

200000433A

厚生科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保
及び高機能食品の開発に関する研究

平成12年度 総括・分担研究報告書

(H12-食品-001 第1分冊)

主任研究者 吉倉 廣

平成13年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究	
吉倉 廣	----- 1
II. 分担研究報告書	
1. 遺伝子組換え食品の安全性について	----- 5
吉倉 廣	
2. 安全性評価に関する研究（1）～（4）	----- 29
鎌田 博	
3. DNA 組換え体の検知に関する研究	----- 49
豊田 正武	
4. 慢性毒性試験に関する研究	----- 65
白井 智之	
5. クローン技術を利用した動物性食品の安全性について	----- 71
熊谷 進	
6. リスクコミュニケーションのあり方に関する研究	----- 75
加藤 順子	
7. 高機能食品の開発に関する研究	----- 145
江崎 治	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 149

厚生科学研究費(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

総括研究報告書

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保及び高機能食品の開発に関する研究

主任研究者 吉倉 廣 国立国際医療センター研究所長

研究要旨

組換え食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保について、世界的な基準作りが要求されている。本研究では、遺伝子導入植物の遺伝的安定性からみた安全性評価、組換え食品の検出法、慢性毒性試験のあり方、遺伝子組換え高機能食品、クローン技術を利用した動物肉の安全性、リスク・コミュニケーションに関する研究を行った。

分担研究者

鎌田 博 筑波大学 教授

豊田正武 国立医薬品食品衛生研究所 部長

白井智之 名古屋市立大学 教授

熊谷 進 東京大学 教授

加藤順子 三菱安全科学総合研究所 部長

江崎 治 国立健康栄養研究所 部長

A. 研究目的

バイオテクノロジーを応用した食品の安全性確保のための科学的知見の集積、安全性評価法の開発改良、試験法の確立、機能性食品や低アレルギー性食品の開発、当該食品の国民受容に関する調査を目的とする。

B. 研究方法

遺伝子導入植物の遺伝的安定性からみた安全性評価の研究を鎌田班員、組換え食品の検出法を豊田班員、慢性毒性を白井班員、機能食品開発を江崎治班員が担当した。クローン牛などクローン技術を利用した動物性食品の安全性については熊谷班員、リスク・コミュニケーションに関しては加藤班員が担当し、主任研究者が総括を行った。

C. 結果と考察

遺伝子導入植物の遺伝的安定性:厚生労働省が食品としての安全性を認可した遺伝子組換え農作物について、既存の非遺伝子組換え品種や他の遺伝子組換え品種等との交配によって作出されているいわゆる後代交配種における導入遺伝子の安定性(導入遺伝子の位置や配列の変化および導入遺伝子の発現変動等)を検討した。特に、我が国で大量に消費されているダイズおよびトウモロコシについて、各地の検疫所で採取した穀粒を用い、穀粒そのものあるいはそれから発芽させた植物体から DNA や蛋白質を調整し、導入遺伝子の塩基配列をもとにした PCR による目的バンドの増幅の有無、増幅されたバンドの塩基配列決定、導入遺伝子産物(蛋白質)の抗体を用いた発現量の変化等を詳細に検討した。現段階では、後代交配種においても大きな変化は見られていない。一方、遺伝子組換え植物とその後代交配種における導入遺伝子の発現(mRNA としておよび蛋白質として)の変動を全体(overall)として探る方法を開発するため、電気泳動法を用いる大規模な蛋白質の検出方法の開発およびマイクロアレーを用いる方法の検討を行っている。マイクロアレーについては、現在使用可能な(市販されている)シロイヌナズナのマイクロアレーを用い、ヘテロな系であるニンジンにおける遺伝子の発現変動を調べたところ、大きな変動があ

る場合には一定の数値として検出できることが明らかとなった。

DNA 組換え体の検知に関する研究: 1) 組換え食品及びその加工品について検知法の開発を行った。承認済み組換えダイズ及びトウモロコシの定性 PCR 分析法を踏まえ、TaqMan Chemistry を利用した定量 PCR 分析法を検討し、Roundup-Ready ダイズ (RRS) 並びに 5 系統の組換えトウモロコシについて、CaM 遺伝子を用いたスクリーニング法並びに品種特異的な定量分析法を確立した。輸入試料の実態調査から、IP ハンドリングされたトウモロコシの組換え体混入率は 5% 以下であった。RRS で ELISA 法と定量 PCR 法に相関が見られた。また、トウモロコシ穀粒における組換え体の定量は F1 hybrid 種子を基準にする必要性があった。さらに加工による DNA の減衰及び未承認組換え作物 3 種の定性検知法を検討している。2) 遺伝子組換え食品のアレルゲン性試験については、新規導入蛋白質及び組換えトウモロコシ抽出物での *in vitro* 分解性を検討している。

バイオテクノロジー応用食品の慢性毒性試験のあり方に関する検討: 遺伝子組み換え農作物についてのヒトに対する安全性を確認するために、実験動物を用いた化学物質の安全性試験を応用し、遺伝子組み換えトウモロコシのラットの 90 日間反復毒性試験を行う。実験動物用の基礎飼料で原材料のすべてが公表され、入手の可能な「改良 NIH 飼料」には 24.5% のトウモロコシが含まれているが、このトウモロコシの成分を今回の実験用の成分と置き換える。すなわち、組み換えトウモロコシを 24.5, 8.2, 2.8, 0%、非組み換えトウモロコシ(組み換え成分が含まれていないことが保証されたもの)をそれぞれ 0, 16.3, 21.7, 24.5% 含有するようにし、その成分としてはいづれも 24.5% 含まれるようにした飼料を作製し、F344 ラットに 90 日間経口投与し、その毒性を評価する。一方、前年度までに調査したバイオテクノロジーに関連ある微生物の含有成分のうち 110 種の微生物の 700 化合物について、RTECS (化学物質毒性データ総

