

- during food processing. *Jap J. Food Chem.* 11, 137-144.
- 11)Yoshimura T.; Kuribara H.; Matsuoka T.; Kodama T.; Shigematsu M.; Watanabe, T.; Akiyama H.; Maitani T.; Furui S.; Hino A. (2005) Applicability of the Quantification of Genetically Modified Organisms to Foods Processed from Maize and Soy. *J. Agric. Food Chem.* 53(6):2052-2059.
- 12)Yoshimura T.; Kuribara H.; Kodama T.; Yamata S.; Futo S.; Watanabe S.; Aoki N.; Iizuka T.; Akiyama H.; Maitani T.; Naito S.; Hino A. (2005) Comparative Studies of the Quantification of Genetically Modified Organisms in Foods Processed from Maize and Soy Using Trial-Producing. *J. Agric. Food Chem.* 53(6):2060-2069.
- 13)菊地博之、渡邊敬浩、笠間菊子、和久井千世子、松木容彦、穉山浩、米谷民雄 (2005) 「遺伝子組換えパパイヤ(55-1)定性検査法を対象とした外部精度管理試験結果の解析」. *食品衛生学雑誌* 46 (1) 21-27.
- 14)渡邊敬浩 (2005) 「未承認遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)の検知技術について」 *食品衛生学雑誌* 46 (4) J223-J227.
- 15)笠間菊子、渡邊敬浩、鈴木達也、菊地博之、時下祥子、坂田こずえ、松木容彦、日野明寛、穉山浩、米谷民雄 (2005) 「遺伝子組換えダイズ (ラウンドアップ・レディー・大豆 40-3-2 系統) の定量検査法の外部精度管理試験」 *食品衛生学雑誌* 46 (6) 270-276.
- 16)渡邊敬浩、笠間菊子、菊地博之、鈴木達也、時下祥子、坂田こずえ、松木容彦、日野明寛、穉山浩、米谷民雄 (2006) 「遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験」 *食品衛生学雑誌* (in press) .
- 17)渡邊敬浩、時下祥子、笠間菊子、鈴木達也、大島赴夫、菊地博之、日野明寛、穉山浩、米谷民雄 (2006) 「遺伝子組換えトウモロコシ(GA21 ならびに MON810 系統)の定量 PCR 法を対象とした外部精度管理試験」 *食品化学学会誌* (in press) .
- 18)Hiroshi Akiyama, Takahiro Watanabe, Kaoru Wakabayashi, Shinsuke Nakade, Shuji Yasui, Kozue Sakata, Ryoko Chiba, Frank Spiegelhalter, Akihiro Hino and Tamio Maitani (2005) Quantitative Detection System for Maize Sample Combined-Trait Genetically Modified Maize. *Anal. Chem.* 77 7421-7428.
- 19)Onihshi M., Matsuoka T., Kodama T., Kashiwaba K., Futo S., Akiyama H., Maitani T., Furui S., Oguchi T., Hino A. (2005) Development of a multiplex polymerase chain reaction method for simultaneous detection of eight events of genetically modified maize. *J. Agric. Food Chem.* 53(25) 9713-9721.
- 20)Takeshi Ogasawara, Yukie Chikagawa, Fumihito Arakawa, Asami Nozaki, Yoshio Itoh, Kazuo Sasaki, Hironori Umetsu, Takahiro Watanabe, Hiroshi Akiyama, Tamio Maitani, Masatake Toyoda, Hiroshi Kamada, Yukihiro Goda, and Yoshihiro Ozeki (2005) Frequency of Mutations of the Transgene, which might Result in the Loss of the Glyphosate-Tolerant Phenotype, was Lowered in Roundup Ready Soybeans. *J.Health.Sci.* 51(2) 197-201.
- 21)Akie Toyota, Hiroshi Akiyama, Mitunori Sugimura, Takahiro Watanabe, Hiroyuki Kikuchi, Hisayuki Kanamori, Akihiro Hino, Muneharu Esaka, Tamio Maitani. (2006) Quantification of genetically modified soybeans using a combination of a capillary-type real-time PCR system and a plasmid reference standard. *Biosci. Biotech. Biochem* (in press) . 学会発表等
- 1)第85回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換え食品定量分析法のコラボレーションスタディーI」栗原秀夫、松岡 猛、吉村倫彰、井上真以子、古井 聡、正野仁慈、布藤 聡、小川真智子、大島慎司、渡邊敬浩、和久井千世子、穉山 浩、米谷民雄、

- 砂川美佐緒、日野明寛、一色賢司(2003.5.)
- 2)第85回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換え食品定量分析法のコラボレーションスタディーII」渡邊敬浩、和久井千世子、穂山浩、米谷民雄、栗原秀夫、松岡猛、太田順司、青木信太郎、渡井正俊、澤田千尋、森曜子、重松万由、大峽太郎、梶野敏彦、砂川美佐緒、日野明寛、一色賢司(2003.5.)
- 3)第85回日本食品衛生学会学術講演会「ダイズ及びトウモロコシ加工食品中の遺伝子組換え体の定量」吉村倫彰、栗原秀夫、松岡猛、児玉貴志、布藤聡、小川真智子、渡辺聡、青木信太郎、飯塚太由、吉川礼次、渡邊敬浩、和久井千世子、穂山浩、米谷民雄、砂川美佐緒、日野明寛、一色賢司(2003.5.)
- 4)第9回日本食品化学学会学術大会「マイクロキャピラリー型リアルタイムPCRシステムを用いた遺伝子組換え食品定量法のコラボレーションスタディー」和久井千世子、渡邊敬浩、穂山浩、米谷民雄、吉村倫彰、紀雅美、富岡千鶴子、有田世乃、松岡猛、栗原秀夫、日野明寛、酒井栄一、豊田安基江、小川真智子、布藤聡、梶原淳睦、乙黒敬生(2003.6.)
- 5)The 117th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition「Identification of Genetically Modified Maize by Multiplex PCR」SATOSHI FURUI, SHINJI KANAYAMA, SATOSHI FUTO, MACHIKO OGAWA, TAKESHI MATSUOKA, TAKASHI KODAMA, HIDEO KURIBARA, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, AKIHIRO HINO, KENJI ISSHIKI (2003.9.)
- 6)The 117th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition「Collaborative Studies of Construct-Specific Quantitation for Genetically Modified Maize and Soybean Using Four Real-Time PCR Equipments」HIDEO KURIBARA, TAKESHI MATSUOKA, TAKASHI MATSUOKA, TAKASHI KODAMA, HIDEO KURIBARA, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, AKIHIRO HINO, KENJI ISSHIKI (2003.9.)
- 7)The 117th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting & Exposition「Quantitative Analysis of Genetically Modified Organisms in Processed Foods from Soy and Maize by using Japanese Standard Method」TOMOAKI YOSHIMURA, HIDEO KURIBARA, TAKESHI MATSUOKA, TAKASHI KODAMA, SATOSHI FUTO, MACHIKO OGAWA, SATOSHI WATANABE, NOBUTARO AOKI, TAYOSHI IIZUKA, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, MISAO SUNAGAWA, AKIHIRO HINO, KENJI ISSHIKI (2003.9.)
- 8)第40回全国衛生化学技術協議会年会「遺伝子組換え大豆定量検査法の外部精度管理について」渡邊敬浩、穂山浩、米谷民雄、笠間菊子、松木容彦、児玉貴志、栗原秀夫、日野明寛 (2003.11.)
- 9)第40回全国衛生化学技術協議会年会「遺伝子組換えパパイヤの定性検査法の外部精度管理について」穂山浩、渡邊敬浩、笠間菊子、松木容彦、米谷民雄 (2003.11.)
- 10)横浜市神奈川区食品衛生協会講習会「遺伝子組換えの基本的な原理について」穂山浩 (2003.10)
- 11)国立保健医療科学院保健講習会「食物アレルギーと遺伝子組換え食品」穂山浩 (2004.2)
- 12)酵素法による食品分析研究会「遺伝子組換え食品の検知法について」穂山浩 (2003.12)
- 13)お茶の水女子大学生活環境研究センター食の安全性に関するシンポジウム「組み替え食品とは何か」と「最近の動向」ー「遺伝子組換え食品とは何か」と「最近の動向」穂山浩 (2003.12)
- 14)バイオメディカル分析科学シンポジウ

