

201033021A

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

第3世代バイオテクノロジー応用食品等の  
安全性確保とリスクコミュニケーションに  
関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

(H21-食品-一般-007)

研究代表者 西島 正弘

平成23年3月

# 目次

## I. 総括研究報告書

第3世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保とリスクコミュニケーションに関する研究

西島 正弘 ..... 1

## II. 分担研究報告書

1. 遺伝子組換え生物の動向調査 西島 正弘
    - (i) 組換え微生物の国際動向、安全性に関する研究 ..... 9
    - (ii) 遺伝子組換え魚文献検索に関する研究 ..... 21
    - (iii) 遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究 ..... 34
    - (iv) 薬用GM植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究 ..... 42
    - (v) クローン牛の開発の動向と安全性評価 ..... 66
  
  2. 遺伝子組換え食品の社会的受容に関する研究  
今村 知明 ..... 75  
(付属資料1：第3世代GMOに関する消費者意識調査の調査設計)  
..... 93  
(付属資料2：海外における遺伝子組換え(GM)食品・作物のガバナンス  
およびリスクコミュニケーションのあり方に関する調査)  
..... 105  
(付属資料3：その他関連資料等) ..... 120
  
  3. 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  
小関 良宏 ..... 144
  
  4. 組換え植物のメタボローム解析  
太田 大策 ..... 156
  
  5. 組換え植物のアレルギー性評価並びにプロテオーム解析  
手島 玲子 ..... 163
  
  6. 組換え植物の検知技術の開発に関する研究  
穂山 浩 ..... 178
- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 209

### 第3世代バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保と リスクコミュニケーションに関する研究

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

環境耐性を有する第 3 世代に位置づけられるバイオテクノロジー応用食品等の安全性確保並びにリスクコミュニケーションに関する研究を遂行するため、1 主任研究者、5 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) モデル組換え植物を用いた実証的データの蓄積、2) 検査技術の確立、3) バイオテクノロジー応用作物や食品に対する国内消費者の意識や受容性の現状把握、適切なリスクコミュニケーションの展開を目的として、第 3 世代組換え植物の安全性研究に資するためのモデル組換え体の開発、安全性評価へのオミックス（網羅的解析）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

今村知明 奈良県立医科大学  
健康政策医学講座 教授  
小関良宏 東京農工大学工学部 教授  
太田大策 大阪府立大学大学院  
生命環境科学研究科 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

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

第 3 世代の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（網羅的オミックス）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、太田班員、手島班員、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（遺伝子組換え食品の社会的受容に関する研究）に関する調査が奈良県立医科大学で、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

#### 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 1 世代、第 2 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 3 世代の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

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、クローン牛に関する調査が、畜産草地研究所で行われ、主任研究者がとりまとめを行った。

### C. 結果およびD. 考察

#### 遺伝子組換え食品の社会的受容に関する研究：

遺伝子組換え作物・食品に関するリスクコミュニケーションについて、今後我が国で取り組むべき方策に対する示唆を得るため、遺伝子組換え作物・食品に関する消費者意識調査の分析を進めるとともに、消費者との対話型コミュニケーションを試行した。また、海外動向調査として、海外当局へのインタビュー調査等を実施した。

その結果、消費者意識調査からは、食品の違いやGMOの性質の違い等から生じる消費者の受容性の違いや、市場経済と消費者意識の乖離を踏まえ、消費者に提供する情報の具体化を検討していく必要性が示唆された。今後、本稿で示した第3世代GMO抵抗感調査を進め、情報の伝え方による消費者の抵抗感の感度を分析する。

対話型コミュニケーションの試行結果からは、食べてみたときの美味しさ、食の楽しみなど、現在のGMに関するコミュニケーションに欠けている要素の重要性が指摘された。また、現在、GM食品の安全性審査における考え方の基本となっている実質的同等性の考え方について、最後まで疑問を持つ消費者がいるなど大きな課題も明らかになったが、その一方で、消費者は専門家との対

話を希望しているなど、消費者が情報を必要としている実態もみえた。消費者が主体的に考え、判断していくためには、専門家でなくても理解でき、かつ十分な情報量が必要となる。情報を分かりやすく伝達するためには、情報提供のツールやそこに盛り込むコンテンツを精査することは重要であるが、そのためにも、消費者と専門家の間を繋ぐコミュニケーターの養成が必要であると考えられた。対話型コミュニケーションについては、引き続き調査を続け、消費者がGMに対して疑問や抵抗を感じる点、コミュニケーションに対する消費者のニーズを探り、今後のGMO及びGM食品におけるリスクコミュニケーション方策を検討していく。

海外動向調査からは、規制や管理体制、受容性の違いに関する国際比較は、他国における教訓を学ぶ意味でも、今後のわが国の対策を検討する上でも有用であることが示された。欧州のGMOに関する政策は、加盟国と欧州レベルの利害関係の違いなどもあり、日本以上に複雑であった。しかし、GMO政策の評価の議論や、経済的社会的要素を管理においてどう位置づけるかといった議論は日本においても参考になると思われた。また、現在欧州のLLP(微量に存在する(low level presence))GMに関する議論は域内の時差や承認切れを理由とする未承認に集中しているが、将来的には共通の課題として、第三国で開発中のものや他の国で承認されても自国に申請がないものなどの未承認LLPの問題も考えられる。そうした問題への対処は国際的な連携が求められる。

#### 組換え微生物の国際動向、安全性に関する研究：

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、細胞レベルでのサイトカイン産生誘導能の評価、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、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の性質を検討しその総和として（相加あるいは相乗的に働くであろうという立場で）安全性を評価してきた。

一方、我々はこれまでの研究により、遺伝子組換え微生物の免疫への反応では、組換えにより導入された形質が本来持つ免疫への刺激と宿主の持つ免疫への刺激の総和という形で免疫反応が起こらない場合があることを示してきた。単独では炎症性サイトカイン産生を誘導する作用を持つ異種タンパク質を遺伝子組換えにより乳酸菌に発現させると、宿主である乳酸菌がもつ炎症性サイトカイン産生能をむしろ低下させることを観察し報告した。また、2つの異なった抗原を共発現させたモデル組換え体进行评估することにより、宿主の持つ免疫刺激、発現させた抗原による免疫刺激、組換え体以外の共存するタンパク質による免疫刺激などが複雑に絡み合い免疫反応を示すことを実証した。組換え微生物の安全性評価特に、免疫影響評価に当たっては今後このような点を考慮する必要があると思われる。本年度は遺伝子組換え技術を用いて、活性型 IL-1 $\beta$  を発現させたモデル組換え体を昨出し、このモデル組換え体を用いてマウス免疫系への影響について明らかにした。IL-1 $\beta$  という免疫系への反応に係わる遺伝子を導入したモデル組換え微生物では、その影響により腸内フローラに対する免疫反応を

