

200501062B

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に
関する研究

平成15年度～17年度 総合研究報告書

(H15-食品-003)

主任研究者 長尾 拓

平成18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に関する研究	
長尾 拓	1
1. 国際動向および組換え微生物の安全性に関する研究	
遺伝子組み換え魚文献検索に関する研究	
リスクコミュニケーションのあり方に関する研究	
諸外国におけるリスク管理、ポストマーケティングに関する調査研究等	
薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査に関する研究	
長尾 拓	10
2. 後代交配種等の安全性に関する研究（1）～（4）	
小関 良宏	51
3. 遺伝子組換え体の検知に関する調査研究	
米谷 民雄	67
4. 新規タンパク質のアレルギー性評価に関する調査研究	
手島 玲子	83
5. 遺伝子組換えトウモロコシの慢性毒性・発ガン性併用試験	
菅野 純	94
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	97
III. 研究成果の刊行物・別刷	102

厚生労働科学研究費（食品の安全性高度化推進研究事業）
総合研究報告書
バイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究

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に関する研究を遂行するため、1 主任研究者、4 分担研究者を中心として、18 機関にわたる研究グループを組織した。1) 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、2) 安全性審査基準への反映、検査体制の確立を目的として、各種動向調査研究（GM 魚、GM 微生物、GM 薬用植物等の動向調査）ならびに、後代交配種に関する導入遺伝子の安定性検討、アレルギー性試験、慢性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

導入遺伝子の安定性に係わる安全性評価に関する研究を小関班員、安全性確保に有用な試験方法の確立のための遺伝子組換え体の検知に関する研究を米谷班員、安全性評価方法の一層の検討、開発のための遺伝子組換え体のアレルギー性に関する研究を手島班員、遺伝子組換え体の慢性毒性試験に関する研究を菅野班員が担当し、主任研究者は、研究班全体の総括を行った。また、遺伝子組換え食品に関する開発・実用化の動向や安全性に関する調査研究の一環として、リスクコミュニケーションに関する調査、諸外国における遺伝子組換え食品に関するポストマーケティングの調査、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、GM 薬用植物に関する文献調査について、三菱化学安全科学研究所、東京大学薬学部、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、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部並びに独立行政法人水産総

A. 研究目的

本研究は、厚生労働省医薬食品局食品安全部の強い依頼をう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、安全性審査基準への反映並びにリスクコミュニケーション及び現在海外で開発されている組換え体の安全性評価状況等に関する調査研究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

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。

C. 結果と考察

諸外国におけるリスク管理、ポストマーケティングに係る調査研究:

バイオテクノロジー応用食品（以下、GM食品）の安全性管理の方策として、長期摂取における安全性評価を目的とした Post Marketing Monitoring(以下、PMM)の重要性が指摘されている。しかしながら、科学的根拠に基づく承認時審査が依然として主流であり、また PMM の実施が困難であることから、これまで実現には至っていない。

本研究班では、GM 食品の PMM に関する動向調査を3年間行ってきた。この間、GM 作物の商用栽培が限られた国や企業だけでなく、世界中で実施されるようになった。それにともない、作物の人為的流通及びGM種子の非人為的拡散が指摘されるようになった。更に、GM 食品自体が、単に病害虫を防ぐ遺伝子の導入だけでなく、疾患の予防や治療を目的とした機能性食品や食用医薬としての特性を有するようになってきた。

今後は機能強化食品や特定の摂取集団における安全性管理を皮切りに PMM が随時行われていくものと予見されるが、実施可能性や評価手法に係る検討は依然不十分である。

本邦としては、高度化する GM 食品の把握と、対応法制度の検討などを進める時期に来ており、この一環として PMM を位置づけ検討を行っていく事が望まれる。

リスクコミュニケーションに関する調査研究:

遺伝子組換え食品のリスクコミュニケーション

のあり方に関して平成 12 年度に行った保健所等に対するアンケート調査では、厚生労働省からの一般向けの分かり易い情報提供を望む声が多かった。平成 15 年度から 17 年度にわたる本調査では、アンケート調査で指摘された「分かり易い情報提供」に焦点をあて、平成 15 年度は「遺伝子組換え食品 Q&A」の見直し、平成 16 年度には、平成 12 年度のアンケート調査で指摘された情報提供に関する要望事項への対応案の整理および遺伝子組換え食品の健康影響評価書の消費者向け文案の作成、平成 17 年度は現在のパンフレットに対する一般女性からの意見聴取に基づくパンフレット改良にむけての検討を行った。厚生労働省では平成 15 年に「遺伝子組換え食品の安全性について」というパンフレットを作成し、パンフレットを通じての情報提供、「食の安全に関するリスクコミュニケーションの在り方に関する研究会」の設置と、リスクコミュニケーションへの取り組みを増している。しかし、パンフレットに関する意見聴取では、依然として消費者のニーズとのずれや、情報提供方法の改良点が指摘されている。今後は、我が国における GM 食品に対するスタンス、食品安全委員会におけるスタンスと取り組み、農林水産省におけるスタンスと取り組みをも視野に入れ、厚生労働省の役割に基づいて、GM 食品に関する情報提供及びリスクコミュニケーションの目標を明確にし、PDCA (plan, do, check, act) のサイクルをまわすことにより、効果的なコミュニケーションを行っていくことが重要であると考えられる。

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に関する国際的な動向の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。協力研究者の吉倉が議長を務めた codex における組換え食品のタスクフォースは、2003 年 3 月リスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の 3 つのテキストで合意に達し終了した。同年 6 月の codex 総会に於いて、引き続き組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が議長国となり、吉倉が議長を務めることになり、2005 年より、組換え動物に関するガイドライン作りから審議を開始することとなった。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検討を試みた。作成済みのモデル組換え体を用い、遺伝子の漏出、免疫系に対する影響、腸内菌叢への影響について、その安全性評価に関する研究で、その評価方法を開発し、具体的な安全評価を行った。マウス腸管内での遺伝子の移行では、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伝達性プラスミドの働きにより、マウス腸内棲息菌に伝達されることを実証し、そのプロトコルを評価法として示した。免疫系に対する影響では、サルモネラの鞭毛抗原を組み込んだモデル乳酸菌の検討により、組換え体において免疫系への刺激ドメインの機能がより強く働き精製抗原に比べ、サイトカインの誘導を強く誘導することを示すと同時に、遺伝子組換えによる細菌菌体表層への抗原の固定化がより強い免疫反応を誘導することを示した。

