

遺伝子組換え飼料の牛に対する安全性に関する研究

嶋田伸明

Safety evaluation of genetically modified Bt11 corn for cattle

Nobuaki SHIMADA

農林水産業における遺伝子組換え技術の利用は、農作物の品種改良や生産工程の効率化といった恩恵を人類にもたらした。しかし、遺伝子組換え農作物の哺乳動物に対する安全性について一般消費者の間に根強い懸念が存在していることから、遺伝子組換え農作物の安全性の確認については、食品としては厚生労働省の「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」に基づき、飼料については農林水産省の「組換え体利用飼料の安全性評価指針」に基づいて行うことが義務づけられている。これらの審査は、開発された遺伝子組換え飼料の既存のものとの同等性に関する資料、宿主に関する資料およびベクターに関する資料等に基づいて行われるが、毒性学あるいは臨床病理学的な観点から実施されている家畜を用いた飼養試験の数は少ない。そこで本研究では、遺伝子組換え飼料の安全性に関する科学的知見を確保する目的の一環として、殺虫性蛋白質Cry1Abを発現している遺伝子組換え農作物であるBt11トウモロコシを牛に給与し、Bt11が牛に与える影響について臨床病理学的視点から*in vivo*レベルで解析するとともに、Cry1Abが哺乳動物細胞に与える影響について*in vitro*レベルで解析した。

(1) 子牛を用いた遺伝子組換えトウモロコシBt11の飼養試験

第1胃フィステルを装着した子牛を用い、Bt11の飼養試験を実施した。すなわち、およそ3ヶ月齢の交雑種子牛の第1胃にキシラジン鎮静、塩酸プロカイン局所麻酔下でフィステル装着手術を実施し、およそ2週間の回復期間の後、試験を開始した。実験牛は、室温およそ24℃に保った物理的封じ込め畜舎の個別牛房に12頭をBt11給与群

および非組換えトウモロコシ給与（対照）2群に分割して収容し、12時間照明、12時間暗黒として12週間飼育した。給与飼料は、1日あたりの体重増加が1kgとなるよう設計を行った。

試験期間中は体温測定と臨床症状観察を毎日実施した。血液および第1胃液は2週間間隔で採取した。血液については、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性、アルカリ性ホスファターゼ活性、総ビリルビン濃度、血清総蛋白質濃度、アルブミン濃度、総コレステロール濃度、トリアシルグリセロール濃度、血液尿素態窒素濃度、クレアチニン濃度、カルシウム濃度、無機リン濃度、マグネシウム濃度、グルコース濃度、ナトリウム濃度、カリウム濃度および塩素イオン濃度を測定した。第1胃液についてはpH、有機酸濃度を測定した。

結果については、体温、肉眼臨床所見に、Bt11給与による異常は見られなかった。その他、血液および第1胃液に関してもBt11給与による異常は認められなかった。

以上の結果から、*in vivo*におけるBt11による影響は認められないことが確かめられた。

(2) 小腸上皮細胞を用いたCry毒素の影響評価

Bt11の生体組織に対する影響をより詳細に調べるため、Bt11が発現している殺虫性蛋白質Cry毒素（Cry1Ab）の牛小腸上皮細胞に対する結合親和性と、牛小腸上皮細胞とヒト小腸上皮細胞に及ぼす影響について、*in vitro*レベルで調べた。まず、免疫沈降法と表面プラズモン共鳴法を用いて、Cry1Abの牛小腸上皮細胞膜との結合親和性と感受性蚕小腸上皮細胞膜との結合親和性につい

て比較検討した。その結果、Cry1Abがわずかながら牛の細胞膜に対して結合することが明らかとなったが、感受性蚕と比較するとその親和性は明らかに低かった。続いてCry1Abの細胞レベルでの影響について検討した。牛の小腸より小腸上皮細胞を調製し、その細胞に対してCry1Abを作用させた。昆虫細胞におけるCry1Abの作用機序は細胞膜上にイオノフォアを形成することであると考えられていることから、細胞の膜電位を測定することにより、間接的に細胞膜の障害の有無について検討した。膜電位を膜電位感受性蛍光色素DiBAC₄ (3) を用いて測定した結果、感受性蚕の中腸上皮細胞では、Cry1Abによる明らかな膜電位の上昇が認められたが、牛の小腸上皮細胞においては膜電位の上昇は認められなかった。さらに、正常ヒト小腸上皮細胞由来の株化細胞に対するCry1Abの影響について調べた結果、細胞形態、LDH遊離率、細胞数、膜電位において、Cry1Abによる異常は認められなかった。

以上の結果より、細胞レベルにおいてもCry1Abは牛に対して影響を及ぼさないことが確かめられた。

(3) 牛小腸上皮細胞におけるCry1Ab結合蛋白質の検索

リガンドブロット法を用いて牛小腸上皮細胞上のCry1Ab結合蛋白質を検索した結果、45kDaの蛋白質とCry1Abが結合することが明らかとなった。そこで、この45kDaの蛋白質のアミノ酸配列を分析した結果、この蛋白質はアクチンであることが明らかとなった。続いて、凍結組織切片上でCry1Ab結合蛋白質の検索を行った。その結果、小腸上皮細胞刷子縁の部位にCry1Abが結合

し、また、その結合はβアクチンの組織局在と一致することが明らかとなった。このことにより、Cry1Abがβアクチンと結合親和性を持つことが明らかになったが、βアクチンは細胞骨格構成蛋白質であり細胞膜上に露出していないことから、生細胞ではCry1Abの受容体とはなりえないと考えられた。

(4) 牛初代培養肝細胞を用いたCry1Abの影響評価

消化管から取り込まれた物質の代謝機構の中心器官である肝臓へのBt11由来Cry1Abの影響を評価するため、牛初代培養肝細胞へのCry1Abの影響について調べた。まず、Bt11から牛の体内に取り込まれたCry1Abは検出限界以下であり、また、たとえあったとしても2μg/ml以下であることをELISA法で確認した。続いて、牛初代培養肝細胞に2μg/mlのCry1Abを作用させて、細胞形態、アルブミン分泌量、LDH遊離率、細胞数、膜電位をそれぞれ観察・測定した。その結果、どの項目においてもCry1Abによる異常は認められなかったことから、Cry1Abは肝細胞に対しても影響を及ぼさないことが確かめられた。

以上のように本研究において、Bt11による牛への影響を*in vivo*および*in vitro*の両面から評価した結果、Bt11給与およびBt11由来殺虫性蛋白質Cry1Abの生体あるいは細胞に対する影響は認められず、したがってCry1Abを発現しているBt11の給与は、従来の非組換えトウモロコシと同様に、安全性の観点からも問題なく給与できるものと結論づけられる。