

# I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究補助金（食品の安全確保推進研究事業）（令和4年度～令和5年度）  
食品衛生基準科学研究費補助金（令和6年度）

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

令和4年度～令和6年度 総合研究報告書

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。＜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、エビ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した。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した。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った。

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（初年度）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（昨年度）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。令和6年度（今年度）の調査検討では、1) **開発動向**としては、昨年度の16件に引き続き、5社を加えた21件の開発事例

を見出し分類表に基づいて整理した。培養の出発材料となる細胞については、初代培養細胞よりも株化細胞が主流となっており、ES 細胞や iPS 細胞の利用をはじめ、すでに別目的で産業化されている細胞の利用の可能性や、必ずしも従来の食肉の細胞に近づけようとしているとは限らないことを見出した。また、2) **規制動向** に関しては、細胞培養食品を取り扱う「**規制の枠組み**」として、シンガポールと EU では Novel Food の中に細胞培養食品に特化した規制の枠組みを新たに設定していること、韓国でも暫定規格・基準の認定対象として細胞培養食品を特定した枠組みを新たに設定したこと、オーストラリア・ニュージーランド及びイスラエルでは既存の規制枠に新規の食品を評価する Novel Food 枠を設けて細胞培養食品は当該枠で申請・評価が実施されていること、一方、米国には細胞培養食品に特化した枠組みはなく、既存の規制枠で扱うとしていることを見出した。「**上市プロセス**」については、Novel Foods として審査・承認を行う、いわば EU 型（シンガポール、EU、オーストラリア・ニュージーランド、イスラエル及び韓国）と、許認可制ではなく市販前コンサルテーションを行う、いわば米国型に大別でき、前者では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り、他方、後者（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ことを見出した。細胞培養食品固有の「**安全性審査項目と審査情報の公開**」については、シンガポールでは安全性評価要件の詳細が明示されているものの、審査結果は公開されておらず、審査における判断基準等は明確になっていないこと、他方、米国では、FDA による市販前コンサルテーションの資料が公開されていることを見出した。一方、EU、オーストラリア・ニュージーランド、イスラエル及び韓国では、必要な要件は明示されており、審査情報については、EU 及びオーストラリア・ニュージーランドで公開されることを見出した。公表されている「**承認の事例**」としては、2025 年 3 月の時点において、細胞培養食品の販売が許可又は可能となったのはシンガポール、米国、イスラエル及び香港のみである。イスラエルでは、2024 年 1 月 Aleph farm 社の培養ウシ肉が販売承認を取得し、シンガポールでは、Vow 社の培養ウズラ肉を 2024 年 4 月に販売承認し、香港では Vow 社のウズラ培養肉が 2 カ国目となる販売承認を 2024 年 11 月に取得した。2025 年 3 月に、豚由来の培養脂肪が、米国 FDA の市販前コンサルテーションを終了し、豚由来のものとしては世界で初めて販売が可能となる見通しである。国際食品規格の策定等を担う CODEX でも新たな食料源と生産システム (New food sources and production systems) の一つとして細胞培養食品に関する議論が展開されている。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改めて抽出でき、**リスクプロファイルの作成及び安全管理の提案**について検討した。なお補完的な検討として、ハザード要因として懸念される正常型プリオンの発現制御に関し検討することとした。マウス筋芽細胞由来の C2C12 細胞を用いた解析の結果、細胞増殖因子の添加や 2 次元から 3 次元培養などの培養条件を変化させることにより、その遺伝子発現が、顕著に変動することを見出し、培養条件の選択理由の重要性に資する成果を得た（北嶋）。

2) については、**令和 4 年度（初年度）**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。**令和 5 年度（昨年度）**から**令和 6 年度（今年度）**に亘る検討では、培養細胞の大量化において、その利用が期待される一方で、調査においてハザードとして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、肝細胞内で YAP を発現する実験系を構築し解析したところ、細胞増殖には YAP の活性化が必要であるが、その活性化が強すぎるとがん発症に至ること、また、YAP の強い活性化はゲノム変化やエピジェネティクス変化を誘導することが示唆された。結論として、細胞増殖のために、YAP を利用する場合には、YAP 活性を適切に制御することが必要であることが示され、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、**令和 4 年度（初年度）**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。**令和 5 年度（昨年度）**の検討では、さらに解析を進め、老齢マウス由来の線維芽細胞では、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、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低下や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。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・臓器部位選択理由の重要性に資する成果と考える。令和 6 年度（今年度）の検討では、ウシの大動脈平滑筋細胞を用いて、無血清培地での細胞増殖培養条件検討を行なった。また、ウシの気管由来単離平滑筋培養細胞について、昨年度の初代培養時と継代培養時での発現遺伝子の変動結果を踏まえた上で、FBS10%による血清培地で培養した後、無血清培地で培養することで変動遺伝子群が血清培地培養前（Primary cells）での遺伝子発現に戻る可塑性を有するか否かを検証した。その結果、血清培地での細胞培養継代によって変動した遺伝子群は、無血清培地での培養によっても初代培養時の状態に戻ることはなく、遺伝子変動に可塑性は認められなかった。以上の3年間の解析結果を踏まえ、細胞培養食品の安全性評価における一般的なターゲットバリデーションについてまとめた。すなわち、細胞培養食品に使用する動物に老齢個体は不向きであること、安定した培養技術・環境が求められること、及び、製品ごとに、生理活性物質の増減を含め、網羅的な遺伝子発現の確認が必要であること、である（堀）。

