

図1 ELISAによる卵白特異的IgE抗体の測定

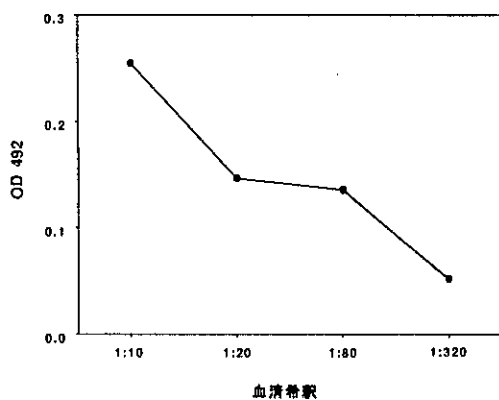


図2 sandwich ELISAによる抗卵白アルブミン特異的IgE抗体測定

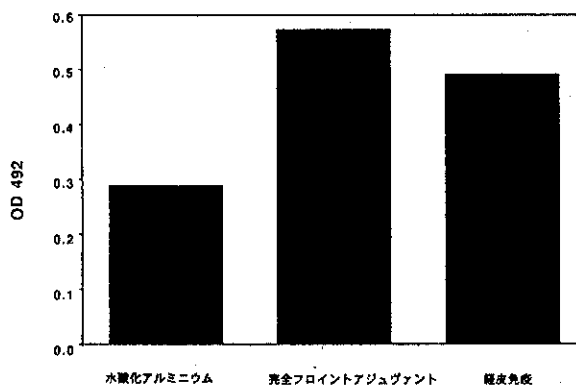


図3 各種の免疫法による卵白アルブミン特異的IgE抗体価

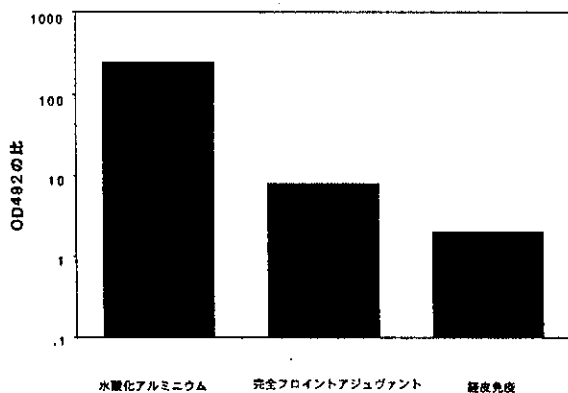


図4 各種の免疫法による卵白アルブミン特異的IgG1/IgG2a比

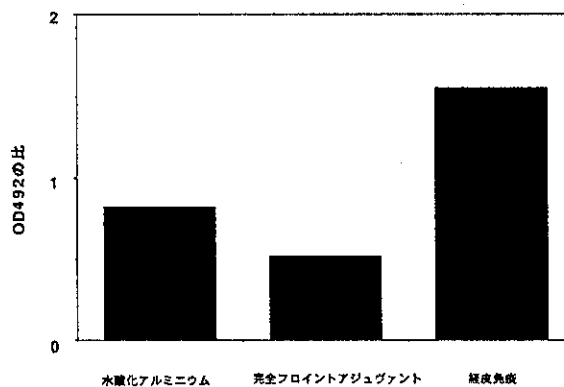


図5 各種の免疫法による卵白アルブミン特異的IgE/IgG1比

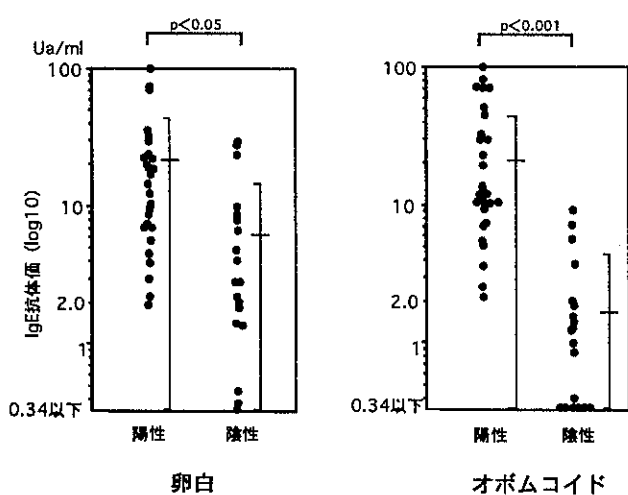


図6 即時型過敏反応陽性及び陰性群における卵白およびオボムコイド特異的IgE抗体価

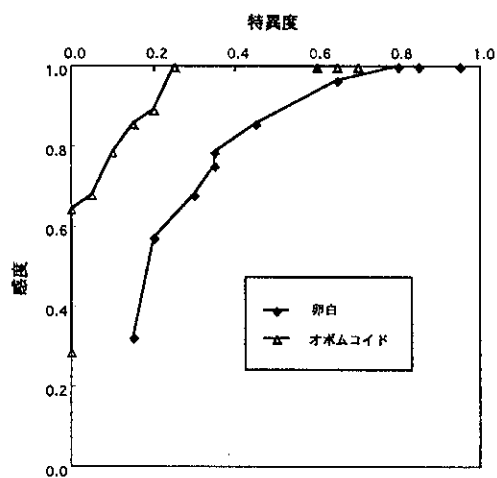


図7 感度及び特異度のROC曲線

表1 対象症例

	即時型過敏型反応陽性	即時型過敏型反応陰性
症例数	29例	19例
年齢 (平均±SD)	3.7±3.1	3.5±2.6
性別 (男:女)	22:7	13:6
血清総IgE(IU/ml) (平均±SD)	508±1699	725±1514

表2 卵白およびオボムコイド特異的IgE抗体値を用いた感度および特異度

カットオフ値	EW		OM	
	感度	特異度	感度	特異度
20	0.321	0.150	0.286	0.000
10	0.571	0.200	0.643	0.000
7.5	0.679	0.300	0.679	0.050
6	0.750	0.350	0.786	0.100
5	0.786	0.350	0.857	0.150
3.5	0.857	0.450	0.893	0.200
2	0.964	0.650	1.000	0.250
1	1.000	0.800	1.000	0.600
0.7	1.000	0.850	1.000	0.650
0.35	1.000	0.950	1.000	0.700