修飾していたことから、腸内フローラに関する影響についても今後検討する必要があると思われる。

また、遺伝子操作により、細菌はどの程度遺伝子レベルでの変化が起こるかに関する知見はほとんどない。そこで乳酸菌を用いて、従来の育種方法として変異原物質を用いた育種を試み、同様な表現型を得るまでに遺伝子組換えによる育種では、ゲノムレベルでどの程度の変化が観察されるかを比較することにした。昨年は乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM393 株と変異原物質を用いた育種株 KK378 株のゲノム解析のドラフトを作成した。本年度は引き続きゲノムの検討を進めた。また、育種株と元株のタンパクの発現レベルでの比較を2次元電気泳動により行い、育種に係わったと思われる遺伝子の検討を試みた。

#### 遺伝子組換え魚に関する文献調査：

2009年1月に公表されたGM動物の取り扱いに関する産業界向けガイダンスによって AquaBounty Technologies 社は不凍タンパクプロモーターの下流に成長ホルモン cDNA をつなげた配列を大西洋サケに導入した GM 大西洋サケを食品として出荷できるように FDA に申請した。FDA はこの申請に対し、2010年9月に公開の科学諮問委員会とこの GM 大西洋サケの表示に関する公聴会を開催した。FDA はこの会議に提出された資料の中で、GM 大西洋サケに関して、特に問題は無いと判断しており、同年11月までパブリックコメントを求める期間を設け、これらの意見を元に最終判断をする状況になっている。

FDA で申請が認可された場合でも、日本で GM 大西洋サケが養殖されることは考えられないが、製品として輸入されることは十分考えられる。今後はアメリカにおける GM 大西洋サケの

表示などに関する情報を調べると共に、非意図的に混入した場合の検査体制の確立等が求められる

#### 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：

遺伝子組換え（GM）植物のうち、人の健康や、牛、豚、鶏等の家畜や動物の健康に影響を与える成分を生産する植物を「薬用 GM 植物」の範囲と定め、その開発及び生産に関する情報を環境浄化目的の植物に関する情報とともに収集した。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、経口ワクチン、食用医薬、ワクチン抗原、抗体医薬、治療薬、診断薬・試薬、環境浄化の 8 種類を設定し、一覧表を作成した。2010 年に公表・出版された論文等 101 件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品：35 件、経口ワクチン：6 件、食用医薬：19 件、ワクチン抗原：7 件、抗体医薬：4 件、治療薬：25 件、診断薬・試薬：4 件、環境浄化：4 件であり、特に機能性食品、食用医薬及び治療薬の開発が盛んである状況が伺えた。また、2010 年の国別の件数は、日本：44 件、米国：18 件に次ぎ、中国：15 件であり、中国の研究が盛んであることが伺えた。

#### 遺伝子組換え動物の安全性評価に関する調査研究：

平成 21 年度は、モデル遺伝子組換えベクターとして、*loxP* 配列で緑色蛍光タンパク質遺伝子（*GFP*）とピューロマイシン耐性遺伝子（*Puro<sup>r</sup>*）を挟み込んだベクター（plex）を構築し、このモデル遺伝子組換えベクターを導入したモデル ES 細胞の樹立を行った。平成 22 年度は、これらのモデルベクターとモデル ES 細胞を用いて、いくつかの *loxP* 配列検出系の開発を試み、インバース PCR による検出が可能であることがわかった。

また Cre リコンビナーゼの細胞への導入が困難であることが判明したことから、Cre リコンビナーゼ発現ベクターの構築を行い、モデル ES 細胞中での Cre リコンビナーゼの発現を行った。その結果、ベクター導入モデル ES 細胞において、Cre リコンビナーゼのが発現することを確認した。

#### クローン牛の開発の動向と安全性評価

わが国の体細胞クローン牛研究は、1999 年 11 月の農林水産省による出荷自粛要請以降も継続し、10 年以上にわたり全国的規模で進められてきた。しかしながら、体細胞クローン家畜の生産効率の低さやこの技術に関する国民理解の醸成不足などが問題視され、食品安全委員会による体細胞クローン家畜とその後代の食品健康影響評価が 2009 年 6 月に済んだにもかかわらず、出荷自粛が継続されている。本年度の研究では、これら家畜の生産効率を明らかにするため、1998～2007 年における体細胞クローン牛の生産効率の国内調査を実施した。その結果、1998 年以降の体細胞クローン牛における子牛生産率（5.1～12.6%）、24 時間以上生存した子牛の割合（3.2～9.5%）および 6 カ月以上生存した子牛の割合（2.2～7.5%）には、経時的な改善傾向は認められなかった。次に、体細胞クローン家畜の安全性評価が出された後の動向を明らかにするための調査を実施した。その結果、欧州では、体細胞クローンの後代家畜の取扱を巡って欧州議会と欧州委員会との調整が難航していることが判明した。一方、国内の大学生等を対象としたリスクコミュニケーションを実施した結果、体細胞クローン家畜に対する理解浸透が認められた。

#### 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) 遺伝子組換え体の調製並びに食品成分調査

これまで実用化研究が進められてきた遺伝子組換え農作物の多くは、除草剤耐性や耐虫性などの形質を単独遺伝子の改変により付与したものであった。しかし、環境ストレス耐性等の付与を念頭に置いた場合、効果的に耐性を付与する手法として、内生遺伝子群の発現を制御することが出来る転写制御因子の導入が試みられている。こうした遺伝子組換え体の安全性評価は生物多様性影響評価にとどまっておらず、食品安全性の観点から評価が行われた事例はない。平成 22 年度は、RKN( root-knot nematodes)耐性遺伝子を導入した遺伝子組換えジャガイモを用いて、どのような要素を取り入れ食品安全性評価を行う必要があるかの検討を加えるため、多方面からの解析を実施し、評価基準の構築に向けての基盤研究を推進することを目的とした。本研究では、第一に可食部生産の可能である遺伝子組換え体を特定網室で栽培し、実験材料となる遺伝子組換えジャガイモの可食部(塊茎)について供給を進めた。得られた塊茎について導入遺伝子の発現解析を非可食部である塊茎皮部分を用いて実施し、提供材料の全てで導入遺伝子の発現を確認した。発現解析の結果、発現の強弱はあるものの全ての塊茎において導入遺伝子の発現が認められた。系統ごとに発現量が異なっており、導入遺伝子の発現量に応じて2つのグループに分け、各班に分配する遺伝子組換えジャガイモ系統を決定し、高発現系統、低発現系統にグループ分けした。オミクス用サンプルには高発現系統、低発現系統を、給餌用、栄養成分分析には高発現系統を用いた。一方、塊茎可食部を用いて食品成分についての調査を行った。組換え体において基本食品成分には差が認められず、遺伝子発現量に伴う成分変化の傾向は見出されなかった。

