

別添 1

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

フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードやリスクに係る研究 -リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元- (22KA1005)

令和4年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 北嶋 聡

令和5(2023)年 3月

目 次

I. 総括研究報告書 (別添 3)

フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上の
ハザードやリスクに係る研究 -リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系
による検証・還元-

北嶋 聡 ----- 1

II. 分担研究報告書 (別添 4)

1. 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討
北嶋 聡 ----- 12
2. モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析
仁科博史 ----- 29
3. モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析
堀 正敏 ----- 35
4. モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析
福田公子 ----- 38

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5) ----- 42

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）
令和4年度 総括研究報告書

フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードや
リスクに係る研究 -リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元-
(22KA1005)

研究代表者 北嶋 聡

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 部長

研究要旨

フードテック、すなわち食に関する最先端技術を活用した、食料システムの構築や国民の健康増進に資する食品の探索などの観点から、従来の生産方法とは異なる新たな方法で作られる、又はこれまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品の研究開発が進められている。この代表例としては、骨格筋細胞といった家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る、「いわゆる培養肉」（肉と称するのは適切とは限らないため、以降「細胞培養食品」とする）の研究開発が国内外で進展している。現時点で国内では、技術の確立や市場化の目途は立っていないが、様々な研究会の設立をはじめ、研究開発の加速が見込まれ、将来、フードテックを活用した様々な「細胞培養食品」の上市化が想定され、その安全性確保に向けた課題の抽出について検討すべきタイミングを迎えている。本調査研究では、特に「細胞培養食品」に着目し、この食品衛生上の取扱いを検討するため、そのハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出をおこない、リスクプロファイルの作成ならびに、想定される今後の動向と方策につき考察することを目的とする。この際、学術的に能動的な調査に努め、あわせて、「細胞培養食品」のモデルとなり得る独自の細胞培養実験系を用いて、抽出した課題の妥当性について検証し、またこの結果を調査の方に還元し、その確度について補強する（先駆的な調査検討）。<各年度の目標> 令和4年度：ハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出、令和5年度：リスクプロファイルの検討と抽出した課題の妥当性についての検証、令和6年度：リスクプロファイルの作成及び安全管理の提案。

本研究では具体的には、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を行い、2) 調査において懸念されたハザードの事象につき、エピジェネティクス解析等を検討し、また 3) モデルとなるウシやニワトリ由来の細胞の分化増殖過程におけるハザード解析を検討する。そして、これらの結果を調査(1)の方に還元し、その確度について補強する。併せて、各種モデル系に係る補完的検討も実施し連携の向上と円滑な進捗を図る。

令和4年度（初年度）は予定通り、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討を、特に開発動向、ならびに安全性や衛生規制の動向を中心に、Web上の公開情報の調査を実施し、それぞれの特徴を抽出した。調査に先立ち、細胞培養食品に関する便宜的な分類表を用意し、これに基づき調査結果を整理した。それぞれの特徴の例として、開発動向としては、シンガポール政府による世界初の承認事例を挙げることができ、規制動向に関しては、シンガポールをはじめ、EU、オーストラリア・ニュージーランドでは、Novel Foodの枠組みの中で細胞培養食品を取り扱っていることを見出したことを挙げるができる。さらに、本調査における検討をもとに、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザードの抽出を行った（北嶋）。なお補完的な検討として、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現制御に関し、レポーター遺伝子アッセイにより、正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御につき検討中である。2) モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析では、個体生存に必須である様々な細胞応答に関与する約800遺伝子を同定し、この内、脂質代謝に関与する2遺伝子に着目し解析した結果、セラミド分子の量的変化により、胚葉分化の異常を伴う細胞の分化異常が生じることを明らかとした（仁科）。3) モデル家畜・家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析では、家畜細胞については、年齢差及び部位差の比較検討を成熟及び老化マウス内臓（骨格筋、肝、肺、消化管、心）由来の線維芽細胞を用い発現遺伝子を解析した（堀）。一方、家禽細胞については、ニワトリ胚砂嚢平滑筋を用いて検討した結果、他の消化管平滑筋と異なり、細胞増殖時でも例外的に分化状態が維持されること、またこの培養条件を見出した。引き続き、この機序を探索中である（福田）。以上の解析結果は、細胞培養食品の作製に際しての、使用する年齢・臓器部位・培養条件などの様々な選択理由に資する成果と考える。

本研究により、「細胞培養食品」の食品衛生上の安全性確保に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性確保に資する基礎的資料の作成といった行政支援として寄与することが期待される。

研究分担者

仁科博史 東京医科歯科大学・難治疾患
研究所・未来生命科学研究部門・
発生再生生物学分野・所長/教授
堀 正敏 東京大学大学院・農学生命科学
研究科・獣医薬理学研究室・
教授
福田公子 東京都立大学・理学研究科 生命
科学専攻・准教授

A. 研究目的

(背景) フードテック、すなわち食に關する最先端技術を活用した、食料システムの構築や国民の健康増進に資する食品の探索などの観点から、従来の生産方法とは異なる新たな方法で作られる、又はこれまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品の研究開発が進められている。この代表例としては、骨格筋細胞といった家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る「いわゆる培養肉」(肉と称するのは適切とは限らないため、以降「細胞培養食品」とする)の研究開発が国内外で進展している。現時点で国内では、技術の確立や市場化の目途は立っていないが、様々な研究会の設立をはじめ、研究開発の加速が見込まれ、将来、フードテックを活用した様々な「細胞培養食品」の上市化が想定され、その安全性確保に向けた課題の抽出について検討すべきタイミングを迎えている。

(目的) 本調査研究では、特に「細胞培養食品」に着目し、この食品衛生上の取扱いを検討するため、そのハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出をおこない、リスクプロファイルの作成ならびに、想定される今後の動向と方策につき考察することを目的とする。この際、学術的に能動的な調査に努め、あわせて、「細胞培養食品」のモデルとなり得る独自の細胞培養実験系を用いて、抽出した課題の妥当性について検証し、またこの結果を調査の方に還元し、その確度について補強する(先駆的な調査検討)。

(必要性) 持続可能な開発目標(SDGs)の

課題に取り組む機運の高まりと呼応し、国内外ともに「細胞培養食品」の開発が革新的に迅速に進む一方で、食経験がない、あるいは従来法とは異なる方法により作製されることが想定されることから、その食品衛生上の安全性確保に向けた課題の抽出や方策だては急務となっている。

(特色・独創的な点) 申請者らは基礎発生学あるいは畜産獣医学の立場から、本調査研究の核心である細胞の分化・増殖に関する国内を代表するエキスパートであり、また研究代表者の所属する毒性部は、日本における食品の安全性確保に係るセンター的役割を担うべく、基礎的研究から応用研究まで幅広い活動を行っているという特徴を有する。

(期待される効果) フードテックを応用した新開発食品には大きく3種、すなわち、大豆などの「植物由来食肉様食品」、昆虫由来たんぱく質などの「代替たんぱく質製品」、及び、当該の「細胞培養食品」が存在するが、この内、食経験がなく、若しくはこれまでとは違った方法により作製されるという観点から、リスクプロファイルの作成が重要となる「細胞培養食品」に特に着目する。本調査研究により、「細胞培養食品」の食品衛生上の安全性確保に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性確保に資する基礎的資料の作成といった行政支援として寄与することが期待される。この際、調査研究だけではなく、この分野を代表する研究者らにより、実際にモデルとなる細胞培養系を用いて、検証とその検討結果の還元というサイクルを通して、ハザード予測の範囲と精度を含め、課題の妥当性を検証し、その確度について補強する。同時にこの課題への方策を通して、食品衛生上の安全性を担保した上での「細胞培養食品」の開発につながれば、その安全性について国際的にアピールする上でも重要な成果となり得る。

また成果物については言うまでもなく、国内のみならず国際的なコンセンサスを得られるレベルを以って、「細胞培養食品」に係る安全性確保への提案に繋がるように図る。以って、振興と規制の両面からの切れ

目のない俯瞰的・長期的政策立案に寄与することが期待される。

＜各年度の目標＞ 令和4年度：ハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出、令和5年度：リスクプロファイルの作成と抽出した課題の妥当性についての検証、令和6年度：リスクプロファイルの作成及び安全管理の提案。

B. 研究方法

本研究では具体的には、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を行い、2) 調査において懸念されたハザードの事象につき、エピジェネティクス解析等を検討し、また 3) モデルとなるウシやニワトリ由来の細胞の分化増殖過程におけるハザード解析を検討する。そして、これらの結果を調査(1)の方に還元し、その確度について補強する。併せて、各種モデル系に係る補完的検討も実施し、連携の向上と円滑な進捗を図る。これに呼応するかたちで、研究班を次の4つの分担課題によって構成し、研究を開始した。すなわち、細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討と研究の総括(北嶋)、モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析(仁科)、モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析(堀)、モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析(福田)。

令和4年度(初年度)は予定通りに、それぞれの分担研究課題に取り組んだ。以下に実験方法の概要を示す。

B-1: 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討：

細胞培養食品に関し、国内外ともに主として以下の4項目について調査を実施する。すなわち、1) 開発の動向、2) 安全性や衛生規制の動向、3) 新たなリスク管理方法の動向、及び4) 食肉産業界ならびに消費者の受け止め(含、リスクコミュニケーション)についての情報。この際、単調な情報収集・整理に終始するのではなく、初代培養系なのか細胞株培養系なのか等、学術的な基軸を拠り所とした能動的な調査に努める。また

併行して、研究分担者の各種モデル系に係る補完的検討も実施し、また連携の向上と円滑な進捗を図る。

令和4年度(初年度)は、1) 開発動向、ならびに 2) 安全性や衛生規制の動向を中心に、Web上の公開情報の調査を実施した。「開発動向」については、細胞培養食品に関する研究開発を資金面などで推進する米国のGFI (Good Food Institute) が公開している関連企業データベースから、知名度や予算獲得状況、開発の進捗状況等を勘案して、なるべく国や開発品の種類が偏らないように開発企業12社を選定して事例調査の対象とした。各企業の開発状況についての情報は、当該企業のホームページを中心に調査を行った。

「安全性や衛生規制の動向」に関する調査対象国は、日本、比較的議論が進んでいると思われるシンガポール、米国、欧州、オーストラリア及びニュージーランドとした。各国における規制の主体となる組織、法律、安全性確保措置などを調査対象とした。規制に関する組織として、例えば、日本では内閣府食品安全委員会、厚生労働省、農林水産省、環境省、消費者庁を、シンガポールではSFA (Singapore Food Agency)、米国ではFDA (Food and Drug Administration)、USDA-FSIS (United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service)、欧州ではEUレベルでのEFSA (European Food Safety Authority)、各国レベルではイギリスのFSA (Food Standards Agency) 及びオランダのNVWA (Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (オランダ語名称)、Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (英語名称))、オーストラリア及びニュージーランドではFSANZ (Food Standards Australia New Zealand) を中心に調査した。

また、インターネット検索においては、培養肉を意味する以下のキーワードで検索を行った: クリーンミート、細胞農業、純肉、培養肉、animal free meat、cell-based meat、cellular agriculture、clean meat、cultivated meat、cultured meat、in-vitro

meat, lab-grown meat, slaughter-free meat. 包括的な情報収集を行った期間は、令和4年(2022年)6月下旬から8月下旬であり、個別に各項目において情報更新の都度、随時反映した。

＜補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ＞

補完的検討により、連携の向上と円滑な進捗を図る。具体的には、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現制御に関し検討することとした。正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御を明らかにするため、株化筋細胞を用い組織特異的に転写制御される培養条件(増殖期間、ストレス等)や培地成分(増殖因子や分化因子等)の有無について検討するため、マウス横紋筋由来細胞株 C2C12 及び比較対象としてマウス神経由来細胞株 Neuro-2a を用い、レポーター遺伝子アッセイ系として pNL2.2[NlucP/Hygro]ベクターにプリオン遺伝子のプロモーター領域約1000bpを導入したベクターを作製し検討した。

B-2:モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析:

細胞培養食品作製過程においてがん化や、DNA やヒストンへの後天的な化学修飾により制御される遺伝現象である「エピジェネティクス」を介した有害影響が誘発される可能性が懸念される。そこで調査の結果を待たずして、「細胞培養食品」のモデルとして、独自に工夫した発がんマウスと老化促進マウスの細胞の培養系を用いて、正常細胞との比較を行い、食の安全性について考察する。次世代シーケンサーと質量分析装置を用いた遺伝子解析とメタボローム解析により、がん化や老化時のエピジェネティクスや遺伝子発現、代謝産物の変化を明らかにする。本評価系の研究成果を、調査によって得られる食品衛生上のハザードの妥当性に還元し、補強する。

初期胚発生に観察される原始線条 (PrS) は中胚葉を生成し、その後の中胚葉以外の内胚葉や外胚葉由来のほぼすべての器官形成にも影響を及ぼす。それゆえ、PrS 形成の

理解は正常器官形成の理解に重要である。しかしながら、PrS は微小で一過性の組織であるため、その形成機構の解明は困難である。研究分担者らは、先ず PrS 形成に必須な遺伝子を同定する目的に、PrS の形成不全が致死的事であることに基づき、2種類のノックアウトマウスデータベースを用いて包括的なスクリーニングを実施した。

データベーススクリーニング

候補遺伝子は、本文に記載したように MGI データベース (Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/>) および IMPC データベース (International Mouse Phenotyping Consortium) 33, 34 をスクリーニングすることにより選定した。本研究で使用したデータは、2021年5月時点のものである。MGI データベースにおいて、表現型用語「embryonic lethality between implantation and placentation」(ID: MP:0009850) は、E4.5~E9 の間に胚死が起こったことを意味し、この基準で候補遺伝子を選択した。また、E14 以前に胚死滅したことを意味する “embryonic lethality, complete penetrance” は補助的な基準として使用した。IMPC データベースでは、KO マウス系統のアノテーションを行い、その致死表現型を報告している。KO マウスが E9 以前に死亡する遺伝子を実験の候補として選択した。ネットワーク解析には、NetworkAnalysist 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca>) を使用した。

ES 細胞の培養と分化

マウス ES (mES) 細胞は、先に述べたように LIF の存在下で培養することにより未分化状態に維持した。簡単に説明すると、フィーダー細胞非依存性の E14K mES 細胞は、15%ウシ仔牛血清 (SFBM30-2362; Equitech-bio, Texas, USA) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (26400044; Gibco, Massachusetts, USA) および 0.1 mM 2-mercaptoethanol (M3148; Sigma, Burlington, USA)、LIF を入れたゼラチンコ

ート皿で保持した。LIFは、当研究所で以下のように自家生産した。簡単に説明すると、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)細胞に、LIF-ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)を発現するベクターをトランスフェクションさせた。ベクターの増幅を誘導するために、メトトレキサート(MTX)(M8407; Sigma, Burlington, USA)を $0.1\mu\text{M}$ でトランスフェクトしたCHO細胞に添加した。MTX処理を1週間行った後、CHO-LIF細胞をMTXフリー培地に移し、LIF産生を行った。24時間後、LIF含有培養上清を回収し、E14K mES細胞で試験し、多能性維持能力およびmES細胞の心筋細胞またはニューロンへの分化効率を確認した。

mES細胞(3×10^3)をLIFを含まない培地で $25\mu\text{l}$ の吊り下げ滴下で培養し、角皿(栄研化学、東京、日本)内でEBsを形成させた。2日後、EBをノンコート細菌シャーレ(IWAKI、東京、日本)に移し、懸濁培養を行った。6日目に、EBをゼラチンコーティングされた組織培養皿(Corning, New York, USA)に移して、自発的な「心拍」を示す組織の領域が顕微鏡で検出できるようになる10日目まで付着培養を行った。EBは、特に断りのない限り、培養の3~6日目に阻害剤で処理した。

メタボローム解析

メタボローム解析は、株式会社ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ(HMT、山形県)に委託した。LC-TOF-MS分析前に酵素を不活性化するため、EBを10mlの5%マンニトール溶液で洗浄し、内部標準物質を含む1mlのエタノールで処理した。サンプルを氷上で5分間ウルトラソニケーションによりホモジナイズし、その後 $4,400\times g$ 、 4°C で5分間遠心分離を行った。上清を乾燥させ、 $200\mu\text{l}$ の50%2-プロパノールに溶解させた。LC-TOF-MSは、Agilent 1200シリーズRRLCシステムSLを用いて実施された。化合物は、正および負のイオン極性モードの両方で分析された。検出されたピークは、Master Hands ver. 2.17.1.11。ピーク面積を評価し、内部標準物質の面積に正規化した。HMT代謝物ライブラリは、m/z値と

リテンションタイムに基づいてピークに注釈を付けるために使用した。

RNAseq解析

RNA配列解析は、タカラバイオ株式会社(日本、滋賀)に委託した。RNeasy Mini Kits(74104; QIAGEN, Hilden, German)を用いて、製造者の指示に従ってtotal RNAを抽出した。抽出したRNAをDNase I(2270B; Takara, Shiga, Japan)とインキュベートし、ゲノムを分解させた。RNAの品質は、まず1.5%アガロースゲルでの電気泳動で評価し、その後、吸光光度計で評価した。遺伝子は、fold-changeが2より大きいとき、差次的に発現しているとみなされた。GO解析は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool(<https://david.ncifcrf.gov/>)を用いて行った。