厚生科学研究費（バイオテクノロジー応用食品等の安全性評価に関する研究班）
分担研究報告書

薬剤耐性

分担研究者 荒川宜親（国立感染症 細菌・血液製剤部）
研究協力者 岩城正昭（同上）

研究要旨

遺伝子組換え技術を用いて新規食用作物を作出する際にマーカーとして使用されそのまま植物ゲノムに残留している薬剤耐性遺伝子が、可食部の摂食や不可食部の圃場への放置などによりヒト体内や環境中に放出されて、正常菌叢を構成する微生物を自然形質転換して薬剤耐性を与える可能性が懸念されている。本研究では、遺伝子組換え作物の利用にともなうこのような薬剤耐性遺伝子の拡散の危険を正しく評価するための基礎研究として、薬剤耐性遺伝子をマーカーとして持つ組換え植物DNAが、実験的条件下で、自然形質転換能を持つ代表的ないくつかの細菌を形質転換して薬剤耐性を与えるかどうかを調べる。初年度である本年度は、材料となる遺伝子組換え植物試料が研究期間内に入手できなかったため、文献的な検討と菌株の収集を行なった。さらにそれらの菌株の性質を一部検討し、次年度以降の研究のための基盤を整えた。

A. 研究目的

遺伝子組換え技術は今や広い範囲の食用植物に応用され、米国においては1999年に圃場で栽培された大豆の45%、とうもろこしの40%が遺伝子組換え体であった[1]。遺伝子組換え体を作成するために外来遺伝子を植物体に導入する際に、形質転換体を効率良く選択するマーカーとしてネオマイシン（カナマイシン）耐性遺伝子が一般的に利用されており、このように耐性遺伝子やその他の組換え遺伝子が環境中に放出されることを含めて、組換え植物の利用にともなう危険が懸念されている[2, 3]。遺伝子組換え技術を用いた植物やその加工食品について、「薬剤耐性遺伝子の拡散」という面から問題になりうるのは、

1. 自然交配により、組換え植物の近縁の植物に薬剤耐性遺伝子が拡散する可能性
2. 食品中に残存している薬剤耐性遺伝子が、腸管内の細菌に取り込まれ（自然形質転換）耐性菌が出現する可能性

3. 組換え植物の、廃棄されあるいは肥料として使われた非食用部分が、土壤中で分解されて露出したDNAに土壤細菌が暴露し、自然形質転換により薬剤耐性遺伝子が伝達する可能性

4. 家畜の飼料として使われた組換え植物に含まれる耐性遺伝子が、家畜用の抗菌薬としてカナマイシンがしばしば用いられ正の選択圧が働く環境下で腸内細菌を形質転換し、形質転換体を選択される可能性である。

実際に多くの遺伝子組換え植物ではカナマイシン耐性遺伝子が用いられているが、自然環境中には、様々なアミノグリコシド耐性菌が存在しているため、仮に耐性菌が出現しても環境全体に対する影響が大きいとはいいきれない。一方でヒトに対する影響を考えると、国内の医療機関で用いられている抗生物質の全消費量に対するカナマイシンの割合は数%以下と考えられ、仮に遺伝子組換え植物由来の耐性菌が出現しても

臨床全般に対する影響はさほど大きくないことが予想される。しかし、カナマイシンを投与されている患者個人にとっては、組換え食品を摂食することで耐性菌出現の可能性が高くなるのであれば危険であり、無視することはできない。

実際に、厚生省が現在法制化に向けて制定の準備を進めている「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査基準案」

(これは平成3年に定め平成8年に改定した「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針」がもとになっている。平成12年4月現在、「案」の段階であることに留意されたい) では、以下に引用するように薬剤耐性遺伝子の拡散について大きな注意を払っている。なお、全文は

http://www.mhw.go.jp/topics/public_13/houkoku4.htmlに公開されている。

第2章 組換えDNA技術によって得られた種子植物の全部又は一部を食品として用いる場合の安全性審査基準

第5 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

抗生物質耐性マーカー遺伝子を使用している場合には、次の(1)及び(2)の各項目について、組換え体内における変化等に関して行われた考察も含め、総合的に判断して、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に問題がないと判断できること。

(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項

(1)構造及び機能

- ・ 遺伝子については塩基配列、タンパク質については機能が明らかであること。
- ・ 挿入した抗生物質耐性マーカー遺伝子以外に有害塩基配列を含まないこと。
- ・ 発現するタンパク質が酵素の場合、必要に応じ、遺伝子産物の基質特異性が明らかであること。
- ・ 遺伝子産物について、既知のアレルゲンと構造相同性がないこと。

(2)耐性発現のメカニズム、使用方法及び関連代謝産物

- ・ 抗生物質の使用法(経口、静注等)が

明らかであること。

- ・ 耐性発現のメカニズムが明らかであること。
- ・ 耐性発現に関連する代謝物質が安全性に問題のないものであること。

(3)同定及び定量方法

- ・ 遺伝子産物の同定及び定量方法が明らかであること。

(4)調理又は加工による変化

- ・ 熱等の物理的処理に対する感受性があること(酵素活性を失っていること等が明らかにされていること。)

(5)消化管内環境における変化

- ・ 人工胃液・腸液に対する安定性の試験により、安定性がないことが明らかであること。安定性がある場合においては、安全性に問題ないことを示す合理的な理由があること。

(6)アレルギー誘発性

- ・ アレルギー誘発性に関する知見が明らかであること。

(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項

(1)予想摂取量

- ・ 発現量から予想される当該タンパク質の摂取量を推定すること。

(2)耐性の対象となる抗生物質の使用状況

- ・ 耐性の対象となる抗生物質の使用状況(使用方法、使用量、使用目的等)が明らかであること。

(3)通常存在する抗生物質耐性菌との比較

- ・ 入した抗生物質耐性マーカー遺伝子と同じ遺伝子を持つ耐性菌が環境中に存在しているかどうかについて明らかであること。

(4)経口投与した抗生物質の不活化推定量とそれに伴って問題が生ずる可能性

- ・ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現タンパク質(抗生物質代謝酵素)の摂取量、調理過程及び消化管内における分解量、抗生物質の使用状況等から検討した抗生物質の不活化に伴う問題がないことが推察されていること。

本研究では、遺伝子組換え作物そのものまたは遺伝子組換え植物に由来する食品中に残留するカナマイシン耐性遺伝子が、*in vitro*あるいは*in vivo*で細菌にどの程度の頻度で取り込まれ、発現して耐性を与えるのかを検討する。

研究初年度である本年度は、細菌の自然形質転換に関する文献的検討と、菌株の収集を主に行ない、入手した一部の菌株については、それらの菌に対するカナマイシンの最小成育阻止濃度を測定した。

B. 研究方法と研究結果

菌株の収集：自然形質転換能を持つ菌種は多数報告されており、1994年までに自然形質転換能を持つことがすでにわかっていた菌種は文献[4]に網羅されている(表1)。そこにあげられた菌種のうち、受容菌あたりの形質転換頻度が 10^{-3} 以上でしかもATCCから購入可能なものを選び、購入した(表2)。これらの菌株を培養し、以下の実験に用いた。

