

## 遺伝子組換え大豆の細胞遺伝学的研究

吉田 誠二\*, 坂本 義光\*, 多田 幸恵\*, 矢野 範男\*  
湯澤 勝廣\*, 長澤 明道\*, 高橋 博\*, 安藤 弘\*  
久保 喜一\*, 門間 公夫\*\*, 永山 敏廣\*\*\*, 小縣 昭夫\*  
青木 直人\*\*\*\*

### Cytogenetic Studies of Genetically Modified Soybean

Seiji YOSHIDA\*, Yoshimitu SAKAMOTO\*, Yukie TADA\*<sup>1</sup> Norio YANO\*,  
Katsuhiko YUZAWA\*, Akemichi NAGASAWA\*, Hiroshi TAKAHASHI\*, Hiroshi ANDO\*,  
Yoshikazu KUBO\*, Kimio MONMA\*\*, Toshihiko NAGAYAMA\*\*\*, Akio OGATA\*  
and Naoto AOKI\*\*\*\*

**Keywords:** 染色体分析 chromosome analysis, 遺伝子組換え大豆 genetically modified soybean, マウス mouse, チャイニーズハムスター chinese hamster

#### 緒 言

厚生労働省により遺伝子組換え食品についての安全性審査手続き, すなわち, 挿入遺伝子の安全性, 挿入遺伝子により産生される蛋白質の有害性, アレルギー誘発性, 挿入遺伝子が間接的に作用することにより有害物質を産生する可能性, 遺伝子を挿入したことにより成分に重大な変化を起こす可能性等について検討がなされた結果, 安全性を確認し, 食品として承認された遺伝子組換え食品は現在まで大豆を筆頭に, とうもろこし, ナタネ, ワタ等の6品目であり, これらは豆腐, 味噌, 油などの原材料としても用いられ, 様々な形で食品となっている.

しかしながら, 東京都が実施した消費生活モニター・アンケートの調査によれば, 遺伝子組換え食品を食べることに抵抗を感じると答えた人の割合は約9割に達しており, 遺伝子組換え食品についての安全性を懸念する消費者の声があることも確かである.

今回, 上述した消費者の遺伝子組換え食品の安全性に対する懸念に対応すべく, 当部では安全審査手続きを経た遺伝子組換え食品の中で, 我が国において最も消費量が多い, 遺伝子組換え大豆の安全性を再確認するために哺乳動物を用いた長期摂取試験および生殖試験を現在行っており, その一環として, 遺伝子組換え飼料3ヶ月摂取後の解剖時におけるマウスでの染色体異常誘発性の有無および染色体観察が容易であり, 通常の染色体試験に用いているチャイニーズハムスターで経時的な染色体分析を行ったので報告する.

#### 実験材料および方法

遺伝子組換え大豆 2000年にアメリカにおいて収穫されたRoundup Ready遺伝子(グリフォサート耐性)を保有するPioneer Brand大豆(lot:B3WAH11301-00-0018, 品種90B72)をPioneer Hi-Bred International Inc.(USA)より購入し, 精製飼料作製の為の材料として用いた. なお, 本大豆の一部を用いてRoundup Ready遺伝子の有無を当所, 栄養研究科において調べたところ, 同遺伝子を検出し, その含有を確認した.

非遺伝子組換え大豆 2000年にアメリカにおいて収穫された種大豆(非遺伝子組換え大豆の種, lotの記載なし, 品種9071)をSinner Bros. & Bresnahan(USA)より購入し, 精製飼料作製の為の材料として用いた. なお, 非組換え大豆についてもRoundup Ready遺伝子の有無を調べたが, 同遺伝子は検出されなかった.

以上2品種の大豆は近縁品種であり, 成長サイクル, 形態, 成分において同じ特徴を有する. これらの輸入大豆は使用するまで15 以下で保存した.

