

**厚生労働科学研究費補助金**

**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14年度 総括・分担研究報告書**

**(H12-食品-001)**

**主任研究者 長尾 拓**

**平成15年3月**

## 目 次

<b>I. 総括研究報告書</b>	
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 長尾 拓	..... 1
<b>II. 分担研究報告書</b>	
1. 諸外国における遺伝子組換え食品に関する法制度に関する研究 抗生物質耐性遺伝子の移行性 組換え微生物の国際動向等に関する研究 遺伝子組み換え魚に関する文献調査 長尾 拓	..... 8
2. 安全性評価に関する研究（1）～（5） 小関 良宏	..... 45
3. DNA組換え体の検知に関する研究 米谷 民雄	..... 79
4. 組換え体のアレルギー性に関する研究 手島 玲子	..... 99
5. 組換え体の慢性毒性試験に関する研究 菅野 純	..... 110
6. クローン技術を用いた動物食品の安全に関する研究 熊谷 進	..... 115
7. リスク・コミュニケーションに関する研究 加藤 順子	..... 151
8. 高機能食品の開発に関する研究 江崎 治	..... 172
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	..... 180

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 国立医薬品食品衛生研究所長 長尾拓

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品等の安全性確保及び、高機能食品の開発に関する研究を遂行するため、1主任研究者、7分担研究者を中心として、15機関にわたる研究グループを組織した。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を蓄積するため、各種調査研究ならびに、後代交配種に関する導入遺伝子の安定性検討、アレルギー試験、毒性試験等の実践的研究を行った。さらに、当該食品の検知に関する試験法の確立を行うとともに、リスクコミュニケーションに関する調査研究、並びに高機能食品の開発を行った。

分担研究者

小関良宏 東京農工大学工学部教授  
米谷民雄 国立医薬品食品衛生研究所食品部長  
手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所  
機能生化学部室長  
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所毒性部長  
熊谷 進 東京大学大学院農学生命科学研究科  
教授  
加藤順子 三菱化学安全科学研究所調査部長  
江崎 治 国立健康・栄養研究所臨床栄養部長

安全性評価に関する研究を小関班員、DNA組換え体の検知に関する研究を米谷班員、組換え体のアレルギー性に関する研究を手島班員、組換え体の慢性毒性試験に関する研究を菅野班員、クローン技術を用いた動物食品の安全性に関する研究については熊谷班員、リスク・コミュニケーションに関する研究については加藤班員、高機能食品の開発については江崎班員が担当し、主任研究者が総括を行った。また、諸外国における遺伝子組換え食品に関する法制度の調査、抗生物質耐性遺伝子の移行性、組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際動向の調査研究、遺伝子組換え魚に関する文献調査について、京都大学医学部、国立感染症研究所、国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部並びに独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所で行われたものを主任研究者がとりまとめた。

研究目的

本研究は、厚生労働省食品保健部の強い依頼を受け遂行されるもので、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蓄積、当該食品の検知に関する試験法の確立及びリスクコミュニケーションに関する調査研究、並びに高機能食品の開発を行うことを目的とする。

B.研究方法

植物中の遺伝子発現変動調査法の開発等による

C.結果と考察

諸外国における遺伝子組換え食品に関する法

制度に関する研究: 遺伝子組換え食品に関する法制度を国際調和する試みには、世界保健機関 (WHO) と国際連合食糧農業機関 (FAO) の下に設けられている国際食品規格委員会 (Codex Alimentarius Commission; CAC) が取り組んでおり、主に、安全性評価を含む危険分析および食品表示の両面から議論が進んでいる。従って、バイオテクノロジー応用食品の安全性を評価する仕組みの制度化は、組換え DNA 技術を応用した植物については、先進各国においてほぼ完了しており、審査手続の国際調和も進みつつある。一方、植物以外に組換え DNA 技術を応用した食品および組換え DNA 技術以外の新技术を応用した食品の安全性を確認する制度的枠組みの整備状況については、クローン牛に関するものを除いて、ほとんど知られていない。本研究では、主な先進工業諸国における取り組みの状況を、質問送付に対する各国担当者からの回答の分析および補完的な文献検索により調査した。

抗生物質耐性遺伝子の移行性: カナマイシン (ネオマイシン) 耐性遺伝子 *npI*II は、市場に流通しているニューリーフプラス・ジャガイモやサンアップ (55-1) パパイヤに、組換え体選抜のためのマーカーとして含まれている。これらの組換え植物由来の DNA が、代表的な自然形質転換細菌 *Acinetobacter* sp. にどの程度の頻度で取り込まれ発現してカナマイシン耐性を与えるのか検討した。

高頻度の自然形質転換のために最適化された *Acinetobacter* sp. 受容菌は、実験室内の条件下でニューリーフプラス・ジャガイモとサンアップ (55-1) パパイヤ由来の DNA で形質転換されカナマイシン耐性を獲得した。しかしこれらの実験は自然界での条件を完全に反映したものでは

ない。実際に、最適化されていない *Acinetobacter* sp. を用いた実験では形質転換頻度は (pNEO ベクターを用いて頻度を比較した場合) その  $3 \times 10^5$  分の 1 である。組換え植物にマーカーとして用いられる Km 耐性遺伝子によって自然界の細菌が形質転換される可能性は否定できないが、その頻度は極めて低いと考えられる。組換え微生物の国際動向等に関する研究: バイオテクノロジー応用食品の安全性、特に遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性に関する国際的な動向に関する情報を収集すると共に、国際機関により開催される関連会議に出席し、その議論に参加した。CODEX バイオテクノロジー特別部会 (2003 年 3 月日本、横浜) で、吉倉は、議長として進行と取りまとめを行い、組換え微生物のガイドラインを最終合意 (step 8) とした。これにより吉倉が議長として担当した部会では、「モダンバイオテクノロジーに由来する食品のリスク分析」、「植物組換え体食品の安全性に関するガイドライン (アレルギー評価法を含む)」および「組換え微生物応用食品の安全性に関するガイドライン」の 3 議題について、最終合意に達することができた。研究としては、遺伝子組換え微生物を用いた食品の安全性評価に特に重要と思われ、かつその試験法が確立していない項目について、モデル組換え体を用いた検討を試みた。本年度は、マウス腸管内での遺伝子の移行について検討を行い、通常の組換えに用いるプラスミドが、自然界に分布する接合性プラスミドの働きにより、マウス腸内生息菌に伝達されることをその試験法を示すと共に、in vivo で実証した。

遺伝子組換え魚に関する文献調査: 遺伝子組換え魚に関する情報を文献検索、インターネット、特許、雑誌・新聞等を用いて収集を行った。

前回調査した以降に、組換え体に関して報告された文献を調べた結果、新たに海産魚を用いた報告（和名：ヘダイ）があったが、それ以外は今まで報告されている魚種を用いたものであった。実験内容では、今まで成長ホルモン遺伝子を導入し、成長促進効果をねらったものが多かったが、新たに、耐病性を付与する組換え体を作成し、細菌性疾病に対し、効果があった報告が出てきた。また、人のラクトフェリン遺伝子をコイに導入して特定のウイルス病に対して抵抗性を増したという論文があった。基礎的研究としてメダカ、ゼブラフィッシュを用いた実験は前回同様、多数の報告例があった。組換え体作出法として、魚類ではほとんどマイクロインジェクション法であったが、精子にエレクトロポレーション法・リポソーム法を用いて遺伝子を導入した報告がなされ、それらの子供に高率（50～70%）で遺伝子が導入されたという報告が出てきた。また、マウスなどで用いられている遺伝子ノックアウト法をニジマスで試み、特定の遺伝子の働きを阻害することに成功した報告もなされた。