菌株の増殖と最小成育阻止濃度の測定：購入した菌株を、ATCCがそれぞれの菌株について推奨する培地で再生育させ、さらに適当な液体培地で培養して最小成育阻止濃度を測定した(表2)。200 μ g/mlのKmを含む培地を、Kmを含まない培地で2倍ずつ段階希釈し、その100 μ lに、培地で適宜希釈した菌液100 μ lを加え、マイクロタイタープレートで37°C、1-2晩培養して菌の増殖を観察して、菌の増殖が認められない最小Km濃度を最小成育阻止濃度とした。

測定された最小成育阻止濃度は表2の通りで、土壌細菌である *Acinetobacter* sp. と *Bacillus*

TABLE 1. Naturally transformable prokaryotic species^a

Species isolated from terrestrial or aquatic habitats	Transformation frequency (chromosomal marker transformants/viable cell)	Reference(s)
Photolithotrophic		
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	4.3×10^{-4}	342
<i>Anacystis nidulans</i>	8.0×10^{-4}	320
<i>Chlorobium limicola</i>	1.0×10^{-5}	258
<i>Nostoc muscorum</i>	1.2×10^{-3}	368
<i>Synechocystis</i> sp. strain 6803	5.0×10^{-4}	115
<i>Synechocystis</i> sp. strain OL50	2.0×10^{-4}	206
Chemolithotrophic		
<i>Thiobacillus thioparus</i>	10^{-3} - 10^{-2}	394
<i>Thiobacillus</i> sp. strain Y	1.7×10^{-3}	394
Heterotrophic		
<i>Achromobacter</i> spp.	+ ^b	156
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	7.0×10^{-3}	158
<i>Azotobacter vinelandii</i>	9.5×10^{-2}	263
<i>Bacillus subtilis</i>	3.5×10^{-2}	246
<i>Bacillus licheniformis</i>	1.2×10^{-2}	102
<i>Deinococcus (Micrococcus) radiodurans</i>	2.1×10^{-2}	365
<i>Lactobacillus lactis</i>	2.3×10^{-5}	138
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	10^{-7} - 10^{-6}	250
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (and related species)	7.0×10^{-5}	38
<i>Rhizobium meliloti</i>	7.0×10^{-4}	59
<i>Streptomyces</i> spp.	+ ^c	299
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	2.7×10^{-3}	141
<i>Thermus thermophilus</i>	1.0×10^{-2}	173a
<i>Thermus flavus</i>	8.8×10^{-3}	173a
<i>Thermus caldophilus</i>	2.7×10^{-3}	173a
<i>Thermus aquaticus</i>	6.4×10^{-4}	173a
<i>Vibrio</i> sp. strain DI9	2.0×10^{-7}	149
<i>Vibrio</i> sp. strain WJT-1C ^d	2.5×10^{-4e}	93
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1.9×10^{-9e}	93
Methylotrophic		
<i>Methylobacterium organophilum</i>	5.3×10^{-3}	255
Archaeobacteria		
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	+ ^b	393
<i>Methanococcus voltae</i>	8.0×10^{-6}	22
Clinical isolates of pathogenic species		
<i>Campylobacter jejuni</i>	2.0×10^{-4}	386
<i>Campylobacter coli</i>	1.2×10^{-3}	386
<i>Haemophilus influenzae</i>	7.0×10^{-3}	218
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	8.6×10^{-3}	118
<i>Helicobacter pylori</i>	5.0×10^{-4}	122
<i>Moraxella</i> spp.	+ ^b	154-157
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1.0×10^{-4}	218
<i>Neisseria meningitidis</i>	1.1×10^{-2}	41
<i>Staphylococcus aureus</i>	5.5×10^{-6}	306
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2.9×10^{-2}	178
<i>Streptococcus sanguis</i>	2.0×10^{-2}	19
<i>Streptococcus mutans</i>	7.0×10^{-4}	315

^a Modified from reference 200.

^b Qualitative determination (streaking on selective medium following plate transformation [158]).

^c Measurement of uptake of tritium-labeled DNA.

^d A high-frequency-of-transformation mutant of DI9.

^e Plasmid-encoded antibiotic resistance marker.

表1. 自然形質転換能があることが知られている細菌 (文献[4]より引用)

表 2. 購入した菌株の性質

菌株	Km最小成育阻止濃度	液体培地
<i>Acinetobacter</i> sp. ATCC33304 (BD4)	6 μ g/ml	BHI*
<i>Acinetobacter</i> sp. ATCC33305 (BD413)	6 μ g/ml	BHI
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC39620 (PSL1)	3 μ g/ml	TSB*
<i>Streptococcus gordonii</i> (<i>sanguis</i>) ATCC37105	200 μ g/ml	THB*
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC700601 (UA130)	3 μ g/ml	THB
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC11733 (R36A)	25 μ g/ml	THB
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC27336 (R36a rough)	25 μ g/ml	THB