B-3: モデル家畜・家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析:

上述の調査とエピジェネティクス解析と併行し、モデル家畜・家禽細胞培養系を用いたハザードの検証をおこなう。具体的には、ウシの気管平滑筋細胞や大腸筋線維芽細胞を用い(堀)、他方ニワトリでは胚消化管平滑筋細胞を用い(福田)、継代による遺伝子発現変動をエンドポイントとして、増殖効率の違い、エピジェネティクスやがん化を検討し、調査によって得られる食品安全性上のハザードの妥当性に還元し、補強する。

B-3-1: モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析:

C57BL/6Jマウスから、大腸と回腸、並びに腓腹筋を採取した。それぞれの臓器をコラゲナーゼ処理し、FACS Cell Sortingを用いてPlatelet Derived Growth Factor Receptor α (PDGFR α)を発現する繊維芽細胞様の間質細胞(以下P α 陽性繊維芽細胞様細胞)を採取した(CD31-CD45-PDGFR α +細胞集団)。大腸と小腸筋層由来のP α 陽性繊維芽細胞様細胞は8週齢の雄マウスを用いた。腓腹筋からのP α 陽性繊維芽細胞様細胞は成熟マウス(8週齢雄)と老齢マウス(36カ

月玲雄) から採取した。さらに、成熟マウスと老齢マウスの心臓、小腸、肺、脂肪、肝臓からも P α 陽性繊維芽細胞様細胞を採取した。

得られた細胞より mRNA を抽出し、タカラバイオによる RNAseq データファイルを作成し、得られた結果について PCA 解析などの遺伝子発現解析を行った。

屠場よりウシの気管を入手し、気管平滑筋細胞をコラゲナーゼ/エラスターゼカクテルにて単離し、DMEM 培地 10% ウシ胎児血清下で培養した。細胞は 70%コンフレントの状態に 25 代まで継代した。これらの実験を実験開始時は同一ロットの細胞を用いて二人の実験者で同様に実験を行い、初代培養細胞と 15 代培養細胞よりそれぞれ RNA を抽出した。

B-3-2: モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 :

ヒペコネラ種のニワトリ 14 日胚を用いた。14 日胚の砂嚢、小腸を取り出し、平滑筋層を単離した。パストツールによるピペッティングを行い、数 100 個の細胞を含む細胞塊を作成した。この細胞塊を DMEM 培地 0、5、10%ウシ胎児血清条件で、コラーゲンコートしたディッシュ、チャンバースライドに播種した。砂嚢に関しては、細胞塊をさらにピペッティングし、シングルセルにしたものも、同様の条件で播種した。コンフルエントになったものは継代を行い、1/10 の細胞を再播種し、6 代まで継代した。培養した細胞は α Smooth muscle actin および calponin 抗体で免疫染色をおこなった。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める動物実験に関する規程、指針を遵守した。組換え DNA 実験については「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、およびこれに基づく政省令・告示に示される基準に適合し、かつ所属機関の承認を得ている。

C. 研究結果と考察

C-1: 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討 (北嶋) :

令和 4 年度 (初年度) は、1) 開発動向、ならびに 2) 安全性や衛生規制の動向を中心に、Web 上の公開情報の調査を実施した。調査に先立ち、とりまとめに際しての基本的な考え方を整理し、細胞培養食品の種類に関する便宜的な分類表を用意した。分類表では、出発材料の種類として、A) 生物個体由来、及び B) 細胞株由来の 2 つの基軸 (縦軸) を設け、各々の横軸として、食品衛生上、考慮しなければならない要因、すなわち「由来する種、遺伝子組換えの有無、分化過程の有無、培養培地中の未知因子の有無 (血清を参照)、培地中の抗菌剤の種類、選択培地の使用の有無、加熱 (調理) 処理の有無、抽出物としての使用の有無、細胞の足場の種類、培養装置の種類」という項目を準備した。その結果、1) 開発動向として、シンガポール政府による世界初の承認事例となった培養チキンナゲットを含む 12 件の開発事例の情報を収集し、安全性の観点で予め用意した細胞培養食品の種類に関する分類表に基づいて整理した。出発材料の種類 (初代培養細胞と株化細胞の区別) がそもそも不明なものが多いたことが明らかとなった。血清や抗菌剤等のなるべく人為的なものを使用しない方向で開発が進められている傾向がみとれた。細胞の大量培養の実現に向けて Hippo-YAP シグナル伝達経路が注目されていることも見出した。また、2) 規制動向に関しては、シンガポールをはじめ、EU、オーストラリア・ニュージーランドでは、Novel Food の枠組みの中で細胞培養食品を取り扱っていることを見出し、シンガポールの安全性評価の要件や EU の申請項目に関する概要の情報を収集した。さらに、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザードの抽出を行い、当初の予定通り進捗した。令和 5 年度 (来年度) は計画に則り、新たなリスク管理方法の動向を中心とした調査を実施、検討し、引き続き、リスクプロファイルの検討と抽出した課題の妥当性について検証する予定である。

＜補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ＞

補完的な検討として、レポーター遺伝子アッセイにより、正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御につき検討中であるが、この制御が明らかとなれば、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現に対する方策に役立つものと考ええる。

C-2: モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析 (仁科):

C-2-1 致死率に基づくスクリーニングにより、器官形成に必須な遺伝子を発見:

PrS 形成に関わる遺伝子を網羅的に同定するため、MGI データベース (15,211 遺伝子) と IMPC データベース (7,590 系統の KO マウス) の 2 つの KO マウスデータベースをスクリーニングし、その欠損が E10 までに胚性致死につながる遺伝子を探した。MGI データベースの遺伝子のうち、463 遺伝子のいずれかが欠損すると、E4.5 から E9 の間に胚性致死となることがわかった。同様に、IMPC データベースの遺伝子のうち、417 遺伝子のいずれかを欠損すると、E9.5 以前の胚性致死が認められた。合計で 812 個の注目遺伝子が同定され、予想通り PrS 制御遺伝子 Brachyury T が含まれていた。812 個の候補遺伝子のエンリッチメント解析により、65 の注目すべき細胞機能パスウェイが同定された。これらの機能パスウェイは、DNA 複製、RNA 代謝、エネルギー代謝、シグナル伝達に必要な遺伝子や、細胞周期や細胞接着などの多様な細胞応答に関わるネットワークを形成していた。最も多くの遺伝子 (103 個) が含まれるカテゴリーは「代謝パスウェイ」(24 位) であった。そこで、この 103 個の遺伝子を DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) を用いて分類し、グルコース、ミトコンドリア、核酸、脂質の代謝に関わる遺伝子を同定した。これらの代謝経路は、エネルギー供給に必要なだけでなく、細胞成分の合成や遺伝子発現のエピジェネティックな制御など、適切な生命活動に欠かせないプロセスとして重要であることがわかった。これらの結果から、初期胚の発生には、代謝を中心とし

た様々な細胞機能のインタクトが必要であることが示された。

C-2-2 スフィンゴ脂質代謝経路の阻害によるマウス ES 細胞の心筋分化の抑制と神経分化の促進:

我々は以前、メバロン酸代謝阻害による PrS 形成不全時に、EB 中のスフィンゴミエリンとスフィンゴシンが増加することを確認した。今回、これらの変化の生物学的意義を明らかにするため、スフィンゴ脂質の代謝に着目した。スフィンゴ脂質代謝には 3 つの遺伝子 (Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 2 (Sptlc2), UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase (Ugcg), N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1 (Asa1)) が寄与することがわかっている。PrS 形成における SPTLC2、UGCG、ASAHI タンパク質の役割を調べるため、これらの酵素の特異的阻害剤 (SPTLC2 は Myriocin16、UGCG は NB-DNJ17、ASAHI は D-NMAPPD18) のマウス ES 細胞分化への影響を調べた。阻害剤は培養 3-6 日目に適用し、10 日目に ES 細胞の分化を光学顕微鏡で心筋細胞拍動を、 β -チューブリン III 免疫染色で神経突起形成を検出することで解析した。その結果、ミリオシンは心筋細胞の拍動と β -チューブリン III 陽性の神経突起の形成をともに阻害し、PrS 形成前に細胞死を起こすことがわかった。一方、NB-DNJ および D-NMAPPD は、EB の拍動を阻害する一方で、これらの薬剤は用量依存的に β -チューブリン III 陽性神経突起の形成を促進した。これらのデータは、UGCG と ASAHI が正常な PRS 形成に重要であることを示唆している。

NB-DNJ による UGCG の阻害や D-NMAPPD による ASAHI の阻害が、どの時点で細胞拍動を阻害するかを明らかにするため、各阻害剤で細胞を 6 期間 (1-2 日、3-4 日、5-6 日、7-10 日、1-4、3-6) 処理し、10 日目の細胞拍動や神経突起伸長を解析した。1-4 日目、3-4 日目、3-6 日目に NB-DNJ を投与すると、細胞拍動は効率的に低下し、神経突起の伸長が促進された。D-NMAPPD を用いて ASAHI を阻害した場合も、同様の結果が得られた。このように、EB の発生 3-6 日目は、特にス

フィンゴ脂質代謝に依存していることが示唆された。

UGCG 阻害による PRS 形成の時空間的影響を明らかにするため、PRS マーカーである Brachyury T の発現を in situ hybridization で検出した。EB を NB-DNJ で 3-4 日または 3-6 日処理し、Brachyury T レベルを 3、4、5 および 6 の組み合わせで 4 パターンで調べた。コントロールの無処理 EB では、3 日目には Brachyury T の発現は見られなかったが、4 日目にピークを迎え、5 日目から 6 日目にかけて徐々に減少した。一方、3 日目から 6 日目にかけて NB-DNJ を処理すると、Brachyury T の発現はほぼ抑制された。興味深いことに、3-4 日目から NB-DNJ のみを適用した場合、Brachyury T の発現は 4 日目に抑制されたが、NB-DNJ を除去した 5 日目には回復した。このように、EB 発生 3-4 日目に ASAHI または UGCG を阻害すると、PRS 形成が阻害され、心筋細胞分化が抑制される一方で、神経分化が誘導されることがわかった。この他、メタボローム解析や RNAseq 解析から、セラミド代謝が PrS 形成に必須の役割を果たすことが明らかとなった。スフィンゴシン-1-リン酸 (セラミド誘導体) は、神経細胞の成熟をポジティブに制御することを明らかにした。これらの結果は、セラミド代謝が PrS の形成と神経細胞分化の誘導の両方を制御していることを示す。以上のように、細胞分化に影響を与える因子の一つとして、セラミド代謝を新たに同定した。

C-3 : モデル家畜・家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 :

C-3-1: モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 (堀) :

細胞培養食品の品質の鍵を握る因子の一つとして、用いる細胞を採取する臓器の部位差や個体の年齢差が考えられる。屠場で得るウシの臓器を用いた細胞培養系では、細かい臓器の部位差や個体の年齢差を選択することは困難である。そこで、今年度はマウスを用いて同じ消化管でも大腸と小腸から繊維芽細胞様の細胞を採取した。また、老個体と若齢個体の骨格筋から同じく繊維芽

細胞様の細胞を採取した。それぞれ採取した細胞の遺伝子発現解析をおこない、臓器部位と個体年齢という二つの因子について、細胞培養食品の安全性確認に関する事項について考察した。

(臓器の部位差) マウスの大腸筋層、ならびに小腸筋層を採取し、Platelet Derived Growth Factor (PDGF) α receptor (PDGFR α) を発現する繊維芽細胞様間質細胞を FACS Cell Sorter により採取し、RNAseq 解析を行い、発現遺伝子の相違について検証した。結果、同じ消化管筋層の同じ繊維芽細胞様細胞であっても、大腸と小腸では発現遺伝子群は大きく異なることが明らかになった。

(個体の年齢) 次に、成熟個体マウス (8 週齢) と老個体マウス (36 カ月齢) の腓腹筋より PDGFR α 陽性の繊維芽細胞様間質細胞を FACS cell sorter にて採取して RNAseq 解析を行った。その結果、老化個体より採取した PDGFR α 陽性繊維芽細胞様間質細胞では、炎症や線維化に関する遺伝子群の発現が亢進していることが明らかになった。

以上の成績から、細胞培養食品の安全性基準の一つとして、細胞を採取する臓器の部位の均一性、細胞を採取する個体年齢の均一性が重要と考えられた。以上の解析結果は、細胞培養食品の作製に際しての、使用する年齢・臓器部位選択理由に資する成果と考える。加えて今年度は、ウシの気管平滑筋細胞を用いたウシ胎児血清を用いた細胞培養系についても樹立したことから、来年度はウシの気管平滑筋細胞の培養系を用い、特に培養継代数の差異について検討し、細胞培養食品の安全性確認に関する検証を実施する予定である。

C-3-2: モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析 (福田) :

モデル家禽細胞培養系として、ニワトリの胚消化管平滑筋細胞に着目し、その中でも特に砂囊平滑筋に注目した。一般に細胞の増殖と分化の維持は相反しているが、砂囊平滑筋は発生中に高効率で増殖することが知られているため、砂囊平滑筋は他の消化管平滑筋に比べて、高い増殖下でも平滑

筋細胞の分化の維持ができるのではないかと考え、砂嚢平滑筋を効率的に増殖させる培養条件を検討し、そのときの分化状態を調べた。ニワトリ 14 日胚の砂嚢から平滑筋層を取り出し、ピペッティングで数 100 個の細胞が含まれる細胞塊を作り、コラーゲンコートしたディッシュに撒き、0、5、10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養したところ、単離細胞の培養と比べ増殖が速く、細胞塊から多くのスピンドル型の細胞が這い出し、7 日でコンフルエントになった。これらの細胞は α Smooth muscle actin および calponin 陽性の細胞だった。これを継代してゆくと、徐々に、仮足を伸ばし広がった形態の細胞が増え、6 代目には多くが広がった細胞になった。それと同時に calponin 陽性細胞の割合も減っていった。また、核の大きさが大きくなっているのも観察できた。次に、砂嚢と比べ、平滑筋の発達が悪い小腸の平滑筋は砂嚢と同条件で培養した際に、どのような動態を見せるかも調べた。砂嚢で増殖が盛んな条件で小腸の平滑筋細胞塊を培養したが、あまり増殖せず、7 日目になっても細胞数は増えなかった上、形態も広がった繊維芽細胞状だった。

以上の結果から、ニワトリ胚砂嚢は、細胞塊で培養するとよく増殖し、分化状態も保っていることから、新たな細胞培養食品のソースになりうると考えられる。ただし、単離細胞での培養と細胞塊での培養では、増殖能、細胞形態に違いがあったことから、培養方法による脱分化リスクへの対応が必要となると考える。すなわち、分化増殖過程におけるハザードとしては、単離細胞と細胞塊という培養条件の違いにより細胞の分化状態が異なり、目的とする細胞と異なる性質を生じる可能性が高く、この分子機序解明がその方策につながるものと考えられる。また今回は増殖刺激としてウシ胎児血清を加えたが、より直接的に増殖を刺激する YAP/TAZ シグナル調節因子を加えて、増殖能を上げたときに細胞分化がどうなるかを調べていく予定である。

D. 結論

令和 4 年度 (初年度) は、1) 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係

る先駆的な調査検討では、1) 開発動向、ならびに 2) 安全性や衛生規制の動向を中心に、Web 上の公開情報の調査を実施し、それぞれの特徴を抽出した。調査に先立ち、細胞培養食品に関する便宜的な分類表を用意し、これに基づき調査結果を整理した。そして、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザードの抽出を行った。2) モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析では、器官形成に必須の役割を果たす PrS 組織の正常分化に必須である複数の候補遺伝子を同定することに成功した。個体生存に必須である様々な細胞応答に関与する約 800 遺伝子を同定し、この内、脂質代謝に関与する 2 遺伝子に着目し解析した結果、セラミド分子の量的変化により、胚葉分化の異常を伴う細胞の分化異常が生じることを明らかとし、セラミド代謝が実際に PrS 形成に必須であることをマウス ES 分化誘導系を用いて実証した。3) モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析では、年齢差及び部位差の比較検討を成熟及び老化マウス内臓 (骨格筋、肝、肺、消化管、心) 由来の線維芽細胞を用い発現遺伝子を解析し、それぞれの場合で遺伝子発現プロファイルが大きく異なることを明らかにした。モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析では、ニワトリ胚砂嚢平滑筋を用いて検討した結果、他の消化管平滑筋と異なり、細胞増殖時でも例外的に分化状態が維持されること、またこの培養条件を見出した。引き続き、この機序を探索中である。以上の解析結果は、細胞培養食品の作製に際しての、使用する年齢・臓器部位・培養条件などの様々な選択理由に資する成果と考えられる。

引き続き、次年度も計画に則り、同様な調査・実験を実施、検討する。本調査研究により、「細胞培養食品」の食品衛生上の安全性確認に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性確保に資する基礎的資料の作成といった行政支援として寄与することが期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表 (抜粋)

Kanno S, Okubo Y, Kageyama T, Yan L, Kitajima S, Fukuda J: Establishment of a Developmental Toxicity Assay based

on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption. *iScience*. 2022, 25, 103770. doi:10.1016/j.isci.2022.103770

相崎健一, 小野竜一, 菅野 純, 北嶋 聡 : Percellome プロジェクト~トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求~, *日本薬理学雑誌*, 2022; 157: 200-206. doi.org/10.1254/fpj.21122

Hirotooshi Soyama, Miki Nishio, Junji Otani, Toshiko Sakuma, Shintaro Takao, Shigeo Hara, Takaaki Masuda, Koshi Mimori, Shinya Toyokuni, John P Lydon, Kazuwa Nakao, Hiroshi Nishina, Takumi Fukumoto, Tomohiko Maehama and Akira Suzuki, Hippo-TAZ signaling is the master regulator of the onset of triple negative basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 119 (29) e2123134119, 2022.