特許関係ではゼブラフィッシュを用いて、組織特異的あるいは発生の特定時期に遺伝子を発現させる手法について特許をとった例が出てきた。

インターネット情報では、引き続き、アメリカにおける組換え体動物を許可する権限のある米国医薬品局(FDA)、組換え体魚類の販売に反対している団体 Center for food safety (CFS) および組換え体魚類を最初に販売するであろう A/F Protein 社のホームページを調べた。未だに販売の許可は下りていないが、A/F Protein 社は2004年までに結論が出ると予測しているとのことである。

最近、組換え体魚類の出荷が近づきつつあると

いう状況を反映してか、比較的一般の人にもめにとまる雑誌で組換え体について報道がなされた。

また、アメリカでは遺伝子組換え魚は自然の生息環境から隔離された施設で養殖されているが、メリーランド州では、他の水路とつながっていない池や湖において遺伝子組換え魚の養殖を認めたとあり、同州では基準が緩和された。反対にカリフォルニア州やオレゴン州は規制強化に動いているようである。また、ワシントン州では州内で組換え体魚を取り扱うことを禁止した。

組換え体の安全性に関する論文は導入遺伝子が拡散するシミュレーション実験やモデル動物を用いた報告がでてきている。また、組換え体魚とコントロールの筋肉中で発現している RNA の差をみた報告がされた。

安全性評価に関する研究：我が国において既に食品としての安全性が確認されている遺伝子組換え農作物、特に、大量に輸入されているダイズについて、導入遺伝子の後代交配種における安定性を中心に解析した。導入遺伝子の塩基配列上の安定性を調べるため、輸入大豆に含まれていたラウンドアップ・レディー・大豆(RR大豆)からそこに含まれる 35S プロモータ::CTP::epsps 遺伝子領域とその挿入領域を含む大豆・ゲノム DNA 断片をクローニングしてその塩基配列を決定した。そこで得られた塩基配列情報をもとに、この領域を増幅する PCR プライマーを作成し、輸入大豆に含まれていた RR 大豆 18 粒から抽出した核 DNA をテンプレートとして PCR を行い、その塩基配列を決定した。その結果、18 粒の中で 7 箇所から点突然変異が検出された。しかし、この結果はコントロールとして同時に調べた  $\alpha$  型  $\beta$ -コングリンシンサブユニット ( $\beta$ -con  $\alpha$ ) 遺伝子における突然変異率とほぼ同等であることがわ

かり、導入された遺伝子と内生の遺伝子とにおいて、ほぼ同じ頻度で点突然変異が起こっていると考えられた。また、輸入 RR 大豆の導入遺伝子産物（EPSPS タンパク質）の発現を ELISA 法で確認したところ、発現タンパク質が検出されない個体が確認された。この個体の導入遺伝子の解析で、数カ所の塩基置換を確認した。これら塩基置換が直接タンパク質が発現しない原因である可能性は低く、さらに詳細な検討が必要である。

一方、このような種子繁殖性植物ばかりでなく、ジャガイモ等の栄養繁殖性植物においても遺伝子組換え農作物が開発・利用されているため、栄養繁殖後代植物における導入遺伝子の安定性を調査するため、ジャガイモおよびサツマイモについてレポーター遺伝子(GUS)を導入し、発現安定性の検討を開始した。ジャガイモの形質転換体は生育が思わしくなかったが、サツマイモは毛状根を利用して GUS 遺伝子の発現を検討したところ、毛状根の誘導直後は個体ごと、実験ごとに発現量が大きく異なった。現在培養を継続中である。さらに、食用として通常利用している植物に由来する新規遺伝子を用いることで、新しいタイプのウイルス耐性植物を育成することに成功した。その種子繁殖後代における導入遺伝子の発現を調査したところ、一部の形質転換株において、感染の拡大が抑制されるウイルス抵抗性の形質が見出された。しかし、そのメカニズムについては、ウイルスゲノム移行の抑制かウイルス複製の阻害によるものかは確定できなかった。後代株での形質発現は個体差が大きいことが判明したが、その原因は転写後ジーンサイレンシングや DNA メチル化などの要因による可能性が考えられた。さらに、微生物の後代交配種の安全性に関する調査として、これまでに微生物において開発・適用

されてきた遺伝子組換え法について調査し、その結果として作出された微生物の塩基配列と自然突然変異もしくは人為突然変異によって作出された微生物の塩基配列と比較検討した。これによって、遺伝子組換えによって作出された微生物の塩基配列が、自然突然変異もしくは人為突然変異によっても作出されるケースがあり、このような場合、遺伝子組換えによって作出された微生物のリスクは自然突然変異もしくは人為突然変異によって作出された微生物のリスクと同等と見なし得ると考えられた。

#### 組換え食品の検知法に関する研究：

安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf ならびに NewLeaf Plus のそれぞれについて、定量 PCR 法を用いた分析法確立のための検討を昨年度に継続して行い、定量用プライマー対、プローブセットに加え、定量用標準分子を開発した。さらにスクリーニングを目的とし、*Cry IIIA* を標的遺伝子とした定量系の開発も行った。また、ジャガイモを対象に既存法を用いた場合、定量分析法に供するのに適した DNA を抽出することが困難であったため、DNA 抽出法の検討を行った。さらに、開発された定量分析法の評価を行うに当たり必要となる疑似混入試料についての検討を行った。

遺伝子組換えジャガイモ NewLeaf ならびに NewLeaf Plus に加え、平成 15 年 1 月に開催された食品衛生バイオテクノロジー部会において審査継続中である NewLeaf Y3 系統中 2 系統が了承された。この事を受け、NewLeaf Y 系統別特異的定性検知法の開発を行った。またさらに、モニタリングを目的とし、上記 NewLeaf ならびに NewLeaf Plus を含む安全性審査を終了した品種についても定量分析法の一部を準用し、定性分析法への適用可

能性についての検討を行った。

また、新たに抗ウイルス性遺伝子組換えパパイヤの簡易検知法としてGUS ( $\beta$ -glucuronidase)アッセイによる組織化学的検知法を確立した。

次いで、遺伝子組換え食品定量分析法における加工影響の評価を行うために、遺伝子組換えトウモロコシGA21穀粒を原材料としたモデル加工食品を作成し、加工による定量値への影響を、原材料を対象とした場合に得られる定量値との比較として調査した。

さらに、新規遺伝子組換え食品の定量分析法の開発として、平成15年2月現在、新たに遺伝子組換えトウモロコシとして安全性審査を終了したMON863、TC1507、NK603の3品種が流通可能な状態となっているため、新品種遺伝子組換えトウモロコシ3品種を対象にした定量分析法開発のための検討を行った。