*BHI: brain heart infusion
 TSB: trypticase soy broth
 THB: Todd Hewitt brothz

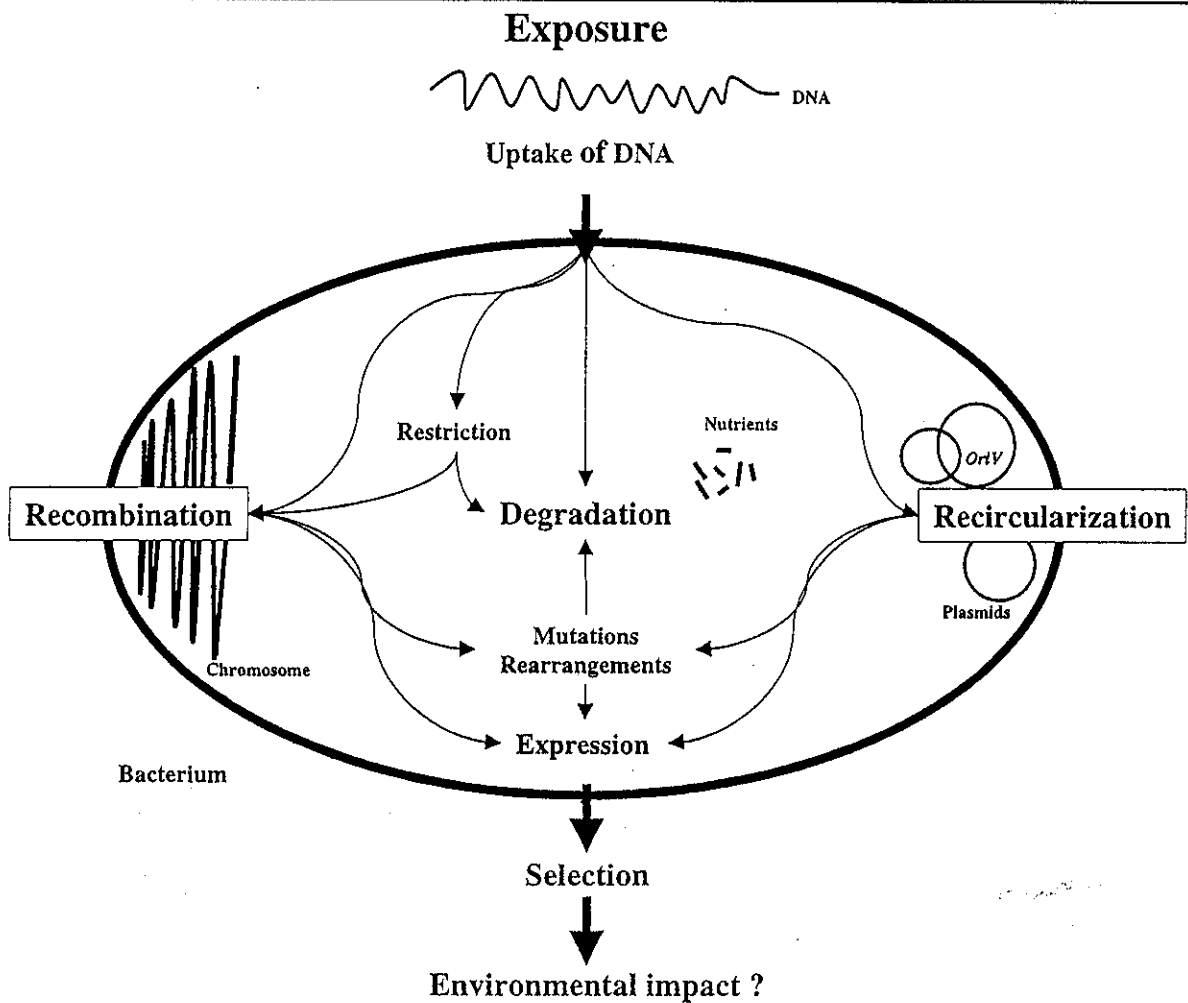


Fig. 1. Proposed fate of DNA exposed to bacterial cells expressing competence for uptake of DNA. The steps thought to be of importance for natural transformation of bacteria with genetically modified plant DNA are further described in Sections 3.1-3.5.

図 1. 形質転換能を持つ細菌に接触したDNAの運命。
 (文献[5]より引用)

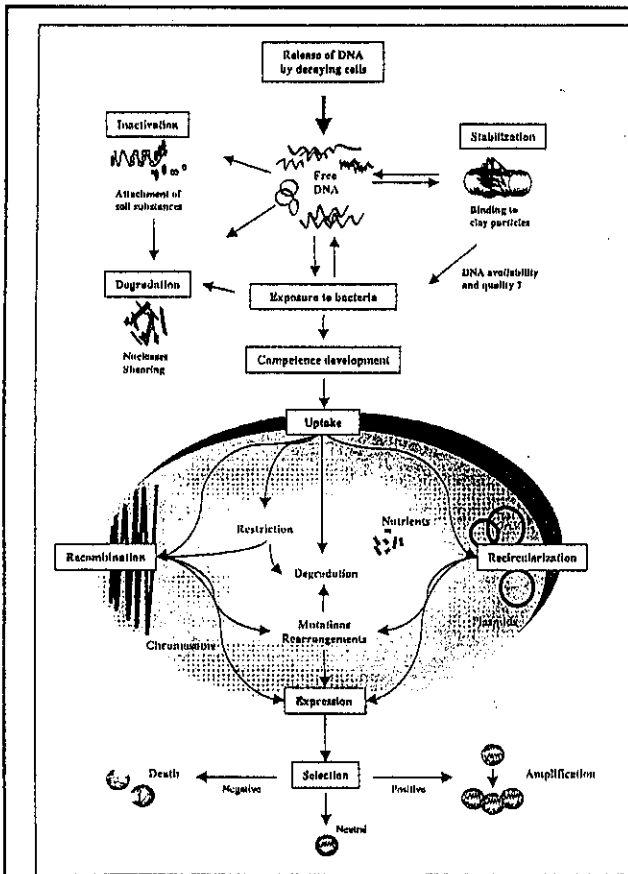


Figure 1. A proposed fate of DNA released into soil from decaying cells (Nielsen *et al.*, 1998).

図2. 土壌中に露出したDNAの運命。
(文献[6]より引用)

*subtilis*の2種はそれぞれ3 $\mu\text{g/ml}$ および1.5 $\mu\text{g/ml}$ を示し、*in vitro*のモデル実験に用いるのに適していることが示された。しかしながら、病原菌である *Streptococcus* 属細菌はこれらにくらべて高い最終成育阻止濃度を示し、モデル実験には不適當と考えられた。本研究では、ヒトに対する病原菌やヒトの腸内常在菌を用いたモデル実験が行なわれることが望ましいので、今後さらに、モデル実験に適した菌株の探索を行なう予定である。

C. 考察

Nielsenら[5, 6]は、植物などから土壌細菌へのDNAの伝達にはいくつもの障壁があり (1) 供与体由来の裸のDNAが土壌中に安定に存在し (2) それらのDNAと細菌が接触し (3) 細菌細胞内部にDNAが取り込まれ (4) 取り込まれた外来DNAが細菌細胞内で分解されずに安定に複製し (5) 取り込まれたDNAの情報が細菌細胞内で発現し (6) 発現した形質がそ