## (2) 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

昨今、様々な種類の遺伝子組換え植物が作出されている。これまでは害虫抵抗性や、栄養価を高めるような遺伝子組換え植物が多かったが、近年では、耐乾燥性や耐塩性などの環境抵抗性を持たせるための遺伝子組換えが行われており実用化されつつある。これらの環境抵抗性を付与するための遺伝子は転写調節因子や、RNA 結合タンパク質など、生体内の遺伝子発現に大きな影響を与えると考えられるものや、その作用機序が明確でないものが用いられている。その為、このような遺伝子組換え植物では内生の遺伝子の発現プロファイルが大きく変動していることが考えられるため、それらの影響が食品としての安全性にどの程度影響するかについて検討しておくことは重要である。そこで本研究では、RKN 耐性遺伝子を組換えたジャガイモと、RNA 結合タンパク質を組換えたイネを材料として、トランスクリプトーム解析を行うことでそれらの内生の遺伝子変動がどの程度揺らぐのかについての検討を行った。その結果、遺伝子を組換えたことよりも、個体、系統間の差や生育環境の影響の方が遺伝子発現に与える影響が大きいように思われたが、RKN 組換えジャガイモにおいては、いくつかの遺伝子について、遺伝子組換えによってその発現量が上昇していることが示唆された。今後その様な遺伝子がどの程度存在するのか、また、その発現量の変化が培養変異や生育環境の影響等ではなく組換えた遺伝子の直接の影響なのか等について詳細に検討する必要があるものと思われた。

## (3) 遺伝子組換え体のプロテオーム解析手法の検討

RKN(Root-knot nematodes) 抵抗性遺伝子を導

入したジャガイモ（高発現系統及び低発現系統）と非組換えジャガイモの塊茎を用いて、アレルゲンを含むタンパク質の2D-DIGE法による比較検討を行い、遺伝子組換え（RKN）ジャガイモは非組換え（NT）ジャガイモに比べて、cysteine proteinase inhibitor や aspartic proteinase inhibitor の発現の増加が観察された。一方、multicystatine は、発現が減少していた

#### (4) 遺伝子組換え体のメタボローム解析手法の検討

第3世代遺伝子組換え作物に分類される RKN 遺伝子導入バレイショ由来の塊茎を供試し、メタボローム解析によって実質的同等性の評価試験を実施した。RKN 遺伝子は、ネコブセンチュウ耐性を持つバレイショ近縁野生種から単離された LZ/NBS/LRR 型に属する植物病害抵抗性遺伝子の一種である。RKN 遺伝子を導入されたバレイショ栽培種はネコブセンチュウ耐性を獲得するが、多様な LZ/NBS/LRR 型遺伝子ファミリーのそれぞれが担う機能そのものが明確に整理されているわけではなく、RKN 遺伝子導入によるネコブセンチュウ耐性獲得の分子メカニズムも不明である。さらに、LZ/NBS/LRR 型遺伝子の導入によって育種された耐病性作物に関する実質的同等性の評価に関する知見もほとんど報告されていない。

本年度は、独立した3系統の RKN 遺伝子導入バレイショから収穫された塊茎を供試し、RKN 遺伝子導入による代謝変動の有無を非ターゲット型メタボローム解析によって評価した。メタボローム解析はガスクロマトグラフ質量分析装置（GC-MS）、および液体クロマトグラフ質量分析装置（LC-LIT-TOF/MS）を使用した。GC-MS 法では、糖、アミノ酸、脂質などの中心代謝に関わる 96 種類の代謝物の定量分析を行い、LC-LIT-TOF/MS

法によってステロイドアルカロイドの定量分析を行った。

GC-MS による同定・定量分析の結果を多変量解析によって比較したところ、組換え体と非組換え体のメタボロームクラスターは明確に分離しなかった。一部の代謝物では、組換え体で有意に含量が増加したが、すべての系統に一貫して確認されることはなかったため、導入された RKN 遺伝子との関連性は不明である。また、LC-LIT-TOF/MS によるステロイドアルカロイドの定量分析の結果から、遺伝子組換えバレイショ塊茎における含量増加は認められなかった。以上の結果から、RKN 導入が原因と理由づけられる有意な代謝変動は認められないと結論づけた。

#### 組換え食品のアレルギー性に関する研究：

平成22年度は、第3世代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並びにプロテオーム解析に関する調査研究として、(1) 遺伝子組換えジャガイモを用いてアレルゲンの網羅的解析手法の検討、(2) 動物を用いる組換えジャガイモのアレルゲン性の検討、(3) アレルゲン予測の解析法の検討並びにアレルゲンデータベース(ADFS)のデータの更新を行った。具体的には、(1) RKN(Root-knot nematodes)抵抗性遺伝子を導入したジャガイモと非組換えジャガイモの塊茎を用いて、アレルゲンを含むタンパク質の2D-DIGE法による網羅的解析を行い、遺伝子組換え（RKN）ジャガイモは非組換え（NT）ジャガイモに比べて、アレルゲンである cysteine proteinase inhibitor (Sola t 3) や aspartic proteinase inhibitor (Sola t 2) の発現の増加が観察された。(2) 食物アレルギー動物モデルマウスを用いて、RKN 遺伝子導入ジャガイモと非組換えジャガイモの感作を行い、両者のアレルゲン

性について比較検討を行った。BALB/cマウスを用い、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、組換えジャガイモ並びに非組換えジャガイモ塊茎抽出物の経口での感作、経口での惹起を行ったところ、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両者で同等と考えられた通常の摂食条件に比べて食物アレルギーの摂食条件ではパイエル板および腸管膜リンパ節のIFN- $\gamma$ 、IL-2、IL-4 およびIL-21 の分泌量が減少したことからTh1、Th2および濾胞ヘルパーT細胞 (Tfh) の分化が抑制されていることが示唆された。(3) アレルゲン予測の解析法の検討では、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を行い、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)ピークをエピトープ候補とし、その中からアレルゲンのエピトープの物理的特徴の解明を行う手法の検討を行った。また、ADFSのアレルゲン及びエピトープ情報の更新を行い、新たに17種のアレルゲンのエピトープ情報を追加し、エピトープ既知のアレルゲンの数は98種となった。