当所, 農業分析研究科における遺伝子組換え大豆および非遺伝子組換え大豆の農業分析の結果では, 遺伝子組換え大豆で定量限界の0.1ppmのグリフォサートを検出した. 一方, 非遺伝子組換え大豆では検出されなかった. また, 有機リン酸系農薬39種, カーバメイト系農薬24種, 含チッ素系農薬18種, その他3種の全てにおいて両大豆から検出されなかった.

\* 東京都立衛生研究所毒性部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* The Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* 東京都立衛生研究所生活科学部栄養研究科

\*\*\* 東京都立衛生研究所生活科学部食品研究科

\*\*\*\* 東京都立衛生研究所毒性部薬理研究科

精製飼料の作製 げっ歯類用精製飼料であるオリエンタル工業社製改変AIN-93G<sup>1)</sup>の基本飼料に、遺伝子組換えおよび非組換え大豆を粉末にし、乾燥重量で30%となるように混ぜた。これは栄養のバランスを崩さず、形の良い固形飼料を作る為の最大濃度である。蛋白質レベルは大豆の蛋白質濃度を測定後、ミルクカゼインで20%に調節した。脂肪レベルは大豆の脂肪濃度を測定後、非遺伝子組換えトウモロコシ油で7.00%に調節した。トウモロコシ澱粉およびトウモロコシ油は国産の非組換えのものを用い、原法の $\alpha$ -トウモロコシ澱粉を $\alpha$ -ジャガイモ澱粉に替えた。なお、原料のジャガイモは国産の非組換えのものを使用した。ミネラル混合はAIN-93Gをそのまま用いた。ビタミン混合はAIN-93VXを用い、L-メチオニンは大豆蛋白を蛋白源とした精製飼料の改変組成に従って添加した。なお、大豆以外の原材料には、水銀、カドミウム、鉛、クロム、砒素、DDT、ディルドリン、アルドリリン、エンドリン、ヘプタクロール、マラチオン、パラチオン、アフラトキシンB1, B2, G1, G2, PCB, セレン、エストラジオール、ニトロソジエチルアミン、ニトロソジメチルアミン、 $\gamma$ -BHCが含有されていないことを確認している。

表1. 試験飼料の組成

成分	遺伝子組換え大豆	遺伝子非組換え大豆
大豆	30.0	30.0
(蛋白質)	(10.05)	(10.06)
(脂肪)	(5.73)	(5.73)
ミルクカゼイン	9.5	9.95
トウモロコシ澱粉	25.412	25.352
$\alpha$ 化ジャガイモ澱粉	13.2	13.2
シュ-クロ-ス	10.0	10.0
トウモロコシ油	1.63	1.27
セルロ-スパウダ-	5.0	5.0
ミネラル(AIN-93G)	3.5	3.5
ビタミン(AIN-93VX)	1.0	1.0
L-シスチン	0.254	0.254
L-メチオニン	0.254	0.254
重酒石酸コリン	0.25	0.25
合計	100.000	100.000
蛋白質	20.00	20.00
脂肪	7.00	7.00
		(乾燥重量%)

マウスを用いた試験 Crj:CD-1(ICR)雌雄マウスを日本チャールスリバー(株)より4週令で購入し、換気毎時10回(HEPAフィルター経由)、温度23-25℃、湿度45-55%、照明12時間に制御された当部動物室にて飼育した。通常の飼育に用いる飼料であるCE-2(日本クレア社製)を水道水とともに自由摂取させ、1週間の順化を行い5週令の時点でCE-2から遺伝子組換え大豆精製飼料、非遺伝子組換え大豆精製飼料(オリエンタル工業社製)に切り替え、水道水とともに自由摂取させた。なお、CE-2のみを水道水とともに自由摂取させた群も設けた。

