

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5年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 北嶋 聡

令和6(2024)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 ----- 17

#### 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 ----- 40

#### 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 ----- 47

#### 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 ----- 50

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別添 5)

----- 54

# 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5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、その安全性評価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。＜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。

1) については、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。令和4年度(昨年度)の検討では、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、他方、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ことができる。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ハザードの抽出を試みた。令和5年度(今年度)の調査検討では、開発動向としては、16 件の開発事例のうち魚介類（サーモン、クロマグロ、ハタ、甲殻類等）を開発対象とするものが 6 社と、魚介由来の開発事例が増えている事が窺え、他方、規制動向に関しては、この時点で細胞培養食品が販売可能となったのはシンガポールと米国、イスラエルの 3 か国である事、イスラエルでは世界初となる牛由来の製品が承認された事、韓国でも承認申請の受付を開始した事を見出し、また FAO と WHO が公表した細胞培養食品の安全性に関するレポートでは、各国の規制状況の分析に加えて、潜在的ハザード因子の包括的な検討を行っている事を見出した。以上の調査・検討を踏えて、細胞培養

食品に関して想定され得る潜在的なハザード因子を抽出した。なお補完的な検討としての正常型プリオンの発現制御に関しては、マウス由来の骨格筋細胞株（C2C12）では他の細胞株と比べ高いプロモーター活性を示し、また、細胞増殖因子の有無や、3次元培養により球状に組織化させたスフェロイドにおいて、プロモーター活性が顕著に変動することを明らかとした。正常型プリオン蛋白質は、その発現の増減の生物学的な意義は明らかとはなっていないが、プリオン感染に関与する原因遺伝子であり、製造・加工時の細胞培養時に想定される細胞増殖に関する培養条件が、正常型プリオン遺伝子の発現に大きく関与しうることを示唆した（北嶋）。

2)については、昨年度の検討では、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。このことは、セラミドシグナルネットワークが個体発生・生存維持に関係しており、細胞培養食品の作製にあたっては、このシグナルの阻害を避ける必要があると考える。スフィンゴシン-1-リン酸などのセラミド代謝関連生理活性物質を潜在的なハザード因子として見出したことを表す。今年度は、調査において、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、ハザードが懸念された因子の一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。YAP の活性化の強さが閾値を超えると、肝がんが生じること、この時にゲノム DNA のメチル化変化（エピジェネティック変化）が生じることを見出した。この事は、転写共役因子 YAP 遺伝子を潜在的なハザード因子として見出したことの妥当性を表すものとする（仁科）。

3)については、家畜細胞について、昨年度の検討では、週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、その部位（臓器）差を明らかとした。今年度は、さらに解析を進め、老齢マウス由来の繊維芽細胞では、細胞外マトリックス関連遺伝子群の発現が低下し、免疫・炎症関連遺伝子の発現が亢進することを明らかとし、これらが安全性の指標となり得ることが示唆された。また、ウシ気管由来単離平滑筋細胞を用い、継代による影響を検討したところ、15継代後の場合、糖質コルチコイド系の合成経路の遺伝子発現亢進など、生理活性物質の産生の継代差について明らかにした（堀）。これらの事は、当該生理活性物質を潜在的なハザード因子として見出したことを表し、また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。

一方、家禽細胞については、昨年度の検討では、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、また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ることを見出した。今年度は、ニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞の分化の維持には、細胞間接着が必要であることが示唆されたため、分化の維持に向け、ハンギングドロップ法による3D培養系を確立した。この際、二種の培養条件、すなわちウシ胎児血清、あるいはニワトリ胚抽出液を添加した場合について比較検討したところ、細胞形態及び組織構築が、両者で異なることが明らかとなり、引き続き、この差異の機序について検討中である（福田）。これらの成果は、細胞培養食品の作製に際しての培養条件の選択理由に資する成果と考える。

このように、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、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行った結果、それぞれの現状と特徴を整理することができ、また潜在的なハザード因子を抽出できた。また各分担研究における検討は、当該生理活性物質及び転写共役因子 YAP 遺伝子を潜在的なハザード因子として見出したことを表し、また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評価に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性評価に向けた新たな制度の枠組みの設定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・未来生命科学研究所・  
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、その安全性評価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、この食品衛生法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、その食品衛生法上の安全性評価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評価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摂取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」の食品衛生法上の安全性評価に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性評価に向けた新たな制度の枠組みの設定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、食品衛生法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」に係る安全性評価法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。

## 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（昨年度）、令和5年度（今年度）共に予定通りに、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。

昨年度及び今年度共に、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。

情報収集を行った期間は、昨年度は令和4年（2022年）6月下旬から8月下旬、今年度は令和5年8月中旬から10月初旬であり、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、昨年度は、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た。今年度は、細胞培養食品の製造・加工時に想定される培養条件下で上記の細胞株を用い、正常型プリオン遺伝子の発現変動の有無について検討を行った。

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。また、大量化に重要な、独自に見出した組織・臓器のサイズを決める遺伝子の働きについても考慮する。本評価系の研

究成果を、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。

昨年度は、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、遺伝子変異によって、遺伝子発現変化や代謝産物変化が生じ、細胞分化や細胞増殖などの細胞応答が異常となる場合に着目し、2種類の遺伝子欠損マウスデータベース（登録数15211種類と7590種類）を用いて、個体死となる遺伝子の網羅的スクリーニングを行った。さらに脂質代謝に関与する2遺伝子に着目し、網羅的な遺伝子発現（トランスクリプトーム）解析と代謝産物（メタボローム）解析を行った。以下に、具体的に記載する。

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ました。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  $\mu$ 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 $\times$ 10<sup>3</sup>) を LIF を含まない培地で 25  $\mu$ 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 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離を行った。上清を乾燥させ、200  $\mu$ 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ました。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。

今年度は、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、調査において懸念されたハザードの一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。また、独自に開発した老化マウスを用いて、加齢依存的な肝細胞の機能低下を

検討する。加齢依存的に神経機能が低下し、筋萎縮(サルコペニア様)を発症するマウスを確立している。本マウスを用いて、加齢が及ぼす肝臓への影響を検討する。

#### 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:

昨年度及び今年度共に、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 Growth Factor Receptor  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ) を発現する繊維芽細胞様細胞(以下 P $\alpha$  陽性繊維芽細胞様細胞)を採取した(CD31-CD45-PDGFR $\alpha$ +細胞集団)。大腸と小腸筋層由来の P $\alpha$  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 $\alpha$  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 ヶ月齢雄)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 $\alpha$  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%コンプレントの状態に 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大学院生に同様に実験を行い、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:

昨年度及び今年度共に、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 の細胞を最播種し、6 代まで継代した。培養した細胞は  $\alpha$  Smooth muscle actin および calponin 抗体で免疫染色をおこなった。さらに今年度は、細胞塊を、ニワトリ胚抽出液(EE)添加など、様々な培養液でハンギングドロップ法を使い、三次元培養し、平滑筋の分化状態を調べた。

#### **(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):

昨年度は、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別表を用意した。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「由来する生物種、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、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ハザードの抽出を行い、当初の予定通り進捗した。

今年度の調査検討では、1) 開発動向としては、16件の開発事例のうち魚介類(サーモン、クロマグロ、ハタ、甲殻類等)を開発対象とするものが6社と、魚介由来の開発事例が増えている事が窺えた。他方、2) 規制動向に関しては、各国の規制当局による細胞培養食品の安全性に関する審査情報の公開状況に着目すると、EU及びオーストラリア・ニュージーランドでは、細胞培養食品または Novel Food としての安全性審査に必要な要件は明示されており審査情報は公開となるが、一方、評価要件を公表しているシンガポールは審査資料及び審査結果を公開しておらず、許認可制を導入していない米国では市販前コンサルテーションの資料を公開しているのみで、いずれも審査における判

断基準等は明確になっていないこと、また公表されている申請・評価・承認の事例としては、2024年4月の時点において、細胞培養食品が販売可能となったのはシンガポールと米国、イスラエルの3か国である事を見出した。シンガポールでは Eat Just 社の鶏由来の2品目を2020年・2021年に販売承認し、米国では Upside Foods 社および GOOD Meat 社の鶏由来の製品が FDA の市販前コンサルテーションを終了し、USDA の認証取得を経て販売可能になったことが2023年6月に報道された。また、審査中であることを公式発表しているのはオーストラリア・ニュージーランドのみで、2023年1月に FSANZ に申請された Vow 社のウズラ由来の製品について、2023年12月~2024年2月に審査結果に対するパブリックコメントの募集が行われたこと、Vow 社のウズラの製品は2024年4月に先にシンガポールで販売承認を取得したことを見出した。さらに、イスラエルでは2024年1月に世界初の牛由来の製品となる Aleph Farms 社の培養牛ステーキが承認されたこと、韓国でも承認申請の受付を開始した事を見出した。加えて、FAO と WHO が 2023年に公表した細胞培養食品(cell-based food)の安全性に関するレポートでは、各国(オーストラリア及びニュージーランド、カナダ、中国、欧州(EU、英国、スイス、ノルウェー、アイスランド)、インド、イスラエル、日本、カタール、シンガポール、及び、米国)の規制状況の分析に加えて、潜在的ハザード因子の包括的な検討を行っている事を見出した。以上の調査・検討を踏えて、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザード因子を抽出できた。潜在的なハザード因子につき、シンガポール食品庁の安全性評価要件、並びに、FAO と WHO の安全性に関するレポートを参考に、最後に表として掲げた。

<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>

昨年度は、マウスの正常型プリオンパク質をコードする遺伝子上流1,000bp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、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た結果、用いたプリオンパク質のプロモーター領域の遺伝子配列は下流の遺伝子発現を制御していることが確認された。

今年度は、上記プロモーターアッセイ系を用い、マウス由来の骨格筋細胞株 (C2C12)、神経細胞株 (Neuro2a) 等に導入し、細胞培養食品の製造・加工時に想定される培養条件下でのプリオン遺伝子の発現変動の有無について検討を行った。C2C12 細胞では他の細胞株と比べ高いプロモーター活性を示し、また、細胞増殖因子の有無や、3次元培養により球状に組織化させたスフェロイドにおいて、プロモーター活性が顕著に変動することが明らかとなった。正常型プリオン蛋白質は、その発現の増減の生物学的な意義は明らかとはなっていないが、プリオン感染に関与する原因遺伝子であり、製造・加工時の細胞培養時に想定される細胞増殖に関する培養条件が、正常型プリオン遺伝子の発現に大きく関与しうることを示唆した。

#### 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):

昨年度は、網羅的スクリーニングを行なった結果、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が明らかとなった。以下、より具体的に記載する。

##### 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ました。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りました。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、 $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 ASAH1 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 ASAH1 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 ASAH1 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 マーカーであるブラキリー 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、ブラキリー T レベルを 3、4、5 および 6 の組み合わせによる 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、ブラキリー 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 ASAH1 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。

