

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）
「新たなバイオテクノロジーを用いて得られた食品の安全性確保と
リスクコミュニケーションのための研究」
分担研究報告書（令和2年度）

ゲノム編集生物作製における現象解析と規制の進め方

研究分担者 木下 政人（京都大学農学研究科）

研究要旨：

ゲノム編集技術（CRISPR/Cas9）を用いて、これまでに我々が作出したゲノム編集トラフグを用いて以下の研究を行なった。1）レプチン受容体遺伝子機能欠失トラフグおよびメラノコルチン4型受容体遺伝子欠失トラフグを用いて、フグ毒（テトロドトキシン：TTX）の体内分布様式を検討した。TTXの経口投与24時間後の各臓器の蓄積を検討した。その結果、ゲノム編集魚および非編集魚いずれにおいても筋肉、皮、精巣には蓄積されず、肝臓と卵巣に蓄積された。この知見は従来のトラフグのフグ毒含有部位と同一であった。2）レプチン受容体遺伝子機能欠失トラフグの骨格筋ホモジネートをラットに2週間経口投与を行い、外見的所見、血液学的検査、血液生化学的検査により毒性を検討した。その結果、ゲノム編集魚骨格筋に毒性は見られなかった。

A. 研究目的

近年急速に発展してきたゲノム編集技術は、「生物種を選ばず、ゲノム上の狙った配列を改変できる」という特性から、農林水産物の育種に応用され始めている。この技術では、「短期間で狙った形質を持つ品種」を作製することが可能であるため、本技術は品種改良方法・育種方法として、今後定着していくものと考えられる。

しかしながら、本技術は歴史が浅いため、この技術で作製された食品に対して、消費者が安全性に不安を持っているのが現状である。加えて、安全性を確認する機関においても安全性への具体的な評価基準の策定に至っていない。

水産物は、これまでの「とる漁業が中心」の時代から、「作る・育てる漁業」へと変わってきたものの、品種の作製や育種が、作物や畜産物に比べて大幅に遅れている。一方、世界的な人口増加と健康食志向の高まりから養殖業が発展してきており、消費者ニーズに合った水産物の作出が望まれるようになってきた。このような背景から、短期間で優良形質を固定化できるゲノム編集技術の導入が水産物育種に活用され始めた。今後、多様な水産物においてゲノム編集技術による新品种・新食品が作製されていくものと思われる。

そこで本研究は令和2年度、自身で作出したゲノム編集トラフグを用い、それらの特性を検討し、食品安全性評価法策定に提言を与えるのを目的とした。

具体的には、1）ゲノム編集によりフグ毒の体内分布が変化するのか、2）ゲノム編集トラフグ骨格筋（可食部）が毒性を有するのか、を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) フグ毒の体内分布の検討：

ゲノム編集によりレプチン受容体遺伝子 (*lepr*)、メラノコルチン4型受容体遺伝子 (*mc4r*) を破壊したトラフグ、および非編集トラフグに市販のテトロドトキシン (和光 TTX206-11071) を 0.4 mg/Kg となるように単回経口投与した。投与24時間後に即殺、解剖し、皮、筋肉、肝臓、生殖巣を摘出して使用するまで冷凍保存した。解凍後、細切したのち 1 g に 0.1% 酢酸 4 mL を添加し 100°C で 10 分間加熱後、冷却、遠心分離し、上清をフィルターろ過して TTX の抽出を行なった。抽出液を HPLC-FLD に供することで、TTX を蛍光検出器 (励起波長 381nm、検出波長 505nm) で定量した。

2) 骨格筋の毒性の検討：

lepr を破壊したトラフグ 4 個体、および、非ゲノム編集トラフグ 4 個体（雌雄 2 個体づつ）それぞれから、背部普通筋を採取し、1.5 倍量のミリ Q 水を用いてホモジナイズした後、目開き 0.42mm のメッシュを通し、筋肉ホモジネートとした。これをラット（Slc:SD 系統、SPF グレード、雄、6 週齢）に各トラフグホモジネートにつき 2 匹に、ゾンデを用いて胃内に 1 日 1 回注入した。これを 14 日間行なったのち、血液を採取し、血液学的検査および血液学的検査を行なった。

また、試験前中後での各個体の体重、試験期間後の肝臓および腎臓の重量測定を行い、試験期間を通じて外見の観察を行った。なお、ラットへの投与試験は株式会社ケー・エー・シーに委託し実施した。

C. 研究結果および考察

1) フグ毒の体内分布の検討：

ゲノム編集によりレプチン受容体遺伝子 (*lepr*) を破壊したトラフグ（ゲノム編集トラフグ）および非編集トラフグの各組織における TTX の蓄積量を、投与した TTX 量に対する比率 (%) で示す（表 1）。TTX を投与しない場合は、ゲノム編集魚および非編集魚のいずれにおいても検討した全ての組織で TTX の蓄積は認められなかった。このことからトラフグ自身が TTX を合成しないことが改めて示された。ゲノム編集魚において、皮、筋肉、雄の生殖巣（精巣）では、TTX 量は検出限界 (0.2 $\mu\text{g/g}$ 組織) 以下であった。一方、個体間に大きなばらつきはあるが、肝臓および雌の生殖巣（卵巣）では、顕著な TTX の蓄積が見られた。この結果は、非編集魚でも同様であった。トラフグのフグ毒蓄積には、サキントキシン・テトロドトキシン結合タンパク質（Puffer-fish Saxitoxin Tetrodotoxin Binding Protein: PSTBP）が関与していることが報告されている。

今回のゲノム編集のターゲット遺伝子は、食欲に関係する遺伝子であり、PSTBP の代謝に関与するものではない。このことから、TTX 蓄積に関与しない遺伝子をゲノム編集することでは、トラフグ体内での TTX 蓄積部位は変化せず、非編集魚と同様であることが示された。

2) 骨格筋の毒性の検討：

試験期間中のゲノム編集トラフグホモジネート、または、非編集トラフグホモジネートを投与したラット全てにおいて、一般状態の異常は観察されなかった。

投与試験終了後の解剖時の肝臓および腎臓を肉眼的に観察した結果、異常所見はみられなかった。体重の増加においても、ゲノム編集トラフグホモジネート投与群または非編集トラフグホモジネート投与群ともに、実験開始時から 55%~69% の増加を示し、両者に差は見られなかった。

血液学的検査結果を表 2 に示す。赤血球数において、ゲノム編集トラフグホモジネート投与群では $7.15 \times 10^6 \mu\text{L}$ 、非編集トラフグホモジネート投与群では $6.87 \times 10^6 \mu\text{L}$ となり統計的な有意差が示されたが、ヘモグロビン濃度やヘマトクリット値など関連するパラメーターに優位な差が見られなかったこと、他の試験での対照群の数値とゲノム編集トラフグホモジネート投与群の方が近いこと、などから事実上、赤血球数には差異がないと判断された。白血球数、血小板数などその他の指標では優位差は示されなかった。

血液生化学的検査結果を表 3 に示す。ゲノム編集トラフグホモジネート投与群のアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (ASAT) は、非編集トラフグホモジネート投与群と比較して統計学的に有意な高値を示した。しかし、ASAT の変動幅は正常の範囲内であり、その他の肝機能の指標となる酵素には変化が見られないことから、ASAT の上昇は肝機能障害を示唆する結果ではないと判断した。血液生化学的検査のその他の項目については、有意差は見られなかった。

以上の結果から、ゲノム編集トラフグ筋肉ホモジネートに毒性はないと判断した。

D. 結論

トラフグの毒化機構は完全に解明されているわけではないが、微生物が産生したフグ毒を PSTBP などに結合させて、トラフグ体内に蓄積すると考えられている。今回、ゲノム編集トラフグおよび非編集トラフグの両者において、フグ毒を投与しなかった個体からは、いずれの組織においてもフ

グ毒は検出されなかった。このことは、ゲノム編集処理、非処理にかかわらず、トラフグ自体がフグ毒を産生するものではないことを示している。

今回実験に用いたトラフグは、食欲に関連する遺伝子機能を欠失させたゲノム編集トラフグであり、これらの遺伝子は、トラフグの毒蓄積に関与が示されている PSTBP の合成や代謝に関わるものではなかった。この様な遺伝子の編集をおこなった場合、トラフグ体内のフグ毒蓄積部位に変化は起こさなかった。また、フグ毒を与えていないゲノム編集トラフグの可食部（骨格筋）においては、非編集トラフグと同じく毒性を示さなかった。

以上の結果から、フグ毒を投与しないゲノム編集トラフグでは、フグ毒を蓄積する可能性は考えられず、その様な条件下で飼育を行っているトラフグに関してはゲノム編集処理の如何に関わらず、食することが認められている部位の毒性検査は不必要であると考えられる。

E. 研究発表・業績

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

該当なし

3. その他

1) 市民向け説明会

養殖業へのゲノム編集技術の可能性、2020年8月21日、アイビーホール青山会館、参加者約50名、一般財団法人日本水産油脂協会、講演者

食べる？食べない？ゲノム編集マダイ・サイエンスアゴラ 2020、2020年11月22日、On line、参加者数約100名、国立研究開発法人科学技術振興機構、講演者

ゲノム編集技術を使った育種の意義、2020年12月22日、兵庫県立兵庫高校、参加者約30名、兵庫県立兵庫高校、講演者

2) 業界関係者向け説明会

ゲノム編集マダイ・スタークホルダー会議、2020年12月3日、東海コープ事業連合（本部）、参加者約50名、くらしとバイオ 21・東海コープ事業連合、講演者

3) 総説など

木下政人、岸本謙太、吉浦康寿、家戸敬太郎「養殖魚でのゲノム編集—肉厚マダイ・トラフグの作出を例に」、ゲノム編集食品—農林水産分野への応用と持続的社会的実現（株式会社エヌ・ティール・エス）、2021年1月刊行

表1. ゲノム編集トラフグおよび非編集トラフグのTTX投与後の組織別蓄積率

	サンプル ID	雌雄	TTX投与	体長 (mm)	体重 (g)	TTX蓄積量 (投量に対する割合 %)			
						皮	筋肉	肝臓	生殖巣
ゲノム編集 トラフグ	1	♀	無	354	2040	0	0	0	0
	2	♀	無	355	1909	0	0	0	0
	3	♀	無	428	2933	0	0	0	0
	4	♂	無	425	2679	0	0	0	0
	5	♀	無	397	2953	0	0	0	0
	6	♀	有	352	2092	0	0	29.7	6.1
	7	♀	有	358	2065	0	0	30.7	1.0
	8	♀	有	390	2389	0	0	24.3	8.0
	9	♀	有	410	2696	0	0	17.3	16.4
	10	♂	有	387	2378	0	0	28.5	0
	11	♂	有	380	2381	0	0	18.7	0
非編集 トラフグ	12	♂	無	360	1590	0	0	0	0
	13	♀	無	360	1560	0	0	0	0
	14	♂	有	375	1640	0	0	60.7	0
	15	♂	有	365	1710	0	0	47.0	0
	16	♂	有	380	1600	0	0	51.2	0
	17	♂	有	380	1590	0	0	48.4	0
	18	♂	有	350	1600	0	0	61.9	0
	19	♀	有	360	1560	0	0	31.0	20.3
	20	♀	有	360	1510	0	0	36.7	10.9
	21	♀	有	395	1490	0	0	41.4	6.9
	22	♀	有	395	1640	0	0	35.6	17.6
	23	♀	有	365	1600	0	0	34.7	11.5

TTX 量が検出限界 (0.2 μg/g組織) 以下の場合は、蓄積量を“0”とした。

表2. トラフグ筋肉ホモジネート投与ラットにおける血液学的検査

試験群	動物 番号	RBC (×10 ⁶ /μL)	Hb (g/dL)	Ht (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	WBC (×10 ³ /μL)	Platelet (×10 ³ /μL)	Reticulocyte (%)	(×10 ⁹ /L)
非編集トラフグ 筋肉ホモジネート 投与群	101	6.52	12.7	40.5	62.0	19.4	31.3	4.11	1102	5.15	336.2
	102	6.93	12.9	41.7	60.3	18.7	31.0	5.21	1196	5.22	361.5
	103	7.08	13.5	43.7	61.8	19.0	30.8	8.12	1125	4.96	351.0
	104	6.85	13.2	42.3	61.8	19.2	31.1	6.07	955	5.18	355.3
	105	6.79	12.9	42.4	62.4	18.9	30.3	7.10	1017	5.14	349.2
	106	7.07	13.0	42.7	60.4	18.4	30.5	4.63	1057	4.73	334.8
	107	6.75	12.8	40.7	60.2	19.0	31.5	6.55	1103	5.79	390.9
	108	6.97	13.3	42.4	60.8	19.0	31.3	8.17	1283	5.05	351.8
	Mean	6.87	13.0	42.1	61.2	19.0	31.0	6.25	1105	5.15	353.8
	SD	0.19	0.3	1.1	0.9	0.3	0.4	1.53	102	0.3	17.5
ゲノム編集トラフグ 筋肉ホモジネート 投与群	201	6.98	12.8	42.0	60.2	18.4	30.6	5.92	1080	5.48	382.7
	202	7.02	13.0	42.3	60.3	18.5	30.7	4.52	981	4.65	326.2
	203	7.27	13.7	45.1	62.0	18.9	30.4	7.43	1269	5.11	371.6
	204	7.16	13.1	42.6	59.5	18.3	30.7	5.50	1088	4.79	342.9
	205	7.03	13.0	41.6	59.1	18.5	31.4	5.91	1122	4.52	317.8
	206	7.15	13.4	43.1	60.3	18.8	31.1	4.36	959	4.95	353.9
	207	7.52	14.4	45.7	60.8	19.2	31.6	6.76	1110	3.96	297.6
	208	7.07	13.5	42.5	60.1	19.1	31.8	4.98	1093	5.41	382.3
	Mean	7.15**	13.4	43.1	60.3	18.7	31.0	5.67	1088	4.86	346.9
	SD	0.18	0.5	1.5	0.9	0.3	0.5	1.07	95	0.50	31.4

RBC: 赤血球数、Hb: ヘモグロビン濃度、Ht: ヘマトクリット値、MCV: 平均赤血球容積、MCH: 平均赤血球色素量、MCHC: 平均赤血球色素濃度、WBC: は血球数、Platelet: 血小板数、Reticulocyte: 網状赤血球数、*: Significant difference (p<0.01) 各項目の平均値について Studentのt検定を用いた。

表3. トラフグ筋肉ホモジネートを投与したラットにおける血液生化学的検査

試験群	動物 番号	ASAT (U/L)	ALAT (U/L)	ALP (U/L)	LDH (U/L)	γ-GTP (U/L)	LAP (U/L)	CK (U/L)	BUN (mg/dL)
非編集トラフグ 筋肉ホモジェネート 投与群	101	54	39	1348	117	1	62	183	18.4
	102	56	42	1177	133	1	59	187	19.7
	103	53	34	1168	145	0	60	242	18.6
	104	49	37	1036	107	1	55	153	22.7
	105	63	41	1165	144	1	62	204	15.3
	106	63	51	1276	116	1	63	170	16.3
	107	59	39	1411	128	1	62	189	18.4
	108	61	47	1336	138	1	69	195	16.2
	Mean	57	41	1240	129	1	62	190	18.2
SD	5	5	124	14	0	4	26	2.4	
ゲノム編集トラフグ 筋肉ホモジェネート 投与群	201	59	43	1602	81	0	70	212	19.0
	202	69	56	1641	164	1	68	271	20.9
	203	72	44	1149	265	1	68	286	19.5
	204	63	49	1309	116	1	64	205	21.6
	205	67	47	1128	145	1	59	191	20.7
	206	50	40	1310	76	1	60	182	17.6
	207	61	42	1139	113	1	62	182	19.0
	208	76	53	1243	107	1	64	163	21.5
	Mean	65 *	47	1315	133	1	64	212	20.0
SD	8	6	203	61	0	4	44	1.4	

ASAT: アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (GOT)、ALAT: アラニンアミノ基転移酵素 (GPT)、ALP: アルカリホスファターゼ、LDH: 乳酸脱水素酵素、γ-GTP: γ-グルタミルトランスぺプチターゼ活性、LAP: ロイシンアミノペプチターゼ活性、CK: クレアチンキナーゼ活性、BUN: 尿素窒素、*: Significant difference (p<0.05)、各項目の平均値について、Studentのt検定又はAspin-Welchのt検定を用いて統計解析した。

表3. (- Continued)

試験群	動物 番号	TG (mg/dL)	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	AMY (U/L)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
非編集トラフグ 筋肉ホモジェネート 投与群	101	213	70	33.7	1806	139.2	5.10	102.6
	102	150	79	38.9	1814	139.9	5.47	103.0
	103	149	58	31.8	1789	140.6	4.49	105.1
	104	193	78	42.0	1908	139.0	5.32	100.9
	105	70	68	37.2	1908	140.1	5.27	105.2
	106	126	65	36.8	1942	140.5	5.29	105.2
	107	107	66	37.1	1891	139.9	4.85	105.6
	108	138	60	35.8	1910	139.1	5.41	104.3
	Mean	143	68	36.7	1871	139.8	5.15	104.0
SD	45	8	3.1	58	0.6	0.33	1.7	
ゲノム編集トラフグ 筋肉ホモジェネート 投与群	201	168	69	38.3	2365	139.3	5.77	103.3
	202	137	74	38.1	1830	139.8	5.54	104.1
	203	155	69	36.4	1984	140.4	5.47	103.6
	204	91	75	41.7	1965	140.0	4.75	104.9
	205	290	86	39.5	1930	139.4	5.11	103.3
	206	119	67	40.6	1835	141.4	5.28	104.5
	207	118	76	40.6	1987	139.6	5.24	105.4
	208	71	66	38.3	1829	138.1	4.56	102.0
	Mean	144	73	39.2	1966	139.8	5.22	103.9
SD	67	7	1.7	176	0.9	0.4	1.1	

TG: トリグリセライド、TC: 総コレステロール、HDL-C: HDLコレステロール、AMY: アミラーゼ、Na: ナトリウム、K: カリウム、Cl: クロール

表 3. (- Continued)

試験群	動物 番号	Cre (mg/dL)	TBiL (mg/dL)	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	Glu (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Mg (mg/dL)
非編集トラフグ 筋肉ホモジェネート 投与群	101	0.28	0.00	5.3	3.1	234	7.0	10.6	1.6
	102	0.25	0.00	5.3	3.2	249	7.0	10.4	1.6
	103	0.25	0.00	5.3	3.2	242	7.3	10.5	1.8
	104	0.24	0.00	5.4	3.2	273	7.1	10.4	1.7
	105	0.25	0.00	5.5	3.2	207	7.1	10.0	1.6
	106	0.23	0.00	5.5	3.3	206	6.9	10.4	1.6
	107	0.23	0.00	5.1	3.1	219	7.2	9.9	1.6
	108	0.24	0.00	5.4	3.2	200	7.1	10.3	1.5
	Mean	0.25	0.00	5.4	3.2	229	7.1	10.3	1.6
SD	0.02	0.00	0.1	0.1	25	0.1	0.2	0.1	
ゲノム編集トラフグ 筋肉ホモジェネート 投与群	201	0.20	0.00	5.5	3.2	199	7.0	10.7	1.6
	202	0.25	0.00	5.4	3.2	191	8.5	10.3	1.6
	203	0.27	0.00	5.4	3.2	202	5.8	10.7	1.7
	204	0.26	0.00	5.2	3.2	267	7.2	10.2	1.7
	205	0.26	0.00	5.4	3.4	202	7.1	10.6	1.6
	206	0.21	0.00	5.6	3.3	184	7.4	10.8	1.6
	207	0.23	0.00	5.5	3.2	184	7.1	10.2	1.6
	208	0.25	0.01	5.2	3.2	248	8.2	10.6	1.8
	Mean	0.24	0.00	5.4	3.2	210	7.3	10.5	1.7
SD	0.03	0.00	0.1	0.1	31	0.8	0.2	0.1	

Cre: クレアチニン、TBiL: 総ビリルビン、TP: 総タンパク質、Alb: アルブミン、Glu: グルコース、IP: 無機リン、Ca: カルシウム、Mg: マグネシウム