

## 遺伝子組換え大豆の細胞遺伝学的研究 (第2報\*)

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\*<sup>4</sup>, 小縣 昭夫\*\*, 上村 尚\*\*

### Cytogenetic Studies of Genetically Modified Soybean ( \* )

Seiji YOSHIDA \*\*, Yoshimitu SAKAMOTO \*\*, Yukie TADA \*\*, Norio YANO \*\*, Katsuhiro YUZAWA \*\*,  
Akemichi NAGASAWA \*\*, Hiroshi TAKAHASHI \*\*, Hiroshi ANDO \*\*, Yoshikazu KUBO \*\*,  
Kimio MONMA \*\*\* , Toshihiro NAGAYAMA \*<sup>4</sup> , Akio OGATA \*\* and Hisashi KAMIMURA \*\*

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

#### 緒 言

平成3年、厚生省は、組換えDNA技術応用食品・添加物等の安全性評価指針を定め、この指針に基づき、食品安全調査会による審議を行うこととなった。平成13年4月以降は安全性審査が法的に義務づけられ、厚生労働大臣が定める安全性審査の手続き、つまり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を検討したものでなければ販売が認められなくなった。これにより、大豆を筆頭に、6作物、44品目の安全性が承認され、市場に展開された。

一方、平成12年に行われた東京都のモニター調査において、遺伝子組換え食品に不安を感じると答えた人は、52.5%と高率であり、安全性を懸念する結果であった。

この事をうけ、我々は、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再確認として、哺乳動物を用いた種々の毒性試験を行い、その一環として、遺伝子組換え大豆のマウスおよびチャイニーズハムスター染色体への影響の有無を検討し、遺伝子組換え大豆に染色体異常誘発性のない事を前報で報告した<sup>1)</sup>。

今回、当部で行っている遺伝子組換え大豆精製飼料摂取ラットを用いた長期毒性試験の一環として、ラット骨髄細胞の染色体分析を行い、染色体異常誘発性の有無を詳細に調べ、遺伝子組換え大豆の遺伝的安全性の再確認をすべく検討を行った。加えて、前報で示したチャイニーズハムスターの経時的染色体分析を続行させており、その結果も併せて報告する。

#### 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、実験用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 遺伝子の有無を当センターの栄養研究科 (現食品成分研究科) において調べたところ、同遺伝子を検出し、その含有を確認している。

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. & Bresnaham (USA) より購入し、実験用精製飼料作製のため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、同遺伝子を検出していない。

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。なお、遺伝子組換え大豆および非遺伝子組換え大豆の農薬分析の結果では、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。

実験用精製飼料の作製 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>2)</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

\* 第1報 東京衛研年報 **53**, 274-277, 2002

\*\* 東京都健康安全研究センター環境保健部病理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\*\*\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

\*\*\* 東京都健康安全研究センター食品化学部食品成分研究科

\* 4 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科

るように混ぜた。これは栄養のバランスを崩さず、形のよ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、原法のトウモロコシ澱粉を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、アルドリル、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、 $\alpha$ -BHCが含有されてないことを確認している。なお、ラットの飼育にあたってはラットの成長段階、つまり、6ヶ月目までは、AIN-93Gを用い、その後の成長維持段階にはAIN-93Mをベースとした飼料に切り替えた。AIN-93GおよびAIN-93Mの組成を表1, 表2に示す。

表1. 初めの6ヶ月間の飼料組成(改変 AIN-93G)

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
化ジャガイモ澱粉	13.2	13.2
シュクロース	10.0	10.0
トウモロコシ油	1.63	1.27
セルロースパウダ	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%)

ラットを用いた試験 日本 Charles River(株)の Fischer (F344/DuCrj) 系ラットの雌雄をそれぞれ4週齢で購入し、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種類の実験飼料を摂取させた後、6ヶ月目および12ヶ月目に動物をエーテル麻酔下にてと殺し、常法<sup>3,4)</sup>

に従い、大腿骨より骨髓細胞の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精製飼料、非遺伝子組換え大豆精製飼料に切り替え、水道水とともに自由摂取させ、36週間から56週間まで、4週間ごとに各飼料群4匹の動物をエーテル麻酔下でと殺し、常法<sup>3,4)</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ラットの試験と同様に行った。

表2. 6ヶ月以降の飼料組成(改変 AIN-93M)