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。

1990 年代中頃から遺伝子組換え魚介類を作出したという報告が多数発表されて以来、現在まで 35 種を超える魚介類で報告されるようになった。当初は遺伝子組換え魚介類を作出したという報告が多かったものの、報告から 10 年近くたち、4 から 5 世代を経て、遺伝子組換え魚の生理・生態学的研究の報告がなされるようになってきた。生殖、繁殖行動の比較、摂餌行動の比較、遊泳能力や酸素消費量の比較など多くの知見が集積しつつある。これらの知見は、遺伝子組換え魚が逃避した場合の生態系に及ぼす影響を評価する知見となり得る。

一方、食品としての評価はキューバのグループが報告している。しかし、これはわずか 5 日間、組換えティラピアをヒトに食べさせ、その前後の血液性状の変化を観察したもので、遺伝子組換え植物で行われているような慢性毒性やアレルギー性評価は行われていない。

中国の遺伝子組換え魚介類作出に関する報告はきわめて少ない。2003 年および 2005 年に報告された論文には中国健康省の規則に則り、安全性評価を行い、市場へ出荷する準備と政府の許可を求めている最中である、となっている。

遺伝子組換え魚介類を作出した、という報告から、これら作出した遺伝子組換え魚を用いて生理・生態学的研究を行った論文が報告されるようになった。また、遺伝子組換え魚類を用いてヒトへの移植医療の材料とする論文も報告された。アメリカと中国ではすでに遺伝子組換え魚類について許可待ちの状況である。遺伝子組換え魚介類に対する安全性評価研究も実施できる体制にすることが重要である。

薬用 GM 植物の開発状況・生産実態の調査に関する

る研究：

薬用GM植物の範囲を、遺伝子組換え (GM) 植物のうち、人の健康に影響を与える成分を生産する植物及び牛、豚、鶏等の家畜の健康に影響を与える植物と定め、薬用GM植物に関する情報を文献データベース (Entrez PubMed、Chemical Abstracts)、インターネット検索 (Google)、関連学会講演要旨集、雑誌等を用いて調査した。得られた情報は、カテゴリー別に整理し分類した。米国における薬用GM植物野外圃場栽培面積は、2004年の45.35エーカーから78.45エーカーへと1.7倍に増加し、作付けが行われた作物には、食用作物でもあるトウモロコシ、ベニバナ、イネ、オオムギが含まれていた。薬用GM植物に関する国際学会 (Conference on Plant-made Pharmaceuticals 2005) で植物工場グループとして紹介されている企業の研究開発内容を、各社HP及び公表論文・特許を基に調べた結果、米国5社、カナダ2社、EU12社、その他の国4社、計23社が食用作物 (アマ、アルファルファ、イチゴ、イネ、ウキクサ、エンドウ、オオムギ、キュウリ、ササゲ、サトウキビ、ジャガイモ、ダイズ、トウモロコシ、トマト、ナタネ、マクワウリ、バナナ、ベニバナ、レタス、ワタ) を用いた薬用GM植物開発を行っており、その中の12社で食用を目的とする薬用GM植物-機能性食品、食用医薬、食用ワクチン- 開発研究が確認できた。国内では2006年度に花粉症緩和米の圃場栽培と、収穫された米を用いての前臨床及び臨床試験が計画されている。前年度までのカテゴリー別の研究・開発数と今年度の研究開発数を集計した結果、機能性食品44件、食用ワクチン39件、食用医薬17件、ワクチン抗原17件、抗体医薬16件、治療薬58件、診断薬・試薬16件であり、特に機能性食品、食用ワクチン、治療薬の開発が活発である現状が

伺えた。

導入遺伝子の安定性に係る安全性評価に関する研究：

(1) 後代交配種における導入遺伝子の安定性の検討

遺伝子組換え農作物における導入遺伝子の塩基配列上の安定性を調べるため、輸入ダイズに含まれていたラウンドアップ・レディー・ダイズ (RR ダイズ) 72 粒から抽出した核 DNA について、導入遺伝子と内生遺伝子のプロモーター領域からオープン・リーディング・フレーム (ORF) の 5' 領域を PCR によって増幅し、その塩基配列を決定して変異率を調べた。その結果、導入遺伝子と内生遺伝子とにおいて、ほぼ同じ頻度で点突然変異が起こっていること、しかし ORF について調べたところ、導入遺伝子においてアミノ酸置換を生じさしめるような突然変異は非常に少ないことがわかった。トウモロコシにおいても同様な調査を行うために MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 5' 挿入近傍塩基配列のクローニングを試みたが、ゲノム内に多数存在するレトロトランスポゾンおよび repetitive sequence にプライマーが結合してしまい、5' 近傍塩基配列は得られなかった。そこで既報の MON810 トウモロコシにおける導入遺伝子の 3' 挿入近傍塩基配列をもとにプライマーを設計し、68 粒の MON810 トウモロコシ DNA から増幅された ORF の 3' 領域から 3' 非翻訳領域の部分の DNA 断片について塩基配列を決定したところ、それらの領域における変異率が RR ダイズに比較して低いことが明らかとなった。

(2) 遺伝子組換えにおけるポストゲノム解析

遺伝子組換え作物の後代交配種における導入遺伝子及び内在性遺伝子の発現産物の変動と変動の幅を解析することを目的として、大豆のプロテオーム、トランスクリプトームの検討を開始し、また、非タンパク性成分（低分子代謝産物）の組成と含量を比較し、遺伝子組換えによって作物の栄養素の増減、あるいは有害成分の増加などが起こっているかどうかを判別するための、メタボローム(代謝産物動態)の一斉解析基盤の整備を行なった。

