

場合、陽性であると判定した。Ct 値が得られない場合は、陰性であると判定した。

5) データベース検索ソフトの開発と公開

データベース検索サイトは、FileMaker ServerII ソフトを用いて開発した。インターネットを利用した一般公開は、株式会社エミックのホスティングサービスを利用した。

C. 研究結果

1. トマト加工食品中の非食用 GM 遺伝子検知に関する研究

GM 作物に汎用されるカリフラワーモザイク 35S プロモーター (P35S) を検出するプライマー・プローブを用いて、トマト加工食品中の GM トマト混入の調査を行った。

P35S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'

市販のトマト加工食品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。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。

P35S 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。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。また、P35S 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が含まれていることが示唆された。

2. ジャガイモ加工食品から精製した DNA の評価

生鮮ジャガイモ 10 品種、ポテトスナック 4 製品、冷凍ジャガイモ 3 製品、乾燥ジャガイモ 3 製品、ジャガイモデンプン製品 7 製品、調理済みジャガイモ惣菜食品 4 製品、ジャガイモデンプンを加工した加工食品 4 製品は、粉碎後、DNA 抽出・精製を行い、検体とした。その検体は、分光光度計を用いて吸光度を測定することにより、DNA 収量及び精製度を算出した。全ての生鮮ジャガイモ・加工食品から DNA を抽出することが可能であった。生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジャガイモ惣菜食品からの DNA 収量は多かったが、ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品からの DNA 収量は少なかった。

生鮮ジャガイモとジャガイモスナック菓子、乾燥ジャガイモ、冷凍ジャガイモ、調理済みジャガイモ惣菜食品については、タンパク質の混入指数(A260/A280)と塩などの混入指数(A260/A230)の値は 2 付近であったため、高い精製度であることが示唆された。ジャガイモデンプンとジャガイモデンプン加工食品については、A260/A280 は 1.3~1.4 で、A260/A230 は 0.4~0.7 であることから高い精製度が得られなかった。

3. ジャガイモ加工食品から抽出した DNA の断片長の評価

ジャガイモ加工食品中に含有する DNA の断片長について解析を行った。設計した定性 PCR 用プライマーを用いて、51、101、201、301、401、501、601、701 bp の断片長で増幅可能であるかを評価した。生鮮ジャガイモについては 51~701 bp まで全ての断片長の増幅産物が得られた。一方、ジャガイモスナック菓子や冷凍ジャガイモは製品によって差はあるものの、全て製品において 401 bp まで増幅産物を得られた。乾燥ジャガイモに関しては 1 つの製品が 701 bp まで得られたものの下限は 301 bp であった。ジャガイモデンプンや調理済みジャガイモ惣菜食品は製品によって差はあるものの下限は 101 bp であった。ジャガイモデンプンを加工した加工食品(春雨)の下限は 51 bp であった。

4. プライマー・プローブ設計

ジャガイモ加工食品より精製される DNA の断片長 (51~101 bp) を考慮し、UGPase を標的に、増幅断片長を 67 bp になるようプライマー・プローブ (以下、UGPase と略す。) を設計した。まず、男爵とメークインで標的配列の情報を得るためシーケンス解析を行ったところ品種間で塩基配列に差を検出した。よって、スクリーニングに使用する UGPase の標的配列は、男爵、メ

ークインの他に 8 種類のジャガイモ品種間に相同性の高い UGPase の配列領域を見出し、UGPase 検出用プライマー・プローブを設計した。次いで、Tnos 検出用のプライマー・プローブの設計を行った。アグロバクテリウムゲノム(GenBank no.V00087.1)の Tnos 配列を基に設計した。増幅断片長は 69 bp とした。P35S 検出用のプライマー・プローブは、GM Papaya Rainbow 品種のゲノム配列(GenBank no.FJ467933.1)に含まれる P35S を基に設計を行った。増幅断片長は 65 bp とした。

5. 作成したプラスミドの特異性と感度の評価

UGPase、Tnos、P35S 検出用プライマー・プローブを用いて、リアルタイム PCR を行い、それぞれの検出特異性と検出感度について解析を行った。

まず特異性について検討した。コメ、トマト、パパイア、ナス、ピーマン、ヒヨコマメ、コムギ、アマ、トウモロコシ、ダイズ、ナタネ、テンサイ、ワタ及びジャガイモの 14 種の作物から精製したゲノム DNA を鋳型にリアルタイム PCR を行った。その結果、コメからはコメ由来のコメ内存在性アクチンプロモーター(AINT)が、コムギとアマ、テンサイからは抗生物質耐性遺伝子 neomycin phosphotransferase II (NPT II)が、ダイズからは Tnos が、トウモロコシからはトウモロコシ由来コビオチンプロモーター(Pubi)と NPT II が検出された。ジャガイモに関しては、UGPase のみ検出され、Tnos や P35S は検出されなかった。

次に、感度について検討を行った。プラスミドを用いて希釈系列を作成し、リアルタイム PCR の鋳型とし、それぞれを検出するプライマー・プローブを用いた検知法の検出感度を解析した。UGPase については 16 回の反復試験、Tnos と P35S については 10 回の反復試験を行った。その結果、全ての試験より UGPase は 2,500 コピーまで、Tnos・P35S は 12.5 コピーまで検出された。Ct 値は、Tnos と P35S に比べて UGPase を高く検出したが、RSD の値はすべて 3.2% 以下と低かった。定量限界をプラスミドの希釈系列の濃度と Ct 値より求めたところ、UGPase は 250 コピー ($R^2=0.996$)、Tnos・P35S は 12.5 コピー (Tnos, $R^2=0.993$; P35S, $R^2=0.998$) であった。

