

内閣府食品安全委員会
平成16年度食品安全確保総合調査

遺伝子組換え微生物のヒト腸内細菌叢への影響に関する安全性評価手法等に関する文献等の収集・整理及び海外実態等の
調査報告書

平成17年2月

財団法人 日本ビフィズス菌センター

目 次

はしがき	1
概 要	2
まとめ	2
1. 文献調査	2
2. 海外研究者を対象とした調査	2
3. 海外政府関係資料調査	3
4. 国内外の学会、企業等における活動調査	3
5. GMM のヒト腸内細菌叢への影響を評価するための方法の検討	3
6. 検討委員会	3
 調査報告 1. 国内外の文献調査	4
資料 1 - 1. 英文	8
資料 1 - 2. 和文	48
 調査報告 2. 海外 (EU 加盟国、米国) の研究者を対象とした聞き取り調査	61
EU 加盟 4 カ国 7 施設	62
1) オランダ・グローニンゲン大学・メディカルセンター	62
2) オランダ・グローニンゲン大学・バイオロジカルセンター	62
3) オランダ・WCFS (Wageningen Centre for Food Sciences)	63
4) オランダ・TNO	64
5) ベルギー・ゲント大学 VIB	66
6) フランス・国立農業研究所 (INRA)	67
7) デンマーク・Danish Institute for Food and Veterinary Disease	68
 米 国	69
1) ノースカロライナ州立大学	69
2) イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校	70
 資料 2 - 1	72
 調査報告 3. 海外政府関係資料調査	74
資料 3 - 1 米国及び欧州における応用食品における遺伝子組換え微生物の利用を 支持するための一般安全性評価の概要	76
資料 3 - 2	89

調査報告 4. 国内外の学会、企業等における活動調査	90
調査の概要	91
資料 4-1 公報別 [番号] [発明の名称]	93
資料 4-2 公報別 [書誌事項] [要約] [発明の名称]	96
資料 4-3 「遺伝子組換え微生物」投与後の安全性など記載の特許	120
GMM の腸内細菌叢への影響を評価するための方法の検討	123
1. 腸内細菌叢構成菌の正常値について	124
2. 菌叢検査法の評価	125
3. 腸内代謝産物の正常値	129
4. ヒトフローラマウス／ラット、キモスタッフの利用	141
5. 検討委員会のまとめ	141
6. 今後の検討課題	142
資料 5-1	143
資料 5-2	144

はしがき

名称：「遺伝子組換え微生物のヒト腸内細菌叢への影響に関する安全性評価手法等に関する文献等の収集・整理及び海外実態等の調査」

調査組織：調査代表者 光岡知足（財団法人日本ビフィズス菌センター理事長）
調査委員会 伊藤喜久治*（学術集
会委員会委員長・東京大学大学院農学生命
科学研究科）
五十君静信（財団法人日本ビフィズス菌センター編集委
員会委員長・国立医薬品食品衛生研究所）
井上直之（財団法人日本ビフィズス菌センター常任顧
問）
佐々木隆（財団法人日本ビフィズス菌センター学術集
会委員会委員・明治乳業株式会社）
田代靖人（財団法人日本ビフィズス菌センター編集委
員会委員・明治製菓株式会社）
平山和宏（財団法人日本ビフィズス菌センター編集委
員会委員・東京大学大学院農学生命科学研
究科）

*委員長

検討委員会委員 光岡知足（同上）
上野川修一（財団法人日本ビフィズス菌センター理事長
代理・日本大学生物資源科学部）
岡村 登（財団法人日本ビフィズス菌センター情報委
員会委員長・東京医科歯科大学医学部）
檀原宏文（財団法人日本ビフィズス菌センター総務局
長・北里大学薬学部）
伊藤喜久治（同上）

概要

今回行った調査目的は「遺伝子組換え微生物(Genetically modified micro-organisms:GMM)を利用して製造される食品の審査に必要な安全性評価基準の策定にあたって、国内外におけるGMMのヒト腸内細菌叢への影響に関する安全性評価手法等に関する情報を収集・整理することにある。調査は財団法人日本ビフィズス菌センターに設けた調査委員会により以下の4項目について調査を行なった。

1. 国内外の文献調査
2. 海外(EU加盟国、米国)の研究者を対象とした聞き取り調査
3. 海外政府関係資料調査
4. 国内外の学会、企業等における活動の調査

さらにこれらの調査をもとにGMMの腸内細菌叢への影響を評価するための方法を検討するため、以下の項目について調査・整理した。

1. 腸内細菌叢構成の正常値
2. 腸内細菌叢検査法の評価
3. 腸内代謝産物の正常値
4. ヒトフローラマウス/ラット、キモスタッフの利用

まとめ

1. 文献調査(担当:平山)

1990~2004年を対象に行なった。最終的に英文78件、和文45件を抽出した。GMMの安全性については遺伝子の移動やアレルギー、Bacterial translocationに関するものがほとんどで、GMMそのもの、またGMMで作製された食品の腸内細菌叢への影響についての論文はみられなかった。GMMの腸内細菌叢への影響についての研究の必要性を記載している文献もあるが(文献4、7)、具体的な方法については今後の検討課題としている。また、GMM以外の微生物として、プロバイオティクスの腸内細菌叢への影響についての研究報告が多数検索され、腸内細菌叢構成ならびに腸内代謝両面への影響が報告されている。これとは逆に異常腸内細菌叢として炎症性腸疾患(IBD)などにおける成績も報告されている。これらの報告は今後GMMの腸内細菌叢への影響を検査するときの方法論として参考になると考える。その他腸内細菌叢構成菌の分子生物学的検索法、Bacterial translocationを中心としたプロバイオティクスの安全性などの文献も検索した。

和文では主にプロバイオティクス、プレバイオティクス摂取、IBD、大腸癌における腸内細菌叢構成菌と代謝産物の変動についての論文を主に検索した。

2. 海外研究者を対象とした調査(担当:伊藤、佐々木;五十君、平山)

オランダのグローニング大学メディカルセンター、同じくバイオロジカルセンター、ワーグ寧寧大学フードサイエンスセンター、TNO、ベルギーのゲント大学バイオテクノロジー研究所、フランスの国立農業研究所、デンマークの食品・獣疫研究所の7研究施設ならびに米国のノースカロライナ州立大学ならびにイリノイ大学アーバナ・シャンペーン校の2研究施設を訪問し、GMMの安全性、GMMの腸内細菌叢への影響などについて多くの情報を得た。

3. 海外政府関係資料調査（担当：田代）

CANTOX に依頼して行い、報告書は翻訳文を添付した。最終的に GMM の腸内細菌叢への影響を検討するためのガイドラインは各国ともないことが報告された。

4. 国内外の学会、企業等における活動調査（担当：井上）

学会関係の情報はビフィズス菌センター発足時より 20 年以上にわたり調査して機関紙に掲載してきている。これらの情報を再度検索してみたが、GMM の腸内細菌叢への影響評価に関するものは見出せなかった。企業活動については直接情報を収集することができないため、特許情報から企業活動を調査した。今回国内特許を主に検索したが、これにより海外の特許関係も入手することができる。GMM に関する特許は多く抽出できたが、GMM の腸内細菌叢への影響に対する安全性評価を検討したものはなかった。

5. GMM のヒト腸内細菌叢への影響を評価するための方法の検討（担当：伊藤、佐々木、五十君、田代）

GMM の腸内細菌叢への影響を評価するためには二つの面で検討する必要がある。一つは腸内細菌叢構成への影響、もう一つは腸内菌の代謝への影響である。これらの検査項目に正常値、異常値といえるものかどうかを知る目的で文献調査を行なった。また、腸内細菌叢の検索は最近従来の培養法とともに分子生物学的手法による解析法が取り上げられるようになったが、これらの方針がそれぞれどのような特徴を持つものかを整理した。

さらに GMM のヒト腸内細菌叢を調べるため、ヒトそのものでは個体差も大きく、採材の難しさから、ヒトフローラマウス/ラットとキモスタッフが有力な方法として考えられるので、その現状をまとめた。

6. 検討委員会において、GMM のヒト腸内細菌叢への影響に関する安全性評価手法について比較検討した。

調査報告 1. 国内外の文献調査

I. 遺伝子組換え微生物がヒト腸内フローラに与える影響を研究した文献

データベースとして MEDLINE を用い、遺伝子組換を行なった微生物がヒトの腸内フローラに与える影響に関して過去に発表された論文を遺伝子組換え（20,405 件）、微生物、腸内フローラ（137,512 件）の各キーワードおよびその類義語で検索を行なった。その結果、腸内細菌科である大腸菌を用いた技術的な論文や、導入した遺伝子が試験管内あるいは実験動物の腸内で他の腸内細菌に移動するかどうかを調べた研究は 437 件検出されたものの、遺伝子改変微生物がヒト腸内フローラの構成あるいは代謝に与える影響を直接検証した研究は検出されなかった。

II. 遺伝子組換え微生物がヒト腸内フローラに与える影響を検証するための基礎となる研究

遺伝子組換え微生物がヒトの腸内フローラに与える影響を直接研究した論文が検出されなかつたため、遺伝子改変微生物の安全性に関する論文やプロバイオティクスなどの外来の微生物がヒトの腸内フローラに与える影響を評価するための指標や評価方法に関する論文、病態時における腸内フローラの活性や構成を含めた生体にとって有益あるいは有害な腸内フローラを理解するための論文など、検索範囲を広げて論文の検索を行ない、検出された論文から本調査に関連する研究の抽出を行なった。

II-1. 腸内環境、腸内菌叢の役割、疾病時における腸内菌叢などに関連する文献

腸内環境の指標となると考えられている有機酸や腸内腐敗産物の產生などの性状や腸内細菌叢の関与が示唆されている疾患をキーワードとして文献の検索を行なった。データベースとして MEDLINE を用いたところ、該当する文献がきわめて多数であったため、過去 15 年間（1990-2004 年）の英語で発表された総説のみを対象として検索を行なった。用いたキーワードと該当した論文数は以下の通りである。検索はなるべく類義語を含むように行なった。

キーワード（論文数）

- putrefactive (11)
- indole (281)
- cresol (19)
- phenol (232)
- skatole (5)
- ammonia (809)
- hydrogen sulfide (33)
- bile acids and salts (499)
- deoxycholic acid (18)
- glucuronidase (116)
- glucosidase (236)
- volatile fatty acids または short chain fatty acids (221)
- butyrates (58)
- succinic acid (14)
- bacterial translocation (100)
- intestinal diseases (593)
- colonic neoplasms または rectal neoplasms または colorectal neoplasms (4853)

ulcerative colitis または inflammatory bowel diseases または crohn disease (2761)

このうち該当文献が 200 件以下のヒット数の比較的少なかった以下のキーワードについてはすべての文献をチェックし、本調査に関連すると思われる文献を一次選抜した。キーワードと一次選抜された文献は下記の通りである。

キーワード（選抜文献数）

putrefactive (5)
cresol (1)
skatole (0)
hydrogen sulfide (3)
deoxycholic acid (3)
glucuronidase (5)
butyrates (20)
succinic acid (0)
bacterial translocation (16)

また、該当文献数が 200 を超えるキーワードについてはすべての文献をチェックすることは困難であるため

feces または intestines または bacteria または flora の検索で該当する論文との結合検索を実施した。該当した文献はすべてチェックし、関連すると思われる文献を一次選抜した。一次選抜された文献は下記の通りである。

キーワード（選抜文献数／結合検索該当数）

indole (0/7)
phenol (1/4)
ammonia (12/66)
bile acids and salts (9/41)
glucosidase (0/8)
volatile fatty acids または short chain fatty acids (27/58)
intestinal diseases (13/106)
colonic neoplasms または rectal neoplasms または colorectal neoplasms (24/88)
ulcerative colitis または inflammatory bowel diseases または crohn disease (52/194)

このようにして一次選抜された論文から重複して検出された論文を除くと総数は 170 件となった。さらにこれらの一次選抜された文献を複数の委員で検討し、本調査に特に関連すると考えられる論文を選抜した。

II-2. 遺伝子改変食品、安全性、腸内フローラおよびプロバイオティクスに関連する文献

MEDLINE に登録されていない論文を検出するためデータベースとして BIOSIS および FSTA を用いた文献検索を行なった。検索は遺伝子改変食品、安全性、腸内フローラおよびプロバイオティクスとその類義語をキーワードとし、(財) 国際医学情報センターに委託して行なった。該当する文献の数が膨大（約 58 万件）であったため、各キーワードについて様々な結合検索を行ないさらに過去 15 年間（1990-2004 年）に発表された論文のみを対象としたところ、それぞれのデータベ

ースで 174 および 38 件の結果を得た。これらの該当論文をすべてチェックして一次選抜し、II-1 で検出された論文との重複を除去して 31 件の論文を得た。さらにこれら的一次選抜された文献を複数の委員で検討し、本研究に特に関連すると考えられる論文を選抜した。

II-3. 遺伝子改変微生物の安全性に関する文献

データベースとして MEDLINE を用い、「遺伝子改変」「安全性」「細菌」「プロバイオティクス」の各キーワードで文献検索を行った。検索はなるべく類義語を含むように行った。該当する文献が約 1,200 件であったため、これらのキーワードの間での結合検索を行ない、さらに過去 15 年間（1990-2004 年）の英語で発表された論文のみを対象とした。その結果、合計 343 件の論文が抽出された。これらの該当論文をすべてチェックして一次選抜し、II-1 および II-2 との重複を除去して 20 件の論文を得た。さらにこれら的一次選抜された文献を複数の委員で検討し、本研究に特に関連すると考えられる論文を選抜した。

II-4. プロバイオティクスの安全性に関する文献

PUBMED を用い、プロバイオティクスの安全性の評価やプロバイオティクスが腸内フローラに与える影響に関する論文の検索を行った。得られた結果から論文を一次選抜し、II-1、II-2 および II-3 との重複を除去して 83 件の論文を得た。さらにこれら的一次選抜された文献を複数の委員で検討し、本研究に特に関連すると考えられる論文を選抜した。

以上の操作により最終的に本調査に特に重要と考えられる論文を 78 件選抜した。文献リストならびに抄録の翻訳を添付する（資料 1-1）。

III. 日本国内で発表された文献

MEDLINE、BIOSIS および FSTA をデータベースとして行なった検索では邦文の文献や一部の日本国内で刊行される雑誌に掲載された論文は検出する事ができない。日本におけるプロバイオティクスの研究は国際的に見ても盛んであり、また日本には特定保健用食品の許可制度があることから日本国内で刊行される雑誌に投稿される論文は多く、その中には邦文で発表される論文も少なくない。そこで主に国内誌を対象とする JSTPlus および JMEDPlus をデータベースとし、遺伝子組み換え、プロバイオティクス、安全性、腸内フローラとその代謝、腸内環境や腸管の疾患、ならびにこれらの類義語を様々に組み合わせて（財）国際医学情報センターに委託して検索を行なった。その結果合計 565 件の論文が検出されたので、該当論文をすべてチェックして一次選抜し、さらに複数の委員で検討して本調査に特に関連すると考えられる論文を 45 件抽出した。文献リストならびに抄録を添付する（資料 1-2）。また、これらの文献は別資料として提出する。

資料 1 - 1

<1>

Adams MR.

Safety of industrial lactic acid bacteria.

J Biotechnol. 1999 Feb 19;68(2-3):171-8. Review.

工業用乳酸菌の安全性

乳酸菌(LAB)は発酵製品および非発酵製品に広く存在し、ヒトと共生する細菌叢の一般的な成分である。ヒトへの曝露および消費に関する長い歴史から、それらが安全であるという妥当な結論が導かれている。最近は健康に有益な作用を示すプロバイオティック細菌としての可能性が注目されている。しかし、LABによるヒト感染症が報告され、調査が進められている。ほとんどの症例では感染源は摂取された細菌よりもむしろ共生する LAB 細菌叢であり、また基礎疾患を有する症例や易感染状態にある症例が多い。日和見性病原菌としても、LAB は腸球菌を除く共生細菌叢の他の細菌に比べ病原性は低い。プロバイオティクスとして新種を利用するには、特に遺伝子的に修飾された種や動物由来である場合は、その安全性について詳細なエビデンスを必要とする。ここでは新しい株の安全性を評価する方法について述べる。

キーワード：発酵、細菌、プロバイオティクス

<2>

Ahmed FE

Genetically modified probiotics in foods.

Trends in Biotechnology, 21 (11): 491-497, 2003

食品中の遺伝子的に修飾されたプロバイオティクス

プロバイオティクスは治療に利用できる多くの可能性を有するが、その作用についての理解が完全ではないため、広く一般的には受け入れられていない。乳酸菌(LAB)は伝統的方法や遺伝子操作により新しい変種に修飾されてきている。分子生物学的な現代的手法はプロバイオティクス LAB (乳酸菌) 株の同定を促進しているが、特にヨーロッパでは市場への導入に対する消費者の抵抗感から、組み換え DNA 技術による修飾が行われている LAB の数は非常に少ない。

<3>

Asfie M; Yoshijima T; Sugita H.

Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method.

Fisheries Science (Tokyo), 69 (1): 21-26, 2003

蛍光 *in situ*ハイブリダイゼーション法による金魚糞便中細菌叢の特性解析

蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法(FISH)によって金魚糞便中細菌の特性解析を行った。rRNA を標的とする合計 9 つの異なる群に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いた。微生物細胞のおよそ半分($57.8 \pm 16.7\%$)が、EUB338 プローブによって検出され、細菌であることが判明した。5 検体からの 35 サンプル中の 33-35 サンプルにおける微生物細胞が、ALF1b プローブ、BET42a プローブおよび GAM42a プローブと強いハイブリッドを形成し、金魚の腸内細菌が、主として Proteobacteria の α 、 β 、 γ サブクラスのよって構成されていることを示唆した。AER66 プローブが全 35 サンプル中の総微生物細胞数の $25.6 \pm 14.2\%$ と反応した事実は、Aeromonas 属が金魚腸管内における優勢菌種であることを示した。BAC303 プローブによって検出される A 型 Bacteroides を含む Bacteroides 属は 35 サンプル中 15 サンプルに認められ、HGC69a、CF39a、P72 プローブによって検出される分類学的グループは、35 サンプル中の 6-11 サンプルに検出された。これらの結果は、Bacteroides が、金魚腸管内で最大の日内変動と個

体間変異を示すことを強く示唆している。更に、FISH 法が魚の腸内細菌の分類学的グループを早く列挙する上でも有用であることが証明された。

<4>

Aureli P; Franciosa G.

Interactions between novel micro-organisms and intestinal flora

Digestive and Liver Disease, 34 (Supplement 2): S29-S33, 2002

新しい微生物と腸内細菌叢の相互作用

伝統的に乳製品に利用されている微生物株は、長い間安全に利用されており、一般的には安全であると考えられている。これらの微生物の多くは機能的な特質を有し、プロバイオティクスに含まれる。技術的および機能的に優れた能力のある新しい細菌種や細菌株が次々と同定されており、さらに株の改良を加速する目的で最近開発された生物化学的手段を用いて微生物を設計することも可能である。改良されたプロバイオティクスとしての機能や技術的な特性をもつ新しい微生物の能力は期待しうるものであるが、安全性に関しては今まで使われてきた微生物の記録を適用することはできないため、ヒトの健康に対する個々の検討が必要であろう。新しい微生物体によるリスクを判定し、その安全性を評価するには、第一にそれらの微生物による宿主の腸内細菌叢に対する直接的、間接的な有害作用に焦点を合わせなければならない。遺伝子的に修飾された微生物の DNA 再配列や最終産物については、親株と本質的に同等であることを完全に示すため、さらに検討を要するであろう。

<5>

Batt RM. Rutgers HC. Sancak AA.

Enteric bacteria: friend or foe?

Journal of Small Animal Practice. 37(6):261-7, 1996 Jun.

腸内細菌：敵か味方か？

正常な消化管には数多くの好気性、嫌気性細菌が存在し、宿主と正常な共生関係を保っているが、結果として局所的および全身的な副作用が生じる場合もある。小腸は細菌叢がまばらに点在する胃と豊富に存在する結腸との間の移行ゾーンである。腸内細菌叢の調節は胃酸分泌、腸運動性、胆汁および膵液分泌、糖衣表面と粘液層および食餌などの多数の因子間の複雑な相互関係の上に成り立っている。微生物間の相互作用も重要であり、酸化還元能、基質の枯渇および細菌の生育を阻害するバクテリオシン産生などの変化に関与している。正常な腸細菌叢の有益な作用としては、病原性有機体の競合的な排除や短鎖脂肪酸（結腸粘膜の重要なエネルギー源）やビタミン類などの栄養素の産生などが挙げられる。有害な作用としては、特に小腸に居住する細菌によるカロリーや必須栄養素との競合や、炎症性腸疾患を誘発あるいは一因となる粘膜損傷能である。これらの問題は正常に居住する菌の過増殖あるいは一過性の病原菌によるコロニー形成により、腔内細菌の生理学的調節が妨害される場合に強く現れる。病態生理学的な結果として、腸粘膜の直接的な損傷および体液分泌を刺激する抱合胆汁酸や水酸化脂肪酸の形成などの腔内成分の細菌代謝などが発生する。さらに粘膜の炎症を促進する細菌や細菌産物の流動増加や、菌血症や敗血症を引き起こす細菌の転流が起こりうるため、その場合には粘膜バリアが妨害されることから、さらに問題が発生する。細菌の病原性に関連する問題は、表面への付着や腸細胞の侵襲により長期コロニー形成を亢進する病原性 *Escherichia coli* の病原性スペクトルの性質に例示される。

<6>

Bokkenheuser V.

The friendly anaerobes.

Clinical Infectious Diseases. 16 Suppl 4:S427-34, 1993 Jun.

有用な嫌気性細菌

嫌気性細菌はほとんどの微生物の病原性に関与している。しかしそれらの主要な機能は疾患の誘発ではない。嫌気性菌が流行病や臨床的に重大な感染症に関与することは稀である。正常な膿生態系をコントロールする乳酸菌などの微生物や腸内嫌気性菌は、ヒトキャリヤーにおける *Clostridium difficile* の成長を抑制する作用を有すると思われる。嫌気性菌の主な役割は、真核生物を起源とする酵素により消化されない有機化合物に対する異化酵素の供給である。嫌気性菌はコレステロール、胆汁酸、ステロイドホルモンの異化に必要であり、フラボノイド配糖体を抗腫瘍形成物質へ加水分解し、デンプンを甘味料に変換し、さらに木屑、切り屑、古紙を燃料に変化させる。実際に嫌気性菌は真核細胞体を千変万化の世界に順応させうる次世代の遺伝子バンクであると思われる。

<7>

Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, Valtonen V.
Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria.
Clin Infect Dis. 2003 Mar 15;36(6):775-80.

乳酸菌またはビフィズス菌含有プロバイオティクスの安全性

ヒトにおいて乳酸菌およびビフィズス菌が感染症を来すことは非常に稀であることから、プロバイオティクスはこれらの生物体を基本としている。病原性がないことは全年齢層に及び、免疫無防備状態のヒトでも認められている。新しいプロバイオティクスに使用される株はヒトの常在菌叢から分離されるものでなければならないし、珍しいプロバイオティクス感染症の治療を阻害するような抗生物質耐性を内在していてはならない。ごく稀に認められるプロバイオティクスによる感染例を発見するために警戒を怠ってはならず、分離株は分子特性を照会する施設に送付し、確認しなければならない。

<8>

Cummings JH.
Dietary carbohydrates and the colonic microflora.
Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care. 1(5):409-14, 1998 Sep.

食餌性炭水化物と腸内細菌叢

近年、腸内細菌叢の分野は休眠状態にあったが、細菌の同定に新たな化学的、分子学的手法が出現したり、バイオフィルム、プロバイオティクス、プレバイオティクスの概念の浮上に伴い、現在、活気付いている。細菌が感染症、潰瘍性大腸炎、大腸癌に抵抗するバリアとして必須的役割を果たしていることが徐々に明らかになってきている。細菌を用いた新たな治療法の開発がまもなく開始されると思われるが、科学的な作用機序についての理解は不足している。

<9>

Cummings JH. Macfarlane GT.
Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism.
Journal of Parenteral & Enteral Nutrition. 21(6):357-65, 1997 Nov-Dec.

栄養分代謝における腸内細菌叢の役割

抄録—ヒトの大腸には細菌叢があるが、その成分は属的に複合しており、代謝も多様である。主要な機能は上部消化管で消化されなかった炭水化物からのエネルギーの再利用である。それは主要産出物である短鎖脂肪酸(SCFA)の発酵と吸収によって達成され、炭水化物の利用できるエネルギーの 40-50%に相当する。主要な SCFA、酢酸、プロピオン酸、酪酸は、大腸上皮

(酪酸)、肝臓（プロピオン酸）および筋肉（酢酸）によって代謝される。腸内細菌は、ビタミンBとKの合成、および胆汁酸、その他のステロールと生体異物の代謝にも関与している。

大腸の細菌叢は食事にも反応する。非澱粉性の多糖類、難消化性澱粉、オリゴ糖などの発酵性炭水化物基質の存在下において、細菌は成長し、蛋白質を活発に合成する。大腸における蛋白質の合成と生産量を測定することは困難であるが、約15gのバイオマスが毎日糞便中に排泄され、1gの細菌窒素を含有している。細菌的に合成されたアミノ酸が大腸から吸収されるかどうかについては依然明らかではない。最後に、硫酸塩減少細菌、ビフィズス菌、クロストリジアのような個々のコロニー微生物は、それぞれ健康にとって重要なと思われるやり方で食事成分に選択的に反応している。

<10>

Dai D. Walker WA.

Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut.

Advances in Pediatrics. 46:353-82, 1999.

未成熟なヒト腸における防御的栄養素と細菌コロニーの形成

抄録

ヒトの正常細菌叢は複合生態系であり、部分的にはコロニーを形成するために腸内栄養素に依存している。腸内細菌叢は代謝機能と細菌感染に対する抵抗性の点で、宿主にとって重要である。出生時に、それまで無菌であった腸において細菌のコロニー形成が始まる。食事と環境状態がこの生態系に影響する。母乳で育った満期出産乳児は、有害性の菌よりビフィズス菌が優勢な好ましい腸内細菌叢を有するが、人工乳で育った乳児では大腸菌群、腸球菌、バクテロイデスが優勢である。早産児の腸の細菌コロニーの形成パターンは、健康な生産児のものとは異なる。集中治療を要する乳児では腸内細菌の獲得が遅く、ビフィズス菌叢の確立が遅延する。限られた種類の菌による腸内コロニー形成の遅延は有害である傾向がある。細菌増殖は細菌転移を促進する大きな要因の1つである。早産児の異常なコロニー形成は壞死性腸炎の発現に関与することがある。母乳は乳児を感染から保護する。母乳の自然成分であるオリゴ糖と複合糖質は、レセプター同族体として作用することによって、腸内病原菌の腸管付着を防止しているのかもしれない。プロバイオティクスとプレバイオティクスはヒト腸内細菌叢の構成を宿主の利益になるように調節する。これらの有益な作用は、結果的に有害細菌の抑制、ビフィズス菌の発育刺激、あるいはこの両方をもたらすかもしれない。将来的には、新生児の腸の細菌コロニー形成をコントロールし、操作することは、様々な病原菌による腸内感染症の予防と治療への新しいアプローチかもしれない。

<11>

Daly K, Shirazi-Beechey SP.

Design and evaluation of group-specific oligonucleotide probes for quantitative analysis of intestinal ecosystems: Their application to assessment of equine colonic microflora.

FEMS Microbiology Ecology, 44 (2): 243-252, 2003

腸内生態系の定量的解析のための群特異的オリゴヌクレオチドプローブのデザインと評価：ウマコロニー細菌叢の評価のための適用

系統発生的に同定された腸内嫌気性菌群から的小サブユニットrRNAの保存部位相補的オリゴヌクレオチドプローブを9種類デザインし、腸内細菌叢の定量的解析に使用するため評価した。最適洗浄温度(Tw)は、各プローブの解離(Td)温度に従って決定され、標的群特異性はナイロン膜に固定された標的および非標的rRNAとのハイブリッド形成を比較することによって示された。3種類のプローブは系統発生的にClostridiaceae群である、III群、IV群、IX群を標的とし、3種類のプローブは低G+C%グラム陽性門に属する未同定群を標的にデザインされた。残りの3種類のプローブはCytophaga-Flexibacter-Bacteroides集団、

Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus 群、および Spirochaetaceae を対象とする。その他の腸内細菌群を標的とした市販されているプローブとともに、これらのプローブをウマのコロニーサンプルから抽出した rRNA に適用したところ、ウマの大腸に定着する優勢な細菌集団に関する一次定量データが得られた。結果は、Spirochaetaceae、Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides 集団、Eubacterium rectale-Clostridium coccoides 群、Clostridiaceae の不明 C 群がウマの腸における最大の集団であることを示しており、それぞれがサンプルを採取したウマの全細菌叢の 10-30%を構成している。その他の検出された目立つ集団は、Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus 群、Fibrobacter および不明 B 群であり、それぞれが全細菌叢の 1~10%を構成していた。これらのプローブ一式を用いた場合の平均カバー率は全細菌叢の 75%を超えた。

<12>

Delcenserie V; Bechoux N; Leonard T; China B, Daube G

Discrimination between Bifidobacterium species from human and animal origin by PCR-restriction fragment length polymorphism

Journal of Food Protection, 67 (6): 1284-1288, 2004

ヒトおよび動物が起源のビフィズス菌種の PCR-RFLP (制限酵素断片長多型分析) 法による判別

ビフィズス菌はヒトおよび動物の正常細菌叢である。ビフィズス属には宿主特異的な 31 菌種がある。その特性を考慮してビフィズス菌を糞便汚染の指標として用いることを提唱した。16S rDNA 遺伝子に対する PCR-RFLP 法を用いて、種々のビフィズス菌種を判別した。1 ないし 2 つの制限酵素を用いることによってヒトもしくは動物起源の 13 菌種に属する 64 菌株を判別した。さらに、用いたプライマーはビフィズス属に特異的であった。従って、本法によってサンプル中のビフィズス菌の存在と汚染の起源の両方を決定することが可能になった。

<13>

Doyle JD, Stotzky G, McClung G, Hendricks CW.

Effects of genetically engineered microorganisms on microbial populations and processes in natural habitats.

Advances in Applied Microbiology. 40:237-87, 1995.

自然環境における微生物の数とプロセスに及ぼす遺伝子組換え微生物の影響過程

1. 序文

自然環境における遺伝子組換え微生物(GEM)の生存(表 1) および遺伝子移動(表 2)に関する研究数は比較的限られている(Armstrong ら、1987, 1989; Bentjen ら、1989; Levy および Miller、1989; Stotzky、1992; Stotzky および Babich、1984, 1986; Stotzky ら、1991; Trevors ら、1987; Walter ら、1987, 1991; Wellington および van Elsas、1992)。GEM 導入による環境への影響に関して行われた研究はなお一層少ない(表 3)(Casper および Landsmann、1992; Fredrickson および Hagedorn、1992; Fuxa、1989; Levin ら、1992; MacKenzie および Henry、1990; Stotzky、1990, 1991, 1992)。さらに、遺伝子組換えでない微生物が特定の計画を行うために導入されて長い歴史があるにも関わらず、自然環境へと取り込まれた遺伝子組換えでない微生物による影響について行われた研究もほとんどない(バイオ農薬については Flexner ら、1986; Gentner および Middaugh、1992; Gilbert ら、1993; James ら、1993; Laird ら、1990; Linderman ら、1991; Snarski、1990; 窒素固定のための根粒菌については Thies ら、1991, 1992、生体異物分解のための純粋培養とコンソーシアムおよびその他の問題:バイオレメディエーション、石炭浄化、エネルギー転換、燃料生産、鉱石採鉱、ミネラル浸出、石油再生、廃棄物処理)。こういった事実は驚くべきで、生態学的影響(すなわち、微生物放出以外の影響)の可能性を考えるには微生物(遺伝子組換えの有無にかかわらず)を自然環境に放出することへの基本的な関心が必要である。

GEM を自然環境に放つことによる影響を評価する場合には多くの問題について検討する必要がある（表 4）。しかし、たとえ取り込まれた微生物が生存し、かつ、またはその遺伝情報を常有する微生物またはそれ以外に取り込まれた微生物に伝達されても、新たな遺伝子の発現により自然環境に容認しがたい変化がおこるのでなければ心配する根拠はほとんどないであろう（Stotzky ら、1991）。

‘野生型’微生物に従来の方法であれ、組換え法であれ外来の遺伝子を導入することで、その生物の遺伝子型が変化するだけでなく、レシピエントの形質発現において容認しがたい変化が起こりうる。言い換えると自然環境に容認しがたい影響を及ぼす可能性がある（Austin ら、1990; Bentley ら、1990; Doyle ら、1991; Kozyrovskaia ら、1984; Lagares ら、1992; Morisaki ら、1992; Nambiar ら、1990; Shoham ら、1991; Short ら、1991; Tapp ら、1994; Venkateswerlu および Stotzky、1992; Williamson および Hartel、1991）。GEM が生態系の構造や機能に及ぼすであろう作用は、導入の様式、空間的、時間的分布、および GEM が放たれる環境の物理化学的、生物学的特性によっても影響されるであろう（表 5）（Doyle、1993; Doyle および Hendricks、1993; Seidler および Hern、1988; Stotzky、1989、1990、1991、1992; Stotzky ら、1991、1993; Trevors ら、1990）。

導入生物による潜在的な生態学的影響があまり広範に研究されてこなかった理由には以下のようなものがある：潜在的影響がどのように発現するか予測不可能；どのような環境レベルで（例えばミクロ生態学対マクロ生態学）影響を追及すべきかを決定するのに必要な生態学的知識の欠如；異なる環境における影響を検出するために最も適切な方法に関する情報の不足

（Pickup ら、1991; Smit ら、1992; Stotzky ら、1993）；結果の解釈法についての問題（Babich ら、1983; Stotzky ら、1993）（表 6、7）。ここでは自然環境に対する GEM の潜在的影響に対する現在の、不適切な知識状態を啓発するために、水域環境や陸環境に放たれた GEM による生態学的影響について行われた数少ない研究について簡潔にレビューするとともに評価する。

<14>

Duc LH, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM.
Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use.
Applied & Environmental Microbiology. 70(4):2161-71, 2004 Apr.

ヒト用バシラス属プロバイオティクスの特性検討

細菌胞子を成分とする 5 種類の市販バイオティクス製品に含有される *Bacillus* 属 (*Bacillus cereus*、*Bacillus clausii*、*Bacillus pumilus*)について、主張されているプロバイオティック作用を説明することができる特性（コロニー形成作用、免疫刺激作用、抗菌作用）に関して検討した。*B.cereus* 3 株は、マウスに投与後最高 18 日間消化管内に存続することが認められ、これらの細菌がコロニーを形成するためのある程度の能力を有していることを示した。*B.cereus* 1 株の胞子は人工胃液および人工腸液に対して極めて敏感であった。全菌株の胞子はマウスに経口投与すると、免疫原性であったが、*B. pumilus* 株は、抗胞子免疫グロブリン G 力値を特に高く上昇させることができた。*B. pumilus* 胞子と *B.subtilis* 保存株胞子は培養マクロファージ細胞株において炎症性サイトカインであるインターロイキン 6 を誘導することが認められ、in vivo では、*B. pumilus* と *B.subtilis* の胞子が炎症性サイトカイン腫瘍壞死因子アルファおよび Th1 サイトカインガンマインターフェロンを誘導した。*B. pumilus* 株と *B.cereus* 1 株 (*B.cereus* var. *vietnamensis*) は、他の *Bacillus* 菌に対してバクテリオシン様活性を示すことが認められた。コロニー形成作用、免疫刺激作用、抗菌作用のエビデンスが示された実験結果は、細菌がプロバイオティック作用を有するとする仮説を支持している。しかしながら、*B.cereus* 3 株が腸内毒素の Hb1 と Nhe も産生することが見出されたことは、ヒトへの使用を不安なものにする。

<15>

Edwards CA, Parrett AM.
Intestinal flora during the first months of life: new perspectives.

生後1カ月間の腸内細菌叢：新しい観点

ヒト腸内細菌叢が健康や疾患における重要な要因であるという認識が高まることにより、健康増進のために細菌叢を操作する種々の方策がもたらされた。成人の複雑な細菌叢を長期間変化させることは難しい。乳児の細菌叢に対しては食事の影響がより大きい。特にプロバイオティクスによる細菌叢の操作では、下痢やアレルギーの予防および治療に有望な結果が示されている。乳児全体の細菌叢を変化させることを試みる前に、消化管での細菌の定着についてよりよく理解することが必要である。消化管への定着に重要な期間は生後の離乳期である。母乳栄養の乳児の細菌叢は乳酸菌が優勢である。人工栄養の乳児ではより多様な細菌叢がみられる。母乳栄養の乳児の糞便には主に酢酸と乳酸が、人工栄養の乳児では主に酢酸とプロピオン酸がみられる。酪酸は両群ともに重要な成分ではない。人工栄養の乳児では、糞便中アンモニアおよびその他の有害な可能性のある細菌産物もより高濃度にある。細菌叢の構成は、離乳の直前や特に離乳後に多様化する。人工栄養の乳児の細菌叢は母乳栄養の乳児より速く発達する。細菌叢を変える方法に着手する前に、次のような問題を考えなければならない：炭水化物複合体の発酵能が乏しい母乳栄養型細菌叢を保持するべきか？プロバイオティクスやプレバイオティクスによって、成人の特性を持った、より多くの乳酸菌の存在する細菌叢を離乳した乳児に作り上げることができるか？そのような細菌叢の操作に関する健康上のリスクがあるか？

<16>

Elmer GW.

Probiotics: "living drugs".

Am J Health Syst Pharm. 2001 Jun 15;58(12):1101-9. Review.

プロバイオティクス：「生きている薬」

抄録：プロバイオティクスの使用、作用機序、安全性について考察する。

プロバイオティクスは生きている微生物あるいはその混合物であり、患者の微生物バランス、特に消化管と膣の環境の改善を目的として投与される。イースト菌の *Saccharomyces boulardii*、*bacterium Lactobacillus rhamnosus GG* 株は、臨床試験において抗生物質投与による下痢を防止する効果を示した。このタイプの下痢に対する予防薬として、少なくともある程度の有望性を示したその他のプロバイオティクスには、*Lactobacillus acidophilus*、*Bifidobacterium longum*、*Enterococcus faecium* などがある。*S.boulardii* は、比較試験においてメトロニダゾールあるいはパンコマイシン治療の補助薬として使用され、*Clostridium difficile* 関連疾患の再発を減少させることが見出された。プロバイオティクスが検討されたその他の消化管障害には、旅行者の下痢、乳幼児の急性下痢、成人の急性下痢などがある。ヨーグルト、錠剤あるいは坐剤として投与された幾つかの *Lactobacillus* 属菌種は膣感染症に対する臨床的治療効果を示した。*Lactobacillus* 株は尿路感染症に対する治療効果も検討された。プロバイオティクスの推定される作用機序としては、病原体阻止物質の产生、病原体の付着阻止、病原体毒素の作用を阻止、免疫グロブリン A の賦活、腸管粘膜への栄養効果などがある。市販されている製品は非病原性と考えられるが、患者がひどく衰弱している場合や、免疫機能が抑制されている場合には、良性の微生物でさえも感染源となりうる。

プロバイオティクスは、ある種の感染症に対する予防あるいは治療能力を示した。プロバイオティクスの効果的な使用によって、患者の抗菌薬への曝露を少なくすることが出来た。これらの薬剤の安全性と効果を明確にするためには、さらなる比較試験が必要である。

<17>

Fooks LJ. Gibson GR.

Probiotics as modulators of the gut flora.

British Journal of Nutrition. 88 Suppl 1:S39-49, 2002 Sep.

腸内細菌叢の修飾物質としてのプロバイオティクス

プロバイオティクスの摂取は腸内細菌叢のバランス維持の予防的アプローチとして推奨され、健康を増進するものと考えられる。特定の疾患や障害に対するプロバイオティクスの介入を利用する研究により、このアプローチによる有効性が認められた症例もある。しかしプロバイオティクスの有効性にはバラツキがあり、全ての種で同じ結果が得られるとは限らない。胃腸管に存在する厳しい物理-化学的条件を生き延びるために十分強い株が最も効率的であることが示されている。これには胃酸、胆汁分泌、常在細菌叢との競合などが含まれる。文献調査では感染症予防/治療に関する結果を報告しているヒトを対象とした50件を超える臨床試験で肯定的な結果が示されている。理論的にはプロバイオティクス濃度の上昇は一般的な病原菌に対する"バリア"を誘導する。作用機序は酸(乳酸、酢酸)排泄、栄養素および腸レセプター部位との競合、免疫調節および特定の抗微生物物質の形成が考えられている。下痢性感染症に感受性の高いヒトはプロバイオティクスの摂取が非常に効果的である。さらに長期的には炎症状態、潰瘍性大腸炎、回腸囊炎の寛解維持に役立つことが示唆されるプロバイオティクスもある。これらは遺伝毒性形成の原因となる酵素を抑制することが示唆されている。さらに過敏性腸症候群の軽減において、プロバイオティクスの抗痙攣薬としての有効性を示唆する報告もある。健康増進のための腸内細菌叢を修飾するアプローチは、急性および慢性腸疾患の治療への適合性を併せ持つ。他に、高齢者と同様に、細菌叢が変化し、有益な微生物が減少している院内感染に感受性が高いグループも対象となりうる。将来的にはプロバイオティクスを補充した場合の力学的相互作用の定義が必須であろう。さらに競合的な腸内生態系における生存に関する問題も解決されるべきであろう。この点で有用なプロバイオティクスに関連したプレバイオティクスの利用は検討する価値のあるアプローチであると思われる。プレバイオティクスはプロバイオティクスにより選択的に代謝される食餌性炭水化物である。プロバイオティクスとプレバイオティクスの組み合わせはシンバイオティクスとして知られている。

<18>

Gibson GR, Fuller R.

Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use.

Journal of Nutrition. 130(2S Suppl):391S-395S, 2000 Feb.

ヒトに用いるプロバイオティクスおよびプレバイオティクスの同定を目的に進められている
in vitro および in vivo 研究の状況

抄録 ヒト消化管内細菌叢は栄養および健康の鍵となる役割を果たしている。腸内細菌は発酵過程を通じて様々な基質(主に食餌性成分)を短鎖脂肪酸やガスなどの最終産物まで代謝する。この嫌気性代謝は宿主の一日エネルギー必要量に正に関与すると考えられている。しかし、ある環境下ではこの発酵過程に好ましくない代謝物が产生される。これは急性および慢性条件下にて発現する腸障害発症の原因となる。さらに腸内細菌叢が一過性の病原菌に汚染され、正常な細菌群構造が著しく混乱する。最近、腸内細菌叢のバランスの維持もしくは向上に食餌性成分を利用することが増加している。プロバイオティクスは適切な食品(発酵乳など)に添加される生きた微生物食餌成分であり、プレバイオティクスは結腸において特定の代謝経路を有する食事性炭水化物であり、好ましいと思われる状態まで細菌数を増加させる。通常、健康増進という目的からビフィズス菌等の乳酸産生菌が標的有機体とされる。これらのアプローチは市場的価値、生物学的可能性ともに大きなものである。本報では有効なタイプを同定する方法についてまとめた。

<19>

Gorbach SL, Goldin BR.

Nutrition and the gastrointestinal microflora.

Nutrition Reviews. 50(12):378-81, 1992 Dec.

栄養と消化管内細菌叢

栄養状態と食餌成分は消化管(GI)機能に大いに作用する。ここではまず、タンパク質・エネルギー栄養不良(PEM)に対処する腸管での代謝イベントに影響を及ぼす西欧およびアジアの食事に特異的な栄養成分を集中して示す。中等度から重度の PEM は胃、胆、脾、腸の分泌低下に関連する。腸の運動性も顕著に低下する。しかしこれらの機能は栄養摂取および栄養状態の回復により正常に戻る。

<20>

Guarner F. Malagelada JR.

Gut flora in health and disease.

Lancet. 361(9356):512-9, 2003 Feb 8.

健康および疾病状態における腸管内菌叢

ヒトの腸は大きく動的な細菌が群生する自然生息地であるが、これらの細菌群の大部分についてはまだ不明な点が多い。しかし、宿主の生理学、病理学に対する常在細菌との関連性やその作用についてはよく実証されている。腸内微生物叢の主な機能は、エネルギー吸収される栄養分を回収する代謝活性への関与、腸上皮や免疫組織および機能に対する重要な栄養に関する作用および異質細菌の侵略に対する宿主防御作用である。腸管内菌叢は多臓器不全、結腸癌、炎症性腸疾患などの病的障害にも重要な因子となりうる。しかし、細菌はヒトの健康促進に有用である。プロバイオティクスおよびプレバイオティクスはいくつかの疾患の予防や治療に役割を果たすことが示されている。

<21>

Hart AL. Stagg AJ. Frame M. Graffner H. Glise H. Falk P. Kamm MA.

The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy.

Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 16(8):1383-93, 2002 Aug.

総論：腸内細菌叢の健康および疾病における役割と、治療としてのその修飾

腸内細菌叢は広大な体内生態系であり、その特性は、高度な分子生物学的手法の出現によって解明され始めたばかりである。16rRNA 遺伝子解析、ポリメラーゼ連鎖反応増幅法、DNA マイクロアレイの使用といった技法により、従来の培養法に抵抗性の菌種やことによると未知の菌種の速やかな同定と特徴付けが現在容易となった。宿主と腸内細菌叢の生涯のクロストークにより、健康が維持されるか疾病が侵入するかが左右される。このような細菌と細菌、および細菌と宿主の免疫や上皮細胞との相互作用を理解することにより、疾患の病因をよりよく洞察することとなると思われる。一つの細菌と上皮細胞の相互作用に関するいくつかの研究によって、腸内細菌が影響を及ぼすと考えられる広範な代謝過程が明らかにされた。炎症性腸疾患においては細菌により炎症過程が促進されるし、また最近報告された NOD2/CARD15 遺伝子変異のような、今までに確認された疾患に対する遺伝子的疾患素質は、細菌に関する認識の変化と関係するものと考えられる。アトピーや関節炎のような腸以外の疾患でも、それらの基礎として腸環境の変化があると考えられる。抗生素もしくはプロバイオティクス細菌を用いてこのような内部環境を修飾することが疾患の予防と治療に有益であるという、臨床上のエビデンスが出現しつつある。このような自然で明らかに安全な方法には大いに魅力がある。

<22>

Huang Y, Kotula L, Adams MC.

The in vivo assessment of safety and gastrointestinal survival of an orally administered novel probiotic, Propionibacterium jensenii 702, in a male Wistar rat model.

新しいプロバイオティクス *Propionibacterium jensenii* 702 を経口投与した雄性 Wistar ラットモデルにおける安全性と消化管内生存能に関する in vivo 評価

本試験は雄性 Wistar ラットモデルを用いてプロバイオティック細菌 *Propionibacterium jensenii* 702 を経口投与した場合の消化管での生存と安全性を in vivo で評価することを目的とする。高用量の *P. jensenii* 702 (10¹⁰cfu/ラット/日) を各ラットに 81 日間与えた。反復投与毒性およびラット組織への *P. jensenii* 702 の転位およびラット糞中 β -glucuronidase 活性および乳業用プロピオン酸菌属数を評価した。*P. jensenii* 702 の生細菌はラットの血液や組織検体（腸間膜リンパ節、肝、脾臓）から回収できず、処置による病気や死亡は認められなかった。糞中のプロピオン酸菌属数は 36 日後に 10(8)cfu/g に達し、81 日の処置終了まで 10(8)-10(9)cfu/g を維持した。この結果から、*P. jensenii* 702 はラット in vivo の消化管内移行では生存可能であり、動物に対する副作用はないことが示唆される。しかし、*P. jensenii* 702 株をプロバイオティクスとしてヒトが消費する食物に取り入れる場合は、事前にヒトでの臨床試験が必要である。

<23>

Huycke MM, Gaskins HR.

Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models.

Experimental Biology & Medicine. 229(7):586-97, 2004 Jul.

共生細菌、酸化還元ストレスおよび結腸直腸癌：メカニズムとモデル

本報では結腸直腸癌の発癌における共生細菌の役割について検討した。結腸直腸癌(CRC)の多くは散発的に起こり、細胞増殖や DNA 修復を調節する遺伝子の突然変異が徐々に蓄積することにより発症する。遺伝子の突然変異はクローニング選択に続き、その結果、正常細胞が悪性導体へと形質変換される。結腸内細菌については多くの毒性作用が報告されている。それらの作用は上皮細胞 DNA の損傷として認識され、現在理解されている散発的 CRC の遺伝的な基礎と容易に一致すると考えられる。そこで、特定の共生細菌が食餌性の前発癌物質を DNA 損傷物質（エタノール、ヘテロサイクリックアミンなど）に変換する、あるいは直接発癌物質(fecapentaenes)を引き起こすメカニズムに焦点を当てた。これらの作用や他の代謝活性はまだ直接散発的 CRC に結びついてはいないが、この領域の難題や進歩を強調する実験系もある。Enterococcus faecalis による酸素ラジカルの產生または sulfate-reducing bacteria(SRB)による硫化水素(H₂S)の產生などの上皮酸化還元環境を変化させる共生細菌に焦点を当てた。スーパーオキサイドを产生する E. faecalis は、結腸上皮細胞 DNA 損傷を起こすことが確証的に示されている。今のところ SRB による H₂S 產生の DNA 損傷誘発または発癌物質としての作用は報告されていないが、最近、この還元が CRC に関与する分子経路を活性化することが示されている。これらの所見は、SRB 輸送が散発的な CRC 発症の基礎をなすと思われる多因子的な遺伝子・環境相互作用を組み込んだワーキングモデルの誘起を遺伝的にエンコードしているというエビデンスに結びつくと考えられる。

<24>

Ishibashi N, Yamazaki S.

Probiotics and safety.

American Journal of Clinical Nutrition. 73(2 Suppl):465S-470S, 2001 Feb.

伝統的に安全とされてきた細菌種がプロバイオティクスに使用される；主に使用される菌種は、ヒトや動物の腸管に棲息する乳酸菌とビフィズス菌である。しかし、プロバイオティクスに使用する細菌を感染源からしばしば分離されたことが近年報告されることから、プロバイオティクスの安全性について多くの論議が持ち上がっている。本報告では、感染部からのプロバイオ

ティクス細菌の分離に関する現状を記載し、プロバイオティクスの安全性評価において対処しなければならない要因、すなわちその細菌の病原性、感染性、毒性、ならびに固有の特性についてレビューした。感染に関する安全性の評価方法としてのノトバイオートマウスにおける *Bifidobacterium longum* の単独定着、および単独定着の結果としてのバクテリアルトランスロケーションと免疫応答について記載した。

<25>

Johnson IT.

New food components and gastrointestinal health.

Proceedings of the Nutrition Society. 60(4):481-8, 2001 Nov.

新しい食品成分と胃腸の健康

ヒト消化管には、消化、吸収、糞便処理という主な機能以外に、自律神経により制御される複雑なパターンの筋肉活動がある。またその各臓器には免疫および内分泌組織が集中している。これら密接に結びついているシステムでは、どんな障害でも軽い過敏性疾患から生命を脅かすような疾患までひきおこす可能性がある。食物には多様な化学種が含まれており、その多くが生物学的活性を有している。腸管遠位部分には、究極的には宿主の食事残渣に由来する栄養依存性の豊富で代謝活性を有する共生細菌叢が定着している。本報告では、腸管機能障害、腸感染症、および結腸直腸の腫瘍形成に関する上皮細胞の生理学的側面に、食品成分が及ぼす重要な影響に対してのエビデンスを検討した。プレバイオティクスやプロバイオティクスによる結腸直腸細菌叢の操作や、生物学的活性成分を含む新製品や植物種の開発といった種々の方策が、新しい機能性食品製品の開発の支えとなる。しかし、このような製品は、証明されている生物学的原理に基づくもので、有効性と安全性が十分に試験されたものであることが必要となる。機能的ゲノム学や細胞生物学の分野の急速な発展により、このような可能性を探索する新しい実験上の戦略が開かれるであろうし、新たに生まれた処理技術がそのような開発の新規手法となるように考えられる。

<26>

Kanauchi O. Mitsuyama K. Araki Y. Andoh A.

Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease.

Current Pharmaceutical Design. 9(4):333-46, 2003.

炎症性腸疾患治療における腸管内菌叢の修飾

抄録：腸内細菌叢は炎症性腸疾患(IBD)の発症に重要な役割を果たすため、最近、細菌叢の組成操作の興味は治療分野への可能性に向けられている。本報では IBD におけるプレバイオティクス、プロバイオティクス、シンバイオティクスおよび抗生物質による細菌叢操作の臨床的および実験的有効性についてまとめて述べる。プレバイオティクスは、すでに結腸に常在する特定の細菌の増殖や活性を選択的に刺激することにより宿主に有益に作用する非消化性食物成分と定義すると、特定の細菌数を増加することにより結腸内細菌叢を修飾し、その組成を変化させる。IBD のプレバイオティクスにはラクトース、オリゴ糖、イヌリン、糠、サイリウム、発芽大麦(GBF)などが挙げられる。GBF は主に食物繊維とグルタミン含量の多いタンパク質から構成され、潰瘍性大腸炎のためのプレバイオティクス食品である。GBF は *Eubacterium* およびビフィズス菌を通じて結腸細胞に選択的な栄養素に変換され、核因子 κ B(NF κ B)を不活化する。さらに保水能および胆汁酸結合能が非常に高い。プロバイオティクスは腸内細菌バランスを改善することにより、宿主に有益に作用する細菌性補助食品であり、結腸細菌叢の組成を変化させるため使用されている。IBD のアプローチには VSL#3、Nissle1917、酪酸菌、ビフィズス菌発酵ミルクなどがある。IL-10 を分泌するラクトコッカスの利用により良好な結果が得られている。プレバイオティクスとプロバイオティクスの組み合わせであるシンバイオティクスは IBD で検討されていないが、その効果は有望である。抗生

物質の使用も興味の対象である。これらの戦略は大変有望であり、ある条件下では有効であることが示されているが、これらの治療法の妥当性の確立にはさらに臨床試験が必要である。

<27>

Khan AA, Nawaz MS, Robertson L, Khan SA, Cerniglia CE.
Identification of predominant human and animal anaerobic intestinal bacterial species by terminal restriction fragment patterns (TRFPs): A rapid, PCR-based method
Molecular and Cellular Probes, 15 (6): 349-355, 2001

Terminal restriction fragment patterns(TRFPs)によるヒトおよび動物の優勢嫌気性腸内細菌種の同定：急速なPCRに基づく方法

従来の方法によるヒトおよび動物の腸管に存在する優勢嫌気性細菌の同定は、分子的方法に比べ煩雑で、時間がかかり、感度も低い。われわれは、一対の PCR universal primer を用いて、16S rRNA 遺伝子フラグメントを増幅したポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)により大量の腸内細菌のほとんどを同定する分子的手法を開発した。制限酵素による分解後の PCR 産物の末端フラグメントを検出するため、PCR forward primer を 6-カルボキシフルオレセリンアミノヘキシル(6-FAM)蛍光染料でラベルした。PCR 産物は精製され、制限酵素により消化され、自動 DNA 配列決定装置を用いたキャピラリー電気泳動により分析された。データは GeneScan ソフトウエア 2.1.により分析した。この急速分子生物学的方法により、ヒトおよび動物の腸管に優勢に存在する 11 種の細菌(*Eubacterium biforme*、*E. limosum*、*Peptostreptococcus* 産物、*Lactobacillus acidophilus*、*Bacteroides thetaiotaomicron*、*B. vulgatus*、*B. distasonis*、*Chlostridium clostridiiforme*、*C. leptum*、*C. perfringens* および *Escherichia coli*)を同定することに成功した。このプロトコールは迅速かつ正確であり、感度もよく、1 つの検体から様々な有機体を検出する能力を有している。

<28>

Kayser FH.
Safety aspects of enterococci from the medical point of view.
Int J Food Microbiol. 2003 Dec 1;88(2-3):255-62. Review.

医学的見地から見た腸球菌の安全性

腸球菌は多様な環境下に存在している。土壤、食物、水の中に見出すことが出来、動物やヒト (10(5)-10(7)/g 粪便) の正常腸内細菌叢のかなりの部分を構成している。腸内細菌叢のその他の細菌と同様に、腸球菌も感染性疾患の原因となりうる。ほとんどの臨床分離株は *Enterococcus faecalis* であり、分離株の 80~90%を占める。*Enterococcus faecium* は 5~10% である。典型的な腸球菌感染症は、様々な程度の疾患と免疫変調を呈している状態の入院患者において見られる。現在、腸球菌の入院患者からの分離頻度は 2 番目か 3 番目である。腸球菌は尿路感染症、腹腔および骨盤内感染、菌血症、創傷および組織感染、心内膜炎から、しばしば多細菌叢の一部として分離される。驚くべきことに、腸球菌の感染を惹起する能力に関与している因子についてはほとんど知られていない。*E.faecalis* の多くの菌株は組織損傷作用のある細胞溶解素（ヘモリジン）を産生する。臨床分離株においてしばしば見られるその他の細胞外産物には、蛋白分解酵素（ゼラチナーゼ）、ヒアルロニダーゼ、細胞外スーパーオキサイドがある。さらに、多くの臨床分離株は表面上の凝集物質と外膜表面蛋白を有しており、両者とも真核細胞への接着に関与している。*E.faecalis* のいくつかの菌株と *E.faecium* の多くの菌株は、多剤耐性である。腸球菌の病原性に関与するこれらの因子の究極的役割については未だ解明されていない。かつて、腸球菌感染は、患者自身の腸内細菌叢から内因的に獲得されるものと考えられていた。比較的最近の考え方では、腸球菌感染は 2 段階過程とするものである。まず最初に毒性形質および／または抗生物質耐性の腸球菌株による腸管内のコロニー形成がある。ついで、この集団は、しばしば抗生物質による対抗菌種の排除に助けられて、拡散する。

限られた患者では、消化管リザーバーからの二次的組織侵襲がある。こうした考え方からすれば、食品やプロバイオティクスとして外部からヒト腸へ送り込まれた毒性形質や抗生物質耐性のない腸球菌は、免疫機能が正常なヒトに対しては全く危険性が無いと推定することが出来る。しかしながら、非常に重篤な免疫不全状態にある患者においては、そのような菌株による腸球菌感染症のリスクを完全には排除できない。

キーワード：腸球菌、感染、病原性、抗生物質耐性、毒性

<29>

Kennedy RJ, Kirk SJ, Gardiner KR.

Promotion of a favorable gut flora in inflammatory bowel disease.

Journal of Parenteral & Enteral Nutrition. 24(3):189-95, 2000 May-Jun.

炎症性腸疾患における好ましい腸内細菌叢の促進

抄録 最近の研究により炎症性腸疾患(IBD)における腸感染症に結腸細菌叢の組成が何らかの役割を果たすことが示唆されている。本レビューでは結腸内細菌濃度の変化がこの状態にある患者に有益であるという根拠を検討した。

<30>

Knasmuller S, Steinkellner H, Hirschl AM, Rabot S, Nobis EC, Kassie F.

Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines.

Mutation Research. 480-481:129-38, 2001 Sep 1.

乳製品中の、あるいは腸内細菌叢の細菌が複素環式芳香族アミンの遺伝毒性や発癌性に及ぼす影響

本論文においては、複素環式芳香族アミン(HAs)の健康障害に対する腸内細菌叢の影響に関する現在の知識の現状について簡単に概観する。通常の無菌およびヒト細菌叢関連ラットを用いる単細胞ゲル電気泳動法試験結果は、腸内細菌の存在下において、IQ (キノリン誘導体)による大腸および肝細胞のDNA損傷の誘導が著しく亢進することを示している。

さらに、餌に乳酸菌を添加することによって、この同じアミンによる大腸癌の誘発が減弱することが見出された。これらの最近の知見は、腸内細菌叢と乳製品中の乳酸菌が、HAs の健康へのリスクに強く影響することを示唆している。それにもかかわらず、これまでの HAs を用いる実験のほとんどは、これらの化合物の代謝に対する哺乳類の酵素の関与に焦点を合わせており、細菌と HAs の相互作用に関する文献の入手はごく限られている。これらの研究の幾つかは、直接的変異原性を有するアミン類の水酸化代謝物の糞中細菌による形成が重要な賦活化経路である可能性を示唆したが、IQ の水酸化誘導体は哺乳類の細胞で変異原性を示さず、実験室のげっ歯類においても大腸癌を発生させないことが明らかにされた。細菌のβグルクロニダーゼによる HA 代謝物の加水分解が HAs の賦活化に関与しているのではないかとするエビデンスがあるが、実験データが乏しく、現時点では確固とした結論は得られていない。最も重要な解毒機序は、発酵食品に含有されるある種の細菌株の細胞壁への HAs の直接的結合であるように思われる。また、これらの結果は生理学的に関連した条件下でも起こることが示された。全体として、腸内細菌叢が HAs の活性化と解毒に重要な役割を果たしているようであるが、これは長らく無視されてきた研究分野であった。これらの機序の解明は、大腸癌のリスクと栄養学的防御法に関するバイオマーカーの開発を可能にするかもしれない。

キーワード：複素環式芳香族アミン、遺伝毒性、発癌性、腸内細菌、乳酸菌

<31>

Laitinen R, Malinen E, Palva A.

PCR-ELISA I: Application to simultaneous analysis of mixed bacterial samples composed of intestinal

species

Systematic and Applied Microbiology, 25 (2): 241-248, 2002

腸内細菌種から成る混合細菌検体の同時分析の有用性

本試験で計画された、または文献から採用された16種のオリゴヌクレオチドの同定プローブを標準条件下にて選択した腸内細菌、乳酸菌またはビフィズス菌を同時に検出するPCR-ELISA法に適用した。得られた特異性レベルはほとんどが規定の基準を満たすものであった。PCRの有効性は全ての真正細菌ドメインに一定に設計されたプライマーにより低下し、PCR-ELISA法の感度を低下させる多様なプローブを同時に使用することによるハイブリダイゼーション状態では誤差が生じた。しかしこの方法は腸内細菌叢の優勢菌の検出には適している。PCR-ELISA法の適応可能性は属特異的なプライマーによるビフィズス菌の検出が示されているように、PCRの特異性をより制限したプライマー利用することでさらに広がると考えられている。PCR-ELISA法の利点は、その簡便性と複数のプローブを持つ大量の検体を迅速に検査しうる点である。

<32>

Macfarlane GT. Macfarlane S.

Human colonic microbiota: ecology, physiology and metabolic potential of intestinal bacteria.

Scandinavian Journal of Gastroenterology - Supplement. 222:3-9, 1997.

ヒト結腸内細菌叢：腸内細菌の生態学、生理学および代謝能力

健康でも病気でも、結腸内細菌叢はヒトの生理学の様々な領域で重要な役割を果たしている。この複雑な微生物集合体は、主にその分解能を通じて大腸に大きな代謝能力を与える。大腸管腔、ムチン層および粘膜表面の多くの生息地には、生理学および生化学的に大きな違いのある何百種類もの細菌が存在している。細菌叢も宿主とともに共生により明らかな利益を受けている。たとえば、食餌や体組織からの成長基質は、細菌にとって比較的安定した増殖環境とともに宿主から提供され、そのかわり宿主は細菌発酵産物である酪酸を遠位腸の上皮細胞の主要なエネルギー源として利用している。腸内細菌の炭素およびエネルギー源は、主に炭水化物複合体（デンプン、非デンプン多糖体）である。デンプン代謝は、培養可能な微生物のほとんどが糖分解性であるという属性および絶対数の点から、大腸にとって非常に重要である。結腸細菌からの発酵産物の量や種類は、基質の脱重合および発酵に関与する細菌の発酵手段（生化学的特徴、分解調節メカニズム）と同様に、それぞれの基質の数やそれらの化学的構造および成分に依存する。タンパク質の崩壊およびアミノ酸代謝の異化作用は、フェノール、インドール、アミンなど毒性をもつとされる代謝物の形成につながるものである。これらの物質の产生は、多くの腸内微生物において、炭水化物の発酵源の働きにより阻害または抑制される。結腸の解剖学および生理学の面から、炭水化物がより制限される遠位腸における腐敗過程はより重要なものである。

<33>

Magliani W. Conti S. Frazzi R. Pozzi G. Oggioni M. Polonelli L.

Engineered commensal bacteria as delivery systems of anti-infective mucosal protectants.

Biotechnology & Genetic Engineering Reviews. 19:139-56, 2002.

抗感染性粘膜保護剤の送達システム用に加工された共生細菌

胃腸、尿生殖器、口腔および呼吸器系の粘膜表面はほとんど全ての病原菌にとって主要な入口であり、同時に多くの感染症に対する防御の第一線である。粘液に関連するリンパ組織は哺乳動物の免疫系にとって重大な意味を持つ成分であり、感染性物質や他の異物の粘膜曝露は、局所細胞を介する免疫応答のみでなく、抗原特異性分泌性 IgA や血清抗体産生の原因となる

(Conley and Delacroix, 1987; Orga et al., 1999)。これらの所見から、粘膜表面は主に粘膜が獲得した感染性疾患に対する保護剤を送達する部位であるとみなされ、感染の初期段階のうちにコロニー形成の拡大を阻止する。

生または生弱毒化微生物を経口投与すると、血清および全身の粘膜免疫応答が効率的に発現する。現在、腸チフス、コレラ、アデノウイルス、セービン経口ポリオワクチン(OPV)などがヒトに用いられている。この分野での最も顕著な成功事例は、ヨーロッパ、北米をはじめ全世界で OPV ワクチンによりポリオが根絶されたことであり、すでにアメリカではルーチン使用は推奨されていない(Kiyono et al., 1996)。

粘膜ワクチン、特に経口製剤は先進国および発展途上国のどちらにおいても安全で非侵襲性の予防接種として期待されている。しかし、粘膜免疫調節の複雑性や適切な抗原送達システムが欠如していることから、新しい有効な粘膜ワクチンの開発にはまだ大きな障害が残っており、ほとんどのワクチンは依然として静注により送達される。粘膜免疫応答誘導は、特異的な細胞、リンパ組織の粘膜表面に局在する M 細胞による抗原の認識から開始し、抗原が存在する細胞への送達も起こる。M 細胞、上皮細胞と樹状細胞(DC)間のクロストークは免疫の転帰を決定するにあたり重要な役割を果たしていると考えられる(Kaiserlian and Etchart, 1999; McGhee and Kiyono, 1999)。

可溶性非複製抗原の粘膜送達は、通常有効な免疫応答を刺激せず、複数回の高用量が必要で、全身性の非応答となることがある(McGhee and Kiyono, 1999; Nosal, 1999)。現在、粘膜経由で送達されるワクチンの免疫応答亢進に関するいくつかの研究が進められている。粘膜へ抗原を送達する新しいキャリヤーと同様に、組み換え型タンパク質、サブユニットまたは DNA ワクチン、遺伝子組換え食用植物などの新しいワクチン、および粘膜と抗原の相互作用を改善する新しい補助剤が計画されている(Ogra et al., 2001)。

抗原の調製方法および補助剤の選択的戦略の調査が進められている。LT (大腸菌易熱性エンテロトキシン) や CT (コレラ毒素) などの無毒化細菌毒素は、可溶性抗原、死細菌または不活化ウイルスと同時に投与した場合、最も強力な粘膜補助を示すことが明らかになっている(Freytag and Clements, 1999; Pizza et al., 2001)。リポソーム、微粒子、粘膜付着性微粒子、重合体誘導体(Kuntz and Saltzman, 1997; O'Hagan, 1998; Wyatt et al., 1998; Baca-Estrada et al., 2000; Kunisawa et al., 2000)といった他の送達システム、免疫刺激複合体(Morein and Bengtsson, 1998)、免疫刺激モチーフ(McCluskie et al., 2001)を含有する合成ODN (オリゴヌクレオチド)、植物レクチン(Lavelle et al., 2001)などに関する研究により粘膜ワクチンキャリヤーとしての可能性が強く示唆されている(Michaelek et al., 1999)。最後に、特に動物における疾患の発現を予防したり、遅延させる能力が低い発展途上国での使用のために、ヒトの臨床試験でその安全性と機能性が示されているワクチン抗原を発現する遺伝子組換え植物が食用に適する低コストワクチンとして考えられている(Walmsley and Arntzen, 2000)。

数 10 年の間に、予防的および治療的利用のためにこれらの抗原送達のための新しい技術や粘膜免疫調節のメカニズムに関する知識により、広範な適応可能性を有し、有効で、無痛の、粘膜送達ワクチン、特に複数の製剤の開発が促進されるべきと考える。

<34>

Mai V. Morris JG Jr.

Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age.

Journal of Nutrition. 134(2):459-64, 2004 Feb.

食餌による大腸環境の変化と結腸直腸癌

大腸内細菌叢：分子生物学時代において変わりつつある認識

ヒト腸内細菌叢は複雑な細菌共生系であり、正常な健康状態に極めて重要である。細菌叢は腸内容物 1g 当たり $10^{11} \sim 10^{12}$ 個存在している；現在の微生物学的方法では微生物の 30% 未満しか培養可能でないことからも正確な数値は明らかではないが、500 種類以上が存在すると考えられる。糞便中細菌叢の構成を研究する場合、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法(FISH)、

変性剤濃度勾配電気泳動法(DGGE)、定量的ドットプロットハイブリダイゼーション法、制限酵素断片長多型法(RFLP)、大規模 16S rDNA シークエンス解析法のような 16S rDNA シークエンスの相同性に基づいた分子生物学的手法が、従来の微生物学的平板培養法の限界を克服するのに役立っている。しかし、このような複雑な共生系の動きを食餌やヒトの健康と関連づけて理解するために、これらの手法はたった今適用し始められたばかりである。このような重大な問題への対応には、現在データーの限界と、最適の分子生物学的および疫学的手法により取り組むことの重要性を共に理解することが必要である。

<35>

Maisonneuve S, Ouriet M-F, Duval-Iflah Y.

Interrelationships between dairy product intake, microflora metabolism, faecal properties and plasmid dissemination in gnotobiotic mice

British Journal of Nutrition, 87 (2): 121-129, 2002

ノトバイオートマウスにおける乳製品摂取、細菌叢代謝、糞便特性およびプラスミド伝達の相互関係

ヒト糞便中細菌(HFF)を投与したノトバイオートマウスの消化管内におけるプラスミド伝達に及ぼす乳製品摂取の影響について過去に報告した。標準飼料飼育マウスでの結果と比較して、ヨーグルト、加熱処理ヨーグルト(HTY)およびミルクは接合伝達菌株数を減少させることを見出した。乳酸糖摂取例では接合伝達菌株は検出されなかった。今回の研究では、このような観察結果とその他の変数（細菌生態学、pH、水分、酵素活性、短鎖脂肪酸(SCFA)）との相互関係の可能性を評価することを目的とした。今回の比較の注目点は、ノトバイオートマウスモデルが週齢、性別、飼料に関して同質であり、また無菌装置内での飼育により腸内細菌叢も同質であったという事にある。SCFA および乳酸含量、ならびに *Bacteroides* および *Bifidobacterium* の偏性嫌気性株と通性嫌気性受容 *Escherichia coli* PGI 株の菌数にも変動がみられなかった。標準飼料飼育した対照群マウスに比較して、ヨーグルト、HTY、ミルクを与えたマウスにおいては伝達菌株数が減少し、付随して β -ガラクトシダーゼ活性が亢進し、 β -グルコシダーゼ活性が低下したことが主要な変化であった。標準飼料で飼育した対照群マウスでの結果と比較して、乳糖を与えた HFF マウスではプラスミド伝達の全面的阻害が認められ、2 種類の酵素活性 (β -グルコシデース、 β -ガラクトシダーゼ) が付随して亢進した。乳糖を与えた無菌マウスでは、プラスミド伝達が認められ、 β -ガラクトシダーゼは検出されず、 β -グルコシダーゼは低下した。従って、これら 2 つの酵素活性が、プラスミド伝達および HFF 投与マウスの消化管内における接合伝達株の生残に影響を与えると考えられた。両活性が亢進した場合には、プラスミド伝達の全面的阻害が認められた（乳糖摂取例）。 β -ガラクトシダーゼが亢進し、 β -グルコシダーゼが低下した場合（ヨーグルト、HTY、ミルクの摂取例）には、プラスミド伝達は対照群におけるものより低い効率で生じ、接合伝達株数が少ないという結果になった。

<36>

Makelainen H, Tahvonen R, Salminen S, Ouwehand AC.

In vivo safety assessment of two *Bifidobacterium longum* strains.

Microbiol Immunol. 2003;47(12):911-4.

Bifidobacterium longum 株 2 種の in vivo 安全性評価

ビフィズス菌は重要な腸内細菌の一種であり、健康維持に寄与すると考えられている。しかし、高齢者では若年者に比べビフィズス菌の腸内コロニー形成は低い。そこで、健常な高齢者から分離した 2 種の *Bifidobacterium longum* 株を高齢者における内因性ビフィズス菌微生物叢の補助菌として選択した。ビフィズス菌は一般的にヒトが摂取するには安全とされている。しかし、病気になりやすい傾向にある高齢者が摂取する場合は、その安全性の確認が重要である。

この目的のため、この株を健常成人ボランティアに与えた。副作用はなく、免疫パラメータの変動も認められなかった。この検討から、これら2種の株はヒトでの忍容性は高く、食物として利用しても不安はないと考えられる。

<37>

Manning TS, Gibson GR.

Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics.

Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology. 18(2):287-98, 2004 Apr.

プレバイオティクス

栄養科学では、ヒト腸の食事による変調に大きな興味が持たれている。消化管、特に大腸では非常に密な細菌集団が見られる。ほとんどの細菌は良性である；しかしながら、ある種の腸内細菌は病原性であり、急性、慢性疾患の発症に関与している可能性がある。ビフィズス菌と乳酸菌は有益と考えられており、食事介入の共通目標である。

プレバイオティクスは有益な腸内細菌によって選択的に代謝された非生存性食物成分である。プレバイオティクスによる腸内細菌叢の食事による変調は、ビフィズス菌と乳酸菌の数および／または活性に刺激を与えることによって健康を改善することを目的としてデザインされている。「最適な」腸内細菌叢を持つことは、病原性細菌に対する抵抗性を高め、血中アンモニア濃度を低下させ、免疫機能を賦活し、癌のリスクを軽減することが出来る。本章では、プレバイオティクスがヒトの健康改善にどのように用いられているかを検討し、その使用の背後にある科学的エビデンスについてレビューする。

<38>

Marteau P, Shanahan F.

Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects.

Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2003 Oct;17(5):725-40. Review.

プロバイオティクスの基本的側面と薬理学：薬物動態、作用機序および副作用の概観

プロバイオティクスは摂取された場合、宿主の健康と生理機能を改善する作用を示す非病原性の微生物と定義されている。その薬理作用は無活性薬品のそれより複雑であるが、現在その詳細が研究されつつある。ある菌株は糞便中に排泄されるまでの高い生存能力を示すが、他の菌株は酸と胆汁によって速やかに殺菌される（細胞内活性物質の運搬に用いることができる特徴）。移転と恒久的なコロニー形成の可能性は稀ではあるが、ありうる事象である；さらに精査されるべきである。作用機序は直接的、あるいは腸内細菌叢の修飾あるいは免疫調節による間接的機序が考えられる。有効成分についてはほとんど知られていないが、細菌性ホルム化ペプチド、ペプチドグリカン細胞壁構成成分およびヌクレオチドなどが含まれる。市販プロバイオティクス製品の安全性は優れているが、この点に関しては、特に免疫不全状態の宿主において、詳細に検討されるべきである。

<39>

Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Miyamoto Y, Takada T, Matsumoto K, Oyaizu H, Tanaka R.

Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces.

Applied and Environmental Microbiology, 68 (11): 5445-5451, 2002

ヒト糞便中の優勢細菌の検出と同定のための 16SrRNA 遺伝子標的の群特異的プライマーの開発

ヒト糞便中の優勢細菌の検出と同定のために、*Bacteroides fragilis* 群、*Bifidobacterium*、*Clostridium coccoides* 群、*Prevotella* 用の 16S rRNA 遺伝子標的の群特異的プライマーをデザインし、評価した。これらのプライマーの特異性は、ヒト腸内細菌叢に通常みられる 90 の細菌種から抽出した DNA を用いて確認した。次にこの群特異的プライマーを 6 例の健常ボランティアの糞便から分離した 300 株の同定に用いた。分離株は *B. fragilis* 群 117 株、*Bifidobacterium* 22 株、*C. coccoides* 群 65 株、*Prevotella* 17 株が明瞭に同定され、4 組のプライマーによって分離株の 74% が同定されたことを示している。残りの 79 株は、16S リボソーム DNA 配列解析によって同定され、*Collinsella* 40 株、*Clostridium leptum* 亜群 24 株、非対応群 15 株より構成されていた。さらに、これらの細菌群の定性的検出は糞便サンプル抽出 DNA を用いる培養を行わなくても可能であった。この特異的 PCR 法の目的は、これらの細菌群の定量的検出法の開発であり、*Bifidobacterium* 検出用リアルタイム定量 PCR を現在開発中である (T.Requena, J.Burton, T.Matsuki, K.Munro, M.A.Simon, R.Tanaka, K.Watanabe, and G.W. Tannock, Appl.Environ.Microbiol.68:2420-2427, 2002)。従って、優勢細菌の検出と同定に用いられたこの群特異的プライマーによるアプローチは、腸内細菌叢の構成と動態についての今後の研究に貢献するに違いない。

<40>

Mattila-Sandholm T, Matto J, Saarela M.
Lactic acid bacteria with health claims-Interactions and interference with gastrointestinal flora
International Dairy Journal, 9 (1): 25-35, 1999

健康に必要な乳酸菌－消化管内細菌叢との相互作用と干渉

食品中の乳酸菌は長年にわたり安全に使用されてきている。ラクトコッカス属および乳酸菌属のメンバーは"一般的に安全と見なされる"状況にあるが、連鎖球菌属、腸球菌属および他の乳酸菌属のメンバーは日和見性病原体を含んでいる。プロバイオティック細菌の新種およびより特異的な株が次々と同定されている。新種を製品に取り入れるに先立ち、その有効性を慎重に評価し、伝統的に食物として認められている有機体の安全な状態を共有しうるかを個別に評価することが必要である。遺伝子的に修飾された有機体は本質的に常に新しい。安全性の評価は表現型、遺伝子型の特質を含む新しい状態の判断に基づく。さらに遺伝子的に修飾された有機体およびその産物に関しては、以下のカテゴリー:宿主の性質に対する遺伝子操作の影響、遺伝子的に修飾された有機体の遺伝的安定性、新しい遺伝的物質発現の特異性、遺伝子的に修飾された生物体から遺伝的物質への転移および遺伝子的に修飾された微生物のコロニー形成能およびヒト腸における生存能に関する情報が要求される。

<41>

McDonald TA, Holland NT, Skibola C, Duramad P, Smith MT.
Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia.
Leukemia. 15(1):10-20, 2001 Jan.

仮説: 主に食餌に由来するフェノールおよびヒドロキノンと消化管細菌叢の活性は白血病の誘発因子である

ほとんど全ての個体の血液中および尿中にはフェノールとヒドロキノンが高濃度に存在するが、その程度にはバラツキがある。フェノールとヒドロキノンはベンゼン曝露による白血病の発症に強く関係する。なぜなら、フェノールとヒドロキノンはベンゼンの血液毒性を再生させ、白血病にみられる DNA と染色体の損傷を誘発し、トポイソメラーゼ II を阻害し、さらに血液生成とクロローン選択を変化させるからである。対照群のフェノールとヒドロキノンのバックグラウンド濃度の大きなバラツキは、主に直接的には食餌、腸内細菌叢にはチロシンおよび他の基質の異化作用、アルブチン含有食品の摂取、喫煙および一般薬の服用などによると考えら

れる。今回、フェノール、ヒドロキノンおよび関連する付加体が、新たに白血病の病態を発生させる原因となる役割を果たしているとの仮説を立てた。この仮説は、肉やタンパク質を多く含む食餌、抗生物質（消化管細菌叢の構成を変化させる）の投与、母乳哺育の減少、フェノールおよびヒドロキノンに由来するキノン類を解毒しベンゼンによる血液毒性を防御するNAD(P)H キノン酸化還元酵素の活性低下等々が白血病と関連するという最近の疫学的知見と一致している。この仮説の特徴は、職業的曝露または明らかな喫煙歴のないヒトが白血病を発症する理由を説明しうることである。この仮説は白血病への感受性と食餌や薬剤の摂取、遺伝および腸内細菌叢との関連性を示唆するものである。これらのうちの後者 2 つはコントロールできないため、食餌を変えたりフェノール濃度を上昇させる薬剤の投与を減少することが、白血病のリスクを低下する介入戦略として最良と考えられる。

キーワード：フェノール；ヒドロキノン；食餌；消化管細菌叢；白血病；ベンゼン

<42>

Muramatsu T.

Gut microflora and tissue protein turnover in vivo in animals.

International Journal of Biochemistry. 22(8):793-800, 1990.

動物における in vivo 腸内細菌叢と組織タンパク質の代謝回転

動物の日常生活は、誕生直後から多数の細菌に影響される。例えば、ヒトには消化管に約 100 種類以上の 100 兆個もの微生物が生息している(Benno et al., 1983)。通常の状態(CV)では、宿主の寿命、自己防御システムおよび栄養などの生理的状態に対する腸内細菌の影響は宿主が生存する限り存続する。

一方、腸内細菌は細菌を起源とするセルラーゼの活性を介して纖維性物質から抽出される揮発性脂肪酸(VFA)として一部の食餌性エネルギーを放出することにより、宿主の栄養に有益な作用を及ぼす。実際、この細菌の作用は反芻動物のエネルギー源として非常に重要である。しかし一方では、腸内細菌はアンモニア(Visek, 1972, 1974)、アミン(Cheeseman and Fuller, 1966)および発癌性ニトロソアミン(Fine et al., 1977; Suzuki and Mitsucka, 1982)などの毒性物質の放出や、特定のビタミン(Coates, 1984)やミネラル(Smith and Soares, 1984)供給の競合または低下により、有害にもなりうる。腸内細菌による代謝産物を表 1 にまとめた(Mitsucka, 1987)。

宿主の栄養と腸内細菌との相互作用を検討する最良の方法は、無菌(GF)またはノトバイオート動物を利用することであろう。GF 動物は微生物の存在しない動物と定義される。この「gnotobiotic」という言葉は、ギリシャ語の既知を意味する「gnoto」をと生きるものを感じる「biotic」を語源とする。したがって、ノトバイオートは動物自身を含み、その生活形態が知られ、確認されている動物を意味する。広い意味では、GF 動物はノトバイオートとして定義される。

GF 動物は対応する CV 動物とは異なる性質を有する。例えばラットやマウスでは盲腸が肉眼的に増大し、体重の 30%を占めることがよく知られている(Comb et al., 1965; Lindstedt et al., 1965; Asano, 1969)。この異常のため、齧歯類では GF とその対照 CV 動物の代謝応答の比較が不能となる。GF ニワトリでは盲腸の増大は認められない(Rolls, 1977)。この点ではニワトリは腸内細菌の存在下および非存在下でのタンパク質代謝の比較には適したモデルである。

本報では、腸内細菌の存在による宿主動物組織におけるタンパク質の代謝回転に影響を与える因子に関して考察した。タンパク質の代謝回転の意味には、さらに説明を要するであろう。Schimke(1970)が指摘したように、過去にはタンパク質の代謝回転およびタンパク質分解という言葉の使用に混乱があった。動物研究ではタンパク質の代謝回転は合成および分解過程の両方に適用されていたが、細菌の研究では、本来、分解過程に適用されていた。定常状態、動的なタンパク質代謝の一般的な状態の特異的および限定された場合においてのみ、この 2 つの過程の速度は一致する。本報ではタンパク質の代謝回転は後者の意味で使用するため、分解速度に関する情報は少ないが、合成および分解速度に対する作用は別々に議論する。

宿主動物の組織および器官を仮に 3 つのグループ、宿主防御システムに属するグループ、腸

内細菌に関連するグループおよび細菌活性から隔離したグループに分類した。最初のグループにはニワトリの場合、脾臓、胸腺、骨髄およびファブリキウス嚢が含まれる。第2のグループは肝臓および胃、十二指腸、空腸・回腸、盲腸、結腸を含む消化管全体から構成される。肝臓は、細菌の作用により腸で新たに合成および修飾された様々な物質が、必要に応じてさらに代謝または解毒されるためにまず肝臓に移動するため、このグループに分類した。第3のグループは骨格筋、循環器系、皮膚、嚢、臍臓および腎臓から成る。

<43>

Owen RW.

Faecal steroids and colorectal carcinogenesis.

Scandinavian Journal of Gastroenterology - Supplement. 222:76-82, 1997.

糞便中のステロイドと結腸直腸発癌

背景：結腸直腸癌は西洋人に多く、その約35%は食事が原因である。疫学的調査では、発症に関する食事成分は、脂肪/赤身肉（原因物質）、纖維（防護物質）とされている。この観点から、毒性学者は食事の取りすぎや腸の生化学的特性およびステロイド（特に注目されている脂肪酸）を評価した。以前は胆汁酸と細菌代謝物は突然変異誘発物質および/または発癌物質として関係があるとされているが、まだ解決はしていない。最近、主に動物モデルでは、もし胆汁酸およびその代謝物が結腸の発癌に役割を果たしているのであれば、腺癌-癌シーケンスのプロモーション段階（ここでは二次胆汁酸デオキシコール酸とリトコール酸が重要である）で作用しているという考えが支持されている。この観点から、総胆汁酸濃度を低下するか、あるいは高纖維食により一次胆汁酸の脱水酸化を低下させる試験を計画した。方法と結果：プロバイオティクスであるラクトロースおよびラクチトール（非消化性食物纖維）が可能性を持つことが示されたため、ヒト結腸の継代培養モデルにおいて腸内細菌によるラクトロースの発酵への作用を検討した。ラクトロースは毒性をもつ二次胆汁酸リトコール酸へのケノデオキシコール酸の脱水酸化を約90%抑制した。一方、ラクチトールはラクトロースと同等に抑制し、ミニブタのS字結腸およびヒト糞便中の一次胆汁酸 7α -dehydroxylationにはほとんど作用しなかったが、ステロイド、特にヒト糞便中の胆汁酸濃度の顕著な低下を引き起こした。結論：二次ステロイド代謝物が結腸直腸癌の発癌に関与しているのであれば、プロバイオティクスを補助的に含む食事によりハイリスクグループでの改善が期待される。

<44>

Pavan S. Desreumaux P. Mercenier A.

Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria.

Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology. 10(4):696-701, 2003 Jul.

乳酸菌の生残性、安全性、および免疫調節能を評価するためのマウスモデルの使用

近年の臨床および実験結果により、特定のプロバイオティクス微生物が炎症性腸疾患に治療的有益性のある可能性が示された。しかし、最適な治療特性を有する新規プロバイオティクス菌株候補を厳密にスクリーニングするためには、宿主との、特に健康でない対象においての有害な相互作用の可能性を判断することも必要である。今回、マウス消化管内での乳酸菌(LAB)株の生残性、免疫調節能および正常動物と大腸炎モデルにおける安全性を評価した。LAB生菌 10^9 CFUを経口、胃内または直腸内に毎日投与して、マウス糞便中の細菌排泄量をしらべ、腸試料中のサイトカインを定量逆転写PCR法により測定した。バクテリアルトランスロケーションのレベルを、正常マウスおよび2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)誘発性大腸炎マウスにおいて評価した。投与経路に関係なく、有効なプロバイオティクス Lactobacillus plantarum NCIMB8826株はマウス消化管内で最高10日間生残することが明らかとなった。正常およびTNBS処理マウスにおいて、体重減少、腸の炎症、回腸および結腸のサイトカイン濃

度の修飾（正常マウス）、細菌播種（正常および大腸炎マウス）が認められることによって示されたように、この菌株は有害作用を誘発しなかった。さらに内因性細菌の腸間膜リンパ節や脾臓へのトランスロケーションは、LAB 投与後の TNBS 処理マウスにおいて大いに減少した。本菌株の生残能および無毒性と共にこのような特性は、*L.plantarum* NCIMB8826 が、慢性炎症の予防と治療に使用するためのプロバイオティクスとして魅力的な候補であることを示している。

<45>

Pearson GS.

How to make microbes safer.

Nature. 394(6690):217-8, 1998 Jul 16.

微生物をより安全にする方法

自然微生物と遺伝子組換え微生物から社会を守るために国際間努力と、これに平行する微生物の生物兵器としての脅威を予防するための努力との間で、より密接なつながりを築くことで多くのことが得られるであろう。

微生物がバイオテクノロジーにより利用可能となり、医学、食品生産、その他の分野で膨大な利益が提供されていることは広く容認されていることである。しかしそれにも関わらず一般的の不安は間違いなく強い。一方では、例えばザイールにおけるエボラウィルスの大発生または畜牛におけるウシ海綿状脳症やヒトへの伝播の可能性など、疾患の危険に対する全般的な認識が存在する。また同様に、食品への加工などのような遺伝子組換えによる結果についての関心が増大している。さらにこれと平行して、例えば戦争やテロリストの攻撃により、疾患が意図的に蔓延することへの不安も存在する。

そのような例すべてにおいて、一般の人々の不安は微生物の貯蔵、運搬、使用方法にある。開発途上国が微生物学の進歩による利益を特に熱望しているが、一方では有害な病原体から国民や環境を守りたいとも思っている。同様に先進諸国は、生物兵器が禁止され、政府もテロリストグループも確実に選択できないものとなることを願っている。

いずれの場合も直面する問題は、いかにすればバイオテクノロジーによる確定的な利益をリスクなく獲得できるかである。このジレンマの解決には、前節で述べた2つの目的を達成するために現在行われている努力が密接となる方法を探ることであろう。

健康と環境

人工微生物からの環境被害の可能性を調整するための国際間努力はほぼ一致しており、1992年、リオデジャネイロにおける地球サミットで一致し、その原則は環境を保護しながら環境破壊をせずに継続できる発展を意図することであった。これらの原則は以下のようであった；食品、飼料、再生可能な原料の安定供給の増大；保健面での改善；環境保護の増進；バイオテクノロジーの発展および環境面で健全に利用するための特権的仕組みを確立すること；安全性の増進および国際協調のための仕組みを展開することである。

これら原則の最後のものが明白に求めるものとは、バイオテクノロジーのあらゆる面での管理とリスク評価に関する国際的間が合意した原則がさらに発展することである。リオデジャネイロ合意文書には、「一般社会が全体としてバイオテクノロジーから最大の利益を受け、バイオテクノロジーの潜在的利益とリスクを受け入れるためによりよいポジションがとれるのは、適切で透明性のある安全性と境界線のコントロール方法が実施される場合のみであろう」と述べられている。

安全性議定書

リオデジャネイロサミットで開催された生物学的多様性に関する協定は、現在174カ国の批准を得ている（注目すべきは米国が批准していないことである）。協定ではバイオテクノロジーによる利益の国際間の分布に関する条項もあり、その安全性および移動について言及している。

その内容は、「関係者は適切な手順を目指す議定書の必要性および調節を考慮すること、特に、生物学的多様性の保全および環境破壊を伴わない継続使用に対して、有害作用を有するかもしれないバイオテクノロジーの所産である生存するすべての人工生物を安全に運び、取り扱い、使用に関する事前通知を含む」である。

生物学的多様性の協定は関係者の協議により履行される。第1回会議は1994年、バハマのナッソーで開催され、関係者により選任された生物学的安全性の専門家グループは適切な手順の議定書を発行する方法を検討するよう依頼された。そのような議定書が事前通知を適用する必要があるのは、生物学的多様性の保全および環境破壊を伴わない継続使用に対して、有害作用を有するかもしれないバイオテクノロジーの所産である、生存するすべての人工生物を安全に運び、取り扱い、使用する分野である。

二重アプローチが合意したのは1995年インドネシアのジャカルタで開催された第2回会議の生物学的多様性会議においてであった。作業委員会は1998年の完成を目標に生物学的安全性議定書に関する交渉に着手した。同時に、国連環境計画(UNEP)のバイオテクノロジーの安全に関する国際技術ガイドラインを完成させるべく努力も並行して行われるであろう。

この2つの構想は互いに相補的であることが意図されている。議定書はどの国々がなすべきかを立案する拘束力ある協定であり、一方、UNEPガイドラインはその方法を示すことを意図する。生物学的安全性作業委員会は1999年2月のモントリオールにおける最終会議のあとに、協定加盟国による採択の準備が整った議定書を用意する予定である。UNEPの国際間ガイドラインは1995年にカイロにおける政府指定専門家の会議により採択され、その後UNEPにより発行された。これらはその後、会議を重ねることで発展していった。

安全保障構想

微生物の軍事的使用の可能性をコントロールするための国際間努力は別のコースで行われている。生物学的戦争、すなわちヒト、動物、および植物に対する兵器として疾病を使用することは、1972年生物・毒素兵器禁止条約において完全に禁止された最初の兵器の1種であった。この条約は非常に広範で、現在、「締結国」が140カ国、「加盟国」が18カ国で、米国、英国、および新生ロシアが共同受託国である。イラクは湾岸戦争後の1991年に批准した。調印国は微生物またはその他の生物学的物質や毒物を開発、生産、備蓄、あるいは入手や保有しないことに同意している。これはその起源または生産方法に関わらず行わないことであり、「予防、保護、あるいはその他の平和目的といった正当性のないもので、その様式及び質」に関わらない。

生物兵器の代表者会議により継続的再検討が行われ、問題とされる「すべての科学的および技術的所産、とりわけゲノム研究によりもたらされた微生物学、バイオテクノロジー、分子生物学、遺伝子工学およびすべての応用分野の所産であり、かつ会議の目標および条項に合致しない目的のために使用される可能性にあるもの」にまで禁止令を拡大することが再確認された。

しかし生物兵器禁止条約には有効な強制手段がない。すなわち、規則遵守を監視、検証できないので規則を強制できない。政治的には1986年に拘束力のある信頼構築措置が合意され、1991年に拡張されたが、指定の関連活動に対して提供された情報について年1度声明を発表する参加国はわずかに半分を上回るのみで、年1度同意声明を発表するのはわずか12カ国ほどで、その質には非常にばらつきがある。

1996年12月に行われた最新の再検討会議では、「条約の発効時に比較して生物学的攻撃用兵器としての潜在能力を有する、あるいは活発に推進する国の数は現在では2倍になっている」とする評価に対して米国が懸念を表明している。実際、国際条約が存在するにも関わらず、生物兵器はある種の国家において相変わらず魅力的である。例えば、1992年、ロシアは生物兵器禁止条約の協同受託国であるにも関わらず、かつてのソビエト時代に、のちに英国外務大臣が述べたところの「何年もの間、甚だしく攻撃的な生物兵器プログラムの違法な執行」を許可していた。

米国のイラク特別委員会は確固たる努力のもとに、サダム・フセイン首相が隠し続けようとした相当規模の深刻な生物兵器プログラムの少なくとも一部を暴露した。米国安全保障理事会に対する1997年10月の報告において、委員会は前月に述べられたそのような兵器についてイラクを最終的に完全に摘発しているが、「イラクの生物兵器プログラムについての間接的で信

憑性のある報告とはなっていない」と述べた。

すべての大規模破壊兵器のうち、生物兵器は今日、最大の脅威となっている。その予防策は弱いが、非常に簡単に入手でき、その効果は核兵器に匹敵する。1991年に再検討委員会により実行可能な科学的かつ技術的な検証法を検討するために政府専門家グループを立ち上げることとなったのは、この問題を認識したためであった。

VEREXと呼ばれるこのグループの1993年の報告から、条約を強化するために検証計画を起草するグループを創設することとなり、このグループは法的拘束力のある機関において「妥当なもの」とされた。それ以来、実行可能な起草議定書の「たたき台として草案」を作成し、現在では23条項、追補8となっている。その草案には義務的声明、申告施設の「申し込み無用」の視察（無作為で集中的な）、および遵守関連調査（施設および活動範囲）といった制度を有効なものとするすべての要素が含まれている。

さらに、このグループの指令により国際条約の条項の完全履行を確実にする方法について考察するよう求められている。その条項において、国家は生物学的物質や毒物使用のための装備、原料、および科学的、技術的情報を、可能な限り最大限に平和目的に転換することを促進し、これに参加する権利を有することを要求している。

この年の3月に開催されたミーティングで、米国をはじめ先進数カ国から検証計画の草案に対して様々な変更が提示された。この変更はいかに微生物の平和使用を促進するかを検討し、さらにそのような物質は禁じられた目的のためには使用されていないという信頼を構築しようとするグループの意図に不必要的疑いを抱かせるものとなり、多くの途上国から厳しく非難された。

規制の枠組み

ヒト、家畜、農作物に対して危険な疾患となる可能性のある脅威については、もちろん、1992年のリオデジャネイロサミットのずっと以前から認識されていた。しかしリオデジャネイロサミットによりこれらの問題に願ってもない関心の的が向けられ、結果的に、多くの国が有害な病原体の取り扱い、使用、貯蔵、および運搬をコントロールするために国家的規制を導入した。さらに最近では、協調と通商を促進するために、様々な国が国家規制を地域レベル、国際レベルのいずれにおいても調和させようとしている。

このような調整のもとで、病原性生物の操作を目論む場合は、通常、政府機関に情報を提供するよう求められ、病原体が取り扱われるべき施設が査察される。このような届出および査察はいかなる作業が行われる前にも求めることができる。さらに、危険性が考えられる病原体の運搬は数カ国からコントロールされ監視される。一方で他の多くの国が遺伝子組換え生物の取り扱いおよび使用に対してさらに規制を受ける。

ヒトや動物に対する医薬品の生産に従事する施設の認可のための規制も平行して存在し、製品の安全性および有効性を確保することを目的とする。これらの規制により、GMP（製造管理及び品質管理規則）にかなうことを保証するために繰り返し施設の査察が要求される。このような規制により医薬品取引や、医薬品施設は禁じられた目的のためには使用されていないという国民の信頼構築が促されるべきである。

これらのコントロールや規制すべてによる最終的效果は、国民の健康や自然環境に対して病原体よりもたらされる危険を最小限とし、医薬品は安全でありそのことを国民に対して断言できることを保証しようとする国家体制をもたらすであろう。ある国におけるヒト、動物、または植物の疾病の大発生は容易に他国に拡大するため、地域的、国際的法案の調停のための様々な動きが進行中である。

目標

国際安全保障のひとつの目標は、疾病を戦争兵器として使用することを禁じ、違反者を発見し思ひどまらせるためにこの禁止令遵守を監視する制度を考案することである。兵器として使用可能な病原体とはまさに、疾病が自然に大発生する危険を示す病原体である。生物兵器禁止条約を強化するための制度はつねに2つの重要な要素を有すべきである。ひとつは、その施行にあたり責任を負う政府や国際組織に対して条約に特に関連のある施設や活動について声明を行うことである。ふたつめは、これらの声明は不定期に行われる査察により確認されるべき

である。

モンテカルロでの微生物の「平和」使用、およびジェノバでの微生物の「軍事使用の禁止」に関する議定書を展開するための折衝が現在行われているが、両者の間に共通のゴールが存在する。健康と自然環境の安全および国際安全保障のために、生物兵器条約を強化することで相乗的有益性が得られるであろう。

<46>

Pryde SE, Duncan SH, Hold GL, Stewart CS, Flint HJ.
The microbiology of butyrate formation in the human colon.
FEMS Microbiology Letters. 217(2):133-9, 2002 Dec 17.

ヒト結腸における酪酸形成の微生物学

細菌発酵により生じる酪酸はエネルギー代謝および結腸上皮細胞の正常な発達に重要であり、結腸疾患に対して主に予防的役割を果たす。結腸では難消化性デンプンなどの食餌性基質が酪酸を産生することが明らかであるが、酪酸の直接的（デンプンを分解する種を促進する）あるいは間接的（発酵産物の cross-feeding を介する）な産生促進の程度は、まだ明らかではない。培養試験や分子試験からヒトの糞便中に酪酸産生細菌が大量に検出され、これらはクロストリジウムクラスターIV または XIVa に属する酸素高感受性嫌気性菌であることが示されている。これらにはその分布や代謝の特性が研究中である *Eubacterium*、*Roseburia*、*Faecalibacterium*、*Coprococcus* に関連する多くの未発見であった種が含まれている。結腸酪酸産生菌の微生物環境を理解することにより、酪酸供給に及ぼす食餌の影響が明らかとなり、大腸における適切な微生物活性への新しいアプローチが示唆される。

<47>

Rafter J.
Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective.
British Journal of Nutrition. 88 Suppl 1:S89-94, 2002 Sep.

乳酸菌と癌：機序の視点から

結腸直腸癌は西洋諸国では癌の罹患率と死亡率の最重要原因の一つである。無数の健康効果がプロバイオティック乳酸菌(LAB)に帰されている一方で、おそらくは最大の論争点として残されているのが抗癌作用である。発酵、非発酵乳製品中の乳酸培養菌群を摂取した結果、ヒトにおいて癌が抑制されたという直接的な実験的エビデンスがないことが指摘される。しかしながら、主として基礎試験成績に基づく間接的エビデンスは文献に豊富である。LAB が大腸癌を阻止するかもしれない詳細な機序は現在不明である。しかしながら、その機序には以下の項目が含まれると考えられる：腸内細菌叢の代謝活性の変化、大腸の物理化学的状態の変化、発癌可能性物質との結合と分解、推定発癌物質あるいはプロモーター産生に関与する腸内細菌叢（例えば、胆汁酸代謝バクテリア）の定量的および／または定性的変化、抗腫瘍性物質あるいは抗変異原性物質の産生、宿主の免疫反応の亢進、宿主の生理機能に対する影響など。本論文においては、これらの推定される機序について触れる。

乳酸菌：腸内細菌叢：化学的予防：大腸癌

<48>

Reid G.
Safety of lactobacillus strains as probiotic agents.
Clin Infect Dis. 2002 Aug 1;35(3):349-50.