上記3種類の添加飼料投与後の3ヶ月目に動物をと殺し、常法<sup>2)</sup>に従い、大腿骨より染色体標本を作製した。染色体

分析はよく拡がった分裂中期細胞を1匹について100個観察し、染色体の構造異常及び数的異常の有無について調べた。染色体異常誘発の有無の判定は染色体異常誘発頻度が5%以上を示したものを陽性(+)とし、それ以下を陰性(-)とした。

チャイニーズハムスターを用いた試験 当部動物室で繁殖、維持管理したチャイニーズハムスターの雄を以下の試験に用いた。8週令の時点で通常の飼育用飼料CE-2から遺伝子組換え大豆飼料、非遺伝子組換え大豆飼料に切り替え、水道水とともに自由摂取させ、1週間から4週間までは毎週、8週間までは2週間おきに、それ以降は4週間ごとに動物をと殺し、常法<sup>2)</sup>に従い、大腿骨より染色体標本を作製した。別に、CE-2のみを水道水とともに自由摂取させた群も設けた。染色体分析および判定は上記マウスの試験と同様に行った。

#### 結果および考察

遺伝子組換え大豆および非遺伝子組換え大豆飼料を3ヶ月間投与させた雌雄マウス骨髓細胞の染色体分析の結果を表2と表3に示す。なお、遺伝子組換えおよび非遺伝子組換え大豆飼料群は6匹、CE-2群は5匹の動物を用い、1匹について100個の分裂中期細胞について染色体分析を行った。

表2. マウス3ヶ月投与試験の染色体分析結果(雄)

	遺伝子	非遺伝子	CE-2
	組み換え大豆	組み換え大豆	
観察細胞数	600	600	500
異常細胞数*	5	7	4
異常%	0.83	1.16	0.80
判定	(-)	(-)	(-)

\* 異常細胞はすべてシングル・クロマチッド・ギャップ

表2に示した雄マウスの結果では、遺伝子組換えおよび非遺伝子組換え大豆飼料群のそれぞれの染色体異常誘発頻度は0.83%、1.16%であり、遺伝子組換え大豆による染色体異常細胞の増加は見られず、同様に、別に設けたCE-2群の0.80%と同様に低い値であった。また、観察された全ての異常も染色体の構造異常としては軽度であるシングルクロマチッドタイプのギャップであった。染色体の数的異常を示す細胞は遺伝子組換え大豆を含め全群で1例も見られなかった。

次に、雌マウスでの結果を表3に示す。

雌も雄と同様に、遺伝子組換えおよび非遺伝子組換え大豆飼料群は6匹、CE-2群は5匹とした。

遺伝子組換えおよび非遺伝子組換え大豆飼料群の染色体異常誘発頻度はそれぞれ0.40%、0.20%であり、遺伝子組換え大豆による染色体異常細胞の増加は見られず、別に設けたCE-2群の頻度、0.20%と同程度の値であった。この頻度は染色体異常誘発性有りとは判断する5%よりも低く、また、観察された異常細胞も全てシングルクロマチッドのギャップと軽度のもののみであった。更に、染色体の数的異常を

表3. マウス3ヶ月投与の染色体分析試験結果(雌)

	遺伝子	非遺伝子	CE-2
	組み換え大豆	組み換え大豆	
観察細胞数	500	500	500
異常細胞数*	2	1	1
異常%	0.40	0.20	0.20
判定	(-)	(-)	(-)

\* 異常細胞はすべてシングル・クロマチッド・ギャップ

示す細胞は遺伝子組換え大豆飼料を含む全群において1例も見られなかった。これらの結果から、本実験条件下においては遺伝子組換え大豆のマウス骨髄細胞染色体への影響はないものと判断した。

雄チャイニーズハムスターの結果を以下の表で示す。

表4は遺伝子組換え大豆、非遺伝子組換え大豆飼料およびCE-2の1~4週間投与の結果であるが、遺伝子組換え大豆飼料の1~4週間投与における染色体異常細胞の出現率は0.50~1.50%であり、非遺伝子組換え大豆の0.75~1.75%および別に設けたCE-2の1.00~1.33%と同様に低い値であり、観察された異常も全てシングルクロマチッドのギャップと軽度の異常であった。また、染色体の数的異常は1~4週間投与の全てにおいて1例も観察されなかった。

