

中の GM トマト混入の調査を行った。

CaMVP35S検出用プライマー・プローブ

35S-F : 5' - GCC TCT GCC GAC AGT GGT -3'

35S-R : 5' - AAG ACG TGG TTG GAA CGT CTT
C -3'

35S-P : 5' -FAM-CAA AGA TGG ACC CCC ACC CAC
G-TAMRA-3'

市販のトマト加工品 55 検体を対象に実態調査を行ったところ、2 検体が擬陽性と判断された (Table1)。再度 DNA 抽出を行い再現性の確認を行ったところ、2 検体において再現性が確認された。以降、この 2 検体 (juice cocktail3, 4) に対して検討を行った。

CaMVP35S 擬陽性検体に対しカリフラワーモザイクウイルスターミネーター (CaMVT) 部位を標的とした PCR の結果、増幅が確認された (Fig. 1)。そこで、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 感染混入の可能性が考えられるため、CaMV 検出用のプライマー・プローブの設計を行った。

CaMV検出用プライマー・プローブ

CaMV p-t F : 5' - GCA AGA CCC TTC CTC TAT
ATA AGG AA -3'

CaMV p-t R : 5' - GGA ACT ACT CAC ACA TTA
TTA TGG AGA AA -3'

CaMV p-t P : 5' -FAM-TTC ATT TCA TTT GGA GAG
GAC ACG CTG A-TAMRA-3'

このリアルタイム PCR の結果、増幅が確認された (Fig. 2)。また、CaMVP35S および CaMV 検出のリアルタイム PCR の Ct 値の比較の結果、juice cocktail 3 は 34.01 ± 1.47 、 35.06 ± 1.19 で差は 0.75、juice cocktail 4 は 32.36 ± 1.17 、 33.87 ± 1.11 で差は 1.07 で、ほぼ同量のコピー数含まれていることが示唆された。

データベース開発では、各分担研究者によって集計したデータをもとに、GM 動物、GM 微生物、工業原料 GM、薬用 GM の表の統一を行い、ウェブ公開用のソフト開発を行った。4 データとも表記の統一および項目の統一を行い、「番号」、「区分」、「生物種」、「研究・開発国・機関」、「開発段階」、「遺伝子組換え法」、「導入遺伝子」、「生産物」、「生産物の種

類」、「機能・薬理・特徴・用途」、「ベクター、プロモーター」、「ターミネーター」、「マーカール」、「備考」、「参考資料 1」、「参考資料 2」、「参考資料 3」、「参考資料 4」、「参考資料 5」、「参考資料 6」、「分類」の 2 3 項目を設けた。

D. 考察

今回の実態調査で検出された CaMVP35S 擬陽性検体は、CaMVP35S と CaMV 検出用プライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR の Ct 値を比較し、ほぼ同量のコピー数含まれていることが確認されたため、CaMV 混入であることが示唆された。CaMVP35S と CaMV 検出用のプライマー・プローブを用いたリアルタイム PCR の Ct 値を比較することにより、GM 擬陽性検体か CaMV 混入によるものかを判別することが可能となった。

E. 結論

GM 体に汎用される CaMV35S 配列が、CaMV の混入によって誤って検出されてしまうことによる、擬陽性の判断を絞っていくことが可能であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

学会発表

- 1) 穂山浩、未承認遺伝子組換え食品およびアレルギー誘発物質の検知法の開発と評価に関する研究日本食品衛生学会第99回学術講演会 (2010.5)
- 2) 中村公亮、穂山浩、山田千尋、佐藤里絵、牧山太樹、坂田こずえ、川上浩、真野潤一、橘田和美、手島玲子、カナダ産安全性未審査遺伝子組換え亜麻の検知法について、日本食品衛生学会第99回学術講演会 (2010.5)
- 3) 張替直輝、吉田雄三、橘田和美、近藤一成、穂山浩、手島玲子、プライマー伸長反応を使用した遺伝子組換え大豆の発色定量法、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
- 4) 高島令王奈、大西真理、小岩智宏、布藤

- 聡, 峯岸恭孝, 穠山浩, 手島玲子, 古井聡, 橘田和美、遺伝子組換え(GM)ダイズ新系統MON89788の系統特異的定量検知法開発および妥当性の確認、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
- 5) 山田千尋、中村公亮、穠山浩、高島令王奈、北川麻美子、橘田和美、川上浩、手島玲子、トマト含有加工食品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に向けて、日本食品化学学会第16回学術大会 (2010.6)
- 6) 穠山浩、食物アレルギーを誘発する原材料の検知法における最近の進歩について、日本分析化学会表示・起源研究懇談会第3回講演会 (2010.7)
- 7) 穠山浩、未承認遺伝子組換え食品の検査法について、平成22年度食品安全行政講習会 (2010.6)
- 8) 笠間菊子、小熊恭代、鈴木達也、穠山浩、大島赴夫、小島幸一、特定原材料検査に関する外部精度管理の実施に向けた検討、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 9) 真野潤一、谷中有香、池津陽子、大西真理、布藤聡、穠山浩、手島玲子、日野明寛、高島令王奈、古井聡、橘田和美、スタック品種の混入に影響を受けない遺伝子組換えトウモロコシ混入率評価手法グループテストングの性能確認、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 10) 大森清美、中村公亮、穠山浩、濱岡志津子、牧山太樹、坂田こずえ、笠原正輝、橘田和美、岸弘子、藤巻照久、手島玲子、加工食品からのパパイヤDNA抽出精製法の検討、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 11) 中村公亮、穠山浩、大森清美、濱岡志津子、牧山太樹、坂田こずえ、笠原正輝、橘田和美、手島玲子、ハワイ産遺伝子組換えパパイヤ55-1系統の特異的検知法の開発について、第100回 日本食品衛生学会学術講演会 (2010.9)
- 12) Mano, J., Shigemitsu, N., Ikezu, Y., Yanaka, Y., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K., In-house validation of component reactions on the real-time PCR array for comprehensive GMO analysis, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
- 13) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S., Hino, A., Kitta, K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
- 14) Ito, K., Yamamoto, T., Doi, H., Shoji, M., Kato, M., Akiyama, H., Adachi, R., Novel ELISA for determine food allergen in processed food, AOAC 124rd Annual Meeting (2010.9)
- 15) 穠山浩、牧山太樹、真野潤一、安井修二、峯岸恭孝、坂田こずえ、中村公亮、橘田和美、手島玲子、2009年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、全国衛生化学技術協議会年会 (2010.11)
- 16) Akiyama, H., Japanese Food Allergen Labeling, Seminar on Food Allergen : Opportunities and Challenges for Thai Food Industries (2010.11,Thailand)

