

201131007A

厚生労働科学研究費補助金

食品の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23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24年3月

# 目 次

<b>I. 総括研究報告書</b>	
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
<b>II. 分担研究報告書</b>	
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	1 9
<レビュー：遺伝子組換え大西洋サケに関する最近の動向>	2 3
(iii) 遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究	3 3
(iv) 薬用GM植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究	4 1
<資料：薬用及び環境浄化用遺伝子組換え植物の開発・	
生産に関する最近の動向>	5 9
(v) クローン牛の開発の動向と安全性評価	1 0 5
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
(i) 遺伝子組換え食品の社会的受容に関する研究	1 1 7
(ii) 食品安全への不安感の時系列調査と遺伝子組 み換え食品と放射線食品との比較結果	1 3 3
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(1)~(2)	
小関 良宏	1 3 9
4. 組換え植物のメタボローム解析	
太田 大策	1 5 1
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	1 5 9
6. 組換え植物の検知技術の開発に関する研究	
近藤 一成	1 7 9
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	1 9 9

### 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 客員研究員

#### 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。

#### 研究分担者

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  
近藤 一成 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近藤班員、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、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増養殖家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、第三世代の定義に関する調査を実施した。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。

社会的受容の国際的比較からは、日本の消費者の GMO に対する抵抗感は、EU の消費者よりも高い傾向がうかがえた。特に、「他の植物の遺伝子を導入した植物」と「動物の遺伝子を導入した植物」の抵抗感を比較すると、日本、EU とともに「動物の遺伝子を導入した植物」の方が抵抗感が高いなど、消費者が抵抗感を示す傾向は同じながらも、日本の消費者の遺伝子組換え生物(GMO)に対する抵抗感は、EU の消費者よりも高い傾向がうかがえた。GMO の世代区分の考え方の整理からは、本研究のように、環境耐性を有する GMO を第三世代と区分する事例は、既存の世代区分ではあまり例の無いことが明らかになった。また、将来的課題として、GM 動物・魚のリスクコミュニケーションが喫緊の

問題である。動物への GM 技術の応用は植物以上に抵抗感のあるものであるため、慎重なリスクコミュニケーションの検討が求められる。また、消費者が主体的に考え、判断していくためには、専門家だけでなく理解でき、かつ十分な情報量が必要となり、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が重要であり、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。

#### 組換え微生物を用いた食品の安全性に関する調査研究：

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、ヒト腸管の M 細胞モデル実験系を開発し、モデル乳酸菌組換え体を用いて、免疫系への影響を検討した。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。本年度は継代細胞を用いて、ヒト腸管 M 細胞モデル実験系を検討し、M 細胞からの取り込みが知られているタンパク質をコードするモデル組換え体を作成し、このモデル実験系での反応性について検討した。

#### 遺伝子組換え魚に関する文献調査：

国内外における遺伝子組換え魚類の開発状況を調べる目的で、文献検索、インターネット情報および特許等を調査した。新たに遺伝子組換え魚類としてリゾチーム遺伝子を導入したニジマスや海産魚のイシモチに遺伝子導入した事例が報告された。中国では遺伝子組換え魚の不妊化を行うのに金魚とコイの雑種の中から見つかった4倍体を利用して、4倍体と2倍体の交配によって3倍体を作成する論文が報告された。遺伝子組換え魚の繁殖特性について遺伝子組換え大西洋サケ、ギンザケおよびコイを用いて報告された。これらの論文では人為的実験環境では正しい評価はできず、なるべく自然環境に似た実験環境で行うべきであると指摘している。そして、自然環境に似せた実験環境を設定し実験を行っている。いずれの実験においても野生魚に比較して遺伝子組換え魚は繁殖特性（餌料競合試験、縄張り試験およびペアリングなど）で劣っている、という結果が得られている。AquaBounty Technologie社研究部長と面談した結果、新たに情報は得られなかった。しかし、許認可状況が停滞しているなか、同社は新たに生産規模を大きくル施設を作る

など、事業を進めている。

#### 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。キーワード「transgenic plant」で SciFinder®で調査し収集した2011年に公表・出版された論文等45件をカテゴリー別に集計した結果、機能性食品：17件、経口ワクチン：9件、食用医薬：1件、ワクチン抗原：0件、抗体医薬：3件、治療薬：8件、診断薬・試薬：1件、環境浄化：8件（重複2件）であり、特に機能性食品、経口ワクチン、治療薬及び環境浄化の開発が盛んである状況が伺えた。また、2011年の国別の件数は、中国：15件、韓国：7件、日本：5件であり、中国の研究が非常に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22年度は、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) を挟み込んだモデル遺伝子組換えベクター (plex) を導入したモデル胚性幹細胞 (ES細胞) に対して、Creリコンビナーゼを一過性に発現するベクターの組込みに成功した。そこで平成23年度は、Creリコンビナーゼを発現させたモデルES細胞において、GFPが削除されたES細胞のクローニングを行った。またこのクローン化

ES細胞中に1コピーのloxP配列の挿入を確認後、このES細胞からゲノムDNAを抽出し、平成22年度に構築したloxP配列を検出するためのインバースPCRを実施した。その結果、標的ゲノムDNAを鋳型にした場合において、明らかな増幅産物の増加が確認され、loxP配列検知系の一次スクリーニングの有効性を示すことができたが、確定判定には、さらなる検知系の開発が必要であることも明らかとなった。

