

氏名（本籍）	嶋田 伸 明（茨城県）
学位の種類	博士（獣医）
学位記番号	獣医博乙第77号
学位授与年月日	平成18年9月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	遺伝子組換え飼料の牛に対する安全性に関する研究
審査委員	主査 東京農工大学 教授 三 森 国 敏 副査 帯広畜産大学 教授 松 井 高 峯 副査 岩 手 大 学 教授 津 田 修 治 副査 東京農工大学 教授 下 田 実 副査 岐 阜 大 学 教授 柵 木 利 昭

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

農林水産業・食品産業等における遺伝子組換え技術の利用については、画期的な新品種の作出、生産工程の効率化等といった生産分野への貢献はもちろんのこと、21世紀半ばの人口100億人時代の食糧問題、地球環境問題等を解決するためのキーテクノロジーとしても期待されている。遺伝子組換え作物の食品としての安全性については、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、それぞれ安全性の確認を行うこととされているが、一般消費者の間には安全性に対する懸念が根強く存在している。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トウモロコシBt11が牛に与える影響について、第1章では臨床病理学的視点から *in vivo* レベルで解析し、第2～4章では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（第2～4章）。

第1章では、第1胃フィステルを装着した子牛を用いたBt11の飼養試験を実施した。約3ヵ月齢の子牛の第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3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（6頭）および非組換えトウモロコシ給与群（6頭）の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。測定項目は、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン濃度、血液生化学分析として、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、グルコース濃度を測定し、その他、血清ナトリウム、カリウム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。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。

第2章では、Bt11の生体組織に対する影響をより詳細に検索するため、Bt11に発現している殺虫性蛋白質Cry毒素(Cry1Ab)の(i)牛小腸上皮細胞との結合親和性と(ii)牛小腸上皮細胞と人小腸上皮細胞に及ぼす影響について*in vitro*レベルで解析した。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中腸上皮細胞膜との結合親和性について比較検討した結果、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するため、牛の小腸より小腸上皮細胞を調整し、その細胞に対してCry1Abを作用させた。Cry1Abの作用機序は昆虫細胞で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索した。膜電位を膜電位感受性蛍光色素DiBAC<sub>4</sub>(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、人小腸上皮細胞由来の株化細胞に対するCry1Abの影響について検索した結果、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。

第3章では、リガンドプ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の蛋白質の内部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。

第4章では、消化管から取り込まれた物質の解毒器官の中心である肝臓への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の影響について検討した。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2000 ng/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2000 ng/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。

以上の研究結果から、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、牛に対して無害であると結論された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

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トウモロコシ 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、さらに、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。

第1章では、子牛を用いた Bt11 の飼養試験を実施し、Bt11 給与の影響を血液およびルーメンの生化学的諸指標を測定することにより評価した。その結果、臨床症状、血液学的指標、生化学的指標、ルーメン指標に異常は認められず、*in vivo* レベルにおいて Bt11 の影響は認められないことが確かめられた。

第2章では、Cry1Ab が生体組織に及ぼす影響を *in vitro* レベルで解析した結果、Cry1Ab がわずかながら牛の小腸上皮細胞膜に対して結合することが明らかとなったが、蚕と比較するとその親和性は明らかに低かった。また、Cry1Ab が牛および人の小腸上皮細胞の膜電位に及ぼす影響を検索した結果、異常は認められなかった。さらに、Cry1Ab が人の小腸上皮細胞に及ぼす影響について検索した結果、細胞形態、LDH 遊離率、細胞数において異常は認められなかった。以上の結果から、Cry1Ab は哺乳動物小腸上皮細胞と僅かに結合するが、悪影響を及ぼさないことが *in vitro* レベルでも確かめられた。

第3章では、牛小腸上皮細胞上の Cry1Ab 結合蛋白質を検索するため、リガンドブロット法、Cry1Ab 結合蛋白質の内部配列の分析、免疫組織化学的検索を行った。その結果、Cry1Ab がβアクチンと結合することが明らかとなったが、Cry1Ab の毒性発現に必要なアミノペプチダーゼ N、カドヘリン、アルカリフォスファターゼとは結合しなかった。これらのことから、Cry1Ab はβアクチンと結合するが、牛小腸上皮細胞上には Cry1Ab の毒性発現に必要な膜蛋白質が存在しないことが明らかとなった。従って、このことから Cry1Ab は哺乳動物の小腸上皮細胞に悪影響を及ぼさないと考えられた。

第4章では、解毒器官である肝臓への Cry1Ab の影響を評価するため、牛初代培養肝細胞を用いた評価実験を行った。その結果、細胞形態、アルブミン分泌量、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ず、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。