#### **組換え食品の検知法に関する研究：**

(1) パパイヤ加工製品からのパパイヤDNA抽出精製法の検討と安全性未承認遺伝子組換え(GM)パパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法の開発

パパイヤ加工製品から精製度の高いパパイヤDNAの抽出・精製法を確立し、台湾産安全性未承認GMパパイヤ (PRSV-YK) の系統特異的検知法を開発した。過去の輸入実績によると、海外からのパパイヤ輸入は国内総生産量の20倍にもおよぶため、今後、PRSV-YKを含む安全性未承認GMパ

イヤの国内への流通を阻止することが求められる。

(2) 中国産安全性未審査GMコメの遺伝子解析の検討

検疫所から提供された複数のコメ加工品に、害虫抵抗性を示すBtトキシン遺伝子が組込まれたGMコメKemingdao(KMD)系統の混入が確認された。その後、同加工製品の一部に新たにトリブシンインヒビターCpTI発現カセットを検出したことを昨年度に報告した。本報告では、新たにCpTI発現カセットを特異的に検知するコンストラクト特異的検知法の確立を行った。中国産GMコメ混入の実態を明らかにするため、これまでに開発した一連のGMコメ検知法と併せて安全性未承認GMコメを検出する解析方法の検討を行った。4種類のGMコメ検出用プライマー・プローブ(Bt63、NNBt、KMD1、CpTI)を組み合わせたリアルタイムPCR解析を行うことで、中国産安全性未承認のGMコメ混入の実態の詳細を解析することが可能となった。

(3) GMトマトの検知法開発に関する研究

国内で消費される主なトマト加工製品を中心にGMトマト混入の検査方法の確立と実態調査を行った。リアルタイムPCRを使用すれば、GMトマトに使用される可能性が高いCaMV 35Sプロモーターを高感度に検出することが可能であることが明らかとなった。また、本研究により、国内で市販されているトマト加工製品にCaMVのコンタミネーションによる偽陽性判定の結果が得られる可能性が示唆された。今後、リアルタイムPCRを使用してCaMVゲノム配列の検出とCaMV 35Sプロモーターの検出を同時に行い、得られるCt値の差を検出することでGMトマトの混入を調査することが可能であると考えられた。

#### (4) 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発

植物のゲノムには、対称 (CG, CNG) 及び非対称 (CHH) な配列のシトシン塩基にメチル化が観察される。本研究では、まず発芽前の種籾を取り上げ、稲の主要病害である白葉枯病の病原菌 *Xanthomonas oryzae* に抵抗性誘導活性を有するタンパク質 Xa21G のプロモーター領域を中心にメチル化パターンの解析を試みた。Xa21G プロモーター領域は、品種間によるメチル化率の違い、もしくは、日本晴種子ゲノム DNA は、発芽後数週間で高メチル化される領域である可能性が示唆された。今後、GM イネ作成に頻用される自家プロモーターの *Actin1* プロモーター領域のメチル化率を追跡し、自家もしくは組換え技術により導入された配列のメチルパターンの違いを解明する予定である。

#### E. 結論

第3世代にあたる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、RKN 耐性遺伝子導入ジャガイモを用いて、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 (パパイヤ、中国産 BT 米、トマト等) の定性試験法を開発した。社会的受容に関する調査研究では、遺伝子組換え作物・食品に関する消費者意識調査の分析を進めるとともに、消費者との対話型コミュニケーションを試行した。また、海外動向調査として、海外当局へのインタビュー調査等を実施した。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1世代、第2世代遺伝子組換え食品に加えて、第3世代遺伝子組換え食品の開発も進んでいる現状に鑑みて、第3世代遺伝子組換え食品の安全性に関する研究、当該食品の検知に関する試験法の確立は、安全性審査への反映、監視体制に直接つながる社会的に要請の高い研究である。これら研究をさらに進めると共に、社会的受容に関する研究等も持続することにより、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、コーデックスの関係では、バイオテクノロジー応用食品特別部会 (TFFBT) の審議は、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ため終了したが、表示部会での議論は継続しており、本研究班において社会的受容の立場からの意見のまとめを行っておくことは有用な情報提供となると思われる。

#### F. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

## 組換え微生物の国際動向、安全性に関する研究

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

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、細胞レベルでのサイトカイン産生誘導能の評価、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、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の性質を検討しその総和として（相加あるいは相乗的に働くであろうという立場で）安全性を評価してきた。

一方、我々はこれまでの研究により、遺伝子組換え微生物の免疫への反応では、組換えにより導入された形質が本来持つ免疫への刺激と宿主の持つ免疫への刺激の総和という形で免疫反応が起こらない場合があることを示してきた。単独では炎症性サイトカイン産生を誘導する作用を持つ異種タンパク質を遺伝子組換えにより乳酸菌に発現させると、宿主である乳酸菌がもつ炎症性サイトカイン産生能をむしろ低下させることを観察し報告した。また、2つの異なった抗原を共発現させたモデル組換え体の評価することにより、宿主の持つ免疫刺激、発現させた抗原による免疫刺激、組換え体以外の共存するタンパク質による免疫刺激などが複雑に絡み合い免疫反応を示すことを実証した。組換え微生物の安全性評価特に、免疫影響評価に当たっては今後このような点を考慮する必要があると思われる。本年度は遺伝子組換え技術を用いて、活性型 IL-1 $\beta$ を発現させたモデル組換え体を作出し、このモデル組換え体を用いてマウス免疫系への影響について明らかにした。

さて、遺伝子操作により、細菌はどの程度遺伝子レベルでの変化が起こるかに関する知見はほとんどない。そこで乳酸菌を用いて、従来の育種方法として変異原物質を用いた育種を試み、同様な表現型を得るまでに遺伝子組換えによる育種では、ゲノムレベルでどの程度の変化が観察されるかを比較することにした。昨年は乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM393 株と変異原物質を用いた育種株 KK378 株のゲノム解析のドラフトを作成した。本年度は引き続きゲノムの検討を進めた。また、育種株と元株のタンパクの発現レベルでの比較を 2 次元電気泳動により行い、育種に係わったと思われる遺伝子の検討を試みた。

### 協力研究者

五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所室長）  
朝倉 宏（同 研究所・主任研究官）  
梶川 揚申（同 研究所・流動研究員）  
榊田 和彌（同 研究所・研究生）