Caleb Kwame Sinclair, Junichi Maruyama, Shunta Nagashima, Kyoko Arimoto-Matsuzaki, Joshua Agbemefa Kuleape, Hiroaki Iwasa, Hiroshi Nishina, Hata, Yutaka, Protein kinase C α activation switches YAP1 from TEAD-mediated signaling to p73-mediated signaling. *Cancer Science* 113, 1305-1320, 2022.

Takeaki Shibata, Hiroki Kawana, Yuri Nishino, Yoshiko Ito, Hiroyasu Sato, Hirofumi Onishi, Kuniyuki Kano, Asuka Inoue, Yoshitaka Taketomi, Makoto Murakami, Satoshi Kofuji, Hiroshi Nishina, Atsuo Miyazawa, Nozomu Konol and Junken Aoki, Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme *Lpgatl* in zebrafish. *Scientific Reports* 12, 7312, 2022.

Chiyumi Oda, Kenya Kamimura, Osamu Shibata, Shinichi Morita, Yuto Tanaka, Toru Setsu, Hiroyuki Abe, Takeshi Yokoo, Akira Sakamaki, Hiroteru

Kamimura, Satoshi Kofuji, Toshifumi Wakai, Hiroshi Nishina, Shuji Terai, HBx and YAP Expression Could Promote Tumor Development and Progression in HBV-related Hepatocellular Carcinoma. *Biochem. Biophys. Rep.* 32, 101352, 2022.

Sakurako Kobayashi, Nobuhiko Ogasawara, Satoshi Watanabe, Yosuke Yoneyama, Sakura Kirino, Yui Hiraguri, Masami Inoue, Sayaka Nagata, Yoshimi Okamoto-Uchida, Satoshi Kofuji, Hiromichi Shimizu, Go Ito, Tomohiro Mizutani, Shinichi Yamauchi, Yusuke Kinugasa, Yoshihito Kano, Yasuhiro Nemoto, Mamoru Watanabe, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Nishina, Ryuichi Okamoto, Shiro Yui (2022) Collagen Type I mediated mechnotransduction controls epithelial cell fate conversion during intestinal inflammation. *Inflammation and Regeneration* 42, 49, 2022.

Hiroshi Nishina (2022) [review] Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis and tumorigenesis. *Cancer Science* 113, 1900-1908, 2022.

仁科博史: 動物における臓器サイズ制御機構 再生医療 Vol 21 No 2 p74-79 (2022)

Takashi Chaen, Tamaki Kurosawa, Kazuhisa Kishi, Noriyuki Kaji, Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Masatoshi Hori. Transcriptome analysis of mesenchymal stromal cells of the large and small intestinal smooth muscle layers reveals a unique gastrointestinal stromal signature. *Biochemistry and Biophysics Reports*, (in press) DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101478

2. 学会発表 (抜粋)

北嶋 聡: 創薬研究における薬理-病理連携の必要性: 毒性学の立場から 一食品トキ

シコゲノミクスと薬理学一、第 96 回日本薬理学会年会、(2022. 12. 2)、横浜

相崎健一、小野竜一、菅野 純、北嶋 聡：Percellome プロジェクト ～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第 96 回日本薬理学会年会、(2022. 12. 2)、横浜

小野 竜一、田塾 慶子、安田 智、佐藤 陽治、内田 恵理子、平林 容子、北嶋 聡 ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第 118 回学術講演会 2022. 11. 11 長崎 (口頭発表)

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima : Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022. 9. 19), Maastricht, The Netherlands Oral.

五十嵐智女、松村万里、小川いづみ、矢川千織、早川孝彦、越智美代子、齊藤 洋克、栗形麻樹子、北嶋聡：「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 1)

五十嵐智女、藤井咲子、釣本真理子、高橋祐次、北嶋 聡、栗形麻樹子：ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験 第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 2)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡：新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察 第 49 回日本毒性学会学術年会(2022. 6. 30)

菅野 純、相崎健一、小野竜一、北嶋 聡：Percellome project からみた毒性 AI の展望

第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 2)

大久保佑亮、菅野聖世、北嶋 聡、平林容子、福田淳二：ヒト iPS 細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発

第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 1)

小野竜一、山本雄介、成瀬美衣、田邊思帆里、吉岡祐亮、相崎健一、広瀬明彦、落谷孝広、平林容子、北嶋 聡：cfDNA による毒性評価

第 49 回日本毒性学会学術年会 (2022. 7. 2)

仁科博史：肝臓の形成と恒常性維持、第 24 回 長崎大学細胞制御セミナー (2022. 10. 21.) 長崎

仁科博史：肝臓の形成と恒常性維持、第 1 回旭川医科大学大学院セミナー (2023. 1. 27.) 旭川

仁科博史：肝臓の発生と再生、新潟大学消化器内科サイエンスセミナー(2023. 3. 16.) 新潟

仁科博史：生物の大きさと再生医療、第 22 回 日本再生医療学会 (2023. 3. 24.) 京都

茶圓貴志、黒澤珠希、岸和寿、梶典幸、堀正敏：小腸、大腸 PDGFR α +細胞の生理機能解明、第 146 回日本薬理学会関東部会 (2022. 6. 18)

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅱ. 分担研究報告書

フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードやリスクに係る研究 -リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元-

分担研究報告書

分担研究課題：「細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る先駆的な調査検討」

研究分担者	北嶋 聡	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
研究協力者	西村拓也	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	齊藤洋克	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部
	五十嵐智女	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部

研究要旨

フードテック、すなわち食に関する最先端技術を活用した、食料システムの構築や国民の健康増進に資する食品の探索などの観点から、従来の生産方法とは異なる新たな方法で作られる、又はこれまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品の研究開発が進められている。この代表例としては、骨格筋細胞といった家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る、「いわゆる培養肉」（肉と称するのは適切とは限らないため、以降「細胞培養食品」とする）の研究開発が国内外で進展している（Post M et al, Nature Food, 1 (7), 403-415 (2020)）。現時点で国内では、技術の確立や市場化の目途は立っていないが、様々な研究会の設立をはじめ、研究開発の加速が見込まれ、将来、フードテックを活用した様々な「細胞培養食品」の上市化が想定され、その安全性確保に向けた課題の抽出について検討すべきタイミングを迎えている。そこで本調査研究では、特に「細胞培養食品」に着目し、この食品衛生上の取扱いを検討するため、そのハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出をおこない、リスクプロファイルの作成ならびに、想定される今後の動向と方策につき考察することを目的とする。この際、学術的に能動的な調査に努め、あわせて、「細胞培養食品」のモデルとなり得る独自の細胞培養実験系を用いて、抽出した課題の妥当性について検証し、またこの結果を調査の方に還元し、その確度について補強する（先駆的な調査検討）。

本分担研究では、この目的に向け、細胞培養食品に関し、国内外ともに主として以下の4項目について調査を実施する。すなわち、1) 開発の動向、2) 安全性や衛生規制の動向、3) 新たなリスク管理方法の動向、及び4) 食肉産業界ならびに消費者の受け止め（含、リスクコミュニケーション）についての情報。この際、単調な情報収集・整理に終始するのではなく、初代培養系なのか細胞株培養系なのか等、学術的な基軸を抛り所とした能動的な調査に努める。また併行して、研究分担者の各種モデル系に係る補完的検討も実施し、連携の向上と円滑な進捗を図る。

令和4年度（初年度）は予定通り、細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を、1) 開発動向、ならびに2) 安全性や衛生規制の動向を中心に、Web上の公開情報について実施した。調査対象とした細胞培養食品とは、バイオプシー（生体組織採取）サンプルから直接あるいは分化させて大量に細胞を増殖させたもの、又は株化された細胞を大量に増殖させたものを指す。開発動向については、研究開発を資金面などで推進する米国のGFI (Good Food Institute) が公開している関連企業データベースから選出した開発企業を対象とした。規制動向の調査対象国は、日本、比較的議論が進んでいると思われるシンガポール、米国、欧州、オーストラリア及びニュージーランドとした。調査に先立ち、とりまとめに際しての基本的な考え方を整理し、細胞培養食品の種類に関する便宜的な分類表を用意した。分類表では、出発材料の種類として、1) 生物個体由来（初代培養）、及び2) 細胞株由来の2つの基軸（縦軸）を設け、各々の横軸として、食品衛生上、考慮しなければならない要因、すなわち「由来する種、遺伝子組換えの有無、分化過程の有無、培地中の未知因子の有無（血清等）、培地中の抗菌剤の種類、選択培地の使用の有無、加熱（調理）処理の有無、抽出物としての使用の有無、細胞の足場の種類、培養装置の種類」という項目を準備した。

その結果、開発動向として、シンガポール政府による世界初の承認事例となった培養チキンナゲットを含む12件の開発事例の情報を収集し、分類表に基づいて整理した。出発材料の種類がそもそも不明なものが多いことが明らかとなった。血清や抗菌剤等のなるべく人為的なものを使用しない方向で開発が進められている傾向がみてとれた。細胞の大量培養の実現に向けてHippo-YAPシグナル伝達経路が注目されていることも見出した。また、規制動向に関しては、米国を除く、シンガポール、EU、オーストラリア・ニュージーランドでは、Novel Food(s)（新食品）の枠組みの中で細胞培養食品を取り扱っていることを見出し、シンガポールの安全性評価の要件やEUの申請項目に関する概要の情報を収集した。さらに、本調査における検討をもとに、細胞培養食品に関して想定される潜在的なハザードの抽出を行った。加えて補完的検討として、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現制御に関し、レポーター遺伝子アッセイにより、正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御につき検討中である。

令和5年度（来年度）は計画に則り、新たなリスク管理方法の動向を中心とした調査を実施、検討する予定である。

A. 研究目的

フードテック、すなわち食に関する最先端技術を活用した、食料システムの構築や国民の健康増進に資する食品の探索などの観点から、従来の生産方法とは異なる新たな方法で作られる、又はこれまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品の研究開発が進められている。この代表例としては、骨格筋細胞といった家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る、「いわゆる培養肉」（肉と称するのは適切とは限らないため、以降「細胞培養食品」とする）の研究開発が国内外で進展している（Post M et al, Nature Food, 1 (7), 403-415 (2020)）¹。現時点で国内では、技術の確立や市場化の目は立っていないが、様々な研究会の設立をはじめ、研究開発の加速が見込まれ、将来、フードテックを活用した様々な「細胞培養食品」の上市化が想定され、その安全性確保に向けた課題の抽出について検討すべきタイミングを迎えている。

そこで本調査研究では、特に「細胞培養食品」に着目し、この食品衛生上の取扱いを検討するため、そのハザードやリスクの特定に向けた課題の抽出をおこない、リスクプロファイルの作成ならびに、想定される今後の動向と方策につき考察することを目的とする。この際、学術的に能動的な調査に努め、あわせて、「細胞培養食品」のモデルとなり得る独自の細胞培養実験系を用いて、抽出した課題の妥当性について検証し、またこの結果を調査の方に還元し、その確度について補強する（先駆的な調査検討）。

本分担研究では、この目的に向け、細胞培養食品に関し、国内外ともに主として以下の4項目について調査を実施する。すなわち、1) 開発の動向、2) 安全性や衛生規制の動向、3) 新たなリスク管理方法の動向、及び4) 食肉産業界ならびに消費者の受け止め（含、リスクコミュニケーション）

についての情報。この際、単調な情報収集・整理に終始するのではなく、初代培養系なのか細胞株培養系なのか等、学術的な基軸を拠り所とした能動的な調査に努める。また併行して、研究分担者の各種モデル系に係る補完的検討も実施し、連携の向上と円滑な進捗を図る。

令和4年度（初年度）は予定通り、細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を、1) 開発動向、ならびに2) 安全性や衛生規制の動向を中心に実施し、また、円滑に効率よく進むように各培養・評価系等を調整する。加えて、補完的検討として、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現制御に関し検討する。

B. 研究方法

B-1：調査対象および情報収集の方法

細胞培養食品とは、バイオプシー（生体組織採取）サンプルから直接あるいは分化させて大量に細胞を増殖させたもの、又は株化された細胞を大量に増殖させたものを指す。細胞培養食品に関する以下の2項目について、Web上の公開情報の調査を実施した。

- 1) 開発動向
- 2) 安全性や衛生規制の動向（規制の主体、安全性確保措置の内容）

「開発動向」については、細胞培養食品に関する研究開発を資金面などで推進する米国のGFI（Good Food Institute）が公開している関連企業データベース²から、知名度や予算獲得状況、開発の進捗状況等を勘案して、なるべく国や開発品の種類が偏らないように開発企業12社を選定して事例調査の対象とし、各企業の開発状況について当該企業の公式ホームページを中心に調査を行った。なお、GFIのデータベースに収録されている細胞培養食品の開発企業は2022年7月15日の時点で約120社にのぼり、すべての開発企業についての網羅的な調査は困難なことから、前述の

¹ Post, M.J., Levenberg, S., Kaplan, D.L. et al. Scientific, sustainability and regulatory challenges of cultured meat. Nat Food 1, 403-415 (2020). <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0112-z>

² State of the Industry Report: Cultivated meat and

seafood <https://gfi.org/resource/cultivated-meat-eggs-and-dairy-state-of-the-industry-report/>（アクセス日：2022年7月15日）

12社に絞った事例調査とした。

「安全性や衛生規制の動向」に関する調査対象国は、日本、比較的議論が進んでいると思われるシンガポール、米国、欧州、オーストラリア及びニュージーランドとした。各国における規制の主体となる組織、法律、安全性確保措置などを調査対象とした。規制に関する組織として、例えば、日本では内閣府食品安全委員会、厚生労働省、農林水産省、環境省、消費者庁を、シンガポールではSFA (Singapore Food Agency)、米国ではFDA (Food and Drug Administration)、USDA-FSIS (United States Department of Agriculture - Food Safety and Inspection Service)、欧州ではEUレベルでのEFSA (European Food Safety Authority)、各国レベルではイギリスのFSA (Food Standards Agency) 及びオランダのNVWA (Nederlandse Voedsel-en Warenautoriteit (オランダ語名称)、Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (英語名称))、オーストラリア及びニュージーランドではFSANZ (Food Standards Australia New Zealand) を中心に調査した。

また、インターネット検索においては、培養肉を意味する以下のキーワードで検索を行った：クリーンミート、細胞農業、純肉、培養肉、animal free meat、cell-based meat、cellular agriculture、clean meat、cultivated meat、cultured meat、in-vitro meat、lab-grown meat、slaughter-free meat。

包括的な情報収集を行った期間は、令和4年(2022年)6月下旬から8月下旬であり、個別に各項目において情報更新の都度、随時反映した。

B-2：調査に際しての基本的な考え方

細胞培養食品の開発動向についての調査の開始に先立ち、基本的な考え方を整理した(図1)。

「細胞培養」という言葉だけでは具体的に指しているものが曖昧模糊となるように考えられたため、学術的観点で便宜的な分類表を研究代表者の

方で予め用意、提案した(表1)。この分類表は、無論、これらの項目を埋めること自体が目的ではなく、あくまでも、調査に際して、当該細胞培養食品の位置づけや特徴をわかりやすく把握するための分類表である。

ここではまず大きく2つ、すなわち1) 生物個体由来、及び2) 細胞株由来に分け、これを基軸とした。前者は初代培養・プライマリー培養系、後者はiPS細胞などの各種幹細胞を含む、細胞株培養系をイメージしつつ、また指している。DNA配列によって決定される遺伝現象とは対照的に、DNAやヒストンへの後天的な化学修飾により制御される遺伝現象を「エピジェネティクス」と呼び、DNAのメチル化やヒストンのアセチル化、メチル化などが、後天的な修飾として作用する。2つに大別した理由は、細胞を培養する出発時点において、後者の株化細胞の方が生体組織内に存在する元の細胞からは性質が大きく変化しているため、ゲノムに変異が入る可能性が高いだけでなく、この「エピジェネティクス」の影響が、後者の方がはるかに大きいと考えられるためであり、この影響の評価を考慮する必要がある。

加えて、前者は各種細胞の混合物であることが多いため、混合物としての取り扱いをせざるを得ないと考えられるのに対して、後者は単一の細胞株である可能性が高いためである。すなわち、エピジェネティクスと各種細胞の混合物か否か、という観点から2つに大別した。アナロジーとしては、前者は閉鎖系である前提で発酵食品、後者は細胞医薬品であるように思える。

この2つの基軸(縦軸)につき、横軸として、食品衛生上、考慮しなければならない要因、すなわち「由来する種、遺伝子組換えの有無、分化過程の有無、培地中の未知因子の有無(血清等)、培地中の抗菌剤の種類、選択培地³の使用の有無、加熱(調理)処理の有無、抽出物として使用の有無、細胞の足場の種類、培養装置の種類」という項目を準備した。この内「由来する種」については、[ヒト、飼料安全法下の家畜・家禽・水産動