組換え食品のアレルギー性に関する研究：平成14年度は、患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討、新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討、及び食物アレルギー動物モデルの検討を行った。患者血清を用いる研究では、国内外食物アレルギー患者血清等126種について、除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS), PAT, 害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9C)タンパク質に対するIgE抗体の有無の検討を、ELISA法、ウェスタンブロット法でおこなったが、陽性の血清はみられなかった。新規産生タンパク質等の人工胃腸液による分解性の検討では、1995年のUSPの方法に基づいて行われることの多いin vitro分解性試験の改良、並びにvalidationを行うために研究を行った。Validation試験では、人工胃液(SGF)による分解性試験につきILSI主催の国際validation試験に参画した。9機関

で、10種のタンパクの人工胃液による分解性を検討し、pH1.2の条件下の方が、pH2.0の条件下に比べよいvalidation結果が得られた。また、タンパク質の加熱前処理による分解性の変化について検討した結果から、特に人工腸液(SIF)による分解性試験の場合に、加熱による分解性の著しい亢進のみられることが判明した。動物を用いるアレルギー性の検討では、種々のマウスを用いる強制経口投与による感作条件の検討を行ったところ、W/Wvマウスで、経口感作能の高いことが判明し、このマウスの腸管リンパ球(IEL)中のTCR $\gamma\delta$ -T細胞の割合の顕著な減少と経口感作能との関連が示唆された。

慢性毒性試験に関する研究：本研究は、遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発がん性併用試験を国民の意向も考慮して行政的観点から実施するものである。

遺伝子組換えトウモロコシ(MON810 Event: Pioneer 33P67株)、遺伝子非組換えトウモロコシ(Pioneer 33P66株)をアメリカ合衆国(イリノイ州の同一地域)より、それぞれのトウモロコシを単一生産する農家から購入した。粗蛋白質量や粗脂質量などの食品成分組成、アミノ酸組成、脂肪酸組成、カビ毒等を分析し、遺伝子非組換えトウモロコシの遺伝子検査を行った。その結果、遺伝子組換えおよび遺伝子非組換えトウモロコシを飼料に添加し、慢性毒性・発がん性併用試験を遂行する上でなんら問題がないことを確認した。

改良 NIH Open Formula の飼料配合を元とし、ここで配合されるトウモロコシ 24.5%すべてを遺伝子組換えに置きかえたものを最高用量群とした。改良 NIH Open Formula の配合成分中の脱脂大豆およびグルテンミールは、遺伝子組換え成分の混入を排除できないので、これを小麦粉に置き

かえた。これにより起こる栄養価あるいは栄養バランスの変更は、飼料として問題になるようなものでないことを確認した。慢性毒性・発がん性併用試験では、この配合による飼料を用いて、F344/Ducrj (SPF)ラット雌雄各群 60 匹に投与し、体重と摂餌量を測定するとともに、1 年目には各群 10 匹、2 年目には残存する動物を対象に、血液学、血液化学、病理組織学的検査等を行う。

遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発がん性併用試験は、国の内外を問わずこれまで行われたことがない。本研究は、国民の意向も考慮して行政的に実施が計画・決定されたものである。

クローン技術を用いた動物食品の安全性に関する研究 国内外でこれまでに得られている知見は、生後 1 ヶ月以上生存した体細胞クローン牛個体は、一般牛と同程度に正常に生育し、一般牛と差異のない生理機能をもつことを示している。したがって、一般牛に比べ、クローン牛個体が、ヒトを含めほ乳動物に対して生物作用をもつ物質を多量に産生したり、新規な生物活性物質を産生していることは考えがたい。

クローン牛の肉と生乳についての構成成分に関する知見は、それら乳肉の構成成分が一般牛と異なること、ならびに栄養機能の点において一般牛の肉や生乳と類似していることを示している。さらに動物への給餌試験の結果は、ヒトが通常摂取している量に十分匹敵する量のクローン牛の肉または生乳をラットに給餌しても、健康を損なうことがないことを示しており、栄養的にも一般牛の肉や生乳と同等の機能をもつことを示している。

したがって、受精卵クローン牛や体細胞クローン牛については、従来技術により産生された牛にはない特有の要因によって食品としての安全

性が損なわれることは考えがたい。ただし、クローン技術は新しい技術であるために、クローン牛由来の食品の安全性については、慎重な配慮が必要である。クローン牛の人獣共通感染症等疾病への罹患、あるいは同牛由来の乳肉における有害化学物質の残留などによって、安全性が損なわれることのないような慎重な対応が必要である。こうした配慮の下に、その安全性を危惧させる要因が新たに検知された場合には、速やかにその要因を排除できる対応が必要である。

リスクコミュニケーションのあり方に関する研究 欧州諸国（英国、ドイツ）および米国における遺伝子組換え食品に関するリスク・コミュニケーションの体制および市民の認知や受容を聞き取り調査等により調べ、それに基づき、我が国における遺伝子組換え食品（GM 食品）に関するリスク・コミュニケーションのあり方について検討した。

各国ともコミュニケーション体制の整備と担当者の訓練が行われており、英国では徹底した公開、透明性の確保が図られていた。また、米国では多数の専従者による直接的な消費者対応が行われていた。英、独においては GM 食品に対する消費者の反対は根強く、背景にリスクと便益の比較を越えた価値観の問題が横たわっているようであった。このような背景からか、英国では GM 食品に関わる様々な決定への消費者参加が図られており、幅広い市民討論も行われようとしていた。一方、米国においては消費者に多少の不安はあっても反発は少なく、具体的な便益に対しては積極的な支持が示されていた。また、行政における GM 食品に対するコミュニケーション活動も、教育・啓発が中心であるようであった。

リスク・コミュニケーションの基本は相互の信



頼を確保し共考関係を築くことであると言われて  
ている。信頼の確保のためにはリスク評価の質の  
高さはもとより、公開性、透明性が確保され、誠  
実さと本気で取り組む態度が伝わるが必要  
である。近年、公開性についてはかなり改善され  
てきたが、さらに説明責任を果たし、透明性を高  
めることが消費者の理解を促し信頼を高めるた  
めに必要であると考えられる。そのような作業を  
実効あらしめるためにも、我が国においてもコミ  
ュケーションのために適切な人員を配置し、訓  
練を行う等の体制の整備は必須であろう。このこ  
とは、いかに政府が消費者とのコミュニケーション  
に本気で取り組もうとしているか、ということ  
でもある。市民参加のあり方についても、今後、  
我が国なりの検討を進めることが必要であると  
考えられる。:

**高機能食品の開発**：生活習慣病予防に効果が期待  
される DHA を効率良く摂取するために、日本人の  
主食であるイネに  $\alpha$ -リノレン酸を効率よく発現  
させた高機能食品の開発を最終目標とした基礎  
的研究を行った。イネ  $\alpha$ -リノレン酸合成の鍵酵  
素である OsFAD3 を取得し、PCR によるランダムな  
変異導入により酵素活性を高めた新規 OsFAD3  
タンパクの創造をめざしたが、高活性を有する変  
異体の獲得に至らなかった。