### A. 研究目的

遺伝子組換え食品特に微生物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、モデル組換え体を用い、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、マウス活性型 IL-1 $\beta$ を発現するように組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。宿主の *Lactobacillus casei* IGM 393 株は、マウス IL-1 $\beta$  の構造遺伝子を組み込んだ pIGM2J

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。このベクターでは組み込んだ遺伝子にコードされている活性型タンパク質は乳酸菌菌体外に分泌されて発現する。

## 2. 組換え乳酸菌の発現状況の確認

作出したモデル組換え体について、タンパクの発現は、IL-1 $\beta$  特異的抗体を用いてウェスタンブロットにより評価した。また、市販のマウス IL-1 $\beta$  特異的抗体を用いた ELISA キットにより定量的に行った。

## 3. マウス IL-1 $\beta$ の活性の確認

産生されたマウス IL-1 $\beta$  の活性は、継代細胞を用いた IL-8 産生誘導能により定量した。IL-8 産生誘導は、ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用いて評価した。モデル組換え体の抽出液をさらした後の培養上清中に産生された IL-8 量を、ELISA 法で測定した。

## 4. マウス腸管ループ法による各種サイトカイン誘導能の評価

モデル遺伝子組換え乳酸菌を腸管ループ内へ  $10^9$ CFU/ml 以上投与し、11 種類のサイトカインについてその誘導の有無を RT-PCR により評価した。

## 5. パイエル板における IL-6 誘導能の評価

マウスからパイエル板を分離し、MACS を用いて CD11c<sup>+</sup> および CD11c<sup>-</sup> 細胞を回収し、IL-6 誘導能を評価した。

## 6. IL-1 $\beta$ 産生モデル組換え体のサルモネラ菌体に対する抗体産生誘導能の評価

IL-1 $\beta$  産生モデル組換え体とサルモネラ・エンテリティディス (SE) 加熱死菌体が共存した場合に、SE 特異的な抗体産生誘導が起こるかを評価した。

## 7. ゲノム解析

IGM393 と KK378 株について行ったゲノムのドラフトについて整理し、更なる解析を続けフルゲノム作成を進めた。

# C. 研究結果

## 1. モデル組換え体の作出

モデル組換え体として、マウス活性型 IL-1 $\beta$  を発現するように組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。マウス IL-1 $\beta$  の構造遺伝子を組み込んだプラスミド pIGM2J::mIL-1 $\beta$  を作成 (Fig.1) し、エレクトロポレーション法にて宿主の *L. casei* IGM393 株を形質転換した。組み込んだ遺伝子にコードされている活性型 IL-1 $\beta$  は乳酸菌々体外に分泌されて発現することになる。

## 2. 組換え乳酸菌の発現状況の確認

作出したモデル組換え体について、IL-1 $\beta$  特異的抗体を用いてウェスタンブロットにより評価した結果を Fig. 2 に示した。菌体のリゾチーム処理により得られた細胞画分には IL-1 $\beta$  の抗体により

認識する前駆体と思われる IL-1 $\beta$  よりややサイズの大きいタンパク質を認めた。培養上清には前駆体と活性型と同様なサイズの 2 つのサイズのタンパク質が検出された。また、市販のマウス IL-1 $\beta$  特異的抗体を用いた ELISA キットにより定量的に測定した結果を Table 2 に示した。培養上清の pH を緩衝液により中性~pH8.0 程度に制御すると、産生される IL-1 $\beta$  の量は 3 倍以上に増大した。

## 3. マウス IL-1 $\beta$ の生物活性の確認

産生されたマウス IL-1 $\beta$  の活性は、継代細胞を用いた IL-8 産生誘導能により定量した。IL-8 産生誘導は、ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用いて評価した。モデル組換え体の抽出液をさらした後の培養上清中に産生された IL-8 量を、ELISA 法で測定した結果を Fig. 3 に示した。モデル組換え体より産生された IL-1 $\beta$  は、この試験系で濃度依存的に IL-8 を誘導し、生物活性が認められた。

## 4. マウス腸管ループ法による各種サイトカイン誘導能の評価

モデル遺伝子組換え乳酸菌を腸管ループ内へ  $10^9$ CFU/ml 以上投与し、11 種類のサイトカインについてその誘導の有無を RT-PCR により評価した結果を Fig. 4 に示した。モデル組換え体の場合、PP cell のメッセンジャーで、IL-1 $\beta$ 、IL-6 が誘導されていることが観察された。TGF $\beta$  では、メッセンジャーのレベルに差が見られた。

## 5. パイエル板における IL-6 誘導能の評価

マウスからパイエル板を分離し、MACS を用いて CD11c<sup>+</sup> および CD11c<sup>-</sup> 細胞を回収し、IL-6 誘導能を評価した結果を Fig. 5、および Fig. 6 に示した。PP cell の CD11c<sup>+</sup> 細胞から、モデル組換え投与の影響で、IL-6 が誘導されていることが示された。

## 6. IL-1 $\beta$ 産生モデル組換え体のサルモネラ菌体に対する抗体産生誘導能の評価

IL-1 $\beta$  産生モデル組換え体とサルモネラ・エンテリティディス (SE) 加熱死菌体が共存した場合に、SE 特異的な抗体産生誘導が起こるかを評価した。結果を Fig. 7 に示した。モデル組換え体の投与により、SE 特異的な抗体誘導が増強されることが示された。

## 7. ゲノム解析

IGM393 と KK378 株について行ったゲノムのドラフトについて整理し、更なる解析を続けフルゲノム作成を進めた。また、2D ゲルを用いて変異株の主要なタンパク質を網羅的に調べ、産生量の変化したタンパク質の内、好氣的な条件での発育に係わるとと思われるタンパク質について考察した。主要なタンパク質の内、等で、タンパク質量に大きな差が認められた。(データ省略)

## D. 考察

### 1. モデル組換え体の作出

これまでの遺伝子組換え植物の安全性評価では、遺伝子組換えによって導入した遺伝子産物の生成物の毒性評価としては、基本的には相加的に働くとして評価が行われてきた。一方、これまでの研究から、モデル組換え微生物と免疫系との反応では、元の宿主菌と遺伝子組換えによって導入された付加的な機能とは、必ずしも相加的な反応を示さないことがあることを示してきた。