今年度は、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、調査において懸念されたハザードの一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。YAP の活性化の強さが閾値を超えると、肝がんが生じること、この時にゲノム DNA のメチル化変化 (エピジェネティック変化) が生じることを見出した。以下、より具体的に記載する。

リン酸化されるアミノ酸残基 Ser を Ala に置換した 3 種類の YAP 変異体 (1SA, 2SA, 5SA) は、タンパク質の安定性や核への移行能力に違いがあり 5SA>2SA>1SA の順番の強弱を示す。我々のマウス肝細胞に YAP (1SA) を発現誘導する実験系では、肝細胞がんは発症しなかった。一方、YAP (2SA) や YAP (5SA) では 4 ヶ月経過すると肝細胞がんが発症した。発症した肝細胞がんのゲノムのメチル化解析を行った結果、正常組織とは異なり、メチル化の低下や亢進が観察された。以上の結果は、YAP 活性化の閾値を超え、ゲノム DNA のメチル化変化 (エピジェネティック変化) が生じると、肝がんが発症することを示唆する。

この事は、転写共役因子 YAP 遺伝子を潜在的なハザード因子として見出したことの妥当性を表すものと考えられる。

### 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、昨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評価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)  $\alpha$  receptor (PDGFR  $\alpha$ ) を発現する繊維芽細胞様間質細胞 (P $\alpha$  陽性繊維芽細胞様細胞) 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 P $\alpha$  陽性繊維芽細胞様細胞を 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  $\alpha$  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。

今年度は、さらに解析を進め、6 種類の臓器由来の繊維芽細胞における老齢化による遺伝子発現変動、並びに、ウシ気管由来単離平滑筋細胞における、継代による遺伝子発現変動影響を検討した。

<6 種類の臓器の同一細胞における老齢化による遺伝子発現変動>

まず、成熟個体と老齢個体から採取した P $\alpha$  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、線維芽

細胞の遺伝子変動は加齢による差よりも臓器間での差が大きいこと明らかになった。また、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すべての臓器に共通して高かった。また、逆に、線維化関連遺伝子群の発現は全ての臓器に共通して低かった。

<ウシ気管平滑筋培養細胞系を用いたバイオハザード研究>

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同じロットの細胞から二人の実験者 A と B が同時にそれぞれ細胞培養を行い、15 代まで細胞を継代した。初代培養細胞 (P0)、初代継代細 (P1)、2 代継代細胞 (P2)、5 代継代細胞 (P5)、10 代継代細胞 (P10)、ならびに 15 代培養細胞 (P15) よりそれぞれ RNA を抽出し、RNAseq 解析をおこない、実験者 A と B による実験手技に由来すると考えられる発現遺伝子の変動について解析した。比較的細胞培養実験に熟練している実験者 A については、P0 から P15 まで継代を追って PCA 解析での分散が変化したのに対して、細胞培養実験技術に熟練していない実験者 B については、P0 から P15 までの継代数に関係なく PCA 解析での分散がばらつく成績を得た。

また、生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子の細胞継代による発現変動解析において、セロトニン系やノルアドレナリン系の分解系の遺伝子発現の低下と、糖質コルチコイド系の合成経路の遺伝子発現の亢進が認められたが、ヒスタミン系については遺伝子発現に継代による有意な差は認められなかった。

これらの事は、当該生理活性物質を潜在的なハザード因子として見出したことを表し、また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。

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、砂嚢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。昨年度は、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。その結果、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  $\alpha$  Smooth muscle actin および calponin 陽性の細胞であった。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、どの様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。

今年度は、昨年度に確立した方法でニワトリ 14 日胚の砂嚢平滑筋の細胞塊から培養した細胞を継代した。コンフルエントになった細胞を 1/10 にして撒き、培養すると、5-6 日でコンフルエントになった。継代は 6 回行なったが、全ての細胞は、 $\alpha$  SMA 陽性だった。しかし継代 4 回まではコンフルエントになったが、5 回目では、コンフルエントにならず、細胞形態もより短い線維芽細胞状になり、核の大きさも大きくなった。そこで、これらの細胞の性質を調べるため、収縮タンパク質の一つである calponin の局在を調べたところ、継代 6 回目の細胞は、calponin 陽性細胞は少数だった。よって、これらの細胞は筋線維芽細胞に似た細胞になっていると考えた。次に、継代前の細胞でも、培養した平滑筋が一樣であるかどうかを調べるため、細胞塊播種から 4 日目の培養細胞での  $\alpha$  SMA、calponin の局在の変化を

調べた。その結果、細胞塊から這い出してすぐの細胞は、密度が高く、著しく細長く、核は小さく、 $\alpha$  SMA は弱く、calponin は細胞全体で強かった。一方、細胞塊から離れた細胞は、密度が少し小さく、形態は細長く、核はやや大きく、 $\alpha$  SMA は強く、calponin は細胞の一部で強かった。この性質は継代 1 回目の細胞にも引き継がれていた。このことから、這い出した直後の細胞は平滑筋であるが、しばらくすると平滑筋から脱分化の方向へすすむと考えられる。FBS の濃度を変えて培養すると、1%では、6 日培養後でも細胞塊からの這い出しが見られるが、10%では、4 日培養後には細胞塊からの這い出しが見られず、細胞塊に近い細胞でも、疎で、 $\alpha$  SMA は強く、calponin が一部で強い細胞(以下、脱分化分化平滑筋)になっていた。また、細胞塊の大きさに注目すると、大きな細胞塊からは平滑筋の特徴を持っている細胞が這い出したが、小さな細胞塊では這い出した細胞がすぐに疎に分布し、脱分化平滑筋の特徴を持っていた。最後に細胞塊培養と、単離細胞からの培養と比べると、単離細胞では細胞がすぐに脱分化平滑筋の特徴を示し、その後形態がひたらくなり、筋線維芽細胞に似た細胞になることがわかった。それぞれの細胞の増殖率は調べていないが、DAPI の染色から分裂細胞と思われる細胞はどの細胞群にも見られた。以上のことから砂嚢平滑筋細胞は、塊で培養すると平滑筋を維持できるが、単離して細胞同士の接着が少なくなると、脱分化し、筋線維芽細胞になることが示唆された。そこで平滑筋細胞塊をハンギングドロップ法で 3D 培養する条件で、細胞分化を調べた。DMEM, 1% FBS 条件では 6 日間の培養で細胞塊の大きさはあまり変化しなかったが、10% FBS 条件では細胞塊が大きくなった。また、組織培養でよく用いられるニワトリ胚抽出液 (EE) 50%条件でも、細胞塊が大きくなったが、10% FBS よりは変化が少なかった。 $\alpha$  SMA および calponin を調べると、FBS 条件では、どちらも細胞塊全体に発現していたが、EE 条件では、内側に  $\alpha$  SMA および強い calponin 発現細胞が密に固まっており、外側には両方とも発現しない細胞が取り囲むという 2 層構造になっ

ていた。このように培養液の条件により、増殖、および分化が異なることがわかった。今後は、足場タンパク質の添加について条件検討を続け、また 3D 培養方法を確立後、YAP/TAZ シグナルを薬剤でコントロールし、増殖能を変えることで、平滑筋の分化への影響を調べる予定である。

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思われる。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、この分子機序説明がその方策につながるものと考えられる。

#### D. 結論

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、今年度の調査検討では、開発動向としては、魚介由来の開発事例が増えている事が窺え、規制動向に関しては、この時点で細胞培養食品が上市されたのはシンガポールと米国のみである事を見出し、また FAO と WHO が公表した 細胞培養食品の安全性に関するレポートでは、各国の規制状況の分析に加えて、潜在的ハザード因子の包括的な検討を行っている事を見出した。以上の調査・検討を踏えて、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザード因子を抽出できた。なお補完的な検討としての正常型プリオンの発現制御に関しては、マウス由来の骨格筋細胞株 (C2C12) では他の細胞株と比べ高いプロモーター活性を示し、また、細胞増殖因子の有無や、3次元培養により球状に組織化させたスフェロイドにおいて、プロモーター活性が顕著に変動することを明らかとし、培養条件が、正常型プリオン遺伝子の発現に大きく関与していることを示唆した。

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、今年度は、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、

調査において懸念されたハザードの一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。YAP の活性化の強さが閾値を超えると、肝がんが生じること、この時にゲノム DNA のメチル化変化 (エピジェネティック変化) が生じることを見出した。この事は、転写共役因子 YAP 遺伝子を潜在的なハザード因子として見出したことの妥当性を表すものとする。

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、今年度は、老齢マウス由来の繊維芽細胞では、細胞外マトリクス関連遺伝子群の発現が低下し、免疫・炎症関連遺伝子の発現が亢進することを明らかとし、これらが安全性の指標となり得ることが示唆された。また、ウシ気管由来単離平滑筋細胞を用い、継代による影響を検討したところ、15 継代後の場合、糖質コルチコイド系の合成経路の遺伝子発現亢進など、生理活性物質の産生の継代差が見出された。これらの事は、当該生理活性物質を潜在的なハザード因子として見出したことを表し、また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。

他方、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、今年度の検討により、ニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞の分化の維持には、細胞間接着が必要であることが示唆されたため、分化の維持に向け、ハンギングドロップ法による 3D 培養系を確立した。この際、二種の培養条件、すなわちウシ胎児血清、あるいはニワトリ胚抽出液を添加した場合について検討したところ、細胞形態及び組織構築が、両者の場合で異なり、ニワトリ胚抽出液 (EE) 50% 条件では、10% FBS 条件下の場合と異なり、内側に平滑筋、外側に非平滑筋細胞が囲むという 2 層構造をとることが明らかとなった。この成果は、細胞培養食品の作製に際しての培養条件の選択理由に資する成果と考える。

<まとめ>このように、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、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行った結果、それぞれの現状と特徴を整理することができ、ま

た潜在的なハザード因子を抽出できた。また各分担研究における検討は、当該生理活性物質及び転写共役因子 YAP 遺伝子を潜在的なハザード因子として見出したことを表し、また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。

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」の食品衛生法上の安全性評価に向けた課題や方策が明らかとなることが期待され、その安全性評価に向けた新たな制度の枠組みの設定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)

Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156  
[doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]

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) vol.34, 101478.  
[doi: 10.1016/j.bbrep.2023.101478]

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡: 細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向, 月刊「食品衛生研究」, 2023; 通巻 885 号 (73 巻 12 号), 公益社団法人日本食品衛生協会 (東京)  
[ISSN: 0559-8974]

### 2. 学会発表 (抜粋)

北嶋聡: 生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 19 日

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥生、伊藤浩人、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡: 細胞培養食品バイオハザード研究 1 マウス線維芽細胞とウシ気管平滑筋細胞を用いた遺伝子発現解析、第 50 回日本毒性学会学術年会、横浜、2023 年 6 月 19-21 日

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima, Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 – 20 July 2023.