6. 実態調査

開発したリアルタイム PCR 検知法を用いて、市販されているジャガイモ加工食品への GM ジャガイモの混入に関する実態調査を行った。全ての検体は、2 試験ずつ行い判定を行った。その結果、15 検体中、27-①(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-1(シチューの素)、T-2(缶

スープ)、31-②(春雨)の 5 製品で Tnos が、33-①(冷凍ジャガイモ)、K-3(片栗粉)、30-②(グラタン)、T-2(缶スープ)、31-①(春雨)の 5 製品で P35S が検出された。得られた Ct 値は 38 以上と高く、いずれも GM ジャガイモではなくバクテリアやウイルスの混入による汚染の可能性が示唆された。

7. データベース検索サイトの開発と公開

データベース検索サイトは、FileMaker ServerII を用いたホスティングサービスを利用し、インターネットより国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部のホームページから公開した。

(アドレス: <http://gmdb.nihs.go.jp/>)

D. 考察

トマトに関しては、今回の実態調査で検出された P35S 擬陽性検体は、P35S 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。P35S 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。

GM ジャガイモの混入を検査するための新しい検知法を開発するにあたり、ジャガイモ加工食品から得られる DNA の評価を行った。生鮮ジャガイモ 10 品種、ポテトスナック 4 製品、冷凍ジャガイモ 3 製品、乾燥ジャガイモ 3 製品、ジャガイモデンプン製品 7 製品、調理済みジャガイモ惣菜食品 4 製品、ジャガイモデンプンを加工した加工食品 4 製品をそれぞれ粉砕し、DNA 抽出・精製を行い、分光光度計を用いて DNA 回収量及び精製度を測定した。その結果、ジャガイモデンプンとジャガイモデンプンを加工した加工食品から得られる DNA の低い精製度の問題は、DNA の回収量の低さに起因するものと考えられた。ジャガイモデンプンより加工された食品は、サンプルを溶解させるために使用する緩衝液(G2 バッファー)に難溶であるため、他の加工食品のサンプリング量の 6~8 割(6~8 g)に抑えたためと考えられた。また、ジャガイモデンプンは、製造工程において物理的に DNA が分解されるような製造工程が多く 10 段階以上もの工程を経た非常に加工度の高い製品である。そのため、ジャガイモデンプンを使用した加工食品より DNA を抽出しにくいと考えられた。その他のジャガイモ加工食品からは、1 g あたりのサンプリング量から 1 μ g 以上の DNA を得ることが可能であることが示唆

された。DNA の精製度については、その製造工程の複雑化によって低く見積もられることが考えられた。ジャガイモ加工食品から抽出精製される DNA 断片長に関して調査を行った結果、ジャガイモスナック菓子、冷凍ジャガイモや乾燥ジャガイモは製品によって差はあるものの全て 301~401 bp まで増幅産物を得られた。一方で、ジャガイモデンプンやジャガイモデンプンを加工した製品は 51~101 bp まで増幅産物を確認することが可能であった。つまり、製造加工工程における熱、冷却、圧力、粉碎、乾燥及びその他の物理的な加工工程の要素によって 51~101 bp 程度まで断片化されていることが示唆された。上記の考察を踏まえ、プロモーターやターミネーター領域などの組換え DNA セグメント、作物内在性遺伝子等を標的に検知するリアルタイム PCR 法により、GM ジャガイモの検出は可能であることが考えられた。

ジャガイモ加工食品への GM ジャガイモの混入を検査するスクリーニング試験法の開発を検討した。増幅断片長を 50~100 bp としたジャガイモ内在性遺伝子の UGPase 及び GM ジャガイモの構造遺伝子に汎用される遺伝子を検知するためのリアルタイム PCR 用のプライマー・プローブを設計し、GM ジャガイモ混入検査を行うことが可能であることが示唆された。また、増幅断片長を短く設計することで増幅効率を向上させ、リアルタイム PCR の感度を向上させることが可能であると考えられた。

また、GM ジャガイモ混入に関する擬陽性判定を防ぐため、GM ジャガイモ検知法は、ジャガイモ内在性遺伝子検知法よりも高感度であることが求められる。本研究では、検出限界(LOD)は、UGPase については 2,500 コピー、Tnos・P35S については 12.5 コピーであることが示唆された。定量下限(LOQ)は、UGPase では 250 コピー、Tnos、P35S では 12.5 コピーであった。Tnos と P35S の検出感度は UGPase よりも高いことから、GM ジャガイモのスクリーニング法に適合していることが示唆された。

実際に市販されているジャガイモ加工食品に意図しない GM ジャガイモの混入を検査するため、開発した GM ジャガイモのスクリーニング検査を行った。その結果、検査を行った全てのジャガイモ製品に GM ジャガイモは検出されず、Tnos や P35S の検査で高い Ct 値(38 以上)を検出した製品については、食品へのバクテリアやウイルスの汚染によることが考えられた。

E. 結論

リアルタイム PCR を使用すれば、GM トマトに使

用される可能性が高い P35S を高感度に検出することが可能であることが明らかとなった。また、本研究により、国内で市販されているトマト加工製品に CaMV のコンタミネーションによる擬陽性判定の結果が得られる可能性が示唆された。今後、リアルタイム PCR を使用して CaMV ゲノム配列の検出と CaMV 35S プロモーターの検出を同時に行い、得られる Ct 値の差を検出することで GM トマトの混入を調査することが可能であると考えられた。