免疫系の反応では、様々なメディエーターが存在し、それらが絡み合って複雑な相互作用をし、その結果としての反応を推定することは容易ではないと思われる。微生物は菌体成分に免疫系を刺激する物質が存在しており、遺伝子組換え微生物の安全性を考える上で免疫系への反応性をどのように評価してゆくかはまだ議論の余地のある分野であり、今後実証的なデータを積み重ねることにより考察してゆかなければならないと思われる。免疫系への反応性については、多様な組換え体を作成して、それぞれがどのような反応を起こすのかを検証してゆき、データベース化した後、安全性評価をどのように行うべきかの方向性を決める必要がある。

昨年度の検討では、TNF 誘導能のある物質の遺伝子を導入したモデル組換え体で、親株に対して TNF 誘導能が低下することが観察され、それが組換え体の菌体膜の構造を変化させていることにより、起こっていることを明らかにした。

今年度は、炎症性のサイトカインであるマウス活性型 IL-1 $\beta$  を発現するように組み込んだ乳酸菌組換え体を作成し、細胞レベル、マウス個体レベルでの評価を試みることにした。

### 2. 組換え乳酸菌の発現状況の確認

作出したモデル組換え体は、IL-1 $\beta$  特異的抗体を用いてウェスタンブロットにより評価した結果、免疫学的に認識されるマウス IL-1 $\beta$  を産生していることが確認できた。菌体内では、やや分子量の大きな前駆体として存在しており、菌体外へは、本来の分子量サイズの IL-1 $\beta$  が分泌されていると思われる。

### 3. マウス IL-1 $\beta$ の生物活性の確認

産生されたマウス IL-1 $\beta$  の生物活性は、継代細胞を用いた IL-8 産生誘導能により評価した。モデル組換え体の上清中に産生された IL-1 $\beta$  の作用により、Caco-2 細胞からの IL-8 誘導を確認したことから、モデル組換え体では生物活性のある IL-1 $\beta$  が産生されていると思われる。

### 4. マウス腸管ループ法による各種サイトカイン誘導能の評価

モデル遺伝子組換え乳酸菌をマウス腸管ループ

内へ 10<sup>8</sup>CFU/ml 以上投与し、11 種類のサイトカインについてその誘導の有無を RT-PCR により評価したところ、モデル組換え体では IL-6 が誘導されていることが確認された。このことからモデル組換え体から産生されている IL-1 $\beta$  には、動物個体レベルで、PP における IL-6 を誘導する作用が確認された。PP 以外の細胞では LP 細胞ではほとんど変化が認められていない。このように免疫系への影響では、対象となる細胞の違いによりその反応が異なることも、今後配慮していかなければならない。

### 5. パイエル板における IL-6 誘導能の評価

マウスからパイエル板を分離し、MACS を用いて CD11c<sup>+</sup> および CD11c<sup>-</sup> 細胞を回収し、IL-6 誘導能を評価した結果から、パイエル板細胞でも、CD11c<sup>+</sup> 細胞と CD11c<sup>-</sup> 細胞ではその反応性が全く異なっている。反応を観察する対象とする細胞は最新の免疫学の情報を基に決定する必要があると思われる。また、この選択を誤ると実際は活性があっても探知できないことがあると思われる。

### 6. IL-1 $\beta$ 産生モデル組換え体のサルモネラ菌体に対する抗体産生誘導能の評価

消化管内では、遺伝子組換え微生物と腸管細胞との反応だけでは十分な安全性評価が困難である。例えば、腸内には大量の細菌フローラが存在しており、この影響も考慮が必要である。今回はモデル組換え体が IL-1 $\beta$  を産生することになると、腸内フローラに存在する菌に対する影響がどのように出るかとの観点で検討してみた。

サルモネラ・エンテリティディス (SE) の加熱死菌体を用いたのは、代表的な腸内病原菌で、抗原的に最も免疫系に認識されやすい菌であるため、評価が得られやすいと考えたためである。モデル組換え体に反応し、腸管では積極的に SE に対する抗体産生を誘導していることが観察された。このことは、腸内フローラからの刺激が、モデル組換え体により影響を受け、積極的に動物腸管内の免疫系の反応性を変化させていることを示している。この結果は、今後はこのような反応についても評価してゆく必要があることを示した。抗体誘導により、おそらく腸管内における病原体の挙動に変化が起これるとと思われる。

### 7. ゲノム解析

ゲノム解析の結果をドラフトの段階から更に進めた。また、2 次元電気泳動による網羅的なタンパク質レベルでの変位の評価は、更に引き続いて検討を進める予定である。

## E. 結論

IL-1 $\beta$  という免疫系に生理活性を有するサイトカイン遺伝子を挿入したモデル組換え体の作出に成功し、細胞レベル、動物レベルでの検討に

より実証的な遺伝子組換え微生物の評価が出来た。複雑な免疫系に対する評価は、適切な細胞や、実験系を設定すればその反応性を評価することが可能である。一方、適切な細胞や評価系を選ばないと反応を見ることは困難であることが実証された。

IL-1 $\beta$ という免疫系への反応に係わる遺伝子を導入したモデル組換え微生物では、その影響により腸内フローラに対する免疫反応を修飾していたことから、腸内フローラに関する影響についても今後検討する必要があると思われた。今回の知見を基に、腸内フローラに存在する病原菌の挙動に関する評価のできる実験系を検討する必要があると思われた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Kajikawa A., Masuda K., Katoh M., and Igimi S.: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(1):43-48. (2010)
2. Kajikawa A., Ichikawa E., and Igimi S.: Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(2):375-382 (2010)
3. Kajikawa A. and Igimi S.: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine* 28(19):3409-3415 (2010)
4. Masuda K., Kajikawa A., and Igimi S. Establishment and evaluation of an *in vitro* M cell model using C2BBel cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. in press

##### 学会発表

1. Masuda K., and Igimi S.: Observation of *Lactobacillus casei* IGM 393 transport using *in vitro* M cell model. International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics. 2010. 6. Kosice, Slovakia
2. 梶田和彌、五十君静信 : Caco-2 細胞と B 細胞との共培養による *Lactobacillus casei* IGM393

株の透過促進. 日本乳酸菌学会. 2010. 7. 26. 仙台

3. 五十君静信 : 乳酸菌・ビフィズス菌の新しい研究と応用—医薬分野への応用の可能性—. 日本乳酸菌学会設立 20 周年記念シンポジウム. 2010. 11. 20. 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