はじめに非組換え体の無菌的な発芽大豆から2種類の 방법으로 RNA を抽出し、その量的、質的な相違の有無を DNA マイクロアレイ解析によって検討した結果、同一の大豆品種からも相違が見られ、トランスクリプトームレベルでも個々の大豆種子分析によって大きな差があることが示唆された。次年度は国産品種を用いて品種間でどの程度データのばらつきがあるか検討するため抽出法を検討した。大豆の RNA 抽出にあたっては、開発が進んできた多検体破砕機を使用し、多数の標品を同時に用いた。その結果、多検体破砕機使用によって多くの個体から一度にそれぞれの RNA を抽出することが可能となったが、品種により抽出効率の差があることが明らかになった。RNA 抽出にあたって当初の条件（安全性試験のための再現性、多検体処理が可能、簡便、安価）の目標は満たされたと考えられる。3年目は輸入した遺伝子組換え品種を用いて個体間でどの程度 RNA 発現にばらつきがあるか検討した。大豆の RNA 抽出にあたっては破砕機を使用し、市販キットによ

る RNA 抽出後、大豆遺伝子の DNA アレイを用いて種子毎に RNA 発現を解析した結果、同一品種内でも個体により大豆遺伝子の発現にばらつきがあることが分かった。

次にプロテオーム解析であるが、遺伝子組換えダイズと非遺伝子組換えダイズそれぞれ4個体について、プロテオーム解析を行い、遺伝子組換えダイズ4個体と非遺伝子組換えダイズ4個体をそれぞれ1つのグループとし、2つのグループ間のプロファイルの比較検討を行ったが、数%のグループ特異的スポットが検出された。このようなスポットが検出される要因については、さらに個体数を増やしプロファイルデータを蓄積して解析する必要があると考えられる。

第3に、メタボローム解析としては、フーリエ変換イオンサイクロトロン型質量分離装置 (FT-ICRMS) を使用した高分解能マススペクトル測定によって代謝成分の分析を行った。FT-ICRMS 法では、試料抽出物に含まれる成分を未精製のまま一斉分析することが出来るため、後代交配種等の安全性評価のためのメタボローム情報を迅速に取得することが可能である。平成 15 年度、FT-ICRMS を用いたメタボローム解析に着手し、代謝成分抽出法、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法による FT-ICRMS 分析、マススペクトルデータ(質量数と各ピーク強度)の高速処理と多変量解析の実験系を整備した。平成 16 年度は、国内産ダイズ 2 品種(フクユタカ、ムラユタカ)および米国産ダイズ 2 品種(Benson, Binton)の合計 4 品種の種子を供試し、それぞれのメタボロームを比較した。主成分分析の結果は、日本産ダイズ品種と米

国産ダイズ品種のそれぞれを特徴づけるメタボロームの差が無いことを示していた。すなわち、解析したダイズ品種メタボロームは、それぞれの品種に特徴的に存在する代謝産物によって形成されるものではなく、同一品種内におけるサンプル間の代謝産物組成と含量の差によるものと推測された。平成17年度には、本メタボロミクス手法によって、遺伝子組換えダイズ種子と非組換えダイズ種子のメタボロームを比較した。その結果、組換え体と非組換え体の間ではメタボロームに差が認められないことが明らかとなった。

組換え食品の検知法に関する研究：

- (1) 遺伝子組換えジャガイモ定性分析法の開発並びに共同試験による標準化---安全性審査を終了した遺伝子組換えジャガイモ全8系統を対象とした定性分析法を開発し、多機関参加の共同試験により標準化を行なった。
- (2) 遺伝子組換えジャガイモ定量分析法の開発並びに一試験室内検証---上記遺伝子組換えジャガイモを対象とした定量分析法を開発し、その妥当性について一試験室内での検証試験を実施した。
- (3) 遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知技術の開発---遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種の試料への混入を想定し、粒数に基づき遺伝子組換えトウモロコシ混入率を評価するための検知技術として、1)1粒毎の試料調製法、2)DNA抽出法、3)遺伝子組換えトウモロコシ粒の判別法、また、4)スタック品種の同定法を開発した。さらに、開発された検知技術を用いてモニタリング調査研究を実施した。
- (4) 競合PCR法を用いた簡易定量分析法の開発---現在までに定量分析法が開発されている6系統の遺伝子組換え作物を対象に、より簡便かつ安価に

スクリーニング試験を実施可能とするため、競合PCR法の原理に基づく簡易型定量分析法の開発について検討した。

(5) 定量PCR法の加工食品適用可能性検証法の検討---加熱等の加工を受けた食品においては直接の分析対象であるDNAの変質により、真値を求めることが難しいと考えられるため、定量PCR法の適用可能試料は穀粒に限定されている。そこで、加工影響を科学的に数値化し、対象検体における定量可能性を明らかにするための検証法について検討した。

(6) 遺伝子組換えダイズを含む加工食品定量分析法の開発を目的とした基礎的検討---遺伝子組換えダイズを対象とし、加工処理の影響を極力受けることのない新規定量系の開発を試み、さらに、モデル加工食品を用いた基礎的検討をおこなった。また得られた結果に基づき、加工影響の大きさを推定し、これを用いた算術式により混入率を求めることが可能となるよう、解析方法の開発を試みた。

(7) 各種定量PCR機器により得られる分析結果の同等性評価---定量PCR法の適用可能機種であるABI PRISM 7700、7900(96ならびに384 well)、7000、5700を用いて得られる混入率の同等性について明らかにするため、共通試料を用いた一試験室内検証を行った。

(8) 安全性未審査遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした定性分析法の開発---安全性審査に諮られていない遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10系統)を対象とした定性PCR法を開発し、共同試験により標準化を行なった。

(9) 安全性未審査遺伝子組換えコメを対象とした定性分析法の検討---安全性未審査遺伝子組換えコメが流通していた旨の情報が得られたことか

ら、当該情報に基づき、Cry1Acタンパク質を標的タンパクとするラテラルフロー法のコメへの適用可能性を確認した。

(10)LightCycler systemを用いた遺伝子組換えダイズ定量分析法の改良---LightCycler systemを定量PCR機器として使用する遺伝子組換えダイズを対象とした定量PCR法について、分析結果の安定性向上を目的に改良を行った。

(11)ABI PRISM 7500を用いた遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とした定量分析法の開発---定量PCR機器のうち比較的安価なABI PRISM 7500を用い、遺伝子組換えトウモロコシ及びダイズを対象とする定量PCR法について開発を行なった。