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)	(10.05)
(脂肪)	(5.73)	(5.73)
ミルクカゼイン	3.5	3.95
トウモロコシ澱粉	30.534	30.444
化ジャガイモ澱粉	15.5	15.5
シュクロース	10.0	10.0
トウモロコシ油	0.36	添加せず
セルロースパウダ	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	0.178	0.178
L-メチオニン	0.178	0.178
重酒石酸コリン	0.25	0.25
合計	100.000	100.000
蛋白質	14.00	14.00
脂肪	5.73	5.73

(乾燥重量%)

### 結果および考察

#### ラットを用いた6ヶ月摂取試験

遺伝子組換え大豆および非遺伝子組換え大豆精製飼料を6ヶ月間摂取した雌雄ラット骨髓細胞の染色体分析の結果を表3と表4に示す。

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群およびCE-2群のいずれも雌雄各6匹の動物を用い、良く拡がった分裂中期細胞を1匹について100個の染色体分析を行った。

表3に示した雄ラットの結果では、遺伝子組換えおよび非遺伝子組換え大豆精製飼料群のそれぞれの染色体異常誘発頻度はともに1.00%であり、両群との間に有意な差は全く認められなかった。また、これらの染色体異常誘発頻度は、別に設けたCE-2群の1.16%と同様に低い値であった。同様に、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のみ

表3. 雄ラット6ヶ月摂取試験の染色体分析結果

動物	遺伝子組換え大豆		非遺伝子組換え大豆		CE-2	
	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数
1	100	2	100	0	100	1
2	100	1	100	1	100	2
3	100	1	100	2	100	1
4	100	0	100	1	100	1
5	100	2	100	1	100	1
6	100	0	100	1	100	1
総数	600	6	600	6	600	7
異常%		1.00		1.00		1.16
判定		(-)		(-)		(-)

観察された異常細胞は全てシングル・クロマチッド・ギャップ

表4. 雌ラット6ヶ月摂取試験の染色体分析結果

動物	遺伝子組換え大豆		非遺伝子組換え大豆		CE-2	
	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数
1	100	1	100	1	100	2
2	100	2	100	1	100	1
3	100	1	100	1	100	1
4	100	1	100	1	100	1
5	100	1	100	1	100	1
6	100	0	100	1	100	1
総数	600	6	600	6	600	7
異常%		1.00		1.00		1.16
判定		(-)		(-)		(-)

観察された異常細胞は全てシングル・クロマチッド・ギャップ

であり、染色体異常としては重度なブレイクや染色体交換などは全群を通じて一例も観察されなかった。数的異常についても同様であり、全群において一例も見られなかった。

次に、雌ラットでの結果を表4に示す。

遺伝子組換え大豆精製飼料群および非遺伝子組換え大豆精製飼料群の染色体異常誘発頻度はともに、1.00%であり、両群との間に有意な差は全く認められなかった。また、別に設けたCE-2群の頻度、1.16%と同程度の低い値であり、観察された異常細胞は、全てシングルクロマチッドタイプのギャップであった。

上述した様に、遺伝子組換え大豆精製飼料を摂取させたラット雌雄で観察された染色体異常誘発頻度は染色体異常誘発性ありと判断する5%よりも低く、また、観察された異常も自然発生においても見られる軽度のもののみであることを考慮すると、本実験条件下においては遺伝子組換え精製飼料6ヶ月摂取ラット骨髓細胞染色体への影響はないものと考えられた。

ラットを用いた12ヶ月摂取試験

次に遺伝子組換え大豆飼料および非遺伝子組換え大豆飼料を12ヶ月間摂取させた雌雄ラット骨髓細胞の染色体分析の結果を表5と表6に示す。

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群

およびCE-2群のいずれも雌雄各6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5に示した雄ラットの結果では、遺伝子組換えおよび非遺伝子組換え大豆精製飼料群のそれぞれの染色体異常誘発頻度は0.66%、0.83%であり、両群との間に有意な差は全く認められなかった。また、これらの染色体異常誘発頻度は別に設けたCE-2群の0.83%と同様に低い値であり、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のみであった。

次に、雌ラットでの結果を表6に示す。

遺伝子組換え大豆精製飼料群および非遺伝子組換え大豆精製飼料群の染色体異常誘発頻度は1.50%、0.83%であり、両群との間に有意な差は全く認められなかった。また、別に設けたCE-2群の頻度、0.83%と同程度の低い値であった。また、観察された全ての異常はシングルクロマチッドタイプのギャップであった。