論文発表

- 1) 清水えり、布藤聡、増淵友子、峯岸恭孝、笠原正輝、穠山浩、手島玲子、日野明寛、真野潤一、古井聡、橘田和美、リアルタイムPCRによるDNA検査に好適なポリプロピレンチューブの選択方法、食品衛生学雑誌, 51, 43-47 (2010)
- 2) Oguchi, T., Onishi, M., Mano, J., Akiyama, H., Teshima, R., Futo, S., Furui, S., Kitta, K., Development of multiplex PCR method for simultaneous detection of four events of genetically modified maize, DAS-59122-7, MIR604, MON863 and MON88017, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 92-100 (2010)
- 3) Sato, Y., Akiyama, H., Matsuoka, H.,

- Sakata, K., Nakamura, R., Ishikawa, S., Inakuma, T., Totsuka, M., Sugita-Konishi, Y., Ebisawa, M., Teshima, R., *J Agric Food Chem.*, 58, 7180-7186 (2010)
- 4) Abbott, M., Hayward, S., Ross, W., Godefroy, S.B., Ulberth, F., Van Hengel, A.J., Roberts, J., Akiyama, H., Popping, B., Yeung, J.M., Wehling, P., Taylor, S.L., Poms, R.E., Delahaut, P., Validation Procedures for Quantitative Food Allergen ELISA Methods: Community Guidance and Best Practices, *JAOAC Int.*, 93, 442-450 (2010)
- 5) Akiyama, H., Sakata, K., Spiegelhalter, F., Furui, S., Nakashima, A., Kitta, K., Teshima, R., Interlaboratory Validation of an Event-Specific Real time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified DAS59132 maize, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 65-70 (2010)
- 6) Mano, J., Yanaka, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Improvement of polymerase chain reaction-based Bt11 maize detection method by reduction of non-specific amplification, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 32-36 (2010)
- 7) Nakajima, O., Koyano, S., Akiyama, H., Sawada, J., Teshima, R., Confirmation of a predicted lack of IgE binding to Cry3Bb1 from genetically modified (GM) crops, *Regul Toxicol Pharmacol.*, 56, 306-311 (2010)
- 8) 清木興介、織田浩司、柴原裕亮、蒲生玲子、有馬優美、酒井信夫、中村厚、安達玲子、塩見一雄、穂山浩、手島玲子、加工食品中の甲殻類タンパク質定量検査法における標準品調製法の検討、食品衛生学雑誌, 51, 133-138 (2010)
- 9) Sakai, Y., Ishihata, K., Nakano, S., Yamada, T., Yano, T., Uchida, K., Nakao, Y., Urisu, A., Adachi, R., Teshima, R., Akiyama, H., Specific detection of banana residue in processed foods using polymerase chain reaction, *J Agric Food Chem.*, 58, 8145-8151 (2010)
- 10) 峰松和彦、中村公亮、穂山浩、張替直輝、中島治、橘田和美、手島玲子、飯塚太由、コンニャク製粉含有コメ粉からのコメDNA抽出精製法の検討、食品衛生学雑誌, 51, 247-252 (2010)
- 11) Nakamura, K., Yamada, C., Akiyama, H., Takabatake, R., Kitagawa, M., Kitta, K., Kawakami, H., Teshima, R., Evaluation of tomato DNA fragmentation and PCR amplicon size for detection of tomato DNA in processed products, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 17, 123-128 (2010)
- 12) Harikai, N., Akiyama, H., Kondo, K., Kitta, K., Teshima, R., Yoshida, Y., A novel chromogenic method for determining the genetically modified soybean content in soybean powder with primer extension, *Jpn. J. Food Chem. Safety*, 17, 110-115 (2010)
- 13) Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, K., Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H., Kita, K., Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies, *Parasitology International*, 59, 560-564 (2010)
- 14) 丸山卓郎、近藤健児、四柳雄一、山本豊、川崎武志、司馬真央、寺坂和祥、山根真由、Shu Zhug、坂田こずえ、藤田正雄、穂山浩、西村直行、小松かつ子、水上元、合田幸広、PCR-RELP法によるビャクジュツのソウジュツに対する純度試験の妥当性確認試験、生薬学雑誌, 64, 96-101 (2010)
- 15) Takabatake, R., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K.,

