

バイオ応用食品の安全性評価・ コーデックスガイドライン③ 「アレルギー誘発性の評価法」

鈴木幸雄

特定非営利活動法人 日本国際生命科学協会 (ILSI Japan)
食品安全部会アレルギー分科会

はじめに

1996年、国際食品バイオテクノロジー会議と国際生命科学研究所のアレルギー・免疫研究所(IFBC/ILSI)は、判断樹を用いて遺伝子組換え食品に含まれる新遺伝子産物(タンパク質)のアレルギー誘発性を評価する方法を提案した(Metcalfほか)。最終的にこの判断樹そのものは採用されなかったが、コーデックス委員会バイオテクノロジー応用食品特別部会(特別部会)におけるバイオテクノロジー応用食品のアレルギー誘発性の議論はこの判断樹を基調になされてきた。本稿では、評価法審議の経過、最終案について紹介する。

1. 評価法審議の経緯

(1) バイオテクノロジーと食品の安全性に関する FAO/WHO 専門家会議(1996年)

遺伝子組換え食品のアレルギー誘発性問題がはじめて大きく取り上げられた。IFBC/ILSIが開発した評価方法と同様の方法が提唱され、判断項目としては、組換え遺伝物質の起源食品、分子量、アミノ酸配列相同性、加熱・加工に対する安定性、pH・胃液の影響(消化安定性)、食品中の含有量、などの事項が含まれ、「遺伝子組換え生物のアレルギー誘発性評価のための合理的かつ科学的総合的な安全性評価法の一環として実施すべきものである」と結論された。

(2) 第1回特別会議(2000年3月、千葉・幕張 メッセ)

FAO/WHOが採択したIFBC/ILSI判断樹の中で用いられている判断基準の確実性が疑問視された。さらに、組換えに用いる遺伝子の起源食品について、ア

レルギー性に関する情報がない場合は判断樹に新たな基準を付け加えることを考慮し、新タンパク質の発現量と発現部位、新タンパク質の機能的特性などもこれらの基準となとした。

(3) FAO/WHO 専門家会議(2000年5~6月、ス イス・ジュネーブ)

特別会議の要請を受け、最新の科学的情報や詳細な協議を行い、IFBC/ILSI判断樹をひな型としてFAO/WHO 2001年判断樹(図1)を作成した。

(4) 第2回特別会議(2001年3月、千葉・幕張 メッセ)

特別部会は、タンパク質がアレルギー誘発性か否かを判断するには単一の基準では不十分であることからFAO/WHO 2001年判断樹を採用せず、これまでFAO/WHOで報告された基本的評価法を提示し、総合的で段階的な個別の評価法を用いることで合意した。

(5) FAO/WHO 専門家会議(2001年1月、イタリ ア・ローマ)

第3回特別会議の要請を受け、「組換えDNA食物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン案のアレルギー誘発性評価に関する添付資料案(付属文書)」を作成した。

(6) 第3回特別会議(2002年3月、横浜・パシフィ コ横浜)

付属文書が合意された。今後、規格作成手続ステップ8に進行させる。

2. 最終評価方法

(1) 評価方法

導入タンパク質の供給源、当該タンパク質と既知のアレルゲンのアミノ酸配列における有意な類似性、構造的特性を調査する。これには酵素分解に対する感受性、熱安定性、酸・酵素処理などが含まれるが、これに限定されない。

(2) タンパク質の供給源の情報

導入タンパク質の供給源についてのアレルギー情報が得られれば、アレルギー誘発性評価において考慮すべき手段や関連データが明らかになる。これには、スクリーニングを目的とする血清の利用可能性、アレルギー反応の種類・程度・頻度の記載、構造的特徴およびアミノ酸配列、その供給源に由来する既知のアレル

筆者紹介：すずき・ゆきお 三栄源エフ・エフ・アイ(株) 執行役員・学術部長 医学博士 専門：免疫生化学、薬事 連絡先：〒561-8588 豊中市三和町1-1-11 E-mail: yusuzuki@sancigenffi.co.jp(勤務先)