(12)新たに安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ(3系統)を対象とした定量分析法の開発とT25系統を対象とした定量分析法の改良---2001年以降に安全性審査を終了した遺伝子組換えトウモロコシ5系統のうち、MON863、NK603及び、TC1507系統の3系統に、改良が必要とされたT25系統を含めた計4系統を対象とする定量PCR法を開発し、共同試験により標準化について検討した。

(13)シリカベースレジソタイプキットを用いたダイズからのDNA抽出法の改良---現行公定分析法に記載されたシリカベースレジソタイプキットを用いた方法をより短時間かつ安価に実施可能とすることを目的に改良を行なった。

組換え食品のアレルギー性に関する研究：

新規タンパク質のアレルギー性評価に関する調査研究として、(1)アレルゲン予測の解析法の検討、(2)食物アレルギー動物モデルの開発、(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分

解性試験、(4)血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性の4項目について検討を行った。具体的には、(1)アレルゲン予測の解析法では、(i)既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討において、アレルゲンに特徴的なアミノ酸断片の組み合わせによる解析手法の検討、立体構造も加味したエピトープ部位の解析を行い、エピトープになりやすいアミノ酸の分布が存在することが示唆された。(ii)衛研ホームページ上へのエピトープ情報も加味した新規統合型アレルゲンデータベース(Allergen Database for Food Safety; ADFS)の立ち上げを行なった。ADFSでは、独自に調査した結果も含めアレルゲン数1280、エピトープ既知のアレルゲン74種を搭載した。タンパク質のアレルゲン予測機能については、FAO/WHO法(Hilemanらの方法)とmotif-based法(Stadlerらの方法)を登載した。(2)食物アレルギー動物モデルの開発では、マウスを用いる経口感作の方法について数種のアレルゲン(卵白アルブミン、ラクトグロブリン、ウシ血清アルブミン)、非アレルゲン物質(ペプシン)を用いて、BALB/cマウスに投与時の溶媒の差違について検討を行った。アレルゲンの溶媒にリノール酸とレシチン混合液を用い、サリチル酸を併用投与する系で、経口での感作、経口での惹起が可能であった。また、Balb/cマウス、W/Wvマウスにおける他の食物抗原オボムコイド(OVM)の経口感作において、抗原-油脂 emulsionの投与により、感作能の上昇がみられた。(3)アレルゲンの分解性試験の一環としての体内分解性試験では、卵白中の主要なアレルゲンであるオボムコイド(OVM)の人工胃液による分解産物と患者血清との反応性を詳細に検討し、分解によるアレルゲン性の変化を検討した。低分子の7kDa、

4.5kDa の断片に対しても、一部の患者の IgE 抗体の結合が確認された。(4) 血清保存システムの構築及び患者血清と新規産生タンパク質との反応性についてにおいては、新たに 99 検体の食物アレルギー患者血清を用いて、新規産生タンパク質である PAT, CP4-EPSPS, Cry1Ab に対する IgE 抗体の産生を ELISA 法で検討したが、いずれの抗原に対する抗体産生も認められなかった。また、新規タンパク質 (Cry 1Ac) と Cup a1 抗原の交差反応性を抗 Cup a1 抗体を有する患者血清を用いて 6 個の連続したアミノ酸の合成ペプチドによる ELISA の阻害試験により確認を行ったが、合成したペプチドでの阻害はかからなかった。

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的要望に対する行政的観点から実施した。

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) を飼料に配合し、慢性毒性・発がん性併用試験を行った。F344/Ducrj (SPF) ラット雌雄各群 60 匹にこの配合飼料を 2 年間投与し、体重と摂餌量を測定するとともに、1 年目に各群 10 匹、2 年目の最終解剖時には生存する動物を対象に、血液学、血液化学検査等を行った。

これまでの検査データの解析結果から、雌 H 群で摂餌量のわずかな減少を伴う軽度の体重増加抑制、用量依存性のない死亡率の増加が雌雄で見られ、剖検所見では雌の肝などごく一部の臓器に於いて肉眼的な微小病変の有意な増加が観察されたが、その他に遺伝子組換えトウモロコシを摂取したためと考えられる毒性学的に明らかな異常所見は観察されなかった。剖検時の所見から、本検体は、重大な毒性 (発がん等) 引き起こさな

いと考えられた。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、国民的要望に対して行政的に実施が計画・決定されたものである。

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た。また、遺伝子組換え食品の検知については、安全性確認のされた食品の定量試験法を開発するとともに、最近、開発の進んでいる遺伝子組換えトウモロコシ・スタック品種検知法の開発、並びに安全性未審査の遺伝子組換え作物 (ダイズ、コメ) の定性試験法の開発を目的とした基礎的検討を開始した。リスクコミュニケーションに関する調査研究では、以前実施した保健所等に対するアンケート調査で指摘された情報提供に関する要望事項に対する対応案の整理、遺伝子組換え食品の安全性についてのパンフレット改良に向けた検討を行った。さらに、組換え微生物を用いた食品や遺伝子組換え魚、GM 薬用植物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、今後の国際的ガイドライン作成に向けた準備状況等の調査も行われた。

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。ポストマーケティングのあり方に関する調査研究は、今後第二世代の組換え食品の開発が進めば、ますます重要になってくると思われる。なお、平成 17 年度から、新たにコーデックスの新バイオテクノロジー応用食品特別部会の設置がされ、クローン動物や生理活性物質等が議論されることになった。バイオ特別部会への情報提供をするという意味でも、本研究班は重要な位置付けを持っていると思われる。

E. 研究発表

個別の研究報告書並びに研究成果の刊行に関する一覧表に記載

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全性高度化推進研究事業）

（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

国際動向および組換え微生物の安全性に関する研究

主任研究者 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に関する国際的な動向の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。協力研究者の吉倉が議長を務めた codex における組換え食品のタスクフォースは、2003 年 3 月リスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の 3 つのテキストで合意に達し終了した。同年 6 月の codex 総会に於いて、引き続き組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が議長国となり、吉倉が議長を務めることになり、2005 年より、組換え動物に関するガイドライン作りから審議を開始することとなった。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検討を試みた。作成済みのモデル組換え体を用い、遺伝子の漏出、免疫系に対する影響、腸内菌叢への影響について、その安全性評価に関する研究で、その評価方法を開発し、具体的な安全評価を行った。マウス腸管内での遺伝子の移行では、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伝達性プラスミドの働きにより、マウス腸内棲息菌に伝達されることを実証し、そのプロトコルを評価法として示した。免疫系に対する影響では、サルモネラの鞭毛抗原を組み込んだモデル乳酸菌の検討により、組換え体において免疫系への刺激ドメインの機能がより強く働き精製抗原に比べ、サイトカインの誘導を強く誘導することを示すと同時に、遺伝子組換えによる細菌菌体表層への抗原の固定化がより強い免疫反応を誘導することを示した。