#### クローン牛の開発の動向と安全性評価

本年度の研究では、わが国で生産された体細胞クローン牛およびその後代の強健性ならびに体細胞クローン技術に携わる研究者とリスクコミュニケーションに関する調査を実施した。その結果、黒毛和種における肥育もと牛の出荷(約10カ月(300日)齢)や食肉出荷(24カ月(720日)齢以降)、ホルスタイン種雌の初産分娩(24カ月(720日)齢以降)の時期に生存している体細胞クローン牛の強健性は一般牛と同等と考えられた。また、後代牛と一般牛の強健性は一般牛と同等と見なされた。一方、「体細胞クローン」の段階に差しかかった先端バイオ研究では、消費者やメディアの多くが「生命の根幹」と捉えている部分を研究者が操作することになったため、両者の間に横たわる意識の落差が極めて大きくなった。そのような状況を迎え、その研究に携わる研究者には、従来から取り組んできた「技術」や「知識」に加え、「リスクコミュニケーション」が追加された。

#### 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  
これまで遺伝子組換えジャガイモについて五大栄養成分の分析を実施してきた。同一環境で栽培した非組換え体を対照として比較を行ってきた

が、その差異を評価する基準が明確でなく、組換え体の影響を議論することが難しかった。そこで、市販されているジャガイモが産地等でどの程度の差異を持つのかの振れ幅を明らかにし、組換え体の影響を評価する基準の概念を形成する必要がある。ジャガイモの主産地である北海道の6地域と、端境期産地の長崎、及び筑波大学で屋外栽培したメークインを材料に栄養成分の分析を行った。その結果、同一品種であっても産地によりその成分は異なり、特に水分の変位が非常に大きいことが明らかとなった。水分は栽培環境や貯蔵と言った外的要素で大きく異なるため、成分の比較は乾重量ベースで行うこととした。その結果、遺伝子組換え体と非組換え体の間には有意な差が認められなかった。今後、含有成分等の比較を行う際には非組換え体の振れ幅を規定し、かつ、成分に応じては乾重量ベースでの比較を行うなど、比較基準を明確にする必要性が見出された。

(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

近年数多くの遺伝子組換え植物が開発され、食品としても流通している。また、最近では遺伝子組換え植物同士を交配したいいわゆる「スタック」品種も作出され始めている。しかし、これら遺伝子組換え植物同士を交配させた品種において組換えた遺伝子の影響がどのようになるかについて研究されていない。そこで、本研究ではタバコを用いてスタック品種のモデルとなる遺伝子組換え植物を作出することと、それらの植物体を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、遺伝子発現量の変化を俯瞰した場合には、遺伝子を組換えた植物体と、それらの交配後代であるスタック品種とにおいて、大きな遺伝子発現のプロファイル変化は見られなかった。また、スタック

品種において遺伝子非組換え体と比較して明らかに発現量が増大していた遺伝子の約半数は、それらの親の世代でも発現量が増加していた遺伝子であり、遺伝子非組換え体と比較して変動量の大きかった遺伝子の多くが後代でもその変動量を保っていることが判明した。

### (3) 遺伝子組換え体のプロテオーム解析手法の検討

RBP(RNA binding protein)を導入したコメをモデル植物として用い、塩ストレス(200mM NaCl)存在下・非存在下で栽培したタンパク質の発現を、同じく塩ストレス存在下・非存在下で栽培した非組換え (NT) コメにおける発現量と 2D-DIGE (2-Dimensional Fluorescence Difference Gel Electrophoresis) 法で比較した。RBP 組換えコメでは NT コメに比べ、塩ストレス栽培下と通常栽培時の中で、タンパク発現の変動が少ないことが明らかとなった。なお、RBP コメのストレス下で発現の上昇するタンパク質は、granule-bound starch synthase, putative abscisic acid-induced protein であった。また、塩ストレス耐性を付与する遺伝子 SeFLA および RBP を、それぞれ単独導入したタバコおよびスタック株を用いた葉のタンパク質発現差異解析結果から、スタック株では単独発現株ではみられなかった、非組換え体とのタンパク質発現差異もみられる可能性が示唆された。

### (4) 遺伝子組換え体のメタボローム解析手法の検討

質量分析を基盤としたメタボローム解析によって、遺伝子組換え作物における代謝動態変化の有無を明らかにし、遺伝子組換え作物の安全性評価の基礎データとすることを目的として研究を行った。まず、SeFLA (アラビノガラクタンタン

パク質) 遺伝子組換えタバコ、McRBP (リボソーム結合タンパク質) 遺伝子組換えタバコ、それらのスタック品種、および非組換え体タバコ緑葉から 80%メタノール抽出物を調製しメタボローム解析に供した (103 種類の化合物由来イオンピークを検出し、53 種類の代謝物を同定・定量)。その結果、各系統は独自のメタボロームを形成したが、葉位による代謝活性の差はそれらよりもはるかに大きかった。McRBP 系統では、Val, Ile, 2-oxoglutaric acid, Asp, Glu, 2-amino adipic acid, sucrose レベルが顕著に上昇しており、同化窒素の輸送、あるいはグルタチオン経路の活性化が示唆された。SeFLA 系統では 2-oxoglutaric acid, putrescine, 2-amino adipic acid, inositol, sucrose レベルが上昇していた。これらの代謝物増減はスタック系統でも保持されていた。続いて、塩ストレス環境下で栽培された McRBP 組換えイネ系統と非組換えイネから収穫された玄米の代謝物プロファイルを解析した。80%メタノール、およびメタノール/クロロホルム (3:1) の 2 種類の抽出溶媒を用いて質量分析用抽出液を調製し、メタボローム解析を実施した。メタノール抽出液から 88 種類の化合物由来イオンピークを検出 (54 種類を同定)、メタノール/クロロホルム抽出液から 26 種類の化合物由来イオンピークを検出 (7 種類を同定) した。McRBP 組換えイネと非組換えイネの両者で、塩ストレスによって大きく代謝プロファイルが変動すること、その要因として TCA 回路代謝物レベルの変動が示唆された。

以上の結果から、導入遺伝子の種類によらず、ストレス応答に関わる代謝活性が亢進 (例えば GSH 系路) していることがわかった。

組換え食品のアレルギー性に関する研究 :