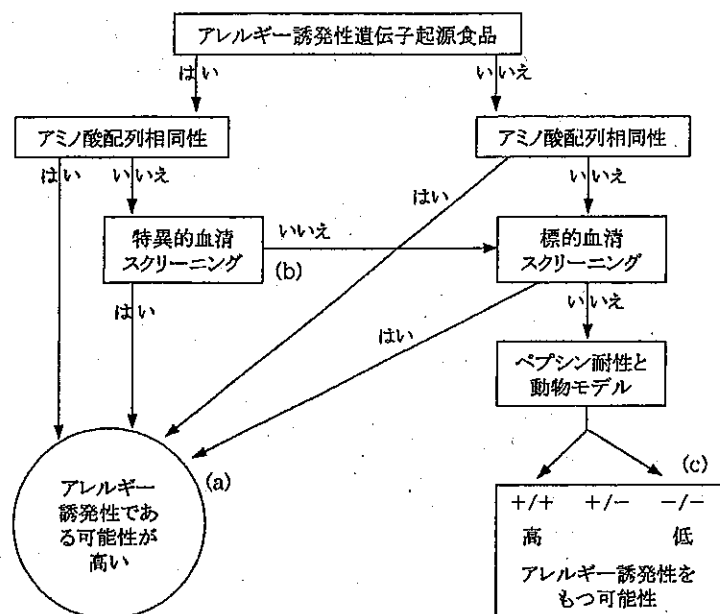


図1 FAO/WHO 2001年判断樹

(a) 指針に基づいて試験し、データベースに掲載されている既知アレルギー誘発物質とのアミノ酸配列相同性と血清スクリーニング検査について陽性を示した場合、発現タンパク質がアレルギー誘発物質である可能性が高い。

(b) 多試行数によるスクリーニングが可能な場合は少試行数でのスクリーニングは避けるべきであると示しており、試行数を増やして検査することによって特異的血清スクリーニングによる陰性結果の信頼性が高まる。

(c) ペプシン耐性試験および動物実験の両方で陽性を示した場合、発現タンパク質はアレルギー誘発物質である可能性が高い。両試験で陰性を示した場合は、発現タンパク質がアレルギー誘発物質である可能性は低い。両試験の結果が異なる場合はアレルギー誘発性の有無は不明だが、理論的な解釈が可能な場合もある。

アレルギー誘発性タンパク質の物理化学的・免疫学的特性(適宜)が含まれる。

①アミノ酸配列相同

配列相同比較の目的は、新たに発現したタンパク質の構造がどの程度既知のアレルゲンと類似しているかを評価することである。この情報は、このタンパク質がアレルギー誘発性を有するかどうかを示唆する。配列相同の検索は、新たに発現したすべてのタンパク質の構造をすべての既知のアレルゲンと比較して行う必要がある。FASTA または BLASTP など様々なアルゴリズム(段階的手法)を用いて検査を行い、包括的な構造的類似性を予測すべきである。直線エピソードを示す可能性のある配列を明らかにするために、連続する同一のアミノ酸部分の段階的な検索などの方法を実施する場合もある。連続アミノ酸検査の規模は、偽陰性または偽陽性結果が生じる可能性を最低限に抑えるために科学的正当性に基づくべきである^{*)}。生物学的

に意味のある結果を得るため、検証済みの調査・評価手法を用いるべきである。

80以上のアミノ酸部分で35%以上の同一性(2001年FAO/WHO専門家会議報告書アレルギー誘発性評価)が認められるか、またはその他の科学的に正当な基準がある場合は、新たに発現したタンパク質と既知のアレルゲンの間のIgE交差反応の可能性を考慮する。個別の科学的評価を可能にするため、新たに発現したタンパク質と既知のアレルゲンの間の配列相同比較から得られた情報はすべて報告する。

配列相同研究にはある種の限界がある。特に比較においては、一般に利用できるデータベースと科学文献に掲げる既知のアレルゲンの配列に限定される。IgE抗体と特異的に結合可能な非連続エピソードの検出においてもその比較能力に限界がある。

配列相同検査でマイナスの場合、新たに発現したタンパク質は既知のアレルゲンではなく、既知のアレルゲンに対する交差反応性が低い。有

意な配列相同がないことを示す結果が得られた場合は、その他のデータと合わせて考慮する。必要に応じ、さらなる研究を実施する。配列相同検査でプラスの場合、新たに発現したタンパク質はアレルギー誘発性である可能性が高い。この製品をさらに検討する必要がある場合は、同定されたアレルギー誘発性供給源に対して感作された特異的血清を用いて評価する。