プロバイオティック薬剤としての乳酸菌の安全性

著者は、疾病の原因となる生物の報告はいずれも深刻に捉える必要があるという Sipsas ら[1]に同意するものの、そのレターの多くの点において意見を異にする。第 1 に、彼らが引用した元のレビューは[2]、賞賛に値するもののいくつかの重大な誤りを含んでおり、その始まりはレビューの著者が考え出したと思われるプロバイオティクスの定義である。プロバイオティクスは「適量を服用すると宿主の健康に有益である生きた微生物」と定義されるべきである[3、ページ 2]。元のレビュー[2]ではヨーロッパで使用されるプロバイオティック製品は米国のそれと異なると述べられているが、これは誤りである。なぜなら、例えば *Lactobacillus rhamnosus* GG はどちらの国々でも使用されている。さらに、レビュー[2]の著者および Sipsas ら[1]は重大な点を見逃している。すなわち、「プロバイオティック」と考えられる乳酸菌の菌種は、まず最初に宿主の健康に有益であることを証明されなければならなかつた[3]。しかし不幸にも、市場に出回る無数の「プロバイオティック」製品、および文献において「プロバイオティック」として引用されるあまりにも多くの生物が、宿主の健康に対する有益性をなんら証明されていない。せいぜい、関連する健康上の利益の証拠を有する菌種はほんのひとにぎりである[4]。しかし、入手可能な偽プロバイオティック製品がこれほど多く、しばしばそれらが信頼できない内容[5]であっても、副作用の報告はほとんどない[6]。

Sipsas ら[1]が引用した症例報告[7]は有用な結論を得るために必要な本質的詳細を欠いている。その患者はプロバイオティックな菌種を含有するかしないかが明らかにされていない乳製品(そのような菌種はほとんど入手されないことからすると、おそらく含有していない)を「毎日大量に」消費していた。Sipsas ら[1]によるとその患者が免疫無防備状態であるとは記載されていない。患者は便秘であったが、便秘が消失したのが乳製品摂取によるのか過量摂取によるのかは不明である。その患者は便秘または結腸スコープの結果として顕微的腸病変を受けたのか。結腸スコープ前に投与された瀉下薬には抗生物質は含有されていたか。いずれにせよ腸内細菌叢は破壊された。分離菌の分子確認は行われておらず、また、分離菌が患者が摂取したヨーグルトにおける菌種と同一であるかどうかを確認する試みが全くなされなかつたことより、心内膜炎と患者の食餌、真のプロバイオティックを摂取した場合はもちろんだが、その両者に何らかの関係の証拠を見出すのは拡大解釈といえよう。

どれほどの人々がプロバイオティックを日常的に安全に使用しているかを確定するのは困難である。ヤクルト製品はカゼイ菌種シロタ株を含有し、その製造元は年間売り上げが 90 億瓶以上であると主張する。ダノン、ヴァリオ、およびその他の健康上の利益が証明されるプロバイオティックを含有する製品の製造元は年間売り上げが 200 億を超えるまでに増加しているようだ。世界中で摂取されたプロバイオティック製品がおそらく 2000 億に達したあの 10 年間に 4 症例に心内膜炎の発現をみたが、これに基づき心内膜炎への心配が高まると(ヨーグルトはプロバイオティックではないので、Sipsas らが言及した症例のうち 6 例を無視した[1])、プロバイオティック療法の真のリスクが誇張されたり誤って伝わったりすることとなる。

安全性に関しては、プロバイオティック分野の信頼できる科学者は長い間、乳酸菌、食物、または医薬品の投与を含むいかなる療法を使用する場合も、患者またはエンドユーザーの体調を考慮するべきであると警告してきた。免疫無防備状態や腸出血を伴うある種の患者では、プロバイオティックの摂取が有益な結果をもたらす場合ともたらさない場合がある。プロバイオティック製品は OTC により容易に入手できるので、購入したものが何であるのかを理解するのは消費者の責任となる。

Sipsas らは感染性病原体は患者が摂取したヨーグルトからの分離菌とは関連するはずがないという 2001 年の研究[8]を引用するが、「プロバイオティック剤として使用される乳酸菌の病原性の役割を示唆する文献の増加」を説明することはできなかつた[1、ページ 1284]。むしろ彼らは個人的認識に基づく誤った警告を起こしてしまつた。もし彼らが高度に信頼のおける製品設計において十分証明されたプロバイオティック生物により生産された病原性毒性因子について記述し、それが患者につながることを証明すれば、我々は喜んで注目しよう。それまでは、適切な試験を受けたプロバイオティックには疾病を予防し、それを治療することもある十分な可能性が存在することが適正に証明されている。このメッセージが健康管理の専門家、政府、および産業界により真剣に受け取られるまでは、デマを撒き散らすことは建設的ではない。薬剤概論を手に取ると、プロバイオティックの安全性よりも副作用により関心を寄せるべき多くの理由が見出せるであろう。

<49>

Rochet V, Rigottier-Gois L, Beguet F, Dore J.

Composition of human intestinal flora analysed by fluorescent in situ hybridisation using group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes

Genetics Selection Evolution (Paris), 33 (Suppl. 1): S339-S352, 2001

細菌群特異的 16S rRNA 標的オリゴヌクレオチドプローブを用いた FISH (蛍光標識 in situ ハイブリダイゼーション) 法によるヒト腸内細菌叢の組成分析

糞便中細菌叢の組成を示すために通常用いられている培養法はしばしばある細菌群についてはあまりにも選択的である。本研究では、培養を介さない直接的方法である FISH 法 (蛍光標識 in situ ハイブリダイゼーション) を用いてヒト糞便中細菌叢組成を定量した。4 種の細菌群特異的プローブと 16S rRNA を標的とした 1 種の領域プローブ Eub338 を用いて、9 名の健常成人ボランティアから得た糞便中細菌の固定浮遊液の分析を行なった。各群からの細胞の相対比率を検討するためエピ蛍光顕微鏡画像分析を行なった。本 FISH 法を検証するため、ハイブリダイゼーション条件を最適化した後プロトコールの再現性を評価した。領域プローブ Eub338 は総糞便中細菌の平均 $80 \pm 11\%$ を標識した。4 プローブのパネルは細菌叢の 75% 以上を明らかにした。Clostridium-coccooides-Eubacterium rectale 群が最も多く示され、細菌の $36 \pm 7\%$ を占めた。用いた他の 3 種のプローブ Bacto 1080、Bif 164、Fpr645 は総細菌叢のそれぞれ $17 \pm 5\%$ 、 $15 \pm 9\%$ 、 $23 \pm 5\%$ を標識した。クロストリジウムに属する 2 種の優勢な細菌群が総細菌叢のほぼ 60% を構成した。画像分析と組み合わせた FISH 法はヒト糞便中細菌叢の組成を評価するための直接的で強力な分子学的手法である。

<50>

Rolfe RD.

The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health.

Journal of Nutrition. 130(2S Suppl):396S-402S, 2000 Feb.

胃腸の健康管理におけるプロバイオティクス培養の役割

抄録 プロバイオティクスを腸の健康増進に利用することが長年提唱されている。プロバイオティクスは、もともとは体内に摂取された後、特定の病的な状態の予防や治療に有益な作用を示す生存能力のある微生物と定義されている。腸疾患の予防や治療にプロバイオティクスを利用するなどを支持する文献は比較的大量にある。しかし、プロバイオティクスの利用の科学的な根拠が確立したのはごく最近のことであり、発表を目的にしっかりと計画された臨床試験が始まられたところである。現在、最も研究されているプロバイオティクスは乳酸菌、特に *Lactobacillus* sp. と *Bifidobacterium* sp. である。しかし *Escherichia coli*、*Streptococcus* sp.、*Enterococcus* sp.、*Bacteroides* sp.、*Bacillus* sp.、*Propionibacterium* sp. および多くの真菌類など、他の有機体もヒトにおいてプロバイオティクスとして利用されている。1 種類以上の菌株が混在するプロバイオティクスもある。プロバイオティクスは抗生物質による下痢 (*Clostridium difficile* による腸疾患を含む)、感染性細菌およびウイルス性下痢 (ロタウイルス、細菌性赤痢、サルモネラ菌、腸内毒素原性大腸菌、コレラ菌、HIV/AIDS、腸内摂食性下痢、ヘルコバクターピロリ胃腸炎、スクラーゼマルターゼ欠如、炎症性腸疾患、過敏性大腸症候群、小腸細菌過成長および乳糖不耐症による下痢を含む) など、胃腸障害の多様なスペクトルの予防および治療における有効性が検討されている。プロバイオティクスは結腸癌の発癌物質生成に関する腸内細菌酵素を阻害することが示されている。プロバイオティクスは免疫を刺激し、限定された栄養素と競合し、上皮および粘膜接着を阻害し、上皮侵襲を阻害し、抗菌物質の産生など、多様なメカニズムにより腸の健康を増進する。腸の健康におけるプロバイオティクスの役割を明確に示すにはさらに検討が必要ではあるが、プロバイオティクスは非常に興味深い予防的および治療的な進歩を代表する物質であると思われる。

<51>

Rowlands JC.

Determining the safety of bioengineered microorganisms.

Food Technology, 2002, 56 (10): 28-31

バイオ工学処理微生物の安全性の決定（判定）

2001年1月18日に、米国食品医薬品局(FDA)は、バイオテクノロジー由来食用作物の安全性を確立するための一連のガイドラインである「Premarket Notice Concerning Bioengineered Foods: バイオ工学処理食品に関する上市前通知」(FDA, 2001a)を公表した。この新政策は、FDAの以前の「Statement of Policy: Foods Derived from New Plant Varieties; 政策声明：新種植物由来食品」(FDA, 1992)を補足し、10年前のこの政策声明公表以後に生じた新たな問題を扱うためにデザインされた。興味深いことに、これら2つの規則はいずれも、バイオ工学処理微生物が食品バイオテクノロジーに利用される最初の微生物であるにもかかわらず、そのリスク評価を具体的に扱っていない。

本論文中で扱う問題のいくつかは、組み換えDNAテクノロジーによるゲノム操作を受けた植物、動物または微生物など、バイオ工学処理生物に適用可能であるが、ここでの目的はバイオ工学処理微生物に特異的な問題を扱うことである。

バイオ工学処理微生物は食品加工補助剤および材料の生産のための使用が高まっている(表1)が、これら微生物の食糧生産における潜在能力は気付かれ始めたばかりである。企業は、明らかにこの技術をプロバイオティクス、すなわち食品としてまたは食品中の摂取を意図して生きた培養菌に遺伝子工学を適用するであろう。FDAは、食品添加物またはGRAS物質(一般に安全と認められている物質)以外のこの種の添加成分に関し特別な規制を課していない。後者の経路が選択される場合には、これらの製品を上市する前にGRASの決定をFDAへ通知するか否かは自主的なものである。

バイオ工学処理微生物およびそれらに由来する製品の安全性評価に関しては確立した先例がある。本質的に、手順には宿主(受容)微生物；遺伝子修飾；新しいバイオ工学処理微生物および発現産物の表現型および生化学的特性；製造工程(現行医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準、現行GMP)および規格；推定一日摂取量(EDI)レベルとその結果である食事／栄養的影響；ならびに精製製品や全バイオ工学処理微生物に要求される適切な試験での安全性評価(毒性)に関する詳細な記述が含まれるべきである。

明らかに、最終食品の成分が何であるか—精製蛋白質、その他の分子あるいはバイオ工学処理微生物そのものであるかどうかで具体的な安全性試験が決定される。

さらに、安全性試験は、バイオ工学処理微生物が生存可能な微生物(プロバイオティック)または生育不能な微生物として摂取されるかどうかによって調整される必要がある。安全性評価は、精製酵素またはバイオ工学処理微生物由来分子に関してよりも、バイオ工学処理微生物プロバイオティックに関するほうが複雑になると考えられる。現在、食品市場でのバイオ工学処理微生物プロバイオティクスに関する確認例はない；バイオ工学処理微生物テクノロジーは、主に精製された食品成分および酵素などの加工補助物質を生産するために利用されている。たとえそうであっても、バイオ工学処理微生物から生産された食品成分のリスク評価は、通常、生存しているバイオ工学処理微生物との直接的および／または間接的な消費者相互作用を考慮するため、微生物は安全で、十分に特徴が明らかにされ、安定していることが必須である。

最も重要な点は、安全性試験の程度およびタイプがリスクと釣り合っていなければならないということである。バイオ工学処理微生物に由来する食品成分およびプロバイオティクスのリスク評価に関する独特な問題点のいくつかを以下に考察する。バイオ工学処理微生物のリスク評価のための決定樹を図1に示す。

微生物の特徴

レシピエント微生物は、遺伝子修飾の前後で、病原性(通常の環境下で病気を引き起こす)、毒素産生性(検出可能なレベルで有害物質を産生するか、または通常の環境下で明らかに有害

である）またはアレルゲン（アレルギー誘発能を有している）であってはならない。現在、微生物に関する GRAS 通知はないが、食品または食品成分として安全に使用されたことを証明できるいくつかの菌株を入手することができる。食品に使用される微生物および微生物由来成分のリストは、FDA のウェブサイト(FDA、2001b)上で閲覧できる；これは完全なリストではなく、安全な食品の利用歴を有するその他の微生物例もある。

しかしながら、新しいまたは特徴が明らかにされていない宿主微生物が使用される場合には、リスク評価で宿主ならびにその近縁で考え得る病原性／毒性／アレルゲン性を考慮すべきである。微生物の内因性遺伝子発現に対するバイオ工学の影響を評価する必要がある。ゲノム変化は、様々な生体分子およびそれらの代謝物のレベルを調節する酵素をエンコードしている遺伝子の発現を変化させるばかりでなく、毒性物質をエンコードしている遺伝子の発現を増加させる可能性がある。さらに、通常検出可能な産物を発現しないゲノム内に組み込まれた「サイレント遺伝子」の活性を招く可能性がある。したがって、活性化されたサイレント遺伝子の産物または変化を確認する必要がある。これらの考え得る変化のリスク評価の重要度は、バイオ工学処理微生物が最終的にどの程度消費されたかとか、最終製品の純度に左右されるであろう。

最終精製食品の成分に毒性物質またはアレルゲンが含まれなければ、微生物による毒性物質またはアレルゲンの発現が、必ずしも宿主としての利用に不適格であるわけではない。また、ずっと複雑なリスク評価であり、毒性物質の無害性影響量(NOAEL)を明らかにする必要があるが、意図した使用による毒性物質の消費レベルが結果的にごくわずかであれば、安全性を確立できる可能性がある。アレルゲンの閾値に関する現行の規制当局の懸念を考慮すると、アレルゲンで汚染された食品成分およびアレルゲン発現プロバイオティクスの NOAEL を設定する可能性は低い。さらに、既知の病原性宿主由来のプロバイオティクスは、間違いなく容認されないと考えられる。

修飾の特徴

遺伝子修飾に関し最も重要な安全性上の関心事は、遺伝子の安定性および表現型の予測可能性である。一番の関心事は、遺伝子が周囲へ漏出しないこと；すなわち消費者またはその他の生物への水平遺伝子移入がないことである。このために、過剰な導入遺伝子または配列の封入や導入遺伝子の過剰発現を避けるか、最小化すること。避けるべき配列は、(1) 異種 DNA の別のゲノムへの予期せぬ組み込みを促進するトランスポゾンおよび (2) 野生型または自然発生細菌へ導入されると、これらの細菌に選択的利益をもたらす抗菌薬耐性決定因子／抗生物質耐性遺伝子である。

遺伝子の安定性は、プラスミドを有する宿主微生物の形質転換ではなく、遺伝物質の染色体組み込みによって高められる。明らかに、すべての遺伝物質の特徴は構造と由来によって明らかにされるべきであり、ビルレンス因子、蛋白毒素、あるいはマイコトキシンまたは他の毒性もしくは有害物質の合成に関与している酵素をコードしている遺伝子を含まないこと。

また、微生物の遺伝子修飾のすべてに、異種 DNA 配列の挿入が生じるとは限らないことを覚えておくことも重要である。遺伝子修飾によって、宿主遺伝子の欠失、増幅、不活性化、変質または発現の増強などが起こり得る；たとえそうであっても、遺伝子修飾は十分に特徴が明らかにされ、安定していて、予測可能でなければならない。

プロバイオティクスと腸内定着

外因性微生物の体内への侵入の主なバリアとして内因性腸内微生物叢が果たしている役割は、正当に評価されないことが多い。成人の消化管には約 400 種、約 10^{14} 個の微生物が生存しており、これらの特徴はほとんど明らかとなっていない。この微生物叢は、環境要因（食餌、抗菌薬療法、消毒薬、食品添加物、職業、気候など）、哺乳類宿主要因（年齢、性別、腸管運動性、通過時間、pH、胆汁酸など）および微生物叢要因（栄養物、酸素、H⁺受容体／レセプターをめぐる競合、抗菌物質、有機酸、アンモニア、硫化水素の产生など）により、消化管に沿って量的および質的に変動する。

消化管内微生物叢は、腸管運動性、微生物補助消化、腸管関連免疫系の発達および細胞レベルでの原核・真核クロストークなど、様々な機能を妨害する。したがって、生きているバイオ工学処理微生物および／またはプロバイオティクス（バイオ工学処理されていないプロバイオ

ティクスでも)のリスク評価では、ヒト胃腸管における新しい微生物の持続性または定着ならびに内因性腸内微生物叢およびヒトの健康に及ぼす影響を考慮すべきである。このようなリスク評価は、亜慢性給餌試験期間中の追加試験によって達成される。そのような試験には、動物の栄養状態に関する追加モニタリングのみならず、腸内定着の一指標として糞中のバイオ工学処理微生物—特異的DNAの存在に関するモニタリングが含まれると思われる。

アレルゲン性

米国における食物アレルギーの90%以上は、牛乳、卵、魚貝類、木の実、小麦、マメ科植物、特にピーナッツおよび大豆によって引き起こされる。明らかに、いかなる導入遺伝子も既知のアレルゲンをエンコードしている遺伝子からの遺伝物質を含むべきではない。しかしながら、すべての新しいバイオ工学処理微生物の発現産物と既知のアレルゲンを比較するために、配列相同性の検索を実施する必要があるであろう。既知のアレルゲンと隣接アミノ酸が6個以上または全アミノ酸の35%超と相同すると陽性と定義されている(JECFA, 2001)。

発現産物は、熱、加工条件、pHおよび/または胃液に対し安定であってはならない。容易に変性および/または分解する蛋白質はアレルゲン性がより低いと考えられている。発現した蛋白質が安定であるおよび/または既知のアレルゲンと相同的である場合には、血清に対するスクリーニングおよび/またはアレルゲンで感作されたヒトでのプリックテストなどの追加試験が必要であろう。

前途有望な未来

バイオ工学処理微生物由来の食品成分および加工補助物質のリスク評価は、今や、10年を超える成功経験で裏打ちされた手順である。チーズ製造に使用される精製キモシンが最初に承認され、それ以降、バイオ工学処理微生物に由来するその他多数の酵素、食品成分および栄養物がこのリストに追加されてきた。これらの食品成分および加工補助物質の安全性は、消費者が食物連鎖を承認するに際しての核である。

バイオ工学処理されたプロバイオティクスの将来を考えるとき、この容認を維持するためにはバイオ工学処理微生物食品の安全性の厳密な科学的評価は欠かせないものである。リスク評価にどの様な新しい難問が生じるかを予測することは困難であるが、ここで考察したように、いくつかの重要な問題が常に扱われる必要がある。過去を教訓にすれば、このエキサイティングな新技術の未来および安全性は前途有望であると思われる。

<52>

Saarela M. Lahteenmaki L. Crittenden R. Salminen S. Mattila-Sandholm T.
Gut bacteria and health foods--the European perspective. [Review]
International Journal of Food Microbiology. 78(1-2):99-117, 2002 Sep 15.

腸内菌と健康食品—ヨーロッパの視点

腸の健康を目的とするプロバイオティクス、プレバイオティクス、シンバイオティクスは、最近、ヨーロッパ、日本、オーストラリアにおいて機能性食品市場の最大部分を占めている。これらの成分がある種の腸疾患を有するヒトの健康を改善する可能性を持っていることを示すエビデンスが増え続けている。現在、ヨーロッパ委員会は、その第5回枠組みプログラムを通じて、腸内細菌叢の科学、腸内細菌叢の宿主との相互作用、ヒトの保健と健康状態の改善を目的とした腸内細菌叢の構成と活性を操作するための方法などに関する実質的な努力に焦点を合わせている。現在、8件の学際的多施設共同研究プロジェクトが、有効なプロバイオテック食品の開発に必要なテーマをカバーしている。即ち、分子レベルでのプロバイオテックな機序の研究をはじめ；安定した製品の配達を確かなものにするための技術の開発；定められた治療目標に対する特異的プロバイオティクスの安全性と効果の証明などである。この協調のとれた研究努力は、健康と疾患に対するヒト腸内細菌叢の役割に関する理解を深め、様々な腸の問題に取り組むための新しいアプローチと製品を我々に与えてくれることを約束する。

<53>

Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T.
Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties.
J Biotechnol. 2000 Dec 28;84(3):197-215. Review.

プロバイオテック細菌：安全性、機能性および工業生産的特性

過去 20 年間に、プロバイオテック（健康促進）微生物は、様々なタイプの食品に、特に発酵乳製品に含有されることが増えた。プロバイオテック微生物を選択する過程においては、安全性、機能性、工業生産的特性を含む幾つかの側面が考慮されなければならない。安全性面には起源(健常人の消化管)のような規格、非病原性、抗生物質抵抗性などが含まれる。機能性面には、消化管内における生存性と存続性、免疫調節、拮抗作用および抗変異原性などが含まれる。良好な安全性と機能性に基づいて選択されたプロバイオテック菌株が消費者に役立つためには、まず、工業的条件下で製造されうるものでなければならぬ。さらに、貯蔵期間中、あるいは配合された食品中でも風味を損なうことなく生存し、機能性を保持しなければならない。プロバイオテック食品生産の工業生産面および感覚面に関連した要因が最も重要である。その理由は、食品産業は、消費者の要求を満たすことによってのみ、将来、機能性プロバイオテック製品の消費の促進に成功することが出来るからである。

<54>

Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH.
Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety.
Am J Clin Nutr. 2004 Feb;79(2):261-7.

プロバイオティック生菌を含有する乳幼児用離乳食の長期間摂取：耐性と安全性

背景：非病原性の生菌は、特にヨーグルトの形で、多くの小児に食物として摂取されている。特定の型や株のプロバイオティック菌を長期摂取した場合の耐性と安全性については良く知られていない。

目的：研究目的は、*free-living* の健康な乳幼児において 2 レベルのプロバイオティック菌が添加された離乳食に対する耐性を検討し、発育、全般的臨床状態および腸の健康に及ぼす影響を検討することであった。

デザイン：3~24 ヶ月齢の健康乳幼児を対象とするプロスペクティブ二重盲検ランダム化プラセボ対照比較試験。乳幼児は *Bifidobacterium lactis* および *Streptococcus thermophilus* をそれぞれ 10(7) CFU/g 含有する牛乳ベースの標準的な離乳食群、*B. lactis* および *S. thermophilus* をそれぞれ 10(6)CFU/g 含有する離乳食群あるいはこれらの菌が添加されていない離乳食群のいずれかに無作為に割り付けられた。臨床的アウトカムは、離乳食摂取量、消化管耐性、身体計測値、保育所出席率、病歴などとした。

結果：118 例の登録時年齢（平均値±SD）は 7.0±2.9 ヶ月、離乳食摂取期間は 210±127 日であった。年齢、性別、離乳食摂取量、試験期間について群間に有意差はなかった。添加された離乳食は良く摂取され、非添加離乳食摂取群に比べ、腹痛や過敏性の報告が少なく ($P<0.001$)、抗生物質の使用頻度も少なかった ($P<0.001$)。発育、ヘルスケア注目度、昼間の保育所欠席率、その他の健康関連指標について両群間に有意差は認められなかった。

結論：*B. lactis* および *S. thermophilus* が添加された離乳食の長期摂取は良く忍容され、安全であり、結果として、適切な発育がみられ、腹痛と過敏性の報告が少なく、抗生物質の使用頻度が少なかった。

<55>

Salminen S, Deighton M.
Lactic acid bacteria in the gut in normal and disordered states.
Digestive Diseases. 10(4):227-38, 1992.

正常および異常状態の腸における乳酸菌

ヒトの腸内細菌叢はヒトにおいて重要な防御的役割を果たすうまくバランスのとれた複合生態系である。その構成は比較的安定ではあるが、様々な疾患状態や抗生物質の投与によって変化することがある。ヒト由来乳酸菌の生菌を含有する製品は微生物の正常な機能を回復し、消化管感染やその他の状態を伴う患者の症状を緩和する上で価値があるように思われる。

キーワード：乳酸菌、腸内細菌叢、消化管感染、コロニー形成による

<56>

Salminen S, Isolauri E, Onnella T.
Gut flora in normal and disordered states.
Chemotherapy. 41 Suppl 1:5-15, 1995.

健康および病気状態における腸内菌叢

消化管感染症は世界的に成人、小児どちらにとっても大きな健康上の問題である。正常なヒト腸内細菌叢が変化すると、腸障害の発症を来す。病原性細菌は腸の微生物環境や腸コロニー形成抵抗性を変化させる。健康な消化管内細菌叢は侵襲する有機体に対してバリアを形成する。正常な腸内細菌およびプロバイオティック細菌のいくつかは病原体に対する宿主の防御メカニズムを強化する。さらに腸粘膜への付着および局所免疫応答刺激により、腸の免疫性を亢進する。つまり、腸内微生物環境のバランス維持により、腸内の統合性を保護する能力が改善する。

<57>

Salminen S, Von Wright A.
Current probiotics-safety assured?
Microbial Ecology in Health and Disease, 10 (2): 68-77, 1998

最近のプロバイオティクス—安全性は確かめられているか?

伝統的にプロバイオティクスは宿主の健康に有益な影響を持つ生きている微生物(細菌、イースト)と定義されている。プロバイオティクスは日常の発酵製品だけでなく、その他の食品、病院食、医薬品にも用いられており、また、非発酵製品に機能性成分として添加されて用いられることが多くなってきている。新しいプロバイオティックな微生物の選択は、新しい菌株だけでなく、より有益なあるいは特異的な属さえも標的としている。全く新しい微生物や遺伝子組み換え微生物を導入する場合には、安全性とリスクベネフィット比が慎重に検討され、評価されなければならない。また、新しいプロバイオティクスは健常人の腸内細菌叢に通常見出される種類の属と菌株でなければならない。食品中の乳酸菌には、長い安全使用の歴史がある。Lactococcus 属と Lactobacillus 属のメンバーは、一般的に最も安全性が高いとみなされている。Streptococcus 属、Enterococcus 属およびその他の乳酸菌属のメンバーには、幾つかの日和見病原体が含まれている。潜在的急性作用、菌株依存性の特性、内因子、潜在的毒性を含む理論的に考えられるプロバイオティクスの副作用について考察する。入手した情報は、現在用いられているプロバイオティクスの安全性を支持しているが、新しいプロバイオティクスについては安全性評価を勧告する必要があり、このことを提唱する。

<58>

Salminen S, von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland SE, Mattila-Sandholm T.
Demonstration of safety of probiotics -- a review.
Int J Food Microbiol. 1998 Oct 20;44(1-2):93-106. Review.Citation

プロバイオティクスの安全性の証明—総説

プロバイオティクスは、一般的に、摂取されると宿主の健康に有益な効果をもたらす生きている微生物（細菌、イースト）と定義されている。プロバイオティクスは、食品、特に発酵乳製品に用いられるほか、医薬品にも用いられる。新しいプロバイオテック菌株の開発は、より活性で有益な微生物を標的としている。新しい微生物あるいは遺伝子組み換え微生物の場合には、安全性とリスクベネフィット比の問題が検討されなければならない。食品中の乳酸菌(LAB)には長い安全使用の歴史がある。Lactococcus 属と Lactobacillus 属のメンバーは、一般的に安全と認められる GRAS クラス(generally-recognised-as-safe)にあるとみなされているが、Streptococcus 属、Enterococcus 属およびその他の幾つかの LAB 属のメンバーには、日和見病原体が含まれている。乳酸菌は本質的には多くの抗生物質に耐性である。しかしながら、多くの場合、耐性は伝達されることがなく、乳酸菌に関する日和見感染においてさえ、多くの臨床的に使用されている抗生物質に感受性を示す。従って、内因性型の耐性の場合には、安全性に懸念は特にない。しばしば見られるプラスミドに関連する抗生物質耐性の場合は、その耐性がその他のより有害な属や菌種に伝播される可能性があるため別問題である。グリコペチド系抗生物質(パンコマイシン、ティコプラニン)に対する腸球菌の伝達される耐性は、パンコマイシンが多剤耐性菌に対する治療において残された最後の有効な抗生物質の一つであることから特に注目される。プロバイオテック菌の新しい菌種や、より特異的な菌株が絶え間なく同定されている。新しい菌株を製品に組み入れる前には、有効性を慎重に評価し、伝統的な食品クラスの微生物と同程度の安全性を有しているかどうかについてケースバイケースの評価を行うべきである。文献に報告されている最近の副作用についてレビューする。既存のプロバイオティクスおよび新しいバイオティクスの安全性についての将来に向けた勧告が行われるであろう。

<59>

Sanders ME.

Probiotics: considerations for human health.

Nutr Rev. 2003 Mar;61(3):91-9. Review.

プロバイオティクス：ヒトの健康についての考察

健康の維持や病気の予防におけるプロバイオティクスの役割に関するエビデンスが集められ、盲検やプラセボを対照とするヒトでの臨床試験により支持される症例もある。今日、抗生物質耐性菌や他の微生物による脅威が予想されることから、感染症を予防する価値が認められている。プロバイオティクスは感染症から自身を防御するにあたり、特に消化管の粘膜表面に付着して、重要な役割を果たすと考えられる。プロバイオティクス製品は錠剤、散剤、食品、乳児の粉ミルクなど様々な形で利用することができる。全身の健康維持のための特定の株や使用される濃度が確認されていない場合もあり、消費者は注意が必要である。

キーワード：プロバイオティクス、腸の健康、消化管、抗生物質耐性菌

<60>

Sanders ME, Klaenhammer TR.

Invited review: the scientific basis of Lactobacillus acidophilus NCFM functionality as a probiotic.

J Dairy Sci. 2001 Feb;84(2):319-31. Review.

招待レビュー：プロバイオティクスとしての Lactobacillus acidophilus NCFM の機能性に関する科学的根拠

Lactobacillus acidophilus NCFM は従来からある食品（牛乳、ヨーグルト、幼児粉ミルク）などに利用されるプロバイオティクス株であり、食品補助成分である。アメリカでは 1970 年

代半ばから商業的に利用されるようになり、その安全性や商業的な易操作性が確証され、生化学的、生理学的な特性がヒトのプロバイオティクスの機能性に重要と推測されている。この株は *in vitro*、動物実験およびヒトにおいて、その特性が示されている。NCFM は染色体配列を完成するために使われる株の前駆体であり、遺伝子機能とプロバイオティクス機能の関係を理解するための基本となる株である。表現型および遺伝子型の技術はから A1 型 *L. acidophilus* 株などの分類状態が確証されている。Caco-2 および粘液分泌 HT-29 細胞培養系に付着し、抗微生物化合物を產生し、遺伝子操作や直接 DNA 誘導を行いやすい。NCFM には突然変異ラットにおける異常な陰窩形成を阻害し、結腸癌のリスクを低下しうる活性が示唆されている。NCFM を含むプロバイオティック株を混合すると、小児の下痢の発生が低下する。NCFM は小腸細菌が過増殖している血液透析患者の血中毒性アミン濃度を有意に低下させる。食餌として適量を摂取した場合、NCFM は乳糖不耐例におけるラクトースの消化を促進する。ヒトにおけるプロバイオティクスとしての特性を確証し、プロバイオティクス作用のメカニズムの解明により、ヒトの健康増進におけるこの株の役割が明らかとなっていくであろう。

<61>

Sanderson IR, Naik S.

Dietary regulation of intestinal gene expression.

Annual Review of Nutrition. 20:311-38, 2000.

食事による腸の遺伝子発現の調節

抄録 我々は疾患原因としての先天的遺伝子異常に徐々に気付いてきている。しかしながら、遺伝子発現の変化はその他の疾患過程にも関与することが出来る。最近、我々の環境が遺伝子を変化させ、疾患に直接的影響を与える可能性が示唆された。食事はほとんどの臓器、特に消化管の細胞の環境を変える有力な機序である。本レビューにおいては腸の遺伝子調節に対する栄養因子の影響について触れる。これらの影響には食事成分ではないが食事の変化に反応するインスリン、酪酸塩、正常腸内細菌叢によって產生される短鎖脂肪酸などが含まれる。食事の操作は腸疾患の治療手段かもしれない。従って、遺伝子発現に対する影響の観点から、栄養的治療についても考察する。

<62>

Scheppach W, Bartram HP, Richter F.

Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer.

European Journal of Cancer. 31A(7-8):1077-80, 1995 Jul-Aug.

結腸直腸癌予防における短鎖脂肪酸の役割

短鎖脂肪酸 (SCFAs : 酢酸、プロピオン酸、n-酪酸) は食物繊維やデンプンが細菌発酵する間に大腸で生じ、結腸上皮細胞増殖に対してパラドキシカルな作用を示す。3つの代表的な SCFA は、正常陰窩細胞の増殖を促進し、n-酪酸と程度は弱いがプロピオン酸は結腸癌細胞株の増殖を阻害する。分子レベルでは n-酪酸はヒストンをアセチル化し、アポトーシスを誘導し、種々の癌遺伝子の発現を調節する。発癌物質に対する SCFA の複雑な作用を理解するには、細胞増殖の促進が抑制に"スイッチ"する腺癌-癌シークエンスの中間ステージの研究が重要である。

<63>

Shi HN, Walker A.

Bacterial colonization and the development of intestinal defences.

Canadian Journal of Gastroenterology. 18(8):493-500, 2004 Aug.

細菌のコロニー形成と腸管防御の発達

ヒトは、妊娠期間中に腸管防御が発達し、満期時には感染源や外部の抗原に適切に反応する能力を有している。しかしながら、活発な防御反応が生じる前に、腸管は最初にコロニー形成細菌に曝露されなければならない。様々な腸内細菌によるコロニー形成は、免疫グロブリン A (IgA) の合成と分泌、平衡のとれた T ヘルパー (Th) 細胞反応の発生の様な重要な腸管防御の発達にとって必要である。無菌動物と腸管防御の研究によって、腸管の正常な免疫生理学的発達についての理解を深めることができた。これらの研究によって免疫反応の生理学を洞察することが出来た。2つの重要な免疫機能は、IgA を分泌して有害な刺激から腸管表面を防御することと共生細菌や食事蛋白に対する全身反応を阻止して（例えは経口耐性）、慢性炎症を防止することである。いずれの機能も無菌動物には存在しないが、無菌動物を通常飼育（集落化）した後には速やかな発達が見られる。

本総説においては、正常な粘膜免疫機能発現に対する細菌コロニー形成の重要性と不適切なコロニー形成の臨床的結果としての疾患の発現について考察する。例えば、過度の Th2 活性はアトピーの原因となることがあり、他方 Th1 の優勢は *Helicobacter pylori* 胃炎やクローン病のような状態で見られる。先進諸国では過去 30 年間における感染性疾患の根絶に伴って、アトピーや自己免疫疾患の頻度が増加した。この疫学的観察結果は「衛生仮説」によって説明されてきたが、このことは公衆衛生による細菌による負担の軽減が腸内の免疫不均衡をもたらしたことを示唆している。腸管リンパ節および上皮細胞のパターン認識レセプターファミリー (Toll 様レセプター) は、細菌分子パターンに対する先天的免疫反応に介在し、それによって後天性免疫を統合する。腸管内における細菌通信(細菌・上皮応答)の役割が明らかにされたので、医師は例えばプロバイオティックの使用によって腸の免疫反応を調節できるに違いない。

<64>

Sipsas NV, Zonios DI, Kordossis T.

Safety of Lactobacillus strains used as probiotic agents.

Clin Infect Dis. 2002 May 1;34(9):1283-4; author reply 1284-5. No abstract available.

プロバイオティクスとしての乳酸菌の安全性

編集者へ

感染症に対するプロバイオティクスの役割についての優れたレビュー[1]を編集者の論評[2]とともに興味深く拝読しました。Salminen 医師と Arvilommi 医師は論評において“乳酸菌は食品に安全に用いられてきた長い歴史があり・・・従ってもしあつたとしても安全性のリスクは低いと思われる”[2, p1578]と述べ、Alvarez-Olmos 医師と Oberhelman 医師はレビューにおいて“乳酸菌により誘発された敗血症や心内膜炎が数例の免疫機能低下患者に報告されているが・・・これらの感染症はいずれもプロバイオティクス食品に用いられた乳酸菌に関連したものではない”[1, p1571]と論じており、両報告ともプロバイオティクスとしての乳酸菌の安全性を示唆している。本文においてプロバイオティクスとしての乳酸菌の安全性についていくつかの問題点を提起した。

乳酸菌は一般に非病原性であると考えられている。しかしくつかの報告では、心内膜炎患者から分離した乳酸桿菌は標準株や口腔常在株に比べて血小板凝集能、コラーゲンやフィブリノゲンとの結合能、グリコシダーゼやプロテアーゼの産生能がより大きいことが示されている[3]。これらの特性は血管表面での生存やコロニー形成に役立つ。心内膜炎を誘発する非常に稀な病原性から、それらが常在菌かまたは摂食菌かについての疑問が浮上してきている。

最近我々は結腸鏡検査の合併症として *Lactobacillus rhamnosus* による心内膜炎を呈した免疫機能正常患者の 1 例を報告した[4]。興味深いことに、本症例は乳製品、特にヨーグルトを毎日大量摂取していたことを報告した。過去 10 年間（1992～2001 年）の文献検索では乳酸菌性心内膜炎の報告が 16 例公表されていた；4 例はヨーグルトの連日摂食を報告しており[4-7]、他の 1 例は *L. rhamnosus* 含有プロバイオティクス製剤の服用を報告していた[8]。これら患者の 1 例では、患者が食べていたヨーグルトから分離した乳酸桿菌と病原性分離菌を標準的方法では区別することができなかった[7]。しかし、最終的には PCR 等の高度な方法で 2 菌株が異なっていることが立証された。乳酸菌性心内膜炎の他の 1 例では、血液培養から分離した菌株

を患者が服用していたプロバイオティクスのカプセルから培養した菌種の1つと区別できず、これは培養中の発現（それらは一致していた）、API 50CHL 検査に対する反応、抗菌薬感受性パターン、熱分解質量分析法の所見によるものであった。[8]。

また乳酸菌は肝膿瘍の稀な原因である。最近の報告では[9]、*L. rhamnosus* による肝膿瘍を呈した74歳の女性患者は *L. rhamnosus* GG 株を含む乳飲料を4ヶ月間以上毎日愛飲していたことを報告した。患者からの分離菌は *L. rhamnosus* GG 株と一致しており、パルスフィールドゲル電気泳動法では区別できなかった。

乳酸桿菌による心内膜炎と肝膿瘍はともに非常に稀な状況であることは承知しており、最近の研究では菌血症患者から分離された乳酸菌種と食品産業で用いられている菌種に関連性はないことが示されている[10]。しかしながらプロバイオティクスとして用いた乳酸菌の病因への関与を示唆する報告数が増え、いくつかの問題が浮上してきている。プロバイオティクスの安全性についてより多くのエビデンスの必要性が示されている。

<65>

Soleman N, Laferl H, Kneifel W, Tucek G, Budschadl E, Weber H, Pichler H, Mayer HK.
How safe is safe?—a case of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* endocarditis and discussion of the safety of lactic acid bacteria.
Scand J Infect Dis. 2003;35(10):759-62.

安全とはどのように安全であるのか？—*Lactobacillus paracasei* のパラカゼイ亜種による心内膜炎の1例と乳酸細菌の安全性について

乳酸菌(LAB)は乳製品やその他の食品の発酵過程に長い間利用されている。最近のレビューで臨床的にプロバイオティクスの有益な作用が示されているが、乳酸菌と関連する感染症が過去数年間に数例報告されている。今回、最終的に RAPD-PCR (無作為に増幅した多形性 DNA ポリメラーゼ鎖反応) により乳製品に使用されていた株とは異なることが確認されたカゼイ菌による心内膜炎の1例について述べる。また、免疫抑制、重症疾患などの医学的条件下で乳酸菌が命を脅かす日和見感染症を引き起こすことについて考察した。これらの事実は、乳酸菌の多くが一般的に安全とされている多くの国や国際的な政府機関では十分に認識されていない。

<66>

Steidler L.
Genetically engineered probiotics.
Best Practice & Research in Clinical Gastroenterology. 17(5):861-76, 2003 Oct.

遺伝子操作プロバイオティクス

プロバイオティクス微生物は長年にわたり使用されている。それらは健康補助食品として始まり、現在では殆どの場合経口摂取され、腸疾患の興味ある代替治療法となっている。このような微生物の作用機序がより良く理解されることによって、新規プロバイオティクス菌株をデザインする可能性が今や開かれた。遺伝子操作により、既存の菌株の効果を増強するだけでなく、全く新規のプロバイオティクスを創り出すことが可能である。それらは必ずしも細菌製品のみで構成される必要はなく、調節系の要素やヒト以外の供給源に由来する酵素も含まれる。入念で、また広範な意味での生物学的安全性への完全な対応をもってデザインすれば、遺伝子組み換えプロバイオティクスの開発には、消化器系の健康管理に大きな変革をもたらす可能性がある。

<67>

Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N, Snoeck V, Vermeire A, Goddeeris B, Cox E, Remon JP, Remaut E.
Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human

interleukin 10.

Nature Biotechnology, 21 (7): 785-789, 2003

ヒトインターロイキン 10 を腸へ到達させるため遺伝子操作された *Lactococcus lactis* の生物学的封じ込み

IL-10 を分泌する遺伝子操作された *Lactococcus lactis* は、炎症性腸疾患の治療的アプローチとなりうる。しかし、このように遺伝子操作された有機体の放出を臨床的に利用する場合は、その安全性が懸念される。この問題を解決するために、*L.lactis* のチミジル酸合成酵素遺伝子 *thyA* を合成ヒト IL-10 遺伝子と置換した。この *thyA·hIL10·L.lactis* 株はヒト IL-10(hIL-10) を産生するが、チミジンまたはチミンを取り除いた場合は生存度が大幅に低下し、その環境下での蓄積は阻害される。この生物学的封じ込みシステムおよび細菌のヒト IL-10 分泌能は、ブタの *in vivo* にて有効である。処理された *L.lactis* がドナーから *L. lactis* subsp. *cremoris* などの *thyA* 遺伝子を獲得するという不測の事態においては、このアプローチはゲノムから導入遺伝子が脱離するため、導入遺伝子の封じ込みに有用な方法であると考えられる。

<68>

Tannock GW.

Exploring the relationships between intestinal microflora and inflammatory conditions of the human bowel and spine.

Antonie van Leeuwenhoek. 81(1-4):529-35, 2002 Aug.

腸内細菌叢とヒト腸および脊椎の炎症状態との関連性の調査

腸内細菌叢を分析する分子学的方法は、複雑な細菌集団の組成を解明するに有用な方法である。しかし批判的にみた場合は、これらのアッセイ法は疾病状態における腸内細菌叢について有用な情報を与えうるものではない。細菌叢を"正常"あるいは"異常"であると明確に定義するには細菌叢の成分はヒトによって非常に大きな違いがある。慢性腸炎に関連する病気の場合には、異常かつ攻撃的な免疫応答の細菌標的が個々の症例によって異なる。細菌叢が互いに同一である実験動物での検討では、腸の炎症に関与する細菌種について手がかりを得ることができる。遺伝的に感受性の高い動物を用いたノットバイオート実験は、健康および病気状態の腸管の微生物環境に関する今後の研究に疑いもなく重要な役割を果たすであろう。この実験により腸内細菌叢を構成する細菌の病原性を調査する宿主-細菌系が定義されると考える。

<69>

Tannock GW.

Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem.

British Journal of Nutrition. 87 Suppl 2:S199-201, 2002 May.

腸内生態系を検討するための分子生物学的方法

分子生物学的方法は、健康および疾患状態における腸内細菌叢の構成を分析するための新たな推進力となっている。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) と変性剤濃度勾配電気泳動法の併用は、多数の試料中の細菌共生系を能率的また有効に比較することができる方法である。従って、疾病状態に関連した細菌数の変化を、さらなる検討の対象とすることが可能である。長期的には'異常な細菌叢'はプロバイオティクスやプレバイオティクスの使用により是正されるかもしれない。

腸内細菌叢：分子生物学的方法：分析

<70>

Tannock GW.

Molecular assessment of intestinal microflora
American Journal of Clinical Nutrition, 73 (2S): 410S-414S, 2001

腸内細菌叢の分子生物学的アセスメント

抄録 腸内細菌叢解析への分子生物学的手法の応用は、ヒト腸内細菌生態学の詳細な知識の発展を可能にするに違いない。この知識は科学的に価値あるプロバイオティクスを得るために必須である。DNA消化のリボタイピングやパルスフィールドゲル電気泳動法のような分子生物学的型別分類（遺伝子フィンガープリント）法は腸管内細菌株の識別手段となる。これらの方法による乳酸菌、ビフィズス菌、腸内細菌群の分析によって、ヒトとブタに特徴的な細菌株が明らかにされた。さらに、これらの集団において抗生物質の投与あるいは自家因子、他家因子によって生じる摂動や転移も腸内細菌叢の分子生物学的解析によって検出することが出来る。将来の研究では、分子生物学的型別分類法をプロバイオティクス製品の投与前、投与中、投与後の腸内細菌叢の構成解析に用いることが出来るであろう。この実験的アプローチは、ヒトおよびその他の動物の腸管内常在菌に対するプロバイオティクスの影響に関する情報をもたらすであろう。

キーワード プロバイオティクス、腸内細菌叢、分子タイピング、乳酸菌、ビフィズス菌、腸内細菌

<71>

Tannock GW.

Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria
International Dairy Journal, 5 (8): 1059-1070, 1995

乳酸菌と関連する消化管の微生物環境

ヒトの小腸および大腸では、健康な状態であっても正常細菌叢として知られる微生物（多くは細菌）の複雑な集合体が生息している。グラム陽性乳酸産生細菌はこの集合体の代表的なものである (*bifidobacteria*、*lactobacilli*、*enterococci*、*eubacteria*、*peptostreptococci*)。宿主に対する正常細菌叢の影響は、無菌動物と通常の動物を比較した試験から全体としてよく知られている。最近では独自の実験動物系（乳酸菌フリーマウス）を用いて、*lactobacilli* は腸管の生化学（アゾレダクターゼ、 β -グルクロニダーゼ、胆汁酸塩加水分解酵素、非抱合／抱合胆汁酸の比率）に対して顕著な影響を与えることが示されている。そのため酪酸産生菌摂取の正常細菌叢およびヒトの腸環境への影響に興味が持たれているのである。細菌株レベルや正常細菌叢での詳細な組成分析には DNA プローブやリボタイプを利用することが可能である。これらの研究は、大腸環境に対する摂取された乳酸菌の影響を研究する基礎や、誘導体や遺伝子的に修飾された細菌の利用がヒトの健康によい影響を与えることを示すにあたり、必要であると思われる。

<72>

Teitelbaum JE. Walker WA.

Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms.
Annual Review of Nutrition. 22:107-38, 2002.

防御的消化管内微生物としてのプレバイオティクスとプロバイオティクスの栄養学的影響

プレバイオティクスとプロバイオティクスの健康上の効果が、増大する研究的興味の対象であった。これらの食品サプリメントは、既存の腸内細菌叢を宿主の有利になるように変えることが示された。本レビューにおいては、健康増進と疾患治療作用を肯定するあるいは否定する科学的エビデンスの双方に焦点を合わせている。科学的な注目は、免疫調節、脂質代謝、癌の予

防、下痢、*Helicobacter pylori*、壊死性腸炎、アレルギー、炎症性腸疾患などに向けられている。

<73>

Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S.
Quality assurance criteria for probiotic bacteria.
Am J Clin Nutr. 2001 Feb;73(2 Suppl):393S-398S. Review.

プロバイオティクス細菌の品質保証基準

要約 プロバイオティクス微生物の選択に使用される基準には、酸および胆汁に対する安定性と腸粘膜への付着性がある。食品中のプロバイオティクス菌株の品質管理は従来、有効期限中の製品に十分な生菌数が存在していることを保証するための試験だけに拠るものであった。生残能は重要な要因ではあるが、唯一の品質保証基準ではない。有効であるためには、そのプロバイオティクス菌株が、本来の選択理由である機能上の健康特性を維持していなければならない。そのような特性には、胃や小腸を生残したまま通過できることと、ヒト消化管に定着でききることが含まれる。in vitro 試験のプロトコールは、菌株の酸性状態への耐性、胆汁存在下での生残、増殖能、選択的基質の代謝能の維持をしらべるために容易に適用することができる。分子生物学的手法によっても菌株の安定性をしらべることが可能である。付着特性を明らかにすることは、消化管のバリア効果を評価するための重要な品質管理方法と考えられる。付着性は、下痢の期間短縮、免疫原作用、競合排除、およびその他の健康効果に関連している。付着特性は入念にモニターされるべきで、腸管細胞（例 Caco-2）やヒト腸粘液への付着性が含まれる。本報告には、機能的プロバイオティクス菌株の品質管理を確実なものとするために適用できる、いくつかのタイプの in vitro 試験の概要を説明した。

キーワード プロバイオティクス、品質管理、付着性、酸安定性、生残能

<74>

van der Werf MJ, Venema K.
Bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon.
Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49 (1): 378-383

ビフィズス菌：遺伝子組み換えと大腸における作用の検討

ビフィズス菌は最も一般的なヒト腸内細菌の一つで、ヒトの健康にポジティブな影響を及ぼすと考えられている。従って、これらの微生物をプロバイオティクスとして発酵乳製品に、あるいは錠剤の形で利用することに興味が高まっている。しかしながら、その健康上の主張を支持する納得の行く科学的データは乏しい。大腸におけるビフィズス菌の作用に関する検討は、ビフィズス菌が複合生態系の一部であり、それは宿主のヒトとも互いに影響しあっているという事実や in vivo の実験は多くの倫理的束縛を受けるという事実によって複雑になっている。TNO では、ビフィズス菌の作用を検討できるような幾つかの手段が開発された。これには、(i) 外部の DNA をビフィズス菌株に導入するための効率的な形質転換プロトコールや(ii) in vivo の状況に非常に類似した環境を作り出せる in vitro の胃/小腸モデル(TIM-1)および大腸モデル(TIM-2)などが含まれる。これらの手段を用いて、ビフィズス菌の腸の健康に及ぼすポジティブな影響を定量化できるバイオマーカーを特定することが出来る。

<75>

von Wright A, Bruce A.
Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition.
Food Science and Technology, 14: 264-276, 2003.

遺伝子組み換え微生物とヒトの健康と栄養に及ぼす影響

微生物（細菌、イースト、糸状真菌）は、さまざまな発酵食品原料調整ための必須成分として、あるいは食品添加物や加工処理補助剤（有機酸、調味料、食品酵素など）生産用として、食品生産に用いることが出来る。発酵食品では、微生物は死滅していても、不活化されていても、生きていってよい。遺伝子組み換え(GM)による微生物(GMM)を使用する場合には、当然、これらの代替品には異なった安全性問題が生じる。微生物ゲノムの可塑性と既存遺伝子の交換機序のため、特に GMM の遺伝子封じ込めは、その他の遺伝子組み換え生物(GMO)の場合とは根本的に異なる。以下、GMM の様々な実際の使用と使用の可能性を考慮に入れながら、GMM のヒトの健康と栄養に及ぼす影響についての分析を試みる。

<76>

von Wright A, Salminen S.

Probiotics: established effects and open questions.

European Journal of Gastroenterology & Hepatology. 11(11):1195-8, 1999 Nov.

プロバイオティクス：立証された効果と未解決の問題

ヒト腸内細菌叢は何百種もの細菌からなる複合生態系である。その代謝機能と宿主との相互作用はヒトの健康や快適性に影響するが、これらの作用の研究は非常に困難である。しかし約100年にわたり、QOLの改善や腸障害の予防や治療のために生きた細菌を摂取し、結腸細菌叢の成分を修飾しようとする考えられてきた。多くの場合、臨床データからはこれらいわゆるプロバイオティクスの健康上の必要性は支持されていない。しかしこの状況は急速に変化している。主に乳酸やビフィズス菌といった特定のプロバイオティック細菌が、様々な腸の障害を軽減あるいは予防し、また、腸疾患のリスクを低下することを示す数多くの臨床試験がある。分子生物学的手法の急速な発達により、腸内でのプロバイオティクスの生存および粘膜への付着を立証する新しい方法が可能となり、利用可能なデータからその作用機序に関する推論も示されている。プロバイオティック細菌を含む食品の開発は食品産業にとって大きな可能性をもたらし、ヒトの健康に有益に働くことが期待され、また、食品としての安全性について記録のない新しい種や株の導入には、安全性への配慮も考慮されている。

- ・ある種のプロバイオティクスではその有効性が臨床的に示されている。
- ・ヒト腸におけるプロバイオティクス株の生残性および結腸粘膜への付着が示されている。
- ・作用機序に関しては不明な点が多い。
- ・現在使用されている株は安全であるが、食品として利用されたことのない新しいプロバイオティクスに対する安全性基準が検討されている。

<77>

Wang RF, Beggs ML, Mullis LB, Cerniglia CE.

Detection and identification of predominant human intestinal bacteria in fecal samples by microarray method.