協力研究者

吉倉 廣 国立感染症研究所 前所長

五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所

食品衛生管理部 室長

A. 研究目的

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ついて情報を収集すると共に、国際機関により開催される遺伝子組換え食品の安全性に関する関連会議に出席し、その議論に参加し、バイオテクノロジー応

用食品の安全性確保に関する要件を明らかにする。吉倉は、2005年より再び開始されたcodex部会の議長として、参加国の意見の調整と議事進行を行う。実験としては、組換え微生物を利用した食品の安全性を評価する上で、微生物組換え体において特に重要と思われる、腸内菌叢に対する影響、組換え遺伝子の漏出、ヒトの免疫系への影響について、モデル組換え体を作成し具体的な安全性評価やその手法を検討し、標準的な評価方法の提供を試みる。

B. 研究方法

①国際動向について：

国際機関により開催される遺伝子組換え食品の安全性に関する関連会議に出席、あるいは公開されている資料、文献を対象とし、情報収集および情報交換を行った。

国際的な会議の議論で明らかとなったバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に必要な要件のうち、その試験検査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て検査法の検討を試みた。分担としては主に微生物組換えを対象とした。

②遺伝子の漏出に関する検討：

モデル組換え体を用いて検査法の検討を試みた。3種類の*Lactococcus lactis*モデル乳酸菌を用い、検討を行った。基礎培地は、GM17培地を用いた。*in vitro*での伝達は、Sasakiらの方法を基に検討し、高頻度に伝達が観察できるフィルターメーティング法の確立を行った。動物腸管内における遺伝子の腸内フローラへの移行については、BALB/cマウスを用い、供与菌を胃内投与後、肛門閉鎖処置を行った。供与菌である*Lc. lactis* (pAMβ1)と受容菌である*Enterococcus faecalis*をマウ

スへ胃内投与し、肛門を手術用接着剤で閉鎖し、一晚飼育した後、マウスを安楽死させ、その直腸内容物について、遺伝子の移行を定量的に測定した。同様な手法を用い組換えプラスミドが腸内生息菌へ移行する頻度を、定量的に調べた。マウスから分離した腸内棲息菌である乳酸菌を受容菌として、同様な検討を試みた。遺伝子組換えにおいて、どのような組み込み方法をとれば、遺伝子の漏出が最低限に抑えられるか検討を行った。組換え遺伝子をプラスミド上に組み込む場合と、宿主染色体上へ組み込む場合の比較を行った。

③免疫系に対する影響：

細胞レベルでの評価系として、ヒト腸管由来Caco-2細胞による評価系を開発した。モデル組換え体としては、サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定した組換え乳酸菌を用いた。増殖させたCaco-2細胞に、これらの組換え乳酸菌を加え、菌の取り込みと、培養上清中へのサイトカインの産生を調べた。マウス免疫系への影響は、モデル組換え体をマウスに投与し、生体への影響につき調べた。組換えにより発現した遺伝子産物の生体への影響と、精製した蛋白と宿主乳酸菌の共存による生体影響を比較することにより、遺伝子組換えによると思われる生体影響の評価を試みた。

(倫理面への配慮)

本研究では、倫理面への配慮が必要となる部分は含まれない。実験動物としてマウスを使用するが、動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所の動物管理規程に従い実行し、動物愛護の精神で必要最小限の動物を用いて実験を行った。

C. 研究結果

①国際動向について：

組換え微生物の国際的な動向に関しては、遺伝子組換え微生物食品の安全性に関する会議に参加し、討論に関わった。協力研究者の吉倉が議長を務めた codex における組換え食品のタスクフォースは、2003 年 3 月リスクアナリシス原則、組換え植物由来食品リスク評価指針、組換え微生物由来食品リスク評価指針の 3 つのテキストで合意に達した。同年 6 月の codex 総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が提案文書を作成する事となった。吉倉が原案を作成し、厚生労働省で最終案とし、関係国に打診を行った。2005 年 9 月 19 日から 23 日にかけて千葉の幕張メッセで開催された codex における組換え食品のタスクフォースでは、このタスクホースで議論するテーマにつき議論し、まず遺伝子組換え動物のガイドライン作りを行うことが決まった。

② 遺伝子の漏出に関する検討：

組換えプラスミドの移行に関する試験管内およびマウス腸管内での試験法について、再現性を確認すると共に、広く用いることが可能なように試験法の修正、確立を行った。接合伝達性プラスミド pAM β 1 を用いると、*in vitro* 実験のフィルターメーティング法では、乳酸菌 *Lc. lactis* から、腸内棲息菌である *Enterococcus faecalis* へは、その伝達頻度は、最高 10^{-2} 程度で、 10^{-3} から 10^{-2} という高頻度に伝達を観察された。一方、BALB/c マウスを用いた肛門閉鎖法による腸内での伝達頻度は、 10^{-3} から 10^{-4} 程度であった。*in vitro* 実験のフィルターメーティング法と、*in vivo* の肛門閉鎖法のプロトコルを確立した。

マウス腸内から分離したグラム陽性細菌である *Lactobacillus* sp. A 株、B 株において、

上述のプロトコルを用いて、その伝達頻度を調べたところ、*E. faecalis* とは異なった傾向が観察された。フィルターメーティング法では、乳酸菌 *Lc. lactis* (pAM β 1) を供与菌とすると、A 株へは 9.7×10^{-6} 、B 株へは 5.3×10^{-5} の頻度で伝達を確認されたが、マウス肛門閉鎖法では、A、B いずれの *Lactobacillus* でも伝達株が分離されなかった。すなわち、これらの *Lactobacillus* では、*in vitro* と *in vivo* で、明らかに伝達頻度の違いが認められた。