- Establishment and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean MON89788, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 51, 242-246 (2010)
- 16) Takabatake, R., Futo, S., Minegishi, Y., Watai, M., Sawada, C., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Furui, S., Akihiro, H., Kitta, K., Evaluation of quantitative PCR methods for genetically modified maize (MON863, NK603, TC1507 and T25), *Food Sci. Technol. Res.*, 16, 421-430 (2010)
- 17) Kodama, T., Kasahara, M., Minegishi, Y., Futo, S., Sawada, C., Watai, M., Akiyama, H., Teshima, R., Kurosawa, Y., Furui, S., Hino, A., Kitta K., Interlaboratory Study of Qualitative PCR Method for Roundup Ready Soybean, *JAOAC Int.* in press (2010)
- 18) Akiyama, H., Makiyama, D., Nakamura, K., Sasaki, N., Minegishi, Y., Mano, J., Kitta, K., Ozeki, Y., Teshima, R., A Novel Detection System for the Genetically Modified Canola (*Brassica rapa*) Line RT73, *Anal Chem.*, 82, 9909-9916 (2010)
- 19) 中村厚、酒井信夫、川浦知子、安達玲子、穰山浩、手島玲子、すり身およびその加工食品に含まれる甲殻類の実態調査、日本食品化学学会誌, in press (2010)
- 20) Takabatake, R., Akiyama, H., Sakata, K., Onishi, M., Koiwa, T., Futo, S., Minegishi, Y., Teshima, R., Furui, S., Kitta, K., Development and Evaluation of Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Soybean A2704-12, *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, in press.
- 21) Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K., Teshima, R., Nakashima, A., Ogawa, A., Yamagishi, T., Futo, S., Mano, J., Oguchi, T., Kitta, K.: Inter-laboratory Study of DNA Extraction from Multiple Ground Samples, Multiplex Real-Time PCR and Multiplex Qualitative PCR for Individual Kernel Detection System of Genetically Modified Maize, *JAOAC Int.* in press. (2011)
- H.知的財産権の出願・登録状況
なし

Table 1. 実態調査結果

Sample	Target gene (Amplicon size)
	P35S (83bp)
Sauce 1	-
Sauce 2	-
Sauce 3	-
Sauce 4	-
Sauce 5	-
Puree 1	-
Puree 2	-
Puree 3	-
Puree 4	-
Puree 5	-
Chili sauce 1	-
Chili sauce 2	-
Chili sauce 3	-
Chili sauce 4	-
Chili sauce 5	-
Juice cocktail 1	-
Juice cocktail 2	-
Juice cocktail 3	+
Juice cocktail 4	+
Juice cocktail 5	-
Juice 1	-
Juice 2	-
Juice 3	-
Juice 4	-
Juice 5	-
Juice 6	-
Juice 7	-
Ketchup 1	-
Ketchup 2	-
Ketchup 3	-
Ketchup 4	-
Ketchup 5	-
Ketchup 6	-
Ketchup 7	-
Ketchup 8	-
Ketchup 9	-
Ketchup 10	-
Paste 1	-
Paste 2	-
Paste 3	-
Paste 4	-
Paste 5	-
Paste 6	-
Paste 7	-
Paste 8	-
Paste 9	-
Paste 10	-
Paste 11	-
Paste 12	-
Paste 13	-
Paste 14	-
Paste 15	-
Paste 16	-
Paste 17	-
Paste 18	-