②ペプシン耐性

いくつかの食品アレルゲンにおいて、ペプシン消化に対する耐性が認められており、ペプシン耐性とアレルギー誘発性には相関関係がある^{**)}。したがって、適切な条件下でペプシンが存在する場合に、分解に対するタンパク質の耐性が認められれば、新たに発現したタンパク質がアレルギー誘発性である可能性を調べるためにさらに分析を行う。整合性があり十分に検証されたペプシン分解プロトコルが確立できれば、この方法の有効性が高まる可能性がある。しかし、ペプシン

耐性がない場合も、新たに発現したタンパク質が関連アレルギーである可能性を排除することにはならないことを考慮すべきである。

ペプシン耐性プロトコルは強く推奨されるが、他の酵素感受性プロトコルを用いてもよい^{*3}。

③特異的血清スクリーニング

アレルギー誘発性である、または既知のアレルゲンとの配列相同が明らかな供給源に由来するタンパク質については、血清が利用できる場合は免疫学的検査における試験を実施する。当該のタンパク質の供給源に対するアレルギーが臨床的に検証された特異的血清を用いて、*in vitro* アッセイにおいてタンパク質の IgE クラス抗体との特異的結合を調べることができる。この試験において重要な問題は、十分な数の個人からヒト血清が得られるかどうかである^{*4}。さらに、血清の質とアッセイ手順を標準化して有効な試験結果を出す必要がある。供給源のアレルギー誘発性が不明で、既知のアレルゲンに対する配列相同を示さないタンパク質については、標的血清スクリーニング(広範な関連領域の食品に対するアレルギー反応が臨床的に認証されている患者の血清における IgE 結合の評価)が利用できる場合は、これを考慮する。

既知のアレルギー誘発性供給源に由来する新たに発現したタンパク質の場合、*in vitro* の免疫学的検査における陰性結果だけでは十分ではないと考えられる場合があり、皮膚テストや *ex vivo* プロトコルなど補足的試験を促すべきである^{*5}。

④その他の検討事項

新たに発現したタンパク質に対する絶対的曝露と、関連する食品加工の影響は、ヒトの健康に対するリスクの可能性に関する総合的な結論に影響を与える。このため、適用される加工の種類や最終食品中のタンパク質の存在に対する影響を判断する上で、対象食品の本質を考慮すべきである。

科学的知識と技術の進歩に伴い、評価方法の一環としての新たに発現したタンパク質のアレルギー誘発性評価において、その他の方法や手段も考慮することができる。こうした方法は科学的な信頼が得られるものであるべきである。標的血清スクリーニング、国際血清バンクの開発、動物モデルの開発、新たに発現したタンパク質の T 細胞エピトープやアレルゲンに関わる構造的モチーフの研究などがある。

おわりに

コーデックス特別部会の最終決定は、食物アレルギーに関する現在の科学的手法・情報が不十分なため網羅的な記載となったが、特別部会において科学的な報告をもとに国際的に論議を積み重ねた上でコンセンサスが得られたことは大いに評価される。課題となった国際血清バンク、動物モデル、新たに発現したタンパク質の T 細胞エピトープやアレルゲンに関わる構造的モチーフの研究などの進展は、広く食物アレルギーに関わる領域で注目すべきである。

注

- * 1 2001 年 FAO/WHO 専門家会議では、検査で使用する同一アミノ酸部分を 8 から 6 に減らすことを示唆したと受け止められた。しかしながら、段階的比較で用いるペプチド配列が少なければ少ないほど偽陽性となる可能性が高い。逆に、用いるペプチド配列が多ければ多いほど偽陰性の可能性が高くなり、比較の有効性が下がる。
- * 2 相関関係の確立において米薬局方(1995 年)に概説する方法を用いた(Astwood ほか、1996 年)。
- * 3 バイオテクノロジー応用食品のアレルギー誘発性に関する FAO/WHO 合同専門家会議報告書(2001 年)のセクション 6.4 「ペプシン耐性」参照。
- * 4 バイオテクノロジー応用食品のアレルギー誘発性に関する FAO/WHO 専門家会議(2001 年 1 月 22~25 日、イタリア・ローマ)の合同報告書によれば、主要アレルゲンの場合、新たなタンパク質がアレルゲンではないことを 99% 確実にするためには、最低八つの関連血清が必要である。同様に、非主要アレルゲンについて同じ確実性を期すためには、最低 24 の関連血清が必要である。これだけの量の血清は試験のためには利用できないことが認識されている。
- * 5 *ex vivo* 試験とは、アレルギー患者の細胞・組織培養を用いたアレルギー誘発性試験とされている(バイオテクノロジー応用食品のアレルギー誘発性に関する FAO/WHO 専門家会議の報告書)。