上述のプロトコルを用いて、モデル組換え乳酸菌における組換え用プラスミドベクター単独のマウス腸管内での挙動について検討した。*in vitro* のフィルターメーティング法により、*Lc. lactis* (pDL278) から、腸内生息菌 *Ec. faecalis* への移行を調べたところ、組換えプラスミド pDL278 の移行は全く検出されなかった。マウスを用いて、3 日間 *Lc. lactis* (pDL278) と *Ec. faecalis* を投与し、pDL278 のマーカーであるスペクチノマイシン耐性を獲得した糞便中の *Ec. faecalis* 株を分離し、pDL278 特異的なプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行ったが、pDL278 移行株は検出されなかった。肛門閉鎖検出法においても組換えプラスミドの移行は検出されなかった。従って、プラスミド自体が伝達能を持たない *Lc. lactis* (pDL278) は、プラスミドの移行頻度は非常に低く、これらすべての実験系の検出限界以下であった。

組換え微生物の特定の遺伝子の腸内棲息菌への移行につき、試験管内でも、マウス腸管内でも定量的に移行を観察する実験系をほぼ確立し、組込み方法の違いによる影響につき検討を加えた。組み込みに用いられる遺伝子は、一般的なプラスミド上にある限り、そのプラスミ

ド自身に伝達能が無くても、自然界に存在する pAM β 1 の様な強力な接合伝達性プラスミドにより他の菌へ伝達されてしまうことを定量的に示した。これは、試験管内でも、マウス腸管内でも観察可能である。そこで、遺伝子漏出の対策として、遺伝子組換えの段階でどのような組み込み方法をとれば、遺伝子の漏出が最低限に抑えられるか検討を行った。理論的には、組み込む先をプラスミド上から、宿主菌の染色体上にすれば、当該遺伝子が移行するためには遺伝子が何らかの作用で切り出される必要があり、プラスミド上に比べ遺伝子漏出が抑えられることが期待される。そこで、相同組換えにより宿主染色体上に遺伝子を組み込んだ組換え体の作成を試みた。プラスミド上に組み込んだモデルであるプラスミド自体が伝達能を持たない *Lc. lactis* (pDL278) においても、プラスミドの移行頻度は非常に低く、これまでの試験法では、すべての実験系において検出限界以下であった。

③免疫系に対する影響：

細胞レベルでの評価系として、ヒト腸管由来 Caco-2 細胞による評価系作出を試みた。用いたモデル乳酸菌は、サルモネラの鞭毛抗原を菌体表層に固定し発現させた組換え乳酸菌で、培養した Caco-2 細胞に乳酸菌および組換え体を添加し、細胞への取り込みと、培養上清中へのサイトカイン産生を定量した。乳酸菌と組換え体では細胞への接着・取り込みに差は認められないが、培養上清中の IL-8 産生は、組換え体のみで観察された。

組み込む遺伝子産物を菌体表層に固定化して発現すると、蛋白質単独に比べ、免疫系への刺激が明らかに増強することを示した。

腸内菌叢への影響:培養による腸内細菌叢の検

査法は、現在急速に分子生物学的方法による評価法に移行しつつある。文献的に分析法を調べ、腸内菌層への影響を見る試験法としての適当と思われる検査方法を整理した。

D. 考察

2003年6月のcodex総会に於いて、次の組換え食品に関するタスクフォースを立ち上げる事が決まり、日本政府が提案文書を作成する事となった。吉倉が原案を作成し、厚生労働省で最終案とし、関係国に打診した。議論するテーマとしては魚などの動物の組換え体の提案もあるが、環境影響の問題がクリアされないとcodexが環境影響評価の場になりかねないので、十分な検討が必要である。特に、養殖中個体が産出する幼生魚の封じ込めが難しい事、組換え魚の維持には交配相手を常に変えて行く必要がある事など、食品としての安全性を考える前の技術的な問題があるようである。むしろ、クローン技術は組換え動物作出に不可欠であるので、この辺りからアプローチするのが賢明かも知れない。又、次のタスクフォースとしては、今迄の作業の上に立ってつぎの活動を考えた方がよいとの考えがあり、例えば、栄養促進組換え植物、組換え植物食品の成分分析、非食用組換え植物の問題を取り上げては、と云う考えもある。

2005年の第一回の会議では、組換え動物についてガイドライン作成を行うことが決まった。動物固有の問題があり、これまでの植物や微生物ガイドラインと同様な議論が可能であるかどうかといったところから検討がされる。組換え植物指針を組換え動物指針に書き換えるに当たっては、植物と動物の基本的な生物学的な差(特に代謝経路の違い)に十分考慮すべ

きである。

一方、既に codex のガイドラインが作成されている組換え微生物ガイドラインについては、実際に安全性評価を行う上でその試験法が十分に確立していないため評価が困難な部分がある。組換え微生物は、生きたまま摂取することにより、動物あるいはヒト消化管内で増殖することから、組換え植物等と異なり、生きた微生物に固有と考えられるいくつかの問題点が指摘されている。同時に多くの重要な項目において、安全性評価法が未だ確立されていない。Codex の微生物ガイドラインでは、今後そのような方面の研究が進むことにより、早急にその評価手法が確立されることが必要であることが明記されている。特に、微生物組換え体の安全性では消化管内での組換え遺伝子の移行、腸内フローラへの影響、免疫系への刺激等の問題について研究することは重要である。本研究では、腸管内における組換え遺伝子の腸内棲息菌への移行に関し、マウス腸管内で定量的に遺伝子の移行を観察できるというたいへん重要な知見を示した。試験管において高感度に遺伝子移行を定量的に評価する評価法、マウス腸管内において定量的にかつ高感度で遺伝子伝達を検出できる肛門閉鎖マウスの実験系はほぼ確立した。

組換え乳酸菌 *Lc. lactis* (pDL278) が、動物腸管内に多量に入ってきたとしても、組換え体自身からプラスミドが直接移行する頻度は、我々の開発した高感度の検査法においても検出限界以下であり、非常に低いことが確認された。従って、腸内で組換え体から腸内棲息菌への移行が起こるとすると、これまでに我々が検討を行って移行を実証することが出来たトリペアレンタルトランスファーが重要となっ