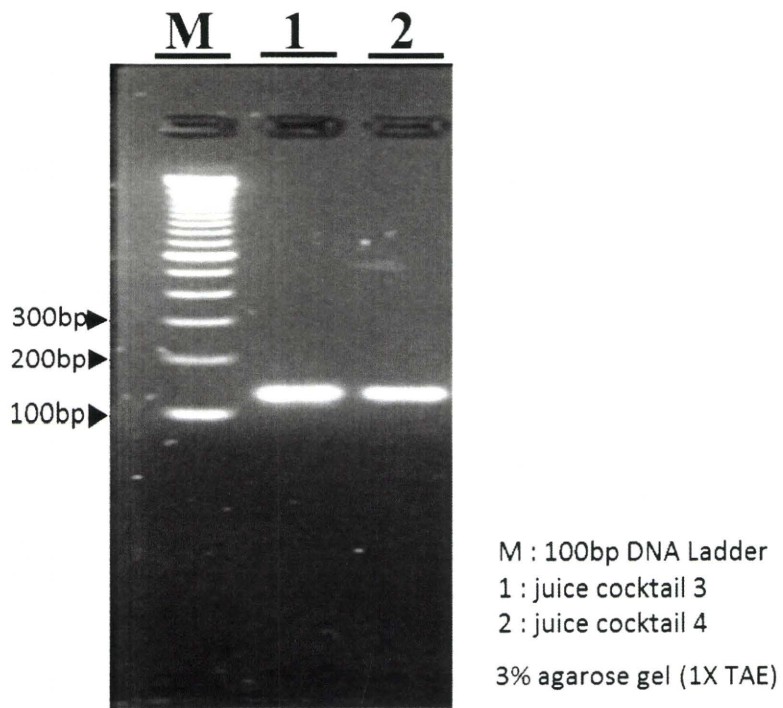


Fig.1 CaMVT検出用プライマー対を用いたPCR増幅産物の電気泳動写真

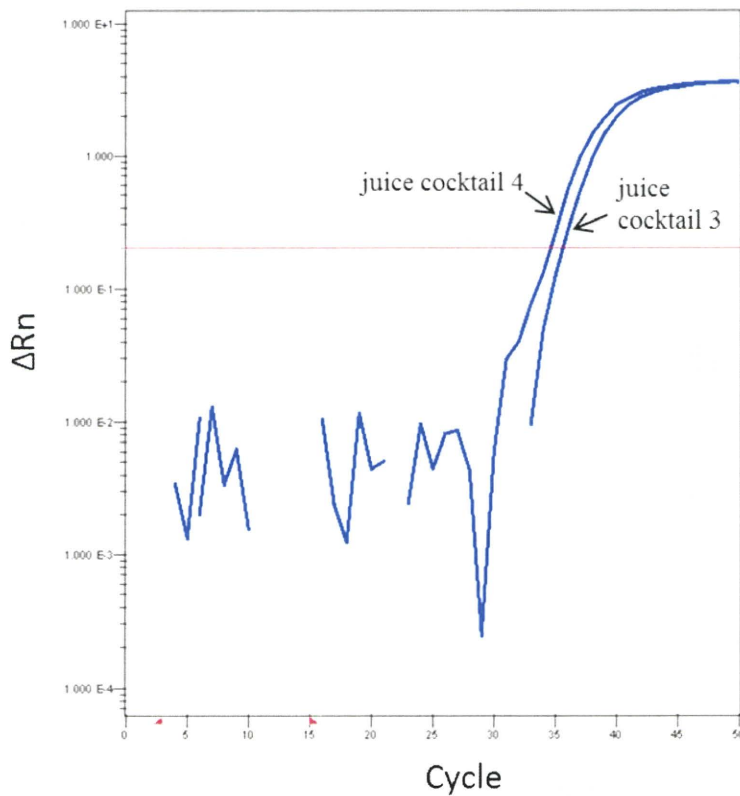


Fig.2 CaMVを標的としたリアルタイムPCRの増幅曲線

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）

平成22年度 分担研究報告書

非食用モダンバイオテクノロジー応用生物の食品への混入危害防止のための
検知法開発に関する研究

研究分担者 五十君 静信 国立医薬品食品衛生研究所食品衛生管理部

研究要旨

食品添加物を生産するための遺伝子組換え微生物やワクチン等医療を目的とする遺伝子組換え微生物は既に実用化されており、さらには工業原料産生及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物の開発も進みつつある。このようなバイオテクノロジー応用技術の拡大により、非食用モダンバイオテクノロジー応用微生物が誤って食品に混入してくる可能性が危惧されている。そこで、モダンバイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン開発が注目されはじめていることから、スロバキアで開催された **International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics** に参加し、研究成果を発表すると共に、遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。遺伝子組換え微生物の定量的検知法の検討では、豚肉中に混入した乳酸菌モデル組換え体を用いて具体的な探知法について検討を行った。

協力研究者

食品衛生管理部 江川 智哉

食品衛生管理部 榊田 和彌

オテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向の調査研究を行う。このような情報を基に、非食用バイオテクノロジー応用微生物の食品中への混入を防止するための安全性確保に有用と思われる検知技術の検討を進める。

A. 研究目的

食品添加物を生産するための遺伝子組換え微生物やワクチン等医療を目的とする遺伝子組換え微生物は既に実用化されており、さらには工業原料産生及び環境浄化目的の遺伝子組換え微生物の開発も進みつつある。このようなバイオテクノロジー応用技術の拡大により、本来はヒトが直接摂取することを想定していない非食用バイオテクノロジー応用微生物が誤って食品に混入してくる可能性が示唆されている。そこで、バイ

B. 研究方法

①バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、論文、書籍、インターネット、業者カタログなどの文献調査に加え、学会やシンポジウム等へ参加しその分野の研究者と情報交換を用い、微生物の遺伝子組換えに関わる情報収集と、ベクターに関するデータベース作りを続け

た。本年度は、国内の食品添加物用途や医療用として認可されている微生物組換え体について整理し、一覧表を作成した。

②海外の研究動向に関する情報収集として、スロバキアで開催された **International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics** に参加し、研究成果を発表すると共に、乳酸菌などの遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。

③遺伝子組換え微生物の検知技術の検討では、乳酸菌モデル組換え体を用いて、豚肉中に混入させた場合の定量的検知法について検討した。宿主としては、ゲノム DNA にエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ery*) を組込んだ *Lactobacillus casei* IGM232 株とエリスロマイシン耐性マーカー遺伝子 (*ermC*) をプラスミド上に保持する *L. casei* IGM393 株の 2 株を用いた。標的とした遺伝子は、各組換え体に 1 コピーのみ存在することを確認した (*ldhD*: D-lactate dehydrogenase) と、グラム陽性細菌のマーカーとしてしばしば用いられるエリスロマイシン耐性遺伝子で、同じエリスロマイシン耐性遺伝子でも *L. casei* IGM232 株はゲノム上に組み込まれているため *ery* を 1 コピー持つ。一方、*L. casei* IGM393 株はプラスミド上に *ermC* が組み込まれており、乳酸菌あたり複数コピーが存在する。これらの遺伝子を標的としてリアルタイム PCR 法による定量的な検知法を検討した。

C. 研究結果

①バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、昨年までの 3

年間に研究用・商業的に入手可能な市販の大腸菌用のベクター、研究用に開発された乳酸菌用発現ベクター、枯草菌と酵母のベクターに関して一覧表を作成して、ほぼ網羅的にデータベース化を行ったが、その後追加された情報について情報収集を続けた。

国内の食品添加物用途に用いられる組換え微生物情報としては、国内の承認済遺伝子組換え添加物リスト (表 4)、食品安全委員会で現在審査中ないしは、審査を終了した組換え添加物リスト (表 5) を作成した。医療用途としては、食品安全委員会動物用医薬品調査会で審議中の遺伝子組換えワクチンリスト (表 6)、ヒトの医療用として日本で承認された遺伝子組換え医薬品・細胞培養医薬品リスト (表 7) を作成した。

②海外の情報収集として、スロバキアで開催された国際シンポジウム (**International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics**) に参加し、乳酸菌を用いた遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行った。ワクチン開発は現在そのほとんどがウイルスワクチンであり、遺伝子組換え技術で行われている。一方、細菌を用いた組換えワクチンとしては、抗原運搬体とするワクチン (経口粘膜ワクチン) 開発が注目されていることから、乳酸菌研究者が集まる国際シンポジウムに参加し、乳酸菌を用いた組換え乳酸菌ワクチンに関する情報収集を行った。

この国際シンポジウムでは、プロバイオティクス乳酸菌の安全性に関する議論も行われていた。プロバイオティクス乳酸菌の遺伝子組換えを用いた育種については、基礎研究として進められているものの、生きた組換え微生物の安全性に関する議論は進

んでおらず、実用化にあたってはこの考え方を早急に何とかするべきだとの意見が出されていた。

国内の学会としては、腸内細菌学会、日本乳酸菌学会に参加し、情報収集を行った。日本細菌学会では、乳酸菌を抗原運搬体とする遺伝子組換え経口粘膜ワクチンの研究動向について口頭発表を行った。