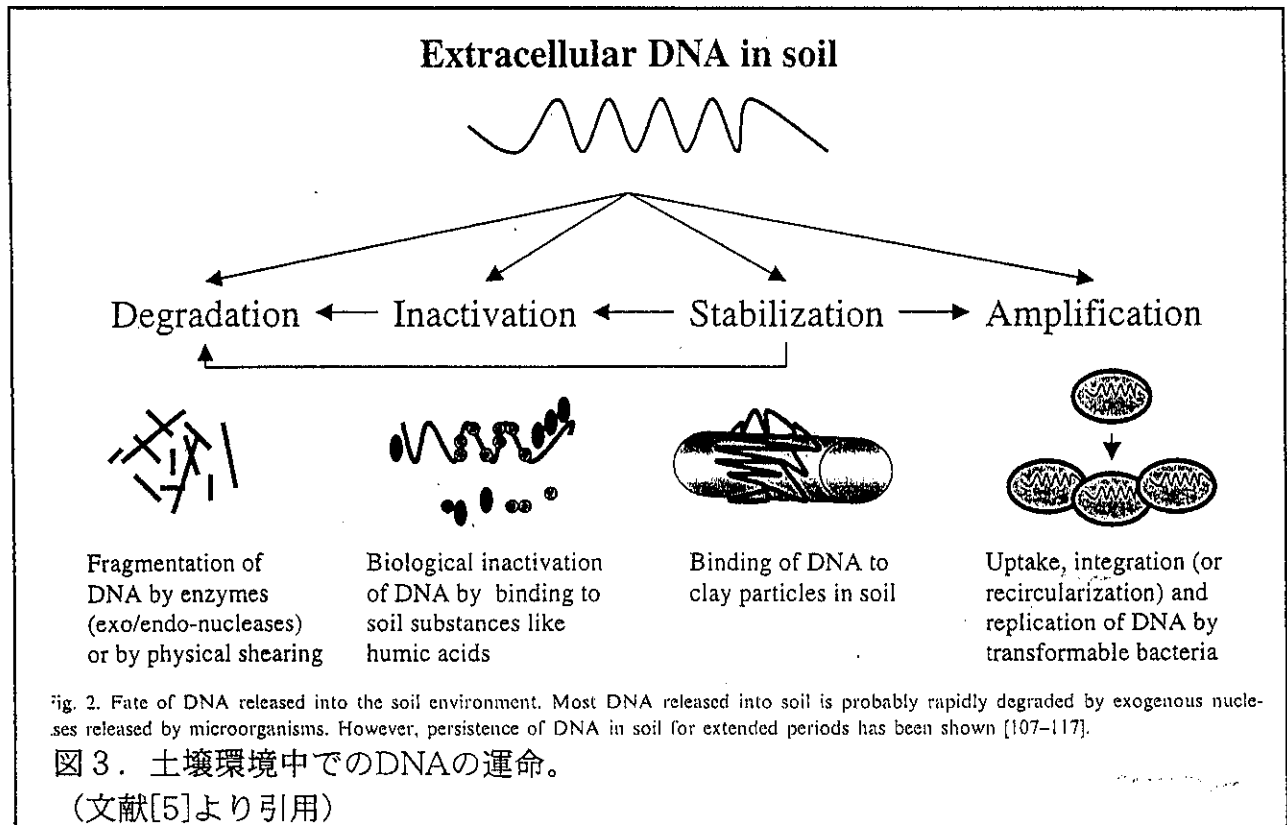


Fig. 2. Fate of DNA released into the soil environment. Most DNA released into soil is probably rapidly degraded by exogenous nucleases released by microorganisms. However, persistence of DNA in soil for extended periods has been shown [107-117].

図3. 土壌環境中でのDNAの運命。
(文献[5]より引用)

の環境中で生存に有利である をすべて満足してはじめて植物などから土壌細菌へのDNAの伝達が起こりうるとしている（図1、図2）。また同じ著者らは[5]環境中の供与体由来の裸のDNAの不活化、分解の要因として土壌中の特定の物質との結合によりDNAが細菌にとって利用不能になることや、DNAの酵素的分解、物理的切断をあげ、安定化の要因として土壌粒子への吸着をあげている（図3）。実際に、実験的にDNAを添加したあと洗って遊離のDNAを除去した土壌に土壌細菌*Pseudomonas stutzeri*を接種することにより自然形質転換体が得られ、土壌粒子に吸着したDNAによる自然形質転換が起こりうることを示されている[7]。

腸内の環境においても、土壌環境と同じように細菌へのDNAの伝達はこれらの条件に支配されると考えられ、食物繊維などの消化されない物質がDNAの安定化に寄与する吸着体として機能する可能性、腸内の酵素がDNAを分解する可能性などについても将来検討する必要があると思われる。

遺伝子組換え植物由来のカナマイシン耐性遺伝子DNAによる細菌の自然形質転換が起こりうることはすでに報告されている[8]が、実験条件が非常に最適化されているにもかかわらず受容菌あたりの形質転換頻度は 10^{-9} から 10^{-10} と極めて低い。この報告では、受容菌となる*Acinetobacter calcoaceticus*（現在*Acinetobacter* sp.と名称を変更されている）BD413株に、317bpの欠失

のため不活性になったカナマイシン耐性遺伝子を持つプラスミドを保持させ、最適条件下（ 10^{-3} /受容菌の頻度で自然形質転換が起こりうる）で組換え植物DNAと共存させたところ、菌側の不完全なカナマイシン耐性遺伝子と組換え植物DNA側の完全なカナマイシン耐性遺伝子の間の相同的組換えにより菌側のカナマイシン耐性遺伝子が完全な形に回復し、活性を発現したと考えられている。このことは、相同的組換えの相手となる菌側の配列の存在が極めて重要であることを示唆しており、この受容菌のように適当なプラスミドを保持していない菌の場合には、組換え植物由来のDNAによる自然形質転換が、低頻度であっても起こりうるかどうか、検討が必要である。今年度購入した菌株の中に、プラスミドを持たないこのBD413株が含まれているので、次年度以降の研究にこの菌株が役立つことが期待される。

D. 参考文献等

- 1 Beachy, R. N. (1999) *Science* 285, 335.
- 2 Gaskell, G., Bauer, M. W., Durant, J., and Allum, N. C. (1999) *Science* 285, 384-387.
- 3 Dröge, M., Pühler, A., and Selbitschka, W. (1998) *J. Biotechnol.* 64, 75-90.
- 4 Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1994) *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
- 5 Nielsen, K. M., Bones, A. M., Smalla, K., and van Elsas, J. D. (1998) *FEMS Microbiol. Rev.* 22, 79-103.
- 6 Nielsen, K. M. (1998) *APMIS Suppl.* 84 (vol. 106), 77-84.
- 7 Sikorski, J., Graupner, S., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1998) *Microbiology* 144, 569-576.
- 8 Gebhard, F., and Smalla, K. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1550-1554.