国際動向

バイオ応用食品の安全性評価・ コーデックスガイドライン④ 「組換えDNA微生物利用食品の安全性 評価の実施に関するガイドライン」

佐々木 隆

特定非営利活動法人 日本国際生命科学協会 (IISI Japan)
バイオテクノロジー部会

はじめに

今年3月横浜で開催されたコーデックス・バイオテクノロジー応用食品特別部会第4回会議で「組換えDNA微生物を利用した食品の安全性評価」に関して討議が進められ、本案はステップ8まで進んだ。

微生物組換え体の安全性に関する論議の特徴は、植物の組換え体と共通の部分はすでに合意されている考えをほぼ適用し、微生物独自の問題を掘り下げたことである。微生物独自の問題とは、微生物の増殖が盛んなこと、比較的短期間に遺伝的変化を起こすこと、微生物組換え体が腸管内で何らかの作用を及ぼしたり微生物間で遺伝子の移行を起こしたりする可能性があること、などである。腸内で起こっている現象が科学的に十分解明されておらず明確に規定することが難しいなど複雑な問題もあるが、本会議では現時点で利用できる科学的根拠ののちって安全性評価を行おうとする姿勢が貫かれ、全体として納得できる内容のガイドラインができたことと評価される。

本稿では、微生物を利用した食品(発酵食品)の歴史や研究にも簡単に触れながら、合意されたガイドライン案の概要について紹介する。

1. 食品と微生物

微生物組換え体を利用した食品の安全性を考える前に、まず食品と微生物の関わりについて触れる。

ヒトは長い歴史の中で、日に運んだ無数のもの(主に植物・動物およびその加工品)の中から本能的・経験的に「食品」を選択してきた。すなわち、安全性を確

認してから食べたのではなく、逆に、長い間食べてきたものを「安全」と考えている。

食品は栄養に富み微生物の作用を受けやすいが、ヒトが地上に出現したときにはすでに無数の微生物が地球のいたるところに存在していたので、ヒトが食べたすべてのものには何らかの微生物が付着し、あるいは増殖していたと考えられる。つまり、ヒトは意識せずに様々な微生物を口から摂取してきた。その中には、食品を腐敗させるなど有害な作用を示す微生物もいるが、パンや各種の酒などを作る酵母、チーズやヨーグルトなどを作る乳酸菌、そのほか各種発酵食品の製造に欠かせない麹菌・酢酸菌・納豆菌など、我々の食生活を支え豊かにする有用な微生物もいる。

伝統的な「微生物利用食品」(いわゆる発酵食品)は、有用な微生物が食品素材に増殖して、アルコールなどが作られたり、味や風味が良くなったり、保存性が向上したものである。はじめは自然にできたものであったが、その後ヒトが意図して作るようになった。近代になると、発酵食品の製造に関わる微生物が明らかになり、食品産業で広く利用され、伝統的方法での育種・改良も行われてきた。また、酵母・乳酸菌・麹菌・酢酸菌などの中で重要な菌株については、1980年ごろから世界中で遺伝子組換え研究が進められてきた。現在までに、産業的に有用で安全と考えられる様々な微生物組換え体を作られている。

さらに考慮すべきことは、ヒトの腸内に数百種類もの細菌が常在して健康に様々な影響を与えているという事実である。したがって、微生物組換え体を利用した食品の安全性を考える場合、微生物菌体そのもの、代謝産物、微生物の酵素などで起こる作用、他の腸内微生物への影響、遺伝子の移行など植物組換え体で議論されたもののほかに、数多くの複雑な事項を検討する必要がある。今回合意されたガイドラインには、これら多様な側面を検討しようとする努力が盛り込まれている。