- ム「遺伝子組換え食品の検知法について」
 穠山浩 (2003.8)
- 15) 遺伝子組換え農産物の検知技術の現状と今後 (食品総合研究所国際ワークショップ)「GMジャガイモ定性、定量分析法のコラボレーションスタディーおよび外部精度管理の概要」渡邊敬浩 (2004.4)
- 16) 第87回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換えスタック品種トウモロコシの検知法について (第1報)」穠山浩、若林薫、渡邊敬浩、菊地博之、米谷民雄、中出晋介、安井修二、千葉良子、日野明寛 (2004.5)
- 17) 第87回日本食品衛生学会学術講演会「Competitive PCR法を用いた遺伝子組換えダイズ・トウモロコシ定量法の検討」中川由紀、加藤久、阿部直哉、布藤聡、松岡猛、栗原秀夫、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄、児玉貴志、日野明寛 (2004.5)
- 18) 第10回日本食品化学学会学術大会「遺伝子組換えスタック品種トウモロコシの検知法について (第2報)」渡邊敬浩、穠山浩、若林薫、菊地博之、米谷民雄、中出晋介、安井修二、昭和薬大 千葉良子、日野明寛 (2004.6)
- 19) A symposium on “DNA analysis for Food safety and quality assurance”(at Chulalongkorn University in Thailand) 「MHLW test methods and monitoring for GMOs」Takahiro Watanabe (2004.8)
- 20) The 118th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting 「Novel Qualitative Detection Methods of Genetically Modified Potatoes」TAKAHIRO WATANABE, HIROSHI AKIYAMA, HIROYUKI KIKUCHI, TAMIO MAITANI, HIDEO KURIBARA, TAKASHI KODAMA, TAKASHI MISHIMA, SATOSHI FUTO, AKIHIRO HINO (2004.9)
- 21) The 118th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting 「Quantitation of Genetically Modified Maize and Soy by Competitive PCR」HISASHI KATO, YUKI NAKAGAWA, NAOYA ABE, TAKASHI KODAMA, TAKESHI MATSUOKA, HIDEO KURIBARA, SATOSHI FUTO, TAKAHIRO WATANABE, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, AKIHIRO HINO (2004.9)
- 22) 第88回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換え食品における加工影響についての基礎的検討 I」渡邊敬浩、菊地博之、荒川史博、小笠原健、峯岸恭孝、栗原秀夫、児玉貴志、古井聡、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2004.11)
- 23) 第88回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換え食品における加工影響についての基礎的検討 II」菊地博之、渡邊敬浩、荒川史博、小笠原健、峯岸恭孝、栗原秀夫、児玉貴志、古井聡、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2004.11)
- 24) International Workshop on Detection Methods for Genetically Modified Organisms 「Development of the detection methods for GM potatoes and stack trait maize」Takahiro Watanabe (2004.11)
- 25) 第41回全国衛生化学技術協議会年会「遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810) 定量検査法の外部精度管理について」渡邊敬浩、菊地博之、穠山浩、米谷民雄、笠間菊子、松木容彦、日野明寛 (2004.11)
- 26) 日本薬学会第125年会「遺伝子組換えトウモロコシスタック品種の検知法の開発について」若林薫、穠山浩、渡邊敬浩、菊地博之、坂田こずえ、中出晋介、安井修二、千葉良子、日野明寛、米谷民雄 (2005.3)
- 27) 日本農芸化学会 2005 年度大会「加工食品における GM 作物定量法の開発の試み」菊地博之、渡邊敬浩、時下祥子、荒川史博、小笠原健、峯岸恭孝、栗原秀夫、児玉貴志、古井聡、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.3)
- 28) 日本食品化学学会第11回総会・学術大会「遺伝子組換え食品検査におけるコンタミネーション予防策について-オートクレー

- ブ処理条件の検討-」渡邊敬浩、寺西清貴、武田明治、峯岸泰孝、古井聡、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.4)
- 29)日本食品化学学会第11回総会・学術大会「遺伝子組換えダイズの導入遺伝子の突然変異について」小笠原健、荒川史博、佐々木和生、梅津博紀、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄、合田幸広、豊田正武、鎌田博、近川幸恵、野崎亜佐美、伊藤佳央、小関良宏 (2005.4)
- 30)日本食品化学学会第11回総会・学術大会「プロファイリング技術の遺伝子組換え食品安全性評価への応用2. 非遺伝子組換えダイズのプロファイリング」佐々木和生、梅津博紀、山川隆、太田大策、小関良宏 (2005.4)
- 31)第 18 バイオメディカル分析科学シンポジウム「加工食品における DNA の分解と遺伝子組換え食品定量分析法の開発について」渡邊敬浩、菊地博之、穠山浩、米谷民雄 (2005.8)
- 32)The 119th AOAC INTERNATIONAL Annual Meeting 「Comparative Studies of Five Real-Time PCR Equipments on Quantitative Methods for Genetically Modified Maize and Soy」HIDEO KURIBARA, MASAKI KAKIHARA, TAKASHI KODAMA, TAKAHIRO WATANABE, HIROSHI AKIYAMA, TAMIO MAITANI, SATOSHI FUTO, SATOSHI FURUI, AKHIRO HINO (2005.9)
- 33)第 90 回日本食品衛生学会学術講演会「未承認遺伝子組換えトウモロコシ(Bt10 系統)を対象とした検知技術の開発」渡邊敬浩、時下祥子、菊地博之、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.10)
- 34)第 90 回日本食品衛生学会学術講演会「シリカベースレジソタイプキット法による遺伝子組換え大豆 DNA 抽出法に関する検討」大森清美、土屋久世、平山クニ、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄 (2005.10)
- 35)第 90 回日本食品衛生学会学術講演会「遺伝子組換えトウモロコシ 4 系統 (MON863, NK603, TC1507 及び T25)の定量分析法のコラボレーションスタディー」児玉貴志、栗原秀夫、松岡猛、青木信太郎、澤田千尋、布藤聡、峯岸泰孝、渡邊敬浩、穠山浩、米谷民雄、古井聡、日野明寛 (2005.10)
- 36)第 42 回全国衛生化学技術協議会年会「遺伝子組換えトウモロコシ(Mon810)定量検査法の外部精度管理について」渡邊敬浩、菊地博之、笠間菊子、鈴木達也、大島赴夫、日野明寛、穠山浩、米谷民雄 (2005.11)
- 37)日本農芸化学会 2006 年度大会「遺伝子組換え穀物検査のための迅速な DNA 抽出キットの開発」黒澤康紀、谷中有香、峯岸恭孝、栗原秀夫、穠山浩、米谷民雄、金山晋治、古井聡、日野明寛 (2006.3)

平成15-17年度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）
「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」
分担研究報告書

新規タンパク質のアレルギー性評価に関する調査研究
分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部室長

研究要旨 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 - 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種を掲載した。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) を掲載した。(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ンチン混合液を用い、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は、新たに99検体の食物アレルギー患者血清を用いて、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 Cup1抗原の交差反応性を抗Cup1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。

協力研究者
澤田純一、中島治、中村亮介 (国立医薬品
食品衛生研究所)

美宅成樹 (名古屋大学工学部)
宇理須厚雄 (藤田学園大学坂文種報徳会病
院)

河野陽一（千葉大学医学部）
金澤由基子（食品薬品安全センター泰野研究所）

A. 研究目的

世界的に遺伝子組換え技術を利用して開発された農作物の実用化が進んでおり、我が国でも、ダイズ、トウモロコシ等の遺伝子組換え食品並びに、それらを原料とする加工食品が流通するようになってきているが、導入された組換えタンパク質が、アレルギー誘起性を持つか否かの検討を行うことは、安全性評価のうえでの重要な判断基準となる。安全性評価の国際的動向としては、1999年から2003年にかけて、コーデックス(Codex)食品規格委員会(国連食糧農業機関(FAO)と世界保健機関(WHO)合同設立国際政府間組織)では、バイオ食品特別部会が設置され、バイオ食品について必要な基準、指針あるいは勧告を策定することとなり、2002年3月に横浜で開催された第3回特別部会で採択された「組換えDNA植物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン案」はステップ8に、進められ、この中で、アレルギー誘発性の評価も付属文書として添付され議論されている。主な評価項目は、(1)新規産生タンパク質と、既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較、(2)新規産生タンパク質の消化性(特にペプシン抵抗性)並びに物理化学的処理に対する安定性の検討、(3)特異的アレルギー患者血清または標的的患者血清を用いる新規産生タンパク質に対するIgE抗体の存在の有無のスクリーニングがあげられ、検討項目として、動物モデルの使用の推奨等が述べられている。このガイドライン案は、平成15年7月にローマで開催されたCodex総会で、遺伝子組換え食品の安全性評価のガイドライン(ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/al03_34e.pdf)として採択されている。組換え食品及び食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになり、食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植)の安全性評価基準が平成16年1月に作定された。

本分担研究では、アレルゲン性の評価方法の一層の検討・開発等を目的として、

(1)アレルゲン予測の解析法の検討、(2)動物を用いるアレルゲン性の検討、(3)新規

産生タンパク質及び食物アレルゲンの人工胃腸液による分解性の検討、(4)患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討の4点を取りあげ、研究を進めている。

B. 研究方法

(1)アレルゲン予測の解析法

(i)既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討-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

