかし、投票で決め最終的には甚だ不味い結果となった過去の経験から、やはり、コンセンサスによる決定と云う原則は動かさない。そこで、議論が完全に膠着した場合どうするかと云う問題になるが、コーデックスが過去に経験し解決した事例を研究する事がこれに有用なのではないかと思う。そう言う事の為にこのような記録は役立つと考えている。本部会で出た traceability はその良い例で、traceability を GM に限らず全ての食品に該当する問題と合意した段階でほぼ問題は解決した。つまり、問題の枠組みを立て替えた事で、問題はほぼ解決した。Precautionary principle も一般原則部会に廻し、GM 特異的な事としない決定を早期にした事が無用な議論を避ける結果となった。

(2) 組換え食品の今後について最後に考察を加える。日本を含め GM 食品への抵抗が強いが、現在 GM 穀物を栽培している 25 ヶ国中、中国インドはもとよりアフリカの南ア、ブルキナファソ、エジプト、南米のメキシコ、ホンジュラス、コロンビア、ボリビア、チリ、アルゼンチン、ウルグアイ、パラグアイ、ブラジルなど途上国の方が国の数では先進国を上回る状況を見ると、途上国由来の GM 食品が正規の輸入或いは混入のかたちで我が国にどんどん入ってくる状況であろう。そのような意味で、組換え食品部会で最後に合意した低レベル混入のリスク評価指針がどのように使われるか興味がある。又、作物は土地に合った品種である必要があり、途上国のあちこちで組換え技術を利用した植物を使った品種改良が事実上起こるのではないかと思われる。そのような状況になれば、カルタヘナ議定書との軋轢が問題になるであろう。その場合、国の立場は従来とは逆転する可能性がある。このような状況は、広い学問的な立場に立つと、生物の進化に人為的な組換え技術がどう影響して行くかという疑問にも繋がる事となる。

E. 結論

FAO/WHO コーデックス委員会の組換え食品の会議の議論を通じ、合意形成の経過の文書化を行った。特に、近年コーデックスにつき、博士論文等学術的調査研究の対象にする事例が増えているので、研究の為の資料としても役立つ事を期待している。

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

研究分担者 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。本分担研究では、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を明らかにした。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評価が行われてきた。本研究により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があることを示した。更にモデル乳酸菌組換え体を用いた実験により、非意図的なサイトカイン誘導が観察されることがあること、また、組み込みを行った遺伝子産物単体の免疫への作用が組換え体でむしろ低減される場合があることについても示した。遺伝子組換え微生物の免疫への反応において、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。今後、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（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）
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協力研
究員）
梶田 和彌（国立医薬品食品衛生研究所研究生）

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、①サルモネラの鞭毛抗原、②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、①サルモネラ鞭毛抗原 (FliC) をコードする遺伝子 *fliC*、②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、組換え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、それぞれの抗原に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。①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、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、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、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。

4. OmpC発現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、培養上清を回収した。この培養上清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。

5. 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。

6. OmpC発現モデル組換え体のバイアビリティ評価

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。このOmpC発現組換え菌体のバイアビリティをLIVE/DEAD BacLight Bacterial Counting and Viability Kit

を用いて判定した。

7. 食細胞による組換え乳酸菌の取込み

OmpC発現組換え乳酸菌が持つ免疫誘導作用を調べたところ、マウス由来マクロファージ様細胞RAW264.7から放出される炎症性サイトカインTNF- α の量がOmpCを発現しない乳酸菌体よりも少なくなることを観察した。TNF- α 産生がRAW264.7細胞表層からの刺激によって誘導されるのか、ファゴソームに取込まれた後の刺激によって誘導されるのかを、ファゴサイトーシスを阻害するサイトカラシンDを添加することにより調べた。また、RAW264.7細胞による組換え菌体の取込み効率に差があるかどうかを調べた。FITCラベルした乳酸菌体をRAW264.7細胞に取込ませ、FACS解析により、取込まれた菌体量を経時的に測定した。

8. 細胞壁画分によるTNF- α 産生誘導

TNF- α 産生誘導に重要な菌体成分が細胞壁に存在するかどうかを調べるために組換え乳酸菌菌体から細胞壁と細胞壁を除去した画分を調製した。それぞれの菌体成分でRAW264.7細胞を刺激し、産生されたTNF- α 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、①サルモネラの鞭毛抗原、②サルモネラの外膜タンパク質OmpC抗原を菌体表層に固定化し発現していることは、FACSの結果および、western-blot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、①25~50 ngの鞭毛抗原、②10 ng程度のOmpC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

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の測定結果から、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。

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

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。

4. OmpC 発現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。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。

5. 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。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た。

6. OmpC 発現モデル組換え体のバイアビリティー評価

OmpC 発現乳酸菌は、液体培地への接種 8 時間後においては明確な差が見られなかったものの、培養 24 時間後においては、顕著なバイアビリティーの低下が認められた。比較対照の OmpC を発現しない乳酸菌体においては、ダメージを受けている菌体は 8 時間後において 0.7%、24 時間後においては 0.1% に留まったのに対し、OmpC 発現菌体では 8 時間後において 1.3%、24 時間後においては 8.3% に上った。

7. 食細胞による組換え乳酸菌の取込み

培養液中にサイトカラシン D を添加した場合、組換え乳酸菌によって刺激した RAW264.7 細胞からの TNF- α 産生が抑制された。FITC ラベルした OmpC 発現乳酸菌と非発現乳酸菌の RAW264.7 細胞