³ 選択培地とは、目的のDNA配列が導入された細胞を薬剤耐性によって選択する際に使用される、G418や

Puromycine、Hygromycineのような抗生物質を添加した培地などを想定している。

物・ミツバチ、及び、これら以外の動植物(含む、昆虫)]という細目を用意した。これは、飼料安全法下で飼育されている種であれば、飼料に関する一定の安全性が担保されているが、そうでない場合は飼料の安全性についても検討する必要がある可能性があり、安全性を検討する対象の範囲が広がると考えられるためである。ヒト細胞を使用する場合には、いわゆる生命倫理の問題が生じることとなる。

以上のように、表1では縦軸で「初代培養系なのか、細胞株培養系なのか」を区別し、横軸で「食品衛生上、考慮しなければならない要因」を挙げ、細胞培養食品特有のハザードとの関連が想定される項目を設定した。こうした分類表を予め用意しておくことにより、網羅性をもって、横断的に、懸念点が考察できるように考えており、たとえ、関連する開発製品が急速に増加したとしても、対応できるものとする。

B-3: 補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ:

補完的検討により、連携の向上と円滑な進捗を図る。具体的には、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現制御に関し検討することとした。正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御を明らかにするため、株化筋細胞を用い組織特異的に転写制御される培養条件(増殖期間、ストレス等)や培地成分(増殖因子や分化因子等)の有無について検討するため、マウス横紋筋由来細胞株C2C12及び比較対象としてマウス神経由来細胞株Neuro-2aを用い、レポーター遺伝子アッセイ系としてpNL2.2[NlucP/Hygro]ベクターにプリオン遺伝子のプロモーター領域約1000bpを導入したベクターを作製し検討した。

C. 研究結果及び考察

令和4年度(初年度)は予定通り、細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を、1) 開発動向、ならびに2) 安全性や衛生規制の動向を中心に調査を実施した。

C-1: 細胞培養食品の開発動向:

細胞培養食品の開発動向についての調査に先立ち、とりまとめに際しての基本的な考え方を整理し、予め用意した細胞培養食品の分類表(表1)に基づき調査したところ、調査時点(2022年8月)で12件の開発事例の情報を収集できた。各々の事例の開発状況と、細胞培養食品の種類に関する情報として、出発材料の種類(初代培養細胞と株化細胞の区別)、由来する生物種、遺伝子組換えの有無、分化過程の有無、培地中の未知因子の有無、培地中の抗菌剤の種類、選択培地の使用の有無、加熱処理の有無、抽出物としての使用の有無、細胞の足場の種類、培養装置の種類について、表2にまとめた。

調査時点(2022年8月)における開発品の上市は、シンガポール政府が2020年に世界で初めて承認したEat Just社(米国)の鶏の細胞培養食品のみであった(2023年3月末の時点でも同じ)。各開発企業のホームページを中心とした調査の結果、出発材料の種類(初代培養細胞と株化細胞の区別)がそもそも不明なものが多いことが明らかとなった。また、幹細胞とするものも見出されたが詳細な情報が不明である。

由来する生物種では、牛や鶏が比較的多く利用されているようである。また、魚介類を専門に扱っている企業もある(Finless Foods社やShiok Meats社)。特筆すべきは、IntegriCulture社(日本)の「食べられる培養フォアグラ」すなわち骨格筋ではなく「肝細胞」を利用した製品開発であり、すなわち肉とはいえ骨格筋だけを対象としていないこととなる。

加えて、将来の想定として、既存の畜産物の代替ではなく、自然保護の観点からの生物種(うなぎ、マグロやクジラなど)に適用した場合の培養肉の有用性が考えられたが、食品の安全性というよりは、すでに、食用に供する対象としてふさわしいかという、倫理的、社会的な側面からの問題が掲げられている報告⁴が見出せ、こうした問題に注視しないといけないことが明らかとなっ

⁴ Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M.,

Glencross, A., & Sexton, A. Bringing cultured meat to

た。

培地に関しては、当初はウシ血清などの動物由来の材料を使用して研究開発が始まっているが、製品化に向けたコストダウンや動物福祉（動物の権利も含む）を目的に、動物由来の材料を使用しない方向で研究が進んでいる。

抗菌剤や選択培地などといった人為的なものを、できるだけ使用しない方向で進んでいる傾向がみてとれ、表1の分類表の横軸部分の項目は、食品衛生上、あまり考慮しなくてもよい方向で動いているように思える。

ただし、今後、こうした動向はどうか注視する必要はあるが、こうした分類表を用意することにより、網羅性をもって、横断的に、懸念点が考察できるように考えており、たとえ、関連する開発製品が急速に増加したとしても、網羅的に分類した上で考察できるものとする。

また、学術文献や特許の調査から、細胞培養食品の開発において課題となっている細胞の大量培養を可能にするための方法として、培養細胞のコンタクトインヒビションや器官サイズを制御するHippo-YAPシグナル伝達経路が注目されていることを見出した^{5,6,7}。すなわち、YAPの活性化を介してHippoシグナルを抑制することによって細胞増殖を促進し、細胞培養密度を高めることが期待されている。細胞の大量培養の工程こそが食品安全上もっとも未知の部分であること、また、Hippo-YAPシグナル伝達経路は幹細胞性の維持やがん化なども制御していることから、この経路に着目した潜在的なハザードの検討を来年度以降行っていく予定である。

C-2: 安全性や衛生規制の動向：

シンガポール、欧州、オーストラリア・ニュージーランド、米国における細胞培養食品に関する安全性や衛生規制の動向を表3にまとめた。このうちの米国以外の国・地域では、細胞培養食品はNovel Foodsの枠組みの中で規制される。細胞培養食品としての販売が最初に承認されたのは鶏で、次いでウズラの申請と続き、当初の開発研究の中心であった牛や豚のような家畜よりも、家禽の細胞培養食品の上市が先行している。

まず、2020年12月にシンガポール食品庁(SFA)が世界に先駆けてEat Just社の鶏の細胞培養食品の販売を承認し、2019年11月22日付のNovel Foodsの安全性評価要件の文書の中で細胞培養食品に特化した安全性評価に必要な情報を示した。この文書は随時更新されており、2022年9月26日付の文書⁸では、評価に必要な情報について、Q2.8で「一般的に、安全性評価には、製造工程における細胞培養の同一性と遺伝的安定性、純度に関する情報、ならびに使用する全ての投入物（培地成分や足場材など）の同一性と純度に関する情報、さらに製造工程から生じる可能性のあるハザードに関する情報が含まれるべき」と説明されている。具体的な合否の基準は明示されていないが、例えば食品に使用されることが知られていない培地成分の安全性については、Q2.11で最終的な培養肉の製品において残留しないことを示すか、残留する場合は、培地成分の残留レベルを従来法で成長させた食肉に存在する同一化合物と比較すること、培養肉における意図的な使用レベルを

market: technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture, Trends in food science & technology, 78, 155-166 (2018) DOI: 10.1016/j.tifs.2018.04.010

⁵ Hadi J, Brightwell G. Safety of Alternative Proteins: Technological, Environmental and Regulatory Aspects of Cultured Meat, Plant-Based Meat, Insect Protein and Single-Cell Protein. Foods. 2021; 10(6):1226. <https://doi.org/10.3390/foods10061226>

⁶ Hippo patent (Memphis Meats): WO 2018/208628 A1 (15.11.2018)

⁷ Liu Z, Lin L, Zhu H, Wu Z, Ding X, Hu R, Jiang Y, Tang C, Ding S, Guo R (2021) YAP Promotes Cell Proliferation and Stemness Maintenance of Porcine

Muscle Stem Cells under High-Density Condition. Cells, 10, 3069. <https://doi.org/10.3390/cells10113069>

⁸ Requirements for the Safety Assessment of Novel Foods and Novel Food Ingredients, Singapore Food Agency. Version dated 26 Sep 2022. https://www.sfa.gov.sg/docs/default-source/food-import-and-export/Requirements-on-safety-assessment-of-novel-foods_26Sep.pdf

最新版が掲載される SFA の該当ページは下記

<https://www.sfa.gov.sg/food-information/novel-food/novel-food>

(アクセス日：2023年5月16日)

考慮した上で同一化合物の毒性データと比較することによって安全性を示すことができるとしている。遺伝子組換え生物／微生物を用いる場合は、遺伝子組換え生物の安全性評価項目が適用される。また、SFAの別の刊行物⁹によると、細胞培養食品の作り方として、酵母細胞やビールやヨーグルト用の乳酸菌の増殖など、既存の食品製造プロセスと同様に、細胞をバイオリアクターに入れて増殖させる方法が想定されているようである（図2）。ただし、世界初となった鶏の細胞培養食品を販売承認した際の安全性評価に係る文書は公開されていない。

米国では、2019年に審査の実施主体がUSDA-FSIS（米国農務省食品安全検査局）とFDA（米国食品医薬品局）による分担体制で、FDAが市販前コンサルテーションを行うことがUSDA-FDA合意文書¹⁰にて発表された。2022年11月16日に、FDAはUpside Foods社の鶏の細胞培養食品の市販前コンサルテーションを終了し、同社の安全性に関する結論にこれ以上の疑問点はないことを表明¹¹し、販売に向けて前進した。同社の開発品に用いられた細胞の不死化には遺伝子組換え技術が使用されている。FDAは2023年中の公開を目標に、培養動物細胞食品の市販前コンサルテーションに関する業界向けガイダンスの開発を行っているようである¹²。

オーストラリア及びニュージーランドにおいても、培養肉はNovel Food（ただし定義は欧州のものとは異なる）として位置付けられている。培養肉固有の安全性審査項目はまだできていないが、FSANZは基準に含まれる可能性のある項目を公表している¹³。2023年2月27日付でオーストラリア・ニュージーランドの食品規制機関（FSANZ: Food Standards Australia New Zealand）がVow社のウズラの細胞培養食品の申請を受理し、評価を開始したことを公表した。

欧州では培養肉はNovel Foodとして位置付けられ、EFSAが申請時に必要な培養肉固有の項目（安全性審査項目）をチェックリスト形式で提供している¹⁴。しかし、可否の基準は公表されていない。遺伝子組換え技術を使用した場合には遺伝子組換えの規制を適用すると明言している。

日本は、培養肉に特化した安全性評価の具体的な内容は今回の調査では見い出せなかった。

以上のように、本調査の時点において、細胞培養食品が上市され、安全性評価に必要な情報が示されたのはシンガポールのみであった。これらの情報は随時更新されていくことから、引き続き動向を注視していく必要がある。

C-3: 想定され得る潜在的なハザードの抽出:

本調査において収集したシンガポール食品庁

⁹ Singapore Food Agency (2021) “A growing culture of safe, sustainable meat”, Published 04 Jan 2021, Updated 22 Jan 2021. <https://www.sfa.gov.sg/food-for-thought/article/detail/a-growing-culture-of-safe-sustainable-meat> (アクセス日: 2023年5月16日)

¹⁰ Formal Agreement Between FDA and USDA Regarding Oversight of Human Food Produced Using Animal Cell Technology Derived from Cell Lines of USDA-amenable Species <https://www.fda.gov/food/domestic-interagency-agreements-food/formal-agreement-between-fda-and-usda-regarding-oversight-human-food-produced-using-animal-cell> (アクセス日: 2023年5月16日)

¹¹ FDA Completes First Pre-Market Consultation for Human Food Made Using Animal Cell Culture Technology <https://www.fda.gov/food/cfsan-constituent-updates/fda-completes-first-pre-market-consultation-human-food-made-using-animal-cell-culture-technology> (アクセス日: 2023年5月16日)

¹² Foods Program Guidance Under Development. “Pre-market Consultation on Cultured Animal Cell Foods: Draft Guidance for Industry” <https://www.fda.gov/food/guidance-documents-regulatory-information-topic-food-and-dietary-supplements/foods-program-guidance-under-development> (アクセス日: 2023年5月16日)

¹³ Food Standards Australia New Zealand, “Cell Based Meat” <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/generalissues/Pages/Cell-based-meat.aspx> (アクセス日: 2023年5月16日)

¹⁴ European Food Safety Authority (2018) “Administrative guidance on the submission of applications for authorisation of a novel food pursuant to Article 10 of Regulation (EU) 2015/2283”, EFSA supporting publication 2018:EN-1381, Published: 15 February 2018, Approved: 7 February 2018, doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1381 <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1381> (アクセス日: 2023年5月16日)

によるNovel Foodsの安全性評価要件について、細胞培養食品の生産・製造において想定されている主な潜在的なハザードを抽出し、表4にまとめた。シンガポールの当該文書を引用することにした理由は、本調査における検討により抽出した潜在的なハザードと同じものが想定されていたからである。本調査において最初に掲げた、細胞培養食品の安全性確保において確認が必要な観点を項目とした表1と合わせて検討した結果、本研究班が特に注目すべき潜在的なハザードは、生物個体より採取した初代培養細胞よりも大きな性質の変化が生じている可能性のある、株化細胞を用いた場合の、人工消化液等で分解されない異常型プリオンのような変異タンパク質やアレルゲン、甲状腺ホルモン、ヒスタミンのような低分子の生理活性物質の産生の可能性であると考えられる。甲状腺ホルモンに関連する例として、ハンバーガーの中に牛の甲状腺が混入したために起こった甲状腺中毒症が知られている^{15, 16, 17}。ヒスタミンに関しては、ヒスタミンが高濃度に蓄積された食品、特に魚類及びその加工品を食べることにより発症する、アレルギー様の食中毒が知られており、ヒスタミンは熱に安定であり、また調理加工工程で除去できない¹⁸。これらのような、加熱や消化液にも安定で、有害作用のある物質が重要なハザードと考えられる。

また、細胞培養食品のハザードの同定と安全性の確認を行うためには、製品ごとに、製造方法を明らかにすること、培養に用いたすべてのものについての品質および特性を確認することが前提と考える。

「細胞採取や培養の方法」「起原細胞の種類」「培養液中の成分や使用される物質」「遺伝子改

変の有無」「最終製品の分析結果」等、現時点では不足している情報も存在するため来年度以降も引き続き検討を行うこととする。

C-4: 補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ:

マウスの正常型プリオンパク質をコードする遺伝子の上流1000bpのプロモーター領域を組み込んだレポーター遺伝子発現ベクターを作製した。現在、マウス由来の筋細胞(C2C12)や神経細胞株(Neuro2A)を用い予備検討を行っている。

D. 結論

令和4年度(今年度)は予定通り、細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査を、1)開発動向、ならびに2)安全性や衛生規制の動向を中心に実施した。その結果、開発動向として、シンガポール政府による世界初の承認事例となった培養チキンナゲットを含む12件(2022年8月時点)の開発事例の情報を収集し、安全性の観点で予め用意した細胞培養食品の種類に関する分類表に基づいて整理した。出発材料の種類(初代培養細胞と株化細胞の区別)がそもそも不明なものが多いことが明らかとなった。血清や抗菌剤等なるべく人為的なものを使用しない方向で開発が進められている傾向がみてとれた。細胞の大量培養の実現に向けてHippo-YAPシグナル伝達経路が注目されていることも見出した。また、規制動向に関しては、シンガポールをはじめ、EU、オーストラリア・ニュージーランドでは、Novel Foodの枠組みの中で細胞培養食品を取り扱っていることを見出し、シンガポールの安全性評価の要件やEUの申請項目に関する概要の情報を収集

¹⁵ Parmar MS, Sturge C. Recurrent hamburger thyrotoxicosis. CMAJ. 2003 Sep2;169(5):415-7. <https://www.cmaj.ca/content/cmaj/169/5/415.full.pdf> (アクセス日: 2023年5月16日)

¹⁶ Hedberg CW, Fishbein DB, Janssen RS, Meyers B, McMillen JM, MacDonald KL, White KE, Huss LJ, Hurwitz ES, Farhie JR, et al. An outbreak of thyrotoxicosis caused by the consumption of bovine thyroid gland in ground beef. N Engl J Med. 1987 Apr 16;316(16):993-8. doi: 10.1056/NEJM198704163161605.

¹⁷ Kinney JS, Hurwitz ES, Fishbein DB, Woolf PD, Pinsky PF, Lawrence DN, Anderson LJ, Holmes GP, Wilson CK, Loschen DJ, et al. Community outbreak of thyrotoxicosis: epidemiology, immunogenetic characteristics, and long-term outcome. Am J Med. 1988 Jan;84(1):10-8. doi: 10.1016/0002-9343(88)90002-2.