遺伝子組み換え技術により導入された新規導入タンパク質のアレルゲン性を、バイオインフォマティクスの手法を用いて、高精度に予測することを可能にすることを目的として、以下、アレルゲンに特徴的な部分配列を予測するための方法を検討した。本研究では色々な質のデータを利用することを考え、エピトープがわかっているアレルゲン(57)、エピトープは分かっていないアレルゲン(663)、非アレルゲン(539)、さらに立体構造が分かっているアレルゲンとして杉花粉のアレルゲン(Jun a 3, PDB:1KUR)を用いた。アミノ酸配列の類似性が高いタンパク質ペアは立体構造的にも機能的にも似ているということが分かっているため、そのような類似タンパク質を多く含むデータセットを用いると、偏った規則性が導かれる可能性が高い。従って、エピトープの分かっていないデータに関しては類似性30%以上のデータに対しては、代表的な配列を一つだけデータセットに採用するようにした。

第1の方法は、エピトープの分かっていない大量のデータの解析は、エピトープの推定をしなければならないので、アレルゲンと非アレルゲンのアミノ酸配列の比較により、排他的な配列のデータセットを作った。そして、アミノ酸配列の中でのアレルゲンの排他的な断片配列と、非アレルゲンの排他的な断片配列の割合を計算し、その比を指標としたときに判別が可能かどうかを検討した。

第2の方法は、さらに排他的なアミノ酸断片における物性の分布を統計的に検討した。グリシン、システイン、リジン、メチオニンの分布である。横軸は、排他的配列の中心の付近における配列位置である。グリシンやリジンが多く見られる一方で、シ

ステインやメチオニンは少ないことが分かる。また、ピークの両脇には谷が、谷の両脇にはピークがあることが分かる。いずれにしてもエピトープに特徴的なアミノ酸の分布が存在しているらしいということが示されたのである。そこでこのエピトープの候補に特徴的なアミノ酸のプロペンシティを利用して、アレルゲンエピトープらしい配列を濃縮する。

第3の方法は、アレルゲンの立体構造については、非常に大きな情報を含んでいるので、そのアミノ酸配列を詳細に検討した。物性を粗視化(7残基の平均)してアミノ酸配列に対するプロットを計算した。アミノ酸配列に対する疎水性インデックス、電荷の粗視化プロットと、二次構造ブレーカーの位置を調べると、エピトープ領域の中心付近にはブレーカーが存在していることが明確に分かった。さらに、5残基の配列でヒトゲノムからのアミノ酸配列に存在しない部分の解析も行なった。これらの物性のプロットに関して、電荷の分布やブレーカーの位置など特徴を捕まえ、予測の試みを行った。

(ii) 新規統合型アレルゲンデータベース (Allergen Database for Food Safety; ADFS) の構築について

データは原則としてすべて2005年7月の時点で収集・解析した。なお、エピトープ情報については、2005年9月現在のデータを入力した。ADFSではアレルゲンに関するデータはSDAP (Structural Database of Allergenic Proteins)、List of Allergens in Swiss-Prot、IUIS (Allergen Nomenclature)、BIFS (The Biotechnology Information for Food Safety Database)等既存データベースより収集している。これらについてはweb公開後、個々の既存データベースがアップデートされたのに伴って、本データベースも新しい情報を取り込む作業を行った。ADFSの特徴であるIgEエピトープ配列情報は既存データベースのうちSDAPにのみ掲載されているが、既知エピトープ配列との相同性検索ツールを充実したものとするためにはさらにエピトープ情報を拡充する必要があった。情報源は1次資料(論文)を集めて抽出する方法しかないためEntrez PubMedによる論文の検索、収集、査読を行った。

ADFS公開当初のデータはSDAPのエピトープデータ(2002年アップデート分まで)を利用し、それ以後2004年3月までに発表された論文のみCTC-LSで収集・査読し、エピトープ配列情報を拾い出す作業を行なった結果得られたものである。論文収集は、下記に示す11のキーワードによりEntrez PubMed内を検索し、エピトープ情報を含む文献を抽出するという方法を用い、22報分のデータをADFSに収載した。

その後、2度にわたり(2005年3月、2005年7月)、同様の方法で論文を検索し、合わせて15報分のデータを追加した。

今回さらに、立体的エピトープのマッピングデータの発表されているアレルゲンについてはADFSからそれらの論文へリンクできるようにする作業をおこなった。その過程で、配列型エピトープについてもかなり記載漏れが見つかり、立体的エピトープの論文と合わせて2002年以前の配列型エピトープデータについても収集・査読作業を行なった。立体的エピトープについては上記11のキーワードのうち1次配列を示す単語の代わりに **conformational or structural or discontinuous or three-dimensional** を用いた。ヒットした論文のPubMed IDを取り出し、重複および記載済みの情報を差し引くと、138報の論文が抽出され、それらの要旨、本文等を査読した。その結果、立体的エピトープの情報を取り込む論文17報、未収載の配列型エピトープ情報を追加する論文27報分のデータをADFSに収載することとし、アップデート作業を行った。現在、ADFSに収載されているアレルゲン数は1280であり、その内、配列型エピトープ情報の付加されているアレルゲン数は74である。

各アレルゲンのアノテーション情報(動物種・一般名・注釈等)はSDAP - Structural Database of Allergenic Proteinから収集し、同サイトが提供する「Source」属性を、8種のカテゴリ(花粉・ダニ・動物・カビ・昆虫・食物・ラテックス・その他)に再編成した。

データベースの作成には、Solaris9プラットフォームにおいてMySQL(Ver. 4.0)を用いた。アミノ酸配列に基づくアレルゲンタンパク質の検索(Protein Search)にはprotein-protein BLAST(blatp; Ver. 2.2.10)を、エピトープ配列内の検索(Epitope Search)にはBLAST

Search for short, nearly exact matches を用いた。FAO/WHO が提唱するタンパク質のアレルゲン性予測法は、Hileman らの方法を一部改変したものを用いた。すなわち、FASTA アラインメントプログラム(Ver. 33t08d4)によりクエリ(問い合わせ)タンパク質の全長を既知アレルゲンと比較し、結果アラインメント中の overlap アミノ酸長(およびその一致率)と連続一致アミノ酸長をそれぞれ異なる閾値で判定するというものである。Stadler らの motif based 法では、既知のアレルゲン配列から MEME を用いてモチーフを抽出し、プロファイルを作成する。抽出されたプロファイルに適合しないアレルゲンについてはシーケンスとして別に抽出する。そのプロファイルとシーケンスをもとに、未知アミノ酸配列に関してアレルゲン性を予測する方法である。Stadler らの発表当時(2003年)には、52のモチーフと135のシーケンスが抽出されており、精度95.5%でクエリ蛋白質がアレルゲンであることを予測できるとされた。既知アレルゲンが追加されているため、この数は変動し、本研究では2005年9月で、67のモチーフと214のシーケンスが得られている

(2) 食物アレルギー動物モデルの開発

(i) BALB/cマウスの経口感作、経口惹起の条件検討

実験には7週齢の雌性 BALB/c マウスを用いた。

(実験 1: 感作条件の検討) OVA を溶解する溶媒について検討した。OVA を 1 mg/匹の割合で 5 回/週、3 週間経口投与して感作した。感作には、生理食塩液溶媒対照群(S)、生理食塩液を媒体とした OVA 群(OVA/S)、生理食塩液とリノール酸/レシチン(4:1)混合液溶媒対照群(LL)、LL を溶媒とした OVA 群(OVA/LL)を設定した。また、OVA/LL 群の一部には、2 回/週の頻度で SA(0.2 mg/匹)を腹腔内投与した群を設定した(SA/OVA/LL)。

(実験 1-1) 感作投与開始の 3 週間後に各群 6 匹について血清中の抗 OVA IgG1 抗体価を測定した。また、各群 17~20 匹について、それぞれの群の感作時と同様の媒体を用いて調製した OVA を 100 mg/匹の割合で経口投与して全身性アナフィラキシー症状の観察を行い、そのうちの各群 6 匹について血漿中ヒスタミン濃度を測定した。全身性アナフィラキシー症状は、無症状を 0、立毛や鼻こすりを 1、吐き気を

2、努力呼吸やチアノーゼ、下痢を 3、痙攣、死亡(24 時間以内)を 4 としてスコアをつけて、発症の頻度と強度を評価した。

(実験 1-2) 前日に OVA の経口投与によって感作の成立を確認した動物を用いて、以下の実験を行った。LL 群、OVA/LL 群、SA/OVA/LL 群の各群の 6 匹を経口、他の 6 匹を静脈内投与により再惹起して全身性アナフィラキシー症状の観察および血漿中ヒスタミン濃度の測定を行った。再惹起を行わなかった動物を対照に再惹起した各群の動物の消化管の変化を肉眼的および組織学的検索により調べた。

(実験 1-3) 試験条件として、惹起時の溶媒(卵黄レシチンと大豆レシチン)、感作開始時週齢(3 週齢と 7 週齢)、感作期間延長の影響(3 週間と 4 週間)の反応性を検討した。