現在、世界では多くの GM ジャガイモが開発されていることが報じられているが、日本で安全性が承認されているものは、米国産害虫抵抗性の GM ジャガイモのニューリーフみである。ニューリーフ・ジャガイモ (SPBT02-5 系統、Bt-6 系統、SEMT15-15 系統、SEMT15-02 系統、RBMT15-101 系統、RBMT21-350 系統)を検出するための定性 PCR 法の標的増幅産物は、111 bp 又は 117 bp に設定されており、その検知法は公定法として報告されている。加えて、我が国で未承認の GM ジャガイモの中で海外で作出報告のある品種は 3 種類程度存在する。そこで、意図しないこれらの GM ジャガイモのジャガイモ食品への混入をより高い精度で検査するための、GM ジャガイモ検出法の開発が求められていた。GM ジャガイモの検出法は、まずジャガイモ内在性遺伝子の検出を前提とし、ゲノム中に組み込まれた遺伝子の検出を必要とする。また、それらを検出する方法の特異性及び検出感度も重要である。本研究では、特異的、且つ高感度な GM ジャガイモをスクリーニングする検出技術を開発することができた。

我が国の GM 表示対象であるジャガイモ加工食品 6 種(ポテトスナック、冷凍ジャガイモ、乾燥ジャガイモ、ジャガイモデンプン、調理済みジャガイモ惣菜食品、ジャガイモデンプンを加工した食品)から抽出・精製された DNA は、51~101 bp 程度まで断片化されていることが示唆され、リアルタイム PCR を用いて標的配列を検出することが可能であることが示唆された。GM ジャガイモに汎用される Tnos(過去データによると AV43-6-G7 系統には Tnos は含まれないとされているが、今回新たな調べにより全ての GM ジャガイモに Tnos が含まれるとされた)及び P35S を特異的に検出するリアルタイム PCR 法を用い GM ジャガイモの混入を検査することが可能であることが示唆された。

ジャガイモ加工食品の GM ジャガイモ混入に関する実態調査を行った結果、GM ジャガイモの混入は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 清水えり、布藤聡、増渕友子、峯岸恭孝、笠原正輝、穂山浩、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., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 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, *Journal of AOAC International*, 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, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56, 306-311 (2010)
- 8) 清水興介、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)
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, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8145-8151 (2010)
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)
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, *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 17, 123-128 (2010)
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, *Japanese Journal of Food Chemistry and 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 Science and Technology Research*, 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, *Journal of AOAC International*, 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, *Analytical Chemistry*, 82, 9909-9916 (2010)
- 19) 中村厚、酒井信夫、川浦知子、安達玲子、穂山浩、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*, 17, 213-220 (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)*, 52, 100-107 (2011)
- 21) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34, 1648-1651 (2011)
- 22) Matemu, A.O., Nakamura, K., Kayahara, H., Murasawa, H., Katayama, S., Nakamura, S. Enhanced Antiviral Activity of Soybean β -Conglycinin-Derived Peptides by Acylation with Saturated Fatty Acids. *Journal of Food Science*, 76(6), 299-304 (2011)
- 23) Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K., Teshima, R. 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. *Journal of AOAC International*, 94, 1540-1547 (2011)
- 24) Ohashi-Suzuki, M., Yabu, Y., Ohshima, S., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Kita, K., Ohta, N., Suzuki, T. Differential Kinetic Activities of Glycerol Kinase among African Trypanosome Species: Phylogenetic and Therapeutic Implications. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(5), 615-621 (2011)
- 25) Suzuki, A., Duc, H. P. N., Nakamura, K., Akiyama, H. and Kasahara, Y. Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 81, 18-23, (2011)
- 26) Kasama, K., Inoue, Y., Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R. Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 19, 215-222, (2012)
- 27) Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R. Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System. *Food Hygiene and Safety Science (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)*, 53, 157-165 (2012)
- 28) Nakamura, K., Ohtsuki, T., Mori, H., Hoshino, H., Hoque, A., Oue, A., Kanou, F., Sakagami, H., Tanamoto, K., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Ogawa, H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research*, 94, 89-97 (2012)
- 29) Mano J., Harada, M., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Noritake, H., Iizuka, T., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R.,

- Furui, S., Kitta, K. Single-laboratory validation of comprehensive GMO detection method using real-time PCR array, *Journal of AOAC International*, 95, 508-516 (2012)
- 30) Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S. Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in *Pichia pastoris* using codon optimization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2013, in press.
- 31) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Teshima, R. Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2013, in press.
- 32) Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products. *Food Control*, 2013, in press.
- 33) Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products. *Food Chemistry*, 136(2), 895-901, 2013
2. 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、布籐聡、峯岸恭孝、穂山浩、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、穂山浩、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) 穂山浩、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) 穂山浩、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、穂山浩、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、布籐聡、穂山浩、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、穂山浩、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、穂山浩、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 124th 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 124th 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 124th Annual Meeting (2010.9)
- 15) 穂山浩、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)
- 17) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Noguchi, A., Kondo, K., and Teshima, R. Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain in Processed Food. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011.9)
- 18) 中村公亮、穂山浩、濱岡志津子、大森清美、坂田こずえ、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、近藤一成、手島玲子：加工食品からの未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検出について (第二報)、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会 (2011. 11)
- 19) 野口秋雄、穂山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子：スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発 (第一報)、第 102 回日本食品衛生学会 学術講演会、秋田 (2011. 9)
- 20) 高橋勇貴、中村公亮、穂山浩、明石良、橘田和美、中澤裕之、近藤一成、手島玲子：パパイヤ加工品の未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検出に関する調査について、第 102 回日本食品衛生学会 学術講演会 (2011. 9)
- 21) 北川麻美子、山田千尋、中村公亮、小林武史、川上浩、穂山浩、手島玲子：野菜加工品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に関する研究 (第一報)、日本食品化学学会第 17 回 総会・学術大会 (2011. 5)
- 22) 穂山浩、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 年度産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の混入率と系統分析、日本食品化学学会第 17 回 総会・学術大会 (2011. 5)
- 23) 中村公亮、穂山浩、濱岡志津子、大森清美、坂田こずえ、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検知法開発について (第一報)、日本食品化学学会第 17 回 総会・学術大会 (2011. 5)
- 24) 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、坂田こずえ、穂山浩、手島玲子：リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子組換え (GM) サケの特異的検知法の開発、日本薬学会第 131 年会 (2011. 3)
- 25) 高橋勇貴、中村公亮、穂山浩、大森清美、笠原正輝、中澤裕之、橘田和美、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換えパパイヤ (GM) パパイヤ 55-1 系統検知法のパパイヤ含有食品への適用性と検出感度について、日本薬学会第 132 回年会 (2012. 3)
- 26) 穂山浩：遺伝子組換え食品と検査法の動向と課題、日本薬学会第 132 回年会 (2012. 3)
- 27) 高橋勇貴、中村公亮、穂山浩、大森清美、笠原正輝、中澤裕之、橘田和美、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換え (GM) パパイヤ 55-1 系統検知法のパパイヤ含有食品への適用性と検出感度について、日本薬学会 第 132 年会 (2012. 3)
- 28) 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、穂山浩、坂田こずえ、野口秋雄、近藤一成、手島玲子：加工品中の遺伝子組換えサケのコンストラクト構造を標的とした新規検知法の開発、日本薬学会第 132 年会 (2012. 3)
- 29) Nakamura, K., Matsuoka, H., Nakashima, S., Kanda, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H. Apple procyanidins inhibit development of collagen-induced arthritis via down-regulation of Th17 response. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.2).
- 30) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R. Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting genetically modified Bt rice lines harboring