平成11年度

バイオテクノロジー応用食品等の安全性評価に関する研究報告書

分担研究

バイオテクノロジーに用いられる微生物およびその成分と安全性に関する
文献調査研究

分担研究者
東亜大学大学院
義平邦利

目 次

1	研究要旨	111
2	研究目的	111
3	研究方法	111
	表 1. 調査研究項目	111
2.	調査研究対象の微生物	113
	表 2. 調査研究対象の微生物	113
3.	微生物部門におけるバイオテクノロジーの応用に関する文献数の調査	116
1)	予備的調査	116
	表 3. キーワード	117
2)	検索対象ソフトの選択	117
3)	DIALOG による検索に使用するファイル (原著) の選択	117
	表 4. 検索用ファイル	117
4)	調査内容	118
5)	文献数の重複	118
4.	食品分野に関連のある微生物の代謝産物の検索および代謝産物の有害性物質および 活性物質の確認。	119
4	研究結果	119
1)	食品関連微生物と遺伝子、組換え体、形質転換、組織培養、細胞融合、バイオリアク ター成分、生理活性成分、毒性成分、および RTECS に記された含有成分	119
2)	食品関連微生物とバイオテクノロジーに関する文献数	121
3)	バイオテクノロジーに関連する文献数 (表 5、6、図 3.)	121
	表 5. 文献検索結果	131
	表 6. 微生物分野におけるバイオテクノロジーに関する文献 D I A L O G 文献 検索結果	136
	表 7. 微生物分野におけるに遺伝子に関する文献 D I A L O G 文献検索結果	140
	表 8. 微生物分野におけるに形質転換に関する文献 D I A L O G 文献検索結果	144
	表 9. 微生物分野におけるに組換え体に関する文献 D I A L O G 文献検索結果	148
	表 10. 微生物分野におけるにベクターに関する文献 D I A L O G 文献検索結果	152
	表 11. 微生物分野におけるに組織培養に関する文献 D I A L O G 文献検索結果	156
	表 12. 微生物分野におけるに細胞融合に関する文献 D I A L O G 文献検索結果	160
	表 13. 微生物分野におけるにバイオリアクターに関する文献 D I A L O G 文献 検索結果	164
4)	代謝産物	168

表 1 4. Pi から Z 群までの微生物の代謝物と安全性	169
表 1 5. Pi から Z 群までの微生物における代謝物も毒性、生理活性、傷害・毒性、 および RTECS	174
<i>Propionibacterium shermanii</i>	174
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	175
<i>Pseudomonas cepacia</i>	180
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	183
<i>Pseudomonas fragi.</i>	190
<i>Rhizopus chinensis</i>	190
<i>Pseudomonas putida</i>	191
<i>Pullularia pullulans</i>	191
<i>Rhizopus chinensis</i>	192
<i>Rhizopus nigricans</i>	192
<i>Rhodotorula glutinis</i>	193
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	194
<i>Saccharomyces rouxii</i>	195
<i>Sarcina lutea</i>	195
<i>Schizophyllum commune</i>	196
<i>Serratia marcescens</i>	200
<i>Streptococcus faecalis</i>	200
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	201
<i>Streptococcus lactis</i>	251
<i>Streptococcus pyogenes</i>	253
<i>Taxomyces andreanae</i>	253
<i>Trichoderma reesei</i>	254
<i>Trichoderma viride</i>	254
<i>Xanthomonas campestris</i>	255
5. 食品分野に於ける農作物バイオテクノロジーの動向	257
1) 諸外国の野外試験	257
2) 我が国の野外試験	257
表 1 6. 諸外国の農作物と野外試験の行われている数	257
表 1 7. 諸外国の遺伝子組換え農作物の野外試験	258
1. イネの遺伝子組換え農作物 (導入遺伝子と野外試験開始年)	258
2. コムギの遺伝子組換え農作物 (導入遺伝子と野外試験開始年)	258
3. オオムギの遺伝子組換え農作物 (導入遺伝子と野外試験開始年)	259
4. トウモロコシの遺伝子組換え農作物 (導入遺伝子と野外試験開始年)	260
5. ダイズの遺伝子組換え農作物 (導入遺伝子と野外試験開始年)	261
6. ヒマワリの遺伝子組換え農作物 (導入遺伝子と野外試験開始年)	263

7.ナタネの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	263
8.ワタの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	265
9.ジャガイモの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	267
10.トマトの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	268
11.ブロッコリーの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	270
12.レタスの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	270
13.イチゴの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	271
14.キュウリの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	271
15.メロンの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	271
16.スイカの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	272
17.パパイアの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	272
18.リンゴの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	272
19.ブドウの遺伝子組換え農作物（導入遺伝子と野外試験開始年）	273
6. 我が国に於ける食品分野に於ける農作物バイオテクノロジーの動向	274
表18. 農作物と野外試験の行われている数	274
表19. 我が国の遺伝子組換え農作物の野外試験	275
1.我が国のイネ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	275
2.我が国のトウモロコシ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	275
3.我が国のダイズ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	276
4.我が国のワタ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	276
5.我が国のナタネ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	276
6.我が国のジャガイモ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	277
7.我が国のトマト遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	277
8.我が国のアズキ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
9.我が国のキュウリ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
10.我が国のメロン遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
11.我が国のカリフラワー遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
12.我が国のブロッコリー遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
13.我が国のイチゴ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
14.我が国のパパイア遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
15.我が国のテンサイ遺伝子組換え農作物野外試験（導入遺伝子）	278
8. 考察	280
9. 結論	280
10. 研究発表	280
11. 知的所有権の取得状況	280
12. 平成13年度計画	280

バイオテクノロジーに用いられる微生物およびその成分と安全性に関する 文献調査研究

分担研究者

東亜大学大学院応用生命科学専攻
義平邦利

研究協力者

三栄源 F F I (株) 学術部

井上健夫

1 研究要旨

食品分野におけるバイオテクノロジーに用いられる微生物の安全性を確保するために、食品に関連ある微生物を抽出し、それぞれの微生物についてバイオテクノロジーに関する研究があるかどうかを調査した。また、これらの微生物の安全性を知るために、まず代謝産物の調査を行った。それらの成分については、生理活性及び有害性があるかどうかを調査した。

2 研究目的

今後の発展が期待されている微生物を用いたバイオテクノロジーについて、動向および安全性に関連する成分調査をあらかじめ行ない、将来の衛生対策の推進に資することを目的とした。

バイオテクノロジーに用いられる微生物およびその成分と安全性に関する総合的な文献調査研究がないので、食品に関連ある微生物を抽出し、それらの微生物についてバイオテクノロジーに関する研究があるかどうかを調査した。

安全性については、微生物そのものについての安全性試験等が行われている例は殆どないので、微生物の代謝産物について調査を行い、その成分が有害性と生理活性があるかどうかを調査した。

本年度は、昨年度までのA群からPh群までの調査研究に引き続き、Pi群からZ群までの微生物に関するバイオテクノロジーとその微生物の、代謝産物について調査研究を行った。