③遺伝子組換え微生物の検知技術の検討では、DNAを標的とした定量 real time PCR 法による検出法の検討を行った。本年度は、乳酸菌モデル組換え体を対象として、豚肉にモデル組換え乳酸菌を混入し、定量 PCR を行い具体的な検知法を検討した。

L. casei IGM232 株および *L. casei* IGM393 株を、エリスロマイシンを含む MRS ブロスで増菌後、10 倍階段希釈したものを検体として、リアルタイム PCR で分析した結果を図 1-1 および図 1-2 に示す。等量の乳酸菌から PCR テンプレート溶液を Matsuki ら (2004) の方法に従い調製し、染色体上にあるシングルコピーの遺伝子 *ldhD* および *ery* をターゲットとするプライマーと、プラスミド上にある遺伝子 *ermC* をターゲットとするプライマーを用いて定量 PCR を行った。

参考文献: Matsuki T et al., Quantitative PCR with 16S rRNA-Gene-Targeted Species-Specific Primers for Analysis of Human Intestinal Bifidobacteria. Appl Environ Microbiol. 70(1): 167-173 (2004)

図 1-1 a) は *L. casei* IGM232 株のクロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子を、b) はクロモゾーム上に組込まれた *ery* 遺伝子を標的とした結果である。図 1-2 a) は *L. casei* IGM393 株のクロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子を、b)

はプラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的とした結果である。

表 1 は、菌数と Ct 値の一覧である。組換え乳酸菌数として 3000 個程度あれば本法により検出が可能である。プラスミド上の遺伝子を標的とする 300 個程度で検出が可能であることが示された。

モデル組換え乳酸菌を豚肉に接種して同様な検討を行った結果を図 2-1 および図 2-2 に示す。接種直後の解析において、豚肉中では、クロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子および *ery* 遺伝子を標的とした場合、 6×10^3 cfu では検出できないが、プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的すると 6×10^3 cfu 以上で検出可能であった (表 2)。

接種直後の各 3 検体ずつコロニー形成を確認したところ、表 3 の様な結果を得た。

D. 考察

①バイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の情報収集は、昨年までの 3 年間に研究用・商業的に入手可能な市販の大腸菌用のベクター、研究用に開発された乳酸菌用発現ベクター、枯草菌と酵母のベクターに関して一覧表を作成して、ほぼ網羅的にデータベース化を行ったが、その後追加された情報について文献調査や web 等を用いて情報収集を続けた。これらはそのほとんどが研究用に用いられているため、食品への混入のリスクはそれほど高くない。遺伝子組換え微生物として実際に使用段階であるものとしては、食品添加物の生産に用いられる遺伝子組換え細菌や、ワクチンなどの医療用途に用いられる組換え微生物がある。本年度は、国内の食品添加物用途や医療用として既に使用が認可されている

微生物組換え体について整理した。

表 4 には、国内で既に評価を終了し、官報で公表されている添加物 14 を一覧とした。これらについては、企業保護の立場から、細かい情報までは公開されていないため、その概略を一覧とした。表 5 には、現在食品安全委員会で、遺伝子組換え添加物として審議中ないしは、審議が終了したものの 7 件について一覧とした。

医療用途としては、食品安全委員会動物用医薬品調査会で審議中の遺伝子組換えワクチン 1 件 (表 6)、また、ヒトの医療用として日本で承認された遺伝子組換え医薬品・細胞培養医薬品リスト (表 7) を作成した。表 7 は、国立感染症研究所の生物製剤部がまとめた医薬品リストから、遺伝子組換えと明記されている医薬品のみを選別しリスト化を行った。酵素 11 件、血液凝固線溶系因子 5 件、血清タンパク質 1 件、ホルモン 22 件、ワクチン 4 件、インターフェロン類 7 件、エリスロポエチン類 4 件、サイトカイン類 6 件、抗体 16 件、融合タンパク質 2 件の合計 78 件があった。

②海外の遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行ったが、ウイルスワクチン研究は盛んであるが、細菌を用いた遺伝子組換えワクチンの実用化は見えていないように思えた。この中で、乳酸菌を組換え体を抗原運搬体とする経口粘膜ワクチンは注目されており、研究論文数も多い。海外の情報収集として、スロバキアで開催された **International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics** に参加し、乳酸菌を用いた遺伝子組換えワクチンの研究状況について情報収集を行った。

このシンポジウムでもプロバイオティク

ス乳酸菌の安全性に関する議論が行われ、生きた乳酸菌の安全性をどのような観点で行うか考えるべきだとされた。また新たに開発される組換えなどを利用した乳酸菌の安全性については、国際的な安全性に関するコンセンサスが必要であると議論されていた。生きたままの遺伝子組換えの安全性をどのように考えるかは、最も重要な課題であると思われた。

国内の学会としては、腸内細菌学会、日本乳酸菌学会に参加し、情報収集を行った。日本乳酸菌学会では、乳酸菌を抗原運搬体とする遺伝子組換え経口粘膜ワクチンの研究動向について口頭発表を行った。この分野の研究は世界的にも注目されており、遺伝子組換え微生物の安全性の問題が解決されれば実用化が進むものと思われる。

③遺伝子組換え微生物の定量的検知法に関し検討を進めた。本年度は、モデル組換え体として乳酸菌を用い、定量 PCR を行い評価した。今回、定量 PCR のブランクにいくつか非特異増幅が認められた。この非特異反応については原因を調べているが未だ結論に至っていない。非特異反応の影響を受けない範囲を検討したところ、スタンダード遺伝子の定量において、Ct 値=31.3 で正確な定量が可能であるため、これ以外の領域を定量可能範囲とした。

1 つの遺伝子組換え細菌あたり 1 コピーしか持たない遺伝子を標的とした場合と、プラスミドなどの複数コピー存在する遺伝子を標的とする場合では、やはり複数コピー存在する場合の検出感度が高かった。