- CpTI—KDEL—T-nos transgenic construct in rice product. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)
- 31) Morimoto, K., Katayama, S., Fukumoto, T., Nakamura, K., Nakamura, S. Amyloidogenicities of artificially synthesized human stefins A and B. 2012 ISNFF-Functional Foods, Nutraceuticals, Natural Health Products and Dietary Supplements, Hawaii, USA, (2012.12)
- 32) Nakamura, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R. Applicability of Qualitative and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Method for Detecting Genetically Modified Papaya Line 55-1 to Papaya Products. 126th AOAC Annual Meeting & Exposition, Las Vegas, USA, (2012.10)
- 33) 中村公亮、穠山浩、松岡英樹、中島翔平、神田智正、近藤一成、手島玲子：リンゴプロシアニジン(ACT)の経口摂取によるコラーゲン誘導性関節炎の発症遅延効果, 日本薬学会 第133年会、横浜、(2013. 3)
- 34) 中島治、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子：ヒトエリスロポエチン遺伝子を導入された組換えニワトリに由来する肉の検知法について、日本薬学会 第133年会、横浜、(2013. 3)
- 35) 近藤一成、小櫃冨未、小林友子、中村公亮、坂田こずえ、野口秋雄、手島玲子：PCR-RFLP法を用いたクサウラベニタケの迅速同定法, 日本薬学会 第133年会、横浜、(2013. 3)
- 36) 中村公亮、穠山浩、河野徳昭、吉松嘉代、野口秋雄、近藤一成、真野潤一、橘田和美、手島玲子：日欧で検出された安全性未審査遺伝子組換えコメ(Kefeng 系統)混入に関する検知技術の開発について(第2報)、日本食品化学学会第18回 総会・学術大会、函館、(2012. 6)
- 37) 高島令王奈、則武寛通、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、真野潤一、橘田和美：加工品を含む複数のスイートコーン試料からのDNA抽出法の検討、日本食品化学学会第18回 総会・学術大会、函館、(2012. 6)
- 38) 中村公亮、穠山浩、野口秋雄、小林友子、坂田こずえ、近藤一成、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：パパイヤ加工品の遺伝子組換えパパイヤ含有に関する総合的評価法、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012. 11)
- 34) 野口秋雄、中村公亮、坂田こずえ、小林友子、大森清美、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、穠山浩、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換えパパイヤ55-1系統特異的検知法の妥当性評価、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012. 11)
- 35) 近藤一成、坂田こずえ、小櫃冨未、中村公亮、野口秋雄、手島玲子：フロクマリン類の*in vitro*光毒性について、第49回全国衛生化学技術協議会年会、香川、(2012. 11)
- 36) 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子：スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発(第二報)、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 37) 小林友子、中村公亮、近藤一成、野口秋雄、小櫃冨未、峯岸恭孝、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：遺伝子組換えコメ検知法に用いる内在性遺伝子の比較検討、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 38) 中村公亮、南竹優美、近藤一成、野口秋雄、小櫃冨未、真野潤一、高島令王奈、橘田和美、穠山浩、川上浩、手島玲子：遺伝子組換え表示対象のジャガイモ加工食品から抽出されるジャガイモDNAの断片長について、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 39) 真野潤一、高島かおり、峯岸恭孝、二宮健二、布藤聡、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：遺伝子組換えトウモロコシグループテストリング法におけるグループ作成法及び系統判別試験法の確立、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- 40) 西辻泰之、菊池洋介、真野潤一、福留真一、遠藤繁、林田拓也、川上裕之、栗本洋一、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、穠山浩、手島玲子、高島令王奈、橘田和美：プロリンリッチプロテイン遺伝子を標的としたコムギ内在性遺伝子検出系の開発とリアルタイムPCRアレイ法への適用、第104回日本食品衛生学会学術講演会、岡山、(2012. 9)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

平成 22-24 年度 分担研究報告書

非食用遺伝子組換え微生物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

食品添加物等を生産するための遺伝子組換え微生物やワクチン等の医療を目的とする遺伝子組換え微生物は既に実用化あるいは実用化に近い状態であり、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情報収集を行った。文献等により現在実用化ないしは開発中の微生物組換えに関する情報のデータベース化を行った。