一方、家禽細胞については、令和 4 年度（初年度）の検討では、ニワトリ胚砂囊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。令和 5 年度（昨年度）の検討では、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。すなわち、ニワトリ胚砂囊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、分化状態を保つために、細胞を密着させたまま培養する、砂囊平滑筋の三次元（3D）培養系を確立に向けた予備検討を行なった。令和 6 年度（今年度）の検討では、ニワトリ胚の砂囊平滑筋分化の維持に向け、ハンギングドロップ法による 3D 培養系を確立に成功した。具体的には、1%FBS 存在下では分化状態を保ったまま7日間分裂できること、他方、10%FBS あるいは、ニワトリ胚抽出液の存在下では、分裂停止や細胞死が誘導されることが明らかとなった。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の重要性に資する成果と考える。一方、培養条件によっては、間充織などの他種の細胞が急速に増殖することが観察されたことから、元々混入していた目的外細胞の急速な増殖にも注意する必要があることを明らかとした（福田）。

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、開発動向、ならびに安全性や衛生規制の動向を中心に行なった結果、それぞれの現状と特徴を整理することができ、また非意図的な細胞由来生理活性物質や新規のアレルゲンなどの潜在的なハザード因子を抽出して、リスクプロファイルを作成し、安全管理において重要と考えられる点の提案を行なった。各分担研究における検討は、複数の潜在的なハザード因子を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、目的に合った細胞を特定する必要性と、使用する年齢・臓器部位・培養条件などの様々な選択理由の重要性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。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。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。

#### 研究分担者

仁科博史 東京科学大学・総合研究院・  
難治疾患研究所・発生再生生物  
学分野・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「食肉代替食品」の一種である「いわゆる培養肉」の研究開発が国内外で進展している。一般的に、細胞培養技術を用いて作られる食品を指すものと考えられるが、この定義については議論が続いている。規制上の正式名称も定まっていないが、“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。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、エビ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ビジェネティクス解析(仁科)、モデル家畜細胞の分化増殖過程におけるハザード解析(堀)、モデル家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析(福田)。

令和4年度(初年度)、令和5年度(昨年度)及び令和6年度(今年度)に亘り、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、令和4年度(初年度)は開発企業12社、令和5年度(昨年度)は開発企業16社、令和6年度(今年度)は開発企業21社を選定して事例調査の対象とし、各企業の開発状況について当該企業の公式ホームページを中心に調査を行った。なお、GFIのデータベースに収載されている細胞培養食品

の開発企業は2024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21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、令和6年度(今年度)からイスラエル及び韓国を加えた。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、令和5年度(昨年度)から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。

情報収集を行った期間は、令和4年度(初年度)は令和4年(2022年)6月下旬から8月下旬、令和5年度(昨年度)は令和5年8月中旬から10月初旬、令和6年度(今年度)は令和6年8月下旬から10月下旬であり、個別に各項目において情報更新の都度、随時反映した。

＜補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ＞

補完的検討により、連携の向上と円滑な進捗を図る。具体的には、ハザード要因として懸念される正常型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、令和4年度（初年度）は、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、マウス由来の筋細胞（C2C12）や神経細胞株（Neuro2A）を用いた予備検討を実施した。令和5年度（昨年度）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。令和6年度（今年度）は、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すが、この活性への細胞増殖因子の添加や 2 次元から 3 次元培養などの条件の変化の影響、及び、この発現制御の詳細を検討するために、メチル化領域を欠損させたプロモーターを用いたプロモーターアッセイ系及びリアルタイム PCR 法により検証を行った。

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：

B-2-1: 胚葉分化の異常を伴う細胞の分化異常メカニズムの探索：

令和4年度（初年度）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において、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

クリーニングを行なった。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) 及び 0.1 mM 2-mercaptoethanol (M3148; Sigma, Burlington, USA)、LIF を入れたゼラチンコート皿で保持した。LIF は、当研究所で以下のように自家生産した。簡単に説明すると、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 細胞に、LIF-ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を発現するベクターをトランスフェクションさせた。ベクターの増幅を誘導するために、メトトレキサート (MTX) (M8407; Sigma, Burlington, USA) を 0.1  $\mu$ 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た。HMT 代謝物ライブラリは、m/z 値とリテンションタイムに基づいてピークに注釈を付けるために使用した。