また、豚肉に接種後直接分析した結果より、組換え乳酸菌においても、昨年度検討した組換え大腸菌と同様、本方法で遺伝子

組換え微生物を定量的に検知することが可能であることが示された。

豚肉に接種後、MRS 培地で 24 時間増菌した場合、豚肉に存在していた低レベルの共雑菌の増殖が認められ、陽性結果が得られることがわかった。これは、検査対象の乳酸菌組換えの体の定量分析の妨げとなった。この結果は、自然界に存在した菌が探知対象とするエリスロマイシン耐性遺伝子を元々保持していたのか、またはエリスロマイシン耐性遺伝子を増菌培養中に組換え体から獲得したものである可能性もあるため、今後の更なる検討課題となった。

E. 結論

モダンバイオテクノロジー応用微生物に関する開発・実用化の動向に関する調査研究を行った。食品添加物製造用に用いられる遺伝子組換え微生物や、医療用途に用いられる遺伝子組換え微生物に関する情報収集を進めた。乳酸菌を抗原運搬体とするワクチン開発が注目されはじめていることから、スロバキアで開催された International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics に参加し、遺伝子組換え乳酸菌に関する研究成果を発表すると共に、遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換と情報収集を行った。遺伝子組換え微生物の定量的検知法の検討では、豚肉中に混入した乳酸菌モデル組換え体を用いて具体的な定量探知法について検討を行った。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kajikawa A., Masuda K., Katoh M., and Igimi S.: Adjuvant effects for oral immunization provided by recombinant *Lactobacillus casei* secreting biologically active murine interleukin-1 beta. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17(1):43-48. (2010)
2. Kajikawa A., Ichikawa E., and Igimi S.: Development of a Highly Efficient Protein-secreting System in Recombinant *Lactobacillus casei*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(2):375-382 (2010)
3. Kajikawa A. and Igimi S.: Innate and acquired immune responses induced by recombinant *Lactobacillus casei* displaying flagellin-fusion antigen on the cell-surface. *Vaccine* 28(19): 3409-3415 (2010)
4. Masuda K. Kajikawa A, and Igimi S. Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBc1 cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. in press

学会発表

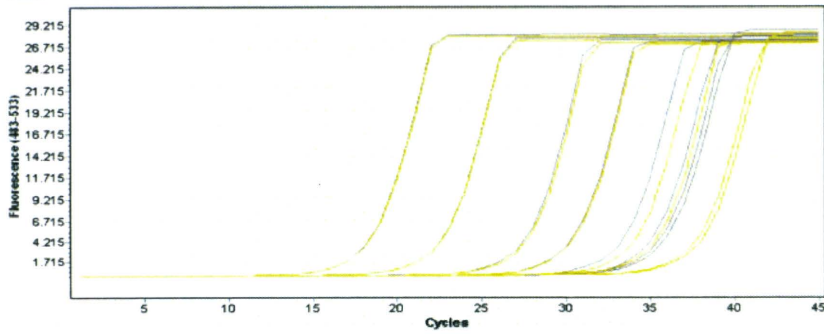
1. Masuda K. and Igimi S.: Observation of *Lactobacillus casei* IGM 393 transport using *in vitro* M cell model. International Scientific Conference Probiotics and Prebiotics. 2010. 6. Kosice, Slovakia
2. 五十君静信：乳酸菌・ビフィズス菌の新しい研究と応用—医薬分野への応用の

可能性一。日本乳酸菌学会設立 20 周年 記念シンポジウム。2010.11.20。港区	1. 特許所得 なし
3. 梶田和彌、五十君静信：Caco-2 細胞と B 細胞との共培養による <i>Lactobacillus</i> <i>casei</i> IGM393 株の透過促進。日本乳酸 菌学会。2010.7.26。仙台	2. 実用新案登録 なし 3. その他 なし

H. 知的所有権の取得状況

図 1-1. モデル組換え乳酸菌 IGM232 株の MRS 培地でのリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析



b) *ery* 遺伝子を標的として分析

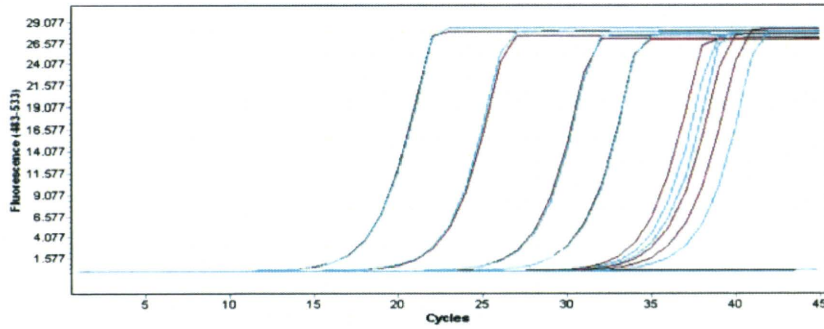
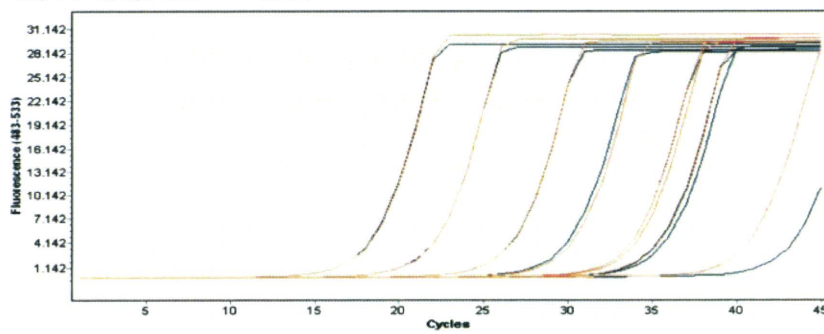