上述の組換え微生物が食品などに混入し我々が経口的に摂取してしまうことを想定し、乳酸菌モデル組換え体を用いて、食品からの検知手法について検討した。グラム陽性細菌では、遺伝子組換えに用いる抗生物質耐性マーカーの種類が限られており、エリスロマイシン耐性遺伝子を標的にして組換え体検出のスクリーニングを行うことが有用と考えられた。しかし、生の食肉を対象として人工的に混入させたモデル組換え体の検知を試みたところ、抗生物質マーカー単独では、食品に常在する耐性菌の影響を受け検知は難しいことが示された。これは食品に存在する常在菌がしばしばエリスロマイシン耐性を獲得しているため、エリスロマイシン耐性などのマーカー以外の組換え体に特有の遺伝子配列を評価する必要が示された。マルチクローニングサイトは常在菌に存在することは稀であり、コロニーハイブリダイゼーション法を用いれば、グラム陽性の遺伝子組換え微生物を検知することが可能であると思われた。

組換え微生物に関しては、組換え体の遺伝子情報がない場合の検知は容易ではないが、2種類以上の組換え体に特有と思われる遺伝子配列を標的として、コロニーハイブリダイゼーション法により、評価する方法は有用と思われる。今回の研究によりまとめられた遺伝子組換え微生物のデータベースを参考にして、この中から検知に有用と思われる遺伝子を2種類以上決定し、コロニーハイブリダイゼーションにより評価する方法は、他の微生物組換え体の検知にも利用可能と思われる

協力研究者

食品衛生管理部 江川 智哉

食品衛生管理部 梶田 和彌

食品衛生管理部 梶川 揚申

A. 研究目的

食品添加物等を生産するための遺伝子組

換え微生物やワクチン等の医療を目的とする遺伝子組換え微生物は実用化あるいは実用化に近い状態であり、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おこなうこととした。

大腸菌、乳酸菌、枯草菌および酵母などの微生物を対象として、遺伝子組換えに用いるベクター、マーカー、プロモーターなどに関する情報収集を行った後、これらの情報をデータベース化し、そのデータを基に、検知法を検討することにした。

環境浄化目的の遺伝子組換え微生物に関する研究は関連する遺伝子情報を探している状況でその実用化にはかなりの時間が必要と思われた。一方、ヨーロッパやアジアを中心に乳酸菌を用いた経口ワクチン開発や腸管内機能製剤開発に関する研究が進んでいることから、これらの研究に関する情報収集を重点的に行い、モデル乳酸菌組換え体を用いて、食品からの微生物の検知法に関する検討を進めた。

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こととした。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遺伝子組換え微生物の定量的検知法について検討を開始した。

単独の遺伝子を標的にして組換え微生物の検知を試みても食品の常在菌の影響を受けて組換え微生物の検知は難しかったため、エリスロマイシン耐性遺伝子を検出するプローブとマルチクローニングサイトを検出するプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法を確立し、確立した方法で組換え体を検知することが可能であるか検討を行った。

B. 研究方法

1. 微生物組換え体に関する情報収集

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、海外の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行った。微生物全てについてデータベース化を行うことは困難であることから、組換え体に関する論文数の多い微生物として大腸菌、乳酸菌、枯草菌および酵母などを対象とし、データベース化を行った。

海外の情報収集では、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、平成 22 年度に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。平成 23 年度は、フランスで開催された国際酪農連盟の分析週間に参加し、微生物の検知法に関する会議に出席し情報収集を行った。その後、オースト

リアで開催された腸内細菌に関する国際シンポジウムで乳酸菌組換え体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を行った。

大腸菌、乳酸菌、枯草菌および酵母などの微生物を対象として、遺伝子組換えに用いるベクター、マーカー、プロモーターなどに関する情報をデータベース化した。

ヨーロッパやアジアを中心に乳酸菌を用いた経口ワクチン開発や腸管内機能製剤開発が盛んに行われていることから、この分野の研究について重点的に情報収集を行った。

2. モデル組換え体

グラム陽性細菌の遺伝子組換えに用いられている抗生物質耐性は、実用的にはエリスロマイシンが多用されていることから、エリスロマイシンをマーカーとして食品（市販の生肉）に混入した乳酸菌モデル組換え体の検出を試みた。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。

3. 遺伝子組換え微生物の検知技術の検討

乳酸菌のモデル組換え体を用いて、エリスロマイシン耐性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。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、組換え体上に 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。

さらに、市販の豚肉に存在したエリスロマイシン耐性菌を単離・同定し、耐性遺伝子の存在位置をサザンブロッティングで解析した。また、データベースを中心に組換え体に利用されているエリスロマイシン耐性遺伝子に関する情報収集を行った。検討の結果、食品中にエリスロマイシン耐性の常在菌が存在するため、モデル組換え体の検知法としては新たな工夫が求められた。エリスロマイシン耐性遺伝子とマルチクローニングサイトを標的とし検討した。

エリスロマイシン耐性には非常に多種類の遺伝子が存在することから、遺伝子組み換えに多用されているエリスロマイシン耐性遺伝子の特異的に確認するため、新たにコロニーハイブリダイゼーション法を検討した。エリスロマイシン耐性マーカーについては、*ermB* 遺伝子、*ermC* 遺伝子のプローブである Probe *ermB*、Probe *ermC* を用いた。マルチクローニングサイトとしては、モデル組換え乳酸菌である *L. casei*

IGM393 が保持するプラスミド pLPempty のマルチクローニングサイトの配列を基に Probe MCS を合成した。

合成したプローブを用い、豚肉から常在菌として単離したエリスロマイシン耐性菌 5 株との反応性をコロニーハイブリダイゼーションで検討した。まず、コロニーリフトの調製は定法に従い、エリスロマイシンを含む MRS プロスで一晩培養した菌液を、エリスロマイシンを含む MRS アガープレートに塗抹し、コロニーを得た。コロニーを含むプレートの表面にメンブレンディスクを乗せコロニーの転写を試みた。しかしながら、この方法では、コロニーがメンブレンにほとんど転写されなかった。転写を助けるために、メンブレンを乗せてさらに数時間培養する方法や、乗せたメンブレンを滅菌綿棒で上から軽くこする方法についても検討したが、確実にコロニーを転写することは困難で、ハイブリダイゼーションにおいても検出シグナルが弱く、プローブの特異性を確認することはできなかった。