¹⁸ ヒスタミンによる食中毒について (厚生労働省 HP) <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000130677.html>

した。さらに、本調査における検討をもとに、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザードの抽出を行った。なお補完的な検討として、レポーター遺伝子アッセイにより、正常型プリオン蛋白質の筋細胞での遺伝子発現制御につき検討中であるが、この制御が明らかとなれば、ハザード要因として懸念されるプリオンの発現に対する方策に役立つものと考えらる。

令和5年度(来年度)は計画に則り、新たなリスク管理方法の動向を中心とした調査を実施、検討する予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表(抜粋)

Kanno S, Okubo Y, Kageyama T, Yan L, Kitajima S, Fukuda J: Establishment of a Developmental Toxicity Assay based on Human iPSC Reporter to Detect Fibroblast Growth Factor Signal Disruption. *iScience*. 2022, 25, 103770.

doi:10.1016/j.isci.2022.103770

相崎健一, 小野竜一, 菅野純, 北嶋聡: Percellome プロジェクト～トランスクリプトミクスとエピジェネティクスによる毒性分子機序の探求～, *日本薬理学雑誌*, 2022; 157: 200-206. doi.org/10.1254/fpj.21122

2. 学会発表(抜粋)

北嶋聡: 創薬研究における薬理-病理連携の必要性: 毒性学の立場から-食品トキシコゲノミクスと薬理学-, 第96回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: Percellome プロジェクト～トランスクリプトミクスとエピジェネティクス、インフォマティクスによる毒性分子機序の探求～、第96回日本薬理学会年会、(2022.12.2)、横浜

小野竜一、田塾慶子、安田智、佐藤陽治、内田恵理子、平林容子、北嶋聡: ゲノム編集技術を利用した際の、オンターゲット部位における非意図配列の挿入と、その検出方法の確立 日本食品衛生学会第118回学術講演会 2022.11.11 長崎(口頭発表)

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima: Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. The XVITH International Congress of Toxicology (ICT2022), (2022.9.19), Maastricht, The Netherlands Oral.

五十嵐智女, 松村万里, 小川いづみ, 矢川千織, 早川孝彦, 越智美代子, 齊藤洋克, 栗形麻樹子, 北嶋聡: 「新規の食品」の安全性を確保するための諸外国の制度比較

第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)

五十嵐智女, 藤井咲子, 釣本真理子, 高橋祐次, 北嶋聡, 栗形麻樹子: ビスフェノール類似体 4,4'-(1,3-dimethylbutylidene)diphenol の卵巣摘出マウスにおける皮下および経口投与による子宮肥大試験

第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

菅野純, 相崎健一, 小野竜一, 北嶋聡: 新型反復曝露トランスクリプトミクスから見た発癌エピジェネティクスの考察

第49回日本毒性学会学術年会(2022.6.30)

菅野純, 相崎健一, 小野竜一, 北嶋聡: Percellome project からみた毒性AIの展望

第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

大久保佑亮, 菅野聖世, 北嶋聡, 平林容子, 福田淳二: ヒトiPS細胞を用いたシグナル伝達かく乱作用のダイナミクスに基づく高精度かつ網羅的ヒト発生毒性試験法の開発

第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.1)

小野竜一, 山本雄介, 成瀬美衣, 田邊思帆里, 吉岡祐亮, 相崎健一, 広瀬明彦, 落谷孝広, 平林容子, 北嶋聡: cfDNAによる毒性評価

第49回日本毒性学会学術年会(2022.7.2)

G. 知的財産所有権の出願・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

細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査に際しての基本的な考え方

「細胞培養食品」とは、バイオプシー(生体組織採取)サンプルから直接あるいは分化させて大量に細胞を増殖させたもの、又は株化された細胞を大量に増殖させたものを指す

「細胞培養」という言葉だけでは具体的に指しているものが曖昧
このため、学術的観点で便宜的な分類表を予め用意

細胞培養食品(いわゆる培養肉)の分類表

出発材料の種類	由来する生物種*	遺伝子組換えの有無	分化過程の有無	培地中の未知因子の有無(血清等)	培地中の抗菌剤の種類	選択培地の使用の有無	加熱(調理)処理の有無	抽出物としての使用の有無	細胞の足場の種類	培養装置の種類
生物個体由来(動・植物、菌類等)										
細胞株由来(ES細胞、iPS細胞等、各種幹細胞を含む)										

*ヒト、飼料安全法下の家畜・家禽・水産動物・ミツバチ、及び、これら以外の動植物(含む、昆虫)
飼料安全法に含まれるものは、牛、馬、豚、めん羊、山羊及びびし、鶏及びうずら、みつばち、ぶり、まだい、ぎんざげなど、計32種

2つの基軸(縦軸): 初代培養系なのか、細胞株培養系なのか

エピジェネティクスと各種細胞の混合物か否か、という観点から2つに大別

	初代培養系 生物個体由来	vs	細胞株培養系 細胞株由来 (ES細胞、iPS細胞等の各種幹細胞を含む)
エピジェネティクスの影響	比較的小さいと考えられる		ゲノムに変異が入っている可能性が高いだけでなく、エピジェネティクスの影響が、こちらの方がはるかに大きいと考えられるため、この影響の評価を考慮する必要がある
各種細胞の混合物か否か	混合物であることが多いため、混合物としての取り扱いをせざるを得ないと考えられる		単一の細胞株である可能性が高い
アナロジー(私見) 閉鎖系である前提	発酵食品		細胞医薬品

横軸: 食品衛生上、考慮しなければならない要因

- 由来する生物種
- 遺伝子組換えの有無
- 分化過程の有無
- 培地中の未知因子の有無(血清等)
- 培地中の抗菌剤の種類
- 選択培地の使用の有無
- 加熱(調理)処理の有無
- 抽出物としての使用の有無
- 細胞の足場の種類
- 培養装置の種類

細胞培養食品特有のハザードとの関連が想定される項目

このうち、「由来する生物種」については、飼料安全法を考慮した細目を用意
ヒト細胞を使用する場合には、いわゆる生命倫理の問題が生じる

分類表を用意しておくことにより、網羅性をもって、横断的に、懸念点が考察できる
→たとえ、関連する開発製品が急速に増加しても対応が可能

図1 細胞培養食品の食品衛生上のハザードやリスクに係る調査に際しての基本的な考え方に基づく分類表の設定

表1 研究代表者が提案する細胞培養食品（いわゆる培養肉）の分類表

出発材料の種類	由来する生物	遺伝子組換えの有無	分化過程の有無	培地中の未知因子の有無（血清等）	培地中の抗菌剤の種類	選択培地*の使用の有無	加熱（調理）処理の有無	抽出物としての使用の有無	細胞の足場の種類	培養装置の種類
生物個体由来（動・植物、菌類等）										
細胞株由来（ES細胞、iPS細胞等、各種幹細胞を含む）										

*ヒト、飼料安全法下の家畜・家禽・水産動物・ミツバチ、及び、これら以外の動植物（含む、昆虫）

飼料安全法に含まれるものは、牛、馬、豚、めん羊、山羊及びひか、鶏及びうずら、みつばち、ぶり、まだい、ぎんざけなど、計32種

表2 国内外における細胞培養食品の開発状況とその種類（調査時点[2022年8月]）

通番	開発企業 開発品 *1	開発状況*2	出発材料の種 類*3 (初代培養細胞と株化細胞 の区別)	由来する 生物種*4	遺伝子組換 えの有無	分化過程 の有無	培養培地中 の未知因子 の有無(血清 など)	培地中の抗 菌剤の種類	選択培地 の使用の 有無	加熱(調 理)処理の 有無	抽出物として の使用の有無	細胞の足場 の種類	培養装置の種類
1	Eat Just (米国) チキンナゲット等	2020年シンガポールで細胞培養食品の販売が承認	脂肪、筋肉、その他の組織細胞に由来する不死化させた細胞株(株化細胞)	鶏	無	不明	不明(鶏や牛が必要とするのと同じ栄養素)	使用せず	不明(ニワトリの線維芽細胞培養用に開発された培地)	不明(成形時に温度差を利用)	無	天然素材の足場で成長させる 又は3Dプリンターで成形	バイオリクターまたは「cultivator」(ビール発酵タンクに似た装置) 生産設備を複数建設(米国では10基の25万Lのバイオリクター導入予定)
2	東大竹内昌治教授と日清食品(日本) 培養ステーキ肉	2019年に世界初のサイコロステーキ状組織の作製に成功、2022年3月に試食実験を実施、2025年3月までに組織の作製を目指す。	筋芽細胞(区別不明)	牛	不明	有(筋芽細胞を細胞融合させ筋線維に分化)	不明(独自に開発した「食用血清」(特許出願中))	不明	不明	不明	不明(食用色素の使用)	独自に開発した「食用血漿ゲル」(特許出願中)	不明 商業化の準備として、パイロット設備を2022年夏までに完全稼働予定
3	インテグリティカルチャー株式会社(日本) ニワトリ・カモ・アヒル 肝臓由来細胞培養食品	2022年に無血清基礎培地を用いて、ニワトリおよびカモ肝臓由来細胞培養に世界で初めて成功。2022年12月には、月産8キロ、100グラムあたり約3万円で生産が可能となる見込	肝臓由来細胞(初代培養細胞)	鶏 カモ アヒル	不明	不明	不明(無血清基礎培地で培養に成功)	使用せず	不明	不明	不明(フィーダー槽の上清成分を加えている)	不明	独自の連結式の培養槽 CulNet® system 2026年に2000Lの、2028年に8000Lの培養槽導入予定
4	ダイバースファーム株式会社(日本) 培養鶏肉 培養フォアグラ	2025年の大阪万博における汎用品販売を目指す	生物個体(初代培養細胞)	鶏	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	網目状の鑄型	ネットモールド法 2022年にラボ、パイロットプラントの建設予定

*1 開発者の情報(国、地域、企業、大学、プロジェクト名)や、開発品の名称など。

*2 研究段階なのか、製品化に向けた開発段階にあるのか、上市予定があるのかなどの情報を含む。

*3 生物個体より採取した生体組織の初代培養細胞なのか、株化細胞なのかを区別する。生体組織の種類(筋肉、肝臓など)、細胞株の種類に関する情報も含む。

*4 由来する動植物菌類などの生物種。飼料安全法下の家畜・家禽・水産動物・ミツバチ、または、これら以外の動植物(含む、昆虫)の区別に関しては不明。

通番	開発企業 開発品 *1	開発状況*2	出発材料の種 類*3 (初代培養細胞と株化細胞の 区別)	由来する 生物種*4	遺伝子組換 えの有無	分化過程 の有無	培養培地中 の未知因子 の有無(血清 など)	培地中の抗 菌剤の種類	選択培地 の使用の 有無	加熱(調理)処理の 有無	抽出物として の使用の有無	細胞の足場 の種類	培養装置の種類
5	Upside Foods(旧 Memphis Meats) (米国) 培養鶏、牛、鴨 、魚介類	規制当局の確認を 得られ次第、アメリ カで製品を販売	生物個体(初 代培養細胞)、 細胞株又は 不死化した細胞 (株化細胞)	鶏 牛 鴨 魚介類	有 細胞株の増 殖又は分化 を制御し、遺 伝子工学を用いて不死 化	不明	不明 (動物性成分 フリー培地 (FBS 不含))	不明	不明	不明	不明	不明	より安価な最終製品の ための効率的な大規 模細胞培養プロセス技 術 2021 年生産施設を開 設、2022 年には商業 施設建設を発表
6	Finless Foods (米国) 培養クロマグロ	マグロ細胞由来の 細胞培養マグロ肉 製品を開発中	生物個体(初 代培養細胞)	クロマグ ロ	不明	不明	不明	不明	不明	不明	不明	細胞が 3D 構造を形成 するために 足場を設置	バイオリアクター 2022 年パイロット施設 の建設完了予定
7	BlueNalu (米国) 培養シーフード(特に 乱獲、輸入又は養殖 が困難な種)の開発	2021 年にはパイ ロット施設を開設、 市場テストを開始	不明	魚介類	無	不明	不明 (FBS 不含)	不明	不明	不明	不明	不明	不明 2021 年パイロット生産 施設を開設
8	Mosa Meat (オランダ) 培養牛肉	今後数年間で、細胞 培養食品の販売 に関する規制当局 の承認を取得	筋衛星細胞 (幹細胞)(区 別不明)	牛	無	有 (筋線維に 分化)	不明 (FBS 不含)	不明	不明	不明	不明	99%水で構成 されたゲル 内に留置	不明 2021 年 7 月パイロット 生産施設の拡大を 発表
9	Cubiq Foods (スペイン) 培養油脂	2023 年初頭までに 米国市場で販売予 定	不明	アヒル	不明	不明	不明 (FBS 不含)	不明	不明	不明	不明	不明	不明
10	Aleph Farms (イスラエル) 培養牛肉 培養コラーゲン	ステーキ肉は 2022 年末までに提供予 定	スターターは 生物個体、 細胞株として 貯蔵(株化細胞)	牛	無	有	不明 (動物由来成 分、FBS 不 含)	不明	不明	不明	不明	植物ベース の足場 3D バイオブ リンター	Cultivator パイロット設備を 2022 年夏までに完全稼働 予定(2022 年 2 月時 点)

*1 開発者の情報(国、地域、企業、大学、プロジェクト名)や、開発品の名称など。

*2 研究段階なのか、製品化に向けた開発段階にあるのか、上市予定があるのかなどの情報を含む。

*3 生物個体より採取した生体組織の初代培養細胞なのか、株化細胞なのかを区別する。生体組織の種類(筋肉、肝臓など)、細胞株の種類に関する情報も含む。

*4 由来する動植物菌類などの生物種。飼料安全法下の家畜・家禽・水産動物・ミツバチ、または、これら以外の動植物(含む、昆虫)の区別に関しては不明。

通番	開発企業 開発品 *1	開発状況*2	出発材料の種類*3 (初代培養細胞と株化細胞の区別)	由来する生物種*4	遺伝子組換えの有無	分化過程の有無	培養培地中の未知因子の有無(血清など)	培地中の抗菌剤の種類	選択培地の使用の有無	加熱(調理)処理の有無	抽出物としての使用の有無	細胞の足場の種類	培養装置の種類
11	Future Meat Technologies (イスラエル) 培養鶏、子羊、牛、豚	培養牛肉の生産はまもなく予定	線維芽細胞(区別不明)	牛 鶏 子羊 豚	無	不明	不明(FBS 不含)	使用せず	不明	不明	不明	不明	ステンレス鋼の cultivator 2021年6月イスラエルに産業用細胞培養食品生産施設を開設。米国にも大規模生産施設を着工予定。
12	Shiok Meats (シンガポール) 培養甲殻類等	2023年の商品化を予定	筋細胞、脂肪細胞(区別不明)	甲殻類	無	不明	不明(FBS 不含)	不明	不明	不明	不明	不明	ステンレス製バイオリクター 2021年には製品開発の小型工場をシンガポールに開設、最大500Lのバイオリクターを投入

*1 開発者の情報(国、地域、企業、大学、プロジェクト名)や、開発品の名称など。

*2 研究段階なのか、製品化に向けた開発段階にあるのか、上市予定があるのかなどの情報を含む。

*3 生物個体より採取した生体組織の初代培養細胞なのか、株化細胞なのかを区別する。生体組織の種類(筋肉、肝臓など)、細胞株の種類に関する情報も含む。

*4 由来する動植物菌類などの生物種。飼料安全法下の家畜・家禽・水産動物・ミツバチ、または、これら以外の動植物(含む、昆虫)の区別に関しては不明。

表3 海外における細胞培養食品の安全性確保及び衛生規制の動向

項目	シンガポール*1	米国*2	欧州*3	オーストラリア及びニュージーランド*4
審査の実施主体	SFA	USDA-FSIS と FDA	EFSA	FSANZ
規制区分	Novel Food	不明	Novel Food	Novel Food
細胞培養食品固有の安全性審査項目	Novel Food 全般の安全性評価要件に加えて、以下の情報が必要である。 ①培養肉製品の特徴(栄養組成、抗菌剤・成長促進剤・調節因子の残留レベル) ②培養肉製造に使用された原材料および全ての投入物の特性・純度・安全性(細胞株や幹細胞およびその誘導に使用した化学物質、培地、成長促進剤、調節因子、抗菌剤、足場材、溶媒、酵素、加工助剤を含む) ③製造工程の説明には、細胞株の選択、細胞適応、細胞増殖、足場、抽出、濃縮、洗浄を通して培地や細胞株が感染性因子(例:ウイルス、細菌、真菌、プリオン)を含まないことを確保するために行われた無菌処理の工程も含める。 ④細胞株の詳細情報(背景情報、識別情報、由来、選択、スクリーニング方法、樹立、保管、感染性因子を含まないことを示す生物学的試験等、生検の適合性・動物疾患がないこと) ⑤培地の詳細情報(添加した抗菌剤等のすべての物質と意図しない代謝物を含む培地の組成等、リスクアセスメントまたは非食品グレードの全成分・意図しない代謝物の残留レベルのテスト、抗生剤の耐性情報、製造中に培地成分として用いられた生物学的物質の安全性評価) ⑥ゲノム不安定性と遺伝的浮動により、最終製品に食品安全上のハザードをもたらすレベルの望ましくない物質が生成されないことを合理的に証明する情報(細胞培養の動物種と関連する既知の物質の系統的文献レビューに加えて、毒素やアレルゲンの in silico ゲノム検査またはトランスクリプトミクス・プロテオミクス・メタボロミクスの手法によるスターター細胞に対する最終細胞製品の定量的比較の組合せによる標的分析の対象とする物質のリスト作成) ⑦細胞製品の再現性と一貫性を確保するために、適正細胞培養規範(GCCP)が適用されていることを証明する情報(遺伝的安定性の評価(例:核型分析)、最終細胞製品の分裂速度や組成の変動のモニタリング)、 ⑧使用する細胞株の性質によって発生するリスクが高い食品安全上のハザードに関する安全性評価とリスク低減措置(例:毒素を含むリスクの高い貝類の細胞株を利用する場合は、ゲノム、トランスクリプトーム、またはプロテオーム解析、実施可能なリスク低減措置など)	不明 業界向けガイダンス作成中: FDA が 2023.12月に Food Program Guidance Documents として「Premarket Consultation on Cultured Animal Cell Foods: Draft Guidance for Industry」を公表予定	Novel Food 全般に関するものに加えて、以下の7項目がある ①元となる動物の国際命名法に従った名称(科、属、種などの分類学的情報) ②植物、藻類、菌類に関しては、国際的に認知されたデータベースと方法論に基づく同一性の検証 ③材料として使用した臓器及び、組織又は生物の部分 ④材料を手に入れた研究所又は培養株 ⑤セルの ID 情報 ⑥使用する細胞又は組織培養のための材料 ⑦細胞株のタイプ	現時点では特に無いが、下記が基準に含まれる可能性がある。 ①加工助剤 ②食品添加物 ③遺伝子技術の利用 ④ビタミンとミネラル ⑤食品の本質を示すラベル ⑥培養肉の定義 ⑦食品の安全要件
遺伝子組換えの扱い	遺伝子組換え生物/微生物を使用する場合は、遺伝子組換え生物の安全性評価項目を適用	不明	GMO の規制(Regulation (EC) No 1829/2003)を適用	不明
審査情報の公開	現状では非公開	不明	原則公開、申請者の利益を損なう場合は非公開	不明
公表された申請、評価、承認の事例	① 2020年12月: Eat Just 社の培養チキンナゲット(鶏)の販売を承認 ② 2021年12月: Eat Just 社の培養チキンの胸肉(鶏)の販売を承認	2022年11月: Upside Foods 社の鶏培養肉の市販前コンサルテーション終了、FDA は安全性に関する質問はこれ以上ないことを表明[承認・認証ではない]	無	2023年2月: Vow 社のウズラ培養肉の承認申請を FSANZ が受理・評価開始