覧)を用いて安全性に関するデータの有無とその内容に関する調査を行った。このうち 143 化合物については RTECS から毒性データを得、調査研究をした。また、今後の遺伝子組換え食品の動向を知るために最近(過去 5 年間)の食品に関連ある遺伝子組換えについて JOIS を用いて検索した。食品に関連あるものとして 344 文献、農作物として 340 件の文献を得、調査研究をした。

高機能食品の開発に関する研究: ヒトは、n-3 系列脂肪酸の α -リノレン酸と n-6 系列脂肪酸のリノール酸を *de novo* 合成できず、それぞれ食事から摂取する必要がある。また、これらの脂肪酸を相互に代謝変換することもできない。よって、生活習慣病予防に効果が期待される n-3 系列脂肪酸であるエイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸は直接摂取するか、前駆体である α -リノレン酸から生合成する必要がある。そこで本研究では、イネの中に α -リノレン酸を効率よく発現させ、疾病予防や健康の維持増進に役立つ食品の開発を最終目標とし研究を開始した。具体的には以下の通りである。リノール酸から α -リノレン酸への変換酵素であるイネ ω -3 fatty acid desaturase (OsFAD3) cDNA を取得した。ORF を全て含む領域を GAL1 プロモーターをもつ酵母発現ベクターに挿入した。これを酵母に導入し、培地中の炭素源をグルコースからガラクトースに変えることで、酵母内に OsFAD3 を強制発現させた。現在、酵母内の脂肪酸組成の変化をガスクロマトグラフィーによって確認している。

クローン技術を利用した動物性食品の安全性について: 体細胞クローン牛については、食品としての安全性を懸念する科学的根拠はないが、新しい技術であるため消費者に対する信頼性確保の上から、安全性の裏付けとなるデータを集積することが望まれる。そこで、(1) 農林水産省と地方自治体等で育成中の体細胞クローン牛について、それら各機関により得られつつある生育、繁殖、肉質、乳質に関するデータを収集することに加え、(2) 肥育牛についてはと殺時の血液・筋肉中の成分(それぞれステロイド・残留塩素系農薬)、搾乳牛と肉用繁

殖牛については血液成分(ステロイド)について分析を行う。(1)については今年度末までに収集したデータより安全性について検討を加える予定であるが、(2)については今年度中に入手できる試料が少ないため分析は主に翌年度に行う。

リスク・コミュニケーションのあり方に関する研究:本年度は遺伝子組換え食品に関する厚生労働省からの情報提供の内容,あり方についてアンケート調査等をもとに検討を行っている。1月末に,一般市民からの相談を受けると考えられる全国の消費生活センター(400カ所)および保健所(635カ所)象に対し,市民からの相談件数,内容等およびこれらの機関や一般市民に対する厚生労働省からの情報提供のあり方について尋ねるアンケートを送付し,2月26日現在,745通(回答率72%)の回答を得ている。また,東京近郊の消費生活センター2カ所(川崎市,東京都多摩),保健所3カ所(中野区,町田市,八王子市),関西の消費生活センター2カ所(大阪市,京都府)を訪問調査した。現時点の結果では,一般市民のこの問題に対する関心は高いと感じている担当者が多く,厚生労働省からのより積極的な情報提供を望む声が多い。今後,新潟県,福島県,さらに東京近郊数カ所で訪問調査を行い,訪問調査およびアンケートの集計結果をもとに,厚生労働省からの情報提供の内容,量,あり方について,具体的な提言をまとめる予定である。

D. 結論

バイオテクノロジー応用食品については,安全性に関する研究を中心に,開発研究の透明性の確保,リスク・コミュニケーションのあり方の検討を持続する必要がある。

厚生科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

分担研究報告書

遺伝子組換え食品の安全性について

主任研究者 吉倉 廣 国立国際医療センター研究所長

研究要旨

現在、組換え食品の安全性に関する国際基準が決められる状況にある。我が国としての科学に基づいた基本原則を決めることが重要である。本分担研究では、宿主遺伝子に相同配列の無い外来遺伝子の組換え効率、少数の組換え微生物が集団に入った場合、その微生物の集団内での生残につき検討した。

A. 研究目的

組換え食品の安全性に関して、食品の元となる生物の環境影響が大きな問題である。特に食品中の抗生物質耐性遺伝子の腸管内細菌への伝達、更に、仮にそのような伝達が起こった場合、非選択条件でそのような細菌が腸管で生残出来るのか、が疑問となる。これらの疑問に答える事を、本年度研究のテーマとした。

B. 研究方法

カナマイシン構造遺伝子による *B. subtilis* の形質変換 (transformation) は国立感染症研究所細菌血液部荒川が、非選択条件下での組換え微生物の生残については、国立国際医療センター医療生態研究部山本が協力研究者として解析した。

C. 結果及び考察

導入後複製可能なプラスミドとして *B. subtilis* を形質変換した場合 $1 \mu\text{g}$ 当たり 20 程度のカナマイシン耐性菌が得られる条件で、構造遺伝子+プロモーターに両端 100 塩基を付けた DNA では、試みた実験条件では耐性菌は全く得られなかった。

コンピューターによるシミュレーションでは、ランダムに菌が死滅し常に集団サイズが一定であると云う条件で(腸管内の菌は無限には増えられない)、組換え微生物1個体を 10、100、1000 と次第に大きい集

団に加えた場合、組み替え生物の残存がどうなるかを調べた。集団サイズに関わらず加えた微生物は消滅するが、其れまでの時間は集団が大きくなればなるほど長くかかることが分かった。

D. 結論

薬剤耐性遺伝子の細菌への伝達は、純化 DNA を多量に使用する条件下でも、検出限界以下であることが分かった。又、集団サイズが一定に保たれる場合、大量の集団に導入した場合の方が組換え体はより長く残り得ることが simulate された。

E. 健康危機管理情報

特になし。

F. 参考文献

Yanaka, Y., Hanaki, K-I., Yoshikura, H., Yamamoto, K. Computer Simulation of Survival of Mutants under Non-Selective Condition. JJID 53, 217-218 (2000)

遺伝子組み換えマーカーとして用いられるカナマイシン耐性遺伝子による
環境細菌等の自然形質転換効率に関する検討

研究協力者 荒川 宜親 (国立感染症研 細菌・血液製剤部)

岩城 正昭 (同上)

研究要旨

カナマイシン耐性遺伝子(neomycin phosphotransferase II: *npII*)は、遺伝子組換え体をその他の個体から識別して実験室内で選択するために、遺伝子組換え植物開発の初期から利用されてきた。現在では *npII* のような抗生物質耐性マーカーが選択マーカーとして利用されることは少なくなってきたが、*npII* を用いた組換え作物は依然として市場に供給され続けている。そのような組換え作物から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た *npII* 遺伝子が、微生物を自然形質転換して薬剤耐性が環境中に拡散する可能性が指摘されている。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頻度や効率を予見するため、実験室的条件下で、自然形質転換されやすい代表的ないくつかの菌種が、カナマイシン耐性遺伝子により形質転換し、薬剤耐性が発現しうるかどうかを検討している。本年度は、自然形質転換能を持つ細菌に *npII* 遺伝子 DNA を加え、カナマイシン耐性の形質転換体が出現する頻度や効率を調べた。その結果、直鎖状の DNA 断片を用いる限り、プロモーターの有無にかかわらず、採用した実験条件下では、形質転換体の出現は確認されなかった。

A. 研究目的

ネオマイシン(カナマイシン)耐性遺伝子 *npII* は、遺伝子組換え植物体を作成する際に、形質転換体を効率良く選択するマーカーとして広く利用されてきた。最近では商品化される組換え作物の多くは *npII* の代わりに除草剤耐性遺伝子などのマーカーを用い[1]、抗生物質を使わないで作出されるようになってきているが、初期に開発された *npII* を含む組換え作物は、現在でも一部が市場に出回っている。耐性遺伝子やその他の組換え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耐性遺伝子が拡散する可能性など、組換え植物の利用にともなう問題点も依然として指摘されている[2, 3]。

これらの懸念は次の2つの可能性に分けられ

る。

1. 組換え植物を用いた食品や飼料に含まれる薬剤耐性遺伝子が、ヒトや家畜の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

以前に比べればまれではあるが、ヒトに対して臨床的にカナマイシンが使われることがある。また、家畜に対しても治療薬や飼料添加物としてカナマイシンは使われているため、耐性菌出現によるヒトや家畜への危険を無視することはできない。

2. 組換え植物体が圃場などの土壌中で分解され、DNA が露出して土壌細菌を自然形質転換する可能性

自然環境中には、様々なアミノグリコシド耐性菌がすでに存在しているため、仮に組換え植物 DNA によって新たに耐性菌が出現しても、

それが環境全体に対して深刻な影響を与えるとは考えにくい、実験的データをもとに影響の大きさを予見する必要がある。これらの点を検討するため、本研究では遺伝子組換え作物中または遺伝子組換え植物由来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、実際に細菌にカナマイシン耐性を与えるのか検討する。

本年度は、来年度(最終年度)に行なわれる予定の組換え植物体を実際に用いた実験に備えて検討を行った。具体的には、昨年度収集した菌株の一部を用いてプラスミド DNA による自然形質転換の条件検討を行ない、自然形質転換が起こりうることを確認された条件のもとで、PCR法で調製した *nptII* 遺伝子を用いて、カナマイシン感受性から耐性への自然形質転換が起こるかどうかを調べた。

B. 研究方法

菌株:昨年度 ATCCより購入した菌株のうち、カナマイシンの最終生育阻止濃度が低く、形質転換実験に適していると考えられた(昨年度報告書参照) *Bacillus subtilis* と *Acinetobacter* sp. を用いた。

プラスミド DNA の調製:グラム陽性菌にカナマイシン耐性を与える広宿主域プラスミド pUB110は、このプラスミドを含む *B. subtilis* 菌体から lysozyme-SDS 法[4]で調製した。プラスミド DNA が単量体の場合、*B. subtilis* に対する自然形質転換頻度が著しく低下することが知られているので[5]、プラスミド DNA 試料を制限酵素 *EcoRI* で切断したのち DNA リガーゼで連結して、プラスミド DNA が繰り返しつながったコンカテマーを作成した。グラム陰性菌にカナマイシン耐性を与える広宿主域プラスミド RP4 は、このプラスミドを含む大腸菌菌体から Qiagen Midi プラスミド調製キットで調製した。

プラスミド DNA 量は、260nm の吸光度を測定することによって求め、染色体 DNA の混入が

多い場合には、全 DNA 量に対するプラスミド DNA 量の割合をアガロースゲル電気泳動のパターンから見積もってプラスミド DNA 量を計算した。

nptII 遺伝子断片の調製: *nptII* 遺伝子断片は、*nptII* 遺伝子を含むプラスミド pBR322::Tn5 またはその欠失変異プラスミド pBR322::Tn5/2 から、

(1)*nptII* 構造遺伝子のみ

(2)*nptII* 構造遺伝子+プロモーター領域

(3)*nptII* 構造遺伝子+プロモーター領域およびその上下流それぞれ 100bp を含む DNA 断片としてそれぞれ PCR により調製した。また、これらの DNA 断片を増幅する際に、上流側に制限酵素 *EcoRI* 切断部位、下流側に制限酵素 *XhoI* の切断部位が生成するようにプライマーを設計しておき、増幅された DNA 断片をこれらの制限酵素で切断した後 DNA リガーゼで連結することにより、コンカテマーを作成した。DNA 量は、プライマー除去後 260nm の吸光度を測定することによって求めた。

Bacillus subtilis の形質転換:*Bacillus subtilis* の形質転換は Dubnau らの方法[6]に従った。一夜、LB (Luria-Bertani)寒天培地上で培養した *B. subtilis* ATCC 39087 (168 株由来)を、無機塩類、クエン酸、グルコース、カザミノ酸で構成される SP I 培地[7]で振とう培養し、定常期初期になったところで遠心集菌して、SP I 培地に塩化カルシウムと塩化マグネシウムを加えた SP II 培地に再懸濁し、さらに 30 分間振とう培養した。このとき菌は菌体外の DNA を取り込むいわゆる“competent”な状態になっているので、この状態の菌懸濁液 200 μ l に相当量の DNA を加えさらに 2 時間ゆっくり振とうしながら DNA を菌体に取り込ませ、その後カナマイシンを含む LB 寒天平板上に塗布して一晚培養し、出現した形質転換体のコロニー数を計測した。

Acinetobacter sp. の形質転換:*Acinetobacter* sp. の形質転換は Nielsen らの方法[8]および

Gebhard らの方法[9]にしたがって試みた。*Acinetobacter* sp. ATCC 33304 および ATCC 33305(いずれも BD413 株)を LB 液体培地中で一晚 28℃で培養することによって“competent”な状態にし、この菌懸濁液を DNA と混合してから寒天培地上に置いたメンブレンフィルターに滴下して、DNAを菌体に取り込ませるために 37℃で 24 時間静置した。静置後、生理食塩水に再懸濁してカナマイシンを含む LB 寒天培地上に塗布し、形質転換体の選択を試みた。

C. 結果および考察

Bacillus subtilis の形質転換:PCR 法で調製した *npdII* 遺伝子 DNA および対照として用いた pUB110 プラスミドによる *B. subtilis* ATCC 39087 の形質転換実験の結果を表1、表2に示した。pUB110 コンカテマーでは $1.9 \times 10 / \mu\text{g}$ DNA の頻度でカナマイシン耐性の形質転換体を得られたのに対し、*npdII* 遺伝子 DNA では構造遺伝子のみ、構造遺伝子+プロモーター領域、構造遺伝子+プロモーター領域にその上下流 100bp を加えたもの、のいずれの DNA 断片を用いても形質転換体は得られなかった。また、これらの *npdII* 遺伝子断片を繰り返し連結したコンカテマーを用いて形質転換頻度の上昇をめざしたが、それでもやはり形質転換体を得ることはできなかった。この条件下では、線状 *npdII* 遺伝子 DNA による自然形質転換は $4.7 \times 10 / \mu\text{g}$ DNA の頻度以上では起こらないといえるが、対照となる pUB110 プラスミドによる形質転換の頻度が一般に報告されている最大の頻度 (μg DNA あたり 10 の 4 乗から 10 の 5 乗程度) よりも 3-4 オーダー低く、実験系が最適化されているとは言い難い。来年度は、ゲノムあたりの *npdII* 遺伝子のコピー数の少ない植物由来 DNA を実験に用いることになるので、十分に効率の高い形質転換系の確立をめざして今後の検討が必要である。

今回の実験に用いた pUB110 プラスミド DNA

は精製度が低く、十分な形質転換頻度が得られなかった原因として、染色体 DNA 以外の、形質転換を阻害する成分が混入していた可能性が考えられる。次年度以降は精製度の高いプラスミド DNA を対照実験に用いることが必要である。

pUB110 プラスミドは、カナマイシン耐性を与えるが、コードされているカナマイシン耐性遺伝子は *npdII* とは異なり kanamycin nucleotidyltransferase をコードしている。本研究ではカナマイシン耐性という表現形質を追跡するので問題はないが、DNA 分子の挙動を問題にするような研究課題に対しては、pUB110 のカナマイシン耐性遺伝子を *npdII* と入れ換えた新規プラスミドの作成が必要になると思われる。

Acinetobacter sp. の形質転換:広宿主域プラスミド RP4 を用いた対照実験で、形質転換体を得ることができなかった。*Acinetobacter* sp. は、前年度の研究報告書にも述べたように、遺伝子組換え作物由来 DNA による形質転換が報告された現在のところただ 1 種類の菌であり、形質転換系を確立することが本研究に与える意義は極めて大きい。今後、形質転換の高感度な検出法による検証、例えば、*recA* 変異株、restriction-modification 系の変異株、integrase や recombinase、transposase などの DNA の組み換えに関与する酵素遺伝子の高発現株などを用いた検討を加える予定である。

D. 結論

本年度は、本研究の 2 年目として、組換え植物由来試料を入手するに先立ってモデル実験系を整備するために、昨年度収集した *Bacillus subtilis* と *Acinetobacter* sp. の 2 菌株について、昨年度検討したカナマイシン最小生育阻止濃度をもとに、プラスミド DNA および PCR 法で調製した *npdII* 遺伝子 DNA による自然形質転換を試みた。*B. subtilis* については、頻度は低いものの、プラスミド DNA による自然形質転換体

を得ることができ、同一条件下で *nptII* 遺伝子 DNA による自然形質転換は認められなかった。来年度の、組換え植物由来 DNA を用いた実験に向けて、高頻度の自然形質転換系の確立をめざして実験系の改良を行なう予定である。

E. 健康危機情報

特記すべき事なし

F. 参考文献

- 1 <http://www.nbiap.vt.edu/indexmain.cfm>
- 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 Tanaka, T., Kuroda, M., and Sakaguchi, K. (1977) *J. Bacteriol.* 129, 1487-1494.
- 5 新家龍、今中忠行 (1991) 微生物工学入門. pp. 170-177. 朝倉書店.
- 6 Dubnau, D., and Davidoff-Abelson, R. (1971) *J. Mol. Biol.* 56, 209-221.
- 7 Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961) *J. Bacteriol.* 81, 741-746.
- 8 Nielsen, K. M., van Weerelt, M. D.M., Berg, T. N., Bones, A. M., Hagler, A. N., and van Elsas, J. D. (1997) *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1945-1952.
- 9 Gebhard, F., and Smalla, K. (1998) *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1550-1554.

表1. *Bacillus subtilis* の形質転換(1)

DNAの種類	形質転換に用いた DNA量(μ g)	得られた 形質転換体の数	形質転換頻度 (形質転換体/ μ gDNA)
実験1			
<i>nptII</i> 構造遺伝子	2.1	0	$<4.7 \times 10^{-1}$
<i>nptII</i> 構造遺伝子 +プロモーター領域	3.1	0	$<3.2 \times 10^{-1}$
<i>nptII</i> 構造遺伝子 +プロモーター領域 +上下流領域各 100bp	4.1	0	$<2.4 \times 10^{-1}$
pUB110 (未切断)	4.2	5	1.2×10^0
なし(対照)	0.0	0	

表2. *Bacillus subtilis* の形質転換(2)

DNAの種類	形質転換に用いた DNA量(μ g)	得られた 形質転換体の数	形質転換頻度 (形質転換体/ μ gDNA)
<i>nptII</i> 構造遺伝子のコンカテマー	2.5	0	$<4.0 \times 10^{-1}$
<i>nptII</i> 構造遺伝子+プロモーター 領域のコンカテマー	5.3	0	$<1.8 \times 10^{-1}$
<i>nptII</i> 構造遺伝子+プロモーター 領域+上下流領域各 100bp の コンカテマー	4.8	0	$<2.1 \times 10^{-1}$
pUB110 コンカテマー	8.4	157	1.9×10^1
なし(対照)	0.0	0	

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

研究協力者
東亜大学大学院
義平邦利

研究要旨

前年度までに調査したバイオテクノロジーに関連ある微生物の含有成分のうち110種の微生物の700化合物について、RTECS（化学物質毒性データ総覧）を用いて安全性に関するデータの有無とその内容に関する調査を行った。このうち143化合物についてはRTECSから毒性データを得、調査研究をした。また、今後の遺伝子組換え食品の動向を知るために食品に関連ある遺伝子組換えについてJICSTを用いて検索した。食品に関連あるものとして344文献、農作物として340件の文献を得、調査研究をした。

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、微生物が産生する成分の安全性および動向に関連する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。