による取込みを経時的に調べた結果、どの時間においても両者の間に差は見られなかった。

8. 細胞壁画分による TNF- α 産生誘導

細胞壁と細胞壁を除去した画分でそれぞれ RAW264.7 細胞を刺激した結果、細胞壁で刺激した場合において高い TNF- α 産生誘導が見られた。また、細胞壁においては OmpC 発現株と非発現株の間で顕著な差がみられたが、細胞壁を除去した画分において明確な差はみられなかった。

(尚、詳しいデータは平成 18 年度、19 年度、20 年度研究報告書参照)

D. 考察

1. モデル組換え体の作出

モデル組換え乳酸菌は、①サルモネラ・エンテリティディスの鞭毛抗原、②サルモネラの外膜タンパク質 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、①25~50 ng の鞭毛抗原、②10 ng 程度の OmpC 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。

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 の測定では、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る。

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。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 10^{10} 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 10^{10} 個投与群では、これらに比べ、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 10^{10} 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。

4. OmpC 発現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、組換えで乳酸菌表面に発現した OmpC が炎症応答を抑制したとは考えにくい。そもそも、細胞培養液中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。

5. 消化酵素感受性の評価

マクロファージ等の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どを調べた。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割合を調べた。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る。

6. OmpC 発現モデル組換え体のバイアビリティ評価

OmpC の発現によって組換え乳酸菌の細胞膜/壁が損傷を受けることが示唆された。本研究で用いた発現ベクターによる外来遺伝子の発現が、必ずしも宿主菌体に対して有害なものでないことは、これまでの実験データや過去の研究報告でも明らかである。つまり、この OmpC 発現による宿主菌体の傷害は、OmpC 特有の働きによるものであると考えられる。OmpC はサルモネラの外膜タンパク質であり、疎水性を示す。従って、菌体表層へ固定化される際、乳酸菌の細胞膜にも干渉する可能性がある。菌体表層の OmpC をフローサイトメトリーによって解析したところ、検出されたシグナルは比較的弱いものであった。この結果も、OmpC が乳酸菌体の細胞膜を通過し、完全には菌体の外側まで到達しにくいことを示唆している。おそらく細胞膜近傍に OmpC が蓄積することにより、細胞膜/壁が脆弱になったものと考えられる。

7. 食細胞による組換え乳酸菌の取込み

RAW264.7 細胞からの TNF- α 産生は主にファゴソームに取込まれた乳酸菌からの刺激によるものであることがわかった。そこで、取込まれる乳酸菌体量に差があるかどうかを調べたところ、OmpC 発現の有無に関わらず取込み効率に違いは見られなかった。従って、OmpC 発現による TNF- α 産生誘導能の低下は、免疫細胞への取込み効率が低下するためではないことがわかった。従って、取込まれた乳酸菌体ひとつひとつの刺激が OmpC 発現によって弱くなっていると考えられる。

8. 細胞壁画分による TNF- α 産生誘導

細胞壁と細胞壁を除去した画分を比較したところ、主に細胞壁に TNF- α 誘導能があり、OmpC 発現株と非発現株との差も、細胞壁において見られることが明らかとなった。乳酸菌の細胞壁を構成する分子は免疫担当細胞上の TLR2 を介して免疫応答を誘導することが知られている。OmpC を発現した乳酸菌においてはこれらの免疫刺激作用を司る分子に質的あるいは量的な変化が起こっている可能性がある。1 の実験において、OmpC 発現乳酸菌の細胞壁/膜が脆弱化していることもこれに関連があるものと思われる。

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新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。本研究は、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た。

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、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。本研究は、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。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

1. 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). 梶川揚申、五十君静信. 2006. 乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン開発。化学と生物。44 巻 No. 10 : 652-654.
- 4). 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* 25:3599-3605. 2007.
- 5). 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。シリーズ21世紀の農学 動物・微生物の遺伝子工学研究。日本農学会編。P.41-55。2007.4。養賢堂。東京
- 6). 五十君静信. 乳酸菌組換えワクチン。乳酸菌の保健機能と応用。上野川修一監修。P.268-275。2007.8。シーエムシー出版。東京
- 7). Kim TW, Igimi S, Kajikawa A, Kim HY. Display of heterologous proteins on the surface of *Lactococcus lactis* using the H and W domain of PrtB from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* as an anchoring matrix. *J Appl Microbiol.* 104(6):1636-1643. 2008
- 8). Toyota-Hanatani Y., Inoue M., Ekawa T., Ohta H., Igimi S., and Baba E. Importance of the major Fli C antigenic site of *Salmonella* Enteritidis as a subunit vaccine antigen. *Vaccine.* 26(33):4135-4137. 2008.
- 9). Kajikawa A, Igimi S. Reduction of TNF-(alpha) inducing capacity of recombinant *Lactobacillus casei* caused by the expression of *Salmonella* OmpC. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Mar 6. [Epub ahead of print]
2. 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
- 2). 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)
- 3). 五十君静信. 遺伝子組換え技術による乳酸菌の新しい機能の開発。日本微生物資源学会第15回大会。2008.7。千葉
- 4). Kajikawa A., and Igimi S. Expression of *Salmonella* OmpC in recombinant *Lactobacillus casei* induced an attenuated pro-inflammatory response of RAW264.7 cell. 9th Symposium on Lactic acid bacteria. 2008.8.31-9.4. Egmond aan Zee (The Netherlands)
- 5). 五十君静信. 遺伝子組換え乳酸菌を用いた経口粘膜ワクチン。第11回日本臨床腸内微生物学会。2008.9。東京
- 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