*1 Requirements for the Safety Assessment of Novel Foods and Novel Food Ingredients, Singapore Food Agency. Version dated 26 Sep 2022. https://www.sfa.gov.sg/docs/default-source/food-import-and-export/Requirements-on-safety-assessment-of-novel-foods_26Sep.pdf *2 Foods Program Guidance Under Development. “Premarket Consultation on Cultured Animal Cell Foods: Draft Guidance for Industry” <https://www.fda.gov/food/guidance-documents-regulatory-information-topic-food-and-dietary-supplements/foods-program-guidance-under-development> *3 European Food Safety Authority (2018) “Administrative guidance on the submission of applications for authorisation of a novel food pursuant to Article 10 of Regulation (EU) 2015/2283”, EFSA supporting publication 2018:EN-1381, Published: 15 February 2018, Approved: 7 February 2018, doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1381 <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1381> *4 Food Standards Australia New Zealand, “Cell Based Meat” <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/generalissues/Pages/Cell-based-meat.aspx> (Access: 2023.5.16.)

表4 細胞培養食品の生産・製造に関して想定されている主な潜在的なハザード*

対象	潜在的なハザードとして想定されているもの
遺伝子改変	毒素産生、病原性関連遺伝子の挿入、抗生物質耐性
原材料（一般事項）	不純物、汚染 製造に用いられるすべての原材料（input）および可能性のあるすべての代謝物（意図的か非意図的かを問わず）の有害性
細胞株	細胞株または幹細胞の誘導に使用される化学物質
	感染性因子（ウイルス、細菌、真菌、プリオンなど）
	細胞株に加えられた改変（modifications）・適応（adaptions）による、食品安全上のリスクをもたらす可能性のある物質の発現
	生検（食用動物から採取する場合）に用いた動物の疾病
培地	非食品グレードの成分及び潜在的な意図しない代謝物の残留
	培地成分として使用される生物学的物質（biological substances）
	抗菌剤耐性への寄与
製造工程	感染性因子（ウイルス、細菌、真菌、プリオンなど）による培地や細胞株の汚染
最終細胞製品	栄養組成の偏り
	残留する抗菌剤、成長促進剤及び／又は調整因子
	ゲノムの不安定性と遺伝的浮動による、食品安全上のハザードをもたらすレベルの望ましくない物質の生成 <ul style="list-style-type: none"> ・動物種に関連する既知の望ましくない物質 ・潜在的な毒素/アレルゲン ・スターター細胞と最終細胞製品との定量的比較において食品安全上懸念される発現量の異なる望ましくない物質

* 本表では、下記のシンガポール食品庁の安全性評価要件において想定されている潜在的なハザードを抽出した。当該文書を引用することにした理由は、本調査における検討により抽出したハザードと同じものが想定されていたからである。Requirements for the Safety Assessment of Novel Foods and Novel Food Ingredients, Singapore Food Agency. Version dated 26 Sep 2022. https://www.sfa.gov.sg/docs/default-source/food-import-and-export/Requirements-on-safety-assessment-of-novel-foods_26Sep.pdf

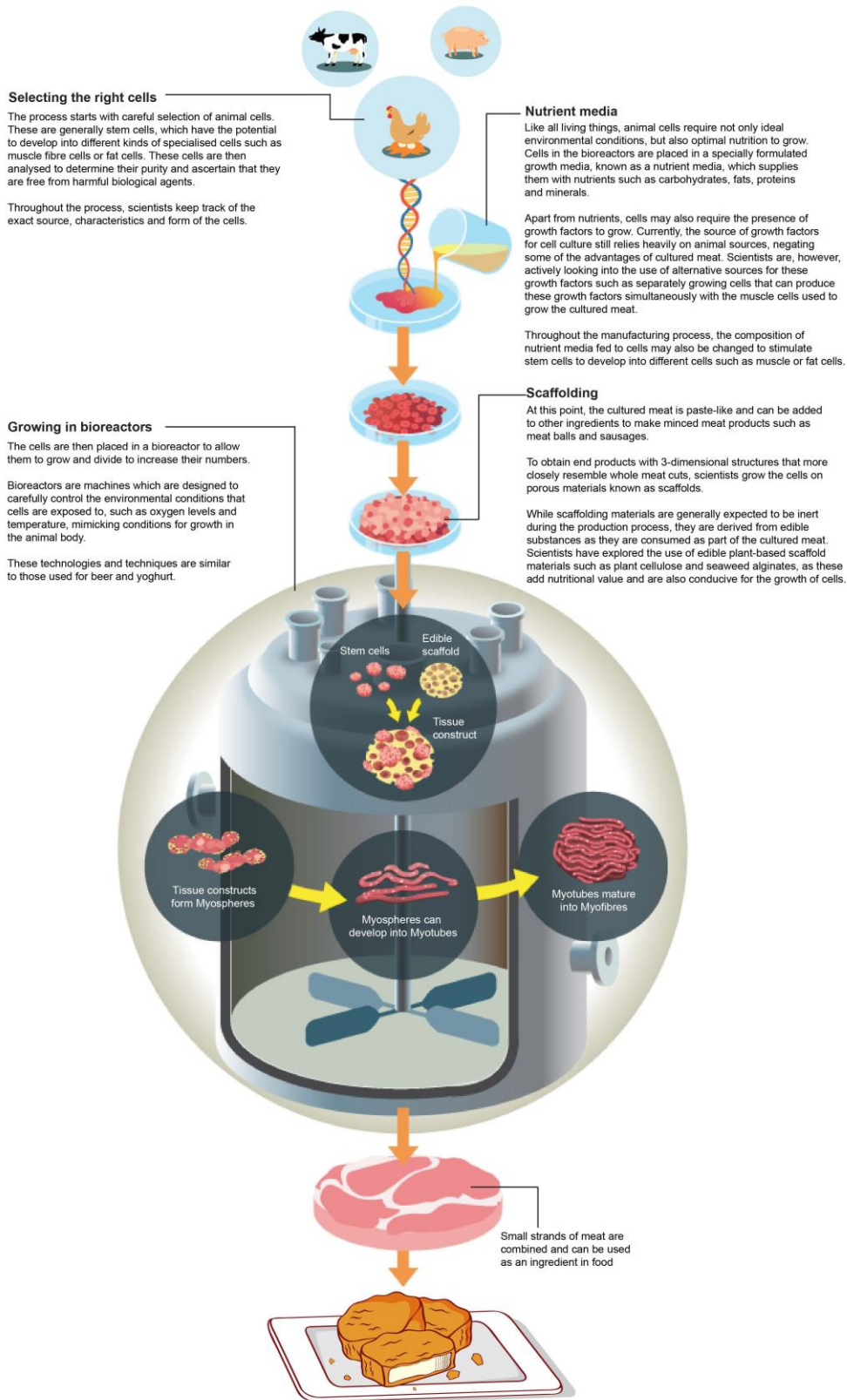


図2 シンガポール食品庁の刊行物におけるバイオリアクターを用いた細胞培養食品の作り方
Image credit: Firn/Shutterstock.com

出典 : A growing culture of safe, sustainable meat, By Singapore Food Agency, Published 04 Jan 2021, Updated 22 Jan 2021. <https://www.sfa.gov.sg/food-for-thought/article/detail/a-growing-culture-of-safe-sustainable-meat>

分担研究報告書

分担研究課題 「モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析」

研究分担者 仁科 博史 東京医科歯科大学 難治疾患研究所
未来生命科学研究部門 発生再生生物学分野

研究要旨

本分担研究では、これまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品を安全の視点から研究する。特に遺伝子変異やエピジェネティクス変化による解析等を検討し、細胞の分化増殖過程におけるハザード解析を検討する。

初期胚発生に観察される原始線条 (PrS) は中胚葉を生成し、その後の中胚葉以外の内胚葉や外胚葉由来のほぼすべての器官形成にも影響を及ぼす。それゆえ、PrS 形成の理解は正常器官形成の理解に重要である。しかしながら、PrS は微小で一過性の組織であるため、その形成機構の解明は困難である。研究分担者らは、先ず PrS 形成に必須な遺伝子を同定する目的に、PrS の形成不全が致死的事であることに基づき、2 種類のノックアウトマウスデータベースを用いて包括的なスクリーニングを実施した。その結果、PrS 形成に必須な様々な細胞機能や反応に関わる 812 遺伝子を同定し、最も多いカテゴリは「代謝」であることを見出した。本研究では、スフィンゴ脂質代謝の遺伝子に着目し、*in vitro* のマウス ES 細胞分化系を用いて PrS 形成におけるその役割を検討した。その結果、細胞内セラミドの上昇が PrS 形成に必須な遺伝子発現をネガティブに制御し、代わりに神経細胞分化を誘導することを明らかにした。また、スフィンゴシン-1-リン酸 (セラミド誘導体) は、神経細胞の成熟をポジティブに制御することを明らかにした。これらの結果は、セラミド代謝が PrS の形成と神経細胞分化の誘導の両方を制御していることを示す。以上のように、細胞分化に影響を与える因子の一つとして、セラミド代謝を新たに同定した。

A. 研究目的

初期胚発生において、個々の細胞は様々なシグナルを受け取り、互いに影響し合いながら複雑な事象を引き起こしている。これらの事象に関わる制御機構を解明することは、発生生物学のみならず、再生医療などの関連分野の進歩につながると考えられる。脊椎動物の初期胚では、すべての器官は外胚葉、中胚葉、内胚葉という3つの胚葉から形成される。中胚葉と内胚葉はともに中胚葉から発生し、上胚葉に原始線条 (PrS) と呼ばれる細胞溝を形成させる必要がある。しかし、PrS は微細かつ一過性の組織であるため、その形成の分子機構を完全に解明することは困難である。

胚性幹 (ES) 細胞の分化系は、エピブラストからの基本的な発生を駆動するプロセスを研究するための強力な *in vitro* ツールである。ES 細胞を懸濁培養すると、胚様体 (EB) と呼ばれる多細胞の集合体を形成し、生体内のエピブラストと同様の性質を持つ。マウスおよびヒトでは、EB を *in vitro* で3つの胚葉に分化させることができる。この方法は、マウス ES 細胞を心筋細胞、神経細胞、肝細胞など様々な細胞種に分化させるために頻繁に使用されており、その基礎的なメカニズムを解析することが可能である。最近では、マウス ES 細胞からの卵形成の全過程を *in vitro* で再現し、この *in vitro* で作製した卵から出産に成功した。また、ヒトにおいても、胚盤胞の形態、大きさ、細胞数、細胞系列構成の点で類似した構造物がヒト ES 細胞から *in vitro* で作成されている。

研究分担者らは、以前、ターゲットが既知の1,600種類化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、PrS 形成に必須ないくつかの因子を同定した。我々の実験系では、マウス ES 細胞は EB 形成後、エピブラスト様状態に移行する。その後、3日目から4日目にかけて Brachyury T や Wnt3 などの PrS マーカーを発現させ、PrS 形成を模倣する。EB 形成後10日目には、Bmp2 などの中胚葉マーカーの発現を伴い、細胞の拍動 (心筋細胞への分化) が観察される。我々は、この EB ベースのシステムを用いて、様々な代謝阻害剤が PrS

形成を阻害することを示し、PrS 形成に重要な因子の同定にケミカルスクリーニングが有用であることを実証した。興味深いことに、いずれの場合も PrS 形成を阻害すると、エピブラストが神経外胚葉系にコミットし、中胚葉からの心筋細胞分化が低下することが確認された。これらの結果は、PrS の形成が神経分化に影響を与えることを示唆するものであり、遺伝子変異やエピジェネティクス変化による細胞分化増殖過程に影響を与える因子の同定の着想となった。

標的がわかっている化合物のライブラリーをスクリーニングすると、関連する遺伝子をすぐに特定できるという利点があるが、酵素や受容体の中にはライブラリー中の薬剤と対応しないものがあり、その検証ができないという欠点がある。この難点を回避するために、PrS 形成に必須な Brachyury T や HMGR などの遺伝子の機能を欠損させたノックアウト (KO) マウスが、心臓などの臓器の発達不全により E10 までに致死することを利用した。この致死的な表現型を利用することで、より幅広い遺伝子を調べ、PrS 形成のメカニズムのより完全な姿を明らかにすることを目指した。そこで、2つの KO マウスデータベースを用いて、機能喪失によってマウス胚の E10 致死を引き起こす遺伝子を同定すること、そして、*in vitro* のマウス ES 細胞分化システムを用いて、PrS 形成に関与する新規因子の同定することを研究目的とした。

B. 研究方法

データベーススクリーニング

候補遺伝子は、本文に記載したように MGI データベース (Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/>) および IMPC データベース (International Mouse Phenotyping Consortium) 33,34 をスクリーニングすることにより選定した。本研究で使用したデータは、2021年5月時点のものである。MGI データベースにおいて、表現型用語「embryonic lethality between implantation and placentation」(ID: MP:0009850) は、E4.5~E9

の間に胚死が起こったことを意味し、この基準で候補遺伝子を選択した。また、E14以前に胚死滅したことを意味する “embryonic lethality, complete penetrance” は補助的な基準として使用した。IMPCデータベースでは、K0マウス系統のアノテーションを行い、その致死表現型を報告している。K0マウスがE9以前に死亡する遺伝子を本研究の候補として選択した。ネットワーク解析には、NetworkAnalysist 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca>)を使用した。

ES細胞の培養と分化

マウスES (mES) 細胞は、先に述べたようにLIFの存在下で培養することにより未分化状態に維持した。簡単に説明すると、フィーダー細胞非依存性のE14K mES細胞は、15%ウシ仔牛血清 (SFBM30-2362; Equitech-bio, Texas, USA) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (26400044; Gibco, Massachusetts, USA) および 0.1 mM 2-mercaptoethanol (M3148; Sigma, Burlington, USA)、LIFを入れたゼラチンコート皿で保持した。LIFは、当研究所で以下のように自家生産した。簡単に説明すると、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 細胞に、LIF-ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を発現するベクターをトランスフェクションさせた。ベクターの増幅を誘導するために、メトトレキサート (MTX) (M8407; Sigma, Burlington, USA) を0.1 μ M でトランスフェクトしたCHO細胞に添加した。MTX処理を1週間行った後、CHO-LIF細胞をMTXフリー培地に移し、LIF産生を行った。24時間後、LIF含有培養上清を回収し、E14K mES細胞で試験し、多能性維持能力およびmES細胞の心筋細胞またはニューロンへの分化効率を確認した。

mES細胞 (3×10^3) をLIFを含まない培地で25 μ lの吊り下げ滴下で培養し、角皿 (栄研化学、東京、日本) 内でEBsを形成させた。2日後、EBをノンコート細菌シャーレ (IWAKI、東京、日本) に移し、懸濁培養を行った。6日目に、EBをゼラチンコーティングされた組織培養皿 (Corning, New York, USA) に移して、自発的な「心拍」を