てくる。すなわち、自然界に接合伝達性プラスミドをもつ菌が存在し、この菌から接合伝達により組換え体へのプラスミドの接合伝達が起こる。すると同一乳酸菌内に組換えプラスミドと接合伝達性プラスミドが共存する。2つのプラスミドの共存する乳酸菌から、接合伝達性プラスミドが再び、他の腸内生息菌へ伝達して行くと、組換えプラスミドは一定の割合で接合伝達性プラスミドと共に腸内棲息菌は移行してしまう。大腸菌の R 因子では、この現象をトリペアレンタルトランスファーと呼んでいる。グラム陰性菌である大腸菌とグラム陽性菌の接合伝達は異なるが、これに類似するプラスミドの移行がグラム陽性菌でも起こっているのである。

この伝達では、自然界に分布する接合伝達性プラスミドと組換えプラスミドが遺伝子に相同性を持たない場合でも観察される。すなわち、プラスミドのように宿主のゲノムから分離して存在するレプリコンは、動物腸管内で他の棲息菌へ、その頻度の差こそあるが、トリペアレンタルトランスファーなどにより移行すると考えられる。従って、組換え微生物特に、プラスミド等の宿主遺伝子とは独立して存在するレプリコンを用いて組換え体を作成すれば、遺伝子の移行は常に起こりうるし、条件を整えば、それを定量的に確認することが可能である。今回確立した実験法は、その移行頻度を確認する最も有用な手法である。一方、本研究で検討した遺伝子組換え方法の違いによる遺伝子伝達を比較する場合の様な超低頻度で起こる遺伝子移行をどの様に評価するかについては、依然として定量的に測定することが困難で、今後新たな評価システムの構築が望まれる。

肛門閉鎖マウスは、あらかじめ供与菌と受

容菌を投与し、人工的に肛門閉鎖を行ったのち、マウスを一晩飼育することにより、直腸内に糞便が圧縮状態で蓄積する。したがって、*in vitro* のフィルターメーティング法と同様な理由で、接合伝達に適する状態が期待できる。ただ、大変興味深いことは、フィルターメーティング法と、マウス肛門閉鎖法でその伝達頻度がほぼ同じ値で示される *Ec. faecalis* に対し、フィルターメーティング法では、伝達を確認されるのに *in vivo* のマウス肛門閉鎖法での伝達を確認できない *Lactobacillus* の様な菌があることが示されたことである。この結果には再現性があり、その理由はまだ不明であるが、少なくとも *in vitro* の結果のみから腸管内での *in vivo* の伝達頻度を推定することはまだ出来ないようである。

組み込む遺伝子をプラスミド上から宿主遺伝子上に移した場合に、腸内棲息菌への伝達の可能性がどの程度変化するかを検討を行った。しかし、どの様にして超低頻度で起こりうる遺伝子の移行を定量的に測定するかの方法論が出来ていないため、プラスミド上から宿主染色体上へ組み込むことの是非に関する結論を出すには至らなかった。組換え遺伝子をプラスミド上から宿主遺伝子上に移すと、宿主染色体からその遺伝子が切り出されることが必要であり、プラスミド上に遺伝子がある場合に比べ、当然その移行頻度が大幅に低下することが期待される。現在の方法による検出限界は、実験系に用いる菌数の逆数に相当する頻度が検出限界である。この実験系で実質的に、 10^9 から 10^{10} 程度が扱える菌数の最大値であるため、この逆数が、理論的に検出限界となる。トリペアルエンタルトランスファーにより推定したプラスミド上にある遺伝子の推定伝達頻度は、 2.8

$\times 10^{14}$ 個に 1 個であるので、これより遙かに低いと推定される宿主染色体上に組み込んだ遺伝子の伝達頻度を推定することは容易ではない。今後、宿主遺伝子から遺伝子が切り出される頻度を何らかの方法で推定しなくてはならない。この値が推定できれば、遺伝子を宿主染色体に組み込んだ場合の遺伝子伝達頻度が推定可能と思われる。現在の技術では、宿主に相同組換えで組み込んだクローンについては、プラスミド単独組込のクローンと同様に検出限界以下と判定され、両者の差を確認することは出来ない。

免疫系に対する影響に関しては、作出した組換え乳酸菌の免疫効果を評価する過程で免疫系への影響やその評価方法の開発を行ってきた。細胞レベルでの評価系として、マクロファージ系継代細胞 JA-4 を用いた実験系と、ヒト腸管由来 Caco-2 細胞による評価系をこれまでに開発してきた。サルモネラの鞭毛抗原を菌体表面層に固定したモデル組換え乳酸菌を用いた実験では、組換え乳酸菌は、Caco-2 細胞への接着や取り込みに有意さは認められなかったが、18 時間後の培養上清中に IL-8 産生を誘導した。腸管上皮細胞から IL-8 が誘導されると、周辺に炎症性の反応が誘導されることが予想される。鞭毛は、細菌における運動器官であることは知られているが、IL-8 を誘導することは、本来の機能としては考えられていない。近年、鞭毛抗原が TLR5 に結合することが知られているが、IL-8 の誘導はこのシステムを介した反応の可能性を示唆するものである。鞭毛抗原は本来細菌の運動器官と考えられているが、このような反応を引き起こす事は、通常は予想出来ない。従って、今回の反応は組み込んだ遺伝子産物の“意図しない免疫系への影響”の

存在があることを実証した事になる。今回の検討で用いた試験系は、免疫系への影響について調べる方法として有用である。

組換え体に発現している抗原とほぼ等しい量の精製した蛋白を、宿主乳酸菌と混和して免疫を行い、菌体に結合することによる免疫効果の違いについて評価を行ったところ、単に混和しただけに比べ、遺伝子組換えにより菌体表層に固定化させて発現させたことにより、免疫効果は高まることが示された。

腸内菌叢への影響については、2段階連続流動培養システムの研究により、ヒトの腸内フローラを *in vitro* で再現する実験系を以前開発した。そこで、腸内菌叢の分子生物学的方法による解析方法につき文献調査、海外の情報収集を行い、培養法に変わる腸内細菌検査法につき検討を行った。この中で、検体から個々の菌を分離することなく、菌叢の変化を示すことの出来る方法として、DGGE 法の有用性が示唆された。

E. 結論

吉倉は、codex 部会の議長として、その責務を果たし、組換え微生物応用食品の安全性に関するガイドラインなど3つのテキストを2003年に最終合意とした。吉倉は、再度codex部会の議長として、2005年より新たに開始された部会で最初に検討するテーマを組換え動物のガイドライン作成とし、議事進行にあっている。