#### RNAseq 解析

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

#### B-2-2: YAP 遺伝子の活性化の強弱の効果の解析

令和 5 年度 (昨年度) 及び令和 6 年度 (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 の活性化体 YAP (2SA) を発現する環状プラスミドを、Hydrodynamic 法を用いてマウスの肝臓にモザイク状に導入した。その後、マウスの肝臓を回収し、組織学的解析、RNA-seq 解析、Whole Exome Sequence (WES) 解析、DNA メチル化解析を行った。ネットワーク解析には、NetworkAnalysist 3.0

(<https://www.networkanalyst.ca>)を使用した。

### 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<sup>7)</sup>用いた。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、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プロックを作製した。MICROM HM335E を用いてパラフィンプロックを 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。

### RNAseq解析

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

### B-3: モデル家畜・家禽細胞の分化増殖過程におけるハザード解析:

上述の調査とエピジェネティクス解析と併行し、モデル家畜・家禽細胞培養系を用いたハザードの検証をおこなう。具体的には、ウシの気管平滑筋細胞や大腸筋線維芽細胞などを用い (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:

令和4年度(初年度)及び令和5年度(昨年度)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の間質細胞(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%コンフレントの状態に 25 代まで継代した。これらの実験を実験開始時は同一ロットの細胞を用いて二人の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。

令和6年度(今年度)は、ウシ大動脈平滑筋細胞(第2継代細胞株、TOY0B0 CAB35405)を DMEM 培地 10% ウシ胎児血清下で培養した。細胞は 70%コンフレントの状態に 5 代まで継代して実験に供した。5 代継代した細胞を DMEM 無血清培地にて 24 時間培養した後、肝細胞増殖因子(Hepatocyte Growth Factor: HGF) c-Met アゴニスト(PepitiGrowth, Tokyo, 日本) 30 ng/mL を添加し培養し、72 時間後に細胞増殖活性を測定した。

屠場よりウシの気管を入手し、気管平滑筋細胞をコラゲナーゼ/エラスターゼカクテルにて単離し、DMEM 培地 10% ウシ胎児血清

下で培養した。細胞は 70%コンフレントの状態に 5 代まで継代した。その時の細胞を集め total RNA の抽出を行った。また、5 代まで継代した後に無血清培地にて 24 時間ごと 3 回無血清培地にて培養を継続した細胞を採取し、total RNA の抽出を行った。得られた total RNA をもとに、RNAseq 解析を行い変動する遺伝子の比較解析を行った。

#### 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:

令和4年度(初年度)から令和6年度(今年度)に亘り、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。

#### 細胞塊の作成

単離した 14 日胚の砂嚢の平滑筋層を眼科ハサミで細かく切断した後、パストールによるピペッティングを行い、直径 0.4 または 0.6 mm の細胞塊を作成した。

#### 平面細胞培養

細胞塊を DMEM 培地 1 または 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。細胞は 5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで 1、4、7 日間培養した。培養後に残った細胞塊は細胞塊は固定後、凍結切片作成し、 $\alpha$  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 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、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで

培養した。1、4、7日間培養した細胞塊は、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。さらにTuji-1及びN-CAM1抗体でも染色した。

#### EdUによる増殖細胞の検出

2次元およびハンギングドロップ法で培養中に、Click-iT™ EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor™ 488 dye (Invitrogen)を用いて、増殖細胞を検出した。培養液を100  $\mu$ M EdUを含む培養液に変換し、4時間後に固定後、細胞塊を回収、薄切し、マニュアルに従って染色した。

#### **(倫理面への配慮)**

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

## C. 研究結果と考察

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

令和4年度（初年度）、令和5年度（昨年度）、及び令和6年度（今年度）に亘り、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-1-1: 細胞培養食品の開発動向:

開発企業数の動向としては、令和6年度（今年度）のGFIの開発企業データベースの調査から、細胞培養食品全体では2020年以降に設立した企業数が全体の半数以上を占め活発化している様相ではあるものの、2021年をピークに新規参入企業数が減少していることを見出した。家禽・家畜だけでなく、魚介類を開発する企業も約3割存在しており、魚介類も開発対象として引き続き注目されている状況が窺えた。

令和4年度（初年度）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、令和5年度（昨年度）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社の培養牛ステーキが承認されている（2024年1月）。令和5年度（昨年度）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、製品の数も鶏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。さらに、令和6年度（今年度）の調査終了

時点（2025年3月）では、香港でVow社のウズラ培養肉が2か国目となる販売承認を取得し（2024年11月）、米国ではMission Barns社の培養豚脂肪がFDAによる市販前コンサルテーションを終了し、これは豚由来の製品としては世界初である。まとめると、現時点までに販売承認を取得又は販売が可能となったのは、動物種3種（鶏、ウズラ、牛）、開発企業4社（Good Meat社、Upside Foods社、Aleph Farms社、VOW社）、国・地域4つ（シンガポール、米国、イスラエル、香港）である。