示す組織の領域が顕微鏡で検出できるようになる10日目まで付着培養を行った。EBは、特に断りのない限り、培養の3~6日目に阻害剤で処理した。

メタボローム解析

メタボローム解析は、株式会社ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT、山形県) に委託した。LC-TOF-MS分析前に酵素を不活性化するため、EBを10 mlの5%マンニトール溶液で洗浄し、内部標準物質を含む1 mlのエタノールで処理した。サンプルを氷上で5分間ウルトラソニケーションによりホモジナイズし、その後4, 400 \times g、4°Cで5分間遠心分離を行った。上清を乾燥させ、200 μ lの50%2-プロパノールに溶解させた。LC-TOF-MSは、Agilent 1200 シリーズ RRLC システム SL を用いて実施された。化合物は、正および負のイオン極性モードの両方で分析された。検出されたピークは、Master Hands ver. 2.17.1.11. ピーク面積を評価し、内部標準物質の面積に正規化した。HMT代謝物ライブラリは、m/z値とリテンションタイムに基づいてピークに注釈を付けるために使用した。

RNAseq解析

RNA配列解析は、タカラバイオ株式会社 (日本、滋賀) に委託した。RNeasy Mini Kits (74104; QIAGEN, Hilden, German) を用いて、製造者の指示に従ってtotal RNAを抽出した。抽出したRNAをDNase I (2270B; Takara, Shiga, Japan) とインキュベートし、ゲノムを分解させた。RNAの品質は、まず1.5%アガロースゲルでの電気泳動で評価し、その後、吸光度計で評価した。遺伝子は、fold-changeが2より大きいとき、差次的に発現しているとみなされた。GO解析は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては組換えDNA実験を含むが、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多

様性の確保に関する法律」、およびこれに基づく政省令・告示に示される基準に適合し、かつ所属機関の承認を得ている。また、動物実験の承認も得ている。

C. 研究結果及び考察

C-1 致死率に基づくスクリーニングにより、器官形成に必須な遺伝子を発見

PrS形成に関わる遺伝子を網羅的に同定するため、MGIデータベース(15,211遺伝子)とIMPCデータベース(7,590系統のKOマウス)の2つのKOマウスデータベースをスクリーニングし、その欠損がE10までに胚性致死につながる遺伝子を探した。MGIデータベースの遺伝子のうち、463遺伝子のいずれかが欠損すると、E4.5からE9の間に胚性致死となることがわかった。同様に、IMPCデータベースの遺伝子のうち、417遺伝子のいずれかが欠損すると、E9.5以前の胚性致死が認められた。合計で812個の注目遺伝子が同定され、予想通りPrS制御遺伝子Brachyury Tが含まれていた。812個の候補遺伝子のエンリッチメント解析により、65の注目すべき細胞機能パスウェイが同定された。これらの機能パスウェイは、DNA複製、RNA代謝、エネルギー代謝、シグナル伝達に必要な遺伝子や、細胞周期や細胞接着などの多様な細胞応答に関わるネットワークを形成していた。最も多くの遺伝子(103個)が含まれるカテゴリーは「代謝パスウェイ」(24位)であった。そこで、この103個の遺伝子をDAVID(Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)を用いて分類し、グルコース、ミトコンドリア、核酸、脂質の代謝に関わる遺伝子を同定した。これらの代謝経路は、エネルギー供給に必要なだけでなく、細胞成分の合成や遺伝子発現のエピジェネティックな制御など、適切な生命活動に欠かせないプロセスとして重要であることがわかった。これらの結果から、初期胚の発生には、代謝を中心とした様々な細胞機能のインタクトが必要であることが示された。

C-2 スフィンゴ脂質代謝経路の阻害によるマウ

スES細胞の心筋分化の抑制と神経分化の促進

我々は以前、メバロン酸代謝阻害によるPrS形成不全時に、EB中のスフィンゴミエリンとスフィンゴシンが増加することを確認した。今回、これらの変化の生物学的意義を明らかにするため、スフィンゴ脂質の代謝に着目した。スフィンゴ脂質代謝には3つの遺伝子(Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 2 (Sptlc2), UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase (Ugcg), N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1 (Asa1))が寄与することがわかっている。PrS形成におけるSPTLC2、UGCG、ASA1タンパク質の役割を調べるため、これらの酵素の特異的阻害剤(SPTLC2はMyriocin16、UGCGはNB-DNJ17、ASA1はD-NMAPPD18)のマウスES細胞分化への影響を調べた。阻害剤は培養3-6日目に適用し、10日目にES細胞の分化を光学顕微鏡で心筋細胞拍動を、 β -チューブリンIII免疫染色で神経突起形成を検出することで解析した。その結果、ミリオシンは心筋細胞の拍動と β -チューブリンIII陽性の神経突起の形成をともに阻害し、PRS形成前に細胞死を起こすことがわかった。一方、NB-DNJおよびD-NMAPPDは、EBの拍動を阻害する一方で、これらの薬剤は用量依存的に β -チューブリンIII陽性神経突起の形成を促進した。これらのデータは、UGCGとASA1が正常なPRS形成に重要であることを示唆している。NB-DNJによるUGCGの阻害やD-NMAPPDによるASA1の阻害が、どの時点で細胞拍動を阻害するかを明らかにするため、各阻害剤で細胞を6期間(1-2日、3-4日、5-6日、7-10日、1-4日、3-6日)処理し、10日目の細胞拍動や神経突起伸長を解析した。1-4日目、3-4日目、3-6日目にNB-DNJを投与すると、細胞拍動は効率的に低下し、神経突起の伸長が促進された。D-NMAPPDを用いてASA1を阻害した場合も、同様の結果が得られた。このように、EBの発生3-6日目は、特にスフィンゴ脂質代謝に依存していることが示唆された。

UGCG阻害によるPRS形成の時空間的影響を明らかにするため、PRSマーカーであるBrachyury Tの発現をin situ hybridizationで検出した。EB

をNB-DNJで3-4日または3-6日処理し、Brachyury Tレベルを3、4、5および6の組み合わせで4パターンで調べた。コントロールの無処理EBでは、3日目にはBrachyury Tの発現は見られなかったが、4日目にピークを迎え、5日目から6日目にかけて徐々に減少した。一方、3日目から6日目にかけてNB-DNJを処理すると、Brachyury Tの発現はほぼ抑制された。興味深いことに、3-4日目からNB-DNJのみを適用した場合、Brachyury Tの発現は4日目に抑制されたが、NB-DNJを除去した5日目には回復した。このように、EB発生3-4日目にASAHIまたはUGCGを阻害すると、PRS形成が阻害され、心筋細胞分化が抑制される一方で、神経分化が誘導されることがわかった。この他、メタボローム解析やRNAseq解析から、セラミド代謝がPrS形成に必須の役割を果たすことが明らかとなった。スフィンゴシン-1-リン酸（セラミド誘導体）は、神経細胞の成熟をポジティブに制御することを明らかにした。これらの結果は、セラミド代謝がPrSの形成と神経細胞分化の誘導の両方を制御していることを示す。以上のように、細胞分化に影響を与える因子の一つとして、セラミド代謝を新たに同定した。

D. 結論

令和4年度は、器官形成に必須の役割を果たすPrS組織の正常分化に必須である複数の候補遺伝子を同定することに成功した。また、この一部であるセラミド代謝が実際にPrS形成に必須であることをマウスES分化誘導系を用いて実証した。それゆえ、研究は順調に進展していると考えられる。

来年度（令和5年度）は今年度の結果を受け、更なる因子の同定などを実施する予定である。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirotohi Soyama, Miki Nishio, Junji Otani, Toshiko Sakuma, Shintaro Takao, Shigeo Hara, Takaaki Masuda, Koshi Mimori, Shinya Toyokuni,

John P Lydon, Kazuwa Nakao, Hiroshi Nishina, Takumi Fukumoto, Tomohiko Maehama and Akira Suzuki, Hippo-TAZ signaling is the master regulator of the onset of triple negative basal-like breast cancers. Proc Natl Acad Sci USA 119 (29) e2123134119, 2022.

Caleb Kwame Sinclear, Junichi Maruyama, Shunta Nagashima, Kyoko Arimoto-Matsuzaki, Joshua Agbemefa Kuleape, Hiroaki Iwasa, Hiroshi Nishina, Hata, Yutaka, Protein kinase C α activation switches YAP1 from TEAD-mediated signaling to p73-mediated signaling. Cancer Science 113, 1305-1320, 2022.

Takeaki Shibata, Hiroki Kawana, Yuri Nishino, Yoshiko Ito, Hiroyasu Sato, Hirofumi Onishi, Kuniyuki Kano, Asuka Inoue, Yoshitaka Taketomi, Makoto Murakami, Satoshi Kofuji, Hiroshi Nishina, Atsuo Miyazawa, Nozomu Konol and Junken Aoki, Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme Lpgat1 in zebrafish. Scientific Reports 12, 7312, 2022.

Chiyumi Oda, Kenya Kamimura, Osamu Shibata, Shinichi Morita, Yuto Tanaka, Toru Setsu, Hiroyuki Abe, Takeshi Yokoo, Akira Sakamaki, Hiroteru Kamimura, Satoshi Kofuji, Toshifumi Wakai, Hiroshi Nishina, Shuji Terai, HBx and YAP Expression Could Promote Tumor Development and Progression in HBV-related Hepatocellular Carcinoma. Biochem. Biophys. Rep. 32, 101352, 2022.

Sakurako Kobayashi, Nobuhiko Ogasawara, Satoshi Watanabe, Yosuke Yoneyama, Sakura Kirino, Yui Hiraguri, Masami Inoue, Sayaka Nagata, Yoshimi Okamoto-Uchida, Satoshi Kofuji, Hiromichi Shimizu, Go Ito, Tomohiro Mizutani, Shinichi Yamauchi, Yusuke Kinugasa, Yoshihito Kano, Yasuhiro Nemoto, Mamoru Watanabe, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Nishina, Ryuichi Okamoto, Shiro Yui (2022) Collagen Type I mediated mechnotransduction controls epithelial cell fate conversion during intestinal inflammation. Inflammation and

Regeneration 42, 49, 2022.

Hiroshi Nishina (2022) [review]
Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway in liver formation, homeostasis and tumorigenesis. Cancer Science 113, 1900-1908, 2022.

仁科博史：動物における臓器サイズ制御機構 再生医療 Vol 21 No 2 p74-79 (2022)

2. 学会発表

仁科博史、肝臓の形成と恒常性維持、第24回 長崎大学細胞制御セミナー (2022. 10. 21.) 長崎

仁科博史、肝臓の形成と恒常性維持、第1回 旭川医科大学大学院セミナー (2023. 1. 27.) 旭川

仁科博史、肝臓の発生と再生、新潟大学消化器内科サイエンスセミナー (2023. 3. 16.) 新潟

仁科博史、生物の大きさと再生医療、第22回 日本再生医療学会 (2023. 3. 24.) 京都

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

プレスリリース「新たな眼の難治疾患を発見」
東京医科歯科大学、国立成育医療研究センター、
東京工業大学 (2023. 3. 27.)

<https://www.tmd.ac.jp/press-release/202303>

分担研究報告書

分担研究課題 「モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析」
研究分担者 堀 正敏（東京大学大学院農学生命科学研究科）

研究要旨

フードテックを応用した新開発食品のうち、これまでに食経験のない骨格筋細胞など家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る「培養肉」（本研究では「細胞培養食品」と呼ぶ）の研究開発が加速度的に進んでいる。しかし、細胞培養食品の上市化に際しその安全性確保に向けた課題の抽出や具体的な安全性基準については整備されていない。本研究では、牛の気管平滑筋や大動脈平滑筋など、実際の家畜の臓器を用いた細胞培養系を樹立し、その開発途上に現れる細胞の様々な変化を検証することで、細胞培養食品の安全性基準の礎となる基盤を構築する。

細胞培養食品の品質の鍵を握る因子の一つとして、用いる細胞を採取する臓器の部位差や個体の年齢差が考えられる。屠場で得るウシの臓器を用いた細胞培養系では、細かい臓器の部位差や個体の年齢差を選択することは困難である。そこで、初年度はマウスを用いて同じ消化管でも大腸と小腸から繊維芽細胞様の細胞を採取した。また、老個体と若齢個体の骨格筋から同じく繊維芽細胞様の細胞を採取した。それぞれ採取した細胞の遺伝子発現解析をおこない、臓器部位と個体年齢という二つの因子について、細胞培養食品の安全性確認に関する事項について考察した。

（臓器の部位差）マウスの大腸筋層、ならびに小腸筋層を採取し、Platelet Derived Growth Factor (PDGF) α receptor (PDGFR α)を発現する繊維芽細胞様間質細胞をFACS Cell Sorterにより採取し、RNAseq解析を行い、発現遺伝子の相違について検証した。結果、同じ消化管筋層の同じ繊維芽細胞様細胞であっても、大腸と小腸では発現遺伝子群は大きく異なることが明らかになった。

（個体の年齢）次に、成熟個体マウス（8週齢）と老個体マウス（36カ月齢）の腓腹筋よりPDGFR α 陽性の繊維芽細胞様間質細胞をFACS cell sorterにて採取してRNAseq解析を行った。その結果、老化個体より採取したPDGFR α 陽性繊維芽細胞様間質細胞では、炎症や線維化に関する遺伝子群の発現が亢進していることが明らかになった。

以上の成績から、細胞培養食品の安全性基準の一つとして、細胞を採取する臓器の部位の均一性、細胞を採取する個体年齢の均一性が重要と考えられた。

なお、本年度は、ウシの気管平滑筋細胞を用いたウシ胎児血清を用いた細胞培養系についても樹立したことから、次年度はウシの気管平滑筋細胞の培養系を用いた細胞培養食品の安全性確認に関する検証を実施する。

A. 研究目的

地球上の人口増加や異常気象を背景に、将来の食糧不足が問題となっている。この地球規模の問題を解決する一つの手法として、様々なフードテックの研究が進み、様々な代替肉の開発が手掛けられている。中でも骨格筋細胞をはじめとする家畜・家禽由来の様々な細胞を採取・培養し食肉の代用品を作る「培養肉」（本研究では以下「細胞培養食品」とする）の研究開発の進展は目覚ましい。

しかし、細胞培養食品の上市化に際しその安全性確保に向けた課題の抽出や具体的な安全性基準については整備されていない。本研究では、牛の気管平滑筋や大動脈平滑筋など、実際の家畜の臓器を用いた細胞培養系を樹立し、その開発途上に現れる細胞の様々な変化を検証することで、細胞培養食品の安全性基準の礎となる基盤を構築する。

（初年度の研究目的） 細胞培養食品の品質の鍵を握る因子の一つとして、用いる細胞を採取する臓器の部位差や個体の年齢差が考えられる。しかし、屠場で得るウシの臓器を用いた細胞培養系では、細かい臓器の部位差や個体の年齢差を選択することは困難である。そこで、初年度はマウスを用いてこの2点について検討する。すなわち、同じ消化管でも大腸と小腸から繊維芽細胞様の細胞を、また、老個体と若齢個体の骨格筋から同じく繊維芽細胞様の細胞を採取し、それぞれの遺伝子発現解析を行い比較解析することで、同一臓器での部位差や細胞を採取する個体の年齢差に起因する細胞培養食品の安全性指針について考察することを目的とした。また、ウシの気管平滑筋を単離し、ウシ胎児血清下の培養条件を確定し、ウシ気管平滑筋の継代によって変動する遺伝子発現解析のためのRNAサンプルを集積する。

B. 研究方法

マウスは東京大学大学院農学生命科学研究科の動物倫理委員会で初認を得た実験計画（P21-006）で使用するC57BL/6Jマウスから、

大腸と回腸、並びに腓腹筋を採取した。それぞれの臓器をコラゲナーゼ処理し、FACS Cell Sortingを用いてPlatelet Derived Growth Factor Receptor α (PDGFR α) を発現する繊維芽細胞様の間質細胞（以下P α 陽性繊維芽細胞様細胞）を採取した（CD31⁻CD45⁻PDGFR α ⁺細胞集団）。大腸と小腸筋層由来のP α 陽性繊維芽細胞様細胞は8週齢の雄マウスを用いた。腓腹筋からのP α 陽性繊維芽細胞様細胞は成熟マウス（8週齢雄）と老齢マウス（36カ月齢雄）から採取した。さらに、成熟マウスと老齢マウスの心臓、小腸、肺、脂肪、肝臓からもP α 陽性繊維芽細胞様細胞を採取した。

得られた細胞よりmRNAを抽出し、タカラバイオによるRNAseqデータファイルを作成し、得られた結果についてPCA解析などの遺伝子発現解析を行った。

屠場よりウシの気管を入手し、気管平滑筋細胞をコラゲナーゼ/エラスターゼカクテルにて単離し、DMEM培地10% ウシ胎児血清下で培養した。細胞は70%コンフレントの状態まで継代した。これらの実験を実験開始時は同一ロットの細胞を用いて二人の実験者で同様に実験を行い、初代培養細胞と15代培養細胞よりそれぞれRNAを抽出した。

C. 研究結果及び考察

（消化管の異なる部位から採取した同一細胞の発現遺伝子変動）

マウス大腸と小腸の筋層よりP α 陽性繊維芽細胞様細胞を採取し遺伝子発現解析を行った。結果、大腸由来P α 陽性繊維芽細胞様細胞では細部外基質系、細胞外骨格系、外部カプセル構造体系の遺伝子群の発現が多かったのに対して、小腸由来P α 陽性繊維芽細胞様細胞では血液循環系、細胞間接着制御系、細胞接着の正の制御系の遺伝子群の発現が多く、大腸での結果と大きく異なっていた。以上の成績から、同じ消化管の同一細胞（P α 陽性繊維芽細胞様細胞）であっても、部位が異なるだけで両細胞の発現遺伝子は全く異なることが明らかに