表4. チャイニーズハムスターの染色体分析結果(1~4週間投与)

	遺伝子	非遺伝子	CE-2
	組み換え大豆	組み換え	
1週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	3	6	4
異常%	0.75	0.75	1.33
判定	(-)	(-)	(-)
2週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	6	7	4
異常%	1.50	1.75	1.33
判定	(-)	(-)	(-)
3週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	2	4	3
異常%	0.50	1.00	1.00
判定	(-)	(-)	(-)
4週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	4	5	5
異常%	1.00	1.25	1.25
判定	(-)	(-)	(-)

\* 異常細胞はすべてシングル・クロマチッド・ギャップ

次に、遺伝子組換え大豆飼料の16週間投与の結果を表5に示す。

遺伝子組換え大豆飼料の6, 8, 12および16週間投与で観察された染色体異常誘発頻度は1.00%~1.25%と、非遺伝子組換え飼料群およびCE-2群の0.75~1.50%と同様の低い値であり、染色体異常誘発性の指標である5%には達しておら

ず、また、観察された異常も全てシングルクロマチッドのギャップであることから、染色体への影響は無いものと思える。

次に、遺伝子組換え大豆飼料の20, 24, 28および32週間投与の結果を表6に示す。

遺伝子組換え大豆飼料の投与期間を通じての染色体異常誘発頻度は0.25%~0.75%であり、これは非遺伝子組換え大豆飼料の0.25%~1.75%およびCE-2群の0.00%~1.33%

表5. チャイニーズハムスターの染色体分析試験結果(6~16週間投与)

	遺伝子	非遺伝子	CE-2
	組み換え大豆	組み換え	
6週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	5	6	4
異常%	1.25	1.50	1.33
判定	(-)	(-)	(-)
8週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	7	4	6
異常%	1.00	1.00	2.00
判定	(-)	(-)	(-)
12週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	4	3	2
異常%	1.00	0.75	0.33
判定	(-)	(-)	(-)
16週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	4	5	4
異常%	1.00	1.25	1.33
判定	(-)	(-)	(-)

\* 異常細胞はすべてシングル・クロマチッド・ギャップ

表6. チャイニーズハムスターの染色体分析試験結果(20~36週間投与)

	遺伝子	非遺伝子	CE-2
	組み換え大豆	組み換え	
20週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	2	3	1
異常%	0.50	0.75	0.33
判定	(-)	(-)	(-)
24週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	1	1	1
異常%	0.25	0.25	0.33
判定	(-)	(-)	(-)
28週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	3	2	0
異常%	0.75	0.50	0.00
判定	(-)	(-)	(-)
32週間			
観察細胞数	400	400	300
異常細胞数*	1	7	4
異常%	0.25	1.75	1.33
判定	(-)	(-)	(-)

\* 異常細胞はすべてシングル・クロマチッド・ギャップ

同様に低い値であり、また、観察された全ての異常が軽度のものであること、および、染色体の数的異常が1例も見られていないことから、染色体に及ぼす影響は無いものと思える。また、長期摂取による染色体異常細胞の経時的な増加も全く認められなかった。

遺伝子組換え大豆の毒性試験においては、アレルギー作用、免疫毒性、変異原性、催奇形性、発癌性のいずれも認めていない<sup>3-6)</sup>が、染色体に関する報告はない。