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) 遺伝子組換えコメを用いてアレルゲンを含むタンパク質の網羅的解析手法の検討、(2) 動物を用いる組換えコメ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、アレルゲンデータベース (ADFS) のタンパク質アレルゲンデータの更新並びに低分子アレルゲン解析ツールの新たな追加、(4) 発現タンパク質の品種間でのばらつきを調べるための2D-DIGEによる網羅的解析を行った。具体的には、(1) RBP(RNA binding protein)を導入したコメをモデル植物として用い、塩ストレス(200mM NaCl)存在下・非存在下で栽培したアレルゲンを含むタンパク質の発現を、同じく塩ストレス存在下・非存在下で栽培した非組換え (NT) コメにおける発現量と比較した。RBP組換えコメではNTコメに比べ、塩ストレス栽培下と通常栽培時の間で、アレルゲンを含むタンパク質発現の変動が少ないことが明らかとなった。(2) 食物アレルギー動物モデルマウスを用いて、RBP遺伝子導入コメと非組換えコメの感作を行い、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、組換えコメ並びに非組換えコメ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は両者で同等と考えられた。(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のため、T細胞エピトープの予測の可能性を、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)インデックスを用いて行ったところ、T細胞エピトープの予測が可能であることを示唆するデータが得られた。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6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165種となった。また、新たに低分子アレルゲンの検索画面をADFS内に立ち上げた。(4) 発現タンパク質の品種間での差を調べるための2D-DIGEによる網羅的解析では、コメ4品種を用いた5機関の国際バリデーション試験を開始した。

#### 組換え植物の検知技術の開発に関する研究：

1. コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良：ビーフンやコメ粉以外にフォー用乾麺、生春巻き用タピオカ入りライスペーパーなど、コメ加工品の種類は多様化しており、安全性未審査の遺伝子組換え (GM) コメを高感度に検査する方法が求められる。一部の加熱加工品において、従来のシリカゲル膜を利用したコメ DNA 抽出精製方法では十分な DNA の抽出精製ができず real-time PCR 反応を用いた高感度な検出が困難であった。そこで、より多様な加工品に対応できるコメ DNA 抽出精製方法の開発を行い、イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット (QIAGEN Genomic-tip) が最も精製度が優れていた。2. コメ陽性対照用試験のためのコメに特異的な DNA 検出法の確立：リアルタイム PCR を使用したコメ内在性遺伝子 PLD について、従来の方法では 100%トウモロコシ試料において弱いながら反応する (Ct40<) ことが確認されたことから、より特異性の高い高感度なコメ PLD の標的配列を検出する方法が求められていた。そこで、特異的なコメ PLD の検出のできる新しいリアルタイム PCR 用プライマー対・プローブの開発を行った。3. 安全性未承認 GM コメの



モニタリング検査: 文献等の情報を基に白葉枯病抵抗性GM コメや除草剤耐性GM コメの混入検査を含めたコメ加工品のGM コメのモニタリング検査を行った。検査の結果、計 32 検体中に 63Bt は 5 検体、NNBt は 9 検体、tnos は 9 検体、35S は 9 検体に検出された。今後、特定できていない GM コメ検体について詳細に調べる必要があると考えられた。

4. 安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性 GM コメ Xa21 の検知法確立: 2009 年 11 月に中国で安全性認可が与えられた害虫抵抗性 GM コメ系統である Shanyou63 (63Bt) は、白葉枯病菌に感染しやすいことから白葉枯病原菌 *Xanthomonas oryzae* 耐性 Xa21 を発現させたスタック品種の開発が報告された。GM コメ Bt63 陽性検体 (R3、R5、R6) において GM コメ Xa21 コンストラクト構造の一部を PCR により検出を試みたところ非 GM 検体には検出されない約 1.4 kb の増幅産物を得た。シーケンス解析を行った結果、白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* に耐性を持つ野生イネ *Oryza longistaminata* 由来遺伝子 Xa21 の配列と同一であった。このことから、GM コメ Xa21 の混入もしくは野生イネとの掛け合わせ品種の可能性が示唆された。今後、導入ベクターと Xa21 の境界領域である配列を解析することで、GM コメ Xa21 を検出可能な高感度で特異的なリアルタイム PCR 用プライマー・プローブの構築を行う予定である。

5. パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査 35S プロモーター及び NOS ターミネーターを検出したパパイヤ加工品に安全性承認済み GM パパイヤ 55-1 系統検知法では検出されない加工製品 (缶詰 1 製品、漬物 2 製品、茶 1 製品) を確認した。35S プロモーター及び NOS ターミネーターは他の GM パパイヤのシスエレメントであるプロモーター、ターミネーターとして

使用されていることから、55-1 系統以外の安全性未承認の GM パパイヤの混入の可能性が示唆された。現時点で、2011 年 2 月に確認された未承認 GM パパイヤ (PRSV-YK) 以外は確認されていないが、パパイヤ加工品の実態調査は継続して行う予定である。

## 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、RBP (RNA binding protein) 遺伝子導入コメをモデル植物として用い、塩ストレス (200mM NaCl) 存在下・非存在下で栽培した植物と、同じく塩ストレス存在下・非存在下で栽培した非組換え (NT) 植物由来のコメについて、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、2種以上の形質を掛け合わせたいわゆるスタック品種の安全性試験に資するために、塩ストレス耐性を付与する遺伝子 SeFLA および RBP を、それぞれ単独導入したタバコおよびスタック株を用いた葉を用いて、ポストゲノム解析を行った。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、パパイア加工品) 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、先進諸国 (EU) における動向調査、並びに遺伝子組換え作物・食品に関する消費者消費者意識調査の分析を進め、今後のリスクコミュニケーションのあり方に関する提言を行った。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、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。

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金（食品の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