## 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

表1 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"> <li>・動物種に関連する既知の望ましくない物質</li> <li>・潜在的な毒素/アレルゲン</li> <li>・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</li> </ul>

\* 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](https://www.sfa.gov.sg/docs/default-source/food-import-and-export/Requirements-on-safety-assessment-of-novel-foods_26Sep.pdf)

表2 FAO&WHO が4つの製造段階に着目して特定した潜在的ハザード因子

4つの製造段階（ハザード特定範囲）			
<p><b>細胞の調達</b></p> <p><b>Cell sourcing</b></p> <p>This step may include muscle biopsy, obtaining stem cells or any other cells, cell reprogramming, cell selection, cell isolation, cell storage and overall cell line development</p>	<p><b>生産</b></p> <p><b>Production</b></p> <p>This step may include cell proliferation, cell differentiation and bioreactor expansion</p>	<p><b>収穫</b></p> <p><b>Harvesting</b></p> <p>This step may include cell and/or tissue harvesting</p>	<p><b>食品加工</b></p> <p><b>Food processing</b></p> <p>This step may include any other processes after harvesting the products from the bioreactor</p>
ハザード因子*			
<p>異物混入</p> <p>動物用医薬品</p> <p>微生物毒素</p> <p>抗菌剤</p> <p>有害化学物質／食品添加物の残留物（培地安定剤、細胞機能調節剤、pH 緩衝剤、洗浄剤、着色料、香料、栄養素、ビタミンなど）</p> <p>重金属</p> <p>食物アレルギー</p> <p>病原体（細菌、ウイルス、真菌、寄生虫、原虫）（抗菌薬耐性株を含む）および病原因子（プリオン）</p> <p>意図的な遺伝子組換えによる新規アレルギー誘発性物質または有害物質（導入遺伝子が関与するものや、その結果生じる内在性遺伝子の変化を含む）</p> <p>遺伝子組換えによる新規物質（アレルギー性や毒性を有するもの）</p>			
<p>新規毒素またはアレルギー、あるいは内因性毒素またはアレルギーの増加</p>			
<p>食品成分の物理化学的変化</p> <p>潜在的に危険な構造材料および関連物質</p>			
<p>細胞からの遺伝物質の構造的・化学的変化</p> <p>マイクロプラスチック（ナノプラスチックを含む）</p>			
ハザード特定範囲に含まれない懸念事項**			
<p>摂取後の細胞の生存、腫瘍形成</p> <p>現在消費されていない生物種の細胞株が、細胞培養中に増殖する新規微生物を保有</p> <p>潜在的な汚染物質または残留物として存在する遺伝物質の存在</p> <p>細胞培養過程におけるマイコプラズマ属の汚染の可能性</p>			

\* FAO & WHO. 2023. Table 5, 6, 7, 8 より抽出      \*\* Section 4.4 より抽出  
 黄色セル：細胞培養食品に特徴的と考えられるハザード因子

## 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
	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、その安全性評価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。

昨年度（令和4年度）及び今年度（令和5年度）共に、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、バイオブシー（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、今年度はWHO等の国際機関も調査対象に含めた。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」という項目を準備した。

その結果、昨年度（令和4年度）は、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得るハザードの抽出を試み、当初の予定通り進捗した。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条件検討をおこなった。

今年度（令和5年度）の調査検討では、1) 開発動向として昨年度に引き続き、16件の開発事例を見出し分類表に基づいて整理した。代替タンパク質産業に参入した企業のリストによれば、細胞

培養食品に関しては2020年以降に設立した企業数が全体の半数以上を占め、近年企業参入が活発化していることが窺え、また開発品種では牛肉が最も多いが、2番目として魚類、3番目として鶏肉が挙がっており、16件の開発事例のうち魚介類（サーモン、クロマグロ、ハタ、甲殻類等）を開発対象とするものが6社と、魚介由来の開発事例が増えている事が窺えた。また、2)規制動向に関しては、各国におけるリスク管理方法の動向としては、安全性評価に必要な情報は示されているが、各開発品の原料となる細胞や製造方法等が多岐にわたることから、細胞培養食品全般に適用できる基準を示したガイドライン等は策定されておらず、市販前の製品毎に個別の対応が行われている状況にあることを見出した。各国の規制当局による細胞培養食品の安全性に関する審査情報の公開状況に着目すると、EU及びオーストラリア・ニュージーランドでは、細胞培養食品または Novel Food としての安全性審査に必要な要件は明示されており審査情報は公開となるが、一方、評価要件を公表しているシンガポールは審査資料及び審査結果を公開しておらず、許認可制を導入していない米国では市販前コンサルテーションの資料を公開しているのみで、いずれも審査における判断基準等は明確になっていないこと、また公表されている申請・評価・承認の事例としては、2024年4月の時点において、細胞培養食品が販売可能となったのはシンガポールと米国、イスラエルの3か国で、鶏4品目（シンガポール、米国）、ウズラ1品目（シンガポール）、牛1品目（イスラエル）と、この1年間で拡大したことを見出した。シンガポールでは Eat Just 社の鶏由来の2品目を2020年・2021年に販売承認し、米国では Upside Foods 社および GOOD Meat 社の鶏由来の製品が FDA の市販前コンサルテーションを終了し、USDA の認証取得を経て販売可能になったことが2023年6月に報道された。また、審査中であることを公式発表しているのはオーストラリア・ニュージーランドのみで、2023年1月に FSANZ に申請された Vow 社のウズラ由来の製品について、2023年12月～2024年2月に審査結果に対するパブリックコメントの募集が行われたこと、Vow 社のウズラの製品は2024年4月に先にシンガポールで販売承認を取得したことを見出した。さらに、イスラエルでは2024年1月に世界初の牛由来の製品となる Aleph Farms 社の培養牛ステーキが承認されたこと、韓国でも承認申請の受付を開始した事を見出した。加えて、FAO と WHO が2023年に公表した細胞培養食品 (cell-based food) の安全性に関するレポートでは、各国(オーストラリア及びニュージーランド、カナダ、中国、欧州(EU、英国、スイス、ノルウェー、アイスランド)、インド、イスラエル、日本、カタール、シンガポール、及び、米国)の規制状況の分析に加えて、潜在的ハザード因子の包括的な検討を行っていることを見出した。以上の調査・検討を踏えて、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザード因子を抽出でき、円滑に進捗した。なお補完的な検討としての正常型プリオンの発現制御に関しては、マウス由来の骨格筋細胞株 (C2C12) 他の細胞株と比べ高いプロモーター活性を示し、また、細胞増殖因子の有無や、3次元培養により球状に組織化させたスフェロイドにおいて、プロモーター活性が顕著に変動することを明らかとした。

このように、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、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行った結果、それぞれの現状と特徴を整理することができ、また潜在的なハザード因子を抽出できた。令和6年度(来年度)は計画に則り、調査を実施、検討し、またリスクプロファイルの作成及び安全管理の提案を行う予定である。

## 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)）<sup>1</sup>。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、その安全性評価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。

昨年度(令和4年度)及び今年度(令和5年度)共に、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原因遺伝子である正常型プリオン蛋白質の発現制御に関し検討する。特に今年度(令和5年度)の調査では、新たなリスク管理方法の動向に着目した検討を行い、引き続き、潜在的なハザードやリスクプロファイルを検討する。

## 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<sup>2</sup>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、昨年度（令和4年度）は開発企業12社、今年度（令和5年度）は開発企

<sup>1</sup> 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>

<sup>2</sup> 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：2024年4月25日）

業16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のデータベースに記載されている細胞培養食品の開発企業は2023年8月の時点で約180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16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。さらに、今年度(令和5年度)はWHO等の国際機関も調査対象に含めた。

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、昨年度は令和4年(2022年)6月下旬から8月下旬、今年度は令和5年8月中旬から10月初旬であり、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<sup>3</sup>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性が生じる可能性があり、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、たとえば、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正常型プリオン蛋白質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、正常型プリオン蛋白質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。

<sup>3</sup> 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

## C. 研究結果及び考察

昨年度(令和4年度)および今年度(令和5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:

昨年度の調査における代替タンパク質産業に参入した企業のリスト（GFIデータベース）によれば、細胞培養食品に関しては2020年以降に設立した企業数が全体の半数以上を占め、近年企業参入が活発化していることが窺えた。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、昨年度の調査で見出した12件の開発事例を含めて、今年度は16件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。

昨年度の調査終了時点（2023年3月末）における開発品の上市は、シンガポール政府が2020年12月に世界で初めて承認したEat Just社（米国）の鶏由来の細胞培養食品（チキンナゲット）と、翌2021年12月に承認された同社の鶏由来の形状の異なる製品（胸肉）の2品目のみであった。しかし、今年度の調査終了時点（2024年4月）では、米国でもUpside Foods社とGOOD Meat社（Eat Just社の細胞培養肉部門を担当する子会社）の鶏由来の細胞培養食品が販売可能となり（2023年6月）、シンガポールではVow社のウズラ由来の製品が承認され（2024年4月）、イスラエルでは世界初の牛由来の製品となるAleph Farms社の培養牛

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。

ステーキが承認されている（2024年1月）。この1年間で細胞培養食品が販売可能となった国は3か国となり、製品の数は鶏4品目、ウズラ1品目、牛1品目、開発企業数は5社へと拡大したことになる。

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。FDAとFSANZが公表した資料によると、販売可能となった鶏由来の2品目と審査中のウズラ由来の1品目の細胞培養食品には、いずれも株化細胞が使用されている。

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）。今年度の調査では、GFIの企業リストにおける開発品種では牛肉が最も多いが、2番目として魚類、3番目として鶏肉が挙がっており、表2の16件の開発事例のうち魚介類（サーモン、クロマグロ、ハタ、甲殻類等）を開発対象とするものが6社と、魚介由来の開発事例が増えている事が窺えた。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<sup>4</sup>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考えられる。

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<sup>5,6,7</sup>。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

<sup>4</sup> Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A., & Sexton, A. Bringing cultured meat to 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

<sup>5</sup> 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>

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

<sup>7</sup> 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>

Novel Foodsの枠組みの中で規制され、所管する公的機関による安全性審査と市販前承認が必要である。米国では製品に対する許認可制が導入されていないが、FDAによる市販前コンサルテーション（任意）の実施が推奨されており、調査対象としたいずれの国・地域においても上市前に安全性の確認を行うプロセスがある。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、2023年7月20日付の文書<sup>8</sup>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を含むべき」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

ことや、培養肉における意図的な使用レベルを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<sup>9</sup>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の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。2024年4月時点までに、シンガポールで販売承認されたのは、Eat Just社の鶏由来の2品目（2020年・2021年）、Vow社のウズラ由来の1品目（2024年4月）である。

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<sup>10</sup>にて発表された。2022年11月16日にUpside Foods社、2023年3月にGOOD Meat社の鶏の細胞培養食品がFDAの市販前コンサルテーションを終了し、FDAは両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<sup>11</sup>し、両社の製品はUSDAの認証取得を経て販売可能になったことが2023年6月に報道された。FDAによる市販前コンサルテーションの文書は公開されており、Upside Foods社の開発品に用いられた細胞の不活化には遺伝子組換え技術が使用されている。FDAは培養

<sup>8</sup> Requirements for the Safety Assessment of Novel Foods and Novel Food Ingredients, Singapore Food Agency. Updated 20 July 2023.