#### D. 結論

バイオテクノロジーを応用した食品のより一層  
の安全性確保のための科学的知見の蓄積に関し  
て、わが国に流通する遺伝子組換え植物の遺伝的  
安定性についての確認、アレルギー性に関する安  
全性評価手法の高度化を図るとともに、消費者の  
意向にも配慮し、ラットを用いた慢性毒性試験が  
実施されているほか、クローン技術を利用した牛

の肉等の安全性に関する検討がなされた。また、  
カナマイシン耐性遺伝子を用いて、抗生物質耐性  
マーカー遺伝子の細菌叢への移行性について検  
討された。遺伝子組換え食品の検知については、  
安全性未審査の品種の試験法を確立するととも  
に、表示義務化されている遺伝子組換え大豆、と  
うもろこしにつき高感度の定量的検知法の開発  
が終了した。リスクコミュニケーションに関する  
調査研究では、海外の調査データを踏まえ、情報  
提供の具体的方法に関する検討が行われた。高機  
能食品の開発では、生活習慣病予防に資するイネ  
の開発が進められている。さらに、組換え微生物  
を用いた食品や遺伝子組換え魚の諸外国での開  
発動向、各国の規制状況等についても調査が行わ  
れた。

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、当該食品の検知に関す  
る試験法の確立及びリスクコミュニケーション  
に関する研究等を持続するとともに、透明性を確  
保しつつ、より一層の安全確保、消費者の不安解  
消に努める必要があると考えられる。

#### E. 研究発表

個別の研究報告書に記載済み。

平成 14 年度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）

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  
諸外国における遺伝子組換え食品に関する法制度に関する研究  
分担研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

バイオテクノロジー応用食品の安全性を評価する仕組みの制度化は、組換え DNA 技術を応用した植物については、先進各国においてほぼ完了しており、審査手続の国際調和も進みつつある。一方、植物以外に組換え DNA 技術を応用した食品および組換え DNA 技術以外の新技术を応用した食品の安全性を確認する制度的枠組みの整備状況については、クローン牛に関するものを除いて、ほとんど知られていない。本研究では、主な先進工業諸国における取り組みの状況を、質問送付に対する各国担当者からの回答の分析および補完的な文献検索により調査した。

協力研究者

宮城島 一明（京都大学大学院医学研究科  
社会健康医学系健康政策管理学 助教授）  
里村 一成（京都大学大学院医学研究科  
社会健康医学系健康政策管理学 助手）

20 世紀に実用化された新技术には、組換え DNA 技術のほかに、培養・反応技術（バイオリアクター）、大量培養技術、細胞融合技術、クローン技術、倍数体技術など、いわゆるニュー・バイオ技術と総称されるものがある。このうち、牛のクローンについては既に多くの事実と安全性の検証のための努力が積み重ねられているが、その他のものについては、そもそも安全性の検証が必要であるか否か、必要であるとすればどこまで公権力が規制主体として介入すべきであるかなど、未解決な部分も少なくない。

そこで本研究では、牛クローン以外のニュー・バイオ技術を応用した食品の安全性について、諸外国、とりわけ先進工業諸国の政府レベルでの検討や取り組みの状況を調査することとした。

A. 研究目的

バイオテクノロジー応用食品、なかでも組換え DNA 生物由来の食品（以下、遺伝子組換え食品という）の安全性については、多くの国においては、上市前の安全性審査が法制度化されている。また、審査手続きの国際調和に向けての取り組みも、世界保健機関（WHO）と国際連合食糧農業機関（FAO）の下に設けられている国際食品規格委員会（Codex Alimentarius Commission; CAC）の場で進行中である。

しかしながら、バイオテクノロジーと総称される技術は、組換え DNA 技術だけではない。

B. 研究方法

ニュー・バイオ技術を応用した食品の安全性を担保するために何らかの規制的活動が国レベルで行われているかを尋ねる質問状を、豪州、韓国、カナダ、米国、英国、欧州委員会の食品安全行政のバイオテクノロジー担当者あてに 2002 年末に送付した。別の担当者を紹介された場合には、質問状を追加送付した。各国政府の担当者から 2003 年 2 月 12 日までに寄せられた回答を整理し、さらに必要に応じて文献検索によって情報収集を行った。

#### (倫理面への配慮)

国レベルの政策および法制度の検討であるため、特に該当しない。各国から非公式に入手したデータおよび通信文書の原本等については、本報告書に含めないことを原則とした。それ以外の場合は、内容を注意深く吟味したうえで、適切な形に加工して使用した。

### C. 研究結果

質問の送付先のすべてから、最低一通以上の回答を得た。その回答および追加的な文献検索によって入手した当該国（地域）の状況は以下の通りである。

#### C-1. 豪州

豪州とニュージーランドは共通の食品基準法制のもとにあり、新規食品（添加物を含む）は Standard A19 に基づき、上市前に ANZFA（Australia New Zealand Food Authority）に安全性審査の申請を行い、承認を受けなければならないとされている。新規性の定義は、当該

食品が「伝統的には広く使われていない」という点と「安全性に関する知見の集積が不十分」という点の両者が満たされる場合である。新規食品は、Food Standards Code の改正手続きを経て Standard A19 の別表に収載されて、初めて販売可能となる（2001 年 6 月施行）。

つまり豪州においては、基本的に、食品の製法ではなく、その性状・性質に注目した法体系となっている。これまでに安全性審査の対象になったもの例としては、植物ステロール・エステル（警告表示義務を課して条件付きの承認）<sup>1</sup>や海洋性微小藻類の乾燥物<sup>2</sup>などがある。細胞融合あるいは非自然的な倍数体由来の食品も、上記の条件を満たせば、新規食品と見なされる。

バイオ・リアクターで生産される食品についても、基本的には新規食品と見なされ、主成分自体の安全性と混合する副産物の安全性が規定の手続きに従って検討されることになる。

クローン生物由来の食品の安全性は今のところは問題視されていないが、専門家委員会による意見を求めることが予定されている。

なお、最終製品の性状・性質に注目した上市前審査体制の唯一の例外が、組換え DNA 生物由来の食品と放射線照射食品である。これらの手法によって製造された食品は、最終製品の性状・性質には関わりなく、すべてが上

<sup>1</sup> Application A410 – Phytosterol esters derived from vegetable oils, Draft Risk Analysis Report, 29 November 2000 (<http://www.foodstandards.gov.au/standardsdevelopment/applications/applicationa410phytosterolesters/applicationa410fulla991.cfm>)

<sup>2</sup> Application A428 -DHA-rich dried marine micro algae (Schizochytrium sp.) and DHA-rich oil derived from Schizochytrium sp. as novel food ingredients (<http://www.foodstandards.gov.au/standardsdevelopment/applications/applicationa428marinemicroalgaeanovelfood/a4>)

市前安全性審査の対象となる。

## C-2. 韓国

細胞融合にかかる生物についてカルタヘナ議定書の定めに従うことを除けば、その他のニュー・バイオ技術応用食品の安全性審査に関する政府レベルの取り組みはない模様である。