研究方法

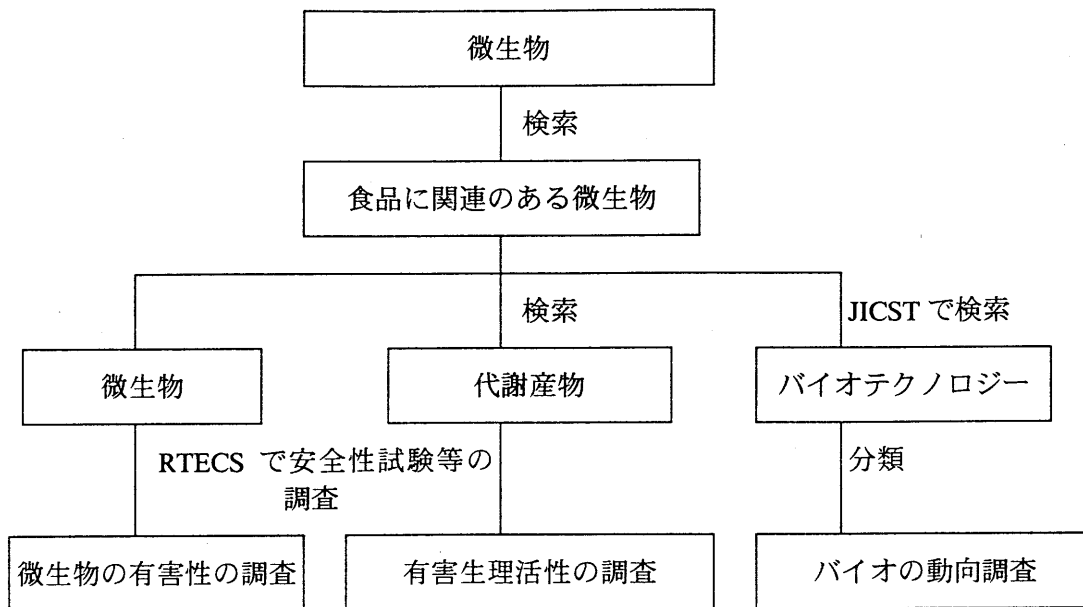
食品分野で、今後期待されるバイオテクノロジーに用いられる微生物の安全性を確保するために、バイオテクノロジーと食品に関連ある微生物を抽出し、それらの微生物の安全性を知るために、代謝産物の調査を行った。安全性については、微生物そのものについての安全性試験等が行われている例は殆どないので、微生物の代謝産物について調査を行い、その成分が有害性と生理活性があるかどうかを調査した。また、食品分野に於ける最近の遺伝子組換え技術の動向を知るために文献調査を行った。

研究のフローチャートは、図1に示した。

研究方法は、次の2課題に分類しそれぞれについて調査を行った。

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
2. 食品分野に於ける最近の遺伝子組換え技術の動向を知るために文献調査

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



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

1. 1 研究方法

微生物およびその成分について RTECS (2000 年) をもちいて安全性試験に関する調査を行った

1) 調査については、RTECS 番号、化学名、CAS 番号、その他の CAS No.、BEILSTEIN REFERENCE NO.、RTECS のデータが改正されたした年月日、分子式、分子量、生体影響、シノニムと商品名等について調査した。

2) 安全性に関わる健康障害に関するデータは

①毒性に関するデータ

試験方法

曝露経路

被験動物

投与量・期間

毒性影響

②催腫瘍性に関するデータ

試験方法

曝露経路

被験動物

投与量・期間

毒性影響

③生殖に関するデータ

試験方法

被験動物

投与量

雌雄投与期間

毒性影響

④皮膚/眼の刺激に関するデータ

試験方法

曝露経路

被験動物種

投与量・期間

反応の症度 : 重度

⑤変異原性に関するデータ

試験方法

試験系

投与量・期間

⑥毒性に関するレビュー

等について調査した。

1. 2 研究結果と考察

1. 2. 1 研究結果

- 1) 今回調査した微生物は、110種に及んだ。
 - 2) 今回調査した微生物については、含有成分に関する報告はない微生物は75種であった。
 - 3) 今回調査した微生物の含有成分は、700品目であった。
 - 4) 含有成分で有害生理活性等に関する報告がある成分は、225品目であった。
 - 5) 含有成分で有害生理活性等に関する報告がない成分は、445品目であった。
 - 6) 有害生理活性等を有する成分のうち生殖影響物質は、14品目であった(ただし、他の有害生理活成分と重複することもある)。
 - 7) 有害生理活性等を有する成分のうち変異原物質は、19品目であった(ただし、他の有害生理活成分と重複することもある)。
 - 8) 有害生理活性等を有する成分のうち催腫瘍物質は、8品目であった(ただし、他の有害生理活成分と重複することもある)。
 - 9) 有害生理活性等を有する成分のうちヒト有害物質は、44品目であった(ただし、他の有害生理活成分と重複することもある。: 44)
 - 10) 有害生理活性等を有する成分のうち一時刺激物質は、3品目であった(ただし、他の有害生理活成分と重複することもある)。
 - 11) 有害生理活性等を有する成分のうち医薬品は、105品目であった(ただし、他の有害生理活成分と重複することもある)。
- これらの詳細なデータは、資料1. に記載をした。

1. 2. 2. 考察

微生物それ自体の安全性に関する研究が少ない。また、微生物の産生する成分について安全性を確認する作業を進めたが、110種の微生物の中で、成分研究が行われていたのは、45種で、40.9%で半数以下で安全であるか否かを確認する手段がない。

成分については、有害生理活性等を有する割合が、植物成分に比べると32.1%と極めて高い。微生物が培養条件で成分が変動しやすさ等から安全性に関する十分な資料の要求が求められる。

2. 食品分野に於ける最近の遺伝子組換え技術の動向

2. 1 研究目的

食品分野に於ける最近の遺伝子組換え技術の動向を知るために文献調査を行った。

2. 1 研究方法

1. 過去5年間の食品に関連ある遺伝子組換え技術について JICST を用いて、次の方法で調査研究を行った（資料1）。

1) JICST を用いた文献検索

2) 得られた文献のキーワードを調査し、繰り返し使用されているワードの数から動向の調査をした

3) 文献要旨の調査

2. JICST を用いた文献検索

検索方法は、次の検索項目で入力した

1) 遺伝子組換えに関連する文献

2) 食品に関連する文献

3) 農産物に関連する文献

4) 農作物に関連する文献

5) トマト+ワタ+ダ`イ` +トウモロコシ+タネ+コムギ` +ジ`ヤカ` イモ+イネ+イチゴ` +オムギ` +ヒマワリ+ブ` ロココリ+メラス+キウリ` +メロン+スイカ+パ`パ` イヤ+マンゴ` +ブ` トウ` に関連する文献（昨年までの調査で得られた遺伝子組換え関連農作物等）

上記で得られた検索項目結果について次式で処理した（1 x 2 と 3+4+5 の数値は上記の項目番号）。

1 x 2 =

(3 + 4 + 5) X 2 =

3. キーワードの調査

1) JICST を用いて得られた 684 件の文献のキーワードを抽出した。

2) 抽出したワードの同じものを整理し、使用されているワードに分類した。

3) 抽出したワードのうち、遺伝子組換えと関係が比較的少なく、使用頻度が4回以下のワードは、調査対象から除外した。

4) 抽出したワードのうち、使用頻度が4回以上のものでも遺伝子組換えと関係のないワードは、調査対象から除外した。

5) ワードについて、次の項目に分類し調査研究した。

① 遺伝子組換えに関するキーワード

② 組換えの目的に関するキーワード

③ 植物組織培養(含遺伝子組換え)に関するキーワード

④ 微生物(含遺伝子組換え)に関するキーワード

⑤ 植物に関するキーワード：762

⑥ 食品関連するキーワード

⑦ 農作物に関するキーワード

⑧ 酵素に関するキーワード

⑨ 化合物に関するキーワード

⑩ 分析法に関するキーワード

⑪ 規制、消費者対策等に関するキーワード

⑫ 各国に関するキーワード

4. 文献要旨の調査

3のキーワードの調査の項目に準じて分類し調査研究した。

2. 2 研究結果と考察

2. 2. 1 研究結果

1. JICST を用いた文献検索の検索数は、

- 1) 1995 年から 2000 年までの遺伝子組換えに関連する文献： 2,428 件
- 2) 1995 年から 2000 年までの食品に関連する文献： 395,362 件
- 3) 1995 年から 2000 年までの農産物に関連する文献： 4,995 件
- 4) 1995 年から 2000 年までの農作物に関連する文献： 252,933 件
- 5) 1995 年から 2000 年までのトマト+ワタダ イ + トウモロコシ+タネ+コムギ + ジ ャ ガ イ モ + イ ネ + イ チ ゴ + オ オ ム ギ + ヒ マ ワ リ + ブ ロ ッ コ リ + ナ ス + キ ウ リ + メ ン + ス イ カ + パ ン + イ ヤ マ ン ゴ + ブ ド ウ に 関 連 す る 文 献 :
157,485 件
- 6) 農産物 + 農作物 + トマト+ワタダ イ + トウモロコシ+タネ+コムギ + ジ ャ ガ イ モ + イ ネ + イ チ ゴ + オ オ ム ギ + ヒ マ ワ リ + ブ ロ ッ コ リ + ナ ス + キ ウ リ + メ ン + ス イ カ + パ ン + イ ヤ マ ン ゴ + ブ ド ウ に 関 連 す る 文 献 : 299,824 件
- 7) $1 \times 2 = 344$ 件 (1x2 の数値は上記の項目番号)
- 8) $1 \times 6 = 340$ 件 (1x6 の数値は上記の項目番号)

2. キーワードの調査

食品に関連あるものとして 344 文献、農作物として 340 件の文献を得た。

- 1) 684 件の文献についてキーワードを抽出したところ、12580 個のワードが存在した。
- 2) 各ワードを整理すると、1617 種のキーワードに分類された。
- 3) 遺伝子組換えと関係が少なく使用頻度が 4 回以下の調査対象から除外したワードは、879 種の 2692 個であった。
- 4) 使用頻度が 4 回以上のものでも遺伝子組換えと関係のないキーワードは、92 種、1160 個のワードが存在し、調査対象から除外した。
- 5) 食品分野に於ける遺伝子組換えに関する各項目に分類したキーワードの結果は次に示すとおりである。
 - ① DNA 等に関するキーワード： 3608 語
他との分類項目のなかで、DNA 等に関するキーワードが最も多く、28.6%を占めた (表 1)。
 - ② 遺伝子組換えの目的に関するキーワード： 1316 語
他との分類項目のなかで、DNA 等に次いでキーワードが最も多く、10.5%を占めた。なかでも耐病性、農薬耐性等の耐性に関するワードが多かった (表 2)。
 - ③ 植物組織培養(含遺伝子組換え)に関するキーワード： 571 語
細胞融合や組織培養に関するワードが多かった (表 3)。
 - ④ 微生物(含遺伝子組換え)に関するキーワード： 299 語
Agrobacterium に関するワードが多かった (表 2)。
 - ⑤ 植物に関するキーワード： 762 語
トマト、ダイズ、トウモロコシ、イネ、サツマイモ、ジャガイモ、コムギ、リンゴ、イチゴ、オオムギ、ミカン、水稻、モモ、インゲンマメ等の順でワードが多かった (表 5)。
 - ⑥ 食品関連のキーワード： 642 語
単一品物では、菜種、ビール、豆腐、牛乳、味噌、アルコール飲料、醤油等の順でワードが多かった (表 6)。
 - ⑦ 農作物に関するキーワード： 690 語
栽培、品種、成長、種子、果実(器官)等の順でワードが多かった (表 7)。
 - ⑧ 酵素に関するキーワード (含遺伝子組換えおよび製造用酵素等)： 358 語
酵素としてはアルファアミラーゼ、ペクチナーゼ、グルカナーゼ等のワードが多かった。醗酵食品としてはパン、ビール、チーズ等のワードが多かった。(表 8)。
 - ⑨ 化合物に関するキーワード： 596 語
蛋白質、アミノ酸、カルボン酸、脂肪族カルボン酸、アルケン、アミロース、成長ホ

ルモン、ビタミン、脂肪族アミン、ペクチン等のワードが多かった（表9）。

⑩規制等に関するキーワード：472語

品質、規制、表示、品質表示、食品衛生、食品検査、消費者志向、法規制、JAS等に関するワードが多かった（表10）。

⑪分析法に関するキーワード：139語

圧倒的にPCR法が多く、その次に免疫学的試験、RT-PCR法等に関するワードが多かった（表11）。

⑫各国に関するキーワード：107語

我が国を除いて、アメリカが最も多く、ヨーロッパ、イギリス、アルゼンチン、カナダ等に関するワードが多かった（表12）。

表1. 食品分野の遺伝子組換えに関するキーワード

No.1

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
遺伝	494	クローン	8
遺伝子	458	トランスジェニック動物	8
組換え	358	バイオセンサ	8
育種	300	バイオマス	8
DNA組換え	237	アレルゲン	7
トランスジェニック植物	229	パーティクルガン法	7
作物育種	219	Tiプラスミド	6
バイオテクノロジー	155	翻訳(遺伝)	6
遺伝子操作	152	ウイルス遺伝子	5
培養	125	トランスポゾン	5
形質転換	111	遺伝子型	5
遺伝子導入	100	DNA複製	4
変異	55	アミノ酸組成	4
DNA(核酸)	46	サテライトRNA	4
遺伝子発現	44	ミクロソーム	4
組換え体DNA	41	ミトコンドリア	4
プロトプラスト	35	異系交配	4
ベクター	28	遺伝子地図	4
突然変異	24	遺伝子融合	4
プラスミド	22	遺伝的影響	4
遺伝子クローニング	20	屋外試験	4
ヌクレオチド配列	16	核移植	4
RNAウイルス	15	転写(遺伝)	4
免疫	15	膜蛋白質	4
cDNA	14	DNAマーカー	3
アミノ酸配列	14	RNA(核酸)	3
染色体	14	トランスジェニックマウス	3
アンチセンスRNA	12	リゾチーム	3
プロモーター領域	12	遺伝子再編成	3
アンチセンスDNA	11	DNA結合蛋白質	2
形質発現	11	GTP結合蛋白質	2
酵素阻害	11	mRNA	2
ゲノム	9	NK細胞	2
センサ	9	RNA依存DNAポリメラーゼ	2
遺伝資源	9	TNF(壊死因子)	2
エレクトロポレーション	8		

表1. 遺伝子組換えに関するキーワード

No.2

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
アデニンヌクレオチド	2	DNA制限酵素	1
アレロパシー	2	EGF(成長因子)	1
アンチセンスヌクレオチド	2	ES細胞	1
遺伝学	2	LDL(リポ蛋白質)	1
遺伝子座	2	ホメオティック遺伝子	1
遺伝的調節	2	ホメオボックス遺伝子	1
遺伝毒性	1	核型	1
bFGF	1	核酸	1

3608

表2. 食品分野に於ける遺伝子組換えの目的に関するキーワード

No.1

キーワード	使用頻度	キーワード	使用頻度
耐病性	101	殺虫剤	9
農薬	77	種間雑種	9
耐性	73	圃場試験	9
脂肪	69	縮葉枯病	8
耐虫性	62	弱毒ウイルス	8
農薬耐性	48	省力化	8
飼料	37	フレーバ	7
除草剤	28	飼料作物	7
微生物育種	26	熟成	7
澱粉	25	食品添加剤	7
植物ウイルス	24	生理活性因子	7
組換え蛋白質	23	耐病性遺伝子	7
タバコモザイクウイルス	22	動物用医薬品	7
環境保全	19	微生物学的反応	7
雑種	18	アズキゾウムシ	6
生態系	18	ウイルスフリー植物	6
ウイルス蛋白質	17	うどんこ病	6
バイオリアクタ	17	ストレス	6
植物病害	15	ポチウイルス	6
貯蔵	15	モザイク病	6
生物農薬	13	モノクローナル抗体	6
生物分解	13	酸化防止	6
毒性	13	植物病原菌	6
有機農法	13	食品アレルギー	6
害虫	11	食品流通	6
雑草	11	耐干性	6
植物ホルモン	11	大豆蛋白質	6
新品種	11	不稔	6
薬物耐性	11	変異誘発	6
作物収量	10	ククモウイルス	5
食糧問題	10	トランスジェニックタバコ	5
生産量	10	一代雑種	5
増殖	10	家畜育種	5
貯蔵安定性	10	害虫防除	5
微生物分解	10	結晶蛋白質	5
栽培管理	9	固定	5