<https://www.sfa.gov.sg/docs/default-source/food-information/requirements-for-the-safety-assessment-of-novel-foods-and-novel-food-ingredients.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：2024年4月23日）

<sup>9</sup> 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：2024年4月23日）

<sup>10</sup> 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：2024年4月23日）

<sup>11</sup> 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：2024年4月23日）

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が、公開予定が当初の2022年から2024年12月末へと遅れている<sup>12</sup>。

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示されていないが、FSANZは成分によっては適用される可能性のある基準を公表している<sup>13</sup>。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。審査中であることを公式発表しているのは、調査対象とした中ではオーストラリア・ニュージーランドのみである。2023年12月～2024年2月にVow社のウズラ由来の製品の審査結果に対する1回目のパブリックコメントの募集が行われた事を見出した。なお、Vow社のウズラの製品は2024年4月に先にシンガポールで販売承認を取得した。

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<sup>14</sup>。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。

さらに、調査対象に含めていなかった国の動向として、イスラエル保健省が、2024年1月17日付でAleph Farms社の牛培養ステーキを承認したことを見出した<sup>15</sup>。これは牛由来の細胞培養食品の世界初の承認事例であるが、審査資料は公表されていない。

また、韓国の食品医薬品安全処（MFDS）（旧KFDA）が、2024年2月21日付でいわゆる培養肉・培養魚の承認申請の受付を開始したことを見出した<sup>16</sup>。具体的には、「食品等の暫定基準及び規格認定基準」を改正・告示し、この中で、細胞培養を使用して生産された原料を食品として認めるための手続きが明確化され、承認申請を行えるようになった。ただし現時点では、提出資料の要件は定められ、また審査期間は270日間と定まっているものの、審査における判断基準、及び、審査結果の公開の有無については明確になっていない。

以上のように、各国におけるリスク管理方法の動向としては、安全性評価に必要な情報は示されているが、各開発品の原料となる細胞や製造方法等が多岐にわたることから、細胞培養食品全般に適用できる承認基準等を示したガイドラインは策定されておらず、市販前の製品毎に個別の対応が行われている状況にあることを見出した。各国の規制当局による細胞培養食品の安全性に関する審査情報の公開状況に着目すると、EU及びオーストラリア・ニュージーランドでは、細胞培養食品またはNovel Foodとしての安全性審査に必要な要件は明示されており審査情報は公開と

<sup>12</sup> 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>（アクセス日：2024年4月23日）

<sup>13</sup> Food Standards Australia New Zealand, “Cell-based meat” <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/safety/Cell-based-meat>（アクセス日：2024年4月23日）

<sup>14</sup> 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://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1381>（アクセス日：2024年4月23日）

<sup>15</sup> イスラエル保健省

<https://www.gov.il/he/Departments/news/17012024-02>（アクセス日：2024年4月23日）

<sup>16</sup> 韓国 MFDS 「食品等の暫定基準及び規格認定基準」一部改正告示 [https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_207/view.do?seq=14965&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm\\_seq\\_1=0&itm\\_seq\\_2=0&multi\\_itm\\_seq=0&company\\_cd=&company\\_nm=&page=1](https://www.mfds.go.kr/brd/m_207/view.do?seq=14965&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1)（最終アクセス日：2024年4月23日）

なるが、一方、評価要件を公表しているシンガポールは審査資料及び審査結果を公開しておらず、許認可制を導入していない米国では市販前コンサルテーションの資料を公開しているのみで、いずれも審査における判断基準等は明確になっていないこと、また公表されている申請・評価・承認の事例としては、2024年4月の時点において、細胞培養食品が販売可能となったのはシンガポールと米国、イスラエルの3か国で、鶏4品目（シンガポール、米国）、ウズラ1品目（シンガポール）、牛1品目（イスラエル）に拡大したことを見出した。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<sup>17, 18, 19</sup>。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<sup>20</sup>。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。ただし、今年度の開発動向の調査結果より、特に魚介類由来の細胞を用いた場合については、家畜・家禽由来の場合との大きな相違点として、生食を想定した製品開発が行われていることにも注意が必要である。

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。

さらに、今年度は、FAO と WHO が 2023 年に公表した細胞培養食品 (cell-based food) の安全性に関するレポートを検討したところ、このレポートでは、各国 (オーストラリアおよびニュージーランド、カナダ、中国、欧州 (EU、英国、スイス、ノルウェー、アイスランド)、インド、イスラエル、日本、カタール、シンガポール、および、米国) の規制状況の分析に加えて、潜在的ハザード因子の包括的な検討を行っていることを見出した (表5)。このレポートでは、細胞培養食品の製造工程を4つの段階、すなわち、1) 細胞の調達、2) 細胞の増殖・生産、3) 細胞の収穫、および、4) 食品加工に分け、各段階における潜在的ハザード因子を特定した結果、多くのものが既によく知られた従来の食品にも存在する因子

<sup>17</sup> 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：2024年4月25日)

<sup>18</sup> 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.

<sup>19</sup> 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.

<sup>20</sup> 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> (アクセス日：2024年4月25日)

であったことから、その安全性確保には適正製造規範や衛生規範、HACCP などの既存の前提条件プログラムが適用できるとしている。これらの潜在的ハザード因子に加えて、「潜在的ハザードの特定範囲に含まれない懸念事項」として、摂取後の細胞の生存や腫瘍形成などを挙げているが、このレポート作成に係るテクニカルパネルによる検討において、その可能性は低いと評価されている。表5に示したFAO/WHOが特定した潜在的ハザード因子について検討した結果、細胞培養食品に特徴的な潜在的ハザード因子としては、新規毒素またはアレルゲン、あるいは内因性毒素またはアレルゲンの増加、細胞からの遺伝物質の構造的・化学的变化、マイクロプラスチック（ナノプラスチックを含む）であると考えられた。また、「潜在的ハザードの特定範囲に含まれない懸念事項」については、原料となる細胞の特性や不死亡の方法、培養や加工の方法によっては、潜在的ハザード因子として考慮する必要が生じる可能性もあると考えられた。

ただし、この細胞培養食品のハザード因子の同定については、細胞培養食品の上市化がままならない現状では、収集した情報が不十分な可能性が高く、今後も、開発動向とあわせて調査・検討する必要があると考える。「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:

昨年度は、マウスの正常型プリオンパク質をコードする遺伝子上流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、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た。今年度は、安定導入株とTransient transfectionの細胞を用いて、培養条件等の違いによるプリオン遺伝子のプロモーター活性の変動を検討した。

その結果、マウス由来の骨格筋細胞株(C2C12)では培養条件により他の細胞株と比べ高いプロモーター活性を示し、細胞増殖因子や3次元培養条件下など培地や培養条件の変化に伴い、プロモーター活性が有意に変動することが明らかとなった。正常型プリオン蛋白質は、その発現の増減の生物学的な意義は明らかとはなっていないが、プリオン感染に関与する原因遺伝子であり、製造・加工時の細胞培養時に想定される細胞増殖に関する培養条件が、正常型プリオン遺伝子の発現に大きく関与しうることを示唆した。

#### D. 結論

令和4年度(昨年度)は、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、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、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ハザードの抽出を行った。今年度(令和5年度)は、1)開発動向として昨年度に引き続き、16件の開発事例を見出し分類表に基づいて整理した。代替タンパク質産業に参入した企業のリストによれば、細胞培養食品に関しては2020年以降に設立した企業数が全体の半数以上を占め、近年企業参入が活発化していることが

窺え、また開発品種では牛肉が最も多いが、2番目として魚類、3番目として鶏肉が挙がっており、16件の開発事例のうち魚介類（サーモン、クロマグロ、ハタ、甲殻類等）を開発対象とするものが6社と、魚介由来の開発事例が増えている事が窺えた。また、2)規制動向に関しては、各国におけるリスク管理方法の動向としては、安全性評価に必要な情報は示されているが、各開発品の原料となる細胞や製造方法等が多岐にわたることから、細胞培養食品全般に適用できる基準を示したガイドライン等は策定されておらず、市販前の製品毎に個別の対応が行われている状況にあることを見出した。各国の規制当局による細胞培養食品の安全性に関する審査情報の公開状況に着目すると、EU及びオーストラリア・ニュージーランドでは、細胞培養食品またはNovel Foodとしての安全性審査に必要な要件は明示されており審査情報は公開となるが、一方、評価要件を公表しているシンガポールは審査資料及び審査結果を公開しておらず、許認可制を導入していない米国では市販前コンサルテーションの資料を公開しているのみで、いずれも審査における判断基準等は明確になっていないこと、また公表されている申請・評価・承認の事例としては、2024年4月の時点において、細胞培養食品が販売可能となったのはシンガポールと米国、イスラエルの3か国で、鶏4品目（シンガポール、米国）、ウズラ1品目（シンガポール）、牛1品目（イスラエル）と、この1年間で拡大したことを見出した。シンガポールではEat Just社の鶏由来の2品目を2020年・2021年に販売承認し、米国ではUpside Foods社およびGOOD Meat社の鶏由来の製品がFDAの市販前コンサルテーションを終了し、USDAの認証取得を経て販売可能になったことが2023年6月に報道された。また、審査中であることを公式発表しているのはオーストラリア・ニュージーランドのみで、2023年1月にFSANZに申請されたVow社のウズラ由来の製品について、2023年12月～2024年2月に審査結果に対するパブリックコメントの募集が行われたこと、Vow社のウズラの製品は2024年4月に先にシンガポールで販売承認を取得したことを見出

した。さらに、イスラエルでは2024年1月に世界初の牛由来の製品となるAleph Farms社の培養牛ステーキが承認されたこと、韓国でも承認申請の受付を開始した事を見出した。加えて、FAO とWHO が 2023 年に公表した細胞培養食品 (cell-based food) の安全性に関するレポートでは、各国 (オーストラリア及びニュージーランド、カナダ、中国、欧州 (EU、英国、スイス、ノルウェー、アイスランド)、インド、イスラエル、日本、カタール、シンガポール、及び、米国) の規制状況の分析に加えて、潜在的ハザード因子の包括的な検討を行っていることを見出した。以上の調査・検討を踏えて、細胞培養食品に関して想定され得る潜在的なハザード因子を抽出でき、円滑に進捗した。