2. バイオテクノロジー応用食品特別部会で合意されたガイドライン案

次に、4節、60のバラグラフからなる「ガイドライン案」の概要を紹介する。

(1) 第1節 ガイドラインの適用範囲

最初にガイドラインの対象が規定されている。対象

筆者紹介: ささき・たかし 明治乳業(株)研究本部食品機能研究所乳酸菌工学研究室 課長 農学博士 専門: 微生物学 連絡先: 〒250-0862 小田原市成田510 E-mail: TAKASHI SASAKI@MEIJI-MILK.COM(勤務先)

となるのは、食品製造の歴史がある微生物(細菌・酵母・糸状菌など)の組換え体が生死を問わず含まれるか除去される食品・食品成分の安全性と栄養に関してである。

次に、安全性評価の原則が記されている。すなわち、これまで食品は安全性評価を受けてきたわけではないし、従来の化学物質や病原微生物の安全性評価法をそのまま食品に適用することもできない。したがって、微生物組換え体と食品中の代謝産物について安全性を評価する際、長い間ヒトが食べてきた伝統的食品(微生物)との比較が進める、などが示されている。

(2) 第2節 語句の定義

・“Recombinant-DNA Microorganism”：*in vitro* で組み換えた DNA を直接細胞などに注入して遺伝子を改変した細菌・酵母・糸状菌など(本稿では「微生物組換え体」と表す)。

・“Conventional Counterpart”：微生物組換え体に対応する微生物株で食品製造・加工などで安全に使われた歴史を有するもの、または、伝統的な食品製造微生物で作られ安全性が確立している食品(本稿では「伝統的対照微生物(食品)」と表す)。

(3) 第3節 食品の安全性評価に関する序論

微生物を利用した食品は古くからあり、従来の方法で改変された微生物も安全と考えられているが、科学的評価がなされてきたわけではない。微生物組換え体には、少なくとも病原性や食品に不適当な性質がないことが前提である。しかし、動物を使った毒性試験は食品の安全性評価としては限界がある(ただし、DNA 供与体・遺伝子・遺伝子産物などが食品として安全に摂取された歴史がない場合には適切な動物実験が必要である)。

したがって、微生物組換え体利用食品の安全性評価には「実質的同等性」の概念の適用が重要であり、伝統的対照微生物(食品)との違いを検討して安全性を評価する。

①意図せぬ効果

組換え体を作成する際に、意図しない形質の付与あるいは欠失が起こり、遺伝子発現の変化、キメラタンパク質の生成、遺伝的不安定性の増加、代謝産物や代謝経路の変化などがあり得る。これは、従来の育種技術でも起こる一般的な現象だが、微生物組換え体利用食品が意図せぬ不都合な効果を持つ可能性は減らすべきである。

安全性評価には多くのデータが必要である。それらを総合的に考慮すると、その食品がヒトの健康に悪い影響を与えないだろうという保証が得られる。この保証があってはじめて、微生物組換え体は第4節に示す安全性評価にかけられる。

②食品安全性評価の枠組み

安全性を評価すべき項目は、第4節に書かれている多くの事項である。安全性評価の対象は免疫不全の人・乳幼児・老人を含むすべての人々であり、新しい食品や微生物が伝統的対照微生物(食品)と比べて安全性で遜色ないという結論を得ることが最終目標であり、リスク管理者が消費者の健康を守るのに適切な決定を下すためのものである。

(4) 第4節 一般に考慮すべき事項

組換え体はストックカルチャーとして保存し、規制当局の求めに応じて提供する。

①宿主微生物

食品製造で安全な利用の歴史を持つものに限る。食品に適さない物質を産生し、遺伝的不安定性・抗生物質耐性・病原性などをもたらす遺伝子を有する生物を使ってはならない。

②DNA 供与体生物

同定・安全性に関わる情報、遺伝子型と表現型、利用の歴史、病原性・毒素生産などの性質に関する記載が必要である。

③遺伝的改変の記述

すべての遺伝的改変が明確に同定できる十分な情報が必要である。遺伝的改変の方法、DNA の起源・同定・機能のほか、改変 DNA の情報を詳細に記述する。

④遺伝的改変の説明

遺伝的改変を分子生物学的・生化学的に記述する。挿入する DNA は意図する機能を実現するのに必要な配列に限定するのが望ましい。また、組換え体の遺伝的改変に関する情報では、導入遺伝因子とベクター・ゲノムへの挿入数、コピー数、配列情報、隣接配列などが必要である。さらに、遺伝子の転写あるいは発現産物の情報、導入した遺伝的改変が安定であるか、意図した効果が現れているか、融合タンパク質や機能に変化したタンパク質が発現しているか、などの情報も必要である。