(実験 2: 種々の蛋白質の反応性の検討) 感作には、溶媒対照群(LL)、LL を溶媒とした OVA 群(OVA/LL)、 β -ラクトグロブリン(LG)群(LG/LL)およびウシ血清アルブミン(BSA)群(BSA/LL)を設定した。各抗原 1 mg/匹を、LL を溶媒として、5 回/週の頻度で経口投与して感作した。また、感作投与群、溶媒対照群とも 2 回/週の頻度で SA(0.2 mg/匹)を腹腔内投与した。

(実験 2-1) 惹起は各抗原を 100 mg/匹の割合で経口投与して行い、アナフィラキシー症状の有無の観察および血清中の特異抗体価を指標としてアレルギーの成立を確認した。また、一部の動物については、惹起 1 週間後に採取した脾臓のリンパ球を培養し、IFN- γ および IL-4 の産生を調べ、Th1/Th2 バランスについて検討した。

(実験 2-2) 感作にはペプシン(PEP)を、溶媒には[リノール酸/大豆レシチン(4:1)混合液]を用いた。低用量群では、1匹あたり 0.4 mg、高用量群では 1 mg をそれぞれ生理食塩液とリノール酸/レシチン(4:1)との等量混合液を溶媒として、5 回/週の頻度で経口投与して感作した。いずれも 2 回/週の頻度で SA を 0.2 mg/匹の割合で腹腔内に(高用量群)あるいは 0.3 mg/匹の割合で経口投与(低用量群)した。惹起では 4 mg/匹(0.4 mg 経口感作、SA 経口投与群)、100 mg/匹(1 mg 経口感作、SA 腹腔内投与群)の抗原を経口投与し、アナフィラキシー症状を指標としてアレルギーの成立を確認した。

(実験 3: 抗原蛋白質の腸管透過性の検討) 感

作には、生理食塩液を媒体とした OVA 群 (OVA/S)、LL を媒体とした OVA 群(OVA/LL)、SA を併用した OVA/S 群(SA/OVA/S)および OVA/LL 群(SA/OVA/LL)を設定した。いずれの群も OVA 1 mg/匹を 2 回/週の頻度で経口投与し、SA 併用群には加えて SA (0.3 mg/匹)を 2 回/週の頻度で経口投与して 3 週間感作した。初回感作および 2.5 週目の感作後 30 分に血液を採取し、血清中の OVA 濃度を測定した。感作 3 週間後に感作と同じ溶媒を用いて OVA 40 mg/匹の割合で大量経口投与して惹起し、アナフィラキシー症状の有無の観察を指標としてアレルギーの成立を確認した。さらに 1 回目の惹起の 2 週間後に、無処置 (Naive) を加えた全ての群に、生理食塩液を媒体として OVA を 40 mg/匹の割合で経口投与し、2 回目の経口惹起を行った。投与 30 分後に血液を採取して血清中の OVA 濃度を測定すると共に、腸管の一部を採取して残存する総 IgA および IgG1 抗体量を ELISA で測定した。

(実験 4: OVA と PEP の反応性の差異の検討) 実験には OVA を抗原とした SA/OVA/LL および PEP を抗原とした SA/PEP/LL を設定し、実験 3 と同じ条件で感作し、3 週間後に惹起してアレルギーの成立を確認した。また、実験 3 と同様に、抗原投与時の蛋白質の血清中への移行や腸管の残存抗体量を調べた。加えて、2 回目の惹起時およびその 1 週間後に非惹起感作動物から採取したパイエル板のリンパ球を培養し、IgA および IgG1 濃度、IFN- γ 、IL-12、IL-10 および IL-4 の産生を調べた。

(ii) 各種マウスにおける Ovomuroid-W/O emulsion 経口投与による影響

これまでの研究から、BALB/c、B10A、NC/Nga、WBB6F1-W/W^v (以下 W/W^v) マウス等にモデル抗原として卵白アルブミン (OVA) 0.1 もしくは 1.0 mg を 9 週間連日経口投与したところ、アジュバントを用いることなく抗原感作が成立し、能動的全身性アナフィラキシー (ASA) を誘導することが分かっている。特に c-kit 遺伝子に突然変異を持つ W/W^v マウス (マスト細胞欠損マウス) は他のマウス種に比べ非常に高い抗原特異的 IgG1 抗体価を示すことから、食物アレルギー動物モデルとして有用だと考えられた。そこで、W/W^v マウスが経口感作動物モデルとして有用かどうかのさらなる確認をするため、OVA 以外の他の食物抗原 (Ovomuroid (OVM) 及び β -lactoglobulin

(β -lac)) を用いて経口投与を行い、感作の程度について調べたところ、OVM 投与群では OVA や β -lac 投与群に見られたような大きな抗原特異的抗体価の上昇が見られなかった。これまでマウスに食物抗原を経口投与する際、生理食塩水に溶解したものを与えていたが、食品に通常相当量含まれる油脂に着目し、W/W^v マウス及び BALB/c マウスに OVM と油脂の emulsion の経口投与を行い、感作の程度について調べた。

まず、タンパク質と混合する油脂として、長鎖脂肪酸を多く含む大豆油 (soybean oil) と中鎖脂肪酸 (炭素数 8-10 の飽和脂肪酸) を多く含むヤシ油 (coconut oil) の 2 種類の油脂を選択した。W/W^v 及び BALB/c マウス (7 週令、雌) をそれぞれ 7 匹ずつ 6 群に分け、OVM-W/O emulsion (soybean または coconut oil) を 9 週間連日強制経口投与した。投与開始より 4 及び 9 週間後に眼底採血をして血清を採取し、ELISA 法を用いて血清中抗原特異的 IgG1、IgE、及び IgA 抗体価測定を行い感作の成立を確認した。9 週間後に抗原の腹腔内投与 (1 mg) により能動的全身性アナフィラキシー (ASA) を誘導し、体温測定、血清中ヒスタミン濃度を測定した。さらに脾臓を摘出し、OVM 共存下 37°C、72 時間培養し、培養上清中に含まれるサイトカイン (IL-4、IL-5、IL-10、IL-2、及び IFN- γ) 濃度を ELISA キットを用いて測定した。

(3) 新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討

人工胃液 (SGF) による食物アレルギーの分解性試験を更にすすめるために、分解後の断片と、患者血清中 IgE 抗体との反応性を検討する実験を取り入れた。具体的には、卵白中の主要なアレルギー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、分解によるアレルギー性の変化を検討した。SGF による分解に関しては、SGF 中の pepsin 濃度は、0.076% とし、pepsin と基質タンパク質の比率 3、0.3、0.03、基質濃度 250 μ g/ml、pH 2.0 で 0-60 分、37°C で培養し、分解の程度を SDS-PAGE (10-20% Tricine gel 使用) 後の蛋白染色にて確認した。患者血清との反応性を検討するために、SDS-PAGE でタンパク質を分離後、ニトロセルロース膜に電氣的に転写し、酵

素標識抗ヒトIgE抗体を反応させ、次いで基質を加え、基質の発色から、抗原に特異的に反応するIgE抗体の有無を検討した。

(4) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

食物アレルギー患者血清中の新規産生タンパク質(CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9C またはPAT(phosphinothrin acetyltransferase))に対するIgE抗体の存在の有無をELISA法、ウェスタンブロット法にて検討した。具体的には、CP4-EPSPS抗原としては、CP4-EPSPS遺伝子を組み込んだ大腸菌の培養上清を、Cry1Ab抗原としては、Btk菌から、結晶毒素として単離したもの、または、Bt11トウモロコシに導入されているCry1Ab遺伝子を増幅させて、大腸菌に組み込んでから精製したものを、Cry9C, PAT抗原としては、Aventis社より供与された精製品を用いた。ELISA法は、抗原を結合させた96穴プレートに種々の食物アレルギー患者血清と反応させ、酵素標識抗ヒトIgE抗体を反応させ、次いで基質を加え、基質の発色から、抗原に特異的に反応するIgE抗体の有無を検討した。

C. 研究結果および考察

(1) アレルゲン予測の解析法

(i) 既知のアレルゲンとの相同性の比較方法の検討

大量のアレルゲンと非アレルゲンのデータに対して、排他的な配列のペアがどのくらいの割合でアミノ酸配列をカバーしているかという値を計算した。その指標をアレルゲンと非アレルゲンで2次元プロットとした。指標の値は閾値によるが非アレルゲン側の排他的配列の方が大きなカバー率を示していることが分かる。しかし、少ないアレルゲン側が大きなカバー率を示しているタンパク質がある。その中には実際にアレルゲンが濃縮されていることが分かった。アミノ酸のプロペンシティを用いて、エピトープらしさのスコアを作り、すべての排他的な配列に対してスコアを求めたところ、スコアの高い配列ではエピトープらしいということが期待された。つまり、これによってエピトープの高精度予測までには到っていないが、その割合を高めることはできていると考えられる。別の方法と併用することによって、さらにエピトープ予測を向上させる可能性が示された。