各開発企業のホームページを中心とした調査の結果、細胞培養食品の開発対象となっている生物種及び使用されている細胞の種類は多種多様であり、令和4年度（初年度）は出発材料の種類（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かったが、令和6年度（今年度）の調査では初代培養細胞よりも株化細胞が主流となっていた。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。多能性を有する幹細胞であるES細胞やiPS細胞に関する開発も進められており、前者は、イスラエルAleph Farms社やフランスGourmeys社、後者はオランダMeatable社などである。注目すべきものとして、ワクチン製造の分野における鳥類の細胞株の細胞培養食品への利用が挙げられ、この例として、Eat Just社（Good Meat社）及びGourmeys社）ものを挙げることができる。このように、すでに別目的で産業化されている細胞も対象となる可能性がある。また、筋肉や脂肪等への分化を行わない事例もあり、必ずしも従来の食肉の細胞に近づけようとしているとは限らないことになる。

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、21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7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。

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。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についても、本研究班のモデル細胞系を用いた分担研究課題（仁科）において行った。

#### C-1-2: 安全性や衛生規制の動向：

シンガポール、米国、欧州、オーストラリア・ニュージーランド、イスラエル、韓国における細胞培養食品を取り扱う規制の枠組みと上市プロセスは、Novel Foods として審査・承認を行う、いわば EU 型（シンガポール、EU、AUS/NZ、イスラエル及び韓国）と、Novel Foods の枠組みを有しておらず、許認可制ではなく市販前コンサルテーションを行う、いわば米国型に大別できる。米国以外の国・地域では、細胞培養食品は Novel Foods の枠組みの中で規制され、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。シンガポールと EU では Novel Food の中に細胞培養食品に特化した規制の枠組みを新たに設定している。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た。

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、2025年3月の時点において、細胞培養食品が販売可能となった地域はシンガポールと米国、イスラエル、香港の4か所で、鶏4品目（シンガポール、米国）、ウズラ1品目（シンガポール、香港）、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-1-3: 潜在的なハザードの抽出及びリスクプロファイルの作成：

令和5年度（昨年度）及び令和6年度（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。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)細胞の採取、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ている。実際、国際食品規格の策定等を担うCODEXでも新たな食料源と生産システム(New food sources and production systems)の一つとして細胞培養食品に関する議論が展開されている。

また、FAO/WHOは、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、摂取後の細胞が生存して腫瘍を形成する可能性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。FAO/WHOが特定した合計54の潜在的ハザード因子について検討した結果、共通するものに着目すると、15の因子に集約することができた。

ハザード因子のタイプとしては、①混入・汚染、②投入物の非意図的な残留、③食品成分の変化、④細胞からの非意図的な新規産生に関する、4つのタイプに分類することができ、このうち、特に④を細胞培養食品に特徴的なハザード因子として抽出した。④には、新規毒素やアレルゲン、あるいは内因性毒素やアレルゲンの増加、細胞由来の遺伝物質の構造的・化学的变化が含まれている。また、「潜在的ハザードの特定範囲に含まれない懸念事項」の造腫瘍性については、原料となる細胞の特性や不死化の方法、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性が生じる可能性もあると考えられた。従来の食肉では腫瘍部位は除外して喫食しないようにしてきたため、この取り扱いとの整合性の面でも検討が必要である。

以上のことを考慮し、現時点で考えられるリスクプロファイルを作成しまとめた(北嶋らの分担報告書参照)。リスクプロファイル作成の標準書として「農林水産省及び厚生労働省における食品の安全性に関するリスク管理の標準手順書」を参考にした。

ただし、この細胞培養食品のハザード因子の抽出及びリスクプロファイルの作成については、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引き続き検討していく必要があると考える。

#### C-1-4: 安全管理において重要と考えられる点の提案:

さらに令和6年度(今年度)は、FAO/WHOのレポートに加えて、シンガポール食品庁の安全性評価要件、米国FDAの市販前コンサルテーションの資料、FSANZの評価資料をはじめとする諸外国の規制動向、ならびに開発動向をもとに、細胞培養食品の潜在的なハザード因子及びリスクプロファイルについて更なる検討を行ったところ、現時点で細胞培養食品の安全管理において重要と考えられる点は、簡潔にまとめると、以下のようになるものと思われた。

1\_従来の食品にも想定されるハザード因子に係る安全性の確保には、危害要因分析重要管理点(HACCP)や適正製造規範(GMP)といった既存の手法が適用できるものとする。

2\_他方、細胞からの意図しない新規の生理活性物質・アレルゲン・毒素の産生または産生増加によるものは、細胞培養食品に特徴的な潜在的ハザード因子と考えられる。

3\_食品は経口的に摂取されることを考慮すると、特に、消化液や熱に安定な変異タンパク質や生理活性物質にも注意を払う必要があるものと考えられる。なお、消化液でタンパク質が分解されたとしても、新規のものも