図 1-2. モデル組換え乳酸菌 IGM393 株の MRS 培地でのリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析



b) *ermC* 遺伝子を標的として分析

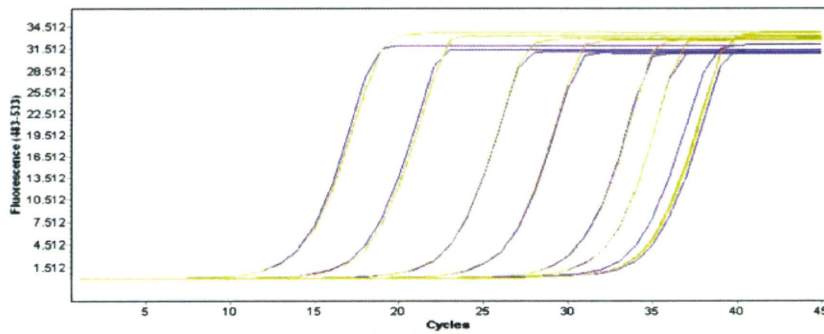
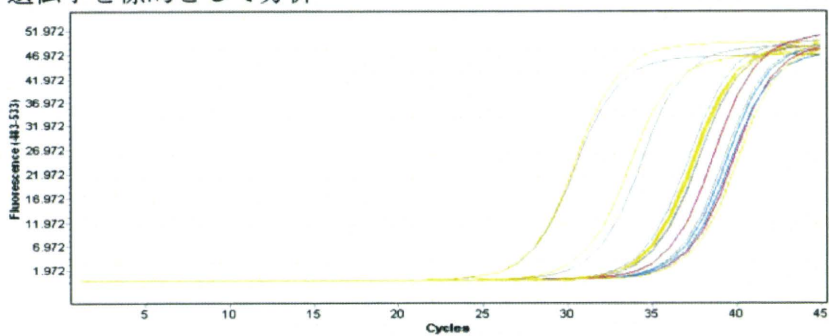


表 1. 接種したモデル組換え乳酸菌の菌数と Threshold cycle (Ct)値

	Primer	IGM232 株		IGM393 株	
		ldhD	ery	ldhD	ermC
cfu in tube	3x10 ⁶	17.47	17.41	17.55	13.71
	3x10 ⁵	21.64	21.73	21.24	17.56
	3x10 ⁴	26.62	26.92	25.85	22.38
	3x10 ³	29.37	29.63	29.31	25.70
	3x10 ²	32.72	33.71	33.08	29.99
	3x10 ¹	34.19	34.51	33.79	31.67
	3x10 ⁰	35.70	35.72	34.80	34.26
	Blank	35.98	35.72	40.00	33.79

図 2-1. モデル組換え乳酸菌 IGM232 株を豚肉に接種した場合のリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析



b) *ery* 遺伝子を標的として分析

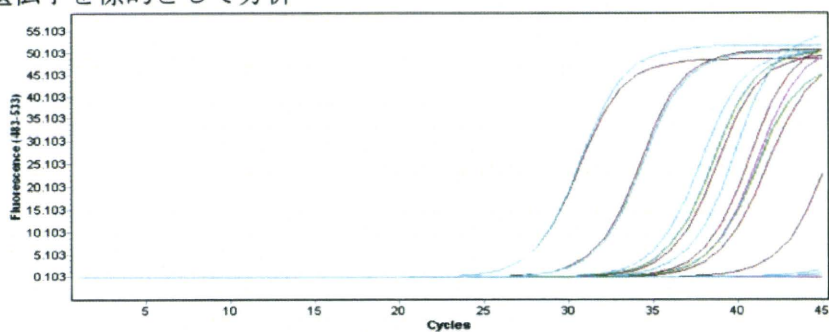
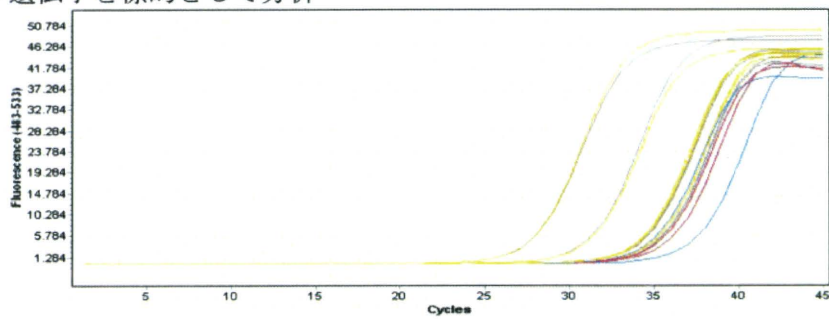


図 2-2. モデル組換え乳酸菌 IGM393 株を豚肉に接種した場合のリアルタイム PCR による検知

a) *ldhD* 遺伝子を標的として分析



b) *ermC* 遺伝子を標的として分析

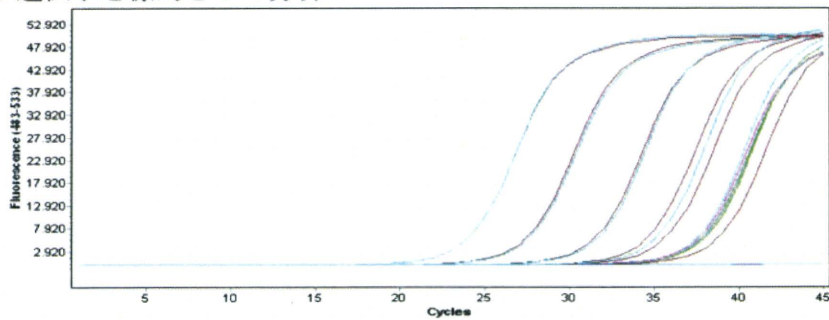


表 2. 豚肉に接種したモデル組換え乳酸菌の菌数と Threshold cycle (Ct)値

	Primer	IGM232 株		IGM393 株	
		ldhD	ery	ldhD	ermC
cfu / g	6x10 ⁵	27.27	27.51	27.56	23.61
	6x10 ⁴	30.81	31.08	30.87	27.07
	6x10 ³	34.02	35.11	33.98	31.14
	6x10 ²	34.41	36.97	34.86	34.47
	6x10 ¹	34.38	39.24	34.90	36.13
	6x10 ⁰	36.38	40.00	34.05	38.35
	none	36.38	36.57	36.27	37.41
	blank	35.95	37.76	34.77	37.12