そこで、フィルトレーションユニットにセットしたメンブレンに菌を吸引濾過する方法である Peterkin ら (1989) の示した HGMFs (Hydrophobic Grid Membrane Filtration) 法を参考にし、メンブレン上にコロニーを出現させることにした。

アガープレート上にメンブレンディスクを設置し、その上から培養菌液をスパイラルプレーターで均一に塗抹した。37°C で二晩培養したプレートからメンブレンを剥がし、メンブレンを風乾させてコロニーリフトを調製した。メンブレン上にあるコロニーの変性は、0.5M NaOH, 1.5M NaCl で処理し、1.0 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl, pH

7.4 で中和させた。核酸の架橋は、UV クロスリンカーで 250mJ の紫外線を照射した。コロニーのデブリスはプロテナーゼ K 溶液で処理し取り除いた。

ハイブリダイゼーションには、3 種類の DNA プローブ Probe ermB、Probe ermC、Probe MCS を使用した。一つのプローブと反応させた後は、プローブを剥離し、新たなプローブと反応させた。

C. 研究結果

1. 微生物組換え体に関する情報収集

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、平成 21 年度までの研究班で研究用・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、新しい情報の追加を行った。

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、食品安全委員会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、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を作成した。各リストについては、平成 22 年度の分担研究報告書を確認していただきたい。

海外の情報収集として、平成 22 年はスロバキアのコシツェ市で開催されたプロバイオティクスとプレバイオティクスの国際会

議でポスター発表を行った。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。

平成 23 年はフランスのリヨンで開催された国際酪農連盟の検査法に関する会議に参加し、その後オーストリアのウィーンで開催された腸内細菌国際シンポジウムでポスター発表を行った。遺伝子組換え微生物の検知法に関する情報交換を行った。ヨーロッパでも遺伝子組換え微生物を生きたまま用いることは実用化には至っていないのが現状であった。

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、研究成果の発表と情報収集を行った。

2. モデル組換え体

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。

3. 遺伝子組換え微生物の検知技術の検討

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。平成 22 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。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。

L. casei IGM232 株のクロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子と、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を得た。*L.*

casei IGM393 株のクロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子と、プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的とした結果を得た。

菌数と Ct 値の結果から、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。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。

モデル組換え乳酸菌を生肉に接種後ただちに検知した結果と接種後 24 時間培養した時の結果を検討した。IGM232 株接種直後では、*ldh* 遺伝子および *ery* 遺伝子ともに菌数として、 6×10^4 cfu、コピー数として 86 および 192 コピーまで検出可能であることが示された。IGM393 株接種直後では、クロモゾーム上の *ldhD* 遺伝子を標的とした場合、 6×10^4 cfu を検出した。プラスミド上の *ermC* 遺伝子を標的すると 6×10^3 cfu まで検出することが可能であった。コピー数においては、*ermC* 遺伝子の方が *ldh* 遺伝子より約 40 倍多いことが明らかとなった。

MRS 培地で 24 時間増菌した場合、両菌株接種群とも低レベルの菌の増殖が認められた。*ery* 遺伝子は、非接種においても検知され、自然界に存在した常在菌がエリスロマイシン耐性遺伝子を保持していた可能性が示唆された。そこで、モデル組換え乳酸菌を接種していない豚肉検体からエリスロマイシン耐性菌を 24 株単離し、*ery* プライ

マーおよび *ermC* プライマーを用いて PCR で評価した。そのうち 3 株は *ery* 遺伝子を保有しており、2 株は *ermC* 遺伝子を保有していた。16S *rRNA* 遺伝子の塩基配列から、*ery* を保有する 3 株は、*Streptococcus salivarius* と同定され、*ermC* を保有する 2 株は *Staphyrococcus hominis* と同定された。

次に、これらの菌がエリスロマイシン耐性遺伝子をどこに保持するのか、サザンブロット解析で検討した。各菌株から抽出したゲノム DNA をブロットしたものに *ery* プローブをハイブリダイズさせた場合、*Streptococcus salivarius* において、スメアなバンドが検出された。また、プラスミド DNA をブロットし、*ermC* プローブをハイブリダイズした場合、*Staphyrococcus hominis* において 1 本のバンドが検出された。これらの結果より、*Streptococcus salivarius* は、*ery* 遺伝子をクロモゾーム上に保有し、*Staphyrococcus hominis* は、*ermC* 遺伝子をプラスミド上に保有していることが示された。

エリスロマイシン耐性のみで、組換え体を検知しようとしても、常在菌のエリスロマイシン耐性株により、正確な評価は難しいため、コロニーハイブリダイゼーション法により、複数の遺伝子を標的として評価することにした。今回調製したコロニーリフトでは、メンブレン上にほとんど重なり合うことなくコロニーを 50 から 150 個出現させることができた。メンブレン上のコロニーの大きさは、プレート 1、4、5 が一番小さく、6、7 が中程度の大きさで、2、3 が一番大きかった。出現したコロニーに対して各プローブを用いてハイブリダイゼー

ションを試みた。複数プレートで、また *ermB* 遺伝子を保持する *L. casei* IGM232 のコロニーでは高感度で 100%検出した。また、一部のプレートにおいて数個のコロニーを検出した。*ermC* 遺伝子を保持する *L. casei* IGM393 は検出しなかった。Probe *ermC* で検出した結果、複数のプレートと *L. casei* IGM393 では検出し、3つのプレートと、*L. casei* IGM232 では検出しなかった。*L. casei* IGM393 の検出率は 100%であったが、2つのプレートの平均検出率は、70%で、検出シグナルは明瞭ではなかった。