Abstracts of the General Meeting of the American Society for Microbiology, 103: N-193, 2003

マイクロアレイ法によるヒト糞便中優勢腸内細菌の検出と同定

ヒト消化管に存在することが知られている優勢細菌40種を検出するためのマイクロアレイ法を開発した。この40種には、*Bacteroides*と*Clostridium*がそれぞれ7種類、*Eubacterium*6種類、*Ruminococcus*5種類、*Bifidobacterium*5種類、*Fusobacterium*3種類、*Peptostreptococcus*2種類、*Lactobacillus*2種類、*Enterococcus*2種類、*Escherichia coli*1種類が含まれる。GenBankデータベースから入手した16S rDNA配列の比較に基づき、各細菌種に特異的な40-merオリゴ3種類をデザインし、DNAアレイ作製に用いた。糞便サンプル中に存在する細菌からの16S rDNAを2種類の共通プライマーを用いてPCR増幅し、標

識し、DNA アレイでのハイブリダイゼーションに用いた。GenBank と正確な参照株における配列の対立による幾つかの困難を解決した後、40 種すべての参照細菌種が陽性を示した。我々はエポキシスライド上で、アミノ修飾オリゴと非修飾オリゴを操作手順を変えて比較し、また、新鮮なあるいは凍結糞便サンプルからの様々な DNA 分離方法を比較した。最終的に、非常に感度の良いマイクロアレイ法を確立した。幾つかの細菌種では、細胞を直接 PCR 増幅および標識に用いることが出来れば最小限 10 細胞まで検出することができた。弱い交差反応も若干認められた。我々は各細菌種に対する 3 種類のプローブをデザインすることによって交差反応性を解決した。1 種に対して、少なくとも 2 種類のプローブが陽性の場合、この細菌種は陽性と判断された。このマイクロアレイ法を 11 名の健常ボランティアから得た糞便サンプル中のヒト腸内細菌の検出に用いた。結果は、このマイクロアレイ法によって、1 枚のスライド上で、各人の糞便サンプルから 25-37 の細菌種が検出されることを示した。サンプル間のバラツキはあったが、優勢腸内細菌叢の 33 種が見出された。

<78>

Whelan K, Judd PA, Preedy VR, Taylor MA.

Enteral feeding: the effect on faecal output, the faecal microflora and SCFA concentrations.

Proceedings of the Nutrition Society. 63(1):105-13, 2004 Feb.

経腸摂食法:大便の排出、糞中細菌叢および SCFA 濃度への影響

経腸栄養法は病院、一般社会いずれにおいても実施される方法であるが、患者は重大な臨床的後遺症となりうる糞便排出の変化を強いられる。糞便排出に関する正しい認識や、下痢の定義に関する問題が、研究試験を比較する際に邪魔となり、臨床現場での治療的介入の標準的な評価ができていない。結腸内細菌叢は腸原性の感染症を防止し、結腸の水分吸収を刺激する SCFA を產生することにより患者を下痢から保護している。しかし、健常人における試験では経腸剤は細菌叢や SCFA 濃度に負の影響を与えることが示唆されている。フラクトオリゴ糖を経腸剤に添加すると負の変化を部分的に予防するが、患者での確証的なデータはまだ得られていない。プロバイオティクスおよびプレバイオティクスによる細菌叢の修飾は経腸栄養法における下痢を予防する可能性がある。

資料 1 - 2

<1>

発酵食品と健康 (2) 乳酸菌の保健効果 腸内環境改善効果

荒勝俊

New Food Ind VOL. 43 NO. 11; PAGE. 53-64; (2001/11/01)

腸内ミクロフローラを改善し、健康維持に有益に作用する乳酸菌等の生きた有用細菌群がプロバイオティクスとして、注目されている。乳酸菌の保健効果には、整腸作用、免疫賦活作用、発癌予防作用、抗変異原性、コレステロール低下作用等が報告されている。乳酸菌の整腸作用としては、便性改善作用、腸内フローラ改善作用、腸内腐敗物質の生成抑制等がある。

<2>

醸酵豆乳の脂質代謝および腸内フローラに及ぼす影響

荒勝俊、大辻一也、川合修次、(花王 生物科研) 大久保一良、(東北大 大学院農学研究科)

日本食品科学工学会誌 VOL. 48 NO. 11; PAGE. 807-815; (2001/11/15)

豆乳を原料として醸酵豆乳を製造し、ラットへの摂取試験を行い、高脂肪食、豆乳及び醸酵豆乳を摂取させた時と比較し、以下の結果を得た。(1)醸酵豆乳を摂取させる事で血中の総コレステロール、トリグリセリド、リン脂質いずれも高脂肪食群に比較して有意($p<0.01$)に低下した。(2)醸酵豆乳を摂取させる事で糞便中に排せつされるコレステロール量が有意($p<0.01$)に増加した。(3)醸酵豆乳を摂取させる事で糞便含水率を有意($p<0.05$)に高め、便性を改善する効果を有した。(4)醸酵豆乳を摂取させる事で *Bifidobacterium* 及び *Bacteroides* や *Eubacterium* が増加し、*Clostridium perfringens* が有意($p<0.05$)に減少した。(5)醸酵豆乳を摂取させる事で高脂肪食群に比べアンモニア、インドール、共に減少傾向が認められた。以上の事から、醸酵豆乳を摂取する事で腸内環境及び脂質代謝を改善する事がわかった。

<3>

21Cの健康志向食品"キレートフーズ"4 ブドウ種子ポリフェノール(プロアントシアニジン)のキレートフーズとしての可能性 糞便消臭効果と腸内細菌叢に及ぼす影響

有井雅幸、(キッコーマン)

食品と開発 VOL. 35 NO. 11; PAGE. 14-16; (2000/11/01)

ブドウ種子ポリフェノールの摂取により、糞便から発生するメルカプタン量、硫化水素量が減少し、糞便臭が軽減する効果が観察された。ブドウ種子ポリフェノールの効果は緑茶抽出物やシャンピニオン抽出物の効果より大きかった。ブドウ種子ポリフェノールの摂取は、便性状に影響しないが、腸内有用菌を増加させ、腸内有害菌を減少させる傾向が観察された。ブドウ種子ポリフェノールを含む介護補助食品は腸内腐敗臭を軽減することが認められた。

<4>

Lactobacillus gasseri NY0509 および *Lactobacillus casei* NY1301 発酵乳酸菌飲料の健常成人の糞便内菌叢に及ぼす影響

東幸雅、伊藤和徳、佐藤学、(日清食品 中研) 大木篤史、井上明浩、井上和久、(日清ヨーク開研) 弁野義己、(理研 微生物系統保存施設)

日本食品科学工学会誌 VOL. 48 NO. 1; PAGE. 35-43; (2001/01/15)

健常成人 6 名(男性、平均年齢 37.5 歳)を対象として *L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 を用いて調製した乳酸菌飲料の糞便内菌叢および糞便性状に及ぼす影響を検討した。乳酸菌飲料 65ml/日を 11 日間、引き続き 195ml/日を 9 日間摂取させた。その結果、乳酸菌飲料の摂取に

より糞便中の *Lactobacillus* 属の菌数は有意に増加した。また, *Bifidobacterium* 属の菌数および占有率も増加し、摂取終了後有意に減少した。一方, *C. perfringens* の検出率は、乳酸菌飲料摂取期間中低下した。菌種レベルでの *Lactobacillus* 属および *Bifidobacterium* 属の変動を検索したところ、*Lactobacillus* 属については、乳酸菌飲料の摂取によって *L. gasseri* が増加する傾向にあり、195ml 摂取中に *L. casei* が検出された。*Bifidobacterium* 属については、*B. adolescentis* group および *B. longum* が乳酸菌飲料の摂取により増加する傾向を示した。さらに、糞便 pH は乳酸菌飲料の摂取期間中低下した。以上の成績より、*L. gasseri* NY0509 および *L. casei* NY1301 を含む乳酸菌飲料が腸内菌叢を改善し、整腸作用を示すことが示唆された。

<5>

健常人における結腸移行時間に及ぼすプロバイオティック株 *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 による発酵乳の消費の効果

BOUVIER M, GRIMAUD J-C, (CHRU-Hopital Nord-13326 Marseille, FRA) MEANCE S, BOULEY C, BERTA J-L, (Danone Vitapole, FRA)

Biosci Microflora VOL. 20 NO. 2; PAGE. 43-48; (2001/07)

標記細菌による発酵乳がヒトでの結腸移行時間(CTT)を調節するかどうかを調べた。健常ボランティアでの二重盲検法により、ビフィドバクテリア生菌を含む発酵乳の効果を熱処理発酵乳と比較した。標記細菌による発酵乳の 11 日間の消費により CTT は著しく減少したが、対照群ではほとんど変化が見られなかった。効果は男性よりも女性に顕著であった。*B. animalis* DN-173 010 の生菌を含む発酵乳の消費がヒトでの CTT を改善すると結論した。

<6>

4‘G’- β -D-Galactosylsucrose(ラクトスクロース)のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響

藤井智恵美、久米村恵、橋本文雄、石田晋也、松尾恵子、木村弘之、宮副玲子、岡松洋、(大塚製薬 佐賀研) 光岡知足、(日本獣医畜産大)

ビフィズス VOL. 6 NO. 1; PAGE. 31-41; (1992/07)

標題化合物のビフィズス菌増殖因子として生体への影響を検討するため、糞便培養試験及びヒトボランティア試験を行った。本剤添加により、培養液中の短鎖脂肪酸の増加、*Bifidobacterium* 菌数(I)の増加、他層菌の減少が認められた。ボランティア試験では、I の増加、便重量の増加、糞便中の短鎖脂肪酸含量の減少を認めた。本剤の摂取により便秘の改善への寄与が推察された

<7>

Pouchitis 症例の糞便中細菌叢の検討（第一報）（厚生労働省 S）

藤井久男、(奈良県医大 内視鏡部)

難治性炎症性腸管障害に関する調査研究班 平成 12 年度研究報告書; PAGE. 120-121; (2001)

潰瘍性大腸炎術後の Pouchitis 合併症例 2 例の糞便中細菌叢を検索し、どのような腸内細菌が Pouchitis の発生に関与しているかを比較対照の Pouchitis を合併していた 2 例を比較した。Pouchitis 症例の糞便中細菌叢は Pouchitis のない対照例と比し、Enterobacteriaceae および *Lactobacillus* が著増しており、嫌気性菌/好気性菌比は有意に低かった。以上から、潰瘍性大腸炎術後の Pouchitis 発生に腸内細菌叢異常、特に好気性菌の Pouchitis への関与が示唆された。

<8>

炎症性腸疾患の治療 - 最近の進歩 - 潰瘍性大腸炎の内科的治療
Antibiotics, Prebiotics, Probiotics など腸内環境を調節する治療

藤山佳秀, 安藤朗, (滋賀医大 医 内科 消化器内科・血液内科学)
消化器病セミナー VOL. 94; PAGE. 53-63; (2004/04/08)

ヒトの腸内細菌叢と炎症性腸疾患(潰瘍性大腸炎やクローン病)との関連について示し, 腸内細菌を中心とした腸内環境を調節する治療法について概説した。ヒトの腸内細菌叢は嫌気性菌が優位で, 種に分けると 70~100 種類, 100 兆個もの細菌から成る。しかし, 炎症性腸疾患では偏性嫌気性菌の優位性が損なわれ, 腸内細菌叢の恒常性に乱れが生ずる結果, 便通の異常が起こる可能性が示唆された。また, クローン病患者の腸内細菌叢の 30%は, 健常者の腸内細菌叢では認められないものであった。粘膜関連細菌叢は, 直接上皮細胞と接触することにより腸管局所免疫を刺激する。クローン病の治療においては, 嫌気性菌に有効なメトロニダゾール, 抗菌剤のシプロフロキサシン, メトロニダゾールの誘導体オルニダゾールが有効とされている。潰瘍性大腸炎には, 最近, 非吸収性のリファキシミンが有効であったとする報告があった。プレバイオティクスは, 腸内細菌叢のうち有益とされる細菌叢の成長や活動度を選択的に刺激する因子とされ, ラクトスクロース, 小麦ふすま, サイリウムおよびGBF が炎症性腸疾患に有用であるとされている。プロバイオティクスは, 摂取することによって腸内細菌叢を変える作用を有する微生物と定義され, 大腸菌製剤であるNissle1917 や糖化菌の生合剤であるVSL#3が効果を発揮している。炎症性腸疾患の治療においては, 病態に関連している細菌を標的とした抗生物質やプロバイオティクスの選択など, 新たな治療戦略の展開が可能と考えられた。

<9>

クローン病研究の最前線 環境因子からみたクローン病の病因・病態-腸内フローラ異常とプロバイオティクス-
藤山佳秀, 安藤朗, (滋賀医大 医 内科 消化器内科・血液内科学)
GI Res VOL. 11 NO. 6; PAGE. 511-517; (2003/12/01)

ヒトの腸内細菌叢と炎症性腸疾患, とくにクローン病との関連について概説した。さまざまの免疫関連遺伝子のノックアウトマウスに自然発症する慢性大腸炎が無菌環境下では発症しない事実などから, クローン病の病因の一つとして腸内細菌叢に対する免疫応答の異常が重要な役割を担っていると考えられている。最近の分子生物学的手法を用いた検討から, クローン病患者の腸内細菌叢の約 30%が, 健常人において優性な菌種と異なることも明らかにされている。

<10>

潰瘍性大腸炎における腸内細菌(特に *Bacteroides vulgatus*)について
福井信, 松村徹也, 山村誠, 田村和民, 里美匡みち, 下山孝, (兵庫医大)
無菌生物 VOL. 29 NO. 2; PAGE. 75-76; (1999)

潰瘍性大腸炎(UC)と腸内細菌叢の偏性嫌気性菌 *Bacteroides vulgatus*(I)との関係を調べた。難治性UC患者の糞便から分離したI菌株の低分子有機酸の産生, 殊にコハク酸の産生に及ぼす影響を無菌ラットを用いて検討した。患者個体により I の菌株が異なるか調べるために, I 菌株の DNA を分析した。I のコハク酸産生能は難治性 UC 患者由来菌株が高く, 次いで非難治性 UC 患者由来菌株であり, 健常人由来菌株は少なかった。I のコハク酸産生能は菌株により異なり, 産生能の高い菌株を持つ患者は難治性となる可能性が有ることを指摘した。

<11>

特集 がん治療と QOL: 感染対策の立場から 大腸癌患者と腸内細菌叢
日伝晶夫, 岩垣博巳, 折田薰三, (岡山大 医) 米山勝, 堺修造, (林原生物化研)
Biotherapy (Tokyo) VOL. 6 NO. 9; PAGE. 1385-1389; (1992/08)

大腸癌患者の糞便の水分量, pH, 有機酸濃度, 細菌叢を健常人と比較検討した。患者糞便の水分量, pH は健常人に比し有意ではないが高値であり, 総有機酸濃度は低値を示した。また, 患者の糞便では好気性菌が高頻度であり占有率も高値であった。ぶどう球菌は, 大腸癌患者にのみ 56% 認めた。ラクトスクロースの経口投与によりビフィズス菌属の菌数, 占有率が増加し, 腸内環境正常化に有用であった

<12>

ヒトの腸内細菌叢とその代謝に及ぼすガラクトシル転移二糖類の影響

ITO M, KIMURA M, DEGUCHI Y, MIYAMORI-WATABE A, YAJIMA T, KAN T, (Yakult Central Inst.

Microbiological Research, Tokyo, JPN)

J Nutr Sci Vitaminol VOL. 39 NO. 3; PAGE. 279-288; (1993/06)

ガラクトシル転移二糖類(I)摂取が腸内細菌叢とその代謝に及ぼす影響を 12 人の日本人男性で調べた。I はガラクトシルガラクトースとガラクトシルグルコースの混合物で, 15g ずつ 6 日間の摂取で糞中のビフィズス菌と乳酸菌が増加, バクテリオデス菌とキャンディダ菌が減少した。また糞の pH が下がり, アンモニア, パラクレゾール, インドールが減少した

<13>

大腸癌患者と腸内細菌叢

岩垣博巳, 日伝晶夫, 渕本定儀, 折田薰三, (岡山大) 米山勝, 堀修造, (林原生物化研)

日本臨床外科学会雑誌 VOL. 53 NO. 10; PAGE. 2343-2346; (1992/10)

患者群の糞便水分は健常者群より高値を, また糞便 pH も高値を示した。各種有機酸濃度は健常者群より一様に低値を示したが, コハク酸に限り, 高濃度かつ有意に高頻度で検出された。内因性 endotoxin 產生に関するグラム陰性菌の菌数および占有率は, 両群間で有意な差を認めなかつた。患者群の糞便から検出される主要な細菌叢は健常者群に近似していたが, *Staphylococcus* をはじめとする好気性菌を高頻度に検出し, 大腸癌患者においては好気的腸内環境にある

<14>

難消化性糖質ラクトスクロース術前経口投与による大腸疾患患者の腸内細菌叢および血中エンドトキシン濃度の変化

岩垣博巳, 日伝晶夫, 木村臣一, 野中泰幸, 根津真司, (岡山大) 米山勝, 万代隆彦, 阿賀創, 藤井和子, (林原生物化研)

日本臨床外科学会雑誌 VOL. 54 NO. 3; PAGE. 553-558; (1993/03)

難消化性糖質 lactosucrose を大腸疾患患者に対して, 術前連続一週間経口投与し, 粪便性状 (pH, 有機酸, 腸内細菌叢) の変化, 並びに術前・術後の血中エンドトキシン・アンモニア値を非投与群と比較検討した。lactosucrose 投与群において, 粪便 pH は低下, 有機酸は増加傾向にあつた。グラム陰性かん菌の菌数並びに占有率の減少は, 非投与群と比較して有意であった。lactosucrose 投与による術前の腸内環境改善の結果は, 術前の血中エンドトキシン・アンモニア値の低下, 術後の血中エンドトキシン値の上昇抑制と術前レベルへの速やかな回復として反映された

<15>

フラクトオリゴ糖と下痢

JUFFRIE M, (Gadjah Mada Univ., Yogyakarta, IDN)

腸内細菌学雑誌 VOL. 16 NO. 1; PAGE. 31-34; (2002/01)

難消化性食物繊維のフラクトオリゴ糖(FOS)の特長として、高コレステロール血症、病原性細菌の過剰増殖や結腸癌の予防および粘膜免疫反応の促進作用のあることが証明されている。善玉腸内フローラの主な機能は、有害な細菌の増殖や感染から消化管を守ることである。Bifidobacterium は揮発性脂肪酸を産生するが、これら脂肪酸は重大な代謝エネルギーとなるだけでなく、消化管を酸性にし、サルモネラ菌、赤痢菌、クロストリジウム、Campylobacter jejuni、大腸菌など有害細菌の増殖を抑制する。反対に消化管環境で善玉腸内フローラが減少すると、潜在的な化学変化が起こり、ウェルシュ菌や大腸菌など有害細菌が増殖する。このようなバランス崩壊の臨床症状の一つが下痢である。発展途上国で下痢は未だに小児のり病と死亡の最大原因で、5歳未満の小児症例数が13億件と推定されている。FOSは善玉腸内フローラの食物となり、増殖を促す消化管の効果的な「肥料」である。腸内フローラが改善すると、便秘や下痢が解消し、大腸内の腐敗物質産生が減少し、高脂血症の血清脂肪が改善し、総コレステロール、中性脂肪、血糖値、血圧が低下する。本試験より、FOSを与えた下痢患児で下痢の疾病期間がプラセボ対照群より短くなることが明らかになった(4.24日に対し2.62日)。またFOSを摂食した小児の糞は、摂食しなかった小児に比べてpHが有意に低かった。

<16>

デイケアセンターの小児における腸内微生物相の変動およびプロバイオティックス

JUNTUNEN M, (Satakunta Central Hospital, Pori, FIN) KIRJAVAINEN P V, OUWEHAND A C, SALMINEN S J, (Univ. Turku, Turku, FIN) ISOLAURI E, (Turku Univ. Hospital, Turku, FIN)
Biosci Microflora VOL. 22 NO. 3; PAGE. 99-107; (2003/07)

フィンランドのデイケアセンターの小児における腸内微生物相の変動に及ぼすプロバイオティックスの影響を調べた。小児94人を対象にしてプロバイオティックスのアシドフィルス菌およびBifidobacterium lactisを6箇月間投与した。正常および下痢の糞便を供試し腸内微生物相をFISH法で測定した。プロバイオティックス投与前の46%はクロストリジウム菌が多い異常型であり54%の微生物相は正常型であること、異常型の75%は下痢を発症し正常型の29%が下痢を発症したこと、抗生素質治療でクロストリジウム菌菌数が増加すること、プロバイオティックス投与後の全細菌数は減少したこと、プロバイオティックス投与後の異常型は正常型に移行すること、プロバイオティックス投与後は異常型を減少することを報告した。

<17>

イソマルトオリゴ糖摂取が健常人の便通と腸内環境に及ぼす影響

金子俊之、河本高伸、菊池弘恵、(昭和産業 総研) 塩田真夫、弥武経也、(昭和産業) 飯野久和、(昭和女大 家政) 辻啓介、(健康・栄養研)
日本家政学会誌 VOL. 44 NO. 4; PAGE. 245-254; (1993/04)

イソマルトオリゴ糖の摂取が、腸内環境と便通に及ぼす影響を明らかにするために、腸内Bifidobacteriumを増殖させる有効量である1日10gもしくは15gを有志健常人に摂取させて検討した。試験期間は5週間で、1週目は摂取前、2~3週目は摂取、4週目は摂取休止、5週目は再摂取とした。1)1日10gの摂取により、Bifidobacterium菌数及び占有率の有意な上昇、Lactobacillus菌数の有意な増加、Bacteroidaceae占有率の有意な減少、Clostridium出現の抑制など、腸内フローラが改善された。2)同時に、糞便pHは有意に低下し、短鎖脂肪酸は増加傾向を、腐敗産物は減少傾向を示すなど、腸内環境が改善された。しかも、試験の後半ほど効果が著しいことから、より長期の摂取が効果的であると考えられた。3)摂取前の排便回数が少ない(3回/5日以下)便秘傾向者では、用量依存的(10gと15g/日)に便通が改善された。しかも、下痢などの重篤な副作用は伴わなかった。4)相関係数の検定より、糞便に含まれる酢酸は、腸内環境及び便通の改善と密接な関係を持つと考えられた。

<18>

パラチノースオリゴ糖がヒトの腸内環境に及ぼす影響

樋村淳, 原喬, 中島良和, (三井製糖)

日本栄養・食糧学会誌 VOL. 46 NO. 2; PAGE. 117-122; (1993/04)

パラチノースオリゴ糖(I)摂取がヒトの糞便中の腸内腐敗産物含量, pH, 腸内フローラ, および発ガン関連で注目される β -グルコシダーゼ, β -グルクロニダーゼ活性に及ぼす影響を調べた。I 摂取により腸内腐敗産物が減少し, 腸内フローラはビフィダス菌が増加し, 腐敗菌ウェルシュ菌は検出されなくなった。 β -グルコシダーゼ活性が増加した

<19>

YP97 ヨーグルトのヒト便通, 便性および糞便内菌叢に及ぼす影響 (II)

勝野真也, 岡田恵, 川合伸一, 宝野英紀, (全国農協直販 開発研究部) 小暮怜美, 中沢勇二, (共立女大 大学院家政学研究科) 寺田厚, (日本獣医畜産大 獣医畜産)

腸内細菌学雑誌 VOL. 17 NO. 1; PAGE. 27-34; (2003/01)

健常な19~25歳の女性58名を対象に, YP97 ヨーグルトの便通および便性に及ぼす影響について調べた。またその中の8名を対象に糞便内菌叢, 短鎖脂肪酸, アンモニア含量, pH および水分について調べた。被験者を2群に分け, YP97 ヨーグルト 115g/日, プラセボヨーグルト 115g/日を各2週間ずつ摂取させ, また各摂取期の間に2週間の休止期を置き, 全8週間のクロスオーバー試験を実施した。YP97 ヨーグルト摂取期において, 便秘傾向者の排便回数は摂取前, 休止期およびプラセボ摂取期に対して有意に増加し, *Bifidobacterium* はプラセボ摂取期に対して有意に増加し, レシチナーゼ陽性 *Clostridium* は摂取前に対して減少傾向を示した。また, YP97 ヨーグルト摂取期において, 総菌数に対する *Bifidobacterium* の占有率は摂取前, 休止期およびプラセボ摂取期に対して有意に増加し, 糞便中のアンモニア含量は休止期およびプラセボ摂取期に対して有意に減少し, 糞便pHは摂取前および休止期に対して有意に低下した。以上の結果より YP97 ヨーグルトの摂取は便通や腸内菌叢の改善に有効であることが示唆された。

<20>

YP97 ヨーグルトのヒト便通, 便性および糞便内菌叢に及ぼす影響 (I)

勝野真也, 岡田恵, 川合伸一, 宝野英紀, (全国農協直販 開発研究部) 寺田厚, (日本獣医畜産大 獣医畜産)

腸内細菌学雑誌 VOL. 17 NO. 1; PAGE. 15-25; (2003/01)

17~85歳の健常人41名を対象に YP97 ヨーグルトの便通および便性に及ぼす影響について調べ, さらにその中の8名を対象に糞便内菌叢, 短鎖脂肪酸, アンモニア含量, pH および水分について調べた。被験者を2群に分け YP97 ヨーグルト 80g/日, 115g/日および市販他社製品ヨーグルト 100g/日をそれぞれ2週間ずつ摂取させ, 各摂取期の間に2週間の休止期を置き, 全11週間のクロスオーバー試験を実施した。YP97 ヨーグルト 80g/日, 115g/日および市販他社製品ヨーグルト 100g/日摂取期における便秘傾向者の排便回数は摂取前に対し有意に増加した。*Bifidobacterium*は摂取前に対して YP97 ヨーグルト 80g/日摂取期において有意に増加し, YP97 ヨーグルト 115g/日摂取期および市販他社製品ヨーグルト 100g/日摂取期において増加傾向を示した。糞便中のアンモニア含量は, YP97 ヨーグルト 80g/日, 115g/日および市販他社製品ヨーグルト 100g/日摂取期において摂取前および休止期に対して有意に減少した。以上の結果より, YP97 ヨーグルト 80g/日, 115g/日および市販他社製品ヨーグルト 100g/日の摂取による排便回数および腸内菌叢の改善効果は同等であることが示唆された。また, 健常な成人11名(22~60歳)を対象に行った過剰摂取試験において胃腸症状の大きな変化は認められなかった。

<21>

炭酸ガス送気による大腸ファイバースコープを用いた潰瘍性大腸炎および慢性下痢患者の

腸内細菌叢の比較検討

河原弘規, 掛井信行, 関根昌子, 中野実, 兼高達式, (東京通信病院) 永井孝三, (帝京大 医溝口病院) 小林寅てつ, (三菱油化ビーシーエル)
通信医学 VOL. 44 NO. 5; PAGE. 315-319; (1992/05)

炎症性腸疾患および慢性下痢患者に, 炭酸ガス送気による大腸ファイバースコープを行い, 減菌カニューレを用いて腸内溶液を採取し, 腸内細菌叢の検索を行った。対象は潰瘍性大腸炎 5 例, 非感染性の慢性下痢 6 例, 健常人 8 例。菌量は, 健常>慢性下痢>潰瘍性大腸炎の順であった。分離菌数の平均は, いずれも嫌気性菌の方が多い, 健常が若干多く, 慢性下痢と潰瘍性大腸炎は同程度であった。菌種の分離頻度は, ビヒドバクテリウムなどの有益菌は健常, 潰瘍性大腸炎はほぼ同等, 慢性下痢はやや少なく, クロストリディウムなどの腐敗菌は, 慢性下痢が潰瘍性大腸炎や健常より多い傾向がみられた

<22>

ヒト由来の *Lactobacillus gasseri* SBT2055 および *Bifidobacterium longum* SBT2928 を加えて調製した発酵乳の摂取による健常成人での便通, 便性および糞便内細菌叢への影響
絹巻明生, 小原義隆, 春日修, 小野沢正人, 高木紀美子, 千葉栄次, 谷佳都, 小野保利, (田辺 R&D サービス) 鈴木豊, (雪印乳業 技研)
日本乳酸菌学会誌 VOL. 12 NO. 2; PAGE. 92-101; (2001/12/01)

通常のヨーグルト用乳酸菌に標記両菌株を加えて調製した発酵乳を健常成人(♂11 人, ♀38 人, 平均 41.2 歳)に 15 日間 100g/日摂取させた結果, 排便回数や便性が改善された。そのうちの 9 人(♂2 人, ♀7 人, 平均 43.4 歳)で行った糞便内細菌叢解析では *Bifidobacterium* の菌数, 及び総菌数に対する占有率が 6.2% から 14.5% に有意に増加した。健常男性 5 人(平均 48.4 歳)にこの発酵乳を 15 日間 300g/日摂取させた副次作用調査では問題となる事象は見られなかった。これらの結果からヒト由来の標記細菌を用いて調製された発酵乳がプロバイオティクス発酵乳として腸内細菌叢や便通の改善に効果的に働くことが示された。

<23>

低分子量アルギン酸ナトリウムのヒト糞便フローラおよび腸内環境への影響
久田孝, 小山田晃, (住友金属工業 ハイクオリティライフ研) 藤井建夫, (東京水産大)
日本水産学会誌 VOL. 60 NO. 1; PAGE. 85-90; (1994/01)

分子量約 5 万の可溶性アルギン酸ナトリウム(AG-5)摂取の健常男子糞便フローラおよび腸内環境因子への影響を調べた。4g/日, 14 日間摂取により総菌数が増加の傾向を示し, 粪中 VBN 濃度の低下の傾向が見られた。単回摂取により糞中揮発性塩基窒素(VBN)が用量依存的に抑制された。7g 単回摂取により *Bacteroidaceae* 菌数が減少し, *Bifidobacterium* 占有率が上昇し, 粪便 VBN 濃度および pH 値が低下した。AG-5 摂取による糞中短鎖脂肪酸への影響はみられなかった。以上の結果により AG-5 は腸内フローラのバランスを整え, 腐敗物の生成を抑制し, 腸内環境を改善することが示された。

<24>

透析患者の腸内細菌叢改善に有用な腸溶性シームレスカプセル 『ビフィズス菌 HD』 の臨床効果 熊本中央病院からの報告
久木山厚子, (宇土中央クリニック) 福井博義, (熊本中央病院)
メディカル朝日 VOL. 28 NO. 10; PAGE. 18-21; (1999/10/01)

透析患者 87 名に腸溶性ビフィズス菌製剤(ビフィズス菌 HD)を服用させ, 便通改善効果および血液検査の変化について検討した。ビフィズス菌 HD は 1 日 1 回食前に 3 か月間服用させ, 投与

前、投与1～3か月後、投与終了後2週目に血液検査を行った。便通改善効果については週1回のアンケートの結果に基づいて判定した。ビフィズス菌HD使用前、下剤使用者は81名であった。43名でビフィズス菌HD服用後に便秘が改善し、このうち17名で下剤を減量できた。血清BUN、クレアチニンはビフィズス菌HD服用後に有意に低下した。

<25>

フラクトオリゴ糖含有乳酸菌飲料の摂取による腸内細菌叢および便性に及ぼす影響

久米仁司、今井哲哉、渡辺正利、(協同乳業)

日本食品科学工学会大会講演集 VOL. 45th; PAGE. 109; (1998)

生菌タイプの乳酸菌飲料にフラクトオリゴ糖(FOS)を添加した飲料を摂取した場合の便性および菌への影響について、健常女子大生を対象に検討した。FOS含有飲料の摂取により排便回数、排便量が有意に増加し、便色、便形状の改善効果も認められた。また非摂取期間に比べてビフィズス菌が増加し、便中のアンモニア量とpHが低下した。

<26>

消化管エコロジーと栄養 大腸疾患における腸内細菌叢の変化とその対策

松村徹也、里見匡みち、福井信、山村誠、下山孝、(兵庫医大)

栄養－評価と治療 VOL. 16 NO. 3; PAGE. 391-396; (1999/08/15)

健常人の糞便細菌フローラ(I)について概説し、大腸疾患患者のIと比較した結果をまとめた。急性下痢では *Bifidobacterium* が激減することなど、慢性便秘、大腸憩室症、潰瘍性大腸炎、クロール病、腸結核、大腸ポリープ、大腸癌についても特徴を概説し、一部についてはその治療法についても考察した。医療現場で用いられる生菌製剤についてまとめた。

<27>

Lactobacillus casei SBR1202株およびLactobacillus helveticus SBR1101株を含む乳酸菌飲料の健常成人の排便および糞便内菌叢に及ぼす影響ならびに安全性

森清、中川和周、矢嶋信浩、(雪印ラビオ開発研) 近松均、(近松医院) 村山力、(小田原女短大)

健康・栄養食品研究 VOL. 5 NO. 3; PAGE. 11-27; (2002/12/31)

SBR1202株(I)およびSBR1101株(II)の整腸効果を検討するために、IとIIを含有する供試乳酸菌飲料を便秘傾向の女性14名に1日65ml、14日間摂取させた。排便回数及び排便日数は増加傾向にはあったが、プラセボ飲料と有意な差はなかった。供試飲料を130ml摂取した場合は、排便回数及び排便日数が有意に増加した。また10名の糞便を調査した結果、全員からIが分離された。一方、1日390ml摂取による腹部症状では有害事象はなかった。以上の結果から、供試乳酸菌飲料の130ml/日摂取は排便回数、排便日数の増加および糞便内菌叢を改善し、Iは有益なプロバイオティクスであるといえる。

<28>

高齢者と消化管 高齢者の便通異常と腸内細菌叢

守田則一、大中治、正木洋治、木村邦彦、安藤静一郎、(都志見病院)

臨床消化器内科 VOL. 12 NO. 2; PAGE. 187-194; (1997/02)

高齢者は便通異常、とりわけ便秘の頻度が加齢とともに増加し、女子の方がその頻度が高く、腸内細菌叢の構造変化と関連がある。高齢者の便通異常の特徴を下痢と便秘を中心に述べ、便通異常と腸内細菌叢の関係および高齢者における腸内細菌叢の変化の特徴を説明した。高齢者の便通異常の処置法を記した。

<29>

ビート食物繊維がヒトおよびラットの腸内フローラに及ぼす影響

名倉泰三, 岸田太郎, 有塚勉, 佐山晃司, (日本甜菜製糖) 中村宣司, (浅井ケルマニウム研) 弁野義己, (理研)

腸内細菌学雑誌 VOL. 11 NO. 2; PAGE. 109-115; (1997)

健康成人男子 7 名に 1 日 10g のビート食物繊維を 21 日間投与した。その結果、糞便中の腸内フローラは変化しなかったが、排便回数や糞便水分の有意な増加と、腸内腐敗産物のアンモニア、インドールの有意な減少が認められた。また、ラットにビート食物繊維を 10% 含む精製飼料を与えたところ、盲腸中の偏性嫌気性菌は変動しなかったが、通性嫌気性菌の減少と、短鎖脂肪酸、特に n-酪酸の減少が認められた。ビート食物繊維はヒトやラットの腸内細菌に利用されるが、腸内フローラに大きく影響せず、排便の促進や腸内腐敗の抑制等、有利な作用を示した。

<30>

高齢患者における経腸栄養施行中の下痢に対する可溶性食物繊維の有用性

中尾誠, 小島康生, (三重大 医 病院 薬剤部) 小倉庸蔵, 鍋島俊隆, (名古屋大 医 病院 薬剤部) 佐竹昭介, 井口昭久, (名古屋大 大学院医学系研究科 老年科学) 高木健次, (名古屋大 医 保健学科)

静脈・経腸栄養 VOL. 18 NO. 3; PAGE. 53-57; (2003/09/25)

半消化態栄養剤で長期栄養管理中に小腸粘膜萎縮を生じ、軟便および下痢を認めた高齢患者 20 名を対象に、可溶性食物繊維を 4 週間投与した。本剤(ヘルッシュファイバー)は液状で、1 袋中にガラクトマンナンと、ミネラルとして Na, K, Ca, P, Mg, Fe を含有している。本剤の投与により血清中のジアミンオキシダーゼ活性は有意に上昇し、糞便中含水分率は有意に減少し、排便回数および便性状は改善した。腸内細菌叢の総菌数は変化がなかった。糞便内 pH は有意に低下し、糞便中の短鎖脂肪酸濃度は有意に増加した。栄養指数は有意な変化を認めなかつたが、微量金属類の鉄、亜鉛は全ての症例において投与後に増加傾向を示した。本剤の投与は上記疾患の患者に対して、自然に近い状態での良好な排便管理を確保するうえで有用と示唆された。

<31>

プロバイオティックス(9)

奥村純市, 古瀬充宏, (名古屋大 農)

畜産の研究 VOL. 49 NO. 6; PAGE. 725-730; (1995/06)

DNA 組換技法を駆使すれば、理想的なプロバイオティックス(P)の作出は可能であり、乳酸かん菌属と *Bacteroides* の分子遺伝学的研究も進んでいる。腸内細菌の遺伝的操作について、研究の展開と成果、可能性、問題点などを紹介・解説した。まず、消化管内の特定の病原菌に対し免疫能を持つ P の生産が可能となるだろうが、安全性を慎重に検討する必要がある。

<32>

***Lactobacillus helveticus* GCL 1001 を含む発酵乳摂取の健常成人の排便状況および糞便内細菌叢に及ぼす影響**

斎藤康雄, 浜中康宏, 斎藤和代, 瀧沢悟, (グリコ乳業 技開研) 弁野義己, (理研 微生物系統保存施設)

健康・栄養食品研究 VOL. 4 NO. 4; PAGE. 11-20; (2001)

標記乳酸菌を含む発酵乳の整腸作用の評価、及び菌の働きを検証するため発酵乳摂取試験を行った。健常成人 39 名(男性 26 名、女性 13 名、23~61 歳)に供試発酵乳を 1 日 84g 摂取させ、排

便状況、及び糞便状態をアンケート調査した。試験は10週を2週づつ5期(非摂取期間、発酵乳摂取期間、非摂取期間、プラセボ摂取期間、非摂取期間)に分けた。被験者全体の排便日数及び排便回数の増加、便秘傾向群における排便日数の増加、非便秘傾向群における糞便色調の黄色化は、プラセボ摂取期間に比べ有意であった。8名の糞便内細菌叢を解析したところ、プラセボ摂取期間に比べ、総菌数に対する *Bifidobacterium* の占有率は有意に増加し、*Clostridium-others* は有意に減少した。

<33>

炎症性腸疾患の抗生素投与後における大腸崩壊性ビフィズス菌カプセルの有用性

鮫島由規則、鮫島隆志、平川あさみ、丹羽清志、今村芳郎、(潤愛会 鮫島病院) 松元淳、(鹿児島大 医 第2内科) 渋江正、(鹿児島県厚生連 健康管理セ)

医学と薬学 VOL. 46 NO. 1; PAGE. 73-80; (2001/07/25)

抗生素投与後に血性下痢をみた炎症性腸疾患2例(潰瘍性大腸炎、クロール病各1例)に対し、健康食品である大腸崩壊性のビフィズス菌カプセルを8週間摂取させ、便性状および随伴症状の推移、腸内細菌の検索、糞便中有机酸濃度の測定などを行った。その結果抗生素投与後は腸内細菌が *Streptococcus* で占められていたが、ビフィズス菌カプセル摂取により腸内細菌は嫌気性菌を中心に著しく改善し、下痢、腹痛などの随伴症状も軽快した。さらにビフィズス菌カプセル摂取は炎症性腸疾患の再燃・増悪リスク軽減も期待され、緩解維持には有用であると考えた。

<34>

ビフィズス菌含有大腸崩壊性カプセルの臨床的有用性

鮫島由規則、鮫島隆志、平川あさみ、丹羽清志、永田祐一、鮫島加奈子、(潤愛会鮫島病院) 松元淳、(鹿児島大 医 光学診療部) 渋江正、(鹿児島県消化器集団検診研究会)

腸内細菌学雑誌 VOL. 17 NO. 2; PAGE. 67-79; (2003/07)

ビフィズス菌は腸内腐敗の抑制、免疫力の増強など宿主の健康維持に大きな役割を果たしている。今回、筆者らは新しい形態のプロバイオティクスである「ビフィズス菌含有大腸崩壊性カプセル」を臨床応用する機会を得た。このカプセルを潰瘍性大腸炎に用いた場合、腸内細菌叢に作用して腸内有用菌の増殖を促進するとともに、腸内有害菌の増殖を抑制して腸内細菌叢のバランスが改善された。この結果、腸内環境が浄化され、症状の改善ならびにQOLの向上がもたらされた。

<35>

経管栄養摂取重度要介護高齢者に対するプロピオン酸菌による新規ビフィズス菌増殖促進物質を含有する乳清発酵物の糞便細菌、腐敗産物並びに便通・便性に及ぼす効果

堰圭介、中尾治彦、海野弘之、(明治乳業) 依田伸生、(明治乳業 食機能科研) 立原玲子、大内としえ、猿田秀子、鈴木邦彦、(博仁会 志村大宮病院) 光岡知足、(東大)

腸内細菌学雑誌 VOL. 18 NO. 2; PAGE. 107-115; (2004/07)

経管栄養摂取重度要介護高齢者18名(64~102歳)を対象に、新規ビフィズス菌増殖促進物質を含有するプロピオン酸菌による乳清発酵物(BGS)摂取の便通・便性・糞便細菌および腐敗産物等に及ぼす影響を検討した。試験食は凍結乾燥BGSを0.4g含有する粉末状食品とし、毎日4週間摂取させた。その結果、試験食摂取に伴い、排便回数および排便量は有意に増加し、黒褐色便と悪臭便の割合が有意に減少した。また、2週間の試験食摂取により、糞便中のビフィズス菌の検出率は有意に増加し、ウェルシュ菌数は、100分の1に減少した。さらに、糞便中の硫化物および糞便pHは、試験食摂取後有意に低下した。以上の結果から、BGSの摂取は、経管栄養摂取重度要介護高齢者の腸内環境および、便通・便性を改善することが明らかとなった。

<36>

Bifidobacterium lactis FK 120 株含有発酵乳の健常成人の糞便内菌叢特に Bifidobacterium 属の菌種構成および糞便性状に及ぼす影響

塩谷雅子, 中岡圭介, 飯塚尚峯, (福島乳業) 弁野義己, (理研)

健康・栄養食品研究 VOL. 3 NO. 1; PAGE. 19-32; (2000/08/31)

48名の健常成人に *B. lactis* FK 120 株含有発酵乳を摂取させ、排便回数、糞便性状に及ぼす影響を検討した。その結果、排便回数及び排便量の増加、便形状の改善、便の黄色化が認められた。比較的排便回数が少ない群では *Bifidobacterium* 占有率が有意に増加した。また、糞便中のアンモニア量は有意に減少した。糞便中の *Bifidobacterium* の菌種構成は全試験期間を通して変動しなかった。これらの結果から、*B. lactis* FK 120 株含有発酵乳は常在 *Bifidobacterium* の構成に変動を与えることなく腸内細菌叢及び便通を改善することが分かった。

<37>

Bacillus subtilis C-3102 株大豆培養物のヒト腸内環境改善効果

鈴木宏美, 渡部じゅん子, 只野幸恵, 増田静男, 丸田喜義, (カルピス 基盤技研) 竹内治男, (社保 相模野病院)

腸内細菌学雑誌 VOL. 18 NO. 2; PAGE. 93-99; (2004/07)

Bacillus subtilis C-3102 株大豆培養物は家畜に対し腸内菌叢改善、増体、感染防御、卵殻強化、肉質改善、便臭改善等の効果があり添加物として利用されている。*B. subtilis* は古くからヒトの食生活に関わる納豆菌と類似菌であり、今回は C-3102 株のヒトでの効果を検証するため摂食試験を実施した。健常成人 25名(25~57歳:平均年齢39.6歳、男性22名、女性3名)を対象に *B. subtilis* C-3102 株大豆培養物錠剤(1錠あたり 1×10^8 個の胞子を含む)を12名の被験者に毎食後1錠(1日3錠)、13名の被験者に毎食後3錠(1日9錠)を約1週間投与し、簡単な2日間の食事コントロール後最初の便を採取し、腸内菌叢の検索および化学分析を行ったところ、毎食後3錠摂取群において便中腐敗産物のパラクレゾールの有意な減少($p<0.001$)、大腸菌群の減少傾向が観察された。便中アンモニアについては試験前高値(500 $\mu\text{g/g}$ 以上)だった被験者(n=12)で摂取量を問わず有意な減少が見られた($p<0.05$)。また便臭や排便回数の改善が見られ腸内環境に好影響を与えることが示唆された。

<38>

慢性腎不全患者に対するフラクトオリゴ糖の投与とその臨床的有用性 腸内細菌叢の変動を中心として

高橋裕一郎, (腎健クリニック) 門脇和臣, (北里研 病院) 田代靖人, 滝沢登志雄, (明治製菓 生物科研) 木下俊夫, (北里大 薬)

ビフィズス VOL. 9 NO. 2; PAGE. 141-150; (1996/01)

慢性腎不全患者9人にフラクトオリゴ糖を3か月間投与した。その結果、腸内ビフィズス菌量は増加した。インドール、スカトール、パラクレゾールは有意に低下し、腸内 Clostridium 量も減少した。血中トリグリセライドは減少が認められた。血中総コレステロールは減少傾向が見られ、その際 HDL-コレステロールは減少させないという特色が見られた。便秘に対する効果は7例で認められた。

<39>

高齢者の腸内細菌叢および腐敗代謝産物生成に及ぼす大腸崩壊性ビフィズス菌カプセルの影響

竹内潤, 伊泊裕子, 中込奈美, 道畑ゆみ, 神沢としえ, 川原和枝, (仁泉会 阪奈苑)

高齢者 6 例を対象に標題カプセルを 1 日 1 カプセル, 2 週間摂取させてその効果を検討した。腸内細菌叢、腐敗代謝産物濃度などの推移から、短期間に腸内環境が改善されたものと判断された。また、便通の改善を認めた。とりわけ糞便臭は有意に減少し、介護高齢者の室内環境改善に及ぼす効果は大きいと考えられた。糞便中のアンモニア濃度は有意に低下し、腐敗産物濃度も低下する傾向にあった。

<40>

フローズンヨーグルトと乳果オリゴ糖摂取がヒト腸内フローラおよび代謝産物に及ぼす影響
TAKUMI H, OCHI H, OKADA S, (Ezaki Glico Co., Ltd., Osaka, JPN) LI S-T, TERADA A, MITSUOKA T, (Nippon Veterinary and Animal Sci. Univ., Tokyo, JPN)
日本食品微生物学会雑誌 VOL. 18 NO. 2; PAGE. 49-56; (2001/06/30)

健康成人 9 名にフローズンヨーグルト(FY; 60g/日)および乳果オリゴ糖(2g/日)添加フローズンヨーグルト(FY-LS; 60g/日)をそれぞれ 2 週間摂取させ、腸内フローラおよび代謝産物に及ぼす影響について検討した。FY 摂取において、腸内フローラでは摂取 14 日目に *Bifidobacteria*($p<0.05$) が有意に増加し、レシナーゼ陰性 *Clostridia*($p<0.05$) が有意に減少した。腐敗産物では FY 摂取 2 週後にアンモニア、硫化物およびインドール($p<0.01$)、また、フェノールおよびクレゾール($p<0.05$)が有意に減少した。短鎖脂肪酸では乳酸および酢酸($p<0.05$)が摂取中有意に増加した。FY-LS 摂取において、腸内フローラでは摂取中に *Bifidobacteria*($p<0.01$) は FY 摂取より有意に増加し、レシチナーゼ陽性($p<0.05$)および陰性 *Clostridia*($p<0.01$)の菌数は摂取中、さらに、レシチナーゼ陽性 *Clostridia*($p<0.05$)の検出率は摂取 14 日目に FY 摂取より有意に減少した。アンモニア、硫化物、フェノール、クレゾール、インドールおよびスカトール($p<0.05$)は FY-LS 摂取で、FY 摂取より有意に減少した。乳酸および酢酸($p<0.05$)は FY-LS 摂取で FY 摂取より有意に増加した。糞便 pH および水分はそれぞれ FY 摂取より FY-LS 摂取で有意に低下および増加した。糞便重量($p<0.05$)は FY 摂取より FY-LS 摂取で有意に増加した。

<41>

ガラクトオリゴ糖のヒト腸内フローラおよび代謝産物に及ぼす影響
玉井智、中村泰之、小沢修、山内謙三、(日新製糖)
J Appl Glycosci VOL. 41 NO. 3; PAGE. 333-338; (1994/08)

健康な成人男性が 1 日 1 回、ガラクトオリゴサッカライドを 1 または 3g 摂取したときの糞便フローラ、糞便の性状(pH、水分量)、糞便中の有害酵素活性、腐敗産物、揮発性脂肪等について調べた。その結果、糞便中の *Bifidobacterium* 数は増加し、 β -グルクロニダーゼ等の有害酵素活性や VFA は有意に低下した。

<42>

納豆摂取がヒト腸内フローラおよび腐敗産物に及ぼす影響
TERADA A, YAMAMOTO M, YOSHIMURA E, (Nippon Veterinary and Animal Sci. Univ., Tokyo)
日本食品微生物学会雑誌 VOL. 16 NO. 4; PAGE. 221-230; (1999/12/28)

22~49 歳の健康人 7 名に納豆を 1 日 50g ずつ 2 週間摂取させ、便の細菌とその代謝産物などを調べた。腸内フローラでは *Bifidobacterium*, *Bacillus subtilis* が有意に増加し、レシチナーゼ陽性 *Clostridia* が減少した。納豆摂取中 *Enterobacteriaceae* は減少傾向を示し、*B. subtilis* の検出率は増加傾向を示した。その他の細菌群の変動は認めなかった。納豆摂取中に酢酸、2 週目に総有機酸とコハク酸が増加し、摂取中にフェノール、エチルフェノール、スカトールが減

少し、2週目にアンモニア、クレゾールが低下した。この結果から納豆摂取は腸内フローラの構成と代謝活性に影響を与え、腸内環境の改善と便の脱臭効果が示唆された。

<43>

大腸疾患における腸内細菌叢の特異的変化とその対策

梅本善哉、南浩二、石本喜和男、正木和人、角田卓也、浦希未子、富永敏治、谷村弘、(和歌山県医大)

消化と吸収 VOL. 21 NO. 1; PAGE. 69-73; (1998)

大腸疾患 7 例にフラクトオリゴ糖(I)を 10~30g/日、透析患者 11 例にビフィズス菌カプセル(対照プラセボカプセル 6 例)(II)を投与し、標題について検討した。腸内細菌叢は環境や宿主の状態の変化に敏感であり、各種大腸疾患では種々の要因により腸内細菌叢が容易に搅乱される。I と II は腸内細菌叢の乱れを改善するのに非常に有用であり、経口投与 7~10 日でビフィズス菌優位の腸内細菌叢に誘導することが可能であった。さらに、短鎖脂肪酸代謝の変化や腐敗物質の減少により病態大腸の腸内環境の改善も可能であることが示唆された。

<44>

Lactobacillus johnsonii Lal 株含有発酵乳の健康な女子学生における腸内細菌叢および糞便性状に対する効果

山野俊彦、福島洋一、(ネスレ日本) 高田麻実子、飯野久和、(昭和女大 大学院生活機構研究科)

腸内細菌学雑誌 VOL. 18 NO. 1; PAGE. 15-23; (2004/01)

健康な女子学生 24 名(20~22 歳、平均年齢 21.2 歳)を無作為に 2 群に分け、Lactobacillus johnsonii Lal 株を 1 カップ 120gあたり 1×10^9 cfu 含む発酵乳(試験食)、または L. johnsonii Lal 株を含まない発酵乳(プラセボ食)を 1 日 1 カップ、21 日間連続摂取する無作為二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を実施した。試験食摂取期における糞便中 Bifidobacterium ならびに Lactobacillus 菌数は、発酵乳非摂取期と比較して有意に増加し、レシチナーゼ陽性 Clostridium 菌数は有意に減少した。これに伴い糞便 pH の有意な減少、糞便中短鎖脂肪酸(SCFA)濃度の上昇傾向が認められた。コロニー-PCR 法による糞便中 L. johnsonii Lal 株の同定を行ったところ、L. johnsonii Lal 株は、発酵乳非摂取期またはプラセボ食摂食期では検出されなかつたが、試験食摂食期において、試験食摂取後全例で検出された。試験食摂取期における便秘傾向者の週あたりの排便回数は、発酵乳非摂取期間と比較して有意な増加が認められた。以上の結果から、L. johnsonii Lal 株は生菌としてヒト腸管へ到達し、これを含有する発酵乳の摂取により腸内細菌叢および糞便性状を改善し整腸効果が得られ、プロバイオティクスとしての有用性が示唆された。

<45>

大豆オリゴ糖含有飲料のヒト腸内フローラおよび代謝産物におよぼす影響

和田光一、渡部恵子、水谷潤、友田昌代、鈴木宏美、斎藤芳男、(カルピス食品工業)