そこでこのプロペンシティからさらに各種の物性量の分布を求め、エピトープと抗体の結合の特徴を調べた。そのために、各種物性量のプロファイルを計算した。スコアの高いアミノ酸配列の断片を中心4残基、両端6残基の2領域ずつの物性の平均値を計算した。物性としては、疎水性、両親媒性インデックス A'-index、A''-index、電荷、プロリン・グリシンの数、セリン・スレオニンの数、芳香族残基の数をを用いた。これに近い物性分布を持つアミノ酸断片は抗体と結合しやすいと考え、主成分分析を行った。

このようなアミノ酸配列の物性を基づいたエピトープ探索の試みははじめてのものであり、どのくらいの精度で予測可能かは今後の研究に待たねばならない。しかし、ここまでの研究ではっきりしたことは、エピトープとなる断片には、物理的な性質としてもかなりはっきりした特徴があるらしいということである。しかも、それは一つの物性量で特徴付けられるようなものではなく、いくつかの物性量の組み合わせとしてエピトープ-抗体結合が起こっていることを示している。今後の研究の方向としては、エピトープが分かっている断片が実際にこの方法でも高いスコアを与えるか、予測システムとして用いたとき、どのくらいの精度を与えるか、非アレルゲンでもエピトープ様の配列は存在するが、それはアレルゲンのエピトープと物性量によって判別可能かというようなことを明らかにしなければならないと考えている。立体構造が分かっているアレルゲンについて構造的特徴とエピトープの関係についても、検討すべきことがいくつかある。エピトープは実際にタンパク質の外側に位置しているが、それは二次構造ブレイカーとの相関が高い。これもスクリーニングの因子として用いることができると考えられる。本研究によって、様々な物性を中心としたアレルゲンエピトープの特徴を抽出することができた。今後それらを組み合わせて、より精度の高いアレルゲン予測を追求していくことができると期待される。

(ii) アレルゲンデータベース(ADFS)の構築について

ADFS (<http://allergen.nihs.go.jp/> ADFS/)ではアレルゲンに関するデータは SDAP、

・List of Allergens in Swiss-Prot、IUIS、BIFS 等既存データベースより収集している。これらについては web 公開(2005 年 4 月)後、個々の既存データベースがアップデートされたのに伴って、本データベースも新しい情報を取り込む作業を行った。アレルギーデータは、2005 年 7 月の時点で収集し、データベース間で重複しているエントリをまとめ、最終的に 1,286 個 (アミノ酸配列数にして 1,019 本) のアレルギーデータを収集した。また、今回、エピトープ情報として、立体的(conformational)エピトープの情報を取り込む論文 17 報、未収載の配列型 (linear) エピトープ情報を追加する論文 27 報分のデータを ADFS に収載することとし、何らかのエピトープ情報の付加されているアレルギー数は 74 となった。これは、我々が知る限り世界でも最大のエピトープデータベースである。なお、この中には、私共が spot assay 法を用いてエピトープ解析を行なった日本スギアレルゲン Cry j 1 の linear epitope も掲載されている。また、立体構造が分かっているアレルギーは 110 種存在した。これらエピトープおよび立体構造が分かっているアレルギーの情報は、ADFS の Keyword Search より知ることができるように検索機能を持たせている。

さらに、今回、アレルギー性予測法の機能として、Hileman らの方法の改良法による FAO/WHO 法に加え、新たに、Stadler らの motif-based 法⁸⁾も導入した。一般にモチーフ検索はペアワイズ検索より検出感度や精度が高いことが知られているが、この原理に着目し、多くのアレルギーに共通なモチーフを抽出し、これにより相同性検索を行なうのが、Stadler らによる Motif-based 法である。既知のアレルギー配列から MEME を用いてモチーフを抽出し、プロファイルを作成する。抽出されたプロファイルに適合しないアレルギーについてはシーケンスとして別に抽出する。そのプロファイルとシーケンスをもとに、未知アミノ酸配列に関してアレルギー性を予測する方法である。Stadler らの発表当時 (2003 年) には、52 のモチーフと 135 のシーケンスが抽出されており、精度 95.5% でクエリ蛋白質がアレルギーであることを予測できるとされた。既知アレルギーが追加されているため、この数は変動し、ADFS では 2005 年 9 月で、

1,019 のアレルギーアミノ酸配列より 67 のモチーフと 214 のシーケンスが得られている。

2006 年 2 月のデータのアップデートと Motif-based 予測インターフェイスの確立により、ADFS は世界でも最も洗練されたアレルギーデータベースの一つとなったと思われる。今後とも、定期的なデータのアップデートが必要であると思われる。

(2) 動物を用いるアレルギー性の検討

(i) BALB/c マウスの経口感作、経口惹起の条件検討

(実験 1-1) 3 週間の感作投与後に S 群、OVA/S 群、LL 群では全く抗 OVA 抗体価が認められなかったのに対し、OVA/LL 群 (12 ± 49) および SA/OVA/LL 群 (47 ± 39, $p < 0.05$ vs. LL 群) において抗 OVA 抗体価の上昇が認められた。経口惹起を行った結果、OVA/S 群や OVA/LL 群では弱い全身性アナフィラキシー症状である鼻こすりや立毛が認められ、SA/OVA/LL 群では明らかに強いアナフィラキシー症状であるチアノーゼや努力呼吸が認められ、そのうち 1 例が死亡した。経口惹起 30 分後に OVA/LL 群および SA/OVA/LL 群で血漿中ヒスタミン濃度の高い個体が認められた。

(実験 1-2) 感作の成立した動物を用いて異なる 2 経路で惹起した結果、静脈内惹起に比べ、経口惹起の方が症状の頻度および強度とも高かった。血漿中ヒスタミン濃度も経口惹起の方が高い傾向にあった。消化管の変化を調べた結果、肉眼的観察では、血管の明瞭化、腔の拡張といった所見が認められた。病理学的観察では、絨毛の短縮、粘膜固有層における形質細胞やリンパ球の増加、毛細血管の拡張が認められたがいずれも軽度であった。惹起をしなかった動物では認められなかった。

(実験 1-3) 惹起時の溶媒について感作投与時と同一溶媒(卵黄レシチン)、感作投与時とレシチンの種類を変えた溶媒(大豆レシチン)および生理食塩液を比較したところ、いずれの溶媒でも惹起が可能であった。感作と惹起でレシチンの種類を変えた場合、対照群の反応を抑制し、かつ被験物質の反応性は維持されることが確認され、レシチンの種類を変えることによって、相対的に反応性が高くなることが示された。感作開始時週齢について 3 週齢と 7 週齢を比較したところ、いずれの週齢でも感作を成立させることが可能であったが、7 週齢の方が全身性アナフィラキシー症状および抗

OVA IgG1 抗体価ともに高値を示した。3 週齢の動物にさらに1週間感作を続けた場合、7 週齢でみられた反応と同等の反応が認められた。感作期間を 4 週間に延長したところ、3 週間に比べてアナフィラキシー症状は強くなる傾向が認められ、特に症状の強かった BSA 群では血清中に特異的 IgG1 抗体に加えて特異的 IgE 抗体が認められた。

(実験 2-1) LG および BSA について惹起時のアナフィラキシー症状の頻度や強弱および抗体価を OVA と比較した結果、いずれも OVA より高い反応性が得られた。また、LG と BSA を比較すると、BSA の方が反応性の高い傾向が認められた。惹起 1 週間後に採取した脾臓のリンパ球では、培養液中への抗原の添加によって IFN- γ の産生は減少し、IL-4 の産生は増加する傾向にあり、Tリンパ球の Th1/Th2 バランスが Th2 優位に傾いていることが示された。

(実験 2-2) 3 週間の感作終了後に大量に被験物質を経口投与した場合、低用量感作群では、媒体対照群と PEP 感作群でアナフィラキシー症状がほとんど認められなかったのに対し、OVA 感作群では弱いアナフィラキシー症状が過半数で観察された。高用量投与群では、溶媒対照群と OVA 感作群でいずれも明らかなアナフィラキシー症状が認められた。PEP 感作群では低用量、高用量のどちらの感作群でも、繰り返し惹起を行ってもアナフィラキシー症状はほとんど認められなかった。

(実験 3) 感作前の動物および感作がほぼ成立している感作開始後 2.5 週の時期に、感作と同じ媒体を用いて OVA 1mg を経口投与して血清中に移行した OVA 濃度を測定した結果、感作前および感作後ともいずれの群間にも有意な差は認められなかった。なお、感作 3 週間後の惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、OVA/S 0.33、SA/OVA/S 0.83 に対し OVA/LL 4.83、および SA/OVA/LL 6.17 であり、OVA/LL および SA/OVA/LL で高く、これら 2 群で感作が成立していることを確認した。

(実験 4) 感作前後の動物に抗原 1mg を経口投与して血清中抗原濃度を測定した結果、感作前および感作後とも OVA および PEP の間に差は認められなかった。なお、感作 3 週間後に惹起におけるアナフィラキシー症状のスコア平均は、SA/OVA/LL 6.17、および SA/PEP/LL 2.00 であり、SA/OVA/LL で感作が成立していることを確認した。