## C-3. カナダ

カナダにおいては、新規食品 (novel food) を販売しあるいは広告しようとする者は、食品医薬品法 (Food and Drugs Act) の下で定められた新規食品規則 (Novel Foods Regulation) に基づき、上市前に届け出を行い、これを受けて、行政手続きに定められた一定の期間内に保健省が安全性審査を行うこととなっている。その対象となるのは、(1)過去に食品として使用されたことのないもの (微生物を含む)、(2)過去に食品製造に利用されたことのない過程を用いて作られた食品、(3)遺伝子操作により改変された食品、以上の三者である。

このうち第三類型である「遺伝子操作により改変された食品」には、細胞融合あるいは倍数体技術の応用により、元の食品にはない新しい性質が付与されたり、性質が有意に変えられたりした食品も含まれると解されている<sup>3</sup>。クローン動物に関しては、単なる胚分割による動物は上記の第三類型に含まれないが、

新たな遺伝子の追加などを行った場合は、新規食品規則の対象となると考えられている。

いわゆるバイオ・リアクターによって製造された物質に関しては、それが食品製造に使われる酵素である場合には食品添加物規則 (Food Additive Regulation) の適用対象となる。一方、単一細胞由来のタンパク質として摂取されることが前提とされる場合には、新規食品規則の適用対象となる。

現行の新規食品規則は 1994 年 9 月に定められ、事前届出制の法制化 (Food and Drug Regulations, Part B, Division 28) に合わせ、1999 年 10 月 27 日に改めて告示されたものである。しかしながら、その安全性評価指針は事実上、食品あるいは動物飼料として用いられる組換え DNA 微生物と組換え DNA 植物を対象として想定したものである。そのため、対象範囲を組換え DNA 食品以外にも広げることを目的の一つとした安全性評価指針の改訂作業が 2002 年に始まった。当初は同年 9 月を目途に作業が進められていたが、2003 年 1 月現在、案の一部が公開されているものの、新しい指針は決定・公表されていない。

## C-4. 英国

細胞融合および倍数体由来する食品の安全性審査に関する情報は得られなかった。

バイオ・リアクター由来の食品に関しては、遺伝子組み換え微生物の閉鎖系における利用に関する EC 指令<sup>4</sup>の定めに従う旨の回答があった。

28draftassexecsumm1494.cfm)

<sup>3</sup> Genetic Modification is any change to the heritable traits of an organism achieved by intentional manipulation. This includes, but is not limited to: recombinant nucleic acid techniques, somaclonal variation, electroporation, artificially induced mutagenesis, and the like (Guidelines for the Safety Assessment of Novel Foods, Volume I, Preamble and Guidance Scheme for Notification, Food Directorate, Health Protection Branch, Health Canada, September 1994).

<sup>4</sup> Council Directive 98/81/EC of 26 October 1998 amending Directive 90/219/EEC on the contained use of genetically modified micro-organisms (Official Journal of the European Communities - 5.12.1998 - No L 330 P. 0013 - 0031).

クローン動物あるいは遺伝子組み換え動物の利用に関する将来の方向性としては、政府の安全性評価の体制に関する情報は得られなかったものの、次のような情報を得た。すなわち、英国政府の正式な諮問機関として農業環境バイオテクノロジー委員会（Agriculture and Environment Biotechnology Commission; AEBC）が2000年に設置された。AEBCの第一次の報告書<sup>5</sup>を2001年9月10日に公表したが、これは組換え植物に関するものであった。翌年9月3日に公表された第二次報告書<sup>6</sup>はバイオテクノロジー応用動物に関するもので、政府に向けて発せられた7箇条の提言を含むものであった。これらの提言のひとつひとつに対して、英国政府は公式文書<sup>7</sup>を通じて立場を明らかにしている。提言の多くは環境影響に関するものであるが、提言3と提言5の内容は以下の通りである。

すなわち、遺伝子組み換え動物とクローン動物の作成に関しては、既に両者とも、世界で最も厳しいといわれる1986年の動物法（Animals Act 1986）の規制の下にあり、動物作成を行おうとする者は、事前に申請を行い、政府の認可を受けなければならない。動物愛護の面からの法制の強化としては、1911年の動物保護法（Protection of Animals Act 1911）の改正が検討されている（以上、提言3関連）。

遺伝子組み換え動物とクローン動物に由来する食品をめぐる消費者の選ぶ権利の確保に

関しては、既存のEC規則<sup>8</sup>によって上市前の安全性審査と食品表示が義務づけられており、可追溯性に関しても規制が強化される見込みである。これまでのところ、遺伝子組み換え動物とクローン動物に由来する食品の申請は一件もない（以上、提言5関連）。

#### C-5. 欧州委員会

欧州共同体においては、新規食品規則（Novel Food Regulation (EC) No. 258/97）があり、上市前の安全性審査を義務づける食品の範囲を定めている。そこには遺伝子組換え生物由来の食品が含まれる（同規則第1条2項a-b号）ほか、新たな一次分子構造を持つ食品（c号）、微生物・菌糸類・藻類を直接食すものあるいは抽出物（d号）、伝統的な方法で開発され安全な食経験がある以外の動植物由来の食品（e号）、今までに用いられたことのない製造方法による食品であって食品成分等が有意に異なる食品（f号）が含まれている。もっとも、これらの条件に合致する食品であっても、同規則が施行された1997年5月12日までに既に欧州共同体域内で広く流通していた食品は新規食品と見なさないことになっている。

いわゆるニュー・バイオ技術を応用した食品に関しては、上記のf号に該当するかどうか焦点となる。

まず、細胞融合体由来の抽出物については、上記のf号に該当すると考えられている。ただし、細胞融合体自体を食す場合にはa号に該当し、遺伝子組換え食品としての安全性審査を受けなければならない。なぜなら、欧州共

<sup>5</sup> Crops on Trial, A Report by the AEBC, September 2001.

<sup>6</sup> Animals and biotechnology, A Report by the AEBC, September 2002.

<sup>7</sup> Government Response to Animals and Biotechnology: A Report by the AEBC ([http://www.aebc.gov.uk/aebc/animals\\_response.html](http://www.aebc.gov.uk/aebc/animals_response.html)).

<sup>8</sup> Regulation 258/97/EC on novel foods and novel ingredients.

同体における遺伝子組換え生物の定義<sup>9</sup>には細胞融合が含まれるからである<sup>10</sup>。

つぎに、倍数体に関しては、上記の遺伝子組換え生物の定義で、倍数体誘導によるものは明示的に除外されている<sup>11</sup>。つまり a 号には該当しない。では、f 号に該当するかどうかということになるが、過去に確立された倍数体誘導技術を使う限り、該当しないという見方が強い。

牛以外のクローン動物については、実際に食品が市場に投入される時点で、f 号に該当すると見なして安全性審査を義務づけることが現行法規の下で可能と考えられているが、現時点では商品化の現実性が薄いため、安全性審査の必要な範囲や審査方法などは検討されていない。なお、欧州共同体内では動物福祉に関する法規もあり、その適用も受ける。

バイオ・リアクターについては、それ自体は新規な食品製造方法と考えられていないので、一義的に f 号の適用となるわけではないが、a-e 号のいずれかに該当すれば、安全性審査が義務づけられる。

新規食品規則に基づく安全性審査の結果、

<sup>9</sup> Council Directive of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms 90/220/EEC.