日本農芸化学会誌 VOL. 66 NO. 2; PAGE. 127-135; (1992/02)

成人男子 7 名に 1 日当たり大豆由来の難消化性ガラクトオリゴ糖 3g(大豆オリゴ糖 10.4g)を含む飲料を連続 3 週間摂取させ、摂取前から終了 21 日後までの糞便を経時的に採取して腸内フローラと糞便中の代謝産物を調べた。その結果、腸内 Bifidobacterium が有意に増し、一方、糞便の β -グルコシダーゼ活性と糞便中のアンモニア量は有意に減少し、p-クレゾールとフェノールも減少傾向にあった。

調査報告 2. 海外（EU 加盟国、米国）の研究者 を対象とした聞き取り調査

EU 加盟 4 カ国 7 施設

1) オランダ・グローニング大学・メディカルセンター

オランダ Groningen 大学, Department of Medical Microbiology の Dr. Gjalt Welling は腸内フローラの新しい解析法としてバクテリアの 16S rDNA を指標とした菌群、菌種特異的プローブを用いた Fluroescent In Situ Hybridization(FISH)法を開発し、培養によらない分子生物学的手法の道をひらいた第一人者である。もともと無菌動物を用いた腸内フローラの生体への影響を生化学的に研究していたことから腸内フローラの機能についても中心的な役割を担っている。

今回、Dr. Welling ならびにグローニング大学の遺伝子操作に関する安全委員会委員である Dr. Albert Jan Scheffer と遺伝子組換え微生物(GMM)の腸内フローラへの影響について意見交換を行った。以下に要点をまとめる。

- ・ 食品として GMM を用いることは消費者の指向からみて EU では難しいだろう。ただし医療の面では IL-10 の遺伝子を挿入した乳酸菌の IBD 治療（後述）はすでに行われており、この方面では可能性はある。
- ・ 腸内フローラ構成菌の標準値を設定するのは難しい。なぜなら個体差が大きく age によっても異なる。例えば大腸菌でも $10^3/g$ のヒトから $10^7/g$ と高い菌数のヒトもいるので、ただ単に菌数だけでは判断できない。むしろ変化率のような指標でみるほうが、異常状態をチェックできるだろう。
- ・ 検査方法としては FISH 法でも $10^7/g \sim 10^8/g$ 以上の菌しか検出できないし Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)などのパターン分析では、トップ 10 ぐらいの菌しか認識できないので培養法も併用して何を調べるかにより方法を選択する必要がある。
- ・ 医学領域での GMM の安全性の評価のポイントは一つに GMM の作り出す peptide が生体にどのような影響を与えるかという点、二つには抗菌性物質を産生するかという点。前者は age により感受性が変わることに注意が必要である。後者は抗菌性物質により腸内フローラのバランスが崩れて日和見感染を起こしやすい菌の急激な増殖により Bacterial Translocation を誘発したり外来の病原細菌の排除能の低下を招くおそれがある。
- ・ 腸内での抗菌性物質の検査法としては糞便を遠心分離して得た fecal water を濾紙にしみこませ、糞便を培養した寒天培地に置き阻止円ができるかどうかで判定できるだろうとのデーターや写真を示して説明された。
- ・ 腸内フローラの検索は単に菌数だけでなく腸内菌の機能も考える必要がある。例えとして *Bifidobacterium* が全く検出されない乳幼児でも健康に問題なく発育しており、その乳幼児の腸内菌を詳しく調べてみると、*Bifidobacterium* と同じような酵素活性をもつ菌が優勢に定着していたという成績を示した。

2) オランダ・グローニング大学・バイオロジカルセンター

グローニング大学バイオロジカルセンター (Rijksuniversiteit Groningen Biologisch Centrum) は、乳酸菌の遺伝学的研究を牽引している世界的な研究機関の一つである。

訪問した研究室は、乳酸菌の応用に関する EU の重要なプロジェクトを担う研究

室の一つで、チーズ製造乳酸菌の一株 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 株) のゲノム解析を行い、また、乳酸菌、枯草菌などのグラム陽性細菌の DNA マイクロアレイ解析では世界レベルの研究を行っている。そして、組換え体の安全性に関する EU プロジェクト研究の一つ "Expression profiles as fingerprints for the safety evaluation of new strains, including GMOs used in bioprocessed food" (略称 "Express-Fingerprints") (http://europa.eu.int/comm/research/quality-of-life/cell-factory/volumel/projects/qlk3-2001-01473_en.htm) に関して、主にマイクロアレイなどの手法を用いた検討で貢献している。

今回の討論には、Jan Kok 教授を始め、Dr. Sacha van Huijum、Dr. J.A.A. Swart の 3 名の研究者が参加してくれた。

まず上記プロジェクト研究で明らかになった結果が紹介された。①実際の製造に使われている「産業株」(チーズ生産乳酸菌)、②それを親株として化学的突然変異処理で得た「変異株」、および、③遺伝子組換え技術でその変異を産業株に導入した「組換え体」を準備し、各株がどのような遺伝子転写パターンを示すか比較した。その結果、③の組換え体は、①の産業株とほぼ同じパターンで、②の変異株のほうが産業株との不一致点が多くかった。これは、突然変異で同時にいくつもの変異が入ったためと考えられる。したがって、遺伝子の転写全体で判断する限り、組換え体は産業株との相違が突然変異株より小さく、安全性に問題がないことがわかった。

その後、乳酸菌などの微生物組換え体の安全性について意見交換した。その結果判明した点を列挙すると、

- ・腸内フローラに対する組換え体の影響について検討を行っている研究機関は、欧州ではないそうである。
- ・組換え体の定義は国によって（特に EU と米国）異なるので注意が必要である。
- ・2003 年 3 月から欧州では組換え体の規制が厳しくなった。
- ・組換え操作によって何が変わるかを科学的に予測することは可能だが、例えば、制御遺伝子や機能未知遺伝子などを改変した場合などは予測が困難になる。
- ・乳酸菌などを遺伝子操作して腸内フローラに対する危険性が考えられるのは、バクテリオシン（抗菌ペプチド）などのような抗菌性をもつ物質を多量に作らせる場合であろう、などであった。

乳酸菌などの組換え体を食品に将来応用するための前提として、最新のゲノム情報やアレイ解析技術を駆使して科学的に安全性を検討している点は参考にすべきだと感じた。

3) オランダ・WCFS (Wageningen Centre for Food Sciences)

WCFS とは、食品と健康、食品の構造と機能性、食品微生物の機能と安全性などに関する基礎研究を進め、その成果を産業に還流することを目的とした研究組織であり、ワーゲニンゲン大学、マーストリヒト大学、国立乳業研究所 (NIZO)、TNO 栄養・食品研究所（後述）、DLO などから成る。新しい研究方法を活用してオランダの食品産業のレベルを高めて新たな商品を作り出すための中心的研究組織であり、政府から資金が援助されている。

ここでは食品への応用を目指して、乳酸菌などの遺伝学的研究が進められており、中でもプロバイオティクス株の一つである *Lactobacillus plantarum* WCFS 株のゲノムの完全な塩基配列を決定し解析を進めている。本株はヒト腸管由来でプロバイオティクス効果が報告され、本株を抗原運搬体とするワクチン開発が進められている。

この組織の研究面のヘッドである Willem M. de Vos 教授が直々に説明してくれた。WCFS の紹介の後、様々な研究成果の説明があった。特に、WCFS がゲノムを決めた乳酸菌 *L. plantarum* WCFS 株の解析（ゲノム遺伝子情報をフルに活用し、アレイ解析も連動して代謝の検討、腸管接着性の検討など）によって、将来、腸管内での挙動やヒト細胞と細菌との関わりを理解し、食品の機能性研究に役立てる研究を進めている。また、遺伝子組換え技術を利用して、乳酸菌にビタミンや各種生理活性物質を作らせようとする応用研究も盛んであり、欧洲各国の研究機関との共同研究によって効率的に研究が進められている。

その他に明らかになったことは、

- ・10 年ほど前より EU プロジェクトで、微生物組換え体から他の微生物への遺伝子移行について検討した結果、遺伝子の移行が起こることが明確になった。
- ・微生物組換え体が腸内フローラ（特に乳幼児のフローラ）構成のバランスを変える可能性は否定できないが、個人的見解としてはあまり気にしていない。（腸内フローラは、いろいろな条件で変動するので）
- ・また、腸内細菌による代謝産物の解析は TNO の Dr. Venema らのグループが人工胃腸モデル TIM を用いて検討しているので、それを参考にすればよいのではないか。

（ただし、安全性を評価する場合にどのようなバイオマーカーが適当であるかについては科学的にはまだ明らかになっていない）

- ・組換え体の安全性に関する情報は、European Food Safety Authority のウェブサイト (<http://www.efsa.eu.int/>) で入手できる。

4) オランダ・TNO

オランダ TNO の Dr. Venema は腸内フローラのシミュレーションシステムとしてのコンピューターでコントロールされた人工腸管を開発した。この装置は極めて in vivo の状態を反映できることから ex-vivo システムともよばれている。

Dr. Venema のグループはこのシステムを用いて腸内フローラの代謝、感染抵抗性、Probiotics や Prebiotics の評価まで広い範囲で腸内フローラ機能解析を行っている。Dr. Venema は 4 人の TNO メンバー Dr. Goert F. Houben, Dr. Claudia van den Berg, Dr. Jos van der Vossen, Dr. Andre Peminsk を召集し我々 2 人の計 7 人でセミナーを行い、GMM の安全性評価や腸内フローラの解析や評価システムについて議論した。

はじめに日本側から今回の訪問の目的をスライド（資料 2-1）をつかって説明し、ついでオランダ側の 4 人がそれぞれの内容をスライドで説明し最後に日本側からの 6 つの質問事項について討論した。内容を以下に要約する。

1. Dr. Houben は Food toxicology, Food allergy, Food & Feed risk assessment の専門家で TNO のマネジャーとして活躍している。Food 全般についての TNO で行っている Risk Analysis and Food Safety について説明された。

2. Dr. van der Berg は Food and Feed の Regulatory Affairs Manager で、新たな食品や飼料添加物関係の対応をしている。実際に新たな食品ができた時の安全性評価の進め方を EU での基準に基づき説明がされた。
3. Dr. van der Vossen は membrane transport mechanism や bacterial gene expression の専門家で、現在遺伝子組換え作物の遺伝子が腸内菌への移行について研究を行っている。また、細菌のシークエンスデーターからマイクロアレーを用いてフローラの解析法の研究を行っている。
遺伝子の移行に関する知見として Brain Heart Infusion Broth ではプラスミドは極めてよく細菌へ移行する。GM potato DNA も容易に移行する。In vitro よりも in vivo のほうが移行しやすいがフローラの構成により遺伝子の移行頻度が変わる。遺伝子移行が免疫的にどのような影響を与えるかについては in vitro や in vivo の成績から推測するしかない、などが説明された。
4. Dr. Peninsk は免疫学の専門家で、主に食品の免疫毒性についての研究を行っている。現在遺伝子改変植物の新たなタンパク質のアレルギー原性を研究しており、数年前に食物プロテインに対して高感受性ラットモデルを開発してその有用性を検討している。このモデルの有用性が確認されれば FAO/WHO 2001 decision tree (遺伝子組換え作物から產生されるアレルギー原の評価の方法) に加えられる可能性が高いと考えている。調べるプロテインを感作させることからこのモデルラットでは飼料が一つの問題点となっている。L. plantarum はこのモデルでオブアルブミンの T cell エピトープを発現させるということもあるとの説明があった。

最後に Dr. Venema の司会で 6 つの問題について討論した。その内容は以下の通りである。

1. GMM の安全性評価については、遺伝子の伝達や免疫応答などで進められているが、腸内フローラを通しての生体への影響については検討されていない。
2. GMM の腸内フローラへの影響を GMM の安全性評価として検討する必要があると思うが、腸内フローラへの影響を評価するのは難しいだろう。
3. GMM の腸内フローラへの害作用をみるためにパラメーターは腸内フローラ構成としては大腸菌は一つのマーカーとして有効だろう。腸内代謝では腸内腐敗産物、胆汁酸組成、有機酸、変異原性などはマーカーとなるが正常値としてとらえるのは個人差を考えると難しいかもしれない。
4. GMM 側の害作用因子としては遺伝子を一つ操作することでどこにどのような影響が出るかをチェックすることは難しく、新たに作られるタンパク質についてはアレルギーの問題、トキシン产生など食品の安全性評価の decision tree にしたがい評価するしかない。この場合特に乳幼児に対しては極めて感受性が良いと考えられるので、バイオティクスも含めて特別な対処法が必要であろう。特にアレルギーに対して
5. TNO の ex-vivo システムは GMM の腸内フローラへの影響を評価するには極めて有用な手法だが、このシステム自体大型で高価なものなので、いろいろなところで用いることは無理である。そのためより簡便なシステムを開発する必要がある。
6. 今後の GMM の食品への応用は医学臨床の面ではバイオティクスとして用

いられる可能性は大きいが食品として用いる場合、プロバイオティクスとして用いる場合と食品の製造過程で用いる場合等があるが、現在は主に食品を作る側に都合の良いことが多く、消費者に何らかの利益が上がることは少ないのでGMMの使用が進むとは考えにくい。

5) ベルギー・ゲント大学・VIB

VIB (Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology)は、ベルギーのフランダース地方の大学からなる研究組織で、ゲント大学にはその一部として最近、Department for Molecular Biomedical Research の研究所が設立された。ここには分子生物学の最新の研究機器が備えられ、微生物から動物、植物まで幅広い研究が行われている。

今回訪問したApplied Molecular Bacteriologyの教授Erik Remautの研究室では、遺伝子操作した乳酸菌を用いて生理活性物質（抗原や免疫調節物質など）を腸管粘膜へ運ぶという研究をしている。Remaut教授は、組換え乳酸菌を用いて唯一実施された「ヒト試験」の中心的研究者である。教授の他に、助教授のPieter Rottigerと専門担当のEmil R.G. Pot氏の3名が対応してくれた。

教授らは、欧米で患者が増加し問題となっており、有効な治療法が確立されていない難病である潰瘍性大腸炎の治療に、ヒトのサイトカイン（IL10）を作る乳酸菌（組換え体生菌）の適用を計画した。潰瘍性大腸炎にはIL10が有効だと考えられるので、まず、動物実験を含む数多くの実験によってIL10を作る乳酸菌組換え体の安全性と有効性を確認した後、本組換え体を用いて（生菌を腸溶カプセルに入れて経口投与）、オランダの病院で12名のクローン病患者に対して治療が実施された。これは世界初の乳酸菌組換え体を用いたヒト試験であり昨年夏に終了した。治療効果などの詳細は投稿中なので聞くことはできなかったが、治療は効果を上げたようであり、難病から患者を救う新しい方法として期待できるようである。なお、これ以外には現時点で微生物組換え体をヒトで試験した例はない。

この組換え体では、IL10産生遺伝子をチーズ製造乳酸菌（*Lactococcus lactis* MG1363株）染色体のチミヂン合成酵素遺伝子（*thyA*）に挿入したので、本組換え体は生育にチミヂンを要求する。遺伝子を染色体に組込み、組換え体が環境中に出ても生育できないことで安全性を確保するなど、乳酸菌組換え体の安全性には十分な配慮がされている。

なお、*Lactococcus lactis*は腸内で生育できず、組換え体は腸で代謝活性（IL10の生産）を示すが、投与を中止すると2～3日で糞便から検出されなくなった。したがって、安全性確保は充分できると考えられる。

なお、教授らはこの方法、すなわち、乳酸菌の染色体 *thyA*部位に腸で生理活性を示す物質の生合成遺伝子を挿入して組換え体を作成し、その生菌を経口投与して治療あるいは予防するという方法を今後広く応用したいと考えている。

教授は、挿入遺伝子（IL10産生遺伝子など）が腸内で他の微生物に移行する可能性があると考えている。しかし、遺伝子が乳酸菌染色体に組込まれているので移行頻度はきわめて低く、また、仮に移行してもその微生物からヒト細胞へ移行することはほとんどなく安全性はきわめて高いと判断している。

なお、IL10を作る乳酸菌組換え体の投与によって患者の腸内フローラが変化したかどうかについて尋ねたが、残念ながら結果は話してもらえなかった。

6) フランス・国立農業研究所 (INRA)

INRA(Insititut Nationale de la Recherche Agronomique、フランス国立農業研究所)の関連施設は国内 21箇所にあり、欧州最大の農業研究所である。

今回訪問したのはパリ近郊にある Jouy en Josas の研究所で、乳酸菌研究（特に遺伝学研究）や腸内細菌研究のメッカである。前述の、微生物組換え体の安全性に関する EU プロジェクト（“Express-Fingerprints”）の責任者である Dr. Pierre Renault と 2名の研究者 Dr. Eric Guedon および Dr. Joel Dore が同席し討論した。

Dr. Renault から全体の説明を受けた。“Express-Fingerprints” のプロジェクトには、欧州 7 カ所の研究機関が参画しており、乳酸菌組換え体のリスクアセスメントを行っている。今後、組換え体からの遺伝子移行と毒性・アレルギー原性などの評価が必要であるが、そのための手法とマーカーの選択が重要であると言う。

ここでも産業株とその突然変異体、および遺伝子組換え体の比較の結果が紹介され、組換えという方法によって問題が起こることはない、と言うのが現時点での評価である。また、多数の乳酸菌産業株（全て歴史的に安全である株）を比較してみると、遺伝子発現や作られるタンパク質全体のパターンはかなり大きな違いがあることも判明した。

Dr. Guedon は、乳酸菌が通常の培地と腸管内で遺伝子発現パターンが異なるかについて検討しておりその結果の一部が示された。通常の培地と腸管液（盲腸内容物？）とで産業株を培養してマイクロアレイで比較した結果、全体の 2割に相当する約 400 の遺伝子（そのうち半分が機能未知遺伝子）の発現が違っていた。腸管内では糖が少なく乳酸菌にとってストレスが多い環境であることと関連すると推測される。（突然変異株と組換え体でも同様の検討をしている）

Dr. Dore は、最近開発され汎用されている分子生物学的手法による腸内フローラの解析について説明してくれた。詳細は省略するが、腸内フローラの構成、安定性、変化などを乳幼児から老人までについて検討している。

その後の討論の際に、以下の意見が出された。

- ・微生物組換え体の安全性の評価は、ケースバイケースで行うしかない。評価には組換え体の代謝変化による影響を見る必要があるが、良いマーカーの選択が重要であろう。
- ・腸管への接着因子やバクテリオシン生産に関わる遺伝子を強く発現するような例を除くと、微生物組換え体が腸内フローラを変えるとは考えにくい。（乳酸菌やビフィズス菌などの接着因子やバクテリオシンが実際に腸内でどのような効果を発揮しているかは明確になっていないが）
- ・遺伝子の移行について調べたが、抗生物質耐性遺伝子など強い選択性があるもの以外では遺伝子の移行はほとんど見られなかった。
- ・欧州でも一般に、消費者は遺伝子組換え体を利用した食品を食べようとしない。そのため EU は、微生物組換え体の安全性評価についてまだ準備を開始していない。（なお、特定の病気の治療に有効な組換え体なら欧州の消費者も受け入れるであろう）

7) デンマーク・Danish Institute for Food and Veterinary Disease

デンマークでは Danish Institute for Food and Veterinary Disease の Department of Microbiological Food Safety、Dr. Tina Rask Licht を訪問した。この研究室は以前 Dr. Badil Lund Jacobsen が主任を務めヒトフローラマウスを用いて食品の安全性評価を行っていた。Dr. Jacobsen は前年に Chr. Hansen 社に籍を移していく Dr. Licht はその後継者をつとめている。

Dr. Licht の他大学院生の Ms. Nete, Ms. Louise ならびに同じ研究所の病理学者の Dr. Sigrid Andersen と、主にヒトフローラマウス、ラットの食品安全性評価での有効性について discussion を行った。

Dr. Licht のグループでは現在バクテリオシンであるナイシン やペヂオシンを产生する *Lactobacillus plantarum* や *Lactococcus lactis* が摂取されたときにヒトの腸内フローラにどのような影響を与えるかをヒトフローララットを用いて検討している。腸内フローラの解析は DGGE や Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) のパターン解析と *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, 好気性菌や嫌気性菌の総菌数をグローブボックスを用いて行っているが、腸内フローラ解析は専門ではないように思えた。ヒトフローララットと同じに市販のキモスタッフにヒトの糞便を培養して用いているが、ラットとキモスタッフでフローラ構成が同じようになる場合と大きく異なる場合があるなど説明された。この実験でヒトフローラの中の *Lactobacillus* のみの菌数が減少した場合、危険と判定するか否かは今後の研究課題であると説明された。

さらにヒトフローラマウスを用いて *L. plantarum* と *Enterococcus faecalis* を用いて抗生素質耐性遺伝子のほかのフローラ構成菌への移行について研究を行っていること、また殺虫剤として植物に用いられている *Bacillus thuringiensis* の安全性評価としてノトバイオートやヒトフローララットを用いて腸内での菌の動態、遺伝子の移行やエンテロトキシンの产生について検討を行っており、この菌が小腸で栄養体に、大腸で芽胞となることでエンテロトキシン产生や腸内フローラがどのような影響を受けるのかを検討しているのかを説明された。

これに対して日本では現在どのような研究が行われているかを説明して最終的にヒトフローラマウス、ラットが GMM の安全性評価にどの程度有用であるかを討論した。その要約は以下の通りである。

1. ヒトフローラマウス、ラットは GMM の安全性評価のスクリーニングとしては有効な手段であるが、作出了したヒトフローラマウス、ラットがどこまでヒトフローラをシミュレーションしているかを把握したうえで用いなければならない。
2. 研究目的によりヒトフローラマウス、ラットが良い場合とキモスタッフが良い場合があると思うが、腸内菌の代謝を見る場合キモスタッフのほうが有効であると考えられるが、トキシン产生やアレルギーではヒトフローラのシミュレーションとしては現在のところヒトフローラマウス、ラットかキモスタッフしかない。

米 国

米国における現地調査は(1)ノースカロライナ州立大学および(2)イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校を訪問し、専門家からの遺伝子組換えの安全性に関する情報収集とこの分野の研究に関する情報交換を行った。

1) ノースカロライナ州立大学

ノースカロライナ州立大学は、米国のバイオ研究の拠点として整備の進む研究機関で、米国の乳酸菌の遺伝学的研究を牽引している代表的な研究機関である。訪問した研究室は、乳酸菌の分子生物学的研究の大家であり、米国科学アカデミー会員である Klaenhammer 教授の指導する研究室で、*Lactobacillus* 属や *Bifidobacterium* 属の全ゲノム配列の解読を推進している。さらに、解読した塩基配列から乳酸菌の医学的あるいは工業的に重要な遺伝子情報の解析や、得られた乳酸菌のゲノム配列情報を DNA マイクロアレイに応用する研究を展開している。今回の討論には、Klaenhammer 教授をはじめ、Altermann 博士、Barrangon 博士、Buck 博士、Azcarate 博士ら同教授の研究グループのスタッフや研究員が参加してくれた。

まず、Klaenhammer 教授により現在精力的に進めている乳酸菌、特に *Lactobacillus* 属の全ゲノム配列の解読に関し、その最新の成果が紹介された。乳酸菌のゲノムはまだわずかな菌種(菌株)について発表されているのみであるが、同教授のグループをはじめとして現在多くの菌種について解析が進められており、近い将来には医学的、工業的に重要な多くの乳酸菌についての全ゲノム情報が公開される見通しだることを教授との会談で知ることができた。プロバイオティクスなどとして利用しようとする乳酸菌の菌種あるいは菌株の全ゲノムが解読されれば、その菌株から遺伝子改変の技術を用いてより有用性の高い菌株を作製しようとするときにその配列情報から安全性をさらに高めた遺伝子改変を行うことが可能となる。例えばインサーション配列等の特定の配列は、遺伝子の挙動に強く影響を与えると考えられており、遺伝子情報をコンピュータ上で比較・分析を行うバイオインフォマティクスの応用により、導入した遺伝子の脱落の起こりやすい配列部分を避けて遺伝子挿入位置を設定するなど、組換え体の作成の段階でどの様な設計を行えば安全性が担保可能であるかの予想が出来るのではないかといった議論がなされた。

また、Klaenhammer 教授とその研究グループでは解読した乳酸菌の全ゲノム情報をもとに乳酸菌全ゲノムの DNA-RNA マイクロアレーを開発し、様々な環境下における乳酸菌株の代謝の変化を遺伝子の発現レベルで解析する研究を進めている。この技術を応用すれば、遺伝子改変を施した微生物が予期せぬ代謝活性の変化や望ましくない蛋白質の合成などの意図しない有害な変化を伴わないことを遺伝子の発現のレベルで確認できる技術が確立されることが期待できる。乳酸菌のゲノム解析によるデータベースの整備は、今後展開されると考えられる乳酸菌の遺伝子組換えにおいて、その安全性を議論する上での基盤となるデータベースとなりうると思われた。

さらにその後、乳酸菌をはじめとするプロバイオティクスの遺伝子組換え体の

安全性の確保とその応用の可能性について意見交換した。Klaenhammer 教授によれば、米国では日本や欧州諸国に比べて消費者のプロバイオティクスの持つ保健効果に対する認知度が低く、遺伝子組換え技術の食品への応用に対する抵抗感は低いため、日本やヨーロッパよりも市場への導入は容易であろうと考えられる。一方、日本では遺伝子組換え技術に対する抵抗感が強い上にプロバイオティクスの効果に対する期待が大きく、消費量も多いため、遺伝子改変微生物の市場への導入には大きな困難が予想される。遺伝子改変プロバイオティクスが実用化されるとすれば、その第一段階としてはある遺伝子を挿入した改変体ではなく、抗生物質耐性遺伝子や病原性関連遺伝子など不必要な遺伝子や有害な遺伝子を取り除いた改変体であれば、比較的受け入れられやすいと思われるというのがクレンハンマー教授の見解であった。

2) イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校

イリノイ大学アーバナ・シャンペーン校では、遺伝子組換え技術を応用して食品微生物を作成し利用する研究を行っている Dr. B. M. Chassy の研究組織を訪問した。遺伝子組換え微生物研究の現状と安全性の考え方に関する情報収集と情報交換並びに、腸内細菌叢に関する研究に関する情報交換を試みた。Dr. Chassy は遺伝子組換え微生物の専門家で、その安全性に関する委員を始め国内外を問わず多忙であり、日程調整がつかなかったために、残念ながら直接意見交換をすることが出来なかつたが、同博士の調整によって Dr. B. A. White および Dr. A. A. Salyers と会見することができ、遺伝子組換えの安全性に関する情報収集とこの分野の研究に関する情報交換を行った。

Dr. White は主に産業動物を用いてではあるが、腸内細菌叢の構成や代謝活性、宿主の健康や疾病における役割などの研究を行なっており、腸内細菌叢の重要性やプロバイオティクスや食餌成分などをを利用して宿主にとってより良い腸内環境を整えることの有用性について専門的な情報を得ることができた。また、Dr. White は同じくイリノイ大学アーバナ・シャンペーン校のマッキー教授や Dr. H. R. Gaskins と共同で腸内細菌叢の構成を分子生物学的手法で解析する技術の開発に携わっている。今回は日程上 Dr. R. I. Mackie, Dr. Gaskins とは会談することができなかつたが、ホワイト教授から古典的な培養法から DGGE 法、T-RFLP 法、SSCP 法、FISH 法などの最新の分子生物学的手法にいたる腸内細菌叢構成の解析法とその応用、利点と欠点などの網羅的な情報を得ることができた。さらに、腸内細菌叢のすべての構成菌種を対象とした DNA マイクロアレーといった現在はまだ実用化されていないが将来の発展が期待される技術についても話を聞くことができた。この研究機関の訪問により、DGGE 法、T-RFLP 法、SSCP 法、FISH 法などの腸内細菌叢の解析法とその応用に関する情報を得ることができ（後述「GMM の腸内細菌叢への影響を評価するための方法の検討 2. 腸内細菌叢検査法の評価」参照）、このような手法が今後の腸内細菌叢の検討や安全性評価の検討に応用可能であることが理解する事ができた。

一方、Dr. Salyers は細菌学の専門家であると同時に食品などの認可や規制のガイドライン策定のための委員会に参加した豊富な経験を持ち、今回の会談では技術的な情報のみならず、認可や規制のためのガイドラインを策定するにあたって

の貴重な助言を得ることができた。Dr. Salyers は特に、特定の企業や業界からの研究費などを受け取っていない中立な立場にある専門家がその過程に加わることの必要性を強調されていた。

さらに、乳酸菌などの微生物組換え体の安全性や市場への導入の将来性について意見を交換した。両教授によれば、米国では乳酸菌のプロバイオティクス効果が消費者にあまり認知されていないため、米国内における乳酸菌の遺伝子組換えは、経口ワクチンの運搬体としての応用以外はあまり実用性がないのではないか。また米国では、遺伝子組換え微生物に関しては、CODEX のガイドラインが既にあるので独自のガイドラインを作る予定は当面ないであろうとの見解であった。

資料 2 - 1

Background of Food Safety Commission	Food Safety Commission
<p>1996: Outbreak of E. coli 0157:H7 in Sakai Patients: more than 8,000</p> <p>2000: Food-borne accident: Enterotoxin of <i>S. aureus</i> in skim milk, Patients: more than 10,000</p> <p>2001: Bovine Spongiform Encephalopathy in cattle</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>2003: Food Safety Commission (FSC) in the Cabinet Office</p>	<ol style="list-style-type: none">1. Conducting risk assessments on food in a scientific, independent, and fair manner, and making recommendations to relevant ministries based upon the results from the risk assessment2. Implementing risk communication among stakeholders such as consumers and food-related business operators3. Responding to food-borne accidents and emergencies

Expert Committees	From Food Safety Commission To Japan Bifidus Foundation
<ul style="list-style-type: none">PlanningRisk communicationEmergency response (food accidents, etc.)Assessment groups<ul style="list-style-type: none">1) Chemical substances: Food additives, Pesticides, Chemical substances (arsenic, PCB etc.)2) Biological materials: Microorganisms, Viruses, Natural toxins, BSE etc.3) Emerging materials: GMO, Novel foods, Feed/Fertilizer etc	<p>Effect of GMO on human health <u>through intestinal flora</u></p> <p>Investigation :</p> <ol style="list-style-type: none">1. Scientific papers2. Documents of foreign countries3. Opinions of scientific experts in Europe and USA

Aim of our visit	Aim of our visit
<ol style="list-style-type: none">1. Safety assessment of GMO2. Is the influence of GMO on intestinal flora necessary when we judge the safety of GMO?3. If yes, how should we evaluate the influence of GMO on intestinal flora? Which parameters related harmful effects to the host should be checked ?	<ol style="list-style-type: none">4. If GMO give harmful effects to the host, which factors in GMO and/or GMO products should be checked ?5. How is the possibility of TM0-1, TM0-2 to be used for evaluation of the safety of GMO against intestinal flora?6. Present aspect and future possibility of the applications of GMO in food.

Intestinal microflora and Host

Beneficial effects:

- Colonization resistance**
- Stimulation of immune function**
- Digestion, Absorption, Composition of Vitamin**

Harmful effects:

- Production of**
- Putrefactive products, carcinogens**
- toxic substances etc.**
- Opportunistic infection**

Items for testing the effects of Probiotics and Prebiotics to the host intestinal environments

Balance of fecal microflora

Metabolites in feces:

- H_2S , ammonia, Indole, p-cresol, skatole, phenol,**
- β -glucosidase, β -glucuronidase**
- Short chain fatty acids, Bile acids**

pH, water content of feces

調查報告 3. 海外政府關係資料調查

米国および欧州において食品へ遺伝子組換え微生物を利用する際の特にヒト腸内細菌叢への影響に関する安全性評価について CANTOX 社に調査を依頼した報告書が資料(和訳を資料 3-1、意見書の和訳を資料 3-2 として添付)である。結論から言うと現時点では遺伝子組換え微生物の腸内細菌叢に及ぼす影響を検討するのに必要な試験に関して FDA、EU、FAO/WHO による明確なガイダンスはない。換言すれば、あらゆる食品及び食品成分の規制に対する既存の安全性基準と同じ基準が適用される。ただし米国および欧州において、現在までのところ Generally Recognized as Safe (GRAS) 承認プロセス (米国) や Novel Food (新規食品) あるいは Qualified Presumption of Safety (QPS) の審査 (欧州) などを完了して認定を受けた遺伝子組換え微生物起源の酵素剤は多数あるものの遺伝子組換え微生物そのものについては確認されていないので、今後は遺伝子組換え微生物に特異的な何らかのガイダンスが発行されることはある。実際に欧州委員会によって何らかの形のガイダンス文書にまとめる作業が進められている可能性があり、場合によっては特定の試験に対する必要性を強調することがあるかもしれない。

生存不可能な遺伝子組換え微生物を含む食品あるいは生存不可能な遺伝子組換え微生物から精製された酵素剤のような食品成分／食品添加物の場合に比較して、生存可能な遺伝子組換え微生物が食品中に存在することは、ある種の消化管関連試験などの追加的な安全性の考慮が必要と考えられる状況であるといえ、欧州国際生命科学協会や FAO/WHO でも食品中で使用される生存可能な遺伝子組換え微生物およびプロバイオティクスの安全評価に関するガイドラインを発行している(訳文 2 ページ参照)。一般的に生存可能な食品微生物およびプロバイオティクスの摂取の安全性に関連があると思われるデータの種類に関する具体的な考察としては、腸内での生存可能性、付着特性、抗生物質耐性、プラスミド導入、酵素プロファイル、代謝産物、感染特性などが挙げられる。遺伝子組換え微生物の摂取の安全性についても同様に考慮することができるのではないかと思われる。必要と思われる試験の種類はケースバイケースで異なり、遺伝子組換え微生物の遺伝子組換えを行っていない微生物と比較した特性、すなわち遺伝子組換えにより微生物の生理学的特性がどのように変化したかによって異なる。安全性の主要な決定因子が、非毒素産生性かつ非病原性を示す生物であるという点に変わりはない。



米国及び欧州における応用食品における遺伝子組換え 微生物の利用を支持するための一般安全性評価の概要

報告書提出先：

MHB & Company, Ltd.
3-4-9 Kyuden, Setagaya-ku
Tokyo, 157,0064
Japan

報告書作成者：

CANTOX HEALTH SCIENCES
INTERNATIONAL
2233 Argentia Road, Suite 308
Mississauga, Ontario, Canada
L5N 2X7

December 14, 2004

Mississauga, ON, Canada
905-542-2900

Bridgewater, NJ, USA
908-429-9202

Reading, Berkshire, UK
+44 (0)118 935 7162

米国及び欧洲における応用食品における遺伝子組換え微生物の利用を 支持するための一般安全性評価の概要

目 次

エグゼクティブサマリー	78
1.0 緒 言	80
2.0 米国における規制	82
3.0 EU における規制	85
4.0 要 約	86
5.0 参考文献	87

エグゼクティブサマリー

緒 言

米国（U.S.）食品医薬品局（FDA）及び欧州食品安全庁（EFSA）はそれぞれ、遺伝子組換え（GM）食品を含むあらゆる食品及び食品成分の安全性を保証する責務を負っている。それぞれの管轄において、安全性評価は厳密かつ科学的根拠に基づくものであり、GM食品ならびに食品添加物が、他の食品及び食品成分に対する既存の安全性基準と同じ安全基準の対象となることを保証する。通常、遺伝子組換え微生物（GMM）由来食品などのGM食品は、すでに日常の食事の一部として消費されている食品と同等に安全であることを明らかにすることを目的とする比較安全性評価に基づいて評価される。微生物起源のGM食品添加物については、安全性評価の要素として、遺伝子組換え技術及び微生物株の特徴付け；潜在的病原性特性、毒素産生特性、及び栄養分吸収阻止作用；GMMと哺乳動物宿主との相互作用；及び遺伝子導入及び抗生物質耐性の可能性などがある。生存可能なGMMを含む食品に対する評価は、生存不可能なGMMを含む食品又はGMM由来の精製された製品よりも厳格なものとなる。

米国における規制

FDAは、組換えDNA（rDNA）技術を用いて開発した食品及び食品成分、すなわちGM食品を規制するのに連邦食品・医薬品・化粧品法（FFDCA）の既存の条項で十分であるとの見解を示している。食品に添加する物質は、食品添加物として規制されるか、又は「一般に安全と認められる食品〔Generally Recognized as Safe〕」（GRAS）とみなされる。GMMの安全性を評価する場合、FDAは毒素産生能及び病原性、既知又は潜在的アレルゲン、及び抗生物質耐性の特定を重視している。食品加工に利用される微生物酵素剤の安全性評価に対するアプローチがParizaとJohnson（2001年）によって詳細に報告されている。生産株の安全性が酵素の安全性評価における最も重要な考慮事項である。

EUにおける規制

2004年4月18日発効の遺伝子組換え食品及び飼料に関する規則（EC）1829/2003により、遺伝子組換え（GM）微生物を含有する、GM微生物からなる、又はGM微生物から生産される食品及び飼料の販売が規制されている。現行の承認手順では、遺伝子組換え生物（GMO）及びその可能性のある用途について単一の承認申請が認められている。販売許可は10年間の期間に対して付与され、European Community（EC）全域で有効である。この手順は米国における手順とは異なるが、意図される使用条件の基礎をなす安全原則は不变である。現在、GM微生物を含有する、GM微生物からなる、又はGM微生物から生産される食品及び飼料のリスクアセスメントに対するガイダンス文書案の策定がEFSA GMOパネルによって進められている。このプロセスをさらに進めるため、EFSAは2004年12月に微生物の安全性評価に対して調和したアプローチを考慮するための科学専門家会議を主催している。「Qualified Presumption of Safety（QPS）」（安全であるとの推定の認定）と呼ばれる提案された制度は、米国において用いられているGRASの定義と目的及び概念を同じくするものである。

要 約

EU と米国では具体的な承認許可手順は異なるものの、食品における遺伝子組換え微生物の安全性評価において検討される評価項目は、それぞれの所轄官庁でほとんど差はない。一般的アプローチとして、GMM の組成、栄養の質、及び毒素産生能ならびに病原性と対応する従来品との比較分析によって導かれるケースバイケースの評価が行われる。GMM と対応する従来品すなわち遺伝子の組換えが行われていない微生物との相違点に安全性評価の焦点があてられ、必要とされる安全性試験の範囲が決定される。食品における使用を目的とする GMM の安全性評価では、遺伝子組換えの詳細にわたる特徴付けを行い、意図された作用及び意図されなかった（多面発現の）作用を検討し、新規の、あるいは変化した危害を特定し、ヒトの健康に関連のある主要な栄養素の変化を特定する。米国では、GM 起源の多数の微生物酵素剤がその使用について GRAS と判定され、FDA に届出が行われている。EU においても多くの GMM 酵素が市販されている。

1.0 緒 言

CANTOX HEALTH SCIENCES INTERNATIONAL (CANTOX) では MHB & Co., Ltd の要請を受け、欧洲連合 (EU) 及び米国 (U.S.) で食品における遺伝子組換え (rDNA) 微生物の安全性評価に用いられている現行のアプローチに関して以下の要約を作成した。意味論についての論議はせずに、組換え DNA 技術などの最新バイオテクノロジーにより遺伝物質が改変されている細菌、酵母、及び糸状菌の記述に対し、簡単にするために遺伝子組換え微生物 (genetically modified microorganism : GMM) という用語を用いる。世界中で種々の微生物が食品生産に利用されており、微生物活動及び／又はその生物自体の産物が日常の食事の一部となっていることを意味する。EU 及び米国では、あらゆる遺伝子組換え (genetically modified : GM) 食品及び食品添加物が、他の食品及び食品成分に対する既存の安全基準と同じ安全基準の対象とされているが、利用のための販売許可を取得するための規制要件は管轄官庁により異なる場合がある。

GM 微生物由来食品の安全性評価において検討される評価項目は、米国と EU でほとんど差がなく、一般に国際食品バイオテクノロジー会議 (IFBC、1990 年)、国連食糧農業機関／世界保健機関 (FAO/WHO、2001 年)、及びコーデックス委員会 (2003 年) によって開発された手法に準拠している。一般的アプローチとして、GMM の組成、栄養の質、及び毒素産生能ならびに病原性と対応する従来品との比較分析 (すなわち、「実質的同等性 [substantial equivalence]」) によって導かれるケースバイケースの評価が行われる。対応する従来品とは、遺伝子組換え技術を利用せずに生産され、安全な使用の歴史が十分確立されている同等の生物と定義される。GMM が既存の微生物と実質的に同等であると確認されると、その GMM は対応する従来品と同等に安全であるとみなすことができ、詳細にわたる安全性試験を必要としない。一方、GMM と従来品との間に相違がみられる場合、その相違点に安全性評価の焦点があてられ、より詳細にわたる安全性試験が必要となる場合がある。

また、食品における使用を目的とする GMM の安全性評価では、遺伝子組換えの詳細にわたる特徴付けを行い、意図された作用及び意図されなかった（多面発現の）作用を検討し、新規の、あるいは変化した危害を特定し、ヒトの健康に関連のある主要な栄養素の変化を特定する。全体として、有害な影響を及ぼす可能性を理解し、予測できることを保証しなければならない。GMM 由來の食品の評価の一環として対応する特定の安全性問題として以下のものがある：

- 遺伝子組換えに用いた技術
- 菌株の特定及び特徴付け（レシピエント、供与体、得られた GMM）
- 適用の歴史
- 抗生物質耐性及び遺伝子導入の可能性
- 遺伝子の安定性
- 挿入遺伝子の発現、あるいは宿主 DNA または代謝経路の崩壊により考えられる二次的影響

- 病原性及び毒素産生能
- 新規 DNA の予測される蛋白発現産物の特徴付け及び検証
- 食品マトリックスの GMM に対する影響
- 摂取及び食事の影響の潜在的レベルを含む、ヒトの食品又は GMM 自体への直接または間接曝露
- 最終用途
- 免疫系への影響（アレルゲン性）
- GMM、消化管腸内細菌叢、及び哺乳動物宿主の間の相互作用
- 加工、調理、及び保存の影響

利用可能な情報が徹底したアセスメントに対して不十分である場合、動物食餌試験を含む毒性スクリーニングを用いてもよい。また、生存可能な GMM を含む食品に対する評価は、生存不可能な GMM を含む食品又は GMM 由来の精製された製品よりも厳格なものとなる。たとえば、プロバイオティックスとしての用途が意図される GMM の安全性を支持するために必要とされるデータは、食品生産に使用され、最終食品中に微量存在する GMM 由来酵素に対して要求されるデータとは異なるものと思われる。

欧洲国際生命科学協会 (Institute for International Life Sciences : ILSI) は 1999 年に食品中で使用される生存可能な GMM の安全性評価に関するガイドラインを発行し、FAO/WHO は 2002 年に食品中のプロバイオティックスの評価に関するガイドラインを発行した。いずれにおいても生きている微生物を含有する食品の評価において問題として取り上げなければならない特有の科学的問題点、たとえば、遺伝子導入、微生物の定着性、病原性などが検討されている。FAO/WHO ガイドラインではプロバイオティックスとしての GMO を論じていないが、その安全性に関する考慮事項は、微生物全般に関連するものである。FAO/WHO による定義では、プロバイオティックとは、適切な量を投与した場合に健康便益を宿主にもたらす、生きている微生物である。菌株及びその作用機序 (mechanism of effect) に関する知見を得るため、可能性のあるプロバイオティックスをスクリーニングするための *in vitro* 試験が必要とされる。検討すべき特性として、胃酸耐性、胆汁酸耐性、粘液及び／又はヒト上皮細胞及び細胞系への付着性、潜在的病原性細菌に対する抗菌力、表面への病原菌付着を抑制する能力、及び胆汁酸塩加水分解酵素活性がある。すべての *in vitro* での結果について、*in vivo* での成績による妥当性の検証を必要とし、ヒトでの用途におけるプロバイオティックスには、ヒト試験による有効性の裏づけを必要とする。宿主における有害な影響を防止するために、プロバイオティックスについて以下のデータによる特徴付けを必要とする。

- 1) 抗生物質耐性パターンの決定
- 2) 特定の代謝活性の評価（例、D-乳酸産生、胆汁酸塩の脱抱合など）
- 3) ヒト試験における副作用の評価
- 4) 消費者における有害な事例に関する疫学調査（市販後）
- 5) 評価対象の菌株が哺乳動物毒素を産生することが確認されている種に属する場合、毒素産生について検査しなければならない。
- 6) 評価対象の菌株が溶血性であることが確認されている種に属する場合、その溶血作用を評価しなければならない。
- 7) 免疫力が低下した動物における非感染性の評価

哺乳動物宿主の胃腸管におけるGMMの存続が安全性評価における重要な考慮事項となる。菌株の特徴付けや病原性など、詳細な安全性評価において収集された情報はヒトの健康に対するリスクを明らかにするのに有用であるが、このような可能性のある相互作用をより詳細に検討するために臨床試験およびシミュレートしたヒト胃腸系を用いる試験が必要とされる場合もある。

2.0 米国における規制

FDAは、米国において連邦食品・医薬品・化粧品法（FFDCA）のもとに、GM食品を含むあらゆる食品及び食品成分（たとえば、原材料、添加物、不純物など）の安全性及び健全性を保証する責務を負う。FDAには、公衆衛生に対する潜在的リスクをもたらすか、又は必要とされるすべての規制当局の承認を受けずに販売されているいかななる製品も市場から直ちに排除する権限がある。したがって食品業界には、消費者が入手できる物品および食品が安全であり、FFDCAのあらゆる法的要件に適合していることを保証する法的義務が課せられている。

食品の安全性を保証するために、FDAはFFDCAの*Adulteration Provisions* [異物混入条項] (Section 402; 21 U.S.C. §342) 及び*Food Additive Provisions* [食品添加物条項] (Section 409; 21 U.S.C. §321) の2つの条項に依拠する。異物混入条項によって消費者は、ヒトの健康に有毒な又は有害と考えられる物質による食品及び食品成分の意図的な、または過失による異物混入から保護される。ある食品及び食品成分を消費することによってヒトの健康に対して有害な影響が及ぶおそれがあるという合理的な確信がある場合、安全性基準は、その食品及び食品成分に異物が混入していると判断されるという事実として明示される。食品添加物条項は、事前に実施した科学的試験又は従来からの使用経験に基づいて一般に安全と認められる（GRAS）ものではない、あるいは他の点から特例として認められない（殺虫剤、食用着色料など）、直接又は製造の結果として食品に添加される物質に関するものである。

バイオテクノロジー製品に関するFDA、米国農務省（USDA）、米国環境保護庁（EPA）の規制上の責務を規定した「Coordinated Framework for Regulation Biotechnology」[バイオテクノロジーの規制に関する調整された枠組み]」が米国科学技術政策局（OSTP）により1986年に発行され、この枠組みにおける勧告に従ってFDAは、rDNA技術を用いて開発した食品及び食品成分、すなわちGM食品を規制するのにFFDCAの既存の条項で十分であるとの見解を示している。GM食品によって生じる科学的問題及び規制上の問題は従来品によって生じる問題と大きく異なるとの結論がFDAによって下された。したがって、GM食品および食品添加物は、FFDCAの下で他のあらゆる食品及び食品成分の規制に対する既存の安全性基準と同じ基準の対象となる。

GM 食品添加物は、食品に添加される他のあらゆる物質と同じ規制基準に準拠しなければならない。食品に添加する物質は、食品添加物として規制されるか、又は GRAS とみなされる。規制当局の見地からは、GM 食品添加物は、科学的手法に基づいてその材料が GRAS であると認定する資料が入手可能であれば、食品添加物としての規制対象から除外され、FDA に対する食品添加物申請（food additive petition to FDA）の提出を免除される。このような資料には、意図される使用条件下での安全に関する技術的根拠及び一般的な知見のうち資格を有する専門家によって認識されたものが含まれる。安全性を示す技術的根拠として、物質の特定情報、製造方法、成分及び規格に関する分析データ、食事由来の曝露量推計、動物及びヒト試験により得られたデータなどがある。GRAS 物質に対する安全性要件は概ねその歴史的消費量によって異なるが、使用（すなわち曝露）条件が変化すれば安全性を示す科学的根拠が必要となる。厳密な定義の下では、歴史的経験とは異なる量や方法での使用が意図される物質は、食品添加物の承認を取得するのに要求されるのと同じ量及び品質の科学的根拠を必要とする。

FFDCA では、食品添加物に対し、その由来とは関係なく食品に加えられるものについて市販前承認が要求される。市販前に、FDA に審査のために食品添加物申請を提出しなければならない。FDA による食品添加物申請の審査プロセスは長期にわたり、完了するまで数年を要することが多い。FDA によってその申請に望ましい審査結果が得られると、提案された連邦規則集（CFR）を改訂する規則が発行され、パブリックコメントが求められる。FDA は受領した意見を審査し、必要に応じて提案された規則を改訂した後、規定された条件下でのその食品添加物の使用を許可するために CFR を改訂した最終規則を公布する。この時点で初めて当該添加物がその使用について規制上の根拠を得ることになる。

他の従来からの応用食品と同等であるとみなされる GM 食品は、さらに FDA に届け出る必要なしに市販することができる。原材料に対して提案された使用条件下での規制上の根拠が得られていない場合、また、同様の提案された使用条件下での既存の原材料又は添加物に対する規制当局の定義に適合しない場合、及び GRAS の基準に適合しない場合にのみ、食品添加物申請の形での FDA への届出が必要となる。GRAS と判定された食品添加物については、任意の届出を提出して FDA の回答を求めることができる。しかし、GRAS 届出プロセスでは、FDA はそのデータを審査することも安全性に関する意見を示すことも行わず、その代わり、意図される使用条件下での GRAS に関する届出人の結論に対する回答を行う。1997 年に提案された GRAS 届出制度（21 CFR §170.36 で提案）（FDA、1997 年）を公布する以前は、FDA は食品添加物申請プロセスと同様の審査のための GRAS 申請を受理した。承認された物質は「GRAS 認定済み [GRAS-affirmed]」として CFR において公表された（21 CFR §184 及び 186 など）。現行の届出制度の下では、FDA は FDA のウェブサイトにおいて GRAS 届出が提出されている物質及び FDA 回答書の一覧を公表している（<http://vm.cfsan.fda.gov/~rdp/opa-gras.html#grastop>）。

GM 食品に関して FDA への必須の市販前届出要件はなく、FDA による正式な食品用物質の市販前審査は食品添加物 [food additives] と定義される物質に限られているものの、食品に添加されるあらゆる物質の安全性は、意図するレベルでの使用及びその結果としての消費者の曝露量を支持するデータによって裏付けられなければならない。米国の規制制度の下で FDA 審査を必要としない物質については、意図される使用条件を支持するために科学専門家又は権威ある科学専門機関のコンセンサスを得る必要がある。

ケースバイケースの評価において、対応する従来品と同様に安全であるとみなされる GM 食品由來の原材料はまた、従来品から由来する原材料と同等に安全であると想定される。微生物起源の GM 食品原材料については、安全性評価の追加の要素として、その微生物及びその表現型の特性の特徴付け； 潜在的病原性特性、毒素產生特性、及び栄養分吸收阻止作用； 及び、遺伝子転移の可能性、マーカー遺伝子の使用、及び抗生物質耐性などがある。食品添加物、酵素、着色剤など、GMM 由來の高度に精製された製品は、10 年以上にわたり多数の国において製造され、使用を許可されており、その多くについて安全性が FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA、1999 年) による評価が行われている。その上、食品加工に利用される微生物酵素剤の安全性評価に対するアプローチが Pariza と Johnson (2001 年) によって詳細に報告されている。