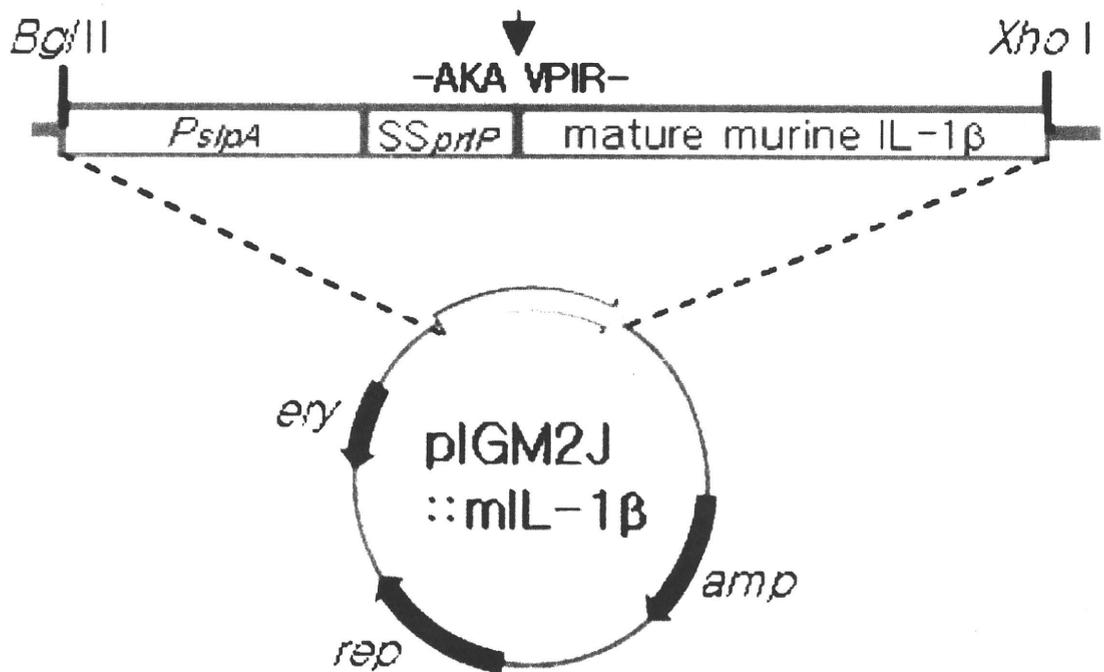


FIG. 1. Feature map of pIGM2J::mIL-1 $\beta$ . The structure, expression cassette, restriction sites, and cleavage point of the fusion protein (arrow) are shown. Genes: *amp*, ampicillin resistance; *rep*, replication protein; *ery*, erythromycin resistance.

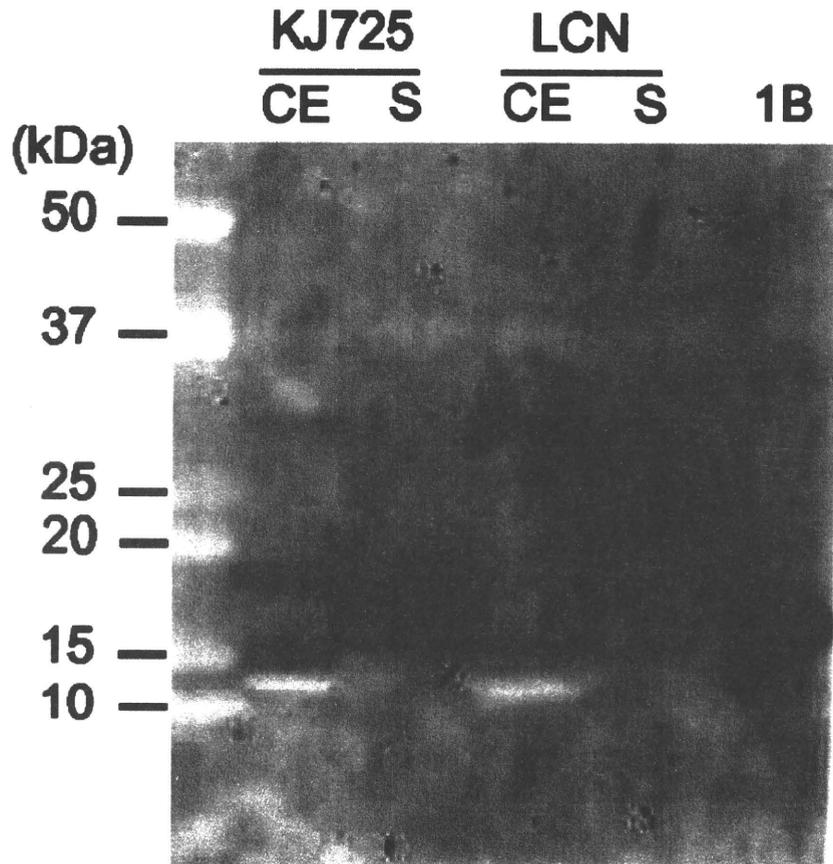


FIG. 2. Detection of IL-1  $\beta$  -specific bands by immunoblotting. Lysozyme-treated cell extracts (CE), concentrated culture supernatants (S), and 10 ng of purified IL-1  $\beta$  (1B) were applied to SDS-PAGE and immunoblotting. Anti-IL-1  $\beta$  antibody was used at 1:5,000, and HRPconjugated anti-rabbit IgG was used at 1:50,000. Molecular masses are shown on the left.

Table 2. Yield of IL-1 $\beta$  in KJ725 culture with or without buffer.

Culture condition	IL-1 $\beta$ yield ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>
No buffer (pH 6.3)	0.326
Buffer (pH 7.0)	1.032
Buffer (pH 7.5)	0.966
Buffer (pH 8.0)	1.116

<sup>a</sup> Mean value of triplicate cultures.