我々の開発した食物アレルギーモデルは、経口で感作し、経口で惹起することにより、人で認められる消化管を標的としたアレルギー反応と同様の反応を誘導するモデルである。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この系では、3 週間という短期間の投与により、特異的 IgG1 抗体の産生を誘導することが確認された。また、感作回数を増やすことで反応性が高まり、血清中の特異的 IgE 検出が可能となったことから、本試験系は、動物を用いたアレルゲン性の評価に有用であると考えられた。

(ii) 各種マウスにおける Ovomucoid-W/O emulsion 経口投与による影響

BALB/c マウスへの OVM-W/O emulsion の 9 週間連日経口投与により、それぞれの対照群に比べ血清中抗原特異的 IgG1 抗体価の上昇傾向が見られた (OVM-soybean oil では 4 匹/7 匹 (titer=4948 \pm 12249)、OVM-coconut oil では 5 匹/7 匹 (titer=10959 \pm 19347))。しかし、いずれも個体差が大きく有意差が出るまでには至らなかった。これに対し OVM 単独投与群では全く変化が見られていない (0 匹/6 匹) (<50)。また、抗原特異的 IgE 抗体価は OVM-coconut oil 投与群で一匹のみ顕著に上昇したが、他のマウスでは大きな変化が認められなかった。W/W^v マウスでは、IgG1 抗体価の有意な上昇が見られ (OVM-soybean oil では 6 匹/7 匹 (titer=18520 \pm 21124)、OVM-coconut oil では 7 匹/7 匹 (titer=14295 \pm 15794))、IgE 抗体価も上昇した (表 1)。これに対し OVM 単独投与群では全く変化が見られていない (0 匹/6 匹) (<50)。emulsion 感作群の抗体価を見ると、BALB/c マウスに比べ W/W^v マウスで顕著に上昇しており、W/W^v マウスの経口感作による高感受性を確認出来た。

脾臓細胞から産生されるサイトカイン濃度の測定において、BALB/c マウス、及び W/W^v マウスの emulsion 投与群で Th1、特に Th2 型サイトカインの濃度上昇が見られた。

以上のことから、抗原-油脂 emulsion の経口投与により、抗原単独では成し得なかった感作の成立がおこること、W/W^v マウスに比べ経口感作が難しい BALB/c マウスにおいても、抗原-油脂 emulsion であれば感作が成立することが分かった。

(3) 新規産生タンパク質の人工胃腸液に

よる分解性の検討

遺伝子組換え食品のアレルゲン性を評価する際には、挿入遺伝子産物のアレルゲン性および既知のアレルゲンとのアミノ酸配列の相同性、アレルギー患者血清中のIgEとの反応性などとともに、消化に対する抵抗性が重要な指標とされる。SGFによる分解で、どの程度の断片まで、IgE抗体能を有するのかもまた、重要な情報となる。今回は、卵白アレルゲンOVMをとりあげた。OVMは、図6に示すように、分解を受ける前は、34-49kDaの分子量を示すが、SGFによる分解により、Fr.1 (23.5-28.5kDa)が生成し、次いで、Fr.2 (10kDa)、Fr.3 (7kDa)、Fr.4 (4.5kDa)が生成される。卵白患者血清24名分を用いて血清と、OVM抗原並びにその分解物との反応をウェスタンブロットで解析したが、患者血清の中には、低分子の断片(Fr.3やFr.4)と反応するケースもみられた。低分子の断片に反応するIgE抗体を有する患者の場合、寛解しにくい傾向を有しており、人工胃液による分解性からアレルゲン性を評価する場合、断片の抗原性も考慮に入れた評価を行うことも必要であると思われた。

(4) 患者血清と、新規産生タンパク質との反応性の検討

遺伝子組換え食品のアレルゲン性を予知する上で、患者血清との交差反応性は重要なファクターである。我々は2001-2004年に国内で採取された99名の食物アレルギー患者血清を用いて、新規蛋白質との反応性の調査を行った。最初に新規蛋白質(CP4-EPSPS, Cry1Ab, Cry9c, PAT)を固相とするELISA法を行い、陽性が疑われるものについて、血清と反応させ、ウサギ抗ヒトIgE抗体、酵素標識抗ウサギ抗体を順に反応させ、ウェスタンブロット法にて確認を行った。

今回用いた血清は、いずれもELISA法で陰性(正常者の平均値+5SDを超える吸光度を示さない)との結果が得られた。

D. 結論

(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—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)の更新を行なった。ADFSでは、独自に調査した結果も含めエピトープ既知のアレルゲン74種を搭載し、任意のアミノ酸配列のADFS内アレルゲン並びにエピトープの検索を可能とする機能をもたせた。また、アレルゲン予測手法として、FAO/WHO法に加え、Motif-base手法も導入した。

(2) 動物を用いるアレルゲン性の検討

では、BALB/cマウスを用いる経口感作の方法について検討を行い、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、油脂とのemulsionでも感作能のあがることが、示された。

(3) 新規産生タンパク質の人工胃腸液による分解性の検討

オボムコイド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、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)患者血清を用いる研究では、国内食物アレルギー患者血清99種について、除草剤グリホサート抵抗性タンパク質(CP4-EPSPS)、グリホシネート抵抗性タンパク質(PAT)及び害虫抵抗性(Cry1Ab, Cry9c)タンパク質に対するIgE抗体の有無の検討を、ELISA法及びウェスタンブロット法で検討したが、陽性の血清はみられなかった。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) Takagi K., Teshima R., Okunuki H. and Sawada J. : Preheating increases the *in vitro* digestibility of several food allergens. Biol. Pharm. Bull, 26(7), 969-973 (2003)
- 2) Okunuki H., Akiyama H., Teshima R., Hino A., Goda, Y. and Sawada J., Toyoda M. and Maitani T., Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvyl shikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS. J. Food Hygienic. Soc. Japan, 44(2), 77-82 (2003).
- 3) Takagi K., Nakamura R., Teshima R. and Sawada J. Application of human FcεRI

- α -chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE. *Biol. Pharm. Bull.*, 26 (2), 252-255 (2003).
- 4) Okunuki H, Teshima R, Harikai N, Sakai S, Akiyama H, Maitani T, Sawada J. Oral sensitization of W/W^v mice with Ovalbumin and possible involvement of the decrease in γ delta-T cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(9), 1260-1265 (2003)
- 5) 手島玲子、食物アレルギーの実験モデルとアレルギー性評価. *ImmunoTox Letter* 8(2), 9-10 (2003)
- 6) 新藤智子、金澤由基子、斎藤義明、白見憲司、小島幸一、手島玲子、経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル. *ImmunoTox Letter* 8(2) 14-16 (2003)
- 7) Takagi K., R. Teshima, H Okunuki et al. Kinetic Analysis of Pepsin Digestion of Chicken Egg White Ovomuroid and Allergenic Potential of Pepsin Fragments. *Int. Arch Allergy Immunol.* 136,23-32, 2005
- 8). Thomas K., Teshima, R. et al, A Multi-Laboratory Evaluation of a Common *In Vitro* Pepsin Digestion Assay Protocol Used in Assessing the Safety of Novel Proteins. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 39, 87-98 (2004)
- 9) 手島玲子、奥貫晴代、食物アレルギーの動物モデル アレルギーの臨床 319(7), 29-33 (2004)
- 10) 手島玲子、組換え DNA 食品の安全性 食品衛生研究 54(6), 11-16 (2004)
- 11) 澤田純一、手島玲子、遺伝子組換え食品と食の安全 医学のあゆみ 211(8), 805-808 (2004)
- 12) Okunuki H, Teshima R, Sato Y, Nakamura R, Akiyama H, Maitani T and Sawada J, The hyperresponsiveness of W/W^v mice to oral sensitization is associated with a decrease in TCR γ δ -T cells. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 584-590, 2005
- 13) Takagi K., Teshima R., Sawada J., Determination of Human Linear IgE Epitopes of Japanese Cedar Allergen Cry j 1: *Biol. Pharm. Bull.*, 28(8) 1496-1499 (2005)
- 14). Takagi K., Teshima R., Nakajima O., Okunuki H., Sawada J., Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 44, 182-188 (2006)
- 15). Nakamura R., Teshima R. Takagi K. and Sawada, J. Development of allergen database for food safety (ADFS): as integrated database to search allergens and predict allergenicity. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* 123, 32-36 (2005)
- 16). 手島玲子、長尾拓：バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する基本的考え方. *応用薬理* 69, 43-46 (2005)
- 17) 手島玲子、澤田純一：遺伝子組換え作物の食品としての安全性、遺伝、60, 41-45 (2006)
- 18) Teshima R, Okunuki H, Sato Y, Akiyama H., Maitani T. and Sawada J. Effect of Oral Administration of CpG ODN-OVA on WBB6F1-W/W^v Mice *Allergol. International* 55: 43-48 (2006)