含め、アレルゲンが存在する可能性は否定できないものとする。

4\_造腫瘍性についても、使用する細胞の種類によっては注意を払う必要があるものと考えられる。

5\_「開発の経緯」として、技術的な障壁の高い商業規模で細胞を増産するための工夫や、使用した細胞、培養条件等の選択理由について、ハザードが高まっている可能性がないかを検討することが、細胞培養食品の潜在的な食品衛生上の脆弱性への対応において重要と考えられる。

特に 2~4 の点については、個々の製品毎の細胞の種類、遺伝子改変の有無、培養期間、加熱の有無、摂取量等によって注意を払う必要がある事項であり、個々の製品毎に、既存の評価手法の適用により安全が十分に確保可能かどうか慎重な検討が必要となる可能性も考えられる。

また、5 の開発の経緯に関する点については、現時点で上市可能となった製品の公開資料ではこの情報が乏しいというのが実情である。しかしながら、実験室レベルで行える小規模な細胞培養ではなく、商業規模で細胞を大量に増殖させることは技術的に最も難しい課題であり、最も未知の部分でもあるため、食品安全上の潜在的な脆弱性を孕んでいる可能性が高いと考える。このような商業規模での細胞の増産を可能とするために行った工夫とその選択理由を含む、個々の製品の開発の経緯に関する情報について、ハザードが高まっている可能性がないかを慎重に検討する必要があると考える。

＜補完的検討としてのプリオンの発現制御に関するレポーター遺伝子アッセイ＞

令和4年度（初年度）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。令和5年度（昨年度）及び令和6年度（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。また、リアルタイムPCR法によりマウスの組織及び細胞株におけるプリオン遺伝子発現変動の検討も行った。その結果、マウス筋芽細胞由来のC2C12細胞では、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、細胞増殖因子の添加や2次元から3次元培養などの培養条件の変化により正常型プリオン遺伝子の発現が顕著に変動することが確認され、特に、細胞増殖亢進時にプリオン遺伝子発現が増強されることを明らかにした。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ていることを示唆した。特に、2次元培養やIGF添加などの細胞増殖亢進時にプリオン遺伝子発現が増強されることを見出し、培養条件の選択理由の重要性に資する成果を得た。また、遺伝子配列欠損型のプリオン遺伝子プロモーターアッセイ系を用いた結果から、その遺伝子発現制御においては、プリオン遺伝子プロモーター領域上流のメチル化領域が関与していることが裏付けられた。

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）：

令和4年度（初年度）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 (Asah1)) 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 日目には抑制されたが、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。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。

#### C-2-3 肝細胞内で YAP を発現する実験系 n の構築と解析：

令和 5 年度（昨年度）から令和 6 年度（今年度）に亘り、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。1) 野生型 (WT) YAP に比較して、3 種類の活性化型 YAP (1SA, 2SA, 5SA、それぞれセリン残基を 1 個アラニンに置換したもの、2 個置換したもの、5 個置換したものに対応する) はすべて肝細胞の増殖を促進す

ることが示された。2) また、YAP (2SA) と YAP (5SA) は、4 ヶ月経過すると肝がん発症を誘導した。興味深いことに YAP (1SA) は細胞増殖を促進したが、肝がん発症は誘導しなかった。次になんが原因を探索するために、YAP (2SA) 発現による遺伝子変異やエピジェネティクス変化の解析を行った。その結果、3) 既に多くのがんで報告されているように体細胞ゲノム変化が生じていた。興味深いことに、アセチル化やメチル化のエピジェネティクス変化も誘導されていた。以上の結果は、細胞増殖には YAP の活性化が必要であるが、その活性化強すぎるとがん発症に至ること、また、YAP の強い活性化は予想通り、ゲノム変化やエピジェネティクス変化を誘導することを示唆している。

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える。

#### 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、令和 4 年度（初年度）は、マウスを用いて同じ消化管でも大腸と小腸から繊維芽細胞様の細胞を採取した。また、老個体と若齢個体の骨格筋から同じく繊維芽細胞様の細胞を採取した。それぞれ採取した細胞の遺伝子発現解析をおこない、臓器部位と個体年齢という二つの因子について、細胞培養食品の安全性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 週玲) と老個体マウス (36 カ月玲) 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。

令和 5 年度 (昨年度) 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。

令和 6 年度 (今年度) は、ウシの大動脈平滑筋細胞を用いて、無血清培地での細胞増殖培養条件検討を行なった。また、ウシの気管由来単離平滑筋培養細胞について、昨年度の初代培養時と継代培養時との比較検討結果を踏まえた上で、その際の無血清培地の影響を検討した。