Probe MCS で検出した結果、*L. casei* IGM232 と *L. casei* IGM393 を 100%検出し、常在菌のプレートでは検出しなかった。Probe MCS は、MCS の配列を保持しないと考えていた *L. casei* IGM232 においても反応した。*L. casei* IGM232 の由来は、その親株にトランスポゾンを用いてクロモソームに *ermB* 遺伝子を挿入したものである。親株は、全ゲノム配列が解読されており、MCS に類似する配列がないことは事前に確認している。実際、Probe MCS を親株に反応させたが検出シグナルは認められなかった。今回、検出に差は認められたが、3種類のプローブを用いることにより、エリスロマイシン耐性菌を検出することが可能であった。それらの中で自然界から分離したものは、一つのプローブに反応するものが多いのに対して、組換え体モデル乳酸菌である *L. casei* IGM393 は、Probe *ermC* と Probe MCS の両プローブで検出が可能であり、これら 2つのプローブを用いることにより、組換え体を検知することが可能であった。

D. 考察

1. 微生物組換え体に関する情報収集

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、平成 21 年度までの 3 年間に行われた研究により、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と思われた。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。

実用化されている組換え体に関する情報収集では、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。これまでに食品安全委員会で、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は 7 件であった。

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、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を作成した。このリストは、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。

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、平成 22 年度に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かをはっきりとさせるべきだとされた。また組換えなどを利用し新たに開発される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。

海外における遺伝子組換え微生物研究は急速に進んでいる一方で、多くの場合は研究段階である。また実用化されている遺伝子組換え微生物では主に閉鎖系における物質生産に利用されており、生菌が環境中に放出する可能性は低い。

遺伝子組換え微生物に関して、生きている遺伝子組換え微生物の安全性並びに環境への放出のリスクに関する方向性が決まっていないため、開放系で用いられることを前提とした遺伝子組換え微生物の実用化は遅れていると思われる。したがって、環境中から遺伝子組換え微生物が検出されるとすると、実験段階の遺伝子組換え微生物が漏出した場合や、正規の扱いを受けていない組換え体の可能性が高いと思われる。このような遺伝子組換え体は、組換えに関する情報が不明であるため、当該組換え体を検知することは容易ではない。そこで、遺伝子組換えのマーカーとして広く用いられている耐性遺伝子に着目してこのような組換え微生物を検出する方法の検討は重要であると考えている。

2. モデル組換え体

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 *L. 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、組換え体(IGM232)株やプラスミド上には 1 コピーのみ存在することを確認した。今回実験を用いるうえで、大変使いやすいモデル組換え体であった。

3. 遺伝子組換え微生物の検知技術の検討

遺伝子組換え微生物の定量的検知法に関する検討を進めた。平成 22 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。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、期待したとお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、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、エリスロマイシン遺伝子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、遺伝子配列の確認を必要とした。

平成 23 年度は、グラム陽性菌で頻繁に用いられているマーカーであるエリスロマイシン遺伝子を標的として、組換え微生物の定量的検知法に関する検討を進めた。モデル組換え体として乳酸菌を用い、豚肉に接種後定量 PCR を行い評価した。

接種直後において 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を比べてみると、ほぼ同じコピー数まで検知できることが明らかになった。認められる約 2 倍の差は PCR 効率の差によるものと考えられる。接種菌数とコピー数について検討してみると、 6×10^4 cfu/g 接種し、*ery* 遺伝子を標的とした場合、PCR の反応チューブあたり菌が 30 個存在したことになり、この時のコピー数は 41 コピーとなり両者に大きな差は認められず、元の遺伝子数を反映していた。

また、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、当然複数コピー存在する場合の検出感度が高く本方法で定量的に検知することが可能であることが示された。しかしながら、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耐性菌の増殖が認められ、これらの菌は少なくともエリスロマイシン耐性を示す *ery* 遺伝子および *ermC* 遺伝子を保有していた。エリスロマイシン耐性遺伝子について調べてみると、本研究で検討した *ery* および *ermC* は、リボソームメチル化に関連する *erm* 遺伝子群の一つであり、*ery* は *erm(B)* 遺伝子であった。

erm 遺伝子の中で組換え体によく利用されている *ery* (*erm(B)*) 遺伝子と *erm(C)* 遺伝子の相同性について調べた結果、相同

性は59%と低かった。組換え体検知の一次スクリーニングとして *erm* 遺伝子群のユニバーサルプライマーの設計についても検討したが、*erm* 遺伝子群のホモロジーレンジはさらに広く、共通領域は見つからなかった。また、組換え体マーカーとして利用される頻度は低いが、薬剤排出亢進にかかわる遺伝子として *msr* 遺伝子や *mef* 遺伝子等も報告されており、スクリーニングには、それぞれのプライマーセットが必要であると考えられる。エリスロマイシン耐性遺伝子は予想以上に多く、近年の報告においても新たな遺伝子が増えられている。それらが組換え体由来であるか判定することは容易ではなく、今後、プロモーターや制限酵素サイトなど、他の領域を組み合わせて検討を行っていく必要があると思われる。

乳酸菌のモデル組換え体を食肉に添加し、定量 PCR 法により定量的な検知が可能であるか検討した。グラム陽性菌の組換え体にしばしば用いられる2種類のエリスロマイシン耐性遺伝子を標的として検知法を検討した。ゲノム上に挿入した“*ery*”とプラスミド上にコードする“*ermC*”のそれぞれのモデル組換え体を用いた検討により、純培養では定量的な検知が可能である方法を開発した。