なお補完的な検討として、なお補完的な検討としての正常型プリオンの発現制御に関しては、マウス由来の骨格筋細胞株 (C2C12) 他の細胞株と比べ高いプロモーター活性を示し、また、細胞増殖因子の有無や、3次元培養により球状に組織化させたスフェロイドにおいて、プロモーター活性が顕著に変動することを明らかとし、培養条件が、正常型プリオン遺伝子の発現に大きく関与することを示唆した。

(まとめ) このように、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、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行った結果、それぞれの現状と特徴を整理することができ、また潜在的なハザード因子を抽出できた。

令和6年度(来年度)は計画に則り、調査を実施、検討し、またリスクプロファイルの作成及び安全管理の提案を行う予定である。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 (抜粋)

Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-

Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina: Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation. *Stem Cells*, 2023; 41(12):1142-1156  
[doi.org/10.1093/stmcls/sxad071]

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) vol. 34, 101478.  
[doi: 10.1016/j.bbrep.2023.101478]

五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡：細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向，月刊「食品衛生研究」，2023；通巻885号（73巻12号），公益社団法人日本食品衛生協会（東京）  
[ISSN: 0559-8974]

## 2. 学会発表（抜粋）

北嶋 聡：生命科学のパラダイムシフトと毒性学の進展、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19日

堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永弥生、伊藤浩人、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡：細胞培養食品バイオハザード研究1 マウス線維芽細胞とウシ気管平滑筋細胞を用いた遺伝子発現解析、第50回日本毒性学会学術年会、横浜、2023年6月19-21日

Toshime Igarashi, Mari Matsumura, Izumi Ogawa Chiori Yakawa, Takahiko Hayakawa, Miyoko Ochi, Hirokatsu Saito, Takuya Nishimura, Makiko Kuwagata, Satoshi Kitajima,

Recent trends in regulatory systems in other countries regarding the safety assurance of new food products including so-called cultured meat 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taiwan on 17 - 20 July 2023.

## 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

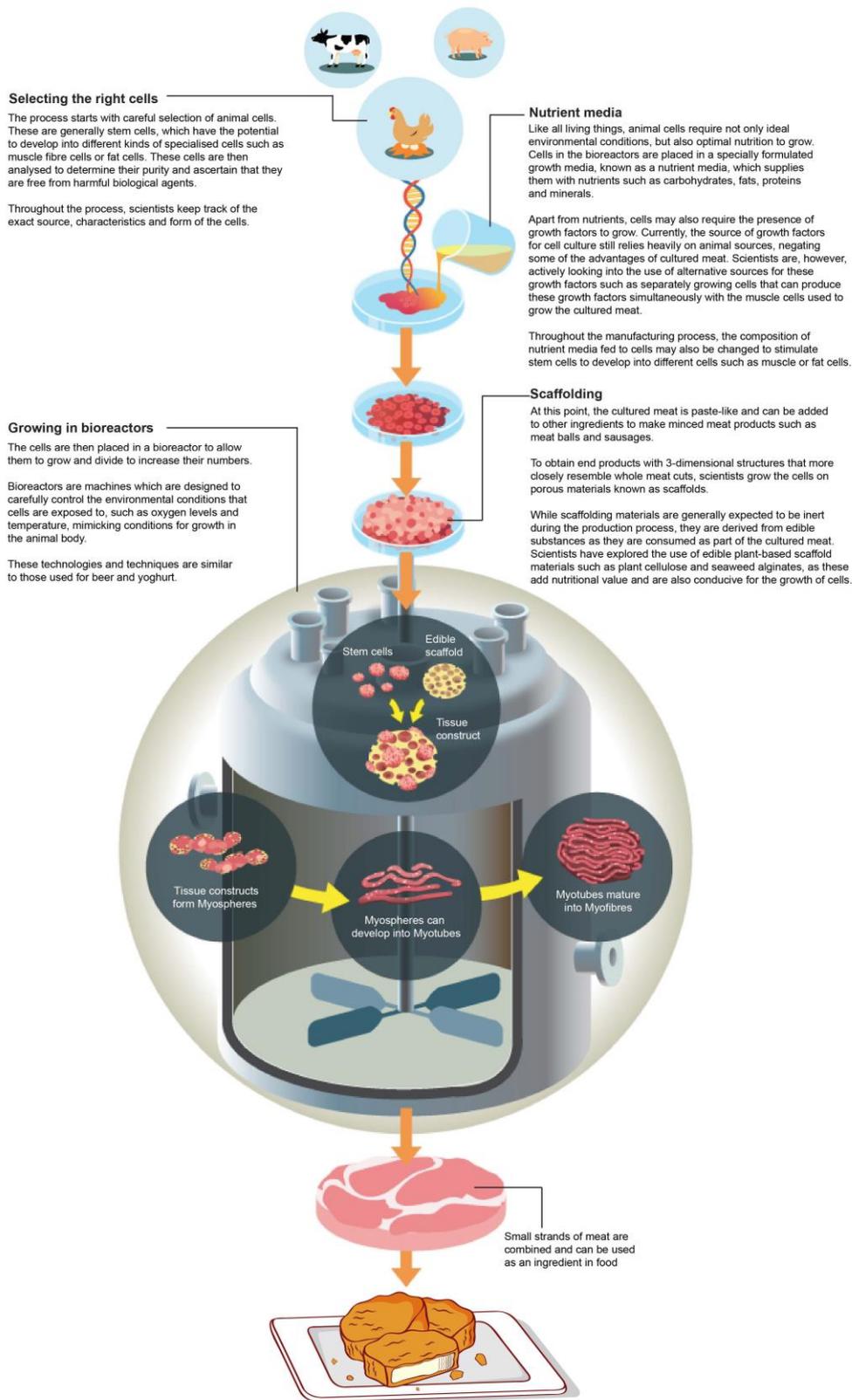


図2 シンガポール食品庁の刊行物におけるバイオリアクターを用いた細胞培養食品の作り方

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>

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、山羊及びしか、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：2023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	Wildtype (米国) 培養サーモン	2023年の米国で の販売を予定	受精卵(株化細胞)	サーモン	不明	有	不明	使用せず	不明	無 (生食を推奨)	不明	植物由来の 成分と合わせ て成形	最大20万ポンド(約 90.7トン)を生産する プラントを稼働
2	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	2022年、250Lの培 養槽を設置したバイ ロット施設を稼働
3	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年にはバイ ロット施設を開 設、市場テストを 開始	不明	クロマグロ	無	有	不明 (FBS 不含)	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基の10万Lバイ オリクターを使用 し、年間最大600万 ポンドの大規模施設 を2027年操業開始 予定。
4	Blue Seafood (旧 Bluu Biosciences) (ドイツ) サーモン、ニジマス等 のフィッシュボールと フィッシュフィンガー、 刺身や切り身	2024年中にシン ガポールで承認 予定、その後米 国、欧州をター ゲット	幹細胞を採取して 細胞株を作成(株 化細胞)	サーモン 、ニジマス	無	不明	不明 (FBS 不含)	不明	不明	不明	不明	植物タンパ ク質により食 感を最適化	2023年秋に建設工 事が完了予定 最大500リットルの 大型発酵槽による生 産拡大予定
5	Umami Bioworks (旧 Umami Meat) (シンガポール) 培養ハタ、ウナギ、ハ タハタ、鯛、マグロ等 の魚介類	2023年4月培養 ハタの試食会開 催 2023年5月日本 進出を決定	間葉系幹細胞、細 胞株を使用(株化 細胞)	ハタ、ウナギ 等魚介類	不明	有 (間葉系幹細 胞から筋肉、 脂肪を構築)	不明 (FBS に代わ る植物由来血 清、NUProtein 社の成長因子 使用の可能性 も有)	不明	不明	不明 (2023年4月 試食会時には 加熱処理有)	不明	3Dプリン ターで成形	2024年後半商業パ イロット施設が完成 予定
6	Shiok Meats (シンガポール) 培養甲殻類、培養牛 肉、豚肉、羊肉	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	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。

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
7	Upside Foods(旧 Memphis Meats) (米国) 培養鶏、牛、 魚介類	2023年6月米国 で細胞培養食品 の販売が可能	成鶏の筋肉組織由 来の筋芽細胞株と 中期受精卵の皮膚 組織由来の線維芽 細胞様細胞株(株 化細胞)	鶏	有 (ただしシス ジェニック。不 死化に際し、 ニフトリテロメ ラーゼ逆転写 酵素(TERT) を発現するシ ス遺伝子の導 入など組換え 技術を使用す る場合有)	有	有 (細胞株の開 発段階では、 ウシ又はブタ 由来の成分 (血清及びトリ プトシン)  細胞増殖や分 化の過程で は、FBS有)	細胞株の開発 段階では抗生 物質、抗真菌 薬を使用 (細胞増殖や 分化の過程で は、抗生物 質、抗真菌薬 は使用せず)	無	有 (加熱(165° F)処置を想 定)	不明	不明 (培養時には 足場等は加 えていない)	カリフォルニア州に 商業施設(EPIC)で、 2000 L 規模を定期的 に生産  イリノイ州に生産量 最大 3,000 万ポンド の工場の建設を 2023 年発表
8	Eat Just (GOOD Meat) (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  2023年6月米国 で細胞培養食品 の販売が可能	ATCCより購入した 鶏の線維芽細胞株 UMNSAH/DF1を基 に、自社で浮遊培 養及び低血清条件 に適応させた細胞 株 G1F-P1(株化細 胞)	鶏	無	無	有 (FBS有)	使用せず	無	有 (加熱(165° F)処置を想 定)	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	シンガポール生産セ ンターには 6000L の バイオリクターを 導入予定 生産設備を複数建 設(米国では 10 基 の 25 万 L のバイオ リアクター導入予定) 米国の製造は CDMO の JOINN Biologics に委託 (1000L のバイオリア クター)
9	VOW (オーストラリア) 培養うずら、カンガ ルー等	2023年2月ウズ ラ細胞培養食品 の承認申請を FSANZ が受理・ 評価開始 ※2024年4月シ ンガポールで販 売承認	細胞株として貯蓄 不死化された胚性 線維芽細胞株(株 化細胞)	うずら	無	不明	不明 (動物由来成 分不含)	使用せず	不明	有 (最低 72°C)	不明	不明	30トン生産量の製 造施設が稼働中 2024年には3000ト ンの生産量の施設 が稼働予定