以上の研究結果から、Cry1Ab は生体あるいは細胞に対して何ら影響を示さず、Cry1Ab を発現している Bt11 の給与は、牛に対して無害であると結論された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Effects of *bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin on mammalian cells  
著 者 名 : Shimada, N., Kim, Y.S., Miyamoto, K., Yoshioka, M. and Murata, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 65(2):187-191, 2003
- 2) 題 目 : *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry1Ab toxin does not affect the membrane integrity of the mammalian intestinal epithelial cells: an *in vitro* study  
著 者 名 : Shimada, N., Miyamoto, K., Kanda, K. and Murata, H.  
学術雑誌名 : In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal  
巻・号・頁・発行年 : 42(2):45-49, 2006
- 3) 題 目 : Binding of Cry1Ab toxin, a *bacillus thuringiensis* insecticidal toxin, to proteins of the bovine intestinal epithelial cell: an *in vitro* study

- 著者名 : Shimada, N., Miyamoto, K., Kanda, K. and Murata, H.  
 学術雑誌名 : Applied Entomology and Zoology  
 巻・号・頁・発行年 : 41(2):295—301, 2006
- 4) 題 目 : Effects of feeding calves genetically modified corn Bt11: a clinico-biochemical study  
 著者名 : Shimada, N., Murata, H., Mikami, O., Yoshioka, M., Guruge, K.S., Yamanaka, N., Nakajima, Y. and Miyazaki, S.  
 学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
 巻・号・頁・発行年 : accepted 8 June, 2006

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Suppressive effect of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on bovine neutrophil chemiluminescence  
 著者名 : Murata, H., Shimada, N. and Yoshioka, M.  
 学術雑誌名 : Veterinary and Human Toxicology  
 巻・号・頁・発行年 : 44(2):83—86, 2002
- 2) 題 目 : Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes  
 著者名 : Yoshioka, M., Watanabe, A., Shimada, N., Murata, H., Yokomizo, Y. and Nakajima, Y.  
 学術雑誌名 : Domestic Animal Endocrinology  
 巻・号・頁・発行年 : 23(3):425—433, 2002
- 3) 題 目 : Structure-activity relationships among zearalenone and its derivatives based on bovine neutrophil chemiluminescence  
 著者名 : Murata, H., Sultana, P., Shimada, N. and Yoshioka, M.  
 学術雑誌名 : Veterinary and Human Toxicology  
 巻・号・頁・発行年 : 45(1):18—20, 2003
- 4) 題 目 : Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves  
 著者名 : Chowdhury, E.H., Shimada, N., Murata, H., Mikami, O., Sultana, P., Miyazaki, S., Yoshioka, M., Yamanaka, N., Hirai, N. and Nakajima, Y.  
 学術雑誌名 : Veterinary and Human Toxicology  
 巻・号・頁・発行年 : 45(2):72—75, 2003
- 5) 題 目 : Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11  
 著者名 : Chowdhury, E.H., Kuribara, H., Hino, A., Sultana, P., Mikami, O., Shimada, N., Guruge, K.S., Saito, M. and Nakajima, Y.  
 学術雑誌名 : Journal of Animal Science  
 巻・号・頁・発行年 : 81(10):2546—2551, 2003
- 6) 題 目 : Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11  
 著者名 : Chowdhury, E.H., Mikami, O., Murata, H., Sultana, P., Shimada, N., Yoshioka, M., Guruge, K.S., Yamamoto, S., Miyazaki, S., Yamanaka, N. and Nakajima, Y.  
 学術雑誌名 : Journal of Food Protection  
 巻・号・頁・発行年 : 67(2):365—370, 2004
- 7) 題 目 : C57BL/6 マウス心臓の新生子期形態形成における細胞増殖とアポトーシスの意義  
 著者名 : 高橋希実, 嶋田伸明, 町田登  
 学術雑誌名 : 動物の循環器  
 巻・号・頁・発行年 : 37(1):14—21, 2004

- 8) 題 目 : Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview  
著 者 名 : Murata, H., Shimada, N. and Yoshioka, M.  
学術雑誌名 : The Veterinary Journal  
巻・号・頁・発行年 : 168(1):28—40, 2004
- 9) 題 目 : Suppressive effect of deoxynivalenol, a *fusarium* mycotoxin, on bovine and porcine neutrophil chemiluminescence: an *in vitro* study  
著 者 名 : Takayama, H., Shimada, N., Mikami, O. and Murata, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 67(5):531—533, 2005
- 10) 題 目 : Cerebrospinal fluid S-100B concentrations in normal and diseased cattle  
著 者 名 : Shimada, N., Inoue, T. and Murata, H.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 67(6):621—623, 2005