一方、食肉に添加した後検知可能であるかを検討した結果、自然界に存在する耐性菌の影響を受け、結果が不安定となった。添加回収実験を行った食肉からは、2種のエリスロマイシン耐性遺伝子を保有する常在菌が分離された。それぞれ *Staphylococcus* spp. 及び *Streptococcus* spp. が分離できたことから、食品や環境中にこのような耐性菌が広く分布しているも

のと思われた。食品や環境から遺伝子組換え細菌を検知するためには、耐性マーカー遺伝子単独では不十分で、更に1つ以上の組換え体に固有と思われる遺伝子を対象として評価をする必要があると思われ、頻度高く用いられるプロモーター配列などについて検討した。複数の遺伝子の組合せにより組換え体と思われる微生物を絞り込んでゆくことは可能である。これらの候補から、挿入配列と思われる遺伝子情報を解読することにより、探知の可能性は高まる。

一方、細菌の遺伝子組換えでは、ダブルクロスオーバー法による特定の箇所への遺伝子組換えが可能であり、この方法を用いた場合、遺伝子組換えの痕跡を残さず、組換え体を取得することが可能である。このような組換え体では、遺伝子組換えが行われたかどうかを判定することは難しいと思われる。このような場合は、挿入遺伝子の情報が無いと探知は困難であると思われる

複数の遺伝子を標的として評価する方法としては、メンブレン上に集落を形成させた後、コロニーハイブリダイゼーションを行うことは有用であると思われる。スパイラルプレーターを用いて調製したコロニーリフトはメンブレン上に均一コロニーを出現させることが可能でプローブによる検出シグナルの位置関係の特定が簡単にできた。今回確立した方法はメンブレンリフトが上手くない場合には、有用な方法であり、他の菌種にも応用できると考えられる。

コロニーの変性は菌種によって、NaOHを用いた変性処理の他にリゾチウムやSDSを加える等の条件検討が今後必要であると考えられる。豚肉より単離されたエリスロマイシン耐性菌は一部の菌で Probe *ermB*、

Probe ermC の両方で検出されるコロニーが認められたが、ほとんどが Probe ermB か Probe ermC で検出された。Probe MCS は、*L. casei* IGM393 だけでなく、*L. casei* IGM232 に対して交差性を示した。*L. casei* IGM232 に関しては、*ermB* 遺伝子を挿入する際に必要となるトランスポザブルエレメントの配列についても確認したが、プローブとの類似配列は認められなかった。そのため、組換え体作出時にマルチクロニングサイトに類似した配列が組換えにより出現した可能性が示唆される。

今回の検討結果より、エリスロマイシン遺伝子とマルチクロニングサイトを検出するプローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションを利用すれば生きた組換え微生物をスクリーニングすることが可能であると考えられる。しかしながら、近年、組換え体を作成するバイオテクノロジー応用技術は進歩しており、マルチクロニングサイトを残さない方法も確立されている。したがって、今回検討した方法でも、すべての組換え微生物を検出するには不十分であり、塩基配列の情報がない状況において遺伝子組換え微生物を検知するのは容易ではないと考えられる。

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、平成 22 年には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。平成 23 年度には、フランスで開催された国際酪農連盟の分析週間に参加し、微生物の検知法に関する会議に出席し情報収集を行った。その後、オーストリアで開催された腸内細菌に関する国際シンポジウムで乳酸菌組換え体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い、リアルタイム PCR 法で定量する方法を示した。

遺伝子組換え微生物をスクリーニングするためのコロニーハイブリダイゼーション法を確立した。確立した方法で食品から組換え体を検知することが可能であるかを検討し、2 つのプローブを用いた方法によりモデル乳酸菌組換え体を食品から検知できることが可能であった。

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. 五十君静信。自然界の薬剤耐性菌汚染食品衛生の視点から。臨床と微生物、37(6):617-622. (2010)
 5. Masuda K, Kajikawa A, and Igimi S. Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel1 cells and Raji cells. *Bioscience and Microflora*. 30(2):37-44. (2011)
 6. Saito E, Yoshida N, Kawano J, Shimizu A, Igimi S. Isolation of *Staphylococcus aureus* from raw fish in relation with culture methods. *J. Vet. Med. Sci* 73(3):287-292. (2011)
 7. 梶川揚申、五十君静信。乳酸菌組換えワクチン。書籍：新しい乳酸菌の機能と応用。in press シーエムシー出版
- 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—。日本乳酸菌学会。2010.11.20。
 3. Masuda K and Igimi S. Establishment of in vitro M cell model and evaluation of M-cell targeted genetically modified bacteria. The 6th International Yakult Symposium. The Gut and Its Role in Health Maintenance. 2011.5.26-27. Vienna, Austria
 4. Kazuya Masuda and Shizunobu Igimi. Establishment of in vitro M cell model and evaluation of genetically modified bacteria as vaccine delivery vehicles targeting M cells. 1st Biotechnology World Congress. 2012.2.14-15 (Dubai, UAE)
 5. 森田英利、Tulika Prakash、大島健志朗、藤英博、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。乳酸菌とビフィズス菌における線毛遺伝子群の解析。日本ゲノム微生物学会。2012.3.10
 6. 森田英利・藤英博・中野章代・大島健志朗・五十君静信・服部正平。*Lactobacillus casei* グループの比較ゲノム解析。日本畜産学会第 115 回大会 2012.3.27-30
 7. 森田英利、Tulika Srivastava、中野章代、高畑宗明、高木孝士、西山英利、藤英博、大島健志朗、Todd D. Taylor、五十君静信、服部正平。*Lactobacillus* 属と *Bifidobacterium* 属における線毛およ
- 学会発表
1. Masuda K., and Igimi S.: Observation of *Lactobacillus casei* IGM 393 transport using in vitro M cell model.