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
10	Aleph Farms (イスラエル) 培養牛肉 培養コラーゲン	細胞培養食品 「Aleph Cuts」を 2023年7月にス イスで、8月に英 国で規制機関に 申請 ※2024年イスラ エル保健省が培 養牛ステーキを 販売承認	受精卵(株化細胞)	牛	無	有 (筋肉とコラー ゲンに分化)	不明 (動物由来成 分、FBS不 含)	使用せず	不明	不明 (グリル等の 加熱を想定)	不明	植物ベース の足場  (3Dバイオ プリンター: リブステーキ の場合)	パイロット設備を稼 働 Esco Asterとの提携 を発表 VBLセラピューティ クスの製造施設を買 収
11	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	筋肉および脂肪前 駆細胞(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	2021年7月パイロ ット生産施設の拡大を 発表 Esco Asterとの提携 を発表 2023年には年間最 大数十万個のハン バーガーを製造可能 とする4施設目を開 設
12	Believer Meats (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	線維芽細胞を細胞 株として貯蔵(株化 細胞)	牛 鶏 子羊 豚	無	不明	不明 (FBS 不含)	使用せず	不明	不明	不明	植物性タン パク質で細 胞を強化	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  2022年12月米国に 最低1万トンの年間 生産量となる工場の 建設を着工
13	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

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
14	インテグリカルチャー 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8000 Lの培養槽導入予 定
15	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	網目状の鋳 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 予定としていた (2022年時点)
16	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 (2022年7月 時点)	不明	不明	不明 (FBS 不含、 (2022年7月 時点))	不明	不明	不明	不明	不明	不明

\*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	EU*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 HHS-FDA	EFSA	FSANZ
規制区分	Novel Food	細胞培養食品に特化した規制枠は現時点設定されていない	Novel Food	固有の規制枠なし、Novel Food など既存の規約の範囲内で取扱う
上市プロセス	市販前承認が必要	許認可制ではない ・FDAによる市販前コンサルテーション(任意) ・USDA-FSISによる製造施設の検査済み証明(GOI)および製品の検査済みマークの取得(必須)	市販前承認が必要	市販前承認が必要
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。 ①Cultured meat 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) ②Cultured meat 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「Pre-market Consultation on Cultured Animal Cell Foods: Draft Guidance for Industry」を公表予定⇒未公開	Novel Food 全般に関するものうち、細胞培養食品に関するアイデンティとして以下項目がある 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	細胞培養食品固有の安全性審査項目は設定されていない 成分によっては、以下の基準が適用される可能性がある: ①Novel Food ②加工助剤 ③食品添加物 ④遺伝子技術の利用 ⑤ビタミンとミネラル ⑥食品の本質を示すラベル ⑦細胞培養食品の定義 ⑧食品の安全要件  このうちの、①Novel Food の安全性審査項目: 食品の特性、不純物プロファイル、製造工程、食品曝露量に関する情報等、動物由来の場合は組成、毒性等の軽減方法、等
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	遺伝子組換え技術及びその応用食品に特化した規制枠組はないが、表示に関する規制があり、細胞培養食品への適応は現状明確でない	GMO の規制(Regulation (EC) No 1829/2003)を適用	「遺伝子技術の利用」の場合は当該枠が適応となる。
審査情報の公開	現状では非公開	・許認可制ではないため、審査資料に該	原則公開、申請者の利益	通常は申請資料および評

開		<p>当するものがない</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・FDA による市販前コンサルテーションの文書は公開(申請者の利益を損なう除法は非開示)</li> <li>・USDA-FSIS による製造施設および製品の検査に係る資料は非公開</li> </ul>	を損なう場合は非公開	価文書を公開
公表された申請、評価、承認の事例	<p>①2020年12月: Eat Just 社の培養チキンナゲット(鶏)の販売を承認</p> <p>②2021年12月: Eat Just 社の培養チキンの胸肉(鶏)の販売を承認</p> <p>③2024年4月: Vow 社の培養ウズラ肉の販売を承認</p>	<p>FDA は2社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]</p> <p>①2022年11月: Upside Foods 社の鶏培養肉</p> <p>②2023年3月: GOOD Meat 社の鶏培養肉</p> <p>⇒2023年6月、2社は USDA-FSIS による製造施設の検査済み証明(GOI)および製品の検査済みマークを取得し販売が可能になったと報道</p>	無	<p>2023年2月: Vow 社のウズラ細胞培養食品の承認申請を FSANZ が受理・評価開始</p> <p>(当初の予定では2024年5月中旬に官報掲載だったが、追加情報が必要とFSANZが判断し審査が予定より遅延)</p> <p>2023年12月~2024年2月: 上記の審査結果に関する1回目のパブリックコメント実施</p>

\*1 Requirements for the Safety Assessment of Novel Foods and Novel Food Ingredients, Singapore Food Agency. Version dated 20 Jul 2023. <https://www.sfa.gov.sg/docs/default-source/food-information/requirements-for-the-safety-assessment-of-novel-foods-and-novel-food-ingredients.pdf> \*2 FDA, Human Food Made with Cultured Animal Cells ; <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/human-food-made-cultured-animal-cells> \*3 European Food Safety Authority (2021), "Guidance on the preparation and submission of an application for authorisation of a novel food in the context of Regulation (EU) 2015/2283 (Revision 1)"; <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/6555> \*4 Food Standards Australia New Zealand, "Cell Based Meat" <https://www.foodstandards.gov.au/consumer/safety/Cell-based-meat> (最終アクセス 2024年4月23日)

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"> <li>・動物種に関連する既知の望ましくない物質</li> <li>・潜在的な毒素/アレルゲン</li> <li>・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</li> </ul>

\* 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>

表5 FAO&WHO が4つの製造段階に着目して特定した潜在的ハザード因子

4つの製造段階（ハザード特定範囲）			
<p><b>細胞の調達</b></p> <p><b>Cell sourcing</b></p> <p>This step may include muscle biopsy, obtaining stem cells or any other cells, cell reprogramming, cell selection, cell isolation, cell storage and overall cell line development</p>	<p><b>生産</b></p> <p><b>Production</b></p> <p>This step may include cell proliferation, cell differentiation and bioreactor expansion</p>	<p><b>収穫</b></p> <p><b>Harvesting</b></p> <p>This step may include cell and/or tissue harvesting</p>	<p><b>食品加工</b></p> <p><b>Food processing</b></p> <p>This step may include any other processes after harvesting the products from the bioreactor</p>
ハザード因子*			
<p>異物混入</p> <p>動物用医薬品</p> <p>微生物毒素</p> <p>抗菌剤</p> <p>有害化学物質／食品添加物の残留物（培地安定剤、細胞機能調節剤、pH緩衝剤、洗浄剤、着色料、香料、栄養素、ビタミンなど）</p> <p>重金属</p> <p>食物アレルギー</p> <p>病原体（細菌、ウイルス、真菌、寄生虫、原虫）（抗菌薬耐性株を含む）および病原因子（プリオン）</p> <p>意図的な遺伝子組換えによる新規アレルギー誘発性物質または有害物質（導入遺伝子が関与するものや、その結果生じる内在性遺伝子の変化を含む）</p> <p>遺伝子組換えによる新規物質（アレルギー性や毒性を有するもの）</p> <p>新規毒素またはアレルギー、あるいは内因性毒素またはアレルギーの増加</p> <p>食品成分の物理化学的変化</p> <p>潜在的に危険な構造材料および関連物質</p> <p>細胞からの遺伝物質の構造的・化学的変化</p> <p>マイクロプラスチック（ナノプラスチックを含む）</p>			
ハザード特定範囲に含まれない懸念事項**			
<p>摂取後の細胞の生存、腫瘍形成</p> <p>現在消費されていない生物種の細胞株が、細胞培養中に増殖する新規微生物を保有</p> <p>潜在的な汚染物質または残留物として存在する遺伝物質の存在</p> <p>細胞培養過程におけるマイコプラズマ属の汚染の可能性</p>			

\* FAO & WHO. 2023. Table 5, 6, 7, 8 より抽出      \*\* Section 4.4 より抽出

黄色セル：細胞培養食品に特徴的と考えられるハザード因子

## 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、まず 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 (*Stem Cells* 2023)。

加えて、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、調査において懸念されたハザードの一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。その結果、YAP の活性化の強さが閾値を超えると、肝がんが生じること、この時にゲノム DNA のメチル化変化 (エピジェネティック変化) が生じることを見出した。

## 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 種類の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 日目にかけてブラキリー 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 HMGCR 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。

加えて、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、調査において懸念されたハザードの一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。

## 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为本研究の候補として選択した。ネットワーク解析には、NetworkAnalyst 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ました。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  $\mu$ 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 ( $3 \times 10^3$ ) をLIFを含まない培地で25  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

#### プラスミド

Flag タグおよび Myc タグ×5 (5つの Myc がタンデムになっている) を付加した Full-length human YAP cDNA を pLIVE プラスミド (Mirus Bio) の Xba I サイトに挿入した発現ベクターを用いた。IRES 型プラスミドも同様に Flag-Myc-YAP (2SA)-IRES-NLS-Cre cDNA を pLIVE プラスミドの Xba I サイトに挿入した発現プラスミドを用いた。YAP (1SA), YAP (2SA), YAP (5SA) は PCR を用いてサイト特異的に変異を導入したものを用いた<sup>7</sup>。発現プラスミドに挿入されたそれぞれの cDNA はマウス AFP エンハンサーおよびマウス Albumin プロモーターによって発現が誘導される。

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 発現プラスミド (20  $\mu$ g) をマウス体重の約 10% 量の TransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus Bio) に希釈した (20-23g のマウスに対して 2 ml)。実験に使用するマウスの尻尾を 42-50°C のお湯に 20-30 秒浸し、2.5ml シリンジと 27G の注射針を用いて発現プラスミドを希釈した溶液を尾静脈から約 7-8 秒で導入した。

#### HE 染色

マウス肝臓を 4% paraformaldehyde (PFA) 中で 4°C で一晩振盪し、固定した。PFA 固定後 70% EtOH 中で一晩固定した。EtOH 固定後の肝臓は分葉し、Thermo Excelsior ES を用いてパラフィン置換した。パラフィン置換した肝臓を用いてパラフィンブロックを作製した。MICROM HM335E を用いてパラフィンブロックを 5  $\mu$ m の厚みに薄切し、切片を作製した。薄切切片の脱パラフィンは、Xylene で 15 分間×2 回、100% EtOH で 10 分間×2 回、90% EtOH で 5 分間×1 回、70% EtOH で 5 分間×1 回、流水で軽く洗浄後、Milli-Q で軽く洗浄する手順で行った。脱パラフィン後の切片を Mayer's Hematoxylin で 10 分間染色し、42-45°C のお湯で 10 分間処理した後に、Eosin で 5 分間染色した。染色後の切片は 70% EtOH で 1 分間×1 回、100% EtOH で 3 分間×2 回、100% EtOH で 5