生産株ないし起源微生物の安全性が酵素の安全性を評価する際の最も重要な考慮事項である。生産株の特徴付けを行う場合には毒素產生能が重要な問題であるが、酵素剤には生存可能な微生物を含有することはほとんどないため、通常、病原性は問題となる。理想的には、GMM は、「安全な株の系列」すなわち、食品生産において安全に利用してきた歴史のある徹底的に特徴付けされた非病原性、非毒素產生株に由来するものが望ましい。そうでない場合、Pariza と Johnson (2001 年) は酵素の安全性を明らかにするために、次の 2 種の動物毒性試験のうち一方を実施することを推奨している：1) OECD ガイドラインに従い、推定されるヒトの平均曝露量の 100 倍以上の用量、すなわち 2000 mg/kg 以上の用量の被験物質の単回投与によるラットにおける急性経口毒性試験、又は、2) 推定されるヒトの平均曝露量の 100 倍以上の用量を最低用量とし、混餌投与又は強制経口投与のいずれかによるラットにおける反復経口投与毒性試験 (14~91 日間)。被験物質は、実際に試験に用いられる酵素含有物質であり、市販の酵素剤とは異なってもよいが、被験物質を生成するプロセスは、最終酵素産物に用いるプロセスを代表するものである必要がある。細菌はきわめて例外的に急性毒素を產生することがあるため、第 1 の試験は LD₅₀ の確立を意図するものではなく、細菌酵素の安全性を明らかにすることを目的とする。第 2 の試験では、経口投与により活性を示す既知の微生物毒素による毒性を検出することを目的とする。また、遺伝子工学で生成された酵素はすべて毒素產生の有無について、適切な化学的、生化学的、あるいは生物学的手法により分析する必要がある。酵素の安全性評価に用いられる方法をまとめた判断樹が Pariza と Johnson (2001 年) の著した論文に記載されている（添付資料 1）。

「実質的同等性」において用いられた概念に基づき、酵素の安全性を適切に評価するために必要とされる安全性試験は生産株及び背景に関する知見が増すに従い減少するものと思われる。これはケースバイケースで判断することになる。

GM 原材料に対する GRAS 判定を支持するために、食品添加物に対して規定されているのと同様に、データの利用可能性及び潜在的な食品安全性の問題に応じて、食品添加物に対して規定されている試験と同様の毒性試験のプログラムが必要とされる。食品添加物の安全性を確立するために必要とされる毒性試験の種類は FDA の Red Book に記載されており、以下の試験が含まれると考えられる：

- げっ歯類を用いる急性経口毒性試験
- 短期食餌試験 (28 日以上)
- げっ歯類及び非げっ歯類を用いる亜慢性食餌試験 (90 日間)
- げっ歯類を用いる癌原性及び慢性毒性に関する生涯食餌試験 (約 2 年間)
- 1 年以上にわたる非げっ歯類食餌試験

- げっ歯類多世代繁殖・食餌試験
- 催奇形性試験
- 短期発癌試験
- 代謝試験

食品添加物申請に対する FDA 要件に準拠して、GM 食品原材料に対する GRAS の判定は、化学組成及び製造工程の記録、製品規格に準拠していることを示す代表的なロットの食品グレードの規格及び分析データの提示；食品における意図する用途の定義、すなわち食品分類及び使用レベル；意図する使用条件における食事由来の曝露量推計；及び、意図する使用条件下での安全性の資料。GRAS 条項に対する「一般的な知識」の構成要素では、GRAS 物質は食品添加物と区別されている。食品添加物については、FDA 審査及び承認のための申請として提出される製品特有の試験を必要とするのに対し、GRAS 物質を支持するためのデータは、公知であり、かつ食品の成分の安全性を評価する資格を有する専門家によって示された安全性の結論を支持するものでなければならない。

3.0 EU における規制

ヒトの健康及び環境を保護するために遺伝子組換え生物（GMO）に関する EU 法が 1990 年代初期から制定されているが、最近まで、GM 食品に適用される特有の法律はなかった。GM 食品には、以前は新規食品規則 (EC) No 358/97 が適用されるたが、2004 年 4 月 18 日発効の遺伝子組換え食品及び飼料に関する規則 (EC) 1829/2003 により、1) 食品／飼料用 GMO、2) GMO を含有する又は GMO から成る食品／飼料、及び 3) GMO から生産される食品／飼料又は GMO から生産される原材料を含有する食品／飼料の販売が規制されている。この規則の下では、食品は 1) ヒトの健康、動物の健康、あるいは環境に有害な影響を及ぼしてはならない、2) 消費者の判断を誤らせてはならない、又は 3) 正常な消費においてそれが置き換えるよう意図している食品と消費者に栄養的に不利益となる程度まで異なってはならないとされている。この規則の下で、遺伝子組換え食品及び飼料の販売承認申請が数件提出された。GMO に適用される別の法として、遺伝子組換え生物の環境への意図的な放出に関する指令 2001/18/EC、及び遺伝子組換え生物のトレーサビリティ及びラベル表示ならびに遺伝子組換え生物より生産される食品及び飼料のトレーサビリティに関する規則 (EC) 1830/2003 が制定されている。

現行の承認手順では、GMO の環境への意図的な放出に対する許可（指令 2001/18/EC）及びこの GMO の食品及び／又は飼料としての使用の許可（規則 1829/2003）に対して单一の承認申請が認められている。承認申請は当該製品が最初に市販が予定される加盟国内で提出され、モニタリング計画、ラベル表示の案、及び新規 GM 食品又は飼料の検出方法を含まなければならない。販売許可は、European Food Safety Authority (EFSA) によって実施される单一の科学的リスクアセスメント及び規制委員会の手順を通じて欧州委員会及び加盟国が関与する单一のリスク管理プロセスを経ることによって行われる。この科学的リスクアセスメントでは、環境リスク評価とヒト及び動物の健康における安全性の評価の両方が対象となる。EFSA の意見は一般的に 6 カ月以内に公表され、公衆はそれに対してコメントを行う機会がある。欧州委員会は、EFSA が作成した意見に基づいて販売許可を与えるか拒絶するかの提案を準備する。販売許可は 10 年間の期間に対して付与され、European Community (EC) 全域で有効である。单一の承認申請により、特定の GMO、その GMO を含有する食品、その GMO からなる食品、その GMO から生産される食用製品、及びその GMO から生産される原材料を含有する食品に適用することができる。販売許可が付与された製品は

GM 食品及び飼料の公報に掲載される。

使用許可に関するアプローチは米国におけるそれとは異なるが、意図される使用条件における安全性の基礎をなす原則は不变である。GM 植物及び GM 由来の食品及び飼料のリスクアセスメントのためのガイダンス文書が EFSA GMO パネルによって発行された。GM 微生物を含有する、GM 微生物からなる、又は GM 微生物から生産される食品及び飼料のリスクアセスメントについても平行したガイダンス文書案が EFSA GMO パネルによって作成されているが、まだ入手することはできない。このプロセスをさらに進めるため、EFSA は 2004 年 12 月に微生物の安全性評価に対して調和したアプローチを考慮するための科学専門家会議を主催しており、「On a Generic Approach to the Safety Assessment of Microorganisms Used in Food/Feed Production (食品／飼料の生産に使用される微生物の安全性評価に対する一般的なアプローチについて)」と題する報告書にその概要が示されている。「Qualified Presumption of Safety (QPS)」(安全であるとの推定の認定)と呼ばれる提案された制度は、米国において用いられている GRAS の定義と目的及び概念を同じくするものである。提案された QPS 制度により、微生物及びその製品の一般的な安全性が合理的な根拠に基づいて「推定され」、特定の制限を適用する「資格をもつ」ことが可能になる。この制度の目標は、現行の安全基準を損なうことなく、微生物に対する承認手順を改善し、明確にすることにある。可能な場合、すでに QPS に適格であると認められている生物に対する新規の用途又は製造方法に関する届出手順を含めて、完全にケースバイケースによる評価に代わり、より一般的なアプローチが利用されるようになる。最低限必要とされるデータには、その生物の分類上の特徴付け、遺伝子組換えの種類、使用歴、分類ユニットの生物学的特性、抗生物質耐性、毒素産生能、病原性、より広い環境に対する影響、及び最終用途に関するデータがある。これらのデータは米国において重要であると考えられているものと一貫している。微生物が QPS に適格であると認められるための適格性を判定するための安全性評価手順を図式化したものが前述の報告書に記載されている（添付資料 2）。

規則 (EC) 1830/2003 を導入し、GMM を含有する、GMM からなる、又は GMM から生産される食品に対するガイダンス文書を作成することにより、EU は GMO 及びその可能性のある用途に対する承認取得のための簡素化された一貫した手順を確立するために作業を進めている。

4.0 要 約

EU と米国では具体的な承認許可手順は異なるものの、食品における遺伝子組換え微生物の安全性評価において検討される評価項目にはほとんど差がない。一般的アプローチとして、GMM の組成、栄養の質、及び毒素産生能ならびに病原性、及び該当する場合、その GMM と対応する従来品すなわち遺伝子の組換えが行われていない微生物との比較によって導かれるケースバイケースの評価が行われる。相違点に安全性評価の焦点があてられ、必要とされる安全性試験の範囲が決定される。食品における使用を目的とする GMM の安全性評価では、遺伝子組換えの詳細にわたる特徴付けを行い、意図された作用及び意図されなかつた（多面発現の）作用を検討し、新規の、あるいは変化した危害を特定し、ヒトの健康に関連のある主要な栄養素の変化を特定する。

米国では、多数の微生物酵素剤がその使用について GRAS と判定され、FDA に届出が行われている。ごく一部の例を以下に示す：

- *Fusarium venenatum* からホスホリパーゼ A1 をコードする遺伝子を発現する *Aspergillus oryzae* を用いて得られたホスホリパーゼ酵素剤（2003 年）

- *Myceliophthora thermophila* からラッカーゼをコードする遺伝子を発現する *Aspergillus oryzae* を用いて得られたラッカーゼ酵素剤（2003年）
- *Aspergillus niger* からグルコースオキシダーゼをコードする遺伝子を有する *Aspergillus oryzae* を用いて得られたグルコースオキシダーゼ酵素剤（2002年）
- *Fusarium oxysporum* からリパーゼをコードする遺伝子を有する *Aspergillus oryzae* に由来するリパーゼ（2001年）
- *Thermomyces lanuginosus* からキシラナーゼをコードする遺伝子を発現する *Fusarium venenatum* に由来するキシラナーゼ（2000年）

表1に記載したものを含めて、EUにおいても遺伝子組換え微生物に由来する多くの酵素が市販されている。

表1. 市販の遺伝子組換え微生物由來の食品用微生物酵素の例

酵素活性	生産生物	「供与体」生物	応用食品
α-アミラーゼ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 又は <i>subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Thermoactinomyces</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	製パン、飲料、澱粉 製パン 飲料、澱粉、糖類
カタラーゼ	<i>Aspergillus niger</i> .	<i>Aspergillus</i> sp.	卵製品
β-グルカナーゼ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 又は <i>subtilis</i> <i>Trichoderma reesei</i> 又は <i>longibrachiatum</i>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Trichoderma</i> sp.	飲料 澱粉
グルコースイソメラーゼ	<i>Streptomyces lividans</i> <i>Streptomyces rubiginosus</i>	<i>Actinoplanes</i> sp. <i>Streptomyces</i> sp.	澱粉 澱粉
リパーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Candida</i> sp. <i>Rhizomucor</i> sp. <i>Thermomyces</i> sp.	脂肪 チーズ、脂肪、着香剤 製パン、脂肪
マルトース生成アミラーゼ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 又は <i>subtilis</i>	<i>Bacillus</i> sp.	製パン、澱粉
プロテアーゼ	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> 又は <i>subtilis</i>	<i>Rhizomucor</i> <i>Bacillus</i> sp.	チーズ 製パン、飲料、チーズ
プルラナーゼ	<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella planticola</i>	<i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	澱粉 飲料、澱粉 飲料、澱粉
キシラナーゼ	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Trichoderma</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp. <i>Thermomyces</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	飲料、澱粉 製パン、飲料 澱粉 製パン 製パン、飲料、澱粉

欧洲 ILSI (2001年) の一部を複製

5.0 参考文献

Codex Alimentarius Commission. 2003. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms.

European Commission. 2003. On a generic approach to the safety assessment of microorganisms used in feed/food and feed/food production.

- FDA. 1997. Substances Generally Recognized as Safe; Proposed rule - 21 CFR Parts 170, 184, 186 and 570. Fed Regist (US) 62(74): 18937-18964.
- FDA. 2001. Premarket notice concerning bioengineered foods. Proposed rule. Fed Regist (US) 66(12): 4706-4738.
- IFBC. 1990. Biotechnologies and Food: Assuring the Safety of Foods Produced by Genetic Modification. Regul Toxicol Pharmacol 12(3), Part 2.
- ILSI Europe. 1999. Safety Assessment of Viable Genetically Modified Micro-Organisms Used in Food. International Life Sciences Institute, Belgium.
- ILSI Europe. 2001. Genetic Modification Technology and Food: Consumer Health and Safety. International Life Sciences Institute, Belgium.
- Official Journal of the European Union. 2003. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. Vol. L 268; pp. 1-23.
- OSTP. 1986. Coordinated framework for the regulation of biotechnology; Announcement of policy; Notice for public comment. US Fed Reg 51(123): 23302-23350.
- Pariza, M.W.; Johnson, E.A. 2001. Evaluating the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: update for a new century. Regul Toxicol Pharmacol 33(2): 173-186.
- WHO and FAO. 2001. Safety assessment of foods derived from genetically modified microorganisms. Geneva, Switzerland.
- WHO and FAO. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada.

資料 3－2

(GMO 生物と腸内細菌叢の相互作用)

GMO 生物と腸内細菌叢の相互作用に関して CANTOX では以下のように回答いたします。

欧州委員会 (the Committee) によって何らかの形のガイダンス文書にまとめる作業が進められているとすれば、場合によっては特定の試験に対する必要性を強調することがあるものの、ガイダンス文書は一般的なものであるべきと考えられる。生存可能な遺伝子組換え微生物が食品中に存在することは、ある種の GI 関連試験などの追加的な安全性の考慮が必要と考えられる状況であるといえる。しかし、このような考慮事項は、食品生産工程における酵素源として、あるいは発酵生物として使用されるような遺伝子組換え微生物の安全性評価にはあてはまらない。このような場合には遺伝子組換え生物は生存することができず、安全性評価では微生物産物が対象となる。現在までのところ CANTOX では、(直接添加物として) 食品中に存在する、あるいは U.S. GRAS 承認プロセスや EU Novel Food (新規食品) 審査などを完了して認定を受けた生存可能な遺伝子組換え微生物を確認していない。

以上をまとめると、遺伝子組換え微生物の腸内細菌叢に及ぼす影響を検討するのに必要な試験に関して明確なガイダンス (たとえば、FDA、EU、FAO/WHO) はない。このため、プロバイオティックスおよび生存可能な微生物の消費の安全性に関連があると思われる独自データあるいは追加データの種類に関する具体的な考察を当社の報告書に記載した。おそらく、腸内の生存可能性、付着特性、抗生物質耐性、プラスミド導入、酵素プロファイル、代謝産物、感染特性などのプロバイオティックスに対する有効性の要素なしに、消費された遺伝子組換え微生物についても同様に考慮することができるのではないかと思われる。必要と思われる試験の種類はケースバイケースで異なり、遺伝子組換え微生物の遺伝子組換えを行っていない生物と比較した特性、すなわち遺伝子組換えにより微生物の生理学的特性がどのように変化したかによって異なる。安全性の主要な決定因子が、毒素産生性でなくかつ病原性でない特性を示す生物であるという点に変わりはない。

欧州委員会に考慮すべき具体例があれば、おそらく特定の試験に関するガイダンスを示すことは可能であると思われる。文献には GI 相互作用試験が報告されていると思われ、おそらく TNO 社には何らかのモデルがあると思われる。また、委員会が現在も Mike Pariza との協議を行う予定であれば、特定の試験のトピックについて討議する価値があると思われる。

以上の説明によって問題点が明確になり、ご質問に対する十分な回答となれば幸いに存じます。

調査報告 4. 国内外の学会、企業等における活動調査

調査の概要

1 実施期間

平成 16 (2004) 年 9 月～平成 17 (2005) 年 1 月

2 データベース

IPDL : Industrial Property Digital Library * を使用。

* 特許電子図書館：独立行政法人工業所有権情報・研修館

3 日本特許の種別

- ① [特許公報]
- ② [公開特許公報]
- ③ [公表特許公報]

4 キーワード

調査テーマ「①遺伝子組換え②微生物」及び「③ヒト腸内細菌叢への影響」の①、
②、③より「遺伝子」、「組換え」など、②③からヒトに経口投与可能な細菌として
「乳酸菌」など、また③より「腸内細菌」、「ワクチン」、「免疫」、「抗原」、「粘
膜」などをキーワードとした。

5 ヒット件数

特許の【発明の名称】を対象としたキーワード検索によるヒット件数を以下に示す。

「組換え」(384/1215)は、キーワード「組換え」で検索した場合、特許公報中のヒ

ットは 384 件、公開特許公報と公表特許公報中のヒットは 1215 件であることを示す。

「組換え」 (384／1215)、「組み換え」 (94／229)、「組換」 (442／1277)、
「遺伝子」 (1126／6049)、「プラスミド」 (222／286)、「ベクター」 (276／1138)、
「微生物」 (1223／3793)、「腸内」 (52／140)、「細菌」 (338／214)、
「腸内細菌」 (6／18)、「細菌叢」 (2／5)、「乳酸菌」 (102／289)、
「ラクトバシラス」 (1／9)、「ラクトバチルス」 (10／30)、
「ラクトバチラス」 (1／5)、「乳酸桿菌」 (5／7)、「乳酸球菌」 (1／1)、
「ラクトコッカス」 (2／2)、「ビフィズス菌」 (43／66)、
「ビフィドバクテリウム」 (15／29)、「オリゴ糖」 (192／444)、
「粘膜」 (60／334)、「粘膜免疫」 (0／13)、「抗原」 (453／1432)、
「抗原提示」 (3／35)、「免疫」 (1270／3662)、「免疫刺激」 (11／53)、
「ワクチン」 (355／1226)、「経口ワクチン」 (4／13)、「粘膜ワクチン」 (0／3)

6 ヒットした特許の内容

前記のヒットした特許中、その [書誌+要約+請求の範囲] の内容が「遺伝子組換え微生物」及び「腸内細菌（叢）」に関するものは、特許公報 15 件、公開特許公報 41 件、公表特許公報 32 件の計 88 件であった。

7 「遺伝子組換え微生物のヒト腸内細菌叢に及ぼす影響に関する安全性評価手法等」に 関連する特許

このテーマに該当する内容の特許は前記 88 件の中には認められなかった。

なお、このテーマに類似性のある「遺伝子組換え微生物を生物に投与した場合、予想される障害を回避するための組換え体構成」について [要件]、[特許請求項] に記載

のある6件の特許が認められた。

8添付資料

公報別特許リスト

- 1 88件の【番号】【発明の名称】
- 2 88件の【書誌事項】【要約】【請求の範囲】
- 3 「遺伝子組換え微生物」投与後の安全性に関する記載のある特許6件

資料4-1 公報別【番号】【発明の名称】

[特許公報] 15件

〔特許番号〕 [発明の名称]

- 1 特公平6-50986 ラクトバチラス属用非接合性プラスミド
- 2 特公平7-97992 組換えプラスミドpSI878
- 3 第2524794号 複合プラスミドベクター
- 4 第2678605号 腸内菌叢改善剤
- 5 第2711258号 組換プラスミド、当該プラスミドを含有する細菌及び当該細菌を使用して、酸発酵食品、動物用飼料、同成分又は蛋白質を製造する方法
- 6 第2742962号 腸定着ラクトバシラス
- 7 第2864285号 乳酸桿菌一大腸菌用複合シャトルベクター及びそれで形質転換された宿主微生物
- 8 特許第3060399号 ラクトバチルス・デルブリュエキイ由来のプラスミド
- 9 特許第3140049号 病原性腸内細菌をコントロールするための医薬製剤
- 10 特許第3294288号 乳酸桿菌由来の新規なプラスミドpBUL1及びその誘導体
- 11 特許第3394048号 増強された抗原性腸内細菌の作出方法およびそれを含むワクチン
- 12 特許第3421119号 プラスミドベクター
- 13 特許第3421357号 乳酸桿菌由来の新規なプラスミドpSY1及びその誘導体
- 14 特許第3532226号 腸内細菌が產生するビフィズス菌増殖促進物質及びその利用
- 15 特許第3553065号 挿入プロモーター含有の組換え乳酸菌とその構築方法

[公開特許公報] 41件

〔公開番号〕 [発明の名称]

- 1 特開平5-130876 プラスミドベクター
- 2 特開平5-176776 乳酸球菌由来の新規なプラスミドpSY1及びその誘導体
- 3 特開平5-176777 ラクトバチルス属乳酸桿菌の形質転換方法及びその形質転換体
- 4 特開平6-277047 腸内細菌が増進するビフィズス菌増殖促進物質及びその利用

- 5 特開平 7-61924 腸内細菌の血中転移を抑制する輸液製剤
- 6 特開平 7-170987 ファージ耐性機構含有核酸配列およびプラスミド、それらが存在する細菌、ならびにファージ耐性機構を与える方法
- 7 特開平 7-184697 腸内細菌科細菌の検出のためのオリゴヌクレオチド
- 8 特開平 7-255481 プラスミドベクター
- 9 特開平 7-265064 腸内細菌叢改善組成物
- 10 特開平 7-303486 ラクトバチルス・デルブリュエキイ由来のプラスミド
- 11 特開平 7-308151 腸内細菌叢改善組成物を製造する装置並びにそのシステム
- 12 特開平 8-59500 腸内細菌の体内移行を阻止するペプチド混合物と、このペプチド混合物を含有する組成物
- 13 特開平 8-103275 乳酸桿菌由来の新規なプラスミド pBUL1 及びその誘導体
- 14 特開平 9-107979 少なくとも一つのファージ耐性機構をもつ核酸配列およびプラスミド、それらを含む細菌およびその使用
- 15 特開平 9-163989 少なくとも一つのファージ耐性機構をもつ核酸配列およびプラスミド、それらを含む細菌およびその使用
- 16 特開平 9-206077 プラスミド及びプラスミドベクター
- 17 特開平 10-4974 ラクトバチラス・カゼイ菌用ベクター
- 18 特開平 10-99077 病原微生物に対するワクチンとして利用しうるコリネ型細菌組み換え体
- 19 特開平 10-262670 ビフィズス菌用シャトルベクター及びビフィズス菌プラスミドの複製タンパク質遺伝子
- 20 特開平 10-313822 腸内細菌叢改善剤及びそれを含有する組成物
- 21 特開平 11-240844 肺炎球菌抗原の経口投与
- 22 特開 2000-333554 ヒト腸内細菌代謝能保有動物
- 23 特開 2001-48796 感染症予防機能及び免疫関連疾患の軽減機能を有する腸内細菌由来乳酸菌エキス及び死菌体粉末とその食品応用
- 24 特開 2001-112485 腸内細菌用プライマー及び該プライマーを用いた検出方法
- 25 特開 2001-136969 腸内細菌検出用オリゴヌクレオチド及び腸内細菌の検出方法
- 26 特開 2001-149073 腸内細菌叢の分析方法及び分析装置
- 27 特開 2001-340090 乳酸菌シャトルベクター
- 28 特開 2001-346577 ヒトラクトフェリン発現プラスミド及びこれを保有するバクテロイデス属形質転換細胞
- 29 特開 2002-253260 *Streptococcus thermophilus* の新規プラスミドとその誘導体
- 30 特開 2002-265381 消臭及び腸内細菌改善素材
- 31 特開 2002-326953 経粘膜法により吸収されるワクチン
- 32 特開 2002-338484 小麦由来蛋白質を成分とする小腸糖吸収率低下剤及び腸内細菌活性化剤
- 33 特開 2003-235565 乳酸菌用シャトルベクター
- 34 特開 2003-238416 腸内細菌改善組成物
- 35 特開 2003-334065 乳酸菌を保護するための核酸複合体
- 36 特開 2004-35532 腸内細菌バランス化剤
- 37 特開 2004-113205 温度感受性複製開始因子、及びそれを含有するプラスミド
- 38 特開 2004-141065 新規プラスミド及び当該プラスミドを含むシャトルベクター
- 39 特開 2004-161777 抗原提示の調節
- 40 特開 2004-166712 温度感受性プラスミド
- 41 特開 2004-339160 経口投与による HIV ワクチン

[公表特許公報] 32件

[公表番号] [発明の名称]

- 1 特表平 8-500739 挿入プロモーター含有の組換え乳酸菌とその構築方法
- 2 特表平 10-504468 腸内細菌検出及び計測のための培養培地及び製品
- 3 特表平 10-507347 増強された抗原性腸内細菌の作出方法及びそれを含むワクチン
- 4 特表平 10-509448 生の組換え細菌ワクチンベクターを用いる癌の特異的免疫療法
- 5 特表平 11-507532 環境に制限される生存能を有する組換え細菌システム
- 6 特表 2000-509281 RNA を添加された抗原提示細胞を用いる癌および病原体感染の治療方法
- 7 特表 2001-522221 腸内細菌におけるチトクロム P450 の発現
- 8 特表 2002-508761 BORDETELLA PERTUSSIS 線毛を含有するワクチン接種結合体および経口ワクチンにおけるキャリアとしての BORDETELLA PERTUSSIS 抗原
- 9 特表 2002-521494 胃腸内細菌抗体工場
- 10 特表 2002-528392 大腸炎処置のためのサイトカイン産生性ラクトコッカス株の使用
- 11 特表 2002-529428 抗原提示細胞に特異的標的化するための腸内細菌タンパク質 OmpA の使用
- 12 特表 2002-542182 粘膜上の可溶性ウイルス特異リガンドの半減期を増加させる方法
- 13 特表 2003-504027 ラクトバシラス・デルブリュッキイのラクトースオペロンと細菌細胞における遺伝子の転写及び／または発現のコントロールのためのその使用
- 14 特表 2003-506007 抗原送達用プラスミド維持系
- 15 特表 2003-509046 組換え微生物
- 16 特表 2003-509469 経口用組換え乳酸桿菌ワクチン
- 17 特表 2003-514512 オリゴ糖レセプター模倣物を発現する組換え微生物
- 18 特表 2003-516119 乳酸菌中の分泌シグナルを分離する方法及びラクトコッス・タクティスから分離された新規な分泌シグナル
- 19 特表 2003-522731 泌尿生殖器感染に対する処置および防止のための乳酸菌の経口投与方法
- 20 特表 2003-525230 尿生殖器または肛門直腸粘膜ワクチンデリバリーシステム
- 21 特表 2003-531569 腸内細菌科の確認および分化用テスト媒体
- 22 特表 2003-533489 粘膜感染症の処置のための組成物および方法
- 23 特表 2003-534284 免疫刺激ペプチドでのラクトバシルスカゼイの使用
- 24 特表 2003-535824 抗原提示細胞におけるエピトープ同調
- 25 特表 2003-535903 プロバイオティックを用いた、粘膜表面での細菌またはウイルス感染の免疫療法または治療、およびそのための組成物
- 26 特表 2004-502653 カンジダ症の治療のための組成物および方法
- 27 特表 2004-510745 細菌におけるプラスミド遺伝の安定化
- 28 特表 2004-519236 ビフィドバクテリウム由来の新規なプラスミド、これを用いた組み換え発現ベクターおよび形質転換方法
- 29 特表 2004-524817 薬剤耐性マーカーを含有しない遺伝子組み換え細胞とその作製方法
- 30 特表 2004-532631 遺伝子組換え生物の核酸中の情報をコードする方法
- 31 特表 2004-538003 マーカーを含まない変異型標的生物の調製及びそのために好適なプラスミドベクター
- 32 特表 2005-501878 経口ワクチン

資料4-2 公報別 [書誌事項] [要約] [発明の名称]

[特許公報] 15件

- ① [発明の名称]
- ② [公告番号]
- ③ [公告日]
- ④ [特許権者]
- ⑤ [発明者]
- ⑥ [特許請求の範囲]

1①ラクトバチルス属用非接合プラスミド

②特公平6-50986

③平成6年(1994)7月6日

④株式会社ヤクルト本社

⑤岩田 雅之、木脇 真裕美、馬田 三夫

⑥ [請求項1] ストレプトコッカス・フェカリス (*Streptococcus faecalis*) の非接合性プラスミド pAM β 1 より派生し、ストレプトコッカス・ラクチス (*S.lactis*) を経て、ラクトバチラス (*Lactobacillus*) に導入されたプラスミドであり、該プラスミドは、ラクトバチラス・カゼイで複製可能で、エリスロマイシン耐性遺伝子領域をもち、該 pAM β 1 よりも小さい 11.1Kb の分子量と、下記の制限酵素認識部位の配列とを備えた pLY201 であることを特徴とするラクトバチルス属用非接合性プラスミド。

⑦ [請求項2] 略

2①組換えプラスミド pSI878

②特公平7-97992

③平成7年(1995)10月25日

④雪印乳業株式会社

⑤石井 哲、橋場 炎

⑥ [請求項1] 大腸菌のプラスミド pBR329 を制限酵素 Ava I および Cla I で切断することによってアンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子および複製領域を含む約 2,800 塩基対の DNA 断片と、ストレプトコッカス・フェカリス DS5 のプラスミド pAM β 1 を含む約 8,000 塩基対の DNA 断片と T4DNA リガーゼで連結した約 10,800 塩基対のプラスミドであって、クロラムフェニコール耐性遺伝子内に制限酵素 Bal I および Nco I の切断部位を、アンピシリン耐性遺伝子内に制限酵素 Pst I の切断部位をそれぞれ一箇所ずつ保有し、大腸菌、枯草菌および乳酸菌で増殖可能な下記の制限酵素地図で表される組換えプラスミド pSI878。

3①複合プラスミドベクター

②第 2524794 号

③平成8年(1996)8月14日

④株式会社ヤクルト本社

⑤石和 浩美、曾根 春恵

⑥ [請求項1] (a)ストレプトコッカス・フェカリス (*Streptococcus faecalis*) のプラスミド pAM α 1 由来のテトラサイクリン耐性遺伝子領域およびその複製開始領域と、(b)大腸菌 (*Escherichia coli*) のプラスミドベクター pACYC177 由来のアンピシリン耐性遺伝子領域およびその複製開始領域と、(c)枯草菌 recE 株でプラスミドを安定に保持する Sop- α 1 領域と、さらに、(d)両端にそれぞれ HindIII と Eco47III の認識切断部位を有するポリリンカーとから構成され、約 3.2Md の分子量を有し、HindIII 部位より 41b の I に -TCCGGA - 塩基配列構造を有し、かつ HindIII 部位から 2.36Kb の位置に、-CCTATG - 塩基配列構造を有し、下記制限酵素切断地図 (I) で特徴づけられる複合プラスミドベクター (pHY320PLK)。

⑦ [請求項2] 略

- 4①腸内細菌叢改善剤
②第 2678605 号
③平成 9 年（1997）11 月 17 日
④日本食品化工株式会社
⑤竹内政保、菅原正義
⑥ [特許請求の範囲] 1. マルトトリオース、マルトテトラオース、マルトペンタオース、マルトヘキサオース、マルトヘptaオースから選ばれる一種または二種以上の混合物を主成分として含有することを特徴とする腸内細菌叢改善剤。
⑦2. 略
- 5①組換えプラスミド当該プラスミドを含有する細菌及び当該細菌を使用して、発酵食品、動物用、動物用飼料、同成分又は蛋白質を製造する方法
②第 2711258 号
③平成 10 年（1998）2 月 10 日
④ユニリーバー ナームローゼ ベンノートシャープ（オランダ国）
⑤コック ヤン、マート ヤン、バン デル ボオセン、ヨセフス マウリティウス ベルナルドウス マリア、ベネマ ゲラルド
⑥1. 枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 及び大腸菌 (*Escherichia coli*) 及び乳酸菌の菌体内で作製可能な組換えプラスミドにして、当該組換えプラスミドが、乳酸菌内に存在するプラスミドから構築されたもので、かつ上記 3 種類の菌内で発現可能な少なくとも 1 つのマーカー、ストレプトコッカス・クレモリス (*Streptococcus cremoris*) のプラスミド pWV01 の一部分でストレプトコッカス・クレモリス内での発現のための複数 Ori 領域を含んだ部分、及びその発現により宿主菌体に改良された性質又は新規な性質を付与するような少なくとも 1 つの挿入 DNA 断片を含んでいることを特徴とする組換えプラスミド。
- ⑦2. ~19. 略
- 6①腸定着ラクトバシラス
②第 2742962 号
③平成 10 年（1998）4 月 22 日
④プロビ エービー（スウェーデン国）
⑤モリン ゴーラン、アールネ シヴ、ベングマーク スティグ、ジェプソン ベングト
⑥ [請求項 1] ラクトバシラス プランタラム (*Lactobacillus plantarum*) 299 DSM 659 ラクトバシラス カセイ エスエスピー (*Lactobacillus casei* ssp. *Rhamnosus*) 271 DSM 6594、又はそれらの菌の制限エンドヌクレアーゼ分析パターン（REA-パターン）に対応する REA-パターンを有する変異体のいずれかであることを特徴とする、インビボでヒト腸粘膜にコロナライズ (colonize) する能力を有するラクトバシラス菌株。
⑦ [請求項 2] ~ [請求項 7] 略
- 7①乳酸桿菌一大腸菌用シャトルベクター及びそれで形質転換された宿主生物
②第 2864285 号
③平成 11 年（1999）3 月 3 日
④雪印乳業株式会社
⑤瀧口 隆一、橋場 炎、青山 顯司
⑥ [請求項 1] ラクトバチルス ヘルベティカス (*Lactobacillus helveticus*) のプラスミド pLJ1 由来の複製開始領域 (ori)、大腸菌 (*Escherichia coli*) のプラスミド pBR329 由来の複製開始領域 (ori)、エンテロコッカス フェカリス (*Enterococcus faecalis*) のプラスミド pAM β 1 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターから開始 コドン ATG、さらにこれに続く新設した制限酵素切断部位、停止コドンまでを含む領域及びラク

トバチルス ブルガリカス (*Lactobacillus bulgaricus*) 由来の β -ガラクトシダーゼ遺伝子を含み、かつ該エリスロマイシン耐性遺伝子のプロモーターから開始コドン ATG、さらにこれに続く新設した制限酵素切断部位、停止コドンまでを含む領域の下流に該 β -ガラクトシダーゼ遺伝子が連結されていることを特徴とする、乳酸桿菌一大腸菌用シャトルベクター。

⑦ [請求項 2] ~ [請求項 5] 略

8①ラクトバチルス・デルブリュエキイ由来のプラスミド

②特許第 3090399 号

③平成 12 年 (2000.7.10)

④ソシエテ デ プロデュイ ネスレ エス.ア. (スイス)

⑤モレット ビート、プリデモア デイビッド

⑥ [請求項 1]

下記の制限地図を含むラクトバチルス・デルブリュエキイ由来のプラスミド。

⑦ [請求項 2] ~ [請求項 6] 略

9①病原性腸内細菌をコントロールするための医薬製剤

②特許第 3140049

③平成 13 年 3 月 5 日 (2001.3.5)

④グラーン エバ エリザベス、ホルム スティグ エドビン フォルケ (スエーデン国)

⑤グラーン エバ エリザベス、ホルム スティグ エドビン フォルケ

⑥ [特許請求の範囲] [請求項 1] 下痢及び他の胃腸障害を予防及び/又は治療する上でヒト及び動物において病原微生物をコントロールするための医薬製剤であって、NCIMB 受託番号 40157 の乳連鎖球菌株 L1a の形の生存微生物株をその微生物がその生存力を止める少なくとも 1 種の薬学上許容されるキャリア媒体中に含有している医薬製剤。

⑦ [請求項 2] ~ [請求項 7] 略

10①乳酸桿菌由来の新規なプラスミド pBUL1 及びその誘導体

②特許第 3294288 号

③平成 14 年 6 月 24 日 (2002.6.24)

④明治乳業株式会社

⑤伊藤 喜之、佐々木 泰子、佐々木 隆

⑥ [請求項 1] 下記の性質を有し、下図 1 に示す制限酵素地図を有する環状二本鎖 DNA

プラスミド pBUL1。(a)約 8.0Kb の長さを持つ。(b)BamHI、EcoRI、KpnI 及び SalI

認識部位を有しない。(c)下図 1 に示す SacI 認識部位から時計回りに約 1.1kbp 離れ

NdeI 認識部位から反時計回りに約 0.45kbp 離れた部位と Eco47III 認識部位との間の約 4kbp の

領域に複製領域を含んでいる。(d)下図 1 の太線部分の 1344bp の SmaI 断片の塩基配列が配列番

号で表される。(e)ラクトバチルス・デルブリュッキー・サブスピーシーズ・ブルガリクス

(*Lactobacillus delbrueckii* subsp.*bulgaricus*) M-878 株由来である。

⑦ [請求項 2] ~ [請求項 10] 略

11①増強された抗原性腸内細菌の作出方法およびそれを含むワクチン

②特許第 3394047 号

③平成 15 年 4 月 7 日 (2003.4.7)

④アンテックス バイオロジックス インコーポレーテッド (アメリカ合衆国)

⑤ペイス ジョン エル、ウォーカー リチャード アイ、フレイ スティーヴン エム

⑥ [特許請求の範囲] [請求項 1] カンピロバクター種 (*Campylobacter* sp.)、バクテロ

イデス種 (*Bacteroides* sp.)、クレブシェラ種 (*Klebsiella* sp.)、ガストロスピリラ

ム種 (*Gastrospirillum* sp.)、エンテロバクター種 (*Enterobacter* sp.)、サルモネラ

種 (*Salmonella* sp.)、アエロモナス種 (*Aeromonas* sp.)、ビブリオ種 (*Vibrio* sp.)、

クロストリジウム種 (*Clostridium* sp.)、エンテロコッカス種 (*Enterococcus* sp.)

および腸出血性エシャレキア・コリ (enterohemorrhagic Escherichia coli) よりなる群から選ばれる、増強された抗原特性を有する腸内細菌の作出方法であって、腸内細菌の培養物を *in vivo* で、a) 約 0.05%～約 3% の胆汁、または約 0.025%～約 0.6% の 1 種以上の胆汁酸もしくはその塩；b) 約 30°C と約 42°C の間の温度；c) 空気中または微好気性条件下、ここで微好気性条件は i) 約 5%～約 20% の CO₂ と約 80%～約 95% の空気、ii) 約 5%～約 20% の CO₂ と約 80%～約 95% の N₂、または iii) 約 5%～約 10% の O₂ と約 10%～約 20% の CO₂ と約 70%～約 85% の N₂ からなる；および d) 0～約 100 μM の BAPTA/AM、0～約 10 mM の EGTA、および 0 より約 100 μM の EGTA/AM よりなる群から選ばれる 2 倍カチオンキレート剤；を含む条件の組合せのもとで、該培養物が早期対数期付近、早期対数期と定常期の間、または定常期付近の成長相に至るよう十分な時間成長させることを含んでなる方法。

⑦ [請求項 2] ～ [請求項 4] 略

12①プラスミドベクター

②特許第 3421119 号

③平成 15 年 6 月 30 日 (2003.6.30)

④雪印乳業株式会社

⑤上保 健一、橋場 炎

⑥ [請求項 1] ビフィドバクテリウム・ロンガムに由来し、[化 1] に示される制限酵素認識部位を有する約 2.90kb の大きさのプラスミド pBL595。

⑦ [請求項 1] ～ [請求項 5] 略

13①乳酸球菌由来の新規なプラスミド pSY1 及びその誘導体

②特許第 3421357 号

③平成 15 年 6 月 30 日 (2003.6.30)

④明治乳業株式会社

⑤伊藤 喜之、佐々木 隆、佐々木 泰子

⑥ [請求項 1] 下記の特徴を有する環状二本鎖プラスミド pSY1：(a) 下記図 1 に示す約 2.8kbp の塩基対数、並びに唯一の EcoRI、HaeIII、ClaI、および 9 ScaI 認識部位を有する；(b) Hind III、SphI、PstI、SalI、XbaI、BhamHI、SmaI および KpnI 人薬部位を「有しない」；(c) 乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* 種を含むグラム陽性菌及び大腸菌を含むグラム陰性菌での複製領域を有する；そして(d) 表 1、表 2、表 3 で示される配列番号 1 の塩基配列を有する。

⑦ [請求項 2] ～ [請求項 17] 略

14①腸内細菌が産生するビフィズス菌増殖促進物質及びその利用

②特許第 3532226 号

③平成 16 年 5 月 31 日 (2004.5.31)

④明治乳業株式会社

⑤金子 勉、森 浩晴、岩田 恵、目黒幸子、矢島昌子、鈴木 美葉子

⑥ [特許請求の範囲] [請求項 1] バクテロイデス属菌及びエンテロバクター属菌からなる群から選ばれる腸内細菌の培養物及び／又はその処理物を有効成分としてなることを特徴とするビフィズス菌増殖促進物質。

⑦ [請求項 2] ～ [請求項 3] 略

15①挿入プロモーター含有の組換え乳酸菌とその構築方法

②特許第 3553065 号

③平成 16 年 8 月 11 日 (2004.8.11)

④バイオテクノロジスク インスティテュート (デンマーク)、シーエイチアル ハンセン エイ／エス (デンマーク)

⑤イスラエルセン ハンス、ハンセン エゴン ベク、ヨハンセン エリック、マドセン ショレン ミカエル、ニルソン ダン、ブラング アストリド

⑥ [請求項 1] 所望の遺伝子産物をコードする遺伝子を含み、pH、生育温度又は NaCl 含量を含む増殖培地組成、およびアデニン、ヒポキサンチン、グアノシン及びその混合物からなる群から選択されるプリンヌクレオチド前駆体の存在又は欠如から選択される因子によって調節可能で、乳酸菌から単離されるプロモーターを、所望の遺伝子産物をコードする遺伝子に作動的に結合するよう細菌に挿入して構築され、挿入されるプロモーターが、P139-170 と命名された PFC-1-クローン (DSM7360) に含まれるプロモーター、pAK80 : SB に含まれるプロモーター (DSM8495)、pAK80 : 143 に含まれるプロモーター (DSM8497)、pAK80 : 162 に含まれるプロモーター (DSM8498)、pAK80 : 170 に含まれるプロモーター (DSM8500)、pLN71 に含まれるプロモーター (DSM8859)、組込み体 SB に含まれるプロモーター (DSM8834)、組込み体 P139-86 に含まれるプロモーター (DSM8835)、組込み体 P139-142 に含まれるプロモーター (DSM8836)、組込み体 P139-143 に含まれるプロモーター (DSM8837)、組込み体 P139-159 に含まれるプロモーター (DSM8838)、組込み体 P139-162 に含まれるプロモーター (DSM8839)、組込み体 P139-163 に含まれるプロモーター (DSM8840)、組込み体 P139-168 に含まれるプロモーター (DSM8841)、組込み体 P139-172 に含まれるプロモーター (DSM8842)、組込み体 P139-179 に含まれるプロモーター (DSM8843)、組込み体 P139-187 に含まれるプロモーター (DSM8844)、組込み体 p139-188 に含まれるプロモーター (DSM8845)、組込み体 p139-192 に含まれるプロモーター (DSM8846)、組込み体 P139-193 に含まれるプロモーター (DSM8847)、組込み体 P139-199 に含まれるプロモーター (DSM8848)、組込み体 P139-201 に含まれるプロモーター (DSM8849)、組込み体 P139-203 に含まれるプロモーター (DSM8850)、組込み体 P139-222 に含まれるプロモーター (DSM8851)、組込み体 P139-224 に含まれるプロモーター (DSM8852)、組込み体 P139-229 に含まれるプロモーター (DSM8853)、組込み体 P139-230 に含まれるプロモーター (DSM8854)、組込み体 P139-237 に含まれるプロモーター (DSM8855)、組込み体 P139-241 に含まれるプロモーター (DSM8856) 及び組込み体 P139-242 に含まれるプロモーター (DSM8857) からなる群から選択される、組換え乳酸菌。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 35] 略

[公開特許公報] 41 件

① [発明の名称] ② [公開番号] ③ [公開日] ④ [出願人] ⑤ [発明者] ⑥ [特許請求の範囲] ⑦ [請求項]

1①プラスミドベクター

②特開平 5-130876

③平成 5 年 (1993) 5 月 28 日

④森永乳業株式会社

⑤富田 守、福渡 康夫、工藤 力、松熊 宏幸、寺口 進、八重島 智子

⑥ [目的] 大腸菌、枯草菌等広宿主において発現し、ビフィドバクテリウム属に属する微生物、乳酸菌において発現する可能性のある新規なプラスミドベクターを提供する。

[構成] ストレプトコッカス属に属する微生物由来のプラスミドと大腸菌由来のプラスミドとを結合させた複合プラスミド、またはストレプトコッカス属に属する微生物由来のエリスロマイシン耐性遺伝子を保有する大腸菌のプラスミド、またはストレプトコッカス属に属する微生物由来のエリスロマイシン耐性遺伝子を保有する大腸菌のプラスミドと、またはストレプトコッカス属に属する微生物由来のエリスロマイシン耐性遺伝子を保有する大腸菌のプラスミドと、ビフィドバクテリウム・ロンガムに属する新規微生物由来の新規なプラスミド、とを結合させた新規なプラスミドベクター。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 3] 略

2①乳酸球菌由来の新規なプラスミド pSY1 及びその誘導体

②特開平 5-176776

③平成 5 年 (1993) 7 月 20 日

④明治乳業株式会社

⑤伊藤 喜之、佐々木 隆、佐々木 泰子

⑥ [構成] 環状二本鎖 DNA プラスミド pSY1 及びその誘導体 [効果] 本発明の環状二本鎖 DNA プラスミド pSY1 はチーズ生産菌の乳酸球菌から分離されたもので、その誘導体は食品界にはきわめて有用である。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 12] 略

3①ラクトバチルス属乳酸桿菌の形質転換方法及びその形質転換体

②特開平 5-176777

③平成 5 年 (1993) 7 月 20 日

④明治乳業株式会社

⑤佐々木 隆、佐々木 泰子、伊藤 喜之、大津 公美

⑥ [目的] 本発明は、ラクトバチルス属乳酸桿菌の形質転換方法及びその形質転換体を示すものである。[構成] その要点は、■pH を低くし、蟻酸塩を添加した培地で培養した菌体を用い、■菌体懸濁液を例えれば 45℃で 30 分の温度処理をした後、■本菌で複製可能なプラスミドとともに電気パルスをかけ (エレクトロポレーション法)、■本菌に適する培地で発現培養した後、選択培地で培養して形質転換株を取得するというものである。 [効果] 乳酸桿菌 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* は、ヨーグルトの製造等で産業上重要な乳酸菌である。しかし、多くの研究にも関わらず本菌での形質転換は成功しておらず、本発明の方法による成功が初めての例である。本方法を用いて異種の遺伝子 (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* 由来の L-乳酸脱水素酵素遺伝子) を本菌に導入し発現させることにも成功したので、本発明の有用性が証明された。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 17] 略

4①腸内細菌が産生するビフィズス菌増殖促進物質及びその利用

②特開平 6-277047

③平成 6 年 (1994) 10 月 4 日

④明治乳業株式会社

⑤金子 勉、森 浩晴、岩田 恵、目黒幸子、矢島昌子、鈴木英毅

⑥ [要約] [構成] 腸内細菌の培養物、及び／又はその処理物を有効成分とするビフィズス菌増殖促進物質。[成果] 本物質は、ビフィズス菌増殖能にすぐれているだけでなくその作用は特異的であるので、飲食品や医薬品として利用できるほか、ビフィズス菌数計測用等ビフィズス菌分析用選択培地にも利用できる。

5①ファージ耐性機構含有核酸配列およびプラスミド、それらが存在する細菌、ならびにファージ耐性機構を与える方法

②特開平 7-170987

③平成 7 年 (1995) 7 月 11 日

④サノフィ (フランス国)、エルフ アキテーヌ (フランス国)

⑤ファビアン プレボ、エリザベト レミー、ポール リツエンターラー

⑥ [目的] 新規核酸配列およびプラスミドの提供。[構成] 配列番号 1 の核酸配列を有する DNA 配列、該配列またはそのフラグメントと一諸にハイブリダイズされる DNA 配列、および対応する mRNA および cDNA 配列からなる、少なくとも 1 つのファージ耐性メカニズムを有する核酸配列、該核酸配列を含有するプラスミド、該プラスミドを

含有するファージ耐性乳酸菌、ならびに、該乳酸菌を使用して菌株に対してファージ耐性メカニズムを与える方法。【効果】得られた新規核酸配列およびプラスミドは、少なくとも1つのファージ耐性メカニズムを有していた。

⑦ [請求項1]～[請求項4] 略

6①腸内細菌の血中転移を抑制する輸液製剤

②特開平7-61924

③平成7年(1995)3月7日

④鐘淵化学工業株式会社

⑤片山雅己

⑥ [要約] [構成] D-3-ヒドロキシ酪酸及びその塩類よりなる群から選べれる少なくとも1種を含む、腸内細菌の血中への転移を抑制する輸液製剤。【効果】敗血症状態において、腸内細菌の血中への転移(Bacterial Translocation)を抑制する。

⑦ [請求項1]～[請求項6] 略

7①腸内細菌科細菌の検出のためのオリゴヌクレオチド

②特開平7-184697

③平成7年(1995)7月25日

④メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ファトング(ドイツ連邦共和国)

⑤アンドレアス ブーベルト、ヴエルナー ゲーベル、モニカ ゲツ、アルブレヒト ルートヴィヒ、ペーター シューベルト、ジックフリート ノイマン

⑥ [要約] [目的] 腸内細菌科、とくにサルモネラ属の細菌などの病原性腸内細菌科細菌の検出のための核酸プローブまたはプライマーとしての使用に適するオリゴヌクレオチドを提供する [構成] オリゴヌクレオチドはサルモリシン様DNA領域から選択され、好ましくは下記Ⅲa～Ⅲhの一つによる配列または対応する相補的配列を有する。

⑦ [請求項1]～[請求項11] 略

8①プラスミドベクター

②特開平7-255481

③平成7年(1995)10月9日

④雪印乳業株式会社

⑤上保 健一、橋場 炎

⑥ [構成] ビフィドバクテリウム・ロンガムに由来し、図1に示される制限酵素認識部位を有する約2.9kbの大きさのプラスミドpBL595。前記プラスミドpBL595と、細菌由来の複製単位と、マーカー遺伝子とから構成されるプラスミドベクター。前記プラスミドベクターは、シャトルベクターとして使用に適している。

[効果] 本発明のプラスミドは、ビフィドバクテリウム・ロンガム中の複製効率が高く、シャトルベクターを構築するために有用である。また、本発明のプラスミドベクターは、大腸菌とビフィドバクテリウム・ロンガム中のコピー数が高く、ビフィドバクテリウム・ロンガムの分子育種に有用である。

⑦ [請求項1]～[請求項5] 略

9①腸内細菌叢改善組成物

②特開平7-265064

③平成7年(1995)10月17日

④山田武敏、石原一興

⑤山田武敏、石原一興

⑥ [要約] [目的] アトピー性皮膚炎や花粉症などのアレルギー疾患の根本的治療や予防に有効かつ安全なそせいぶつを提供する。[構成] 本発明は、ストレプトコッカス属、

エンテロコッカス属、ビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属、クロストリジウム属に属する細菌の生菌体又はこれらの細菌を可食性培地で培養した可食性培養物を含む組成物からなる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 13] 略

10①ラクトバチルス・デルブリュエキイ由来のプラスミド

②特開平 7-303486

③平成 7 年 (1995) 11 月 21 日

④ソシエテ デ プロデュイ ネスレ エス アー (スイス)

⑤モレット ビート、プリデモア デイビッド

⑥ [構成] 少なくとも図 1 の制限地図又はその部分を含むラクトバチルス・デルブリュエキイ由来のプラスミド、並びに、前記のプラスミド、大腸菌及び/又はラクトコッカス・ラクチス内での複製が可能な少なくとも 1 つの DNA 配列、そして少なくとも 1 つのマーカーを含む組み換えベクターに関する。[効果] 本発明のラクトバチルス・デルブリュエキイ由来の新しいプラスミドは、特定の微生物、特にラクトバチルス・ブルガリカスの形質を転換するのに利用でき、また、本発明の上記のプラスミドを含む組み換えベクターは、大腸菌とラクトコッカス・ラクチスの中での複製が可能で、特定の微生物、特にラクトバチルス・ブルガリカスを形質転換できる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 6] 略