2. 学会発表

- 1) 第10回免疫毒性学会学術大会「食物アレルギーの実験モデルとアレルギー性評価」手島玲子 (2003.9)
- 2) 第10回免疫毒性学会学術大会「経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(1)」金澤由基子、新藤智子、斎藤義明、白見憲司、小島幸一、手島玲子 (2003.9)
- 3) 第10回免疫毒性学会学術大会「経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(2)」新藤智子、金澤由基子、斎藤義明、白見憲司、小島幸一、手島玲子 (2003.9)
- 4) 第53回日本アレルギー学会総会「W/W^v マウスにおける OVA 経口感作による ASA 誘導と γ δ -T 細胞について」手島玲子、奥貫晴代、澤田純一 (2003.11)
- 5) 日本薬学会第123年会「W/W^v マウスにおける OVA 経口感作による ASA 誘導と γ δ -T 細胞の減少」奥貫晴代、手島玲子、張替直輝、酒井信夫、穂山浩、米谷民雄、澤田純一 (2003.3)
- 6) 日本薬学会第124年会「組換え食品中の新規蛋白質と患者血清の反応性評価法に関する研究」高木加代子、奥貫晴代、手島玲子、澤田純一 (2004.3)
- 7) 日本薬学会第124年会「W/W^v マウスにおける CpG oligodeoxynucleotide OVA 経口感作による影響」奥貫晴代、手島玲子、

- 佐藤雄嗣、澤田純一 (2003.3)
- 8)第76回日本生化学会大会「Digestive stability and allergenic potential of chicken egg white ovomucoid and their pepsin-fragment」高木加代子、手島玲子、奥貫晴代、伊藤さつき、川崎ナナ、川西徹、早川堯夫、澤田純一 (2003.10)
- 9) 第76回日本生化学会大会「Oral sensitization of W/W^v mice with ovalbumin and possible involvement of the decrease in TCR $\gamma\delta$ -T cells」奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、穂山浩、米谷民雄、澤田純一(2003.10)
- 10)日本食品衛生協会シンポジウムー食品の安全研究をめぐってー「組換えDNA食品の安全性」手島玲子(2004.1)
- 11) ILSI HESI/ILSI Japan タンパク質のアレルギー誘発性に関するワークショップ「人工胃液によるタンパク質の消化性ーILSI-HESIリングスタディーの結果ー」手島玲子 (2003. 9)
- 12) 第11回免疫毒性学会学術大会「経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(3)」新藤智子、金澤由基子、斎藤義明、臼見憲司、古谷真美、小島幸一、手島玲子 (2004.9)
- 13)第54回日本アレルギー学会総会「W/W^vマウスにおける CpG ODN-OVA 経口感作による影響について」手島玲子、奥貫晴代、澤田純一(2004.11)
- 14) 第77回日本生化学会大会「The effect of reconstitution with bone marrow cells on oral sensitization of W/W^v mice with ovalbumin」奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、穂山浩、米谷民雄、澤田純一(2004.10)
- 15) 日本薬学会第125年会「BALB/c マウスにおける CpG-ODN-OVA 経鼻投与の効果」奥貫晴代、手島玲子、佐藤雄嗣、穂山浩、米谷民雄、澤田純一 (2005.3)
- 16) 10th International Congress of Toxicology, In vitro digestive stability evaluation, Teshima R. (2004.7)
- 17) ILSI HESI International Bioinformatics Workshop, Improvement of ELISA method for antigen-specific IgE in human sera. Teshima R (2005. 2)
- 18) 児矢野聡、高木加代子、手島玲子、澤田純一：そば 16-kDa アレルゲンの組換えタンパク質の調製及びアレルギー患者血清との反応性について、日本薬学会第126年会 (2006. 3)
- 19)朝川直行、手島玲子、美宅成樹：物理化学的性質に注目したアレルゲンエピトープ候補の抽出法、第5回日本蛋白質科学会年会(2005.6)
- 20). 手島玲子、奥貫晴代、中村亮介、穂山浩、米谷民雄、澤田純一：W/W^v マウスの卵白アルブミン (OVA) 経口投与による AS A 誘導ならびに PAF の作用について、第6回 Pharmacology-Hematology シンポジウム (2005.7)
- 21). 新藤智子、金澤由基子、古谷真美、田面喜之、小島幸一、手島玲子：経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル(4)、第12回免疫毒性学会 (2005.9)
- 22). 中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：食物アレルゲンの予測とバイオインフォマティクスーアレルゲンデータベースの構築と利用ー、第12回免疫毒性学会 (2005.9)
- 23).手島玲子、長尾拓：バイオテクノロジー応用食品の安全性に関する基本的考え方、第8回食品薬学シンポジウム (2005.11)
- 24) 手島玲子：遺伝子組換え食品の活用とその問題点ーこれからの展望ー、第9回日本病態栄養学会年次学術集会(2006.1)
- 25) 中村 亮介、手島玲子、高木加代子、澤田純一：アレルゲンデータベース ADFS の構築、日本薬学会第126年会 (2006. 3)

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

分担研究者 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

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）を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。

研究協力者

小川 幸男、関田 清司、斎藤 実、松島 裕子、
高木 篤也、北嶋 聡、山本 雅也
(国立医薬品食品衛生研究所 毒性部)

トウモロコシ添加量が 24.5%の飼料が既に存在することから本実験の検体として選んだものである。

A. 研究目的

本試験は、遺伝子組換え農作物の安全性確保のため、ラットに遺伝子組替トウモロコシを 2 年間繰り返し経口投与し、生じ得る毒性あるいは発がん性についてのデータを収集することを目的とする。導入遺伝子産物の毒性は別途に評価済みであるが、ここでは国民の強い要望に応え、前年度までに実施された 90 日間反復投与毒性試験に引き続き、敢えて最終生産形態での試験を実施するものである。

遺伝子組換え農作物の実験の候補としてトウモロコシ、ダイズ、ジャガイモが挙げられたが、動物実験に際して、飼料成分としての含有量が最も高いトウモロコシを取り上げたものである。すなわち、ラット・マウス用飼料の材料としてジャガイモは使用されず、ダイズは脱脂ダイズとして添加量が通常 12%前後であるのに対し、

B. 研究方法

被験物質である遺伝子組換え(GM)トウモロコシ(MON810 Event: Pioneer 33P67 株)は、BT 菌の毒素遺伝子を組み込み、害虫である蛾の幼虫から植物を守ることを意図して作られた製品である。その対照として遺伝子非組換え(non-GM)トウモロコシ(Pioneer 33P66 株)を用いた。両者とも、アメリカ合衆国(イリノイ州)の同一地域内で、単一生産する 2 農家から購入した。トウモロコシの粗蛋白質量、粗脂質量、アミノ酸組成、脂肪酸組成などの成分に差は見られなかった。また、カビ毒の既知毒性成分の分析を飼料製造開始前、最終製造前および試験中間期に行った結果検出限界以下であることを確認した。non-GM トウモロコシ 2kg を抜き取り、更にその上中下 3 点から 100g ずつ取り出して粉末化し、その 1g を用いて遺伝子検査を行った。2 点からは検出されなかったが、1 点から

MON810 遺伝子が 0.35%検出(検出限界 0.1%)された。これはトウモロコシが風媒植物であるため、近隣 GM トウモロコシの花粉が低頻度ながら受粉した結果と思われた。陰性対照として、同一地域内で栽培された近縁株のトウモロコシを選択する以上、この程度の混入は避けがたいと考えられた。

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 GM に置きかえたものを最高用量群とした。改良 NIH Open Formula の飼料配合成分中の脱脂大豆(11.75%)およびグルテンミール(3.0%)は、遺伝子組換え大豆の成分の混入を排除できないため、これを小麦粉に置きかえた結果、小麦粉の混合比率は 32.87%から、47.62%となった。そのため、総蛋白質含有量は、3%ほど低下し、25%となったが、最低必要量の 12%を十分に上回っており、この低下は問題とならないと判断した。

飼料中のトウモロコシの総配合量を合計で 24.5%に保ちつつ、GM トウモロコシ含有率 24.5%を最高に、公比 3 により 8.2 および 2.8%を配合、non-GM をそれぞれ 0、16.3 および 21.7%加え、対照飼料には non-GM のみを 24.5%配合した。

この配合による飼料を用いて、F344/Ducrj (SPF)ラット雌雄の各群 60 匹に 2 年間投与する慢性毒性・発がん性併用試験を行った。

慢性毒性・発がん性併用試験は、体重と摂餌量を測定するとともに、1 年目に各群 10 匹、2 年の最終解剖時には生存する全動物を対象に、血液学、血清生化学的検査等を行った。組織臓器の標本作りがほぼ終了、病理組織学的検査を行いつつデータ集計を行う。

(倫理面への配慮)