分間×1 回、Xylene で 5 分間×2 回洗浄する手順で透徹し、MOUNT-QUICK (DAIDO) とカバーガラスを用いて封入した。組織像の観察及び撮影は、BZ-X710 (KEYENCE) で行った。

#### (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 K0 マウス) の 2 つの K0 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ました。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りました。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、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、 $\beta$ -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 $\beta$ -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 $\beta$ -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マーカーであるブラキリー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、ブラキリー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、ブラキリー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 (セラミド誘導體) 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。スフィンゴシン-1-リン酸などのセラミド代謝関連生理活性物質を潜在的なハザード因子として見出した。

#### C-3 YAP活性化の強弱とエピジェネティック変化、肝細胞がん発症誘導の相関

リン酸化されるアミノ酸残基SerをAlaに置換した3種類のYAP変異体 (1SA, 2SA, 5SA)

は、タンパク質の安定性や核への移行能力に違いがあり5SA>2SA>1SAの順番の強弱を示す。我々のマウス肝細胞にYAP(1SA)を発現誘導する実験系では、肝細胞がんは発症しなかった。一方、YAP(2SA)やYAP(5SA)では4ヶ月経過すると肝細胞がんが発症した。発症した肝細胞がんのゲノムのメチル化解析を行った結果、正常組織とは異なり、メチル化の低下や亢進が観察された。以上の結果は、YAP活性化の閾値を超え、ゲノムDNAのメチル化変化(エピジェネティック変化)が生じると、肝がんが発症することを示唆する。

#### 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、原著論文として報告した(*Stem Cells* 2023)。また、培養細胞の大量化への利用が期待されている転写共役因子YAP遺伝子の長所とリスクに関する基盤的知見を得た。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6年度)は今年度の結果を受け、更なる進展を予定している。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

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 Sinclear, Junichi Maruyama, Shunta Nagashima, Kyoko Arimoto-

Matsuzaki, Joshua Agbemefa Kuleape, Hiroaki Iwasa, Hiroshi Nishina, Hata, Yutaka, Protein kinase C $\alpha$  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評価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。

今年度は、成熟個体マウス(8週齢)と老個体マウス(36カ月齢)から様々な内臓臓器を採取し、各内臓臓器のPlatelet Derived Growth Factor (PDGF)  $\alpha$  receptor (PDGFR $\alpha$ )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、繊維芽細胞の遺伝子変動は加齢による差よりも臓器間での差が大きいことがわかった。さらにすべての内臓臓器に共通して、加齢により細胞外マトリックス関連遺伝子群の発現が低下し、免疫・炎症関連遺伝子の発現が亢進することが判った。

次に、ウシ気管由来単離平滑筋細胞を用いて異なる実験者による実験技術による培養による発現遺伝子変動解析を、細胞培養食品バイオハザード研究モデルとして実施した。結果、実験者の細胞培養実験技術の差により継代による発現遺伝子群の変動が大きく異なることが判った。

ウシ気管培養平滑筋においては、初代培養から培養を15代まで継代した細胞群遺伝子発現解析をPCA解析によりYoung、Intermediate、Agedの3群にわけ生体にとって毒性のある化学物質について合成、分解系の遺伝子発現解析を行った。結果、15継代後にセロトニン系やノルアドレナリン系の分解系の遺伝子発現の低下、糖質コルチコイド系の合成経路の遺伝子発現亢進が認められた。

以上の成績から、1) 老齢動物では炎症誘発化学物質やがん関連遺伝子の発現増加の可能性が増加する可能性が示された。すなわち、老齢動物(あるいは老齢動物由来の臓器)からの培養細胞食品の製造は避けるべきであると考えられた。2) 細胞外マトリックス関連遺伝子群と免疫・炎症関連遺伝子群の発現増減は培養細胞食品の安全性評価の指標となる、ことが示唆された。また、細胞外マトリックス関連遺伝子群の発現変動は食感や味覚にも影響を与える可能性が考えられた。3) 培養細胞食品の品質管理において、培養工場ごとに安定した培養技術・環境が求められることが明らかになった。4) 生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子発現変動の解析は安全性評価に有用と考えられた。

## 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評価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。

（二年度の研究目的）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。本年度は、マウスを用いて成熟個体と老齢個体から肺、肝臓、小腸、骨格筋、脂肪、心臓の各臓器を摘出し、それぞれの若齢、老齢臓器から線維芽細胞を採取しそれらの遺伝子発現解析を比較解析することで、臓器間での老齢化による共通して変動する遺伝子群や、臓器特異的に変動する遺伝子群について解析し、細胞培養食品の品質の指標となる遺伝子群の同定を試みることを第一の目的とした。また、初年度に樹立したウシの気管平滑筋単離培養実験系において、異なる実験者による実験技術による培養による発現遺伝子変動解析を、細胞培養食品バイオハザード研究モデルとして実施した。さらに、発現遺伝子から生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子発現変動について解析した。

## 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（8週令

の成熟雄マウス、ならびに36カ月齢の老齢雄マウス）から、腓腹筋、肝臓、心臓、肺臓、小腸、脂肪を採取した。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 Growth Factor Receptor  $\alpha$  (PDGFR  $\alpha$ ) を発現する線維芽細胞様の間質細胞（以下P $\alpha$ 陽性線維芽細胞様細胞）を採取した（CD31<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>PDGFR  $\alpha$ <sup>+</sup>細胞集団）。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%コンプレントの状態ですべて継代した。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大学院生に同様に実験を行い、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

（6種類の臓器の同一細胞における老齢化による遺伝子発現変動）

まず、成熟個体と老齢個体から採取したP $\alpha$ 陽性線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、線維芽細胞の遺伝子変動は加齢による差よりも臓器間での差が大きいことが明らかになった。また、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すべての臓器に共通して高かった。また、逆に、線維化関連遺伝子群の発現は全ての臓器に共通して低かった。

（ウシ気管平滑筋培養細胞系を用いたバイオハザード研究）

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同じロットの細胞から二人の実験者AとBが同時にそれぞれ細胞培養を行い、15代まで細胞を継代した。初代培養細胞（P0）、初代継代細胞（P1）、2代継代細胞（P2）、5代継代細胞（P5）、10代継代細胞（P10）、ならびに15

代培養細胞（P15）よりそれぞれRNAを抽出し、RNAseq解析をおこない、実験者AとBによる実験手技に由来するであろう発現遺伝子の変動について解析した。比較的細胞培養実験に熟練している実験者Aについては、P0からP15まで継代を追ってPCA解析での分散が変化したのに対して、細胞培養実験技術に熟練していない実験者Bについては、P0からP15までの継代数に関係なくPCA解析での分散がばらつく成績を得た。

また、生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子の細胞継代による発現変動解析において、セロトニン系やノルアドレナリン系の分解系の遺伝子発現の低下と、糖質コルチコイド系の合成経路の遺伝子発現の亢進が認められたが、ヒスタミン系については遺伝子発現に継代による有意な差は認められなかった。

#### D. 結論

老齢個体からの細胞を使用することにより細胞外マトリックス関連遺伝子群の発現低下し、免疫・炎症関連遺伝子群の発現が増加したことから、1) 老齢個体の細胞を使うことで食感や味覚に影響する可能性、2) 老齢個体の細胞を使うことで、炎症誘発化学物質やがん関連遺伝子発現の増加の可能性、3) 上記二つの遺伝子群の変動は細胞培養食品の品質管理の指標となること、が示された。

実験者の手技により細胞の発現遺伝子は継代によって大きく変動したことから、4) 培養細胞食品の品質管理において、培養工場ごとに安定した培養技術・環境が求められることが明らかになった。

細胞培養によっていくつかの生理活性物質関連遺伝子に変動が認められたことから、5) 生体にとって有害な活性物質の合成・分解系に係わる遺伝子発現変動の解析は安全性評価に有用と考えられた。

#### 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) vol. 34, 101478.

DOI: 10.1016/j.bbrep.2023.101478

##### 2. 学会発表

細胞培養食品バイオハザード研究1

マウス線維芽細胞とウシ気管平滑筋細胞を用いた遺伝子発現解析

堀 正敏、三原大輝、後藤 もも、徳永弥生、伊藤浩人、茶園貴志、黒澤珠希、北嶋 聡

日本毒性学会 第50回学術年会 (2023)6月19-21日 (横浜市)

#### 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

## 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

分化した細胞は増殖しにくい。そのため、「細胞培養食品」のための細胞培養では株化や不死化などの過程を経ることが必要となる。しかし、この過程で何が起きているのか、培養後の細胞はソース細胞と同じ細胞なのかなどの解析は困難であり、リスク因子となりうる。本分担研究では、分化した胚の細胞をその性質を保ったまま増殖させることで、胚の平滑筋がリスクの少ない「細胞培養食品」のソースとなるかを検討すると同時に、その時の培養リスクの解析を行った。昨年度確立した、ニワトリ14日胚の砂嚢平滑筋層の細胞塊からの培養をより詳細に解析したところ、細胞塊から這い出した直後、細胞は密に集まり、平滑筋の性質を保っているが、その後細胞密度が下がり、継代を経て筋線維芽細胞へと変化していることが判明した。さらに、単離した平滑筋細胞は細胞塊からの培養に比べ、早く筋線維芽細胞へと変化することから、平滑筋の細胞間接着がその分化の維持に必要ではないかと考えた。細胞間接着を保ったまま培養するために、3D培養を試みた。ウシ胎児血清またはニワトリ胚抽出液を添加した培養液でハンギングドロップ法を用いて平滑筋細胞塊を培養したところ、細胞塊が大きくなるのが観察された。また細胞塊中では器官培養で見られるネクロシスは起こっておらず、全ての細胞が平滑筋収縮タンパク質である $\alpha$ Smooth muscle actinを発現していた。ウシ胎児血清添加培地では、全ての細胞で別の平滑筋収縮タンパク質であるcalponinを発現していたが、ニワトリ胚抽出液では一部の細胞のみがcalponinを発現し、calponin陽性細胞は固く塊状に集まっていた。この後は3D培養での細胞形態、増殖、2つの因子での組織構築の違いの機序などを研究してゆきたい。

## 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」のリスクとして培養中に細胞が変化してしまうことが考えられる。これはほとんどの細胞にとって、「増殖」と「分化」はトレードオフになっているためである。特に成体の分化細胞はほとんど増殖しないため、効率の良い培養には、培養中に偶然または何らかの因子を用いて株化または、不死化した細胞を増殖させるしかない。これらの細胞はゲノムに何らかの変化が起きていると考えられ、もとの細胞の性質とはかけ離れてしまっている可能性が高いが、それを解析するのは非常に困難であり、食品のリスク因子になりうる。