11①腸内細菌叢改善組成物を製造する装置並びにそのシステム

②特開平 7-308151

③平成 7 年 (1995) 11 月 28 日

④株式会社和同ドクターズグループ

⑤山田武敏

⑥ [要約] [目的] 容器本体の栄養性培地と微生物との混合物を均一に加熱できる発酵製品の製造装置を得る。[構成] 外容器 12 と、外容器にある程度の間隙を持って内設する内容器 14 とかなる容器本体 10 と、外容器の内壁と内容器の外壁との間、及び外容器の底面と内容器の底面との間に配設されたニクロム線ヒータ 40 と、容器本体に接続されたタイマー回路 56 とを備えて構成される。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 16] 略

12①腸内細菌の体内移行を阻止するペプチド混合物と、このペプチド混合物を含有する組成物

②特開平 8-59500

③平成 8 年 (1996) 3 月 5 日

④森永乳業株式会社

⑤島村誠一、福渡康夫、寺口 進、新 光一郎、桑田英文

⑥ [要約] [構成] ラクトフェリン加水分解物が分離され、理化学的および生物学的性質が、腸管から臓器への腸内細菌の体内移行を阻止すること、生体外で抗菌作用を有しないこと、抗原性が未分解のラクトフェリンの 1/1000 以下であること、高速液体クロマトグラフィーにより測定した平均分子量が 13,000 ダルトン以下であること、およびラクトフェリンの分解率が少なくとも 6% であるペプチド混合物と、このペプチド混合物を有効成分として含有する組成物。[効果] 腸管から臓器への腸内細菌の体内移行を阻止し、日和見感染症、嫌気性菌感染症、敗血症等の疾病を予防する効果を有し：消化機能あるいは感染抵抗力の低下した患者に対して経口的または経管的栄養組成物の成分として副作用が少ない状態で用いられ；腸内細菌に起因する感染症の治療において薬剤投与量の減少を可能となし；抗生物質、抗癌剤等の腸管に障害を及ぼす副作用を緩和する効果を有する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 2] 略

13①乳酸桿菌由来の新規なプラスミド pBUL1 及びその誘導体

②特開平 8-103275

③平成 8 年 (1996) 4 月 23 日

④明治乳業株式会社

⑤伊藤 喜之、佐々木 泰子、佐々木 隆

⑥ [構成] 図で示される制限酵素切断地図を有する分子量約 8.0kb のプラスミド。このプラスミドは、ラクトバチルス・デルブルュッキ・サブスピーシーズ・ブルガリカス (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) M-878 から分離された。

[効果] このプラスミドは、乳酸菌等各種微生物の育種用ベクターとして有用であり、その誘導体はシャトルベクター（乳酸菌一大腸菌）としても利用可能である。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 10] 略

14①少なくとも一つのファージ耐性機構を持つ核酸配列およびプラスミド、それらを含む細菌およびその使用

②特開平 9-107979

③平成 9 年 (1997) 4 月 28 日

④システムズ・バイオーアイナストリーズ (フランス)

⑤ファビアン プレボ、サンドリン トルー、マルレーヌ ダロイオー

⑥ [課題] 乳業などにおいて利益対象となる菌にファージ耐性機構を付与すること。

[解決手段] 菌にファージ耐性機構を付与する新規な核酸配列および該配列とハイブリッドを形成するプラスミド、このような配列またはこのようなプラスミドを含む乳酸菌 (特に、ラクトコッカス ラクチス (*Lactococcus lactis*) 類に属する乳酸球菌 (lactococci))、ならびにこのようなプラスミドを得るための菌株ラクトコッカス ラクチスの使用。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 6] 略

15①少なくとも一つのファージ耐性機構をもつ核酸配列およびプラスミド、それらを含む細菌およびその使用

②特開平 9-163989

③平成 9 年 (1997) 6 月 24 日

④システムズ バイオーアイナストリーズ (フランス)

⑤ファビアン プレボ、サンドリン トルー、マルレーヌ ダロイオー

⑥ [課題] 乳業などにおいて利益対象となる菌にファージ耐性機構を付与すること。

[解決手段] 菌にファージ耐性機構を付与する新規な核酸配列および該配列とハイブリッド形成するプラスミド、このような配列またはこのようなプラスミドを含む乳酸菌 (特に、ラクトコッカス・ラクチス (*Lactococcus lactis*) 類に属する乳酸球菌 (lactococci))、ならびにこのようなプラスミドを得るための菌株ラクトコッカス・ラクチスの使用。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 6] 略

16①プラスミド及びプラスミドベクター

②特開平 9-206077

③平成 9 年 (1997) 8 月 12 日

④カルピス食品工業株式会社

⑤山本 直之

⑥ [課題] ラクトバチルス・ヘルベティカス由来の、高コピー数を有する新規なプラスミド及びその新規なプラスミドを改変したシャトルベクターを提供する。

[解決手段] 約 11.5kb 長であるプラスミド pCP53、及びこの複製開始領域、細菌由来の複製開始

領域、及びマーカー遺伝子を含む約 4.7kb 長であるプラスミドベクター pCP53D を提供する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 3] 略

17①ラクトバチルス・カゼイ菌用ベクター

②特開平 10-4974

③平成 10 年 (1998) 1 月 13 日

④株式会社ヤクルト本社

⑤門多 真理子、木脇 真裕美、澤木 佐重子、白澤 幸生、曾根 春恵、佐古 知行

⑥ [課題] 安定性の高い形質転換体を得ることができるラクトバチラス・カゼイ菌用ベクターを得る。[解決手段] ラクトバチラス・カゼイ (*Lactobacillus casei*) YIT9018 株の溶原ファージ φFSW 由来の部位特異的組換え酵素（インテグラーゼ、int）領域及び attP 領域（宿主染色体への組込み部位）と、乳酸菌及び大腸菌で機能する薬剤耐性領域と、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来の複製開始領域と、クローニング部位とを備えたもの。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 3] 略

18①病原性微生物に対するワクチンとして利用しうるコリネ型細菌組換え体

②特開平 10-99077

③平成 10 年 (1998) 4 月 21 日

④三菱化学株式会社

⑤小林 幹、湯川 英明

⑥ [課題] ヒトを含む哺乳類を宿主とする病原性微生物に対する有効で安全なワクチンを開発する。[解決手段] 病原性微生物由来の DNA を発現することができ且つ非病原性であるコリネ型細菌組み換え体およびそれを主成分とするワクチンを提供する。病原性微生物由来の DNA は、染色体上に組み込まれていても、また、染色体外に存在してもよく、例えば、病原性微生物毒素そのもの、またはヒトを含む哺乳類に障害を与えない蛋白質をコードする。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 8] 略

19①ビフィズス菌用シャトルベクター及びビフィズス菌プラスミドの複製タンパク質遺伝子

②特開平 10-262670

③平成 10 年 (1998) 10 月 6 日

④株式会社ヤクルト本社

⑤飯野 透、森下 隆

⑥ [課題] ビフィズス菌の広範囲な種において発現可能であり、操作時の取り扱いも容易な新規なビフィズス菌用シャトルベクターを得る。[解決手段] ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*) ATCC 15689 株のプラスミド pNBb1 由来の複製必須領域と、大腸菌 (*Escherichia coli*) のプラスミド由来の抗生物質耐性遺伝子と、ビフィズス菌で機能する抗生物質耐性遺伝子とを備えたもの。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 2] 略

20①腸内細菌叢改善剤及びそれを含有する組成物

②特開平 10-313822

③平成 10 年 (1998) 12 月 2 日

④ポーラ化成工業株式会社

⑤石神政道、岡 憲明、岡田正紀、坂田完三、碓氷泰市、渡辺修治

⑥ [要約] [課題] 本発明は、腸内細菌叢を改善する手段を提供することを課題とする。

[解決手段] プリメロペロースからなる腸内細菌叢改善剤。これを食品に含有させる。

本発明によれば、腸内細菌叢を改善する手段を提供することができる。

21①肺炎球菌抗原の経口投与

②特開平 11-240844

③平成 11 年 (1999) 9 月 7 日

④ユーエイビー レサーチ ファンデーション (アメリカ合衆国)

⑤ディビィッド イー ブライス、ラリー エス マックダニエル、マサフミ ヤマモト、
ヒロシ キヨノ

⑥ [課題] 肺炎球菌タンパク質を用いた経口免疫療法を提供する。[解決手段] 死菌全肺炎球菌、肺炎球菌の溶解物、単離精製 PspA、ならびにそれらの免疫原断片の消化管内を含む経口または経口的投与により、特にコレラ毒素のようなアジュバントと共に投与したときに、転移増殖および敗血症などの全身性感染を含む肺炎球菌感染に対して宿主、すなわち動物またはヒトを防御する。宿主における肺炎球菌の転移増殖に対する防御を誘発する能力により、免疫化された個体間の保菌を防ぎ、これにより固体群全体から病気をなくすことができる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 19] 略

22①ヒト腸内細菌代謝能保有動物

②特開 2000-333554

③平成 12 年 12 月 5 日 (2000.12.5)

④株式会社ハッピーワールド

⑤長谷川秀夫

⑥ [要約] [課題] ヒト腸内細菌による配糖体代謝能と統計的に優位差を認めない代謝能を保有する動物（ヒト腸内細菌代謝能保有動物）を提供する。[解決手段] 実験動物を通常飼育環境で継代し、腸内細菌の配糖体代謝能を指標として選別される、腸内細菌による配糖体のモル変換率が、ヒトの場合のそれと比較したとき、統計的に有意差を認めない代謝能を持つ動物。[効果] 通常飼育環境で継代し、腸内細菌による配糖体代謝能を指標として選別されるヒト腸内細菌代謝能保有動物は、医学の基礎研究、医薬品の開発、治療法、予防法の開発の過程でヒトに代用される実験動物として有用である。

23①感染症予防機能の及び免疫関連疾患の軽減機能を有する腸内細菌由来乳酸菌エキス
及び死菌体粉末とその食品応用

②特開 2001-48796

③平成 13 年 2 月 20 日 (2001.2.20)

④株式会社アドバンス

⑤岡部敬一郎

⑥ [要約] [目的] 本発明は腸内病原細菌感染を予防する機能及び免疫関連疾患の症状を軽減する機能を有する腸内細菌由来乳酸菌エキス及び死菌体粉末を提供し、さらにその食品素材としての応用を提供する。[構成] ヒト腸管由来乳酸菌の腸球菌 Enterococcus faecalis AD101 菌株の大量培養して熱処理によりえられる死菌体（エキス）を含む液状体あるいはその乾燥粉末顆粒体からなる可食性食品素材。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 4] 略

24①腸内細菌用プライマー及び該プライマーを用いた検出方法

②特開 2001-112485

③平成 13 年 4 月 24 日 (2001.4.24)

④財団法人ヤカルト・ハイオサイエンス研究財団

⑤伊藤 喜久治、菊池栄作、松木隆広、宮本 有希子

⑥ [要約] [解決手段] 特定の 47 の配列から選ばれる塩基配列又は該塩基配列に相補的な配列を有する腸内細菌用プライマー又はプローブ、並びにこのプライマーを使用す

る腸内細菌の検出方法。[効果] 菌の培養が不便で、迅速、簡便に腸内細菌の同定・検出を行うことができる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 4] 略

25①腸内細菌検出用オリゴヌクレオチド及び腸内細菌の検出方法

②特開 2001-136969

③平成 13 年 5 月 22 日 (2001.5.22)

④財団法人テクノポリス函館技術振興協会

⑤大坪雅史

⑥ [要約] [課題] 腸内細菌の検出を正確かつ簡易、迅速に行うこと。[解決手段] 配列番号 1 乃至配列番号 3 で表される塩基配列を有する DNA 又は RNA の核酸、又は配列番号 4 乃至配列番号 6 で表される塩基配列を有する DNA 又は RNA の核酸とする。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 13] 略

26①腸内細菌叢の分析方法及び分析装置

②特開 2001-149073

③平成 13 年 6 月 5 日 (2001.6.5)

④三洋電機株式会社

⑤井上高一

⑥ [要約] [課題] 腸内細菌の核酸に基づいて、腸内細菌叢を分析する。[解決手段] 本発明の腸内細菌叢を分析する方法は、被験者から試料を採取して (S01)、細菌を抽出して細菌懸濁液を調製する (S02)。細菌懸濁液から細菌 DNA を抽出して DNA 抽出液を調製する (S03)。この DNA 抽出液を用い、例えば、16SrDNA などの特定の領域を增幅する (S04)。増幅された増幅断片を電気泳動により分画して分画パターンを得る (S05)。この分画パターンを予め測定された腸内細菌の増幅断片の泳動パターンを予め測定された腸内細菌の増幅断片の泳動パターン (S06) と対比して、被験者の腸内細菌叢を分析する (S07)。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 16] 略

27①乳酸菌シャトルベクター

②特開 2001-340090

③平成 13 年 12 月 11 日 (2001.12.11)

④アナーダバイオテック コーポレイション リミテッド (台湾)

⑤羅 いゆ、羅 敏青、廖 瑰如

⑥ [課題] 抗生物質耐性遺伝子を含まないベクターを提供し、生物中の異種遺伝子を発現する無害の宿主細胞を DNA ワクチン又は健康食品として用いることにより、安全性及び免疫反応を高める。[解決手段] 本発明は、(a) プラスミド複製数を調節し、大腸菌複製起源配列を含む領域と、(b) 少なくとも一つの真核細胞遺伝子の転写プロモーター配列、異種遺伝子が挿入されるマルチクローニングサイト、及び転写終結配列を含む真核細胞遺伝子発現カセットと、(c)複製のプラス起点と、乳酸菌プラスミドの複製に関連するタンパク質をコードする核酸配列とを含む乳酸菌プラスミド配列と、(d)非抗生物質耐性遺伝子及びそのプロモーター配列とを含有する、乳酸菌シャトルベクターを提供する。この乳酸菌シャトルベクターは選択マーカーとしての非抗生物質耐性遺伝子を特徴とし、薬剤や食品に利用できる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 14] 略

28①ヒトラクトフェリン発現プラスミド及びこれを保有するバクテロイデス属形質転換細胞

②特開 2001-346577

③平成 13 年 12 月 18 日 (2001.12.18)

④大西克成、株式会社大塚製薬工場

⑤大西克成

⑥ [課題] [解決手段] ヒトラクトフェリン遺伝子をベクターに組み込んでなり、バクテロイデス属宿主細胞によってヒトラクトフェリンタンパク質及び／又はそのプロセッシングされたタンパク質を発現することができるプラスミド、該プラスミドを保有するプロテロイデス属形質転換細胞、該細胞を有効成分として含有する例えば飲食品形態の大腸発癌抑制組成物。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 7] 略

29① **Streptococcus thermophilus** の新規プラスミドとその誘導体

②特開 2002-253260

③平成 14 年 9 月 10 日 (2002.9.10)

④明治乳業株式会社

⑤佐々木 泰子、竹田 麻里子、佐々木 隆

⑥ [課題] *Streptococcus thermophilus* 由来の θ 型複製プラスミドを得ることを課題とする。[解決手段] 下記制限酵素地図を有するプラスミド。[化 1] 略

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 12] 略

30① 消臭及び腸内細菌改善素材

②特開 2002-265381

③平成 14 年 9 月 18 日 (2002.9.18)

④有限会社ソーシン

⑤木村祥子

⑥ [要約] 本発明は、消臭作用及び腸内細菌改善作用を有する機能性食素材を提供することを課題とする。[解決手段] *Flammulina velutipes* の培養菌糸体または子実体の熱水抽出物を有効成分とする消臭及び腸内細菌改善作用を有する素材。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 6] 略

31① 経粘膜法により吸収されるワクチン

②特開 2002-326953

③平成 14 年 11 月 15 日 (2002.11.15)

④グリソテク ソシエテ アノニム (イスラエル)

⑤ベルナルド ビツツィニ、イヴォ ヴォルバト

⑥ [要約] 医薬品用途のためのレクチンで誘導体化された多糖類被覆済み抗原から成るワクチンを提供する。[解決手段] 前記ワクチンにおいて、多糖類は好ましくは、キトサン；高度に脱アセチル化された低分子量キトサン；メチルグリコールキトサン；アルギン酸；ポリマンブロン酸；並びにそれらの塩又は誘導体から成る群から選ばれる。本発明のワクチンにおいて、抗原は、微生物；病原菌又はそれらの構成物質；ホルモン；酵素；プロ酵素；麻醉剤；生理活性ペプチド；代謝物；生理的前駆体；細胞構成物質；アレルゲンであり、また、レクチンは植物由来蛋白質である。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 32] 略

32① 小麦由来蛋白質を成分とする小腸糖吸收率低下剤及び腸内細菌活性化剤

②特開 2002-338484

③平成 14 年 11 月 27 日 (2002.11.27)

④タマ生化学株式会社、コンビ株式会社

⑤伊地知 哲生、畠 修一

⑥ [要約] [課題] 本発明は、小腸糖吸收率低下剤及び／又は腸内細菌活性化剤、特に便秘を緩和する方法に関し、具体的には、作用が緩和で下痢発生の心配のない、習慣性や副作用がない便秘改善剤を提供することである。[解決手段] 小麦由来の α -アミラーゼ阻害物質を成分として含む製剤を摂取することにより、小腸での糖吸收率低下及

び／又は腸内細菌活性化を促すことができる。

33①乳酸菌シャトルベクター

②特開 2003-235565

③平成 15 年 8 月 26 日 (2003.8.26)

④株式会社ヤクルト本社

⑤久代 明、清水 健介、木脇 真裕美

⑥ [解決手段] ラクトバチルス・カゼイ YIT0306 又は YIT0356 のプラスミド pYIT306 由来又は pYIT356 由来の複製必須領域と、大腸菌のプラスミド由来の複製必須領域と、大腸菌及び乳酸菌で機能する薬剤耐性遺伝子とを有することを特徴とする乳酸菌用シャトルベクター。[効果] 本発明のシャトルベクターを用いれば乳酸菌及び大腸菌で外来の遺伝子情報を発現させることができる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 5] 略

34①腸内細菌改善組成物

②特開 2003-238416

③平成 15 年 8 月 27 日 (2003.8.27)

④クレオ・インターナショナル株式会社

⑤浅野悠輔

⑥ [要約] [課題] 腸内細菌を改善する組成物の提供。[解決手段] アカシアガム及びオリゴ糖を含む組成物、並びにエリスリトールをさらに含む組成物。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 2] 略

35①乳酸菌を保護するための核酸複合体

②特開 2003-334065

③平成 15 年 11 月 25 日 (2003.11.25)

④日生バイオ株式会社

⑤西 則雄、ベンジャマート ジョンアヌラッケン、劉 向東、松永 政司

⑥ [課題] コストのかかる工程または材料を必要とせずに、経口摂取による効率的な腸への送達を可能とする乳酸菌生菌を含む食品の提供。[解決手段] 本発明は、核酸と 1 種以上のゲル化剤と水とを含む乳酸菌生菌を胃液から保護するための核酸複合体、乳酸菌生菌を含む液体を乳化剤と油脂とで乳化した乳化物と前記核酸複合体を含む乳酸菌生菌を保護した核酸複合体混合物、ならびに乳酸菌生菌を含む液体を乳化剤と油脂とで乳化して得られた乳化物を、核酸と 1 種以上のゲル化剤と水とを含む核酸複合体と根号することによる乳酸菌生菌を保護した核酸複合体混合物の製造方法ならびに乳酸菌を胃液から保護す方法に関する。好ましい核酸複合体は、核酸が特に生体廃棄物由來の DNA であり、ゲル化剤がゼラチンとカラギーナンを使用したものである。また、乳化剤としてレシチン及び油脂としてカカオ脂を使用したものが好ましい。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 12] 略

36①腸内細菌バランス化剤

②特開 2004-35532

③平成 16 年 2 月 5 日 (2004.2.5)

④永井正哉、小川 久美子

⑤永井正哉

⑥ [要約] [課題] 従来の整腸剤に代えて、もっと効能のよい腸内異常発酵を鎮める薬を開発したい。[解決手段] 乳酸が或いはクエン酸か或いは酢とビタミン B 群とアミノ酸を主成分としたゴリンク剤に製剤した腸内細菌バランス化剤。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 2] 略

37①温度感受性複製開始因子、及びそれを含有するプラスミド

②特開 2004-113205

③平成 16 年 4 月 15 日 (2004.4.15)

④科学技術振興事業団

⑤橋本 保

⑥ [課題] 本発明は、高コピー数プラスミドベクターの持つ低レベルの継続的な遺伝子発現、それを避ける為に低コピー数プラスミドを使うことで起こる発現ベクターの不安定化の両方を克服し、かつプロモーターのスイッチを入れる発現開始にウイルス感染ではなく従来の IPTG 添加法を使える新規なプラスミド、それを用いた遺伝子発現方法などを提供する。[解決手段] 本発明は、pSC101DNA 複製開始因子 (RepA) であって、そのアミノ酸配列の 13 番目のアミノ酸がトレオニンに変異し、かつ 56 番目のアミノ酸がバリンに変異していることを特徴とする温度感受性複製能及び温度感受性分離能を有する pSC101DNA 複製開始因子 (RepA) 変異体、それをコードするタンパク質の製造方法に関する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 25] 略

38①新規プラスミド及び当該プラスミドを含むシャトルベクター

②特開 2004-141065

③平成 16 年 5 月 20 日 (2004.5.20)

④株式会社ヤクルト本社

⑤佐藤 隆、木脇 真祐美、白沢 幸生、久代 明、辻 浩和、上原 一晃、三瓶 巍一、溝渕 潔

⑥ [課題] 発現効率、操作性、安定性、形質転換体の判別が容易な性質を有する乳酸菌用シャトルベクターの提供。[解決手段] ラクトバチルス・カゼイ由来のプラスミドであって、ラクトースオペロンをコードする遺伝子と、大腸菌のプラスミド由来の複製必須領域を含む DNA と、大腸菌と乳酸菌で機能する薬剤耐性遺伝子を含む DNA を有することを特徴とする乳酸菌用シャトルベクター。[効果] 本発明の乳酸菌用シャトルベクターは、従来のシャトルベクターと比べて宿主中での安定性が高く、また操作性にも優れることから、食品又は医薬品を製造するためのベクターとして有用である。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 5] 略

39①抗原提示の調節

②特開 2004-161777

③平成 16 年 6 月 10 日 (2004.6.10)

④アンティジェン エクスプレス インコーポレーテッド (アメリカ合衆国)

⑤ハンフリーズ ロパート イー

⑥ [課題] 抗原提示細胞による抗原提示を増強あるいは阻害するための方法を提供する。

[解決手段] 抗原提示細胞による抗原提示を増強あるいは阻害するための方法であって、抗原提示細胞を Ii の精製されたペプチドと接触させることを含む方法であって、該ペプチドは、カテプシン B ならびにカテプシン B および D の混合物からなる群から選択されたエンドプロテアーゼによる Ii の加水分解によって得られる特定のアミノ酸配列を有する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 7] 略

40①温度感受性プラスミド

②特開 2004-166712

③平成 16 年 6 月 17 日 (2004.6.17)

④アンスティテュ ナショナル ド ラ ルシェルシュ アグロノミク (フランス国)

⑤グリュス アレクサン德拉、マガン エマニュエル

⑥ [課題] グラム陽性染色性を示す細菌、特に産業上および医学上重要な乳酸菌、の遺伝子修飾に使用できるプラスミドの提供。[解決手段] 本発明によれば、グラム陽性菌

で効率的な複製起点を有した細菌ベクタープラスミドが提供される。このプラスミドは、細菌宿主株で自己を発現する少なくとも1つのマーカー遺伝子、宿主株の生存と適合しうる温度で熱感受性である効率的複製系を有し、更に複製阻害の温度が37℃以下であることで特徴付けられる。

⑦ [請求項1] ~ [請求項19] 略

41①経口投与によるHIVワクチン

②特開2004-339160

③平成16年12月2日(2004.12.2)

④株式会社ヤカルト本社

⑤忻克勤、奥田研爾、久代明、木脇真祐美

⑥ [課題] 粘膜免疫を誘導する経口性エイズワクチンを開発するに際して、安全な経口投与によるHIVワクチンを得る。具体的には、非病原性のベクターを用い、更に、投与を終えた後に不用意に腸管に住みつく膚のないベクターを用い安価な経口投与によるHIVワクチンを得る。[解決手段] 乳酸菌の菌体表層にHIV由来の蛋白質を発現させたことを特徴とするものである。特に、この乳酸菌としては、ラクトコッカス・ラクチス(*Lactococcus lactis*)であり、この菌体表層にHIVのエンベロープ蛋白質を発現させたものである。

⑦ [請求項1] ~ [請求項4] 略

[公表特許公報] 32件

① [発明の名称] ② [公表番号] ③ [公表日] ④ [出願人] ⑤ [発明者] ⑥ [特許請求の範囲] ⑦ [請求項]

1①挿入プロモーター含有の組換え乳酸菌とその構築方法

②特表平8-500739

③平成8年(1996)1月30日

④バイオテクノロジスク インスティテュート、シーエイチアール ハンセンエイ／エス(デンマーク)

⑤イスラエルセン ハンス、ハンセン エゴン ベク、ヨハンセン エリック、マドセン
ショレン ミカエル、ニルソン ダン、ブラング アストリド

⑥プロモーターープローブ遺伝子としてプロモーターレス構造遺伝子からなる転位因子を含むDNA分子を乳酸菌の集団中に導入することからなる、プロモーターからなる乳酸菌DNAフラグメントの単離方法、上記方法を用いることによる調節可能なプロモーターからなる組換え乳酸菌の構築方法、所望の遺伝子産物をコードする遺伝子とそれらに作動的に結合された、その遺伝子に天然では関連していない調節可能な乳酸菌プロモーターからなる組換え乳酸菌、そのような組換え乳酸菌の用途、および調節可能な乳酸菌プロモーターからなる組換えプラスミド。

⑦1.~73. 略

2①腸内細菌の検出及び計測のための培養培地及び製品

②特表平10-504464

③平成10年(1998)5月6日

④ミネソタマイニング アンド マニュファクチャリング カンパニー(アメリカ合衆国)

⑤マック パトリック エー、ウイックカード ペーター ディー、アダムス カール エー

⑥ [要約] 本発明は一般にサンプル中の腸内細菌の存在を決定するために用いる製品及び方法に関し、そして特にサンプル中の腸内細菌の早期検出及び計測を可能にする製品及び方法に利用できうる細菌培養培地に関する。腸内細菌の早期検査及び計測を助長するこの細菌培養培地は所定量のグルコース、pH指示薬、及び生育する細菌に関連

する有色指示薬ゾーンの培地中えの拡散を防ぐバッファーを含む。

⑦ [1.] ~ [10.] 略

3①増強された抗原性腸内細菌の作出方法およびそれを含むワクチン

②特表平 10-507347

③平成 10 年 (1998) 7 月 21 日

④マイクロカーブ インコーポレーテッド (アメリカ合衆国)

⑤ペイス ジョン エル、ウォーカー リチャード アイ、フレイ スティーヴン エム

⑥ [要約] 腸内細菌の抗原または毒力因子 (virulence factor) の発現を誘導又は増強するための、in vitro プロセスを用いる方法を開示する。本方法は該腸内細菌を含有するワクチンも開示する。特定すると、腸内細菌またはその構成成分がヘリコバクター (Helicobacter) 種により提供される。開示した本発明にとって有用な腸内細菌はほかにも存在する。一つのタイプがカンピロバクター・ジェジュニ (Campylobacter jejuni) であり、C.jejuni の表面抽出物の加水分解産物からの単糖類の高速液体クロマトグラフ イーお結果がグラフにより示される。

⑦ [1.] ~ [56.] 略

4①生の組換え細菌ワクチンベクターを用いる癌の特異的免疫療法

②特表平 10-509448

③平成 10 年 (1998) 9 月 14 日

④ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ペンシルバニア (アメリカ合衆国)

⑤パターソン イヴォンヌ

⑥腫瘍特異的抗原を発現することが可能な組換え体リストリア モノサイトゲネス (Listeria monocytogenes) を含むワクチンが提供される。これらのワクチンは、ある宿主に投与される際には腫瘍特異的抗原に対する免疫応答を誘導することが可能である。腫瘍形成の抑制の際にこれらのワクチンを使用する方法も提供される。

⑦1.~15. 略

5①環境に制限される生存能を有する組換え細菌システム

②特表平 11-507532

③平成 11 年 (1999) 7 月 6 日

④ワシントン ユニバーシティ (アメリカ合衆国)

⑤カーティス ロイ ザ サード、ティンギ スティーブン エイ

⑥許容環境と非許容環境との間の差に基づく、微生物に対する環境により制限される生存能システム (ELVS) を開示する。微生物の生存能は、1 またはそれ以上の必須遺伝子を許容環境中でのみ特異的に発現させ、そして／または 1 またはそれ以上の致死遺伝子を非許容環境中でのみ特異的に発現させることによって、許容環境に制限される。非許容環境中の一時的な生存能は、1 またはそれ以上の必須遺伝子を非許容環境中で一時的に発現させ、そして／または許容環境中での 1 またはそれ以上の致死遺伝子の発現を一時的に遅延させることによって達成され得る。必要遺伝子と致死遺伝子の組み合せの共役発現を包括する、環境により制限される許存システムもまた開示される。環境により制限される生存能システムを含む微生物は、許容環境および非許容環境への放出に有用である。温度調節された環境により制限される生存能システムは、増殖を宿主内部のより暖かい環境に制限することによる、または増殖を宿主において制限された時間の間のみ可能にすることによる、組換え無毒性 *Salmonella* を用いる発現産物 (例えば、抗原) の送達に特に適する。

⑦1.~59. 略

6①RNA を添加された抗原提示細胞を用いる癌および病原体感染の治療方法

②特表 2000-509281

③平成 12 年 7 月 25 日 (2000.7.25)

④デューク ユニバーシティ (アメリカ合衆国)

⑤ナエア スミタ ケイ、ボクツコウスキ デイヴィッド ジエイ、ギルボア エリ

⑥開示されるのは、患者の腫瘍形成または病原体による感染を治療するまたは予防する

ための細胞および方法である。本発明の細胞は、腫瘍または病原体に由来する RNA を添加された抗原提示（例えば、樹状細胞またはマクロファージ）である。該 RNA 添加抗原提示細胞を患者に対して投与することにより、腫瘍形成または病原体感染を治療できるしまたは予防できる。或いは、該 RNA 添加細胞は、CTL の ex vivo 増加の刺激用細胞として用いることができる。次に、このような CTL を、寛容的な養子免疫療法技術の変法において用いることができる。

⑦1.~53. 略

7①腸内細菌におけるチトクロム P450 の発現

②特表 2001-522221

③平成 13 年 11 月 13 日 (2001.11.13)

④ユニバーシティ オブ ダンディー (イギリス国)

⑤ウルフ チャールズ ローランド、フリードバーグ トマス ハーバート、プリッチャード マイケル パトリック

⑥【要約】機能性チトクロム P450 モノオキシゲナーゼ系を含む菌細胞であって、該細胞がチトクロム P450 を発現し得る遺伝子作成物と上記チトクロム P450 とは別個にチトクロム P450 レダクターゼを発現し得る遺伝子作成物を含み、チトクロム P450 の N 末端とチトクロム P450 レダクターゼの N 末端がそれぞれ上記細胞内において上記チトクロム P450 と上記チトクロム P450 レダクターゼの機能性カップリングを可能にするように適合化されている。チトクロム P450 を含む菌細胞において、上記チトクロム P450 をコード化し、かつ発現し得る遺伝子作成物を含有し、チトクロム P450 が、菌細胞の細胞区画又は膜にチトクロム P450 を方向付ける N 末端部分を含む。該菌細胞は、例えばバイオリアクターとして、薬物試験及びチトクロム P450 の供給源として、有用である。

⑦ [1.] ~ [41.] 略

8①BODRDETELLA PERTUSSIS 線毛を含有するワクチン接種結合体および経口ワクチンにおけるキャリアとしての BORDETELLA PERTUSSIS 抗原

②特表 2002-508761

③平成 14 年 3 月 19 日 (2002.3.19)

④マイクロバイオロジカル リサーチ オーソリティ (イギリス国)

⑤ファラー グラハム ヘンリー、ジョーンズ デイビッド ヒュー

⑥ワクチン接種結合体は、Bordetella pertussis の線毛、百日咳毒素、百日咳トキソイド、および百日咳 69kD タンパク質より選択されるキャリアと結合体化した抗原を含有する。結合体はまた、第 1 の抗原と異なる第 2 の抗原を含有し得る。経口ワクチン接種組成物は、Bordetella pertussis の線毛、または線毛-抗原結合体を含有する。

⑦1.~19. 略

9①胃腸内細菌抗体工場

②特表 2002-521494

③平成 14 年 7 月 16 日 (2002.7.16)

④ウイスコンシン アルムナイ リサーチ ファウンデーション (アメリカ合衆国)

⑤ウイリアム イー ファール、ジェフリー ジェイ レッチワース、ジェラルド シーミューラー、アダム ケイ ザベッジ、ラボラ ルー

⑥【要約】生後 30 日間の新生児は病原体に対して特に感受性がある。なぜならその免疫

系がまだ完全に機能していないからである。成人であっても、その免疫系が疾病により傷つけられた場合、あるいは急に大量の GI 病原体にさらされた場合には、病原体に感受性になることがある。本発明は、病原体に対する抗体を発現する組み換え共生細菌を経口投与することにより新生児および成人を病原体に対して免疫する方法を提供する。これらの共生細菌を、病原体に免疫学的に特異的な抗体とともに投与してもよい。さらに本発明は、病原体に対する抗体を発現する組み換え共生細菌を含む組成物、ならびにこの組成物を用いて新生児および成人を免疫する方法も提供する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 27] 略

10①大腸炎処置のためのサイトカイン産生性ラクトコッカスの使用

②特表 2002-528392

③平成 14 年 9 月 3 日 (2002.9.3)

④フームス インテルウニフェルシティ インスティチュート、フォールビオテヒノロピー ヴェーゼットウェー (ベルギー国)

⑤ステイドラー ロタール、レマウト エリック レーネ、ファイアス ウォルター

⑥本発明は、経口経路による IL10 及び／又は溶解性 TNF レセプターのような、サイトカイン又はサイトカインアンタゴニスト、好ましくは、酸感受性抗炎症剤の腸粘膜における送達のための投与方策に関する。本発明による好ましい特徴は、それぞれのタンパク質を产生するために操作された、リコンビナントラクトコッカス ラクチス細胞の懸濁液の接種である。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 6] 略

11①抗原提示細胞に特異的標的化するための腸内細菌タンパク質 OmpA の使用

②特表 2002-529428

③平成 14 年 9 月 10 日 (2002.9.10)

④ピール ファーブル メディカマン (フランス国)

⑤ホヌフォワ ジャン-イブ、ルコアネ シビュ、オーブリイ ジャン-ピエール、ジャン パスカル、ザサン ティエリイ

⑥本発明は、腸内細菌タンパク質 OmpA、好ましくはクレブシエラ ニューモニエ (Klebsiella pneumoniae) P40 タンパク質を、これに関係する生物学的活性物質を、抗原提示細胞、特にヒト樹状細胞、に特異的に標的化するために使用することに関する。本発明はまた、OmpA タンパク質を、病気、特に腫瘍抗原に関するがん、自己免疫疾患または感染症、の予防および／または治療を目的とする製薬組成物の製造に使用することにも関する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 25] 略

12①粘膜上の可溶性ウイルス特異リガンドの半減期を増加させる方法

②特表 2002-542182

③平成 14 年 12 月 10 日 (2002.12.10)

④オセル インコーポレーテッド (アメリカ合衆国)

⑤リー ピーター ピイ

⑥本発明は、ウイルス特異リガンドを修正して粘膜上に定着するバクテリアと結合させることにより、粘膜上のウイルス特異リガンドの半減期を増加させる方法に関する。本発明はまた、ウイルス特異リガンドとバクテリア特異リガンドとを含むキメラ分子を提供する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 41] 略

13①ラクトバシラス・デルブリュッキのラクトースオペロンと細菌細胞における遺伝子の転写及び／または発現のコントロールのためのその利用

②特表 2003-504027

③平成 15 年 2 月 4 日 (2003.2.4)

④ソシエテ デ プロデュイ ネツスル ソシエテ アノニム
⑤ジェルモン ジャック エデュアール、ラピエール ルシアン、モレ ベア
⑥本発明は細菌、望ましくはグラム陽性細菌における各種遺伝子の転写かつ／または発現をコントロールするために適したDNA配列をもつラクトバシラス・デルブリュッキのlacオペロンのlacリプレッサーをコードする遺伝子から構成されるDNA配列に関するものである。

⑦ [請求項1]～[請求項17] 略

14①抗原送達用プラスミド維持系

②特表2003-506007
③平成15年2月18日(2003.2.18)
④ユニヴァーシティ オブ メリーランド ボルチモア(アメリカ合衆国)
⑤ガレン ジェームス イー
⑥[要約] 本発明は概して、外来抗原をコードする発現プラスミドを安定化するためのプラスミド維持系ならびにそのプラスミド維持系の作製法および使用法に関する。本発明は、(1)平衡致死維持機能だけへの依存を排除し、かつ(2)発現プラスミドのランダムな分離を防ぐことでそれらの遺伝と安定性を高めるために少なくとも1つのプラスミド分配系を組みいれることにより、2つの独立したレベルで発現プラスミドの維持を最適化する。本プラスミド維持系は発現産物を発現させるように組み換え操作されているプラスミド内に使用できる。
⑦ [請求項1]～[請求項155]

15①組換え微生物

②特表2003-509046
③平成15年3月11日(2003.3.11)
④イギリス国(イギリス国)
⑤ティットボール リチャード ウィリアム、ブーリフエント ヘレン リーザ
⑥粘膜エクター部位における所望のタンパク質の発現を増強する方法であった、発現させるタンパク質を、配列番号2、配列番号3もしくは配列番号4を有するプロモーター活性を有するこれらの断片もしくは変異体もしくはこれらのいずれかの制御下に配置し、粘膜細胞内で発現を引き起こすことを含んでなる方法。該方法で使用する構築物および適当な組換え腸定着微生物(例えばサルモネラ種)も記載し特許請求する。該生物はワクチンの製造に有用である。

⑦ [請求項1]～[請求項16] 略

16①経口用組換え乳酸桿菌ワクチン

②特表2003-509469
③平成15年3月11日(2003.3.11)
④ネーデルランドセ オルガニザティエ フール テゲパストーウーベテンシヤツペリーク オンデルツエク テイエヌオー(オランダ国)
⑤ショウ デビット マイケル、リーア ロバート ジャン、ポーウェルス ペーター
⑥ワクチンとして用いるための組換えもしくは改変ラクトバチルスについて述べている。該細菌は異種抗原を細胞内もしくは細菌の表面上のいずれかに発現し、免疫応答を引き出す。該ワクチンは経口投与に適している。好ましい細菌はラクトバチルス プランタルム(*Lactobacillus plantarum*)の種、特にL.プランタルム(*L. plantarum*) 258である。

⑦ [請求項1]～[請求項30] 略

17①オリゴ糖レセプター模倣物を発現する組換え微生物

②特表2003-514512

③平成 15 年 4 月 22 日 (2003.4.22)

④ ウィメンズ アンド チルドレンズ ホスピタル (オーストラリア国)、
ルミニス プロプライエタリー リミテッド (オーストラリア国)

⑤ペイトン アドリーヌ、モロナ レナト、ペイトン ジェイムズ

⑥外因性グリコシルトランスフェラーゼを保有する組換え微生物によって產生されるキメラ糖質は、合成に必要な外因性酵素またはヌクレオチド合成前駆体と共に作用するか、またはいずれも併わずに作用する。これらの組換え微生物は、粘膜表面（特に、胃腸表面）のレセプターに対する毒素または付着因子の結合を競合的に阻害するための手段として使用し得る。特に、キメラ糖部は、オリゴ糖の複数のコピーを提示する組換え微生物における、リボ多糖から作製された。このように提示されるオリゴ糖部分は、毒素および付着因子についてのレセプター模倣物として作用する。多くのものが合成され、そしてインビトロおよびインビボでの病原性生物またはそれらの産物による攻撃に対して保護を付与することができる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 116] 略

18①乳酸菌中の分泌シグナルを分離する方法及びラクトコッカス ラクティスから分離された新規な分泌シグナル

②特表 2003-516119

③平成 15 年 5 月 13 日 (2003.5.13)

④バイオテクノロジスク インスティテュート (デンマーク)

⑤ラヴィン ペーター、マドセン ソレン ミハエル、ラング アスリッド、イスラエル
セン ハンス、ジョンセン マップ グロエンヴォルド、ブレッドモーゼラース、アーネ

⑥LR とレポーター遺伝子との間の領域が欠失しており、かつ分泌レポーター分子をコードする DNA 分子からなる DNA 分子由来のプロモーターを持たないレポーター遺伝子ナル ジョゼ

を含むトランスポゾンからなる DNA 分子を用いて、乳酸菌中でシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列を同定する方法。LR とレポーター遺伝子間の領域を欠失することによって、分泌レポーター分子とともにフレーム中にある停止コドンが除かれ、転位により LR の上流から翻訳融合が可能になる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 35] 略

19①泌尿生殖器感染に対する処置および防止のための乳酸菌の経口投与方法

②特表 2003-522731

③平成 15 年 7 月 29 日 (2003.7.29)

④ウレックス バイオテック インク (カナダ国)

⑤レイド グレゴール、ブルース アンドリュー ダブリュ

⑥本発明は、健康な尿生殖器微生物叢の確率及び維持のために乳酸菌及び／又はビフィズス菌等の他のプロバイオティック生物を経口するための方法及び組成物を提供する。また本発明は、疾患の危険を低減する方法及び組成物も提供する。また本発明は、生物学的試料中の乳酸菌を検出するためのプローブも提供する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 24]

20①尿生殖器または肛門直腸粘膜ワクチンデリバリーシステム

②特表 2003-525230

③平成 15 年 8 月 26 日 (2003.8.26)

④プロテイン エクスプレス インコーポレイテッド (アメリカ合衆国)

⑤ジョセフ トーマス、ゾルト アイ ハーテレンディ、マーレー ワイナー、マイケル ハウエル

⑥本発明は、ヒトおよび動物において尿生殖器および肛門直腸で伝播される感染疾患

に対して免疫するための坐剤ベースのワクチンデリバリーシステムおよび同疾患の治療方法に関する。さらに詳しくは、本発明は、ウイルスまたは病原体などの尿生殖器または肛門直腸で伝播される感染疾患の予防または治療のための坐剤ベースのワクチンデリバリーシステムに関する。本発明の坐剤ベースのデリバリーシステムは、全体のまたは断片化したウイルスまたは他の微生物病原体、またはヒトまたは動物において液性または細胞媒介免疫を生成しうる核酸、タンパク質、脂質、または他の抗原決定基からなる、天然のものであるか、変異させたものであるか、合成したものであるかクローニングしたものであるか、または組換え発現させたものであるかを問わずその精製した細胞構成成分を含むワクチンおよび／またはワクチンアジュバント；およびポリエチレングリコール基剤を含み、該坐剤は、ヒトまたは動物の体の開口部の組織と接触して該組織を通したワクチンまたはワクチンアジュバント物質の移行を容易にするよう該開口部に挿入するのに適合したものであることを特徴とする。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 20] 略

21①腸内細菌科の確認および分化用テスト媒体

②特表 2003-531569

③平成 15 年 10 月 28 日 (2003.10.28)

④マイクロロジー ラボラトリーズ エル エル シー (アメリカ合衆国)

⑤ロス ジョフレイ エヌ、ロス ジョナサン エヌ

⑥ [要約] [課題] 単一サンプルを单一のテスト媒体により、選択された複数の微生物である生物実体を検出、定量化および分化可能なテスト媒体を提供すること。[解決手段] 特定に酵素を生成する一般大腸菌、E.C.、エーロモナス属およびサルモネラ菌又はシゲラ菌を含む生物実体の集合体を周囲光の下で定量化および分化するテスト媒体を開示する。非クロモゲンサブストレートは、実質的に黒色の非拡散性の沈殿物を生成し、テスト媒体に存在する他のクロモゲンサブストレートは干渉しない。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 57] 略

22①粘膜感染症の処置のための組成物および方法

②特表 2003-533489

③平成 15 年 11 月 11 日 (2003.11.11)

④ニューモバイオティックス プロプライエタリー リミテッド (オーストラリア国)

⑤ [発明者] クランシー ロバート ルエリン、パン ジェラルド、ダンクリー マーガレット ロレイン

⑥本発明は粘膜感染の予防および／または治療処置に有用な新規の組成物およびワクチンに関する。また、特に経口ワクチン、および呼吸器官の感染に対する耐性の向上または確立した感染症の治療のための方法に関する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 30]

23①免疫刺激パプチドでのラクトバシルスカゼイの使用

②特表 2003-534284

③平成 15 年 11 月 18 日 (2003.11.18)

④カンパニー ジエルヴェ ダノン (フランス)

⑤ポステール エリック、ボナヴィダ ベンジャミン

⑥本発明は、病原微生物に対して特異的な免疫を増強するための、経口投与用組成物でのラクトバシルス カゼイの使用に関するものである。組成物は、特に食品または補助食品であってもよい。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 7] 略

24①抗原提示細胞におけるエピトープ同調

②特表 2003-535824

③平成 15 年 12 月 2 日 (2003.12.2)

- ④シーティーエル イムノセラピーズ コーポレーション (アメリカ合衆国)
- ⑤シマード ジョン ジェイ エル、ダイアモンド デビッド シー、リー シアンードン
- ⑥癌細胞および細胞内寄生生物により感染された細胞に対する免疫応答を誘発するためのワクチンならび方法を、本明細書中に開示する。ハウスキーピングエピトープを有するワクチンを開示する。ハウスキーピングエピトープは、周辺細胞中のマウスキーピングプロテアソームにより形成されるが、プロフェッショナル抗原提示細胞により形成されない。したがって、末梢的細胞に関連した抗原に由来するハウスキーピングエピトープを有するワクチンを投与することを含む治療方法も開示する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 161] 略

25①プロバイオティックを用いた、粘膜表面での細菌またはウイルス感染の免疫療法または治療、およびそのための組成物

②特表 2003-535903

③平成 15 年 12 月 2 日 (2003.12.2)

④ミューコプロテック プロプライエタリー リミテッド (オーストラリア国)

⑤クランシー ロバート、パン ジェラルド、ポロディ トーマス、ダンクリー マーガレット、コンウェイ パトリシア リン

⑥粘膜表面に関連する障害の療法的または予防的治療のための組成物および方法、並びに特に、非特異的粘膜免疫を、特に乳酸桿菌またはミコバクテリウム バカイなどのプロバイオティックで増進することによる、粘膜部位での感染性障害の治療。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 42] 略

26①カンジダ症の治療のための組成物および方法

②特表 2004-502653

③平成 16 年 1 月 29 日 (2004.1.29)

④キャンディヴァクス プロプライエタリー リミテッド (オーストラリア国)

⑤クランシー ロバート、パン ジェラルド、ショクロラー エラヒ

⑥本発明は、新規の経口組成物およびワクチンに関し、特に、カンジダ症の予防または治療のための経口ワクチンに関する。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 36] 略

27①細菌におけるプラスミド遺伝の安定化

②特表 2004-510745

③平成 16 年 4 月 8 日 (2004.4.8)

④アカムビス リサーチ リミテッド (イギリス国)

⑤タナー アーサー キース、スティーブンス ジョナサン クライブ

⑥本発明は、医薬品として受容し得る担体または希釈剤及び、(i)部位特異的組換え酵素をコードする DNA 配列、及び(ii)組換え酵素の認識配列及び異種ポリペプチドをコードする DNA 配列を含むプラスミドを含む細菌を含むワクチンに関するものである。この組換え酵素はプラスミドの遺伝を安定化し、それによって異種ポリペプチドを発現する能力が細菌から失われるのを防いでいる。

⑦ [請求項 1] ~ [請求項 30] 略

28①ビフィドバクテリウム由来の新規なプラスミド、これを用いた組換え発現ベクターおよび形質転換方法

②特表 2004-519236

③平成 16 年 7 月 2 日 (2004.7.2)

④ビフィド カンパニー リミテッド (大韓民国)

⑤ジー ゲウンーエオグ、パーク ミヨンソウ、カン ユンヒー、セオ ジュンミン

⑥ [解決手段] 本発明はビフィドバクテリウム由来の新規なプラスミド、これを利用した組換え発現ベクターおよび形質転換方法に関するものであり、配列番号1で示される塩基配列を有するプラスミドpMG1と、前記プラスミドpMG1を含む菌株ビフィドバクテリウム ロンガム MG1 ((*Bifidobacterium longum* MG1)と、大腸菌およびビフィドバクテリウムで相互複製されて配列番号2で表示される塩基配列を有するMob遺伝子、配列番号3で表示される塩基配列を有するRep遺伝子および選別遺伝子を含むシャトルベクターに関するものである。本発明のシャトルベクターおよびプロモーターを利用して目的遺伝子を発現時に別の精製過程が必要ないし、ビフィドバクテリウム内発現された目的遺伝子を直ちに食品に添加することができて食品添加物または経口用ワクチンの製造に使われることができる長所がある。また、このようなシャトルベクター開発を通じてビフィドバクテリウムを利用したプロバイオティックスの潜在力と可能性を画期的に高めることができる。

⑦ [請求項1]～[請求項15] 略

29①薬剤耐性マーカーを含有しない遺伝子組換え細胞とその作製方法

②特表2004-524817

③平成16年8月19日(2004.8.19)

④カーネギーメロン ユニヴァーシティ(アメリカ合衆国)

⑤ヴィラ マニュエル ジェイ、ヘンリー スザン エイ

⑥ [要約] 一切の薬剤耐性遺伝子の添加が無く、酵母のような微生物のゲノムの特定の部位にどのような遺伝子でも安定的に導入できる方法および材料を提供する。ここでは、具体的に、宿主ゲノムへの相異的な遺伝子と同様、相同的な遺伝子の安全で、安定し、そして制御された導入を可能とする新規な一連の酵母組み換えプラスミドを用いて得られた、新規な遺伝子的に作製されたイノシトール過剰生産サッカロマイシーズセレバイシエ株を提供する。特に、「サッカロマイシーズセレバイシエ酵母のゲノムの特定の」部位は、宿主が一切の薬剤耐性遺伝子の添加なしに使用可能なように、発現されるように求められる特定遺伝子の单一または多コピーあるいは一連の特定遺伝子で形質転換することができる。この新規な方法の理念は、より高度な真核細胞と同様、他のリコンビナント酵母および細菌の株にも用いることができる。

⑦ [請求項1]～[請求項]61 略

30①遺伝子組換え生物の核酸中の情報をコードする方法

②特表2004-532631

③平成16年10月28日(2004.10.28)

④アイコン ジェネティクス アクチングゼルシャフト(ドイツ連邦共和国)

⑤グレバ ユーリ、クリムユク ヴィクター

⑥ [要約] 遺伝子組換え生物を製造する方法であって、(a)前記生物中に機能性DNA配列を組み入れること及び(b)前記生物中に非機能性DNA配列を組み入れることによる方法であって、前記非機能性DNA配列は、事前に定義されたコード体型の情報メッセージへの適用の結果に対応しており、前記情報メッセージは、前記機能性DNA配列に関連しており、前記の事前に定義されたコード体系は、複数の可能な情報メッセージから複数のDNA配列中のマッピングを提供する方法、前記機能性及び非機能性DNA配列は、実用上適応な期間、生物の生殖中に転写をたもっている。

⑦ [請求項1]～[請求項49] 略

31 ①マーカーを含まない変異型標的生物の調製及びそのために好適なプラスミドベクタ

—
②特表2004-538003

③平成16年12月24日(2004.12.24)

- ④ビーエーエスエフ アクチングゼルシャフト（ドイツ連邦共和国）
⑤ポンペユス マルクス、クロプロッゲ コリンナ、ツエルダー オスカー、リエブル ウ
ォルフガング
⑥ [要約] 本発明は、標的生物において複製しないプラスミドベクターであって、以下の構成要素：
a)標的生物と同一でない宿主生物のための複製起源、b)少なくとも1つの遺伝子マーカー、c)
場合によって、コンジュゲーションによってDNAのトランスファーを可能にする配列部分
(mob配列)、d)標的生物の配列に相同であり、かつ標的生物における相同組換えを可能にする
配列部分、e)プロモーターの制御下にあるガラクトキナーゼの遺伝子、を含む上記プラスミ
ドベクターに関する。