なった。

(成熟個体と老齢個体から採取した同一細胞の発現遺伝子変動)

まず、成熟個体と老齢個体から採取したP α 陽性繊維芽細胞様細胞の発現遺伝子変動について、心臓、肺、小腸、骨格筋、脂肪、肝臓について比較検討したところ、老齢個体から採取した細胞では、炎症関連遺伝子群の発現が共通して高かった。また、逆に、線維化関連遺伝子群の発現は共通して低かった。さらに骨格筋のP α 陽性繊維芽細胞様細胞に着目し、他の臓器に無く、骨格筋においてのみ老化によって発現が大きく変動する遺伝子について解析したところ、細胞外マトリックス系の1遺伝子の顕著な減少を見出した。この細胞外マトリックスの遺伝子欠損マウスでは、確かに筋力が低下し骨格筋の萎縮が生じることを確認した。このように、臓器特異的に老化によって変動する遺伝子があることが示された。

(ウシ気管平滑筋培養細胞)

ウシの気管より平滑筋細胞を単離し、ウシ胎児血清を用いて細胞培養した。得られた細胞は α SM-アクチン抗体陽性の平滑筋細胞であることを確認した。初代培養細胞並びに25代培養細胞よりそれぞれRNAを抽出し、RNAseq解析をおこなった。解析結果は次年度に得られる。

D. 結論

以上の成績から、細胞培養食品の安全性基準の礎となる考えとして、以下のことが考察された。1) 細胞培養に使用する細胞を採取する臓器の部位を一定部位に均一化することの重要性。2) 細胞培養に使用する細胞を採取する個体の年齢を一定の年齢にすることの重要性、がそれぞれ示された。2) において、採取する細胞の個体として老齢個体は不適であるか否か、明確な結論を出すことはできなかった。今後、生体に有害な炎症性物質を産生する酵素の発現変動や、発がん誘導に関与する物質産生に関与する遺伝子発現などについて別途解析を進めていくことが重要と考えられた。しかし、

今回骨格筋においてのみ老化によって低下する遺伝子を見出した例を考慮すると、成熟個体からの細胞採取が望ましいと考えられた。

E. 健康機器情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Takashi Chaen, Tamaki Kurosawa, Kazuhisa Kishi, Noriyuki Kaji, Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Masatoshi Hori. Transcriptome analysis of mesenchymal stromal cells of the large and small intestinal smooth muscle layers reveals a unique gastrointestinal stromal signature. *Biochemistry and Biophysics Reports*, (2023) 34: 101478.

DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101478

2. 学会発表

茶圓貴志、黒澤珠希、岸和寿、梶典幸、堀正敏、小腸、大腸PDGFR α +細胞の生理機能解明、第146回日本薬理学会関東部会 (2022. 6. 18)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

分担研究報告書

分担研究課題 「モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析」

研究分担者 福田 公子 東京都立大学理学研究科生命科学専攻

研究要旨

昨今、培養肉（細胞培養食品）作成がさまざまな企業から発表されているが、その多くは骨格筋由来細胞を培養し、加工しているものである。本分担研究では、筋細胞のまま分裂できる胚の平滑筋の特徴を生かして、新たな細胞培養食品のソースとなりうるかを検証し、併せて分化増殖過程におけるハザードについて検討した。特に注目するのは、ニワトリ胚の砂囊である。鳥類での二番目の胃である砂囊は、一番目の胃である前胃や後方につながる十二指腸などと比べて著しく発達した平滑筋を持つ臓器で、この発達した平滑筋で機械的消化を担っている。砂囊では、平滑筋の前駆細胞である間充織でも分裂能が高いが、平滑筋に分化してからもよく分裂し、平滑筋層が厚くなる。そこで、砂囊平滑筋細胞の培養下における分裂能を調べることにした。血管平滑筋では、増殖刺激を与えると平滑筋は種々の収縮タンパク質の発現量が落ち、脱分化することが知られている。砂囊の細胞培養でも脱分化がどのような条件で起こるかを調べた。

ニワトリ 14 日胚の砂囊から平滑筋層を取り出し、ピペッティングで数 100 個の細胞が含まれる細胞塊を作り、コラーゲンコートしたディッシュに撒き、0、5、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養したところ、単離細胞の培養と比べ増殖が速く、細胞塊から多くのスピンドル型の細胞が這い出し、7 日でコンフルエントになった。これらの細胞は α Smooth muscle actin および calponin 陽性の細胞だった。これを継代してゆくと、徐々に、仮足を伸ばし広がった形態の細胞が増え、6 代目には多くが広がった細胞になった。それと同時に calponin 陽性細胞の割合も減っていった。また、核の大きさが大きくなっているのも観察できた。

次に、砂囊と比べ、平滑筋の発達が悪い小腸の平滑筋は砂囊と同条件で培養した際に、どのような動態を見せるかも調べた。砂囊で増殖が盛んな条件で小腸の平滑筋細胞塊を培養したが、あまり増殖せず、7 日目になっても細胞数は増えなかった上、形態も広がった繊維芽細胞状だった。

以上の結果から、ニワトリ胚砂囊は、細胞塊で培養するとよく増殖し、分化状態も保っていることから、新たな細胞培養食品のソースになりうると考えられる。ただし、単離細胞での培養と細胞塊での培養では、増殖能、細胞形態に違いがあったことから、培養方法による脱分化リスクへの対応が必要となると考える。すなわち、分化増殖過程におけるハザードとしては、単離細胞と細胞塊という培養条件の違いにより細胞の分化状態が異なり、目的とする細胞と異なる性質を生じる可能性が高く、この分子機序解明がその方策につながるものと考えられる。さらに継代すると脱分化が進むことも示唆された。平滑筋が脱分化した筋線維芽細胞と分化した平滑筋を見分ける方法として、核の大きさが使えるかを今後検討したい。また、小腸平滑筋を培養すると、増殖刺激に対してあまり反応せず、形態も筋線維芽細胞に近かった。このため、砂囊平滑筋の高い増殖能は消化管平滑筋に共通の性質ではなく、砂囊特異的であると考えられる。また、今回は増殖刺激としてウシ胎児血清を加えたが、より直接的に増殖を刺激する YAP/TAZ シグナル調節因子を加えて、増殖能を上げたときに細胞分化がどうなるかを調べていきたい。

A. 研究の目的

細胞培養し、それを加工したいいわゆる「細胞培養食品」は、現在のところ骨格筋をターゲットにしている場合が多い。多核で分裂しない筋細胞をもつ骨格筋では、前駆細胞である筋芽細胞または生体幹細胞であるサテライト細胞を培養したのち、分化させて筋細胞を作る方法が使われている。一方、平滑筋は筋細胞が分裂可能であり、より簡便な細胞培養食品のソースの候補として有効と考えられる。しかし、平滑筋をこの観点から研究した報告はほとんどなく、培養方法やソース組織による増殖能の差や、脱分化の危険性などの基礎的知見を積み上げる必要がある。本分担研究では、本年度消化管平滑筋、特に砂囊平滑筋が細胞培養食品のソースになりうるか、またそのリスクの解析を研究目的とした。

平滑筋は血管壁、消化管壁、呼吸器壁、泌尿生殖器壁などに豊富にみられる。そのうち血管平滑筋は増殖の研究が進んでおり、分化した血管平滑筋は増殖刺激を与えると、収縮型から脱分化し、収縮タンパク質の発現が下がった増殖型になると言われている。一方、消化管平滑筋に関しては血管平滑筋に比べ、脱分化しにくいと言われているが、培養方法や部域による増殖能や脱分化を研究したものは少ない。そこで本研究では消化管平滑筋に注目した。特に、咀嚼器官として働くため、平滑筋が著しく発達し、筋胃とも呼ばれている鳥類胚の砂囊に注目した。砂囊の平滑筋は多くの平滑筋が単離できること、平滑筋としては珍しく収縮がPhasic型であることなどから、平滑筋の生化学、生理学的な研究の材料としてよく使われている。

砂囊平滑筋は内臓板中胚葉に由来する間充織から分化する。消化管は発生初期では、食物の通る穴に面した上皮と、それを取り囲む間充織から成る。上皮は消化管の各部域で全く違った形態及び遺伝子発現を行い、さまざまな形態を取ることで、さまざまな消化機能を担うことが知られている。一方、間充織は上皮ほどバリエーションがなく、まず、上皮に近い内側から結合組織と平滑筋に分かれ、移動してきた神経堤細胞が神経叢として最外層に位置する三層構造をとる。その後、上皮を中心として同心円状に粘膜固有層、粘膜筋板、粘膜下層、筋層、神経叢、漿膜

という、どの領域でも似た構造となることが知られている。砂囊では、筋層が他の領域に比べ、早く分化し、かつ著しく厚い。既に、6日胚で隣接する小腸よりも厚い間充織を持つ。この間充織の大半が10、11日胚でsmooth muscle actinを発現する平滑筋へと分化し、その後も盛んに増殖することで、厚い筋層を獲得する。

ここで砂囊では、間充織の増殖が高いだけでなく、平滑筋に分化した後も増殖能できることは、細胞培養食品のソースとして注目に値する。ただし、砂囊平滑筋は単離細胞培養では、インスリンによる増殖刺激で分化を保って培養でき、FBSによる増殖刺激で筋線維芽細胞(myofibroblast)に脱分化すると言われている。本研究では、砂囊が細胞培養食品のソースとなりうるかを、単離細胞の培養ではなく細胞塊からの培養を行うことで調べた。また、継代による増殖、脱分化への影響も調べた。

砂囊平滑筋に比べ、小腸平滑筋層は薄い。2つの隣接する臓器の平滑筋の違いはどの様に生まれるのか。可能性の一つは砂囊と小腸の平滑筋は同様の増殖能を持つが、砂囊には増殖促進因子があるため、増殖するというもので、もう一つは砂囊の平滑筋は小腸の平滑筋と比べ、増殖能が元々高いというものである。これを明らかにするため、ニワトリ胚の砂囊、小腸の平滑筋の培養を行った。砂囊平滑筋の分裂能が消化管平滑筋に共通のものなのか、砂囊平滑筋特異的なのかを調べた。

B. 研究方法

ヒペコネラ種のニワトリ14日胚を用いた。動物実験は「東京都立大学研究倫理委員会規程」および「東京都立大学動物実験管理規程」に基づいて計画し、承認されたもの(A4-11)に従って実施した。14日胚の砂囊、小腸を取り出し、平滑筋層を単離した。パスツールによるピペッティングを行い、数100個の細胞を含む細胞塊を作成した。この細胞塊をDMEM培地0、5、10%ウシ胎児血清条件で、コラーゲンコートしたディッシュ、チャンバースライドに播種した。砂囊に関しては、細胞塊をさらにピペッティングし、シングルセルにしたものも、同様の条件で播種した。

コンフルエントになったものは継代を行

い、1/10の細胞を最播種し、6代まで継代した。

培養した細胞は α Smooth muscle actinおよびcalponin抗体で免疫染色をおこなった。

C. 研究結果及び考察

C-1. 砂嚢平滑筋単離細胞と細胞塊の培養

砂嚢平滑筋の細胞塊からの培養では、DMEM培地5または10% ウシ胎児血清条件下で細胞塊から α Smooth muscle actin陽性細胞が這い出し、7日でコンフルエントになった。これらの細胞はスピンドル型でcalponin陽性だった。一方、単離細胞ではDMEM培地10% ウシ胎児血清条件下で細胞は増殖したものの、細胞塊からの培養ほどは増殖せず、9日後にもコンフルエントにはならなかった。全ての細胞は α Smooth muscle actin陽性ではあったが、スピンドル型の形態をとる細胞と薄く広がった形のもの混じっていた。

C-2. 継代に伴う細胞の形態変化

コンフルエントになった砂嚢平滑筋培養細胞を1/10希釈して播種すると、約7日間の培養で再度コンフルエントになり、継代を続けることができた。6回目の継代の後、7日間の培養でコンフルエントにならなくなったため、培養を中止した。6代の培養を通じ、全ての細胞は α Smooth muscle actin陽性だったが、calponin陽性細胞は始め100%陽性だったが、徐々に下がり、6代目では約5%にまで下がった。形態も最初の2代の継代ではスピンドル型だったが、その後薄く広がり仮足をたくさん出す形のもの現れ、4代目以降は細いスピンドル型のは非常に少なくなった。

C-3. 小腸平滑筋の培養

小腸平滑筋は砂嚢平滑筋とくらべ、シャーレ底面への接着が悪く、接着したのも増殖能は砂嚢平滑筋と比べて著しく低かった。そのため、這い出してくる細胞数は少なく、コンフルエントになることはなかった。7日培養後に調べたところ、全ての細胞は α Smooth muscle actin陽性だったが、calponinの発現は弱いものと強いものがあり、細胞塊の近傍ではスピンドル型をしているが、すぐ外側では薄く広がり仮足をたくさん出す形のもの

が見られた。

C-4. 考察

砂嚢平滑筋は細胞塊での初代培養をすることで、よく増殖し、かつタンパク質の発現やその形態から分化を維持していることが考えられる。単細胞で播種した時とかなり違う培養結果になったが、細胞接着因子やそれに伴う細胞内のシグナルの違いがあったと考えられる。

また、小腸平滑筋に対しては同様の培養が同じ効果にならないことから、増殖刺激に対する反応性が高いことは消化管平滑筋の特徴というよりも、砂嚢平滑筋の特徴と言える。

一方継代を続けるとcalponin非陽性細胞が現れること、形態も仮足の多い線維芽細胞型になることなどから、筋線維芽細胞に脱分化が進んだと考えられる。本培養で平滑筋の分化をどこまで保っているかはsmoothelinの発現やカルバコール投与による収縮が見られるかなどを調べてゆく必要がある。

D. 結論と今後の展望

本研究で、ニワトリ胚砂嚢平滑筋は増殖刺激に反応し、盛んに増殖することから、細胞培養食品のソース組織の候補であることが示唆された。ただし、培養方法（単離細胞or細胞塊）や継代回数などによっては脱分化した筋線維芽細胞の出現がリスクファクターとなると考える。すなわち、分化増殖過程におけるハザードとしては、単離細胞と細胞塊という培養条件の違いにより細胞の分化状態が異なり、目的とする細胞と異なる性質を生じる可能性が高く、この分子機序解明がその方策につながるものとする。筋線維芽細胞と平滑筋の明確な区別は難しいが、培養を続けると、核が大きい細胞が出現することが観察された。今後は培養における核の大きさのばらつきとcalponinの発現を比べ、脱分化した細胞の簡便な区別ができるかどうかを試すつもりである。

また、今回は増殖刺激としてウシ胎児血清を加えたが、より直接的に増殖を刺激するYAP/TAZシグナル調節因子を加えて、増殖能

を上げたときに細胞分化がどうなるかを調べていきたい。

E. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

F. 知的財産所有権の出願・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

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takashi Chaen, Tamaki Kurosawa, Kazuhisa Kishi, Noriyuki Kaji, Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Masatoshi Hori	Transcriptome analysis of mesenchymal stromal cells of the large and small intestinal smooth muscle layers reveals a unique gastrontestinal stromal signature	Biochemistry and Biophysics Reports	34	101478	2023
Hirotochi Soyama, Miki Nishio, Junji Otani, Toshiko Sakuma, Shintaro Takao, Shigeo Hara, Takaaki Masuda, Koshi Mimori, Shinya Toyokuni, John P Lydon, Kazuwa Nakao, Hiroshi Nishina, Takumi Fukumoto, Tomohiko Maehama, Akira Suzuki	Hippo-TAZ signaling is the master regulator of the onset of triple negative basal-like breast cancers	Proc Natl Acad Sci USA	119	e212313 4119	2022
仁科博史	動物における臓器サイズ制御機構	再生医療	21	74 - 79	2022

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 合田 幸広

次の職員の令和4年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 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
- 研究課題名 フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードやリスクに係る研究 -リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元-
- 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター毒性部・部長
(氏名・フリガナ) 北嶋 聡・キタジマ サトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東京医科歯科大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 田 中 雄 二 郎

次の職員の令和4年度 厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードやリスクに係る研究・リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元・
- 研究者名 (所属部署・職名) 難治疾患研究所未来生命科学研究部門発生再生生物学分野・所長／教授
(氏名・フリガナ) 仁科 博史 ・ ニシナ ヒロシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京医科歯科大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣 殿

機関名 国立大学法人東京大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 藤井 輝夫

次の職員の令和4年度 厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードやリスクに係る研究-リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元-
3. 研究者名 (所属部署・職名) 大学院農学生命科学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 堀 正敏・ホリマサトシ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

令和 5年 4月 19日

厚生労働大臣 殿

機関名 東京都立大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 大橋 隆哉

次の職員の令和4年度 厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 フードテックを応用した細胞培養食品の先駆的な調査検討による食品衛生上のハザードやリスクに係る研究・リスクプロファイルの作成とモデル細胞実験系による検証・還元
3. 研究者名 (所属部署・職名) 理学研究科生命科学専攻・准教授
(氏名・フリガナ) 福田公子・フクダキミコ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	東京都立大学研究倫理委員会	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。