表 3. 豚肉に接種したモデル組換え乳酸菌の菌数とそれぞれの濃度での検知数 (n=3)

inocula of bacteria (cfu / g)	6x10 ⁵	6x10 ⁴	6x10 ³	6x10 ²	6x10 ¹	6x10 ⁰	none
IGM232 株	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3
IGM393 株	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3

接種直後直接分析した結果を示す (陽性検体数/検査検体数)

表 4. 国内の承認済遺伝子組換え添加物リスト

評価案件名	性質	開発者等	官報掲載日
1. α -アミラーゼ TS-25	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2001.3.30
2. α -アミラーゼ BSG-アミラーゼ	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2001.3.30
3. α -アミラーゼ TMG-アミラーゼ	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2001.3.30
4. α -アミラーゼ SP961	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2002.2.21
5. α -アミラーゼ LE399	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2005.10.31
6. α -アミラーゼ SPEZYME FRED™	耐熱性向上	Genencor International Inc. (米国)	2007.4.12
7. キモシン マキシレン	生産性向上	DSM (オランダ)	2001.3.30
8. キモシン カイマックス	キモシン生産性	CHR. HANSEN A/S (デンマーク)	2003.6.30
9. プルラーゼ Optimax	生産性向上	Genencor International, Inc. (米国)	2001.3.30
10. プルラーゼ SP962	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2001.3.30
11. リパーゼ SP388	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2001.3.30
12. リパーゼ NOVOZYM677	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2001.6.30
13. リボフラビン	生産性向上	F. Hoffmann-La Roche (スイス)	2001.3.30
14. グルコアミラーゼ AMG-E	生産性向上	Novozymes A/S (デンマーク)	2002.7.8

表 5. 食品安全委員会で現在審査中ないしは、審査を終了した組換え添加物リスト

評価案件名	審議状況
1. HxR-No. 1株を利用して生産された 5'-イノシン酸二ナトリウム	食品安全委員会 意見募集中
2. <i>Aspergillus oryzae</i> MT2181株を利用して 生産されたキシラナーゼ	食品安全委員会 審議中
3. BR151 (pUAQ2)株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼ	食品安全委員会 審議中
4. GLU-No. 3株を利用して生産された L-グルタミン酸ナトリウム	食品安全委員会 審議終了
5. LEU-No. 2株を利用して生産された L-ロイシン	食品安全委員会 審議終了
6. LYS-No. 1F株を利用して生産された 塩酸L-リジン	食品安全委員会 審議中
7. NIA1718株を利用して生産された インベルターゼ	食品安全委員会 審議中

表 6. 食品安全委員会動物用医薬品調査会で審議中の遺伝子組換えワクチン

評価案件名	審査状況
マイコプラズマ・ガリセプチカム感染症・マイコプラズマ・シノビエ感染症混合生ワクチン（ノビリスMGM S）	意見・情報募集終了 (22.8.20)

表 7. 日本で承認された遺伝子組換え医薬品・細胞培養医薬品 (1 / 3)

分類	一般名	商品名	承認年
酵素			
t-PA	アルテプララーゼ	アクチバシン注、グルトパ注	1991
t-PA	パミテプララーゼ	ソリナーゼ注射用	1998
t-PA	モンテプララーゼ	クリアクター静注用	1998
グルコセレブロシダーゼイミグルセララーゼ		セレザイム注	1998
αガラクトシダーゼ A	アガルシダーゼ アルファ	リプレガル点滴静注用	2006
αガラクトシダーゼ A	アガルシダーゼ ベータ	ファブラザイム点滴静注用	2004
α-L-イズロニダーゼ	ラロニダーゼ	アウドラザイム点滴静注用	2006
酸性α-グルコシダーゼ	アルグルコシダーゼ アルファ	マイオザイム点滴静注用	2007
イズロン酸 2 スルファターゼ	イデュルスルファラーゼ	エラプレース点滴静注液	2007
N-アセチルガラクトサミン-4-スルファターゼ	ガルスルファラーゼ	ナグラザイム点滴静注液	2008
尿酸オキシダーゼ	ラスブリカーゼ	ラスリテック点滴静注用	2009
血液凝固線溶系因子			
血液凝固第 VIII 因子	オクトコグ アルファ	コージネイト FS バイオセット注	1993
血液凝固第 VIII 因子	ルリオクトコグ アルファ	リコネイト→アドベイト注射用	1996
血液凝固第 VII 因子 (活性型)	エプタコグ アルファ (活性型)	注射用ノボセブン	2000
血液凝固第 IX 因子	ノナコグアルファ	ベネフィクス静注用	2009
トロンボモデュリン	トロンボモデュリン アルファ	リコモジュリン点滴静注用	2008
血清タンパク質			
アルブミン	人血清アルブミン	メドウェイ注	2007
ホルモン			
インスリン	ヒトインスリン	ヒューマリン注	1985
インスリン	ヒトインスリン	ノボリン注、ペンフィル注	1991
超速効型インスリンアナログ	インスリン リスプロ	ヒューマログ注	2001
超速効型インスリンアナログ	インスリン アスパルト	ノボラピッド注	2001
持続型インスリンアナログ	インスリン グラルギン	ランタス注	2003
持続型インスリンアナログ	インスリン デテミル	レベミル注	2007
超速効型インスリンアナログ	インスリン グルリジン	アピドラ注	2009
成長ホルモン	ソマトロピン	ジェノトロピン	1988
成長ホルモン	ソマトロピン	ノルディトロピン注	1988
成長ホルモン	ソマトロピン	ヒューマトローブ注射用	1989