⑦ [請求項1] ~ [請求項15] 略

32①経口ワクチン

②特表2005-501878

③平成17年1月20日(2005.1.20)

④アカデミア シニカ(台湾)

⑤ヤン フェイーラン、ユー ジェームズ チェインナー、リン ジョン ハンユー

⑥ [要約] 本発明は、ワクチン投与すべき水生動物(例えば、魚またはエビ)の飼料として用いられる多細胞生物と、該多細胞生物に給餌されて該多細胞生物の体内に閉じこめられる単細胞生物と含む経口ワクチンを特徴とする。単細胞生物は、水生動物内で免疫応答を誘導することができ、これにより該水生動物にワクチン投与を行う組換え抗原を発現するように形質転換されている。

⑦ [請求項1] ~ [請求項27] 略

資料4-3 「遺伝子組換え微生物」投与後の安全性など記載の特許

1 公開特許公報 2件

① [発明の名称] ② [公開番号] ③ [要約] ④ [請求項]

1①病原性微生物に対するワクチンとして利用しうるコリネ型細菌組み換え体

②特開平10-99077

③ヒトを含む哺乳類を宿主とする病原微生物に対する有効で安全なワクチンを開発する。病原性微生物由来のDNAは、染色体上に組み込まれていても、また、染色体外に存在していてもよく、例えば、病原性微生物毒素そのもの、またはヒトを含む哺乳類に傷害を与えない蛋白質をコードする。

④ [請求項1] 病原性微生物由来のDNAを発現することができかつ非病原性であるコリネ型細菌組み換え体。

[請求項4] 前記病原性微生物由来のDNAがコードする蛋白質抗原が、ヒトを含む哺乳類に対し傷害を与えない蛋白質である請求項1~3のいずれか1項に記載のコリネ型細菌組み換え体。

2①経口投与によるHIVワクチン

②特開2004-339160

③粘膜免疫を誘導する経口性エイズワクチンを開発するに際して、安全な経口投与によるHIVワクチンを得る。具体的には、非病原性のベクターを用い、更に、投与を終えた後に不用意に腸管に住み着く虞のないベクターを用い安価な経口投与によるHIVワクチンを得る。

2 公表許公報 4 件

- ① [発明の名称] ② [公表番号] ③ [請求項]

1①環境に制限される生存能を有する組換え細菌システム

②特表平 11-507532

③ [請求項 1] 環境に制限される生存能システムを含む単離された微生物細胞であって、該細胞は、
許容環境中では生存可能であり、非許容環境中では生存不可能であるか、または一時的に生存可
能であり、該システムは、必須遺伝子あって、該細胞中の該遺伝子の発現が、該細胞の生存能に
必須であり、該必須遺伝子は、該細胞が該許容環境中にある場合に発現され、そして該細胞が該
非許容環境中にある場合には発現されないか、または一時的に発現される、必須遺伝子を含む、
細胞。

[請求項 2] 前記システムが、致死遺伝子であって、該遺伝子の発現は、該細胞に致死
的であり、そして該致死遺伝子は、該細胞が該非許容環境中にある場合に発現され
るが、該細胞が該許容環境中にある場合には発現されない、致死遺伝子をさらに含む、請求項 1
に記載の細胞。

[請求項 37] ワクチンとして使用のための請求項 2 に記載の細胞であって、該細胞は、
動物中にある場合、一時的に生存可能であり、前記必須遺伝子は、該細胞が該動物
中にある場合、一時的に発現され、そして前記致死遺伝子は、該細胞が所定の期間、
該動物中にあった後でのみ、該細胞が該動物中にある場合、発現されて、ここで、
前記許容環境は、該必須遺伝子の発現を維持し、そして該致死遺伝子の発現を防止
するために必要な栄養素を含む環境を含み、そして前記非許容環境は、該栄養素を
欠く環境を含む、細胞。

[請求項 42] ワクチンとしての使用のための請求項 2 に記載の細胞であって、該細胞
は、動物中にある場合、生存可能であり、そして該動物の外部にある場合、生存不
可能であり、前記必須遺伝子は、該細胞が該動物中にある場合、発現され、そして
該細胞が該動物の外部にある場合、発現されず、そして前記致死細胞は、該細胞該
動物の外部にある場合、発現され、そして該動物中にある場合、発現され、ここで、
前記許容環境が約 37℃ の温度を含み、そして前記非許容環境が約 30℃ 未満の温度を
含む細胞。

2①オリゴ糖レセプター模倣物を発現する組換え微生物

②特表 2003-514512

③ [要約] 外因性グルコシルトランスフェラーゼを保有する組換え微生物によって產生
されるキメラ糖質は、合成に必要な外因性酵素またはヌクレオチド合成前駆体と共に
作用するか、またはいずれも伴わずに作用する。これらの組換え微生物は、粘膜
表面（特に、胃腸表面）のレセプターに対する毒素または付着因子の結合を競合的
に阻害するための手段として使用され得る。特に、キメラ糖部分は、オリゴ糖の複
数のコピーを提示する組換え微生物における、リポ多糖から作製された。このよう
に提示されるオリゴ糖部分は、毒素および付着因子についてのレセプター模倣物と
して作用する。多くのものが合成され、そしてインビトロおよびインビボでの病原
性生物またはそれらの産物による攻撃に対して保護を付与することが示された。

3①遺伝子組換え生物の核酸中の情報をコードする方法

②特表 2004-532631

③ [請求項 37] 前記非機能性 DNA 配列の前記組み入れが、前記遺伝子組換え生物の生
態学的安全性に悪影響を及ぼさない請求項 1~36 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項 39] 前記非機能性 DNA 配列が、前記遺伝子組換え生物中の前記機能性 DNA
配列の性能に悪影響を及ぼさない請求項 1~38 のいずれか一項に記載の方法。

4①粘膜上の可溶性ウイルス特異リガンドの半減期を増加させる方法

②特表 2002-542182

③ [請求項 1] 動物の粘膜の上のウイルス特異リガンドの半減期を増加させる方法であつて、前記粘膜にはバクテリアが定着し、前記方法が、粘膜に定着するバクテリアの表面に結合するよう修正したウイルス特異リガンドに粘膜を接触させることを含む方法。

[請求項 17] ウイルス特異リガンドとバクテリア特異リガンドとを含み、前記バクテリア特異リガンドが粘膜の共生生物であるバクテリアと結合する、キメラ分子。

[請求項 37] (i)キメラ分子がウイルス粒子とバクテリア特異リガンドと結合し得るウイルス特異リガンドを含み、前記バクテリア特異リガンドが健康な粘膜の自然共生生物であるバクテリアと結合する、以下略。

GMM の腸内細菌叢への影響を評価するための方法の検討

1. 腸内細菌叢構成菌の正常値について

抽出した和文論文より腸内細菌叢のデーターから健常人、病態でのデーターを一部まとめた[資料5—1]。国内の論文ではほとんどがいわゆる「光岡の方法」で行なっており、各菌群で一定の幅の中にあるといえる[資料5—2]。海外での成績は、「光岡の方法」とは基本的には同じであるが、用いる培地や培養方法の違い、資料5—1にも付けたDry weightあたりで計算しているものなどにより全てを統一的にみることはできない。また分子生物学的手法を用いた成績は培養法との比較検討が行なわれていないことで、それぞれの検出範囲を示したうえで正常値としてどのようにみるかが必要である。

例えば資料5—2においても大腸菌群は、ほぼ100%の検体から検出され、IBD患者では菌数が高くなる傾向がみられるが、健常者でも $10^9/g$ の個体もあり、 $10^9/g$ の菌数が異常値と判定することは難しい。

海外調査で、オランダのDr. Welling や Dr. Venemaとの議論でも年齢、生理状態、食生活によっても腸内細菌叢構成を正常値としてとらえるのは難しく、むしろ変化率で異常状態をみるべきだとの意見もあり、この正常値をどのように設定するかは検査方法(次のセクション参照)も含めて今後の検討課題である。

2. 菌叢検査法の評価

<分子生物学的方法による腸内フローラの同定法>

これまで腸内フローラの同定は、主に、培養によって検出した菌株を純粋分離した後、各種の選択培地あるいは非選択培地での生育や、コロニーおよび細胞形態の観察、グラム染色、発育可能温度、好気および嫌気条件下での発育可能性、糖の分解性、ガス産生、乳酸の旋光性、菌体成分の分析など、各種の表現形質に基づいて行われてきた。

しかし最近、腸内フローラの同定を表現形質ではなく、ゲノム塩基配列の違いに基づいて行う新しい同定法が広く用いられるようになってきた。これらの方法は、培養法に比べて簡便あるいは短時間で腸内フローラの同定を正確に行うことが期待できるものである。また、これらの方は、腸内に現時点で培養が難しい多くの（培養可能な菌数の数倍もの）細菌が存在することが推定され、培養によらない同定法が強く求められていることに対応する方法もある。

ここでは、腸内フローラの同定に用いられている各種の方法について簡単に紹介する。

1) rDNAの塩基配列を利用する方法

リボソームDNA（rDNA）は数多くの細菌で全体的には保存性が非常に高いと同時に、部分的には変化に富んでいるため、種を区別する際に利用できる。そして、種を越えて配列が保存されている領域を利用してユニバーサル・プライマーを容易に設計できるため、細菌の同定に広く用いられている。なかでも16S rDNAの塩基配列情報はデータベースの情報量が豊富なため有用である。

1-1. rDNAの塩基配列による同定法

多くの細菌の16S rDNAの塩基配列情報が蓄積され、この配列を利用して菌種を同定することが可能になった。微量の菌体があればPCRにより短時間で16S rDNAを増幅し、シークエンサーで比較的簡便に塩基配列が決定できる。決定した塩基配列を同定に利用する場合には、16S rDNAの全塩基配列を決定しなくとも、菌種によって多様性のある16S rDNA 5'末端から約500塩基程度の配列があれば通常は同定が可能である。得られた塩基配列を、日本DNAデータバンク（DDBJ）やRibosomal Database Project II（RDP II）などのデータベース内にある既知配列と相同性を検索して菌種を同定する。

16S rDNAの塩基配列決定により菌種の同定はほぼ可能であるが、最終的な菌種の決定には定量的DNA-DNAハイブリダイゼーション法など他の方法を併用する必要がある。

1-2. 特異的プローブおよびプライマーを用いる方法

16S rDNAの配列をターゲットとして、属あるいは種特異的なプローブやプライマーを設計してハイブリダーゼーションやPCRを行い同定することもできる。特に、同定したい菌株の性状などからある程度菌種が推定できる場合には、限られた特異的プライマーを用いればよいので、迅速で簡便に実施できる。また、特異的プローブおよびプライマーは後述のように、培養によらずに細菌を検出・同定する方法にも利用されている。

16S rDNAの塩基配列の違いのみでは特異的プライマーの設計が困難な近縁種に関しては、16S - 23S rDNAスペーサー領域や*recA*遺伝子を利用した菌種特異的プライマーの設計も行われている。

2) 培養しないでフローラを解析する方法

糞便などのように多数の菌株が混在する試料を対象とする場合には、特定の細菌を培養法によって選択的に分離することは容易ではない。そこで、環境中の微生物の多様性解析のために既に開発されている方法を応用して、培養に依存しないで試料から直接抽出したDNAを解析し同定する方法がいくつか開発されている。

2-1. 特異的プライマーによる定性的・定量的PCR法

属や菌種に特異的なプライマーを用いると、試料から直接抽出した全体のDNAを鋳型にして、PCR反応を行い、糞便試料中のフローラを構成する特定の属あるいは菌種を定性的に検出できる。

また、PCR産物を各サイクルごとに測定するリアルタイムPCR法を特異的プライマーを用いて実施すると、特定の属あるいは菌種の細胞数を推定することが可能となる。これらの方法を用いて、ヒト成人や乳児の糞便中ビフィズス菌の菌種構成を調べたり、ビフィズス菌の菌量を推定することができる。

2-2. クローンライブラー法

クローンライブラー法は、フローラの菌種構成を決定するのに有効である。本方法では、試料から直接DNAを抽出し、PCRで非選択的に16S rDNAを増幅し、増幅産物を大腸菌のクローニングベクターに組み込み、16S rDNA断片を含む多数の組換えプラスミドDNAを精製して各々の塩基配列を決定する。得られた多数の塩基配列をネット上のデータベースに対して相同性検索して菌種の同定を行い、試料中の各菌種の構成を推定する。

2-3. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)法

DGGE法は、パターン・多様性解析法の一つであり腸内フローラの解析に有用である。試料から直接DNAを抽出し、16S rDNAの一部（約200~500bp）をPCRで増幅した後、増幅産物を変性剤（尿素とホルムアミド）の濃度勾配をつけたポリアクリルアミドゲル中で変性させながら泳動する。この方法では、同一鎖長であっても配列が異なるDNAは変性剤濃度が異なる位置で解離するため、泳動距離に差異が生じ、配列が異なるDNAを分離することができる。

本方法は迅速性や再現性に優れているが、例えば2種類の近縁種のバンド位置が非常に近い場合や断片サイズが同一の場合には、変性剤濃度勾配を変えたり、別のプライマーを使うなどの対応が求められ、それぞれの条件下におけるデータベースの構築が必要となるなど手間がかかる。

また、菌種を同定するには、電気泳動で分離されたバンドの塩基配列を決定する必要があるが、この作業を行わなくてすむNested-PCR-DGGE法がある。すなわち、1回目のPCR産

物を鋳型にして、特異的な内部プライマーによって増幅した2回目のPCR産物をDGGE解析用の試料とする方法である。

2-4. T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)法

T-RFLP法はDGGE法と同様にパターン・多様性解析法の一つである。試料から直接DNAを抽出し、プライマーの一方のみを蛍光標識してrDNAをPCR増幅し、増幅産物を制限酵素で切断した後、DNAシーケンサーで分離・検出する。この際、蛍光色素で標識されている末端断片のみがシーケンサーで検出されるので、原理的には1菌種に付き1本のピークが検出される。フローラをピークパターンとして表わすことができるので、複雑な菌叢の解析にも威力を発揮し、迅速性や再現性に優れている。フローラ全体を解析する場合、ユニバーサル・プライマーと制限酵素 Hha Iおよび Msp Iの組み合わせがよく用いられるが、目的によってはプライマーや制限酵素を変える。各ピークにどのような菌種が含まれるかを同定するには、コンピューターシミュレーションやクローンライブラリー法などを行う必要がある。本方法を用いて、ヒトの糞便菌叢や口腔内菌叢の解析が行われている。

2-5. FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)法

以上は、菌体から抽出したDNAをPCRで増幅し、その増幅断片を解析するものであるが、FISH法は、細胞内に多数の分子が存在するrRNAを標的として、蛍光標識した特異的プローブを細胞内でハイブリダイズし、蛍光顕微鏡で観察する方法である。本方法では、DNAの抽出効率やPCRによる増幅効率などの影響を受けることなく、細胞をそのまま計測できる点で定量性に優れており、試料中における各細菌の空間分布を解明することも可能である。本方法を用いて様々な試料中の菌叢解析が行われているが、この一連の操作を自動的に行う装置もある。

2-6. DNAマイクロアレイ法

菌種などに特異的なプローブをナイロン膜などにスポットし、試料などから抽出したDNAを鋳型に、蛍光色素を含めてPCR増幅したDNA断片をハイブリダイズして検出する方法がある。DNAマイクロアレイ法はこの方法の微小化であり、サンプル量が少なくてすむ。また、本方法では複雑なフローラ構成を一度に解明することができるため、糞便試料の解析にも応用されている。この方法は複雑な細菌叢の解析に有効であるが、プローブサイズの影響でクロスコンタミネーションが起こる可能性があるため、データの解釈には細心の注意が求められる。

3) 菌株レベルでの識別

培養による同定法は、時間と経験を要する弱点があるが、菌株レベルでの識別も困難である。しかし近年、分子生物学的方法を用いた様々な菌株識別法が開発されている。

菌株レベルでの識別法としては、ゲノムDNAの制限酵素切断断片の多型性を利用したパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)法や、ゲノムDNA上のr RNA遺伝子領域の多型性を利用したリボタイピング法、ランダムプライマーを用いてアニーリング温度を低く設定して

PCR反応を行うRAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 法、特定の遺伝子領域をPCRで増幅しPCR産物の制限酵素断片の多型性を利用したPCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) 法などがある。

これらの方法のうち、最も汎用性が高く菌株識別能力が高いのはPFGE法であろう。しかし、本方法は操作が煩雑で、結果を得るまでに数日を要することや装置が高価であるという欠点もある。そのため、特定の菌株を他の微生物集団から識別するにはRAPD法が多用されている。この方法は、有効なプライマーを設計するのが容易でないことや、対象とする菌株ごとにプライマーを設計しなければならないという問題点はあるが、良好なプライマーが得られれば、菌株識別能が高く、迅速かつ簡便に多くの検体を解析することができるという長所がある。

4) 各種方法の評価

腸内フローラを構成する細菌の検出・同定法は、従来では培養法を基礎としたものであり、経験と熟練した技術を要するだけでなく、正確性に欠ける面もあった。しかし、上記のような分子生物学的方法によって、正確な菌種の同定や菌株の識別、あるいは培養法では困難な細菌種の迅速で正確な検出や、複雑な菌叢の解析も可能になっている。

培養に依存せず分子生物学的方法を用いた多種多様な方法が開発されているが、現状ではいずれの方法にも長所と短所があることを理解する必要がある。例えば、菌種や菌株によって、核酸 (DNA や RNA) の抽出効率や、同一プライマーを用いた PCR での増幅効率などが異なり、また、検出可能な細胞数は PCR の限界などからおおむね 10^5 個/g サンプル以上であること、などである。フローラの解析で正確な結果を得るには、各方法の特徴と限界を知り、いくつかの方法で比較するなどの慎重なやり方が求められる。

また、培養法の優れた面も認識する必要がある。例えば、良好な選択培地があれば簡単に特定の菌種を高感度で（一個以上の細胞を）正確に定量することができる。さらに、上記の分子生物学的方法と培養法による結果を組み合わせることによって、より正確で総合的な情報を得ることもできる。

なお、現在、乳酸菌やビフィズス菌をはじめいくつかの腸内フローラ構成菌のゲノム塩基配列の解読が世界中で進められている。それらのデータが公開されれば、各々の属・種に共通な遺伝子や、種あるいは株によって異なる独自の遺伝子が明確になり、菌種・菌株の同定やフローラ中の各細胞数を正確に定量できる可能性がある。近い将来には、より簡便でありながら確実で、かつ定量性が伴った同定法の開発が期待されるが、文献34 [資料1-1]においても、分子生物学的手法は始まったばかりで、腸内細菌叢をどこまで評価できるか、またその生物学的意味付けをどのように行えるかについては今後のデーターの蓄積をもつて評価しなければならないとしている。

3. 腸内代謝産物の正常値

1) 糖質の代謝

食物として摂取する栄養素の60%以上が多糖類であり、そのほとんどはでんぶんであり、他にグリコーゲン、サッカロース、ラクトースなどが含まれる。ヒトや動物の消化管では、でんぶんは小腸の強力な胰液アミラーゼによる消化の後、最終的にはぶどう糖として腸管から吸収される。糖類は、単糖まで分解されて、消化吸収される。セルロース、ペクチン、レジスタンストarcherといった難消化性多糖類は腸管の消化酵素により分解されないため主に腸内細菌により代謝されることになる。腸内菌叢による多糖類の主要な代謝の模式図を図1に示す。吸収されなかった糖および、非消化多糖類はオリゴ糖を経て、腸内細菌により代謝され発酵産物として、図に示した様な主要な物質や、短鎖脂肪酸へと分解される。

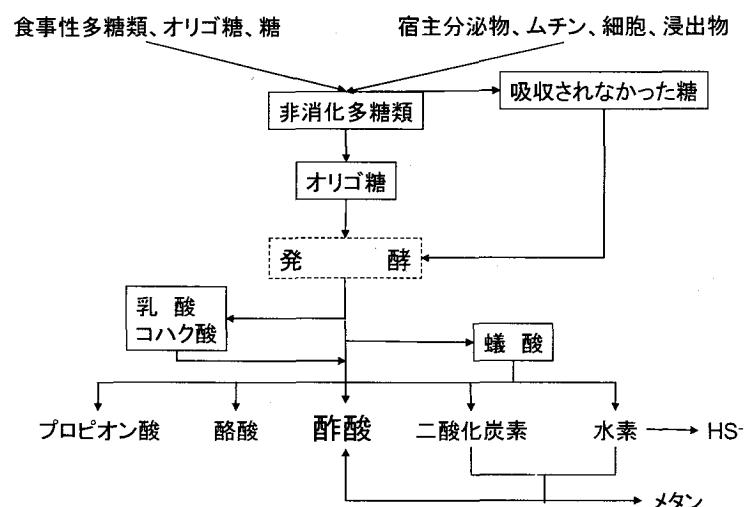


図1. 腸内菌叢による多糖類の主要な代謝の模式図 Hudson MJ et al. 1995

おもな発酵代謝産物は、菌群により異なる。表1に、それぞれの菌群の主要な代謝産物を一覧として示した。ヒトにおいては、腸内菌叢により糞便中の代謝産物が異なってくることは知られており、糞便中の短鎖脂肪酸をはじめとする代謝産物をモニターすることにより、腸内菌叢の評価および、宿主であるヒトの健康状態を推定することができると考えられている。文献的には、健康人や病気（例えば大腸癌患者）における糞便中の代謝産物の定量値に関する知見が報告されている。表2に、日本人の健康成人の糞便中の短鎖脂肪酸の平

均値を示す。

表1. 主要な腸内梗息菌のおもな発酵産物

菌 群	おもなもの	量は少ないが特徴的なもの
<i>Bacteroides</i>	酢酸、コハク酸、ガス	蟻酸、プロピオン酸、乳酸
<i>Fusobacterium</i>	酢酸、酪酸、ガス	乳酸、プロピオン酸
<i>Bifidobacterium</i>	酢酸、乳酸	
<i>Eubacterium</i>	酢酸、乳酸、ガス	蟻酸、酪酸、コハク酸
<i>Peptostreptococcus</i>	酢酸、乳酸	
<i>Peptococcus</i>	酢酸、乳酸	
<i>Ruminococcus</i>	酢酸、蟻酸、アルコール、ガス	コハク酸
<i>Clostridium</i>	酢酸、酪酸、乳酸、ガス	蟻酸、プロピオン酸、吉草酸
<i>Veillonella</i>	酢酸、プロピオン酸、ガス	
<i>Megasphaera</i>	酪酸、酢酸、カプロン酸、ガス	
<i>Lactobacillus</i>	乳酸	酢酸、ガス
<i>Enterococcus</i>	乳酸、酢酸	
<i>Escherichia coli</i>	酢酸、乳酸、蟻酸、ガス	アルコール

腸内細菌学 1990一部加筆

表2. 日本人の糞便中における短鎖脂肪酸(n=7)

短鎖脂肪酸	平均値±S.D.(mmol/kg)
Succinic acid	3.1±9.53
Lactic acid	11.6±7.22
Formic acid	9.0±3.17
Acetic acid	79.2±22.12
Propionic acid	31.8±10.58
<i>t</i> Butyric acid	4.8±6.32
Butyric acid	23.6±9.33
<i>t</i> Valeric acid	3.2±2.30
Valeric acid	4.2±2.63
Total SCFAs	170.4±36.25

Ikeda et al.1994

2) タンパク質の代謝

ヒトや動物のタンパク質代謝は、腸内細菌叢の影響を受けている。食品として摂取されたタンパク質は、胃内でペプシンによってペプトン、プロテオースペプトンに分解され、小腸内で胰液中のトリプシン、キモトリプシンによってポリペプチド、ジペプチドとなる。さらに、胰液のアミノペプチダーゼによりアミノ酸まで消化されて腸管から吸収される。小腸内では、通常腸内菌数は少なく腸内容物の移動は速やかであることから、食物が消化されて行く過程において腸内細菌叢の影響は少ない。腸内菌の影響は、おもに回腸下部から大腸に至る部分である。不消化食物残渣と剥離した粘膜、酵素などの内因性タンパク質がゆっくり移動する間に、水分の吸収がされると同時に、腸内細菌叢によるタンパク質の分解と合成が行われる。大腸に至る不消化タンパク質は、食物由来のタンパク質のおよそ10%と考えられている。図2に大腸におけるタンパク質(窒素源)の代謝とアミノ酸形成の概略を示す。

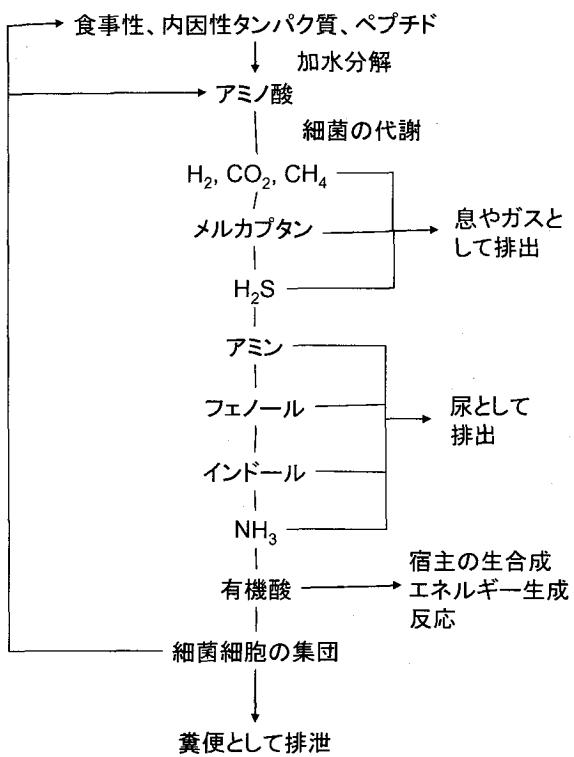


図2. 大腸における窒素源の代謝とアミノ酸形成
Macfarlane S et al. 1995

図3には、腸内細菌によって産生されるアミンとその前駆物質を示す。

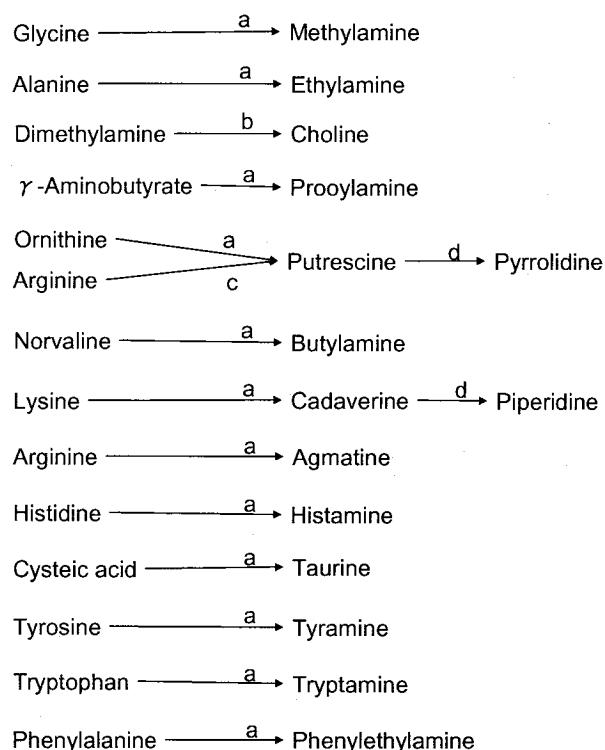


図3. 腸内細菌によって産生されるアミンとその前駆物質
 (a)Decarboxylation reaction, (b)N-dealkylation
 (c)decarboxylation and hydrolysis, (d)oxidative decarboxylation

Macfarlane S et al. 1995

表2に糞便中のアミン類の測定値を示す。

表2. 1日当たりの糞便中アミン排泄量 (mg/day)

被験者	A	B	C	Mean
Putrescine	0.92	1.34	5.62	2.63
Cadaverine	1.54	2.35	10.14	4.68
Histamine	0.46	ND	0.79	0.63
Spermidine	1.62	10.94	6.06	6.21
Spermine	t	t	0.41	0.41
Total	4.53	14.63	23.01	14.06

ND: 検出せず、t: 定量できないが微量に検出

その他のアミン類：動物で認められている agmatine、tryptamine、tyramine は上記の3名の被験者から検出されなかった。

Spermine と Spermidine の代謝

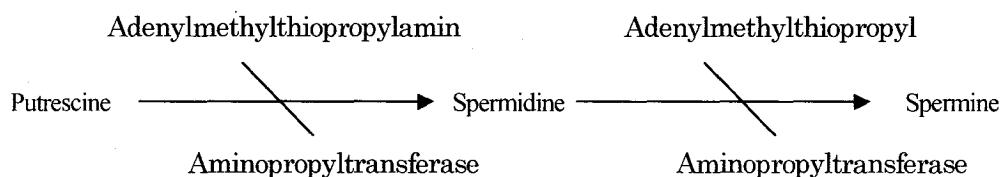


図4にヒト腸内菌の代謝により產生されるインドール、フェノール類を示す。

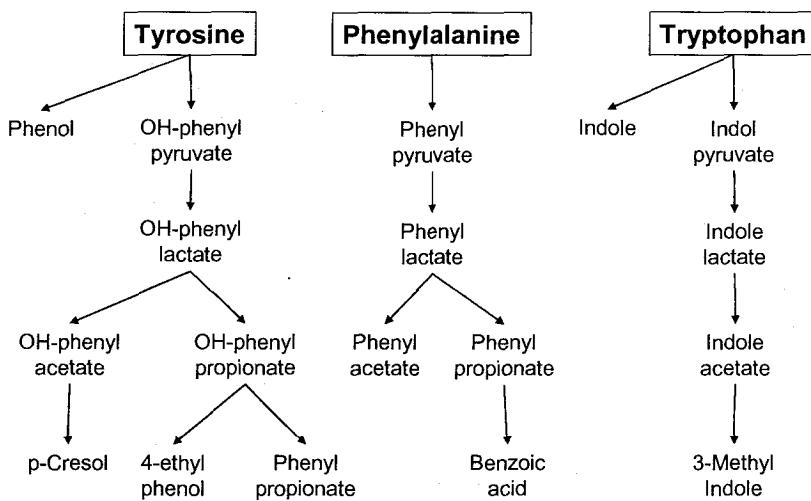


図4. ヒト腸内菌の代謝により產生されるインドール、フェノール類 Macfarlane S et al. 1995

表3に、日本人のヒト糞便中のフェノール類の正常値を示す。

表3. 日本人の糞便中におけるフェノール類(n=7)

物質名	平均値±S.D.(mmol/kg)
Phenol	0.02±0.02
<i>p</i> Cresol	0.56±0.11
4-Ethylphenol	0.06±0.11
Indole	0.38±0.12
Skatol	0.11±0.09
Ammonia	43.6±10.1

Ikeda et al. 1994

図5にその値の個人別分布を示す。

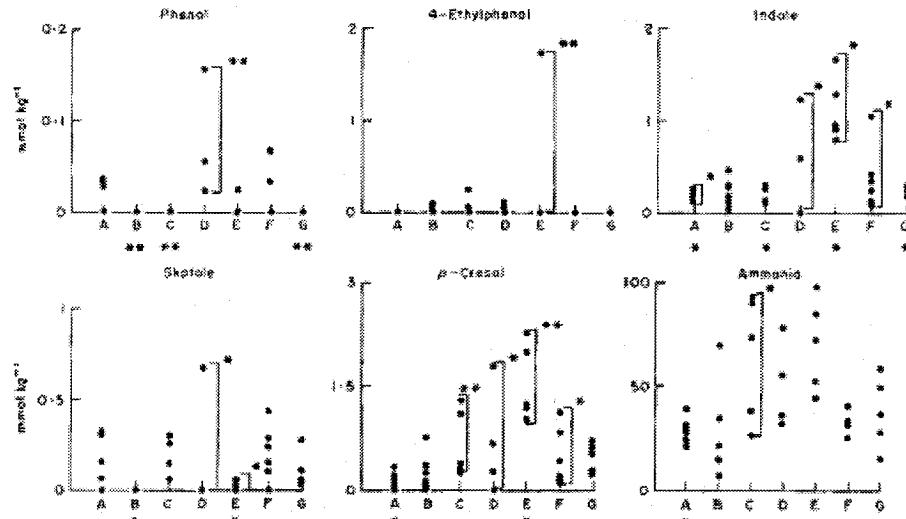


図5. ヒト糞便中のフェノール類およびアンモニアの分析結果の個人別ばらつき状況
Ikeda et al.1994

3) 脂質、胆汁酸の代謝

脂質の消化・吸収には、胆汁酸、脣リパーゼが関与する。胆汁酸は肝臓で作られ（一次胆汁酸）、胆汁として胆嚢に蓄えられ、グリシンやタウリンを結合した抱合胆汁酸として腸管へ送られる。胆汁はアルカリ性で、これらの酸はNa塩あるいはK塩として存在している。この胆汁酸塩の一部は腸内細菌によって脱抱合され、さらに還元され二次胆汁酸となる。無菌動物の胆汁および糞中には一次胆汁酸のみがみられ、有菌動物ではほとんど二次胆汁酸のみ存在する。代表的な一次および二次胆汁酸を図6に示す。腸肝循環の間に胆汁酸は腸内細菌による脱抱合反応、脱硫酸化反応、脱水酸化反応、酸化・還元および異性化反応など種々の変換を受ける。胆汁酸は大腸癌発症に対し、促進的に作用するが、二次胆汁酸の生成はその発症率を高めると報告されている。ヒト糞便中の胆汁酸の値を、表4に示した。論文により糞便の処理や単位が異なり、それぞれの値を直接比較することは困難で、統一した測定方法が望まれる。

胆汁酸の原料となるコレステロールの代謝も腸内菌が関与している。コレステロールは腸内菌によってコプロスタノンやコプロスタノールに変換される。

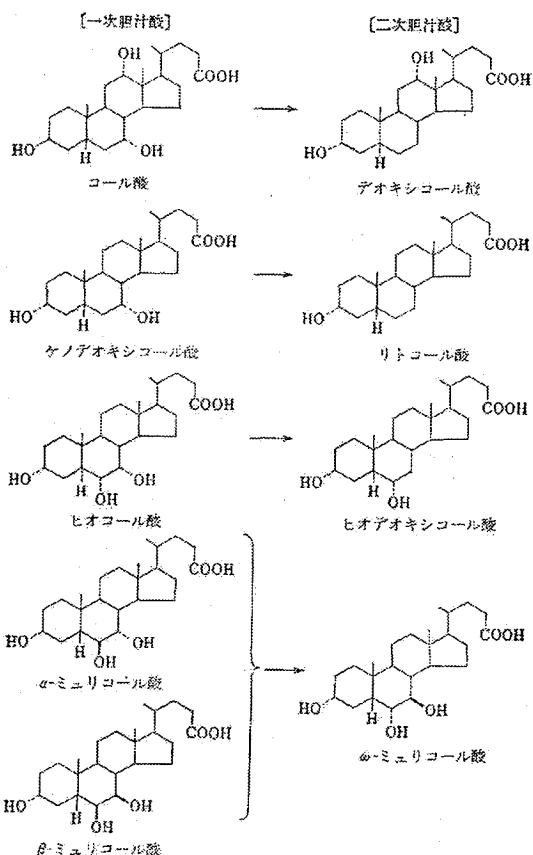


図6. 代表的な一次および二次胆汁酸 腸内細菌学1990

表4. ヒト糞便中の胆汁酸濃度

Reference	Kitahara M	Gaston SM	Haack VS	Hegnen MLA	Alberts DS	Connor WE	Batta AK
Year	2004	2000	1998	1998	2003	1983	1999
Unit	mg/g	μ mol/g	mg/g	μ mol/L	μ g/ml	μ g/mg	μ g/mg
	wet feces	wet feces	wet feces	fecal water	fecal water	dry feces	dry feces
DCA	0.132	2.46		215	504	5.88	2.49
LCA	0.091	0.95		80	11.4	5.58	2.03
CDCA		0.19		13	2.0	0.26	0.07
CA		0.17		28	103	0.35	
UDCA		0.12		3	1.9	0.27	
Other					243	2.53	
Total			9.37	450	1003	14.86	5.26
							7.7

4) その他

ニトロソ化合物とは亜硝酸と一级アミン、二级アミン、アミド類、尿素類、カルバミン酸、グアニジン酸、アミノ酸などと形成される化合物の総称で、その多くが強力な発癌性を有し、その腫瘍スペクトラムが広いことからヒトの多くの癌の原因として注目されている。特に、亜硝酸と二级アミンから形成されるニトロソアミンの酵素的生成に腸内菌が関わっている。このような癌関連物質をはじめ、腸内細菌が関与する毒性関連物質としては以下のようなものがある。

A. 化合物の活性化

植物配糖体、アゾ化合物、ニトロ化合物、IQ

B. 発ガン物質の合成

硝酸化合物の還元と N-ニトロソ化合物の合成、Fecapentaenes

C. 発ガンプロモーターの合成

二次胆汁酸、タンパク質およびアミノ酸代謝物*、Fecapentaenes

*腐敗物質はここに入ります。

表5. 毒性、遺伝毒性、発ガン性物質を産生する腸内細菌の酵素

酵素	基質
β -Glucosidase	植物配糖体 Amygdalin Rutin Franglucoside
Azoreductase	アゾ化合物 Benzidine-based dyes
Nitroreductase	ニトロ化合物 Dinitrotoluene Dinitrobenzene Nitrochrysene
β -Glucuronidase	胆汁のグルクロニド Benzo(a)pyrene 抱合体 IQ 抱合体 Benzidine 抱合体
IQ "hydratase-dehydrogenase"	IQ、MeIQ
Nitrate/Nitrite reductase	硝酸、亜硝酸化合物

表6. 腸内細菌により毒性化される植物配糖体

種類	配糖体	アグリコン	起源
Flavonol	Rutin	Quercetin	柑橘類
	Quercetin	Quercetin	ベリー類
	Robinin	Kaempferol	豆類
	Astragazin	Kaempferol	葉野菜類
	Tiliroside	Kaempferol	ハーブ、香辛料
Diterpenoid	Stevioside	Steviol	ステビア
	Rebaudioside A	Steviol	
Anthraquinone	Chrysazin glucoside	Chrysazin	
	Franguloside	Emodin	ルバーブ
	Quinizarin glucoside	Quinizarin	
	Lucidin 3-O-primveroside	Lucidin	セイヨウアカネ*
Azoxyl	Cycasin	Methylazoxymethanol	ゾテツ

*アカネ色素の毒性についてはアカネ色素に係る食品健康影響評価に関する審議結果として内閣府食品安全委員会で公表されています。

表7に日本人の糞便中酵素の測定値、図7、8にその個人的ばらつきを示す。

表7. 日本人の糞便中の主な酵素の測定値 (n=7)

物質名	平均値±S.D.(unit/g wt feces)
Azo reductase (units)	1.01±0.38
β -Glucuronidase	22.57±22.14
β -Glucosidase	33.57±20.51
Nitroso reductase	2.98±1.67
Nitrate reductase	1.98±3.32
Moisture (%)	76.2±5.98
pH	6.55±0.720

Ikeda et al.1994

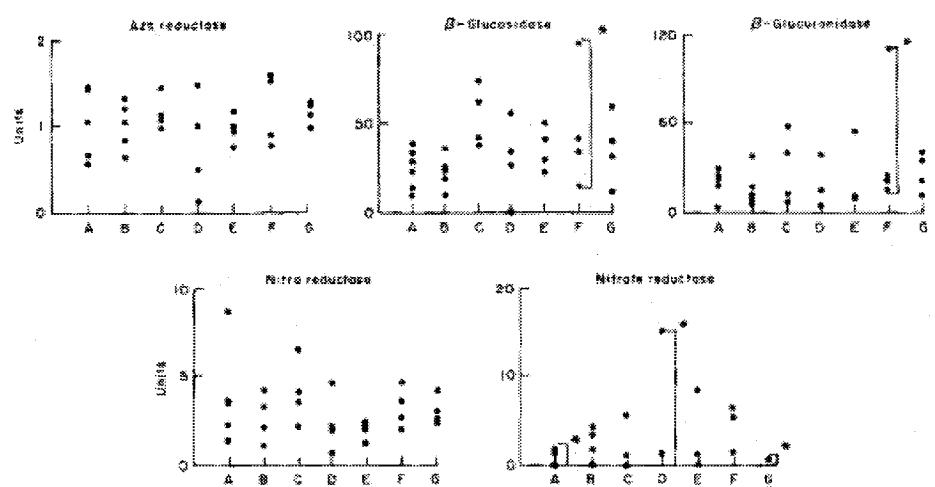


図7. ヒト糞便中酵素の分析結果の個人別ばらつき状況 Ikeda et al.1994

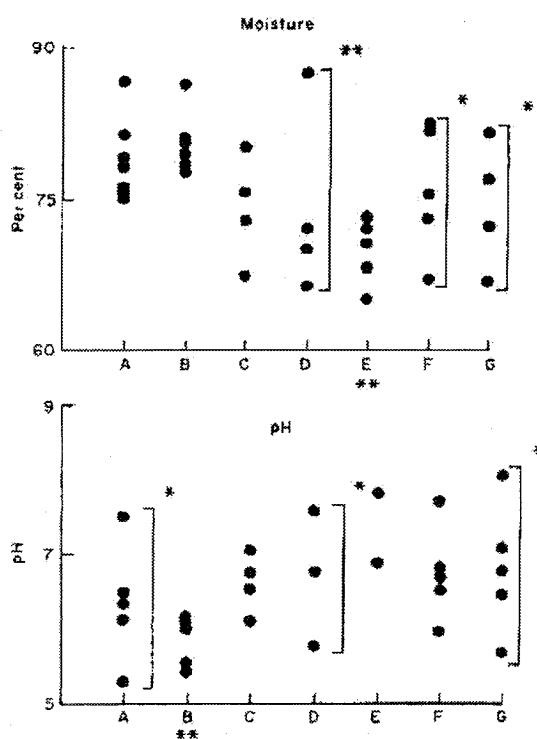


図8. ヒト糞便中、水分、pHの分析結果の個人別ばらつき状況
Ikeda et al.1994

追加文献

1. Sugawara M, Suzuki K, Endo K, Tashiro Y, Nakamura K, Suzuki K, Fujisawa T, Shiragami N, Mitsuoka T. Effect of dietary fat and fiber on fecal flora, bacterial metabolites, and fecal properties in Japanese volunteers. *J Nutr Sci Vitaminol* 38:317–28, 1992
2. Ikeda N, Saito Y, Shimizu J, Ochi A, Mizutani J and Watabe J. Variations in concentrations of bacterial metabolites, enzyme activities, moisture, pH and bacterial composition between and individuals in feases of seven healthy adults. *J Appl Bacteriol* 77:185–194, 1994
3. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62:67–72, 2003
4. Kitahara M, Sakata S, Sakamoto M and Benno Y. Comparison among Fecal Secondary Bile Acid Levels, Fecal Microbiota and *Clostridium scindens* Cell Numbers in Japanese. *Microbiol Immun* 48:367–375, 2004
5. Grasten SM, Juntunen KS, Poutanen KS, Gylling HK, Miettinen TA, Mykkanen HM. Rye bread improves bowel function and decreases the concentrations of some compounds that are putative colon cancer risk markers in middle-aged women and men. *J Nutr* 130:2215–2221, 2000
6. Haack VS, Chesters JG, Vollendorf NW, Story JA, Marlett JA. Increasing amounts of dietary fiber provided by foods normalizes physiologic response of the large bowel without altering calcium balance or fecal steroid excretion. *Am J Clin Nutr* 68:615–22, 1998
7. Heijnen ML, van Amelsvoort JM, Deurenberg P, Beynen AC. Limited effect of consumption of uncooked (RS2) or retrograded (RS3) resistant starch on putative risk factors for colon cancer in healthy men. *Am J Clin Nutr* 67:322–331, 1998
8. Alberts DS, Einstpahr JG, Earnest DL, Krutzsch MF, Lin P, Hess LM, Heddens DK, Roe DJ, Martinez ME, Salen G, Batta AK. Fecal bile acid concentrations in a subpopulation of the wheat bran fiber colon polyp trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:197–200, 2003
9. Batta AK, Salen G, Rapole KR, Batta M, Batta P, Alberts D, Earnest D. Highly simplified method for gas-liquid chromatographic quantitation of bile acids and sterols in human stool. *J Lipid Res* 40:1148–1154, 1999

4. ヒトフローラマウス/ラット、キモスタッフの利用

ヒト腸内細菌叢のシュミレーションとして無菌のマウス/ラットにヒトの糞便や分離菌を投与した動物は以前から用いられてきた (Hirayama, K. and Itoh, K.: Current Issues in Intestinal Microbiology, vol. 6: in press, 2005)。その使用にあたっては十分にヒトの腸内細菌叢を反映できないものもあるが、各種研究のモデル動物として使用されている。デンマークのDr. Lichtとの議論でも実験目的により、次に述べるキモスタッフを用いるかヒトフローラマウス/ラットを用いるかを検討する必要があるとの意見の一致をみた。

キモスタッフについては現在オランダTNOのDr. Venemaが開発したex-vivoシステム [Leads in Life Sciences, vol. 16, 3-7, 2002]とよばれているものが最もヒト腸内細菌叢のシュミレーションとしてすぐれているが、機械のサイズが通常の研究室に設置するには大きすぎること、また費用がかかることが、Dr. Venemaの指摘するようにこのシステムを評価システムとして一般に広く用いるための難点となっている。これ以外にも各種簡便なキモスタッフが用いられているので、これらのキモスタッフがシュミレーションとしての評価をどこまでできるかを検討する必要がある。キモスタッフは特に腸内代謝への影響をみると有効であると考えられる。文献18 [資料1-1]においてもこれらの有用性についてまとめられている。

その他腸内細菌叢構成の変化の結果としてのBacterial translocationの誘発や腸内代謝変化の結果としての発がんの誘発について、遺伝子改変動物の病態モデルを用いて検討する必要があると考える。

5. 検討委員会のまとめ

調査委員会の報告をもとに、検討委員会において今後の評価法の設定について議論された要旨を参考まで以下にまとめるとする。

1. 腸内フローラ構成菌のいわゆる正常値について、方法論が違うとその値も異なることがあるため、それぞれのデーターをどのように比較するかが問題となる。そのためには従来の培養法と近年急激に発展してきた、分子生物学的手法との比較検討が必要である。
2. GMMの腸内フローラの影響を評価するには、全ての構成菌を調べるより、ポイントとなる菌群、例えばこれまでの報告から各種病的状態において変動しやすい菌群について検査する方法が適当であると考えられる。具体的には *Bifidobacterium*、

Bacteroidaceae、*Clostridium perfringens*、*Lactobacillus*、*Enterobacteriaceae*、*Enterococcus*、*Staphylococcus*が候補としてあげられる。

3. 現在培養できない菌については、それがどのような菌であるかを調べる必要があるが、それらが生体にとってどのような意味かを明らかにする必要があり、ハイリスクの病気に対して「培養できない」では問題である。
4. 評価にあたっては指標（インディケーター）として何を調べるかが最も重要で、腸内フローラ、腸内代謝を含めた一つのモデル型を作成することで説得力が上がると考える。そのためにも病態と正常のデーターを比較検討する必要がある。
5. GMM に限らず腸内フローラが変動した時の指標として生体側の反応としてのバイオマーカーがあると評価しやすいが、現時点の知見からはバイオマーカーの設定は難しい。

6. 今後の検討課題

GMM のヒト腸内細菌叢への影響の安全性評価の方法として今後検討しなければならない点を以下にまとめる。

1. 腸内細菌叢の検査法（培養法、分子生物学的方法）の基準化
2. 腸内代謝の評価系としてのキモスタッフの作製
3. 安全性評価に用いるためのバイオマーカーの選定

以上の項目を検証するために次の事項が必要と考えられる。

1. ヒトそのものを用いて、健常人、病態患者での基礎的なデーターの収集。
2. モデル実験として GMM の乳酸菌と野生株の乳酸菌をヒトフローラマウス、簡易キモスタッフ、TNO キモスタッフで腸内細菌叢構成を培養法、FISH 法、PCR 法、DGGE 法で比較する。また各種腸内代謝産物を比較する。
3. また、がんの誘発は *rash₂* マウス（ヒトの発癌遺伝子 *c-Ha-ras* 遺伝子を導入されたトランスジェニックマウス）、Bacterial translocation はヌードマウスや NOG マウス（複合免疫不全 NOD/SCID/γ c^{null} マウス）のヒトフローラマウスを用いて検討する。

資料5-1

	Mitsuoka, 1976 成人	Mitsuoka, 老人	Mitsuoka, 日本人(農村)	カナダ(都市)	Mitsuoka, 長寿老人	Mitsuoka, 老人				
Total	11.2 ± 0.2	100	11.1 ± 0.2	100	10.9 ± 0.2	100	10.9 ± 0.3	100	11.1 ± 0.2	100
Bacteroides	10.9 ± 0.2	100	10.9 ± 0.3	100	10.7 ± 0.2	100	10.9 ± 0.2	100	10.8 ± 0.4	100
Eubacterium	10.4 ± 0.4	100	10.1 ± 0.7	100	10.5 ± 0.2	100	9.9 ± 0.4	100	10.2 ± 0.3	100
Peptococcus	10.2 ± 0.3	100	10 ± 0.6	100	9.6 ± 0.2	100	9.5 ± 0.4	88	10.2 ± 0.4	100
Bifidobacterium	10 ± 0.8	100	9.4 ± 0.8	85	10.3 ± 0.4	100	9.8 ± 0.4	63	9.6 ± 0.5	87
Megasphaera	9 ± 0.5	33	8.5 ± 1.1	17	8.4 ± 1.2	33	8.5 ± 1.2	0	9 ± 0.8	7
Veillonella	7.4 ± 1.2	79	5.2 ± 2	61	6.4 ± 2.1	78	4.9 ± 0.2	63	6.5 ± 2	100
Selenomonas	9.7 ± 0.5	24	9.3 ± 0.9	30	9.2 ± 0.5	33	9.7 ± 0.1	25	9.7 ± 0.6	53
Clostridium	9.5 ± 0.5	67	9.6 ± 0.8	100	7.7 ± 2.3	100	8.8 ± 0.9	100	8.7 ± 0.7	100
C. perfringens	4.4 ± 1.2	45	6.6 ± 2	83	5.4 ± 1.6	67	5.1 ± 0.5	38	6.6 ± 1.6	53
Enterobacteriaceae	7.8 ± 0.8	100	8.2 ± 1.3	100	6.8 ± 1.7	100	7.7 ± 1	100	8.5 ± 1	100
Enterococcus	7.9 ± 1.4	100	7.4 ± 1.6	100	7.7 ± 0.9	100	6.8 ± 1.6	100	7.1 ± 1.5	100
Lactobacillus	5.8 ± 2.1	91	7.5 ± 1.7	98	8.1 ± 1.4	78	6.8 ± 1.6	75	6.7 ± 1.8	100
Staphylococcus	3.1 ± 0.7	79	3.8 ± 1.2	44	3.1 ± 0.8	44	3.3 ± 0.5	13	3.3 ± 0.4	33
Corynebacterium	5.3 ± 2.2	36	4.7 ± 2	7	—	—	2.8 ± 0.5	25	—	0
Yeast	3.9 ± 1.6	43	4.7 ± 1.5	72	3.6 ± 1.5	89	2.9 ± 0.6	38	4.2 ± 1	87

	文献4	文献6	文献8 健常者	大腸炎・活動期	大腸炎・緩解期	クローン病・活動期
Total	10.3 ± 0.2	100	10.9 ± 0.2	100	10.8 ± 0.4	9.7 ± 0.7
Bacteroides	10.1 ± 0.2	100	10.6 ± 0.2	100	10.4 ± 0.5	9.9 ± 0.7
Eubacterium	9.3 ± 0.4	100	10.1 ± 0.4	100	9.4 ± 0.8	9.1 ± 1.2
Peptococcus	9.2 ± 1.1	67	9.8 ± 0.4	100	9.7 ± 0.8	8.8 ± 0.5
Bifidobacterium	9.4 ± 0.1	100	9.8 ± 0.3	100	9.8 ± 0.7	9.8 ± 0.8
Megasphaera	—	—	7