分担研究報告書（平成 23 年度）

## 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 客員研究員

**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、ヒト腸管の M 細胞モデル実験系を開発し、モデル乳酸菌組換え体を用いて、免疫系への影響を検討した。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。本年度は継代細胞を用いて、ヒト腸管 M 細胞モデル実験系を検討し、M 細胞からの取り込みが知られているタンパク質をコードするモデル組換え体を作成し、このモデル実験系での反応性について検討した。

協力研究者

五十君 静信（国立医薬品食品衛生研究所 室長）

榎田 和彌（同 研究所・研究生）

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。

### 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

### B. 研究方法

#### 1. ヒト腸管 M 細胞モデル系の策出

ヒト結腸がん由来の腸管上皮細胞株 C2BBel 細胞と、ヒトバーキットリンパ腫由来の細胞株 Raji B 細胞の共培養による in vitro ヒト M 細

胞モデルの確立を検討した。Transwell 上に C2BBel 細胞を播種し、およそ 3 週間培養した。単層膜を形成した C2BBel 細胞に対し Raji 細胞を基底膜側に添加し共培養した。単層膜の形成状況は Millicell-ERS (Millipore) を用いて電気抵抗値 (TEER) の測定により評価した。蛍光抗体法による M 細胞マーカーの観察を行った。

## 2. M 細胞モデル系の機能に関する評価

トランスウェル上の C2BBel 単層膜を介した蛍光微粒子の透過を観察するため、単層膜を Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) で洗浄後、37 °C で 30 分間インキュベートし平衡化した。蛍光微粒子  $1.0 \times 10^9$  個を血清濃度の異なる HBSS に懸濁し、懸濁液 500  $\mu$ l を単層膜の頂端部側に添加し 3 時間インキュベートした。基底膜側の緩衝液を回収し、Fluorescent Activated Cell Scan (FACScan、Beckton Dickinson) により透過した微粒子数の測定を行った。

同様な手法で、乳酸菌 *Lactobacillus casei* IGM393 株の透過菌数の測定を行った。集落の計数は、MRS 寒天平板培地上に形成された集落数から算出した。

## 3. モデル組換え体の作出

動物実験により M 細胞への侵入因子であることが知られている *Yersinia* Invasin を発現する組換え大腸菌を作出し、M 細胞モデルの機能評価を行った。

## 4. 遺伝子組換え微生物の情報収集

平成 24 年 2 月にアラブ首長国連邦のドバイで開催された第 1 回世界バイオテクノロジー学会で、研究発表を行い、遺伝子組換え微生物に関する情報交換を行った。

# C. 研究結果

## 1. ヒト腸管 M 細胞モデル系の策出

共培養モデル系が安定した時点での、細胞間のタイトジャンクション形成の指標である電気抵

抗値は、共培養中の C2BBel 細胞でも単独培養時と同程度に保たれた。共培養後の C2BBel 細胞単層膜ではヒト M 細胞マーカーである sialyl Lewis A 抗原の発現量が上昇した (図 1)。一方、マウス M 細胞マーカーであるハリエニシダレクチン (UEA-1) (図 2) の結合量は減少した。

## 2. M 細胞モデル系の機能に関する評価

M 細胞は最大の特徴として物質透過能を示すことから、C2BBel 細胞単層膜の微粒子、及び非侵入性細菌として乳酸菌の透過を観察した。Raji 細胞と共培養後の C2BBel 細胞の単層膜は、頂端部側から基底膜側への微粒子の透過数が増加した (図 3)。また、C2BBel 細胞単独培養時の単層膜では乳酸菌の透過はほとんど見られなかったのに対し、共培養後の C2BBel 細胞単層膜では、乳酸菌の透過が確認された (図 4)。透過実験の前後で単層膜の電気抵抗値に極端な減少は見られず、単層膜の損傷は確認されなかった。

## 3. モデル組換え体の作出と評価

Invasin 遺伝子をコードするプラスミドを導入した大腸菌は Invasin を菌体表面に発現した。Invasin 発現株は HeLa 細胞による取り込み菌数が増加した (図 5) が、一部の細胞侵入因子に見られるような細胞毒性は Raji 細胞に対しては見られなかった。また、この取り込みは抗 Invasin 抗体により特異的に阻害された (図 5)。Invasin 発現株の機能を確認できたことから、M 細胞モデルによりその透過菌数を測定したところ、非発現株に比べ Invasin 発現株の透過菌数が増加した (図 6)。

## 4. 遺伝子組換え微生物の情報収集

第 1 回世界バイオテクノロジー学会で、本年度の研究成果を発表し、海外の遺伝子組換え微生物に関する研究動向について情報交換を行った。

## D. 考察

### 1. ヒト腸管 M 細胞モデル系の策出

腸管内の抗原は主にパイエル板 M 細胞により取り込まれると考えられている。腸管粘膜免疫は M 細胞により取り込まれた抗原が、免疫担当細胞に受け渡されることによって惹起される。そのため M 細胞を標的としたワクチン抗原の運搬体の作成は、より効果的な粘膜免疫の誘導が期待される。M 細胞は動物種によりその性質が異なり、評価対象に応じた評価系が必要となる。また、ヒトの M 細胞は数が少なく、初代培養も困難なことから、*in vitro* においてヒト M 細胞との作用を観察可能な評価系が望まれている。そこで、*in vitro* でのヒト M 細胞モデルを確立し、そのモデル系により遺伝子組換え細菌の免疫への作用について実証的な知見を集積することにした。

共培養後の C2BBel 細胞単層膜ではヒト M 細胞マーカーである sialyl Lewis A 抗原の発現量が上昇した。一方、マウス M 細胞マーカーであるハリエニシダレクチンの結合量は減少した。用いている細胞がヒト由来の継代細胞であること、発現している M 細胞マーカーがヒト型であることなどから、今回作出したモデル系はヒト M 細胞評価系と言える。

### 2. M 細胞モデル系の機能に関する評価

作出されたモデル細胞系では、ヒト M 細胞マーカーである sialyl Lewis A 抗原の発現量が上昇し、蛍光微粒子、乳酸菌共に透過性が上昇したこと、透過実験の前後で単層膜の電気抵抗値に極端な減少は見られず、単層膜の損傷は確認されなかったことなどから、Raji 細胞との共培養により C2BBel 細胞の単層膜の一部は、M 細胞様の機能を持った細胞への分化が促されることが示され、ヒト M 細胞モデル実験系として有用であることが示された。

### 3. モデル組換え体の作出と評価

本 M 細胞モデルにおいて確認された Invasin 発現株の透過菌数の増加は、*in vivo* の M 細胞においても同様の結果が観察されている。このことから、本 M 細胞モデルは Invasin を介した抗原取り込み機構を有することが確認された。M 細胞モデルは *in vivo* の M 細胞と同様に M 細胞への侵入因子による特異的な透過促進を示したことから、今回開発したヒト M 細胞モデル実験系は、遺伝子組換え体の免疫系への影響を調べる有用な実験系であると思われる。

### 4. 遺伝子組換え微生物の情報収集

第 1 回世界バイオテクノロジー学会では、遺伝子組換え微生物に関する研究も多数報告されていた。未だ研究レベルの報告がほとんどであった。一方、医学の分野では遺伝子組換え微生物の実用化が求められているが、生きた組換え体に関する安全性評価の問題は、まだ十分な議論が行われていないと言えないため、今後の動向待ちであるという認識が一般的であった。

## E. 結論

ヒト M 細胞モデル実験系を検討した。作出されたモデル細胞系では、ヒト M 細胞マーカーである sialyl Lewis A 抗原の発現量が上昇し、蛍光微粒子、乳酸菌などの微粒子の透過性が上昇するなど、M 細胞としてのマーカーを備え、粒子を透過させる機能も示した。また、遺伝子組換え大腸菌を用いた実験により、M 細胞モデルは *in vivo* の M 細胞と同様に M 細胞への侵入因子による特異的な透過促進を示した。このことからヒト M 細胞モデル実験系として有用であると思われる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Masuda Kazuya, Akinobu Kajikawa, and Shizunobu Igimi. Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. 30(2):37-44. (2011)

### 2. 学会発表

1. Kazuya Masuda and Shizunobu Igimi. Establishment of in vitro M cell model and evaluation of genetically modified bacteria as vaccine delivery vehicles targeting M cells. 1st Biotechnology World Congress. 2012.3 (Dubai, UAE)
2. 森田英利、Tulika Prakash、大島健志朗、藤英博、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。乳酸菌とビフィズス菌における線毛遺伝子群の解析。日本ゲノム微生物学会。2012.3 (東京)
3. 森田 英利・藤 英博・中野 章代・大島 健志朗・五十君 静信・服部 正平。*Lactobacillus casei* グループの比較ゲノム解析。日本畜産学会第 115 回大会 2012.3 (名古屋)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

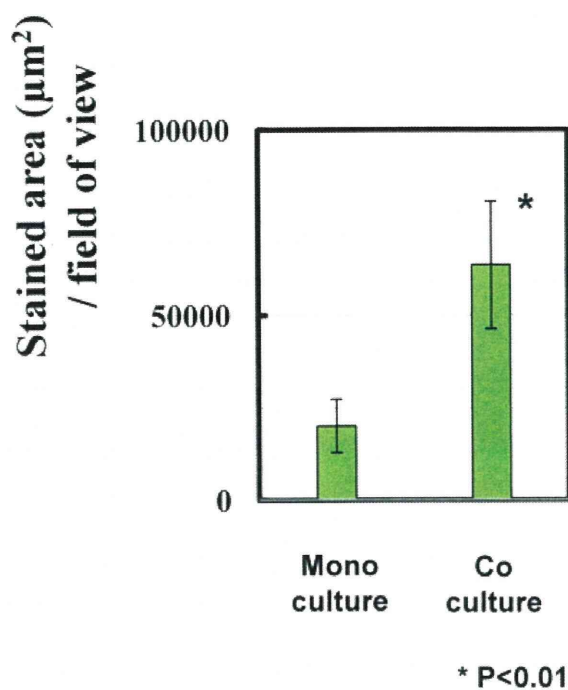
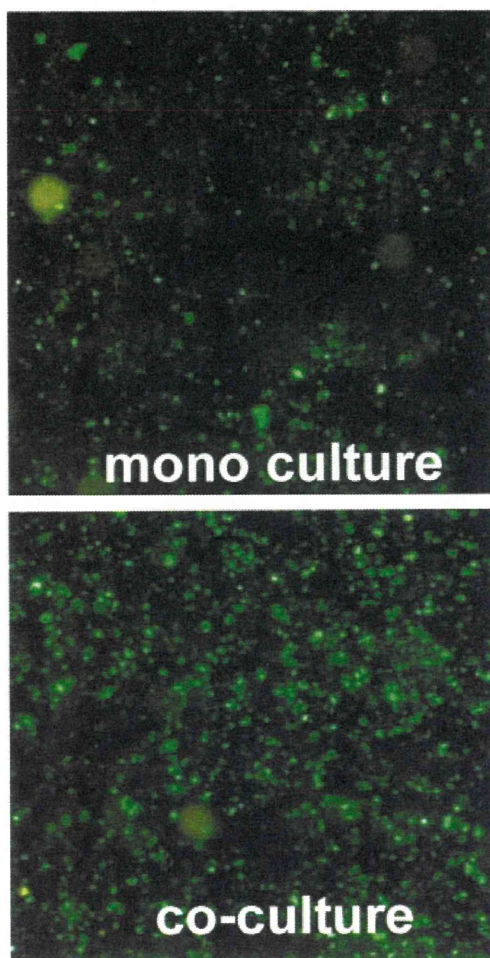
なし

### 2. 実用新案登録

なし

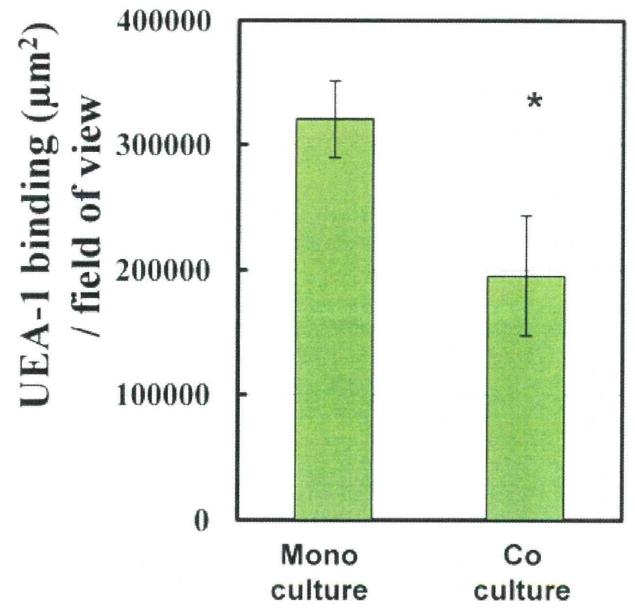
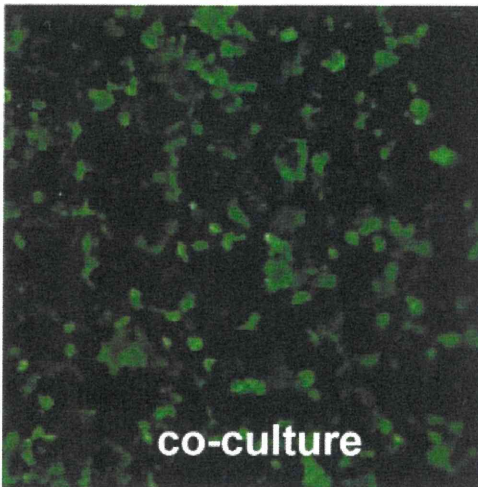
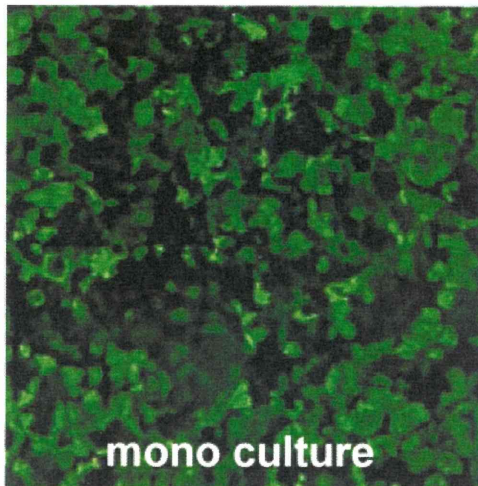
### 3. その他

なし



	mono culture	co culture	Reference
Sialyl-Lewis A (human M cell Marker)			BBRC, 2000

図1. 共培養による細胞表層のヒトM細胞マーカーの発現増強(Sialyl-Lewis A)



\* P<0.01

	mono culture	co culture	Reference
Binding of UEA-1 (Mouse and rabbit M cell marker)			BBRC, 2000

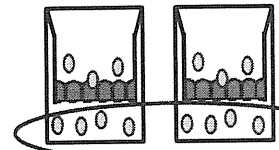
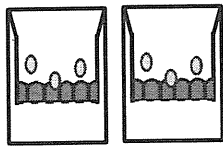
図2. 共培養による細胞表層のマウスM細胞マーカーの発現減衰 (UEA-1)



0.5  $\mu\text{m}$  latex beads  
(FITC labeled)

$10^9$

incubation for 3 hr



FACS 分析

mono  
culture

co  
culture

mono  
culture

co  
culture

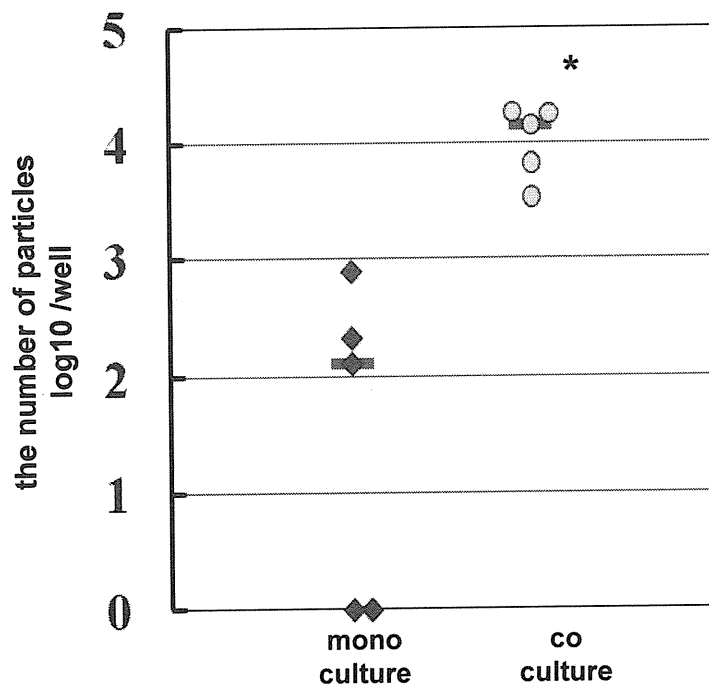
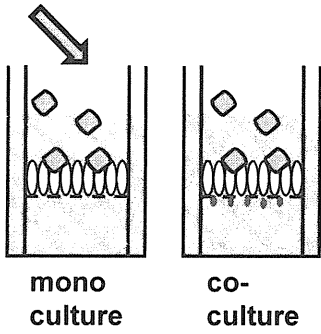


図3. C2Be1単層培養と共培養M細胞モデル系における蛍光微粒子の透過性比較

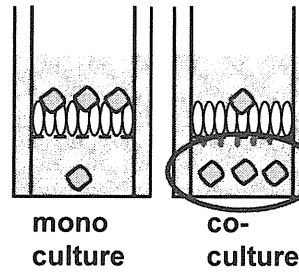


*Lactobacillus casei* IGM393

$1.0 \times 10^8$  cfu

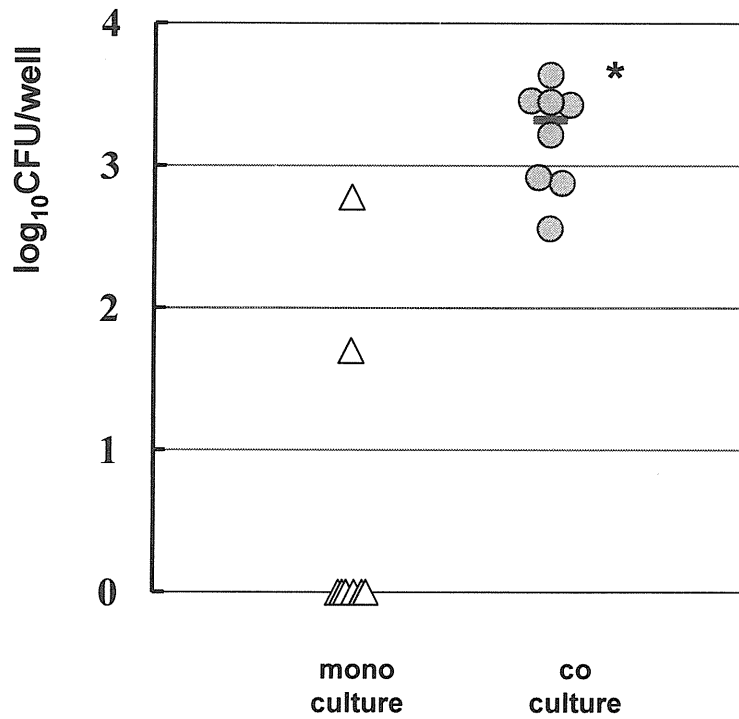


37 °C  
3 hr



透過した細菌  
(CFU)

培養



\* P < 0.01

図4. C2BBe1単層培養と共培養M細胞モデル系における乳酸菌の透過比較

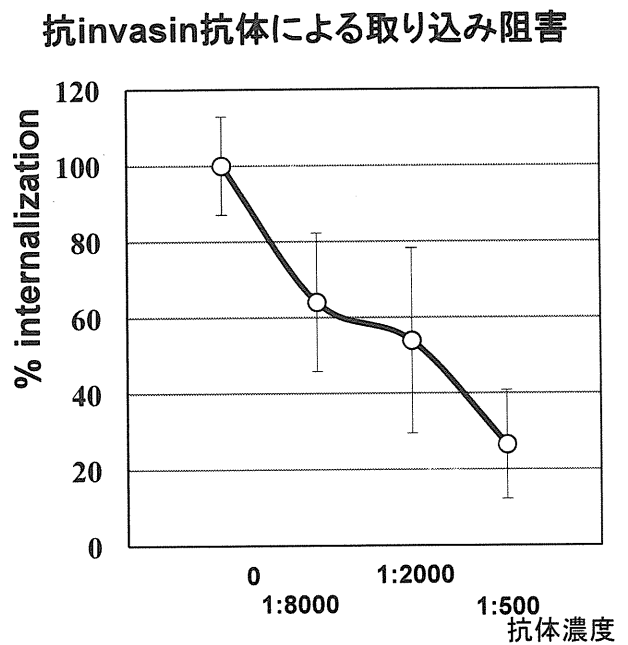
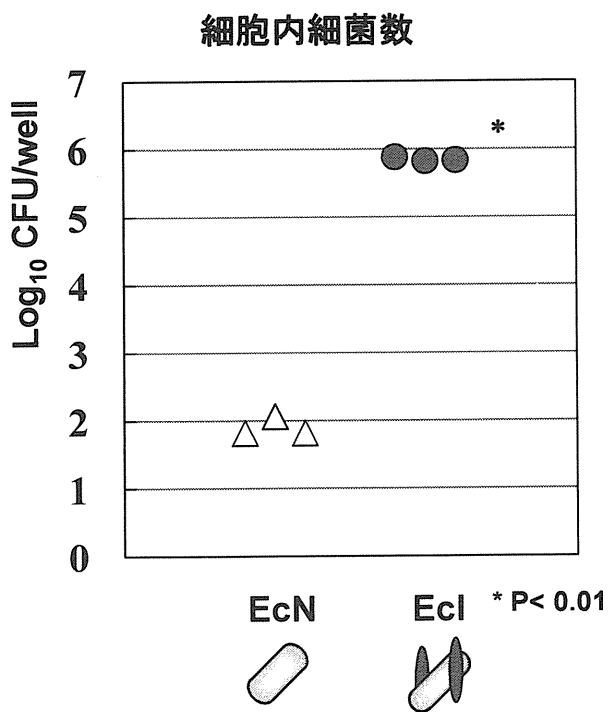
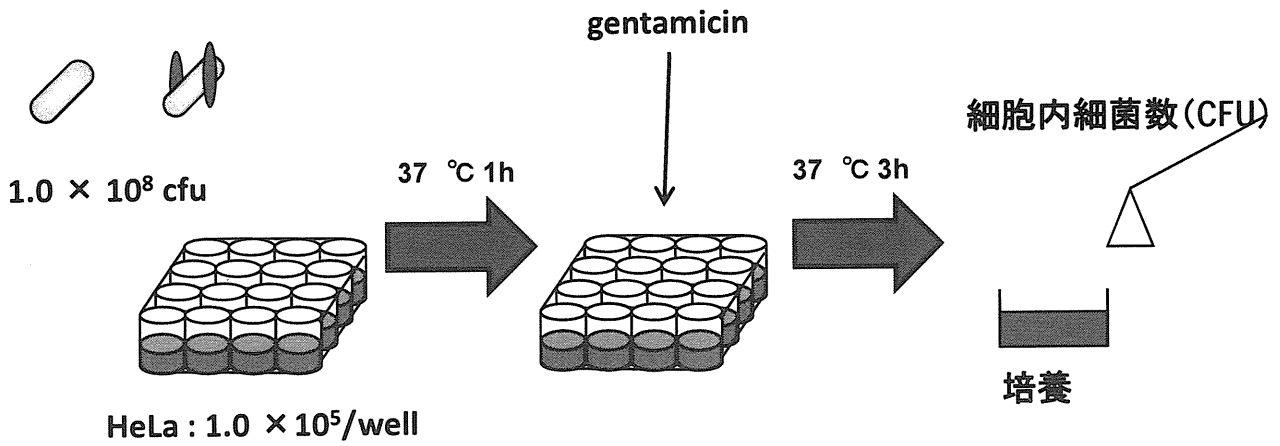
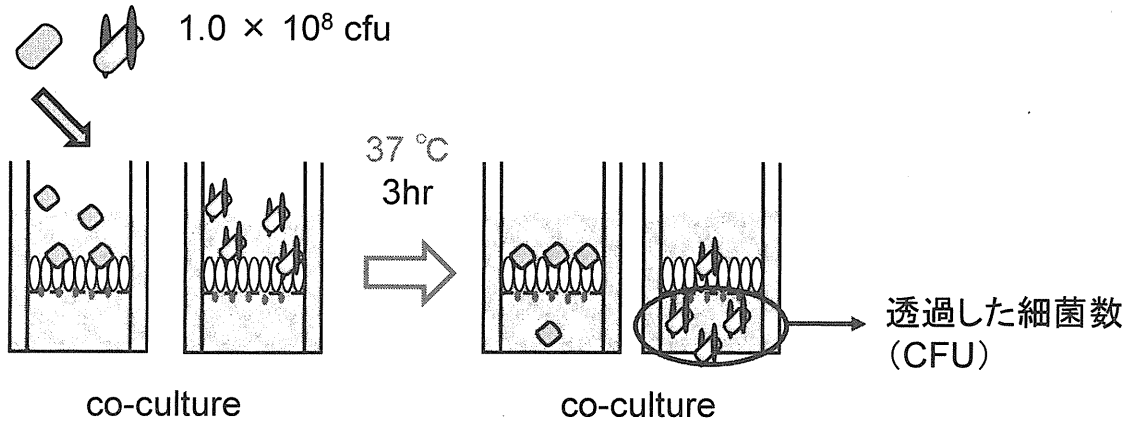
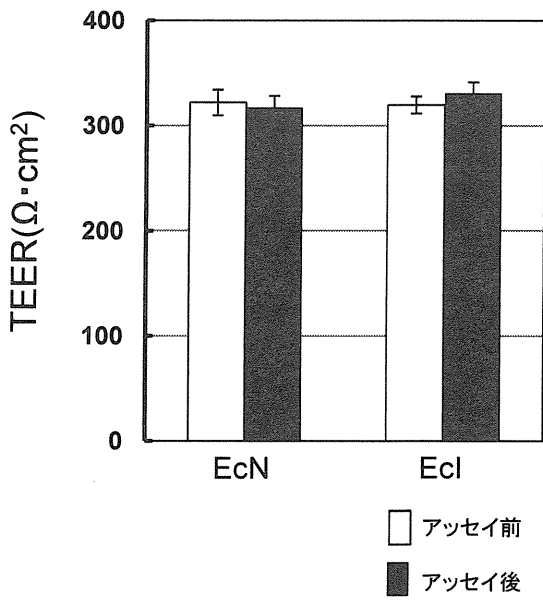


図5. HeLa細胞における大腸菌モデル組換え体の取り込みと特異抗体による阻害



電気抵抗値 (TEER 値)



モデル組換え体の透過数

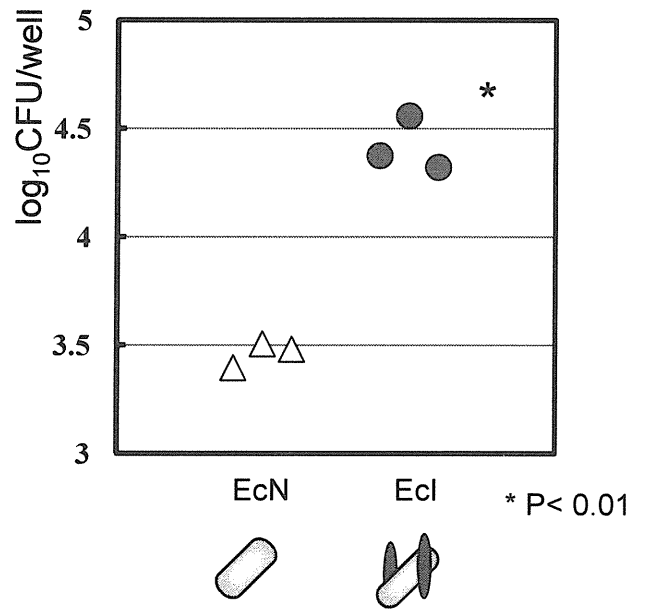


図6. 共培養M細胞モデル系における大腸菌モデル組換え体の透過