遺伝子組換え大豆精製飼料を摂取させたラット雌雄で観察された染色体異常誘発頻度は染色体異常誘発性ありと判断する5%よりも低く、観察された異常も自然発生においても観察される軽度のもののみであり、これらのことを考慮すると、本実験条件下においては遺伝子組換え精製飼料12ヶ月摂取ラットの骨髓細胞染色体への影響はないもの

表5. 雄ラット 12ヶ月摂取試験の染色体分析結果

動物	遺伝子組換え大豆		非遺伝子組換え大豆		CE-2	
	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数
1	100	0	100	1	100	0
2	100	1	100	0	100	1
3	100	1	100	0	100	1
4	100	1	100	1	100	1
5	100	1	100	1	100	0
6	100	0	100	1	100	0
総数	600	4	600	5	600	3
異常%		0.66		0.83		0.50
判定		(-)		(-)		(-)

観察された異常細胞は全てシングル・クロマチッド・ギャップ

表6. 雌ラット 12ヶ月摂取試験の染色体分析結果

動物	遺伝子組換え大豆		非遺伝子組換え大豆		CE-2	
	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数	観察細胞数	異常細胞数
1	100	0	100	0	100	1
2	100	0	100	1	100	0
3	100	1	100	1	100	0
4	100	1	100	1	100	1
5	100	1	100	1	100	1
6	100	0	100	1	100	1
総数	600	3	600	5	600	5
異常%		1.50		0.83		0.83
判定		(-)		(-)		(-)

観察された異常細胞は全てシングル・クロマチッド・ギャップ

と考えられた。同様に、現在、遺伝子組換え大豆精製飼料を2年間摂取したラットの染色体分析を行っているが、ここまでの観察段階では、染色体異常細胞の増加は観察されておらず、遺伝子組換え大豆精製飼料によると思われる影響は見られていない。

#### チャイニーズハムスターを用いた経時試験

次に、チャイニーズハムスターの結果を表7に示す。

今回、新たに加えたデータは前回報告<sup>1)</sup>した、1~32週間までに続く、36~56週間摂取の結果であるが、遺伝子組換え大豆精製飼料摂取群の染色体異常細胞の摂取期間中の出現率は0.50~1.50%であり、非遺伝子組換え大豆精製飼料の0.75~1.75%と比べ、ほとんど変わらぬ値であった。これらの値は、別に設けたCE-2の1.00~1.33%と同様に低い値であり、さらに、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った事を考えると、チャイニーズハムスターにおいて、遺伝子組換え大豆摂取による染色体異常細胞の経時的な増加は全くないものと思える。参考として、今回の結果に、前報で示した1~32週間摂取の結果を併せたものを表8に示す。

以上、ラットおよびチャイニーズハムスターの染色体分析の結果と前報で示したマウスおよびチャイニーズハムスターでの結果、いずれの摂取期間および動物種において、

遺伝子組換え大豆精製飼料によると考えられる染色体異常細胞の増加を全く認めなかった。

細胞遺伝学的試験は被検物質の染色体異常誘発の有無を決定する試験方法であり、培養細胞を用いた試験系と哺乳動物を用いた試験に大別されるが、我々は後者の哺乳動物を用いた試験で、これまでに医薬品、食品添加物等の染色体異常誘発の有無を検討してきた<sup>5-7)</sup>。

一般に、哺乳動物を用いた試験系は、培養細胞を用いた試験系に比べ、化学物質が標的臓器に若干到達しにくい点はあるが、代謝物質の検出に有効であること、同時に行っている哺乳動物を用いた毒性試験との比較検討が容易なこと、および、試験結果の最終的な目標である、ヒトへの外挿等を考慮すると、哺乳動物を用いた試験系がより重視されると考えられる。

今回、上述した試験法を用い、遺伝子組換え大豆の哺乳動物における染色体異常誘発の有無を調べたが、本報で示した結果で明らかのように、ラットおよびチャイニーズハムスターの二種の動物において、遺伝子組換え大豆によると思われる染色体への影響は全く見られなかった。すなわち、染色体異常誘発性の指標となる染色体異常細胞誘発頻度において、全ての摂取期間で陽性と判定する5%に達しておらず、無処理動物の自然誘発頻度と同程度であった。