一方、胚の細胞には、胚に必要な細胞分化をしているが、増殖能も併せ持つものがある。例えば、ある程度成長した胚の消化管の上皮は胚型の消化酵素を分泌し、蠕動運動を起こすことから、平滑筋や神経、ペースメーカーなどの細胞が分化していることがわかる。ニワトリ胚の砂嚢は成体では、咀嚼器官として働くため平滑筋層が著しく発達しているが、胚でもすでに平滑筋の種々の収縮タンパク質を発現し、分化した平滑筋が、著しく増殖することで大きくなることが知られている。このような胚で分化を保ったまま増殖できる細胞をソースとして、もとの分化状態を保ったまま培養することができれば、より安全な「細胞培養食品」を作ることができると考えられる。本研究では、ニワトリ胚砂嚢平滑筋細胞を分化を保ったまま培養する条件を探ることを目的とした。

既に先行研究で砂嚢平滑筋は単離細胞培養において、インスリン添加条件では分化を保って培養でき、ウシ胎児血清(FBS)添加条件では筋線維芽細胞(myofibroblast)に脱分化すると言われている。また、分化を保つような培養条件ではほとんど増殖していないことも報告されている。そこで、昨年度は単離細胞の培養ではなく細胞塊からの培養を用い、FBS添加条件下で平滑筋が増殖培養可能かを調べた。本年度は、昨年度確立し

た培養条件で、より詳細に平滑筋細胞の分化状態を調べたところ、細胞塊から這い出した直後は平滑筋分化を維持できているが、その後、筋繊維芽細胞へ変化してゆくこと、単離細胞の方がその変化が早いことを見出した。この違いが細胞間接着の違いではないかと考え、ハンギングドロップ法での砂嚢平滑筋3D培養法の確立を目指した。

## B. 研究方法

### 組織

ニワトリ(ヒペコネラ種)の14日胚の砂嚢平滑筋層を単離し、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(A5-4)に従って実施した。

### 細胞塊の作成

単離した4日胚の砂嚢の平滑筋層をハサミで細かく切断した後、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または、0.2-0.5mmの細胞塊を作成した。

### 平面細胞培養

細胞塊をDMEM培地1, 10%ウシ胎児血清(FBS)条件で、コラーゲンコートしたチャンバースライドに播種した。また、細胞塊をさらにピペッティングし、単離細胞にしたものも同様の条件で播種した。細胞はCO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。6-7日後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 $\alpha$ Smooth muscle actin( $\alpha$ SMA)およびcalponin抗体で免疫染色をおこなった。

### ハンギングドロップ培養

DMEM培地0.2, 1, 10%ウシ胎児血清(FBS)条件または、DMEM培地50%ニワトリ胚抽出液(EE)条件を用いた。EEは12日胚の胚全体を取り出してDMEM培地に1:1で混ぜ、ブレンダーにかけたものを遠心し、その上澄を用いた。シャーレの蓋に20 $\mu$ lの培地を滴下し、培地

の中に細胞塊を入れた後、PSBを入れたシャーレに蓋を被せることでハンギングドロップにし、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養した。培養した細胞塊は、凍結切片作成後、 $\alpha$  SMA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. 培養中の砂囊平滑筋細胞の分化状態

昨年度の研究で確立したDMEM培地1, 10% FBS条件での砂囊平滑筋の細胞塊からの培養で、培養後の平滑筋は $\alpha$  SMA 陽性ではあったが、その形態はスピンドル型から広がって仮足が見られる形態まで様々だった。そこで、 $\alpha$  SMA や calponin の強度、細胞内局在も含めてその分化状態を確認した。

#### ① 細胞塊からの這い出しと培養平滑筋細胞の性質

培養すると、平滑筋細胞塊から著しく細いスピンドル型の細胞が分裂しながら這い出してくる。この時、細胞は密で、核は小さく、 $\alpha$  SMA は弱陽性、calponin は細胞全体で見られた。これは、培養前の14日砂囊平滑筋組織と同様であるため、分化型平滑筋の状態だと考えられる。一方、這い出した細胞は細胞塊から離れると、細胞密度が下がり、形態はスピンドル型で $\alpha$  SMA は陽性、calponin は細胞の一部、核周辺のみで見られた。これは、平滑筋から筋線維芽細胞へと変化する途中であると考えられる。

これらの細胞を継代すると、細胞は徐々に密度を下げ、それと同時に核は大きくなり、 $\alpha$  SMA が強く発現、calponin は細胞の一部のみに発現または見られなくなることが判明した。

この結果から、培養した細胞は細胞塊から離れると、細胞形態、密度、核の形態、収縮タンパク質の発現が変化することが示唆された。また、培養を続けると、細胞はさらに変化し、筋線維芽細胞の特徴を示すことがわかった。

#### ② FBS 濃度と培養平滑筋細胞の性質

FBS の濃度を変えると、高濃度(10%)の方が、低濃度(1%)の時よりも増殖が早いことが、昨年度の研究からわかっていた。一方、細胞塊からの這い出しは、1%では培養2, 4, 6日の全てで見られたが、10%では培養2日より後ではほとんど見られなかった。さらに10%の培養4, 6日では、細胞塊の近辺でも細胞密度

が下がり、形態はスピンドル型で $\alpha$  SMA は陽性、calponin は細胞の一部、核周辺のみで見られたため、筋線維芽細胞様に変化をおじていることが示唆された。

#### ③ 細胞塊の大きさの違いと培養平滑筋細胞の性質

次に細胞塊の大きさで培養細胞の状態を比較した。比較的大きな細胞塊からは著しく細いスピンドル型の細胞が這い出し、細胞は密で、核の大きさ、 $\alpha$  SMA, calponin の発現様式から、分化型平滑筋の状態と考えられた。一方、小さな細胞塊から這い出した細胞は、すぐに変化し、筋線維芽細胞様になった。

#### ④ 単離細胞の培養と細胞階からの培養の比較

細胞塊の大きさが培養細胞の分化に影響しているという結果が出たため、単離細胞と細胞塊培養の比較をおこなった。細胞塊からの培養では、1%FBS条件、培養2, 4, 6日で細胞塊の周辺で分化型平滑筋が維持され、細胞塊から離れたところで、スピンドル型で $\alpha$  SMA は陽性、calponin は細胞の一部という、筋線維芽細胞様になった一方、同様の培養液を使った単離細胞の培養では、培養2日ですべての細胞が筋線維芽細胞様となり、6日では広がった線維芽細胞状の形態を示し、筋線維芽細胞となったことが示唆された。

このように単離細胞からの培養では、砂囊平滑筋はその特徴を早く失う。単離細胞の細胞密度は初めから疎であることが原因の一つであると考えられる。

### C-2 細胞塊の3D培養方法の確立

細胞塊の培養からは、這い出してすぐの細胞は蜜で平滑筋の特徴を保っているが、その外側では密度が下がり筋線維芽細胞様に変化すること、また、単離細胞の培養では、すぐに平滑筋の特徴を失うことがわかった。これらの結果から、培養時の平滑筋細胞の密度が分化の維持に重要なのではないかと仮説を立てた。平面培養では、細胞は単層で増殖するのに対し、3D培養では細胞同士が密着したまま培養できる。そこでハンギングドロップ法で砂囊平滑筋細胞塊の培養を試みた。

まず、DMEM培地0.2, 1, 10% FBS条件で平面細胞塊培養と同様の大きさの細胞塊を10個程度入れ、ハンギングドロップ法で培養した。6日間の培養を行ったが、細胞塊培養どうしはあまり接着しなかった。そこで、0.2-0.5mm程の大きめの14日砂囊組織片をハンギング

ドロップ法で培養した。すると、DMEM 培地 0.2, 1 %FBS 条件下では、細胞塊はあまり大きくならなかったが、DMEM 培地 10%FBS 条件下では、細胞塊の直径は 1.5-2 倍程度大きくなった。この後、この細胞塊を 28 日間培養したが、培養 7 日以降、その直径は大きくなり、14 日から 21 日の間に細胞塊は小さくなった。

次に DMEM 培地 10%FBS 条件にくわえ、ニワトリ消化管器官培養でよく用いられるニワトリ胚抽出液 (EE) を 50%含む DMEM でも 1, 4, 6 日間ハンギングドロップ法で培養し、細胞塊内部の細胞の状態を調べた。

培養 1 日では、どちらの培養液でも細胞塊全体に  $\alpha$  SMA, calponin が発現しており、内部の細胞の並びは砂囊平滑筋組織と似ていた。その後 4 日や 6 日では、FBS を添加した DMEM で培養した細胞塊はそのまま組織片全体で  $\alpha$  SMA, calponin が発現したが、平滑筋特有の組織構築は消失し、細胞は方向性なく並んでいた。一方、EE を含む DMEM で培養した細胞塊では、 $\alpha$  SMA は組織全体で発現したが、一部の細胞が calponin を発現する非常に密な塊を作っていた。この calponin 陽性細胞塊は細胞塊の内部、または一方の端に存在し、細胞塊は明瞭な二層構造になっていた。また EE を含む培養液で培養した細胞塊は、明視野での観察でも光の透過性が低く、細胞が密であることを示していた。どちらの培養でも組織培養で細胞塊の中心によく見られるネクロシスは観察されなかった。

#### D. 結論と今後の展望

本年度の実験で、細胞塊からの平面培養では細胞が密でいるところでは平滑筋分化を維持できるが、細胞間の接着が無くなると、筋線維芽細胞への変化が促進されることが示唆された。また、分化状態を保つため、細胞を密着させたまま培養する、砂囊平滑筋の 3D 培養系を確立しつつある。今後は、3D 培養での細胞の形態の観察、FBS と EE での培養で違う組織構築ができる機構、それぞれの条件での増殖効率、他の因子を加えることでより平滑筋組織に近い培養ができるかなどを調べて行く予定である。また、砂囊平滑筋の 3D 培養系の確立後は、細胞接着だけでなく、細胞増殖が平滑筋分化にどのような影響を与えるかを調べるため、YAP/TAZ シグナルに注目して解析する予定である。

#### 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
Jing Pu, Satoshi Kofuji, Yoshimi Okamoto-Uchida, Keiko Danzaki, Ruoxing Yu, Akira Suzuki, Satoshi Kitajima, Hiroshi Nishina	Lethal Phenotype-Based Database Screening Identifies Ceramide as a Negative Regulator of Primitive Streak Formation	Stem Cells	41(12)	1142-1156	2023
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	34	101478	2023
五十嵐智女、西村拓也、北嶋聡	細胞培養食品に係る開発や諸外国の衛生規制に関する最近の動向	食品衛生研究	73 巻 12 号	17 - 32	2023

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 本間 正充

次の職員の令和5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5年度 厚生労働科学研究費補助金 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) 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"/>	東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部動物実験委員会	<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」、「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 6年 2月 5日

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5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) 難治疾患研究所 ・ 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」、「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 6年 4月 9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5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) 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」、「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。