3 研究方法

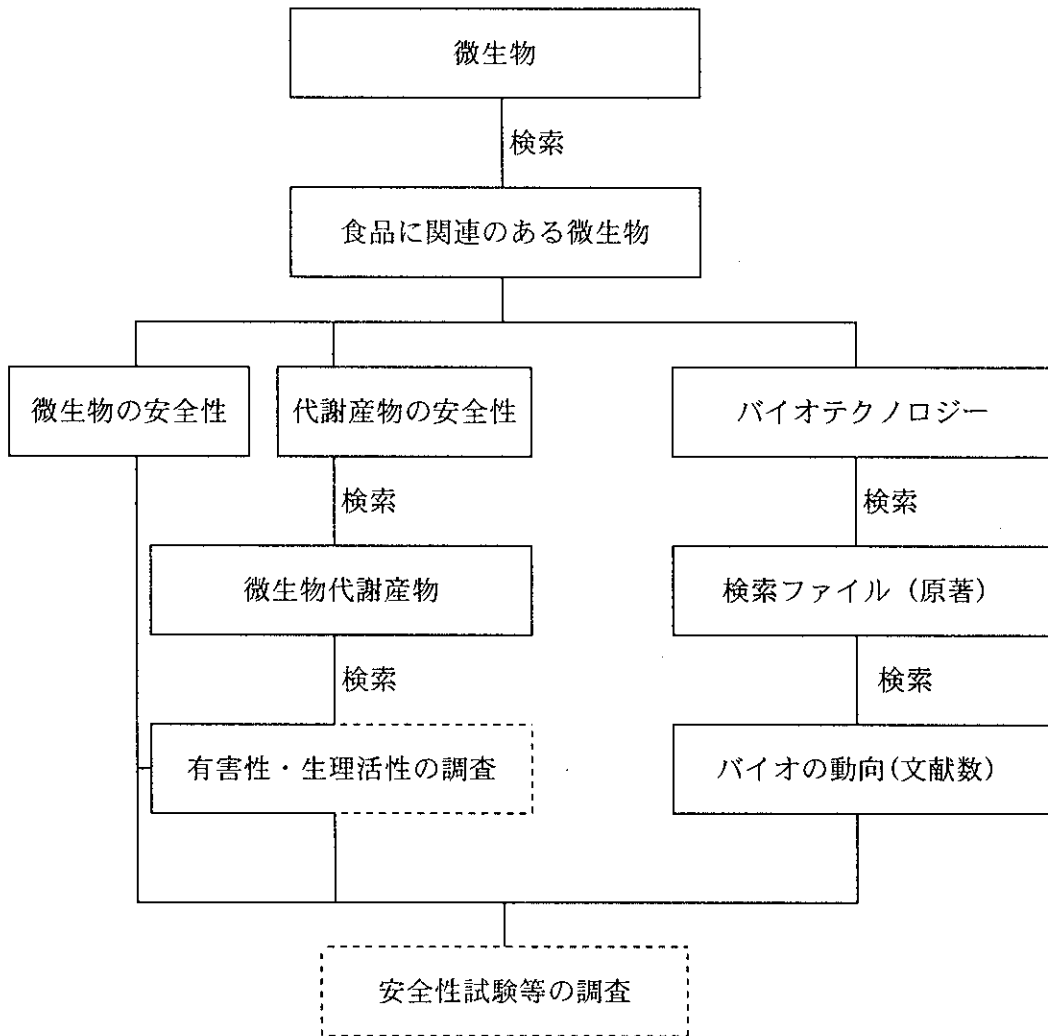
1. 微生物を対象として、次に関する項目について、調査研究をした (図1. 参照)。

表1. 調査研究項目

- 1) 食品分野に関連のある微生物として、どのようなものがあるか。
- 2) バイオテクノロジーが応用されている食品関連の微生物として、どのようなものがあるか。
- 3) 食品関連微生物は、バイオテクノロジーではどのように応用されているか。
- 4) 食品分野に関連の微生物の安全性は、確認されているか。

- 5) 微生物自身の安全性が余り確認されていないとすると、微生物の代謝産物についての安全性はどうか。
- 6) 食品分野に関連のある微生物の代謝産物は、どれぐらい研究されているのか。
- 7) 代謝産物には、有害性および生理活性を有するものがあるかどうか。
- などを調査の研究項目とした。

図 1. バイオテクノロジーに用いられる微生物およびその成分と安全性に関する文献調査研究方法



実線は、本年度行ったP i 群からZ群の調査研究
 破線は、次年度以降に行う調査研究

2.調査研究対象の微生物

調査研究対象の微生物は、Food Biotechnology (Y.H.Hui ら) に収載されている、食品に関連がある下記の P i 群から Z 群までの微生物を研究の対象とした。

表 2. 調査研究対象の微生物

P 群

Pichia pastoris
Pichia polymorpha
Pichia satoi
Pichia stipitis
Podospira anserina
Propionibacterium acnes
Propionibacterium avidum
Propionibacterium acidipropionici
Propionibacterium freudenreichii
Propionibacterium granulosum
Propionibacterium italicum
Propionibacterium jensenii
Propionibacterium lymphophilum
Propionibacterium shermanii
Propionibacterium thermasphacta
Propionibacterium thoenii
Proteus rettgeri
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas cepacia
Pseudomonas elodea
Pseudomonas fluorescens
Pseudomonas fragi
Pseudomonas pentosaceus
Pseudomonas putida
Pseudomonas putrefaciens
Pullularia fermentans
Pullularia pullulans
Pyrococcus furiosus

R 群

Rhizobium meliloti
Rhizomucor meihei
Rhizomucor pusillus
Rhizomucor tauricus
Rhizopus achlamyosporus

Rhizopus aorhizus
Rhizopus bahnensis
Rhizopus batatus
Rhizopus boreas
Rhizopus chinensis
Rhizopus chungkuoensis
Rhizopus delemar
Rhizopus delemar var. *minimus*
Rhizopus formosaensis
Rhizopus fusiformis
Rhizopus hangchao
Rhizopus homothallicus
Rhizopus japonicus
Rhizopus javanicus
Rhizopus javanicus var. *hawasakiensis*
Rhizopus kansanensis
Rhizopus liquefaciens
Rhizopus maydis
Rhizopus microsporus
Rhizopus nigricans
Rhizopus niveus
Rhizopus nodosus
Rhizopus norvegicus
Rhizopus oligosporus
Rhizopus oryzae
Rhizopus peka
Rhizopus pseudochinensis
Rhizopus rhizopediformis
Rhizopus semarangensis
Rhizopus shangheiensis
Rhizopus sontii
Rhizopus stolonifer
Rhizopus suinus
Rhizopus thermosus
Rhizopus tonkinensis
Rhizopus tritici
Rhizopus usamii
Rhodococcus fascians
Rhodotorula glutinis