表7. チャイニ - ズハムスタ - の染色体分析試験結果

	遺伝子組み替え大豆	非遺伝子組み替え大豆	CE- 2
36 週間			
異常% (判定)	0.75(-)*	0.50(-)	0.66(-)
40 週間			
異常% (判定)	0.50(-)	0.75(-)	1.00(-)
44 週間			
異常% (判定)	1.00(-)	0.75(-)	0.66(-)
48 週間			
異常% (判定)	0.50(-)	1.00(-)	1.00(-)
52 週間			
異常% (判定)	0.75(-)	1.25(-)	0.66(-)
56 週間			
異常% (判定)	1.25(-)	0.75(-)	1.00(-)

\* 4 匹合計 400 細胞の平均誘発頻度であり, 観察された異常細胞は全てシングル・クロマチッド・ギャップ

表8. チャイニ - ズハムスタ - の染色体分析試験結果

	遺伝子組み替え大豆	非遺伝子組み替え大豆	CE- 2
1 週間			
異常% (判定)	0.75(-)*	0.75(-)	1.33(-)
2 週間			
異常% (判定)	1.50(-)	1.75(-)	1.33(-)
3 週間			
異常% (判定)	0.50(-)	1.00(-)	1.00(-)
4 週間			
異常% (判定)	1.00(-)	1.25(-)	1.25(-)
6 週間			
異常% (判定)	1.25(-)	1.50(-)	1.33(-)
8 週間			
異常% (判定)	1.00(-)	1.00(-)	2.00(-)
12 週間			
異常% (判定)	1.00(-)	0.75(-)	0.33(-)
16 週間			
異常% (判定)	1.00(-)	1.25(-)	1.33(-)
20 週間			
異常% (判定)	0.50(-)	0.75(-)	0.33(-)
24 週間			
異常% (判定)	0.25(-)	0.25(-)	0.33(-)
28 週間			
異常% (判定)	0.75(-)	0.50(-)	0.00(-)
32 週間			
異常% (判定)	0.25(-)	1.75(-)	1.33(-)
36 週間			
異常% (判定)	0.75(-)	0.50(-)	0.66(-)
40 週間			
異常% (判定)	0.50(-)	0.75(-)	1.00(-)
44 週間			
異常% (判定)	1.00(-)	0.75(-)	0.66(-)
48 週間			
異常% (判定)	0.50(-)	1.00(-)	1.00(-)
52 週間			
異常% (判定)	0.75(-)	1.25(-)	0.66(-)
56 週間			
異常% (判定)	1.25(-)	0.75(-)	1.00(-)

\* 4 匹合計 400 細胞の平均誘発頻度であり, 観察された異常細胞は全てシングル・クロマチッド・ギャップ

また、誘発されたとくわずかな異常も全てシングルクロマチッドギャップであることから、DNA への傷害はほとんどないものと考えられる。加えて、本報では示していないが、遺伝子組換え大豆精製飼料を2年間摂取したラットでの染色体分析を現在行っているが、これまでの観察段階では染色体異常細胞の増加は全く見られていない。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ないものと判断した。

#### ま と め

1. Fischer (F344/DuCrj) 系雌雄ラットに遺伝子組換え大豆精製飼料、非組換え大豆精製飼料を6ヶ月および12ヶ月間摂取後の染色体分析を行ったが、いずれの精製飼料群および、いずれの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。

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精製飼料、非組換え大豆精製飼料を36~56週間摂取し、経時的に染色体分析を行ったが、いずれの精製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、遺伝子組換え大豆精製飼料摂取による哺乳動物染色体への影響はないものと判断した。

#### 文 献

- 1) 吉田誠二,小縣昭夫,青木直人ら:東京衛研年報, **53**, 274-277, 2002.
- 2) Lien, E.L., F. G. Boyle,; *Food and Chemical Toxicology*, **39**, 385-392, 2001.
- 3) Sellar, M, J. and A. A. Mends: *Stain Technol.*, **46**, 285, 1971.
- 4) Hope, J.,: *Mut.Res.* **56**, 47-50, 1977.
- 5) 吉田誠二,藤田博,佐々木美枝子:東京衛研年報, **37**, 442-446, 1986.
- 6) 吉田誠二,青木直人:東京衛研年報, **48**, 342-344, 1997.
- 7) 吉田誠二,青木直人:東京衛研年報, **49**, 289-290, 1998.