#### <ウシ大動脈平滑筋の無血清培養>

ウシ大動脈平滑筋細胞は 5 代まで 10% FBS 存在下で継代を継続したところ、安定した平滑筋細胞の形態と増殖を維持していた。5 代継代した細胞を無血清培地に交換し 24 時間培養後、c-Met アゴニスト 30 ng/mL を添加し培養し、さらに 72 時間後に細胞増殖活性を測定した。結果、c-Met アゴニスト添加の有無によって細胞数に有意な変動はなく、有意な細胞増殖活性は得られなかった。今後、c-Met アゴニストの濃度設定や、将来上市される予定の PDGF-BB や IGF-1 の代替ペプチドなどを用いて、無血清培地での細胞増殖培養条件の探索をさらに行っていく必要があると考えられた。

#### ＜ウシ気管平滑筋細胞の可塑性＞

ウシ気管平滑筋を 10% ウシ胎児血清下で培養と継代を重ねると発現遺伝子群に変動が認められ、細胞の脱分化の可能性が考えられた（昨年度の成果）。そこで、令和 6 年度（今年度）は血清培地下での変化が無血清培地に戻すことで発現遺伝子が血清培養前に戻るか否か、発現遺伝子変動の可塑性について検証した。結果、ウシ胎児血清下で 5 代まで培養したウシ気管平滑筋細胞の遺伝子発現パターンは、5 代まで培養した細胞を 24 時間 x3 日間無血清培地にて培養した細胞から得られた遺伝子発現パターンとの間に差は認められず、継代によって変動した遺伝子変動に可塑性はないことがわかった。すなわち、一旦血清存在下で培養したウシ気管平滑筋細胞は増殖型に脱分化し、発現する遺伝子パターンは生体内での細胞とは異なり、もとは戻らない可能性が考えられた。今後、無血清培地での培養法の確立後に、発現する遺伝子群が生体内での遺伝子発現パターンと同じであるのか検証することが必要と考えられた。

以上の 3 年間の解析結果を踏まえ、細胞培養食品の安全性評価における一般的なターゲットバリデーションについてまとめた。すなわち、細胞培養食品に使用する動物に老齢個体は不向きであること、安定した培養技術・環境が求められること、及び、製品ごとに、生理活性物質の増減を含め、網羅的な遺伝子発現の確認が必要であること、である。

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

モデル家禽細胞培養系として、ニワトリの胚消化管平滑筋細胞に着目し、その中でも特に砂嚢平滑筋に注目した。一般に細胞の増殖と分化の維持は相反しているが、砂嚢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。令和 4 年度（初年度）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、どのような動態を見せるかも調べた。砂嚢で増殖が盛んな条件で小腸の平滑筋細胞塊を培養したが、あまり増殖せず、7 日目になっても細胞数は増えなかった上、形態も広がった線維芽細胞状だった。

#### C-3-2-1: 三次元培養条件の検討

これまで、砂嚢平滑筋細胞の培養では、増殖を抑えるような条件でのみ、分化状態を保ったまま培養できるとされていた。令和 5 年度（昨年度）は、平滑筋細胞塊をつかった 2 次元培養では、細胞塊から這い出た直後は平滑筋の形態、収縮タンパク質の発現から平滑筋の特徴を保っていると考えられるが、その外側では細胞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。このことから令和 6 年度（今年度）は、平滑筋細胞塊を這い出させることなく、三次元（3D）で培養すれば、胚の砂嚢内と同様に、平滑筋が分化を維持したまま増殖できるのではないかと考え、検討することとした。

#### ＜細胞塊の大きさの検討＞

令和 5 年度（昨年度）の終わりに、0.2-0.6mm 程度の平滑筋細胞塊を用いてハンギングドロップ法による 3D 培養を試みた

が、結果が安定しなかった。この結果が、細胞塊の大きさが違うことによる可能性を追求するため、細胞塊の大きさが直径0.4 mmのものと0.6mmのもののみを選び、培養した。厚さはどちらも0.2mm程度だった。直径0.4 mmの細胞塊では培養液によらず、培養2日までに細胞塊の直径は0.3mm程度に縮み、細胞密度が上がり、かつ球状になった。その後、DMEM-10%FBS条件では、4日、7日と培養が進むにつれ細胞塊が大きくなり、0.6-7mmほどの直径の球となった。DMEM-1%FBS条件では、それほど大きくはならず、7日目の直径は0.4mmほどだった。直径0.6 mmの細胞塊では0.4mmの細胞塊と同様に2日目までに細胞塊が縮んだが、その後、細胞塊は大きくならず、4日を過ぎてから徐々に中心部が黒くなって、ネクロシスが疑われた。そこで、この後の解析は直径0.4 mmの細胞塊を使用することにした。

#### <EE 培地の検討>

ニワトリ消化管の器官培養では、ニワトリ胚抽出液(EE)を FBS の代わりに使うことが多い。そこで、DMEM-50%EE 条件で細胞塊を培養したところ、2 日までは同様だったが、4 日には塊の中心部が黒くなり、7 日には黒い部分が増えていた。切片からは細胞塊中心部に細胞が見られず、ネクロシスと思われた。このため、今後の解析では EE を使用しないことにした。EE を細胞塊の 2 次元培養で使った時は、細胞が 2 日でコンフルエントになるなど、EE 条件の増殖刺激が高いことが考えられ、それが細胞死の原因となっている可能性が高いものとする。

#### <DMEM-1 及び 10%FBS 条件での細胞分化の解析>

ハンギングドロップ法で培養した細胞塊内の細胞の分化を解析するため、細胞塊の切片を作成し、2 次元培養の時と同様に、平滑筋初期マーカーである  $\alpha$  SMA、分化した平滑筋マーカーとされる calponin の発現を免疫抗体法で調べた。DMEM-1%FBS 条件では 2 日、

4 日、7 日を通して、 $\alpha$  SMA、calponin とともに、細胞塊の最も外側に位置する細胞で非常に強いものの、内部も満遍なく発現していた。ただし、砂嚢で見られた平滑筋の束構造は見られず、細胞は全体で同様の方向に並んでいるだけだった。DMEM-10%FBS 条件では、2 日までは DMEM-1%FBS 条件と同様の組織構築、マーカータンパク質の発現だったが、4 日では細胞塊の一部に、 $\alpha$  SMA、calponin が両方とも出ていない領域が見られた。7 日ではそれがさらに顕著になっており、細胞塊の外側に  $\alpha$  SMA、calponin が両陰性の領域が広がっていた。さらに、細胞塊の最も外側の  $\alpha$  SMA 強陽性の細胞では calponin が発現していないものが多かった。ここでは、2 次元培養でも見られたように、平滑筋が脱分化している可能性が高い。

DMEM-10%FBS 条件で 4、7 日に見られる calponin 陰性の領域がどのような細胞でできているのかに興味を持った。そこで、胚の平滑筋細胞層に含まれると考えられる、間充細胞と神経叢の細胞に注目した。切片を Tuji-1 (神経マーカー) および N-CAM1 (神経および砂嚢間充細胞マーカー) で染色したところ、Tuji-1 は calponin 陽性細胞に隣接して発現が少数見られたものの、塊にはなっておらず、神経叢の細胞が増殖し、 $\alpha$  SMA、calponin 陰性領域ができたとは考えづらかった。一方、N-CAM1 は Tuji-1 と重なる、少数の強い染色のほかに、弱い染色が細胞塊内に見られた。この染色は  $\alpha$  SMA、calponin 陰性領域にあることもあったが、calponin 陽性領域と重なることもあった。このことは、間充細胞は calponin 陽性の平滑筋と混じって存在していること、間充細胞が増えて  $\alpha$  SMA、calponin 陰性領域を作ることがあることを示唆している。

#### <DMEM-1 及び 10%FBS 条件での細胞増殖の解析>

DMEM-10%FBS 条件では、必ずしも平滑筋だけが増えているわけでないことが示唆されたため、本当に平滑筋細胞塊ハンギングドロップ培養で平滑筋が増殖したのかを EdU の細胞への取り込みと calponin の免疫染色を重ねることで解析した。DMEM-1%FBS 条件で

は、培養4日、7日ともに calponin 陽性細胞が、EdU を取り込んでいることがわかった。また、EdU 陽性細胞は細胞塊全体に散らばっていた。このことは、平滑筋が分化を維持しながら増殖していることを強く示唆している。一方、DMEM-10%FBS 条件では、4日では calponin 陽性細胞、陰性細胞の両方に EdU の取り込みが見られ、細胞塊全体に散らばっていた。7日では、calponin 陰性細胞の方に EdU 陽性細胞が多く、また外側に EdU 陽性細胞が局在するのが見られた。これは DMEM-10%FBS 条件が平滑筋より他の細胞種の増殖条件に合っている可能性がある。

#### < 2次元培養での細胞塊の分化解析 >

平滑筋細胞塊の DMEM-1%FBS 条件の3次元培養で、砂囊平滑筋の分化を維持しながら増殖させることに成功したが、2次元培養でも塊の部分では同じことが起こっている可能性があるので検証した。直径 0.4mm の細胞塊をコラーゲンコートしたディッシュにまき、DMEM-1%FBS 条件で培養後、残った細胞塊を回収し、calponin の発現、EdU の取り込みを解析した。2次元培養では細胞が次々と這い出すので、細胞塊は小さくなっていたが、細胞塊の中には、calponin、EdU 両陽性の細胞が存在しており、ここでも平滑筋が分化を維持しながら増殖していることが示された。

以上の結果から、砂囊平滑筋は細胞塊で培養することで、少なくとも7日間は平滑筋が分化を維持しながら増殖できることを示した。細胞塊の外側、つまり、細胞接着が弱い細胞が  $\alpha$  SMA 強陽性、calponin 陰性になり、脱分化したことを示していることは、昨年度2次元培養で示された、細胞接着が平滑筋の分化に重要であることをさらに裏付ける結果と考えられる。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の重要性に資する成果と考える。

また、平滑筋細胞が一般的な細胞の増殖刺激条件である 10%FBS よりもかなり低い濃度である 1%FBS で増殖を維持していることは非常に興味深い。このことが、砂囊平滑筋が消化管の他の領域より、よく増殖し、平滑筋

層が著しく厚くなる理由の一つである可能性がある。また、今回の培養で DMEM-10%FBS 条件下では、細胞塊は大きくなったが、その原因は平滑筋の増殖が 1%FBS 条件よりも上がったというよりは、間充織細胞などの他の細胞種、すなわち目的外細胞が盛んに増殖したためと考えられる。このことは「細胞培養食品」を作製する際に、条件をよく整えないと、一見増殖し収量は上がるものの、ターゲットではない、コンタミネーションまたは元々組織中に存在していた少数の細胞の割合が上昇してしまう可能性を示唆しており、細胞培養食品作製におけるリスクと考えられる。

#### D. 結論

令和4年度(初年度)から令和6年度(今年度)に亘り、以下のような研究成果を得た。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調査については、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た。補完的な検討として、ハザード要因として懸念される正常型プリオンの発現制御に関し検討した結果、細胞増殖因子の添加や2次元から3次元培養などの培養条件を変化させることにより、その遺伝子発現が、顕著に変動することを見出し、培養条件の選択理由の重要性に資する成果を得た。また非意図的な細胞由来生理活性物質や新規のアレルゲンなどの潜在的なハザード因子を抽出して、リスクプロファイルを作成し、安全管理において重要と考えられる点の提案を行なった。他方、各分担研究における検討については、転写共役因子 YAP 遺伝子をはじめ複数の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、目的に合った細胞を特定する必要性と、使用する年齢・臓器部位・培養条件などの様々な選択理由の重要性に資する成果を得た。

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。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。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。

#### E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表 (抜粋)

1) 五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡: 細胞培養食品の安全性に係る諸外国の規制動向について, 食品と開発, 2025; 60 巻 6 号, 1-5, インフォーマ マーケッツ ジャパン (東京) [ISSN: 0911-3932]

2) 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]

3) Takashi Chaen, Tamaki Kurosawa, Kazuhisa Kishi, Noriyuki Kaji, Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Masatoshi Hori: Transcriptome analysis of mesenchymal stromal cells of the large and small intestinal smooth muscle layers reveals a unique gastrontestinal stromal signature. Biochemistry and Biophysics Reports, (2023) vol. 34, 101478.  
[doi: 10.1016/j.bbrep. 2023. 101478]

4) 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, 2023; 通巻 885 号 (73 巻 12 号), 17-31, 公益社団法人日本食品衛生協会 (東京) [ISSN: 0559-8974]

5) 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 (2022) 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.

6) 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 (抜粋)

1) 金佳誼、福田公子: A 3D Culture System to Maintain Proliferation and Differentiation of Gizzard Smooth Muscle Cells. 第 58 回日本発生生物学会, 第 77 回細胞生物学会合同大会、名古屋、2025 年 7 月 16-18 日

2) 五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡: 細胞培養食品の開発や規制に関する最近の国際動向、第 51 回日本毒性学会学術年会、(2024. 7. 4)、福岡

3) 堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永 弥月、茶圓貴志、黒澤珠希、北嶋 聡: 細胞培養食品バイオハザード研究 2: 培養細胞の遺伝子発現における老齢個体の影響と 継代による生体内有害物質合成/分解系の遺伝子変動、51 回日本毒性学会学術年会、(2024. 7. 4)、福岡

4) 北嶋 聡: いわゆる培養肉の開発動向とその食品安全に関する諸外国の規制動向、日本食品化学学会 第 40 回食品化学シンポジウム、(2024. 11. 15)、川崎

5) 仁科博史: JNK および Hippo リン酸化シグナル伝達経路の生理的役割、神戸大学 CMX 創発医学講演会(2024. 6. 24) 神戸

6) 金佳誼、福田公子: 砂囊平滑筋細胞塊からの平滑筋細胞培養、第 47 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2024 年 11 月 27-29 日

7) 堀 正敏、三原大輝、後藤もも、徳永 弥生、伊藤浩人、茶圓貴志、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

8) 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.

9) 五十嵐智女、西村拓也、北嶋 聡：細胞培養食品(いわゆる培養肉)の開発と安全性確保に関する最新動向―家畜・家禽以外の動物種を含めて―、日本動物学会第95回長崎大会、(2023.9.14)、長崎

#### G. 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