哺乳動物を用いた染色体試験は試験物質を投与した動物の骨髓細胞における染色体異常細胞の増加を指標とするものであり、試験物質の投与を含めた試験方法の簡便さとともに、その結果は染色体異常誘発性の有無はもちろん、変異原性およびがん原性を予測しうる有用な試験系<sup>7)</sup>である。我々はこれまでに本試験法を用いて様々な試験物質の染色体への影響を調べてきた<sup>8-10)</sup>。今回、遺伝子組換え大豆の短期および長期連続摂取における染色体への影響を調べた。本法における染色体異常誘発性の有無の陽性基準は染色体異常誘発頻度が5%以上であることを原則としており、これは、マウスおよびチャイニーズハムスターで別に行った試験において陰性対照として用いた1000匹以上の無処理動物の自然発生異常細胞頻度が常時3%以下であることを踏まえたものである。一方、染色体異常誘発頻度が5%に達していない場合でも、観察された異常細胞が交換などの重篤なものや、倍数性や異数性を示す数的異常細胞が見られた場合には染色体異常誘発性を疑わなければならない、更に詳細な試験を加えて染色体異常誘発の有無を決定する方法が採られている。これらの基準のもとに、遺伝子組換え大豆添加飼料を摂取させたマウスおよびチャイニーズハムスターの骨髓細胞を用いた染色体分析を行ったが、いずれの動物およびいずれの摂取期間の観察結果においても、染色体異常誘発頻度は非組換え大豆摂取群およびCE-2群の頻度と同程度の低い値であり、また、観察された異常細胞も全てシングルクロマチッドギャップのみであった。ギャップは切断や交換を誘発するものに比べるとDNAに対する傷害はかなり低いものと定義されており、染色体の構造異常としては最軽度のもので、自然発生でも観察される異常であることを考えると、今回、マウスおよびチャイニーズハムスターを用いた遺伝子組換え大豆摂取による哺乳動物染色体への影響はないものと考えられる。チャイニーズハムスターに

長期投与し、経時的に観察した結果においても染色体異常頻度の増加が全く見られていないことから、長期摂取においても染色体には全く影響を与えていないことを観察した。本報では示していないが、遺伝子組換え大豆添加飼料を6ヶ月投与したラットでの染色体分析を行っているが、これまでの観察結果では染色体異常細胞の増加は見られていない。これらの結果から遺伝子組換え大豆の哺乳動物における染色体異常誘発性は無いものと判断した。

#### ま と め

1. Crj:CD-1マウス雌雄に遺伝子組換え大豆添加飼料、非組換え大豆添加飼料を3ヶ月間摂取させたものの染色体分析を行ったが、いずれの添加飼料群においても染色体異常細胞の増加は認められなかった。
2. 当部動物室にて繁殖させたチャイニーズハムスターの雄に遺伝子組換え大豆添加飼料、非組換え大豆添加飼料を自由摂取させ、経時的に染色体分析を行ったが、いずれの添加飼料群および摂取期間においても染色体異常細胞の増加は認められなかった。
3. 上記の結果より、遺伝子組換え大豆添加飼料摂取による哺乳動物染色体への影響は無いものと判断した。

#### 文 献

- 1) Lien, E.L., F.G. Boyle, : *Food and Chemical Toxicology*, 39, 385-392, 2001
- 2) Sellar, M.J. and A.A. Mends: *Stain Technol.*, 46, 285, 1971
- 3) Harrison, L.A., et al.: *J. Nutr.*, 126, 728-740, 1966
- 4) Hammond, B.G., J.L. Vicini, S.R. Padgett: *J. Nutr.*, 126, 717-727, 1966
- 5) Teshima, R., H. Akiyama, M. Toyoda: *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 41, 188-193, 2000
- 6) WHO working group: *Environmental Health Criteria*, 159, 177, 1994
- 7) Hope, J.: *Mut. Res.* 56, 47-50, 1977
- 8) 吉田誠二, 藤田博, 佐々木美枝子: 東京衛研年報, 37, 442-446, 1986
- 9) 吉田誠二, 青木直人: 東京衛研年報, 48, 342-344, 1997
- 10) 吉田誠二, 青木直人: 東京衛研年報, 49, 289-290, 1998