⑤安全性評価

安全性評価は、遺伝的改変の実態に応じてケース・バイ・ケースで実施する。食品として安全に摂取され

た歴史がある物質の場合には、従来の毒性試験は不要である。その他の場合、動物実験が必要な場合がある。

⑥発現産物

発現産物が食品で新規なものであれば毒性試験が必要である。タンパク質の場合は、毒性などの可能性をアミノ酸配列と機能から評価する。非タンパク性産物でこれまで摂取していないものは、構造・濃度・機能などに応じて毒性評価を行う。供与体が持つ好ましくない形質(または遺伝子)が、組換え体で発現(または移行)してはならない。

⑦主要食品成分の組成分析

主要食品成分の組成を、微生物組換え体および伝統的対照微生物で作った食品と比較する。

⑧代謝産物

遺伝的改変によって新規な代謝産物ができ、また混合培養の微生物組成が変わって有害微生物(物質)が増加する可能性などがあるので考慮すべきである。

⑨食品加工の影響

遺伝的改変による毒物の熱安定性増加・栄養素の生物利用率の変化などが考えられる。調理など加工による組換え体利用食品の変化も検討すべきである。

⑩免疫学的影響の評価

組換え体タンパク質のアレルギー原性を調べる。アレルギー性のある生物由来の遺伝子は避けるべきである。また、組換え体が腸管免疫系に作用するかもしれないので、伝統的対応微生物と比較すべきである。

⑪ヒト腸管での挙動

組換え体が食品で生きている場合、食品中や腸管内での生菌数と滞留時間、腸内フローラへの影響などを示すことが望ましい。

⑫抗生物質耐性と遺伝子移行

食品製造に使われてきた微生物の多くは何らかの抗生物質耐性を持つが、宿主として不適当ではない。しかし、移行可能な耐性遺伝子を持つ株は使うべきではない。抗生物質耐性以外の選択マーカー遺伝子を使うべきだが、中間宿主でのみ用いられる耐性遺伝子が最終的な組換え体に残らなければ問題ないといえる。

摂取された組換え体と腸内微生物などとの間でプラスミドや遺伝子の移行は起こり得る。遺伝子移行の可能性を最小限にするには、遺伝子を染色体に組み込むのが好ましい。腸管内で宿主株の生存を有利にする作用を持つ遺伝子の利用は避けるべきであろう。

⑬栄養的改変

バイオ技術で栄養的な改変が行われたら、その食品で試験を行って改変の影響を調べ、総合的な栄養評価(生物利用率と安定性を含めて)を行う。食品の組成が著しく変化した場合には、その組成に類似した伝統的食品と比較する。

⑭ガイドラインの見直し

将来、このガイドラインに不備が見つかった場合には見直す。

おわりに

今回のコーデックス会議でこうしたガイドライン案が合意され、微生物組換え体を利用した食品の安全性を評価する共通原則と基準が国際的に明確になった。今年中にはコーデックスの正式決定となり、各国政府がこれをもとに具体的なガイドライン作成に進むであろう。

そして近い将来、微生物組換え体を利用した食品が、政府機関の審査を経て市場に現れる可能性が極めて高くなった。ただし、発酵食品には多種類のものがあるため、組換え食品を1種類開発しても期待される販売量は作物の1品種と比べると極めて小さい。また、組換え食品に対する消費者の反応はまだまだ厳しいものがあり、有用性が明確で安全性が確保された食品が消費者に十分理解されるまでは、「微生物組換え体を利用した食品」が市場にあふれるようにはならないかもしれない。

今後様々な可能性があるものの、今回合意されたガイドラインが微生物組換え体の食品への応用にとって極めて重要な一歩であることは確かである。

個人会員入会のご案内

個人会員の入会申込みは、ホームページからできます。

<http://www.jba.or.jp> にアクセスし、

個人会員入会申込書に記入してご返信下さい。

個人年会費：年額8000円

学生会員会費：年額5000円