組換え微生物からの腸内棲息菌への遺伝子漏出に関する実験と実験結果をまとめると、

1. 試験管において超高感度に遺伝子移行を定量的に評価する評価法、マウス腸管内で乳酸菌から腸内生息菌への遺

伝子移行を調べる肛門閉鎖マウスの実験法を確立した。

2. この実験法を用い、乳酸菌の組換えに用いるプラスミド pDL278 が、試験管内、マウス腸管内においてマウス腸内棲息菌に伝達されることを定量的に示し、原則的にプラスミドによる組込は遺伝子移行を起こすことを示した。
3. 試験管内とマウス腸管内でその伝達頻度が大きく異なる腸内棲息菌が存在する事を示した。

組換え微生物のヒト腸管細胞への影響を調べる細胞レベルの実験系を示し、“意図しない影響”の存在を示した。モデル組換え乳酸菌のマウスへの免疫実験において、遺伝子組換えにより、抗原を菌体表層に固定発現することにより、同量の精製蛋白を乳酸菌と共存させ免疫を行った場合に比べ、免疫系への刺激が増大することを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Xin KQ, Hashino Y, Toda Y, Igimi S, Kojima Y, Jounai N, Ohba K, Kushiro A, Kiwaki M, Hamajima K, Klinman D and Okuda K. (2003) Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant *Lactococcus lactis* expressing surface-bound HIV Env. Blood. 102:223-228.
- (2) Shizunobu Igimi, Akinobu Kajikawa, and Akiko Okutani. (2003) Development

- of oral vaccines based on lactic acid bacteria. *Milk Science*. 52:185-187.
- (3) 五十君静信. (2003) 乳酸菌を応用した感染症対策. 獣医畜産新報. 56:493-497.
- (4) 五十君静信. (2003) Codexにおける遺伝子組換え微生物利用食品の安全性に関するガイドライン作り. 日本乳酸菌学会誌. 14:89-93.
- (5) Cheun HI, Kawamoto K, Hiramatsu M, Tamaoki H, Shirahata T, Igimi S and Makino S-I. (2004) Protective immunity of SpaA-antigen producing *Lactococcus lactis* against *Erysipelothrix rhusiopathiae* infection. *J Appl Microbiol*. 96:1347-1353.
- (6) Tanaka Yasuhito, Takizawa Makiko, Igimi Shizunobu, and Amano Fumio. (2004) Enhanced Release of Prostaglandin D2 during Re-incubation of RAW 264.7 Macrophage-Like Cells after Treatment of Both Lipopolysaccharide and Non-steroidal Anti-inflammatory. *Drugs. Biol. Pharm. Bull*. 27(7): 985-991.
- (7) 五十君静信、梶川揚申、浅井美里、金台運. (2004) 乳酸菌ベクターワクチン. 獣医畜産新報. 57:No. 9:748-752.
- (8) 五十君静信. (2005) 乳酸菌組換えとその応用. バイオインダストリー. 22巻1号: 38-45.
- (9) 五十君静信. (2006) 組換え微生物の安全性と乳酸菌. 乳酸菌ニュース. No. 451新年号: 7-10.
- (10) 五十君静信. 微生物および食品添加物としての安全性評価. 新しい遺伝子組換え体 (GMO) の安全性評価システムガイドブック 食品・医薬品・微生物・動植物. エヌ・ティー・エス. P274-280. 2005年4月. 東京
- (11) 五十君静信、梶川揚申、浅井美里、佐藤英一. 乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン. P. 149-155. 光岡知足編 腸内フローラと感染・免疫. 学会出版センター. 2005年10月

2. 学会発表

- (1) 梶川揚申、五十君静信、佐藤英一. Intiminを抗原とする組換え乳酸菌の経口ワクチンモデル. 2003年度日本農芸化学会大会. 2003年4月1日. 東京.
- (2) 五十君静信. 乳酸菌ワクチンの開発. シンポジウムプロバイオティクスの乳業における将来性. 日本酪農科学会. 2003年9月5日. 弘前市
- (3) 五十君静信. 乳酸菌ベクターワクチン. シンポジウム「ワクチン研究の新展開: 多様な手法が切り開く 'ワクチン' の可能性». 第137回日本獣医学会学術集会. 2004年4月2日.
- (4) Kajikawa A., Asai M., Satoh E., Okutani A., Okada Y., Yamasaki M., Yamamoto S., and Igimi S. PROTECTIVE IMMUNITY AGAINST *LISTERIA MONOCYTOGENES* BY RECOMBINANT *LACTOBACILLUS CASEI* EXPRESSING *LISTERIOLYSIN 0*. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.
- (5) Igimi S., Kajikawa A., Kim T.W., Okutani A., Satoh E. and Makino S-I.

DEVELOPMENT OF LISTERIA VACCINE USING RECOMBINANT LACTIC ACID BACTERIA. XV International Symposium on Problems of Listeriosis Uppsala, Sweden, September 14, 2004.

- (6) 五十君静信。組換え乳酸菌を用いた感染症予防の試み。日本学術会議、日本乳酸菌学会、日本農芸化学会共催シンポジウム。“一乳酸菌と健康—乳酸菌を用いた健康増進・疾病予防の試み”。

2004. 12. 17

- (7) 五十君静信。組換え乳酸菌の機能とその応用。愛知免疫アレルギーを語る会。

2005. 2. 18

- (8) 五十君静信。組換え微生物の安全性を考える。第9回腸内細菌学会特別講演。

2005. 5. 27東京

- (9) Kajikawa A, Asai M, Satoh E, Yamasaki M, Kim T, Yamamoto S, and Igimi S. Protective immunity against *Listeria monocytogenes* by recombinant

Lactobacillus casei expressing listeriolysin O. 8th Symposium on Lactic Acid Bacteria. 2005. 8. 28. The Netherlands.

- (10) 梶川揚申、佐藤英一、山崎学、朝倉宏、山本茂貴、五十君静信。サルモネラ鞭毛抗原を発現する組換え乳酸菌による感染防御免疫の誘導。第79回日本細菌学会総会。2006年3月29日。金沢市。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

サルモネラの毒性検査方法（申請）

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし