

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・未来生命科学研究部門・
発生再生生物学分野・所長/教授
堀 正敏 東京大学大学院・農学生命科学
研究科・獣医薬理学研究室・
教授
福田公子 東京都立大学・理学研究科 生命
科学専攻・准教授

A. 研究目的

(背景) フードテック、すなわち食に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 μ M でトランスフェクトした CHO 細胞に添加した。MTX 処理を 1 週間行った後、CHO-LIF 細胞を MTX フリー培地に移し、LIF 産生を行った。24 時間後、LIF 含有培養上清を回収し、E14K mES 細胞で試験し、多能性維持能力および mES 細胞の心筋細胞またはニューロンへの分化効率を確認した。

mES 細胞 (3 \times 10³) を LIF を含まない培地で 25 μ l の吊り下げ滴下で培養し、角皿 (栄研化学、東京、日本) 内で EBs を形成させた。2 日後、EB をノンコート細菌シャーレ (IWAKI、東京、日本) に移し、懸濁培養を行った。6 日目に、EB をゼラチンコーティングされた組織培養皿 (Corning, New York, USA) に移して、自発的な「心拍」を示す組織の領域が顕微鏡で検出できるようになる 10 日目まで付着培養を行った。EB は、特に断りのない限り、培養の 3~6 日目に阻害剤で処理した。

メタボローム解析

メタボローム解析は、株式会社ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT、山形県) に委託した。LC-TOF-MS 分析前に酵素を不活性化するため、EB を 10 ml の 5% マンニトール溶液で洗浄し、内部標準物質を含む 1 ml のエタノールで処理した。サンプルを氷上で 5 分間ウルトラソニケーションによりホモジナイズし、その後 4, 400 \times g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離を行った。上清を乾燥させ、200 μ l の 50% 2-プロパノールに溶解させた。LC-TOF-MS は、Agilent 1200 シリーズ RRLC システム SL を用いて実施された。化合物は、正および負のイオン極性モードの両方で分析された。検出されたピークは、Master Hands ver. 2.17.1.11. ピーク面積を評価し、内部標準物質の面積に正規化しました。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 α (PDGFR α) を発現する繊維芽細胞様細胞(以下 P α 陽性繊維芽細胞様細胞)を採取した(CD31-CD45-PDGFR α +細胞集団)。大腸と小腸筋層由来の P α 陽性繊維芽細胞様細胞は 8 週齢の雄マウスを用いた。腓腹筋からの P α 陽性繊維芽細胞様細胞は成熟マウス(8 週齢雄)と老齢マウス(36 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 α 陽性繊維芽細胞様細胞を採取した。

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

屠場よりウシの気管を入手し、気管平滑筋細胞をコラゲナーゼ/エラスターゼカクテルにて単離し、DMEM 培地 10% ウシ胎児血清下で培養した。細胞は 70%コンプレントの状態に 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 α 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の上流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 (Asal)) が寄与することがわかっている。PrS 形成における SPTLC2、UGCG、ASAHI タンパク質の役割を調べるため、これらの酵素の特異的阻害剤 (SPTLC2 は Myriocin16、UGCG は NB-DNJ17、ASAHI は D-NMAPPD18) のマウス ES 細胞分化への影響を調べた。阻害剤は培養 3-6 日目に適用し、10 日目に ES 細胞の分化を光学顕微鏡で心

筋細胞拍動を、 β -チューブリン III 免疫染色で神経突起形成を検出することで解析した。その結果、ミリオシンは心筋細胞の拍動と β -チューブリン III 陽性の神経突起の形成をともに阻害し、PRS 形成前に細胞死を起こすことがわかった。一方、NB-DNJ および D-NMAPPD は、EB の拍動を阻害する一方で、これらの薬剤は用量依存的に β -チューブリン III 陽性神経突起の形成を促進した。これらのデータは、UGCG と 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) α receptor (PDGFR α) を発現する繊維芽細胞様間質細胞 (P α 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 α 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 α 陽性繊維芽細胞様間質細胞では、炎症や線維化に関する遺伝子群の発現が亢進していることが明らかになった。

以上の成績から、細胞培養食品の安全性基準の一つとして、細胞を採取する臓器の部位の均一性、細胞を採取する個体年齢の均一性が重要と考えられた。以上の解析結果は、細胞培養食品の作製に際しての、使用する年齢・臓器部位選択理由に資する成果と考える。

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 α 陽性繊維芽細胞様細胞の発現遺伝子変動について、心臓、肺、小腸、骨格筋、脂肪、肝臓について比較検討したところ、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 α 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、 α 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 α 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、 α 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、 α 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、 α 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。 α 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 α 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"> ・動物種に関連する既知の望ましくない物質 ・潜在的な毒素/アレルゲン ・スターター細胞と最終細胞製品との定量的比較において食品安全上懸念される発現量の異なる望ましくない物質

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

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>細胞の調達</p> <p>Cell sourcing</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>生産</p> <p>Production</p> <p>This step may include cell proliferation, cell differentiation and bioreactor expansion</p>	<p>収穫</p> <p>Harvesting</p> <p>This step may include cell and/or tissue harvesting</p>	<p>食品加工</p> <p>Food processing</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