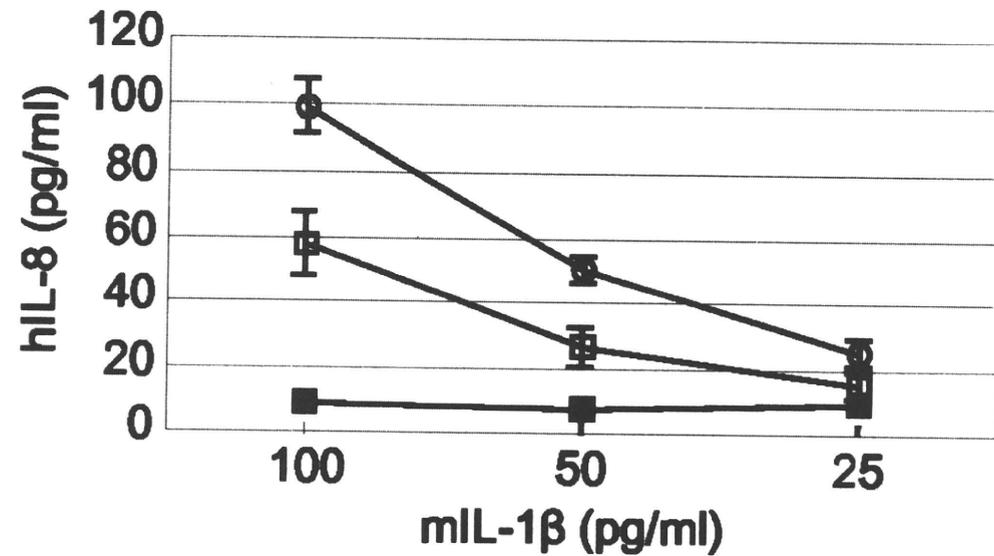


FIG. 3. Biological activity of recombinant murine IL-1  $\beta$  produced by KJ725. Human IL-8 released from Caco-2 cells was measured after 24 h of stimulation with culture supernatant of KJ725 (empty squares) or LCN (filled squares) or with purified murine IL-1  $\beta$  standard (empty circles). The concentration of total murine IL-1  $\beta$  in the culture supernatant of KJ725 (in MRSEC medium) was determined by ELISA and then adjusted to 100, 50, and 25 pg/ml by dilution in complete RPMI medium. The corresponding volume of culture supernatant of LCN was added to the Caco-2 cell culture as a negative control. The result shown is representative of three separate experiments; the values are the means  $\pm$  standard deviations (SD) of duplicate samples.

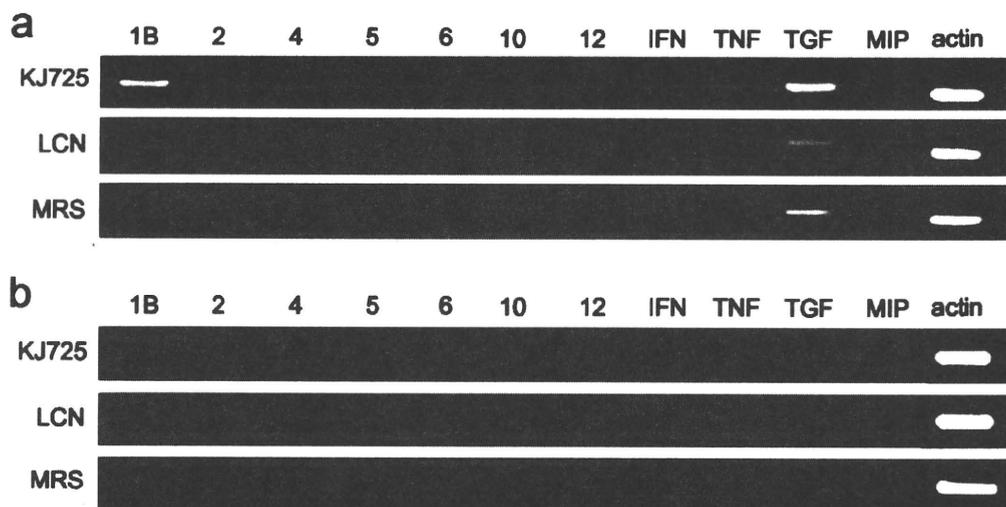


FIG. 4. Cytokine expression induced by ligated-intestinal-loop assay using RT-PCR. PCR products were applied to 2% agarose gels. Eleven kinds of cytokines (IL-1  $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, and IL-12p35 [lanes 1B to 12]; IFN-  $\gamma$  [IFN]; TNF-  $\alpha$  [TNF]; TGF-  $\beta$  [TGF]; and MIP-2 [MIP]) expressed in PP cells (a) and LP cells (b) were detected by RT-PCR using specific primer pairs. As an internal control, a DNA fragment of  $\beta$ -actin (actin) was also amplified. The data represent at least three separate experiments.

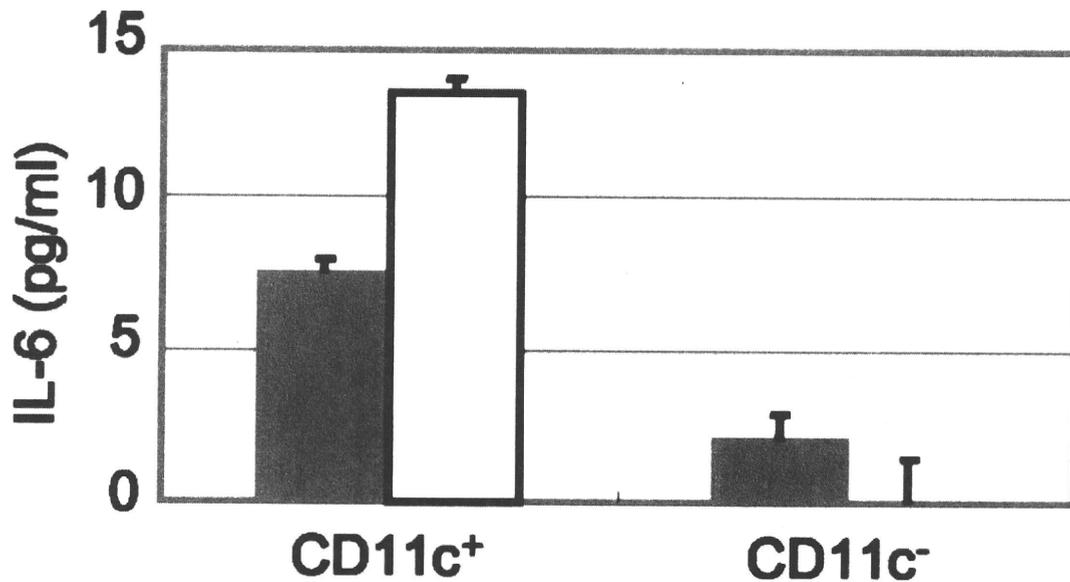


FIG. 5. IL-6 release by PP CD11c<sup>+</sup> or CD11c<sup>-</sup> cells. MACS separated CD11c<sup>+</sup> or CD11c<sup>-</sup> cells ( $5 \times 10^4$  cells/well) were stimulated with KJ725 cells (solid bars;  $5 \times 10^5$  CFU/well) or culture supernatant (open bars; 0.5%). After 24 h of incubation, samples were collected and released IL-6 was detected by ELISA. The results shown are representative of three separate experiments; The values are means and SD.