<sup>10</sup> Techniques of genetic modification referred to on Article 2 (2) (i) are inter alia: (1) recombinant DNA techniques using vector systems as previously covered by Council Recommendation 82/472/EEC(1); (2) techniques involving the direct introduction into an organism of heritable material prepared outside the organism including micro-injection, macro-injection and micro-encapsulation; (3) cell fusion (including protoplast fusion) or hybridization techniques where live cells with new combinations of heritable genetic material are formed through the fusion of two or more cells by means of methods that do not occur naturally. (Annex I A Techniques Referred to in Article 2 (2) Part 1)

<sup>11</sup> Techniques referred to in Article 2 (2) (ii) which are not considered to result in genetic modification, on condition that they do not involve the use of recombinant DNA molecules or GMOs, are: (1) in vitro fertilization, (2) conjugation, transduction, transformation or any other natural process, (3) polyploidy induction (Annex I A Techniques Referred to in Article 2 (2) Part 2).

2002 年 7 月までに新規食品として販売が認められたものは、(1)フィトエストロールエステルを添加したファットスプレッド、(2)卵黄由来のリン脂質、(3)*Leuconostoc mesenteroides* が産生したデキストラン、(4)高圧滅菌した果実製品、(5)トレハローゼ、(6)凝固ジャガイモ蛋白、以上である。一方、審査の結果、販売が承認されなかったものは、(1)ステヴィア植物および乾燥葉、(2)ナンガイ豆(*Canarium indicum* L.)、以上である。

新規食品規則 (Novel Food Regulation (EC) No. 258/97) は現在、見直しが検討されており、2003 年 11 月を目処に改正案が提案される見込みである。

改正にあたっての主な論点は 2002 年 7 月に欧州委員会が公表したディスカッションペーパー<sup>12</sup>に詳しいが、そこにおいても、f 号に関する新規性の定義と運用が最大の論点の一つとして指摘されている。

いずれにしても、遺伝子組換え食品 (現行の a-b 号) は別の規則体系に移管されることがすでに決まっており、改正後の新規食品規則の対象として残るのは現行の c-f 号である。そのうち、f 号については、何ををもって「食品の成分や構造に関する有意な変化」と解釈するのかという問題、製造過程を評価の対象とせずに製品を評価の対象とすることの是非、そもそも有害な食品を販売することは違法であるという前提がある以上、規則自体が必要なのかなどの問題が指摘されている。現行の規則では新規食品の定義の狭間に漏れてしまう

<sup>12</sup> Discussion Paper: Implementation of Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients, Prepared by Directorate General Health and Consumer Protection (SANCO D4) European Commission.

製品もある一方で、新規製品の定義を一般化して拡大すると、あまりに多くの製品が安全性審査の対象となり、また、経過措置も複雑化するのではないかと危惧されている。

#### C-6. 米国

いわゆるニュー・バイオ技術を応用した食品に関して、食品としての安全性を確保するための法整備はなされていない。しかし、分野と技術によっては、食品業界に対する強制力のない指針が政府によって示されている場合もある。

細胞融合体に関しては、苺の一品種の上市が過去に検討されたことがあるが、その後の商業的進展はなく、行政側も新たな法令を準備する状況にない。

倍数体誘導に関しては、比較的古い技術であることもあり、特に安全面に関する社会的懸念は存在しておらず、法令も準備されていない。

牛以外のクローン動物については、遺伝子組換え動物とともに、FDAの部局である Center for Veterinary Medicine (CVM)が所管している。2002年8月に科学アカデミー（National Academy of Science）がバイオテクノロジーの動物への応用に関する報告書<sup>13</sup>を公表したことを受けて、食品としての危険評価に関する議論がCVMのなかで進んでおり、結論は2003年初めにも出されるのではないかとされている。その結論次第では、産業界向けの指針の作成が始まる可能性もある。

いわゆるバイオリクターに関しては、植物あるいは動物を反応体として使用する医薬

品製造について既に指針を策定済みであり、食品の製造に関しては、国際食品規格会議（Codex Alimentarius Commission）における指針作成が待たれている状態であり、これが国際基準として正式に採択されるのを待って、米国内における指針作成が本格化する見通しとなっている。

#### D. 考察

今回の調査の対象とした国・地域における、いわゆるニュー・バイオ技術を用いた食品に対する食品安全上の行政的対応を大まかに整理すると次のようになる。

すなわち、ニュー・バイオ技術を用いた食品の上市を最初から禁止している国はない。その一方で、上市前の届け出制ないし事前審査性を取っている先進工業国が少なからずある。ただし、その内容は一様でない。

カナダと豪州では、現行法において全ての新規食品の安全性審査が要求されている。しかも、何が新規食品に該当するかの定義も包括的である。従って、新たな食品が実用化されれば、それは、組換えDNA技術を用いているか否かにかかわらず、安全性審査の対象となるのが原則である。この制度の長所としては、新種の食品が開発されても、法律の根幹を変えることなく対応ができるということである。また、新規食品を一律に安全性審査の対象とするということ、論理的整合性も高い。制度の短所としては、新規性とは何かという哲学的な命題と常に向き合う必要があること、異なる新規食品群に対応するために安

<sup>13</sup> <http://www.fda.gov/cvm/index/updates/NASrpt.htm>

全性審査手続きを必要に応じてひとつひとつ定めていく責任が行政に生じること、新規食品を網羅的に審査するために行政の事務量と費用が高むことである。

欧州共同体の現行法制では、事前の安全性審査の対象となる新規食品の範囲はカナダと豪州に次いで広いが、一方で、新規食品と見なされない例外もいくつか設けられており、論理的整合性はやや劣ると言えなくもない。現行規則の改正手続が始まっており、このような点を中心に議論が進行中である。今後、審査範囲を広げる方向に改正が行われるのか、逆に狭める方向で改正が行われるのか、現時点では明らかでない。

なお、欧州のなかでも英国は、遺伝子組換え動物を中心に追加的に厳しい認可手続を定めているようであり、欧州共同体のなかでも加盟国によって法制に若干の違いがあると考えられる。

最後に、米国と韓国においては、新規食品に対して一律に安全性審査を義務づける制度が無く、組換え DNA 技術を応用した食品だけを審査対象としている点において、日本と同じである。しかし、健康に対する潜在的危険が、食経験がない新規食品のなかでも特に組換え DNA 技術応用食品に多く内在していると考えられるべき科学的根拠が無い以上、なぜ、組換え DNA 技術応用食品だけが安全性審査の対象となるべきなのか、論理的根拠は薄いと言える。しかしながら、仮説的にしろ何らかの危険性が予見されるような新規食品に対しては積極的に安全性の研究と検討を行い、必要があれば政府が業界に対する指針を出すべく準備している米国の動向は、我が国にとっ

ても大いに参考になる。

## E. 結論

組換え DNA 技術を応用した食品およびその他のいわゆるニュー・バイオ技術を用いた食品をめぐっては、大きく分けて、表示に関する議論と安全性審査に関する議論がある。両者の議論は一応別物であるが、例えば我が国の食品衛生法が定める組換え DNA 食品の表示が安全性審査済みであることを前提としている例から分かるように、両者は関連する部分も多い。

消費者の健康に害のある食品を故意あるいは過失により供した者に対して、刑法により事後的に罰が科されることは、全ての国に共通であるといつてよい。それでは、どのような場合に特定の食品群に対して上市前の安全性審査が要求されるかといえば、ひとつは、通常の食品を上回る水準の危険が客観的に予見される場合、もうひとつは、単に消費者がそれを求める場合である。

前者の場合、安全性審査の必要性は正当化される（誰がコストを負担すべきかという問題は残る）が、後者の場合、本来は必要のない行政手続を行うことであり、危険関連情報の通知（risk communication）の失敗による帰結と見なすこともできる。公共サービスは最低の費用で最大の効果を上げる必要があることはいうまでもない。仮に、本来ならば不要の安全性審査にかかる費用と行政資源を別の食品安全対策に振り向けることができれば、消費者は食品に関する実質的な危険減という利益を得ることができるからである。



表示に関しても、食品安全の原則からいえば、消費者に対して特定の危険を内包している食品の特性（例えば、アレルゲンを含む食品、病原微生物を多く含む可能性のある食品）に関する表示を義務表示とし、その他の表示を任意表示とするのが論理に叶っている。この立場からすれば、他の食品と同じか、あるいはそれ以上の安全性を備えていることが確認されている以外に大きな差異のない食品（例えば、栄養成分等に変化のない組換え DNA 技術応用食品、放射線照射食品）に対して、その旨の表示を義務づけることは、消費者の好奇心を満足させる効果はあっても、公衆衛生の立場からすれば、全く根拠がない。

政府の一義的機能は納税者の要請に応えることであるから、安全性審査に関しても、表示に関しても、科学的合理性を最大化させるように最適化された行政制度を構築することは、理想ではあるが、現実的でない。政府の使命は、食品の安全と危険に関する科学的な情報を最大限に収集し、それをもとに可能な限り効果的な危険関連情報の通知（risk communication）を行うことである。あとは、その結果として形成される、納税者（あるいは一般国民）の危険認知（risk perception）に合致するように、食品衛生行政を運営するだけである。

いわゆるニュー・バイオ技術を応用した食品に関する安全性審査の枠組みについて、先進工業諸国の制度を比較すれば、安全性審査の対象を組換え DNA 食品に限定しない、カナダ・豪州型のアプローチの方において論理的整合性はそれなりに高いと言えるが、その代償として、市場に投入される食品のうち、何

が新規で何が新規でないのか、そもそも新規性とは何なのかを常に考え判断する必要に迫られる。例えば、安全性審査の済んだ二種類の遺伝子組換え植物を古典的な方法により掛け合わせ、二つの新たな特徴をひとつの個体に集積した系統は、新規食品と呼ぶべきかどうか。新規食品は市場に登場して何年経てば新規性が失われるのか。これらの問題に行政は対処せねばならない。さらに、新たな技術が開発されるたびに、安全性審査の体制を整えることは義務的となり、大きな政府が必要となる。

一方、危険関連情報の通知（risk communication）を最大限に活用し、安全性審査の対象をその必要性が最も高い食品群に極力限定して運用するアプローチがある。この考え方に従えば、今までは安全性審査が義務づけられていた食品であっても、その本来的な安全性について国民の合意が成立すれば、来年からは安全性審査が免除されるというように、機動的な対応も不可能ではない。その意味で、限られた行政資源の効果的な利用に資するといえるが、何を持って国民の合意とするか、制度の継続性と安定性をどう保つかなど、難しい課題も少なくない。

新規食品一般に対する食品衛生行政上の対応として、上記二つのアプローチのうち、我が国がどちらに近い立場をとるかは市民の判断に任されており、どのような制度を構築するかは、ある意味で哲学的な選択にも近い。しかしながら、世界有数の食糧輸入国である我が国としては、世界貿易機関の諸協定に基づく義務の遵守と権利の行使を通じて国民の健康の保持増進を図っていく外はなく、世界

各国・各地域および食品基準にかかる国際組織における議論の推移を注意深く見守っていく必要がある。

F. 健康危険情報

特に無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

無い。

2. 学会発表

無い。

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

無い。

2. 実用新案登録

無い。

3. その他

無い。

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）

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  
薬剤耐性に関する研究

分担研究者 長尾 拓 国立医薬品食品衛生研究所長

研究要旨

カナマイシン(ネオマイシン)耐性遺伝子 *nptII* は、市場に流通しているニューリーフプラス・ジャガイモやサンアップ(55-1)パパイアに、組換え体選抜のためのマーカーとして含まれている。これらの組換え植物由来の DNA が、代表的な自然形質転換細菌 *Acinetobacter* sp. にどの程度の頻度で取り込まれ発現してカナマイシン耐性を与えるのか検討した。高頻度の自然形質転換のために最適化された *Acinetobacter* sp. 受容菌は、実験室内の条件下でニューリーフプラス・ジャガイモとサンアップ(55-1)パパイア由来の DNA で形質転換されカナマイシン耐性を獲得した。しかしこれらの実験は自然界での条件を完全に反映したものではない。実際に、最適化されていない *Acinetobacter* sp. を用いた実験では形質転換頻度は (pNEO ベクターを用いて頻度を比較した場合) その  $3 \times 10^5$  分の 1 である。組換え植物にマーカーとして用いられる Km 耐性遺伝子によって自然界の細菌が形質転換される可能性は否定できないが、その頻度は極めて低いと考えられる。

協力研究者

国立感染症研究所 細菌第二部

部長 荒川宜親

主任研究官 岩城正昭

A. 研究目的

遺伝子組換え植物体を作成する際の抗生物質耐性マーカー遺伝子に関して、(1) 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、(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、が懸念される。これらの点を検討するため、本研究ではカナマイシン耐性遺伝子を含むニューリーフプラス・ジャガイモとサンアップ(55-1)パパイアを材料として選び、これら由来の DNA が代表的な自然形質転換細菌 *Acinetobacter* sp. にどの程度の頻度で取り込まれ発現してカナマイシン耐性を与えるのか検討する。

具体的には次のような研究計画で臨んだ。

(1) *Acinetobacter* sp. を用いた自然形質転換系の確立

前年度までに、*Acinetobacter* sp. を用いた自然形質転換系を構築することができた。前年度に用いた実験系では、*nptII* と異なるタイプのカナマイシン耐性遺伝子を受容体 DNA として用いざるを得なかったため、組換え植物 DNA による自然形質転換を高感度で計測することができなかった。本年度は受容菌 *Acinetobacter* sp. に、新しく構築した *nptII* を含むプラスミドを導入し、*nptII* による高頻度の形質転換系を確立する。

(2) 組換え植物由来 DNA による *Acinetobacter* sp. の自然形質転換 DNA は 2 種類の組換え植物 (SunUp パパイア、ニューリーフプラスジャガイモ) およびそれらと同系の非組換え植物から調製し、*Acinetobacter* sp. を形質転換する。形質転換を起こす最小の DNA 量から、自然界での形質転換によるカナマイシン耐性遺伝子の拡散の危険について検討する。

B. 研究方法

・菌株、材料

*Acinetobacter* sp. は米国 ATCC より購入したものを用いた。試薬は入手できる最高純度のものを用いた。

#### ・ *Acinetobacter* sp. の形質転換

pKT230NEOKm<sup>s</sup> を保持する *Acinetobacter* sp. BD413 (ATCC33305) 株を、30 μg/ml のストレプトマイシンを含む LB 液体培地で 30°C 一晚培養し、翌日新鮮な LB 液体培地 100ml に 1ml を植え継ぎ 30°C で 5 時間培養して、自然形質転換能のある定常期初期の菌体 (competent cell) を得た。これを遠心集菌後グリセロールに懸濁して凍結保存し、以後の実験に使用した。

凍結保存した competent cell は融解後遠心してグリセロールを除き、それぞれ 0.25mM の MgCl<sub>2</sub> と CaCl<sub>2</sub> を含む LB 培地 10ml に再懸濁した。0.01 ~ 1 μg の DNA を加えて 30°C 90 分振とうして DNA を取り込ませ、適当に希釈または遠心集菌してから 30 μg/ml のカナマイシンを含む LB 平板培地に塗布し、形質転換体を選択した。

### C. 研究結果と考察

#### *Acinetobacter* sp. の自然形質転換

*Acinetobacter* sp. (旧名 *A. calcoaceticus*) は、培養中の一定の時期 (定常期初期) に外来 DNA を取り込む。取り込まれた外来 DNA は、染色体あるいはすでに菌が保持しているプラスミドに相同な領域があればそれを「受容体 DNA」として相同的組換えにより組み込まれ形質転換を起こす [1, 2, 3]。

今回我々は、変異を導入して不活化した *nptII* 遺伝子を有するプラスミドを「受容体 DNA」として *Acinetobacter* sp. に保持させ、*nptII* 遺伝子を含む種々の形態 (プラスミド、PCR 増幅断片、植物ゲノム) の DNA で菌を処理して、外来の無傷の *nptII* 遺伝子が菌体内プラスミド上の不活性な *nptII* 遺伝子と相同的組換えで置き換わることで菌がカナマイシン耐性を獲得する自然形質転換が起こるかどうかを調べた。

#### ・ 受容体 DNA プラスミドの調製

RSF1010 の複製開始点を持ち広い範囲のグラム陰性菌で複製保持されるいわゆる「広宿主域ベクター」pKT230 (Km<sup>r</sup> (カナマイシン耐性、Tn903 由来)、Sm<sup>r</sup> [ストレプトマイシン耐性]) [4] と、*nptII* 遺伝子を持つ大腸菌プラスミド pNEO (Km<sup>r</sup> (*nptII*), Ap<sup>r</sup>) を材料に用い、pNEO 由来の *nptII* 遺伝子を不活化して pKT230 に連結することにより、不活化 *nptII* 遺伝子を持ち *Acinetobacter* sp. が保持可能なプラスミドを構築した [図 1]。pNEO の Km 耐性遺伝子 *nptII* の内部には唯一の *NcoI* 切断部位がある。プラスミドを *NcoI* 切断後、DNA ポリメラーゼ I の Klenow フラグメントで平滑末端化して再結合することにより 2 塩基対を挿入し、フレームシフトによる *nptII* 遺伝子の不活化を行なった。得られたプラスミド pNEOKms が Ap 耐性をコードしているが Km 耐性を失ったこと (Km<sup>s</sup>) を、大腸菌を形質転換して確認し、親プラスミド pNEO とほぼ同じ大きさであることを

アガロースゲル電気泳動で確認した (data not shown)。

次に、pNEOKm<sup>s</sup> の不活化された *nptII* 遺伝子を pKT230 に連結した。pNEOKm<sup>s</sup> の不活化された *nptII* 遺伝子は *Bam*HI と *Cla*I で切り出される。pKT230 の Km 耐性遺伝子 (*Tn903* 由来) の中にもこの二つの制限酵素サイトが存在するので、pNEOKm<sup>s</sup> から切り出された不活化 *nptII* 遺伝子は pKT230 の Km 耐性遺伝子を不活化しつつその内部に連結される (図 1)。得られたプラスミド pKT230NEOKm<sup>s</sup> が Sm 耐性をコードしているが Km 耐性を失ったことを大腸菌の形質転換実験で確認し、pKT230 由来の約 10.5kb の DNA 断片と pNEOKm<sup>s</sup> の *nptII* 遺伝子由来の約 1.5kb の DNA 断片から構成されることを制限酵素解析で確認した (data not shown)。

#### ・ 受容体プラスミド pKT230Km<sup>s</sup> を保持する *Acinetobacter* sp. の作成

*Acinetobacter* sp. BD413 (ATCC33305) 株に pKT230NEOKm<sup>s</sup> プラスミドをエレクトロポレーション法で導入し、Sm<sup>r</sup>、Km<sup>s</sup> の形質転換体を得た。得られた形質転換体が pKT230NEOKm<sup>s</sup> と同じ大きさのプラスミドを保持することをアガロースゲル電気泳動で確認した (data not shown)。

#### ・ 受容体プラスミド pKT230Km<sup>s</sup> を保持する *Acinetobacter* sp. の自然形質転換

研究方法の項に示した方法で、pKT230NEOKms を保持する *Acinetobacter* sp. BD413 (ATCC33305) 株の自然形質転換を試みた。表 1 に示すように、受容体プラスミドの親プラスミドである pNEO (Km<sup>r</sup>) 0.1 μg を形質転換に用いた場合 (陽性対照) 6.2 × 10<sup>6</sup> / μgDNA、PCR 増幅した *nptII* 遺伝子 1 μg を用いた場合 1.4 × 10<sup>6</sup> / μgDNA という高頻度でカナマイシン耐性のコロニーが出現した。これに対して、SunUp 組換えパピアゲノム DNA 1 μg を用いた場合には 31 / μgDNA、ニューリーフプラス組換えジャガイモゲノム DNA 1 μg を用いた場合には 10 / μgDNA の頻度でカナマイシン耐性のコロニーが出現した。陰性対照として非組換え植物 DNA を用いると、パピアでは 0 個、ジャガイモでは 2 個とそれぞれの組換え体にくらべて明らかに少ない数のコロニーが出現したのみであった。

組換え植物のゲノムサイズを仮に 1 × 10<sup>9</sup> kb とすると、1 μgDNA あたりの *nptII* 遺伝子のコピー数は、5.5kb の pNEO の 1.8 × 10<sup>5</sup> 倍になり、これは得られた形質転換体数の比とほぼ一致する。

一方、最適化されていない (プラスミドを持たない) 受容菌を用いたところ、1 μg の pNEO を用いて 23 個の形質転換体を得られた。これは、最適化された受容菌と比較すると 3 × 10<sup>5</sup> 分の 1 の頻度である。また、組換え植物 DNA では形質転換体を得られず、*Acinetobacter* sp. BD413 株の自然形質転換には受容体 DNA が菌体内に存在する