当所内の動物実験倫理委員会が定めた規定に則り、動物に苦痛を与えないため、採血および屠殺処分に際しては麻酔を行うなど細心の注意を払っている。

C. 研究結果及び考察

上記組成による GM および non-GM トウモロコシ配合ラット用飼料を製造し、慢性毒性・発がん性併用試験を開始、動物への投与を終了した。

生存率は、最終的に雄の対照群で 91.8%、L 群で 86.0%、M 群で 78.0%、H 群で 82.3%、雌の対照群で 92.38%、L 群で 78.0%、M 群で 83.7%、H 群で 82.0%と、有意差はないが雄の M 群と雌の L 群でやや低い結果であった。背景データにおいて対照群の生存率の低いものは雄 74%、雌 76%を示しており、雄 M 群および雌 L 群における生存率の低下は、用量に関連していないことから投与による影響とは考えなかった。

体重は、雄の投与各群および雌の L・M 群は対照群との間に差はないが、雌 H 群の 4 週から 52 週(1 年目)および 104 週(2 年目)において対照群との間にわずかな差の低値が認められた。摂餌量は雄で大きな差は見られないが、雌では 2 年間の累積値で対照群 6531g/匹に対して、L 群 6482g/匹、M 群 6482g/匹、H 群 6237g/匹と H 群では摂餌量の若干の低下が体重増加抑制とともに見られた。

尿検査は、1 年目および 2 年目において、雌雄の各群に対照群との間に差はなかった。

血液学的検査は、1 年目において、雌の H 群の MCH および MCHC にわずかな差の高値が見られたが、赤血球系の指標におけるヘモグロビンの高値が反映されたもので、毒性学的に意義のあるものではなかった。2 年目では、雌雄ともに変化はなかった。

血清生化学的検査は、1 年目および 2 年目において、雌雄ともに変化はなかった。

剖検所見は、1 年目において、雄の対照群と M 群に片側性の精巣の浮腫および精巣上体の萎縮、雌の M と H 群の肝臓に黄白色斑、雌の対照群の腎臓に白色結節、雌の全群の卵巣に卵巣嚢腫、雌の子宮では L 群にのう胞、M 群に肥大、雌の対照群の下垂体に血腫、雌の L 群の甲状腺に肥大が認められた。2 年目(104 週)では、1

年目でみられた剖検所見項目に加え雄の精巢の変色斑および萎縮などの所見をはじめとする加齢に伴う剖検所見が認められている。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ているが、本検体による重大な毒性（発がん等）を示す所見は認められていない。

器官重量の1年目において、雄の各群に対照群との間に差は見られないが、雌では対照群に対してH群の脳、肝臓および脾臓の実重量に低値、M群の脾臓の実重量、LおよびM群の肝臓および脾臓の比重量にわずかな差の低値が見られた。しかし、H群の脳、肝臓および脾臓の実重量における低値は体重の低値によるもので比重量において差が無く体重の低値によるもので、雌LおよびM群の脾臓の比重量の低値(脾臓:0.22,0.21)は背景データにおける正常値(脾臓:0.19~0.21)程度であり、肝臓(4.70,4.61)は実重量の背景データにおける正常値(4.61~5.17)内であった。2年目では、雄H群の肝臓の実重量に高値、雌ではH群の体重に低値、脳と腎臓の比重量に高値が見られた。雄H群の肝臓の実重量(11.90g)は対照群(11.22g)に対して差はあるものの比重量では認められず(背景データ:15~16g(100~115週齢))、毒性学的に意義のあるものとは考えられなかった。雌H群の脳および腎臓比重量の高値は実重量に差が無く、体重の低値によるものである。

D. 結論

被験物質として遺伝子組換えトウモロコシ(MON810 Event: Pioneer 33P67株)、その対照としてきわめて近縁な株の遺伝子非組換えトウモロコシ(Pioneer 33P66株)を単一生産する同一地域内の農家から調達することができた。GM

および non-GM を飼料に添加することに対し、栄養学的に差がなく、カビ毒の既知毒成分は検出限界以下であり、non-GM への遺伝子混入も許容範囲以下で、2年間の長期試験を遂行するための根本的な飼料成分でもある材料としての確かな被験物質が得られた。

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、尿、血液学、血清生化学的検査あるいは器官重量など解析の終了したデータに毒性学的に意義のある変化は見られなかった。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。炎症性の微細な変化等に関する詳細な病理組織学的検査を追加し、もって、これを確認する。

遺伝子組換えトウモロコシそのものを用いた慢性毒性・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。従って、本試験の結果は、社会的に意義の大きいものである。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
Igimi, S. 他	Development of oral vaccines based on lactic acid bacteria.	Milk Science	52	185-187	2003
五十君 静信	乳酸菌を応用した感染症対策	獣医畜産新報	56	493-497	2003
五十君 静信	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	2003
Xin, KQ. 他	Immunogenicity and protective efficacy of orally administered recombinant <i>Lactococcus lactis</i> expressing surface-bound HIV Env.	Blood	102	223-228	2003
Ogasawara, T. 他	Fragmentation of DNAs of processed foods made from genetically modified soybeans.	Jpn. J. Food Chem.	10(2)	155-160	2003
Akiyama, H. 他	A Comparative study of real-time PCR method and ELISA method for detection of recombinant DNA from genetically modified Soybean as soybean grain and de-fatted soybean.	Jpn. J. Food Chem.	10(2)	73-77	2003
日野 明寛 他	遺伝子組換え農産物の最新検知技術	日本食品科学工学会誌	50(3)	107-114	2003
Matsushita, Y. 他	The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates in vitro the movement protein of Tomato mosaic virus.	J. General Virology	84	497-505	2003
Watanabe, T. 他	Laboratory-performance study of the notified methods to detect genetically modified maize (CBH351) and potato (NewLeaf Plus and NewLeaf Y).	J. Food Hygienic. Soc. Japan	44	281-288	2003
Okunuki, H. 他	Determination of Enzymatic Activity of 5-Enolpyruvyl shikimate-3-phosphate Synthase by LC/MS.	J. Food Hygienic. Soc. Japan	44(2)	77-82	2003
Okunuki, H. 他	Oral sensitization of W/W (V) mice with ovalbumin and possible involvement of the decrease in gammadelta-Tcells.	Biol. Pharm. Bull	26(9)	1260-1265	2003
新藤 智子 他	経口感作および経口惹起によるマウスの食物アレルギーモデル	ImmunoTox Letter	8(2)	14-16	2003
Takagi, K. 他	Comparative Study of in Vitro Digestibility of Food Proteins and Effect of Preheating on the Digestion	Biol. Pharm. Bull	26(7)	969-973	2003
Takagi, K. 他	Application of human FcεR1 α-chain-transfected RBL-2H3 cells for estimation of active serum IgE.	Biol. Pharm. Bull	26(2)	252-255	2003

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻、号	ページ	出版年
手島 玲子	食物アレルギーの実験モデルとアレルギー性評価	ImmunoTox Letter	8(2)	9-10	2003
Yamasaki, M. 他	Effect of anaerobic preculture on aerobic stress responses of <i>Campylobacter jejuni</i> .	Bioscience Microflora.	22	21-25	2003
Yamaguchi, H. 他	Two detection methods of genetically modified maize and the state of its import into Japan.	Food Control	14(3)	201-206	2003
五十君 静信 他	乳酸菌ベクターワクチン	獣医畜産新報	57(9)	748-752	2004
Cheun, Hl. 他	Protective immunity of SpaA-antigen producing <i>Lactococcus lactis</i> against <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> infection.	J Appl Microbiol.	96	1347-1353	2004
穂山 浩 他	食品衛生外部精度管理調査研究の概要(第1報) 遺伝子組換えトウモロコシ(CBH351)および遺伝子組換えジャガイモ(NewLeaf Plus and NewLeaf Y)の検知用試料の作製と調査成績について	食品衛生研究	54(4)	25-35	2004
Ogasawara, T. 他	Genomic DNA fragmentation of genetically modified corn during food processing.	Jpn. J. Food Chem.	11(2)	137-144	2004
Tashiro, K. 他	New qualitative detection methods of genetically modified potatoes.	Biol. Pharm. Bull.	43	301-305	2004
Watanabe, T. 他	New qualitative detection methods of genetically modified potatoes.	Biol. Pharm. Bull.	27	1333-1339	2004
澤田 純一 他	遺伝子組換え食品と食の安全	医学のあゆみ	211(8)	805-808	2004
手島 玲子 他	食物アレルギーの動物モデル	アレルギーの臨床	319(7)	29-33	2004
手島 玲子	組換えDNA食品の安全性	食品衛生研究	54(6)	11-16	2004
Thomas, K. 他	A Multi-Laboratory Evaluation of a Common In Vitro Pepsin Digestion Assay Protocol Used in Assessing the Safety of Novel Proteins.	Regulatory. Toxicol. Pharmacol.	39	87-98	2004
Wakui, C. 他	A Histochemical method using a substrate of β -glucuronidase for detection of genetically modified papaya.	J. Food Hygienic. Soc. Japan	45	19-24	2004
Yoshida, H. 他	Differences in chalconaringenin 2-O-glucoside content in the petals of carnations (<i>Dianthus caryophyllus</i>) bearing yellow flowers.	Scientia Horticulturae	99	175-186	2004