

201131007B

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21～23年度 総合研究報告書

(H21-食品-一般-007)

研究代表者 西島 正弘

平成24年3月

# 目次

## I. 総合（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. 総合（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 ..... 1 1

(ii) 遺伝子組換え魚文献検索に関する研究 ..... 1 9

(iii) 遺伝子組換え動物の安全性評価に関する研究 ..... 3 5

(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

(v) クローン牛の開発の動向と安全性評価 ..... 5 9

### 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 ..... 6 5

### 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 2 1

### 4. 組換え植物のメタボローム解析

太田 大策 ..... 1 3 3

### 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 3 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 5 3

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 1 8 3

### 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研究代表者、5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、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（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並びに東京大学公共政策大学院で、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、研究代表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、基礎的な知見と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、先進諸国における遺伝子組換え食品に関する動向調査、新聞報道量の分析、遺伝子組換え作物・食品への抵抗感に関する消費者意識調査を行った。その結果、遺伝子組換え食品に対する消費者の抵抗感が、市場の取引価格と比べても高い傾向にあることが明らかになり、消費者と専門家の仲立ちをするコミュニケーターの必要性などが示唆された。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こと、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ことがあげられた。

また、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。さらに、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。

日本国内の消費者のGMOに対する抵抗感は、その対象(動物、植物、微生物)や使用目的(食用、医療用、工業用)等によって違いがみられ、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。また、日本国内の消費者におけるGMOに対する抵抗感は、世界的にもGMOに対する抵抗が強いといわれている欧州の消費者よりも強く、非常に強いものであるといえる。一部の消費者においては、従来の品種改良による改変種を実質的同等性でいうところの「conventional counterpart」(GMOと安全性を比較する食経験のある対象物)としては認められないとする意見が多かった。従来の実質的同等性の考え方では「conventional counterpart」には、品種改良による改変種を含んでいることから、今までの実質的同等性による説明では安全性の説明が受け入れられない可能性も示唆され、実質的同等性に代わる新たな安全性の説明のロジックを検討する必要がある。

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る。

海外事例調査からは、リスクコミュニケーションの体制については、各部局で分散的なコミュニケーション活動をするのではなく、一定の人的資源的リソースを投入したリスクコミュニケーションを専門に担当する部署が必要と思われた。また、コミュニケーションは評価機関と管理機関で

重なる部分も多くあるので、一貫性や重複のない連携が求められる。

また、今後、日本の消費者の特徴を踏まえ、海外の先進事例も参考としつつ、米国で GM サケの申請が行われているなど身近な課題となりつつある GM 動物・魚のリスクコミュニケーション方策について、検討する必要があることが示された。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。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を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。組換え微生物の免疫影響評価にあ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。免疫評価のモデル系として、マウスを用いた評価系に加え、継代細胞を共培養することによりヒト M 細胞モデル系を作出した。この系では M 細胞マーカーの増強や粒子の運搬能の増強といった機能も確認され、有用な評価系として用いることが出来ると思われる。

遺伝子操作により、細菌ほ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、ゲノム解析によりどの程度の変化が観察されるかを検討した。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。

#### 遺伝子組換え魚に関する文献調査：

2009 年 1 月に FDA は「遺伝性の組換え DNA 構成体を含む遺伝子操作動物についての規制」について産業界向けガイダンスを公表した。その内容は今まで動物医薬品として取り扱っていた遺伝子組換え魚類を食品として取り扱うとする記述があることから、遺伝子組換え魚類の食用として利用についても対応を取ることを明らかにした。FDA は申請中の案件については途中経過を公表しない、とした。一方、申請を提出した AquaBounty Technologies 社はホームページ上で FDA から請求された研究資料は全て提出し、許可がおりるのを待っている状態であることを公表した。同社は許可がおり次第、商業規模での試験養殖をする計画を立てていることも公表した。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。2009 年に公表された遺伝子組換え魚に関する論文はサケ科魚類やコイを用いた報告以外に前年に引き続き、微細藻類に牛由来のラクトフェリン遺伝子を導入し、この遺伝子組換え微細藻類を餌として与えたあと、攻撃試験を行って耐病性が付与されたことを確認した、といった新しい取組みの論文が報告された。中国で行われた遺伝子組換えコイを用いた報告もされているが、中国における遺伝子組換え魚の制度上の進捗状況に関する情報は見つけられなかった。また、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、2006～2010 年に収集した薬用及び環境浄化用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する情報 405 件を、1) 機能性食品、2) 経口ワクチン、3) 食用医薬、4) ワクチン抗原、5) 抗体医薬、6) 治療薬、7) 診断薬・試薬、8) 環境浄化の 8 カテゴリー別に集計した結果、機能性食品：120 件、経口ワクチン：65 件、食用医薬：25 件、ワクチン抗原：36 件、抗体医薬：36 件、治療薬：76 件、診断薬・試薬：15 件、環境浄化：40 件であり、機能性食品、治療薬及び経口ワクチンに関するものが多かった。使用された食用作物は、イネ：51 件、トマト：28 件、レタス：22 件、ジャガイモ：18 件、トウモロコシ：15 件であり、国別件数は、日本：142 件、米国：97 件、中国：56 件の順に多かった。2011 年の SciFinder® での調査結果では、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 件であり、2006～2010 年と同様に、機能性食品、経口ワクチン、治療薬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：

近年、高度化が進む遺伝子組換え動物の作出技術に対応するために、組換え体の検知技術の開発に取り組んだ。特に多能性幹細胞を活用した遺伝子組換え動物において、Cre-loxP システムの導入により外来遺伝子が loxP 配列以外残存しないことが想定され、本研究ではニワトリ胚性幹細胞 (ES) 細胞をモデルケースとして、細胞に残存する loxP 配列の検知技術の開発を行った。平成 21 年度は loxP-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) -loxP のカセットを持った pFlox-EIP ベクターの開発とその機能試験、並びにこのベクターを導入したモデル ES 細胞の樹立を完了させた。平成 22 年度は、pFlox-EIP ベクターを用いていくつかの loxP 配列の検知系を試行し、インバース PCR が有効であることを確認した。また Cre リコンビナーゼ発現ベクターを構築し、モデル ES 細胞での Cre リコンビナーゼの発現に成功した。平成 23 年度は、Cre リコンビナーゼ発現 ES 細胞から loxP 配列のみを有する ES 細胞をクローニングし、この細胞を用いて実際にインバース PCR を実施した。その結果、明らかな増幅産物の増加が確認され、インバース PCR が loxP 配列の一次スクリーニングに有効であることが明らかとなった。

#### クローン牛の開発の動向と安全性評価

2009 年 6 月 25 日、食品安全委員会は、体細胞クローン牛及び豚並びにそれらの後代の安全性を示す食品健康影響評価を公表した。しかし、農林水産省は、1999 年 11 月以来要請しているこれら家畜の出荷自粛の継続を決定している。そのた

め、体細胞クローン牛の生産頭数は、1999 年度の 93 頭を頂点として、2011 年度上半期には、わずか 2 頭まで減少した。この間のわが国における体細胞クローン牛の生産効率に、経時的な改善傾向は認められなかった。また、生後 200 日以降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。一方、食品安全委員会や農林水産省が実施した体細胞クローン技術に関するパブリックコメント (2009) や欧州の意識調査 (2008) などでは、この技術に対する国民理解の醸成不足が示唆された。そこで、先端バイオ研究に携わる研究者には、従来から取り組んでいる「技術」や「知識」に加え、「リスクコミュニケーション」に務める必要がある。

#### 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やモードオブアクションの明確でない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り、食品安全性の観点から評価が行われた事例はない。本研究では転写制御因子やモードオブアクションの明確でない因子を導入した遺伝子組換え体を用いて、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必要がある。

## (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、多くの遺伝子組換え植物が開発・実用化され食品として流通している。最近では環境ストレスに対応するような遺伝子を組換えたものも開発されており、これらの場合、ストレス向上の作用機序が明確でないものや転写調節因子など他の多くの遺伝子発現に影響を与えることが予想される遺伝子が用いられている。さらに、最近ではこれらの遺伝子組換え植物を交配させた“スタック品種”も開発されている。これらの遺伝子組換え植物が近い将来流通する可能性は高く、それらの安全性を検討するために、遺伝子やタンパク質、代謝産物がどのように変化しているかを確認しておくことは重要である。そこで本研究では環境ストレス抵抗性の遺伝子を組換えたコメ、ジャガイモ、タバコを作出し、タバコにおいては遺伝子組換え体を交配した後代を獲得し、それらについてトランスクリプトーム解析を行った。その結果、遺伝子を組換えたことによって発現量が変化している遺伝子も見受けられたが、遺伝子を組換えていない植物体でもその個体や、生育環境によって遺伝子発現変動のプロファイルが揺らいでいることが判明した。また、スタック品種においては親世代で発現量が変化していた遺伝子のおおぐが、その発現量のまま引き継がれていることが示唆された。

## (3) 遺伝子組換え体のプロテオーム解析手法の検討

平成 21 年度は シロイヌナズナの乾燥耐性に関する転写因子 AtDREB1A 遺伝子を導入したジャガイモの塊茎、平成 22 年度は RKN (Root-knot nematodes) 抵抗性遺伝子を導入したジャガイモの塊茎、平成 23 年度は RBP (RNA binding protein)

を導入したコメ、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モデル植物として用い、2D-DIGE によるタンパク質発現の量的、質的変動を調べた。21 年度に用いた転写因子である DREB1A 遺伝子導入ジャガイモで、非組換え体に比べ、Patatin precursor をはじめ、いくつかの代謝系酵素の発現差異が検出された。22 年度以降に用いた組換え植物では、組換えにより、非組換え体に比べ大きく発現変動するタンパク質はほとんど検出されず、むしろ、塩ストレス (200mM NaCl) 存在下・非存在下での栽培によるタンパク質発現変動の方が大きい傾向にあった。今後、栽培環境の違いによるタンパク質発現の変動を調べることで、組換えによるタンパク質発現が、環境による変動幅内に抑えられるかどうかを、可能な限り標的となるタンパク質を絞って定量的に解析してゆくことが重要になると思われる。なお、RBP コメのストレス下で発現の上昇するタンパク質には、putative abscisic acid-induced protein 等があった。

## (4) 遺伝子組換え体のメタボローム解析手法の検討

遺伝子組換え作物と非組換え作物の代謝成分の組成と含量を比較し、遺伝子組換え作物において栄養素の増減、あるいは有害成分の蓄積の有無を判別するためには、代謝成分の総和 (メタボローム) を解析するメタボロミクス研究が必須である。本研究では、フーリエ変換型イオンサイクロトロン質量分離装置 (FT-ICR/MS)、GC-MS、LC-MS を組み合わせたメタボロミクスプラットフォームを基盤として、第 3 世代遺伝子組換え作物の代謝物一斉解析を実施した。平成 21 年度は転写因子 DREB1a 遺伝子導入組換えバレイショ塊茎を供



試した。非組換え体との比較により、DREB1a 組換え体でストレス応答関連の代謝中間体含量の変動を確認した。特に、DREB1a 発現系統で  $\alpha$ -cyanoalanine ( $\alpha$ -CA) の有意な蓄積を認めた。 $\alpha$ -CA は、植物ホルモンであるエチレン生合成経路において、1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid 酸化酵素反応の副産物である CN<sup>-</sup>の除去反応によって生成する。すなわち DREB1a 遺伝子の発現によって、内生ストレス応答が活性化し、その二次的な結果としてエチレン生成の亢進と  $\alpha$ -CA 含量増加に至った可能性が示唆された。平成 22 年度には、LZ/NBS/LRR 型に属する植物病害抵抗性遺伝子 (RKN) 導入バレイショ塊茎のメタボローム解析を実施した。野生型との比較から、組換え体で変動する代謝中間体を複数確認したが、これらに関連する代謝経路の活性変動との一貫した関連性は認められず、遺伝子組換えが直接の原因ではないと判断された。平成 23 年度は、リボソーム結合タンパク質遺伝子 (MeRBP) 導入イネとアラビノガラクトナンタンパク質遺伝子 (SeFLA) 遺伝子組換えタバコ、MeRBP 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のメタボローム解析を実施した。その結果、遺伝子組換えイベントそのものによるメタボローム変動よりも、ストレス応答による代謝活性のシフト、あるいは葉位別の代謝活性の違いを反映したメタボローム変動が顕著であることが分かった。

#### 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に関する調査研究として、(1) 遺伝子組換えじゃがいも、遺伝子組換えコメを用いてアレルギーの網羅的解析手法の検討、(2) 動物を用いる組換え生物のアレル

ゲン性の検討、(3) アレルゲン予測の解析法の検討、アレルギーデータベース (ADFS) 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) DREB1A遺伝子導入ジャガイモの塊茎、RKN (Root-knot nematodes) 抵抗性遺伝子導入ジャガイモの塊茎、RBP (RNA binding protein) 導入コメをモデル植物として用い、アレルギー蛋白質の量的、質的変動を調べた。DREB1A遺伝子導入ジャガイモで、非組換え体に比べ、Patatin precursorをはじめ、いくつかの代謝系酵素の発現差異が検出された。また、RBP遺伝子を導入したコメでは、塩ストレス (200mM NaCl) 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が、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、アレルギーを含むタンパク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BALB/cマウスを用いてDREB1A遺伝子導入ジャガイモとその非組換え体、RKN抵抗性遺伝子導入ジャガイモとその非組換え体、RBP遺伝子導入コメと非組換えコメの感作を行い、それぞれ組換え体と非組換え体のアレルギー性について比較検討を行った。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により、組換えによってアレルギー誘発性が大きく異なる可能性は低いことが示された。(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3年間続けを行い、文献検索により得られたエピトープ既知のアレルゲン34種を新たにADFSに搭載し、平成24年3月時点で、搭載されているアレルゲン数1583本、エピトープ既知のアレルゲン数は165種となった。また、平成24年3月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、in house試験としてコメ10品種を用いた品種間の差に関するデータの蓄積を行い、国産米とインディカ米でのタンパク発現が大きく異なることを見出した。平成23年度にコメ4品種を用いた5機関での2D-DIGE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：

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. GM トマトの検知法開発に関する研究：トマト内在性遺伝子 LAT 52 を標的としたプライマーアッセイ法により、100 bp 以下の遺伝子を標的にPCR法を用いれば、トマト加工品に意図せず混入する可能性のある未承認 GM トマトを検知できる検知法を開発可能であることが示唆された。また、国内で消費される主なトマト加工品を中心に GM トマト混入の検査法の確立と実態調査を行った。

2. GM 亜麻の検知法開発に関する研究：除草剤耐性な変異型 ALS 遺伝子を有する GM 亜麻を高感度かつ特異的に検知する方法を開発した。国内のカナダ産輸入亜麻市販製品を調べた結果、6 検体中 1 検体から安全性未承認 GM 亜麻 CDC Triffid と

思われる増幅が検出され、増幅産物のダイレクトシーケンシングにより、CDC Triffid の挿入配列と一致したことから、CDC Triffid と同定した。

3. GM 魚の検出法の確立と調査：AquaBounty Technologies 社が販売しようとしている GM サケに組み込まれる可能性のある OPAPFcsGH プラスミドの北太平洋サーモン成長因子 cDNA の exon-intron junction 配列を標的にして real-time PCR 用のプライマー・プローブを設計した。並行してサケ加工品を中心に GM サケ混入に関する実態調査を行った。

4. GM コメの検知法に関する研究：一部のコメ加工品において、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イオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キットを用いるコメ DNA 抽出精製方法の開発を行った。また、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 標的配列を検出する real-time PCR 手法を開発した。

未知 Bt 系統混入もち米検体に、殺虫活性を示すトリプシンインヒビター (CpTI) 発現コンストラクト配列の混入を検出した。この領域から、新規検知法開発に必要な同コンストラクトの未知領域を明らかにするため、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。次に、トリプシンインヒビター 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。

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。そこで、アフリカの野生イネ由来の遺伝子 Xa21 のシーケンス解析から得られた情報を基に、リアルタイム PCR を用いた Xa21 コメの検知法の確立を試みた。アフリカの野生イネ由来遺伝子 Xa21 を検出する特異的プライマー対を用いて輸入コメ加工品を検査したところ、野生型コメ検体からは検出されないシーケンスを得た。

これまでの結果及び文献等の情報を基に、GM コメの混入検査を含めたコメ加工品の GM コメ混入に関する実態検査を行った。

5. 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。また、GM パパイヤ含有に関するパパイヤ加工品の実態調査を行った。

6. 種子エピジェネティクスを利用した新規検知法の開発: ゲノム DNA のメチル化は、塩基配列の変化を伴わない遺伝情報の生体内制御システムとして機能する。一方、休眠状態にある種子の

ゲノム情報は一定の環境下では不変的に保たれていることが予想されるが、現在のところその実態に関する情報は皆無である。そこで、まず発芽前の種籾を取り上げ、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。種子ゲノム DNA のメチル化のような後天的修飾のダイナミズムに関する基礎的な知見を収集し、そのパターンを応用した新規な染色体上の組換え遺伝子を検出する識別検知法の開発を目指した。

また、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 *X. 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、種子ゲノム DNA のメチル化のような後天的修飾のダイナミズムに関する基礎的な知見を収集した。

## 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、シロイヌナズナの乾燥耐性に関する転写因子 AtDREB1A 遺伝子を導入したジャガイモ、平成22年度は RKN (Root-knot nematodes) 抵抗性遺伝子を導入したジャガイモ、RBP (RNA binding protein) 遺伝子導入イネをモデル植物として用い、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。RBP 遺伝子導入イネについては、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、さらに解析を加え、更に、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(トマト、GM亜麻、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意識調査の分析を進め、遺伝子組換え食品に対する消費者の抵抗感が、市場の取引価格と比べても高い傾向にあることが明らかになり、消費者と専門家の仲立ちをするコミュニケーターの必要性など、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。

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  
総合研究報告書（平成21～23年度：分担）

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。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。組換え微生物の免疫影響評価にあ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。免疫評価のモデル系として、マウスを用いた評価系に加え、継代細胞を共培養することによりヒトM細胞モデル系を作出した。この系ではM細胞マーカーの増強や粒子の運搬能の増強といった機能も確認され、有用な評価系として用いることが出来ると思われる。

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、ゲノム解析によりどの程度の変化が観察されるかを検討した。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。

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、実験動物や細胞評価系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

#### ①サルモネラの鞭毛抗原と外膜タンパク質

モデル組換え体として、サルモネラの鞭毛抗原と外膜タンパク質をそれぞれ単独及び共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、鞭毛抗原 (FliC)、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。このベクターでは組み込んだタンパク質抗原は乳酸菌の菌体表層に固定化して発現する。

#### ②マウス活性型 IL-1 $\beta$ を発現する組換え体

宿主の *L. 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の菌体外に分泌されて発現する。

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。

#### ③Invasin を発現するモデル組換え体

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。

### 2. 細胞を用いた評価系

#### ①ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用いた IL-8 産生評価系

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。モデル組換え体に 24 時間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。

#### ②マウス活性型 IL-1 $\beta$ を発現する組換え体

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。

#### ③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 C2BBel1 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 C2BBel1 細胞を播種し、およそ 3 週間培養した。単層膜を形成した C2BBel1 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。

#### ④M 細胞モデル系の機能に関する評価

トランスウェル上の C2BBel1 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 *L. 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. マウスを用いた評価

#### ①マウスを用いた免疫評価

遺伝子組換え乳酸菌を 8 週齢の雌 C3H/HeJ マウスへの免疫することにより、誘導される特異的 IgG 量を測定した。免疫は  $10^7$  cfu に調整した菌液を 3 回ずつ 2 週免疫し、ブースターとして 1 回追

加免疫し 2 週間後の血中の特異的抗体価を測定した。特異的抗体価は、IgG のサブクラス別に ELISA 法により測定し、IgG1 と IgG2a 比を計算した。

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。

#### ②マウスを用いた腸管ループ法

各種サイトカイン誘導能の評価は、モデル遺伝子組換え乳酸菌を腸管ループ内へ 10<sup>9</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。

#### ③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。

### 4. 乳酸菌のゲノム解析

IGM393 と変異原物質による育種株 KK378 株について、元株である BL23 株の公開されているシーケンスを対照とし、高速シーケンサーにてゲノムのドラフト作成を試みた。

## C. 研究結果

### 1. モデル組換え体の作出

#### ①サルモネラの鞭毛抗原と外膜タンパク質

モデル組換え体として、サルモネラの鞭毛抗原と外膜タンパク質をそれぞれ単独及び共発現するように組み込んだ乳酸菌組換え体を作成した。宿主としては、ベクターを組み込んでいない宿主乳酸菌を用いた。サルモネラの鞭毛抗原のみを組み込んだ LCF、外膜タンパク質単独 LCS、鞭毛抗原=外膜蛋白の順 LCFS、外膜蛋白=鞭毛抗原の順 LCSF、さらにベクターのみを組み込んだ LCN につき、実験に用いた。

作出したモデル組換え体について、タンパクの発現は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で確認した。菌体表層への発現は、FACS によって評価し、いずれも菌体表層に固定化されていることが

確認された。

#### ②マウス活性型 IL-1 $\beta$ を発現する組換え体

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* IGM 393 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。

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。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。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。

#### ③Invasin を発現するモデル組換え体

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。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。

### 2. 細胞を用いた評価系

#### ①ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用いた

##### IL-8 産生評価系

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。鞭毛では菌体表層に単独発現、SipC と共発現させた組換え体で、どちらも Caco-2 からの炎症性サイトカイン IL-8 産生を誘導した。

#### ②マウス活性型 IL-1 $\beta$ を発現する組換え体

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。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。

### ③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 C2BBe1 細胞でも単独培養時と同程度に保たれた。共培養後の C2BBe1 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。

### ④M 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、C2BBe1 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 C2BBe1 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。また、C2BBe1 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 C2BBe1 細胞単層膜では、乳酸菌の透過が確認された。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. マウスを用いた評価

### ①マウスを用いた免疫評価

遺伝子組換え乳酸菌を 8 週齢の雌 C3H/HeJ マウスへの免疫することにより、誘導される特異的 IgG 量を測定した。ブースター 2 週間後の血中の特異的抗体価を測定した。SipC 特異的な IgG 抗体価と FliC 特異的な IgG 抗体価をそれぞれ別に測定した結果を Fig. 3 に示した。2 つの異なった抗原を遺伝子組換えにより菌体表層に固定して共発現させると、より外側に位置する抗原に対して特異的抗体産生が誘導される。

特異的抗体価は、IgG のサブクラス別に ELISA

法により測定し、IgG1 と IgG2a 比を計算した結果は、Table 2 に示した。乳酸菌 *L. casei* IGM 393 株をマウスに免疫し、IgG1 と IgG2a 比により判断すると主に Th. 1 型の免疫誘導が起こるが、可溶性抗原を共存させると Th. 2 型、遺伝子組換えでは、発現させる抗原により混在型の免疫反応が観察される。

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。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。

### ②マウスを用いた腸管ループ法

モデル遺伝子組換え乳酸菌を腸管ループ内へ  $10^8$ 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。

### ③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。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。

## 4. 乳酸菌のゲノム解析

IGM393 と変異原物質による育種株 KK378 株について、ヨーロッパの元株である BL23 株の公開されているシーケンスを対照とし、高速シーケンサーにてゲノムのドラフト作成を進めた。IGM393 株と KK378 株のドラフトは完了した。

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。

#### D. 考察

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。

##### 1. モデル組換え体の作出

###### ①サルモネラの鞭毛抗原と外膜タンパク質

2つの異なった抗原を遺伝子組換えにより菌体表層に固定して共発現させると、どのような免疫反応が起こるかを明らかにする目的で評価した。遺伝子組換えにより乳酸菌に発現させた抗原は、より外側に位置する抗原に対して免疫反応が強く起こることが示された。

###### ②マウス活性型 IL-1 $\beta$ を発現する組換え体

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。

###### ③Invasin を発現するモデル組換え体

作出した M 細胞モデル系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、M 細胞モデル系は 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 細胞モデル系は 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。

##### 2. 細胞を用いた評価系

###### ①ヒト腸管上皮細胞由来 Caco-2 細胞を用いた IL-8 産生評価系

サルモネラの鞭毛抗原は、TLR5 を介して自然免疫を誘導することが知られている。鞭毛と他の抗原を共発現させたモデル組換え体がどのような免疫反応を示すかを細胞レベルで評価した。細胞レベルの検討では、鞭毛を菌体表層に単独発現、SipC と共発現させた組換え体で、どちらも Caco-2 からの炎症性サイトカイン IL-8 産生を誘導した。

###### ③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 (UEA-1) 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。

#### ④ 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. マウスを用いた評価

#### ① マウスを用いた免疫評価

サルモネラの鞭毛抗原は、TLR5 を介して自然免疫を誘導することが知られている。鞭毛と他の抗原を共発現させたモデル組換え体がどのような免疫反応を示すかをマウス個体レベルで評価した。

マウス個体レベルの免疫実験では、2つの異なった抗原を遺伝子組換えにより菌体表層に固定して共発現させると、より外側に位置する抗原に対して特異的抗体産生が誘導される。乳酸菌 *L. casei* IGM 393 株をマウスに免疫し、IgG1 と IgG2a 比により判断すると主に Th. 1 型の免疫誘導が起こるが、可溶性抗原を共存させると Th. 2 型、遺伝子組換えでは、発現させる抗原により混在型の免疫反応が観察される。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。

#### ② マウスを用いた腸管ループ法

マウス IL-1 $\beta$  産生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。

### 4. 乳酸菌のゲノム解析

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、容易ではなく、数千の変異の中から特定のタンパク質を明らかにするのは予想以上に困難である。

## E. 結論

サルモネラの鞭毛抗原は、TLR5 を介して自然免疫を誘導することが知られている。鞭毛と他の抗原を共発現させたモデル組換え体がどのような免疫反応を示すかを細胞レベルとマウス個体レベルで評価した。細胞レベルの検討では、鞭毛を菌体表層に単独発現、SipC と共発現させた組換え体で、どちらも Caco-2 からの炎症性サイトカイン IL-8 産生を誘導した。マウス個体レベルの免疫実験では、2つの異なった抗原を遺伝子組換えにより菌体表層に固定して共発現させると、より外側に位置する抗原に対して特異的抗体産生が誘導される。乳酸菌 *L. casei* IGM 393 株をマウスに免疫し、IgG1 と IgG2a 比により判断すると主に Th. 1 型の免疫誘導が起こるが、可溶性抗原を共存させると Th. 2 型、遺伝子組換えでは、発現

させる抗原により混在型の免疫反応が観察される。組換え微生物の安全性評価に於いては、このような組換えにより発現させた抗原の免疫への反応性は宿主の性質により変化し、これまでのように相加的な反応ではないことを認識する必要があることを考慮する必要があると思われる。また免疫への反応性は、実際の組換え体について検証するまで予測できないという点が重要である。

ヒトM細胞モデル実験系を開発した。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。このことからこの共培養M細胞系はヒトM細胞モデル実験系として有用であると思われる。

尚、図表や個々の実験結果については各年度の分担研究報告書を参照していただきたい。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 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. 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開発の試み。日本臨床腸内微生物学会会誌。11:34-40 (2009)
5. 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*. 30(2):37-44. (2011)

### 2. 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. 榊田和彌、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
4. 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)
5. 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）

6. 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