S 群

Saccharobacillus pastorianus
Saccharomyces bayanus
Saccharomyces carlsbergensis
Saccharomyces cerevisiae
Saccharomyces chevalieri
Saccharomyces diasticus
Saccharomyces exiguus
Saccharomyces fibuliger
Saccharomyces italicus
Saccharomyces lactis
Saccharomyces rosei
Saccharomyces rouxii
Saccharomyces servazzi
Saccharomyces unisporus
Saccharomyces uvarum
Saccharomyces uvarum (carlsbergensis)
Saccharomycopsis fibuligera
Saccharomycopsis lipolytica
Salmonella typhimurium
Sarcina lutea
Sarcina ventriculi
Schizophyllum commune
Schizosaccharomyces pombe
Schwanniomyces occidentalis
Sclerotium rolfsii
Serratia marcescens
Staphilococcus hyicus
Staphylococcus aureus
Staphylococcus staphylolyticus
Streptococcus bovis
Streptococcus cremoris
Streptococcus faecalis
Streptococcus lactis
Streptococcus pyogenes
Streptococcus salivarius
Streptococcus sanguinis
Streptococcus thermophilus
Streptomyces hygrosopicus
Streptomyces lividans

T群

Taxomyces andreanae
Thermococcus litoralis
Tolypocladium geodes
Torulaspora delbrueckii
Torulopsis colliculosa
Torulopsis etchellsis
Torulopsis versatilis
Torulopsis holmii
Torulopsis magnoliae
Torulopsis glabrata
Torulopsis utilis
Tremella mesenterica
Trichoderma reesei
Trichoderma viride
Trichoderma margaritifera
Trichosporon cutaneum

U群

Ustilago maydis

X群

Xanthomonas campestris
Xanthomonas campestris pv. *juglandis*

Y群

Yarrowia lipolytica
Yersinia enterocolitica

Z群

Zygosaccharomyces rouxii
Zymomonas mobilis

3.微生物部門におけるバイオテクノロジーの応用に関する文献数の調査

微生物分野におけるバイオテクノロジーの応用に関する文献数の調査に当たり、まず予備的調査を行い、諸条件を決定した後、検索を行った。

1) 予備的調査

調査研究のために、キーワード、検索対象ソフトおよびファイル（原著）について選択を行った。

① キーワード

Abtsidia glaurca と *Acetobacter aceti* について、タイトルを打ち出し、検索の結果 257 件がヒットした。これらについて、タイトルを打ち出し、それぞれに記載のあるキーワードを検討した結果、次の表 3 に示すキーワードを設定することによって、経験的に、可成りの精度で検索ができる事が判明し、表 3 のキーワードの選択は正しく、不要なものはあま

り含んでいないことがわかった。

表3. キーワード

GENETIC?
RECOMBINA?
VECTOR?
TRANSFORM?
TISSUE CULTURE
CELL FUSION
BIOREACTOR

2) 検索対象ソフトの選択

DIALOG、CA、およびJOISの何れを選択するかを、先ず検討をした。

- ① DNA を例に取り、予備調査を行った。DNAに関するおよその文献数は、DIALOGは11,000,000件、CAは1,000,000件、JOISは10,000件であった。
- ②文献数から、DIALOGとCAを検索の一次候補とした。(JOISはDIALOGに含まれる)
- ③ DIALOGとCAの選択について。
 - i) DIALOGは、採用されているファイル(原著)は624と多いので、その索引と費用と手数料が掛かることから、CAのファイル(原著)が399で、比較的少なく、可能であればCAを採用することとし、検索対象微生物リストの*Abtsidia glaurca*と*Acetobacter acetii*について検索を行ったところ、DIALOGでの検索数は、257件、CAでの検索は、44件であった。
 - ii) 以上結果から、CAでは不十分であることが分かり、DIALOGで検索を行うことにした。

3) DIALOGによる検索に使用するファイル(原著)の選択

DIALOGには、624のファイルがあることから、バイオテクノロジーと食品に関係すると思われるファイルを選択するために予備的調査を行い、検討を重ねた結果、次に示すファイルで十分に、本目的に即することが判明したので、表4にしめしたファイルを用いた。

表4. 検索用ファイル

AGRICOLA 70-1998
AGRIS 1974-1998
BIOSIS PREVIEWS (R) 1969-1998
Bio Business (R) 1985-1998
Biocommerce Abs. & Dir. 1981-1998
Biol. & Agric. Index 1983-1998
CA SEARCH (R) 1967-1998
CAB Abstracts 1972-1998

CHEMTOX (R) Online 1998
 CLAIMS (R)/US Patent 1950-98
 CRIS/USDA 1998
 Chem Eng & Biotec Abs 1970-1998
 Chemical Safety NewsBase 1981-1998
 Current BioTech Abs 1983-1998
 Derwent Biotechnology Abs 1982-1998
 EMBASE 1974-1998
 EUROPEAN PATENTS 1978-1998
 Food Science & Technology 1972-1998
 Food sci.&Tech. Abs 1969-1998
 Foods Adlibra (TM) 1974-1998
 Inside Conferences 1993-1998
 JICST-EPlus 1985-1998
 Life Sciences Collection 1982-1998
 MEDLINE (R) 1966-1998
 McGraw-Hill Publications 1985-1998
 Occ. Saf. & Hth. 1973-1998
 PHARMACEUTICAL NEWS INDEX 1974-1998
 Pascal 1973-1998
 Pesticide Fact File 1997
 RTECS 1998
 Sci Search (R) Cited Ref Sci 1988-1998
 Scisearch (R) Cited Ref Sci 1974-1998
 Toxline (R) 1965-1998
 Wilson Appl. Sci & Tech Abs 1993-1998
 World Patent Endex
 World Transl. Index 1979-1997

4) 調査内容

調査研究にあたり、予算との関係で、検索数を予想したところ、検索対象微生物リストの *Abtsidia glaurca* から *Agrobacterium tumefaciens* までの 10 種の微生物の検索を行ったところ約 3 万件であった。このことから、単純計算を行うと、調査対象の 600 種の微生物では 1,800,000 件になり、タイトルのみでも打出しには 1 検体約 24 円（電話料別）掛かるため、43,200,000 円となり費用も莫大になると考えられるので、文献数のみの調査にとどめた。

5) 文献数の重複

同一文献がある場合には、同一除去機能が働き、重複文献は除去された。但し文献数が 5,000 件を越えると、重複除去機能(同一文献除去機能)が使用出来ず、除去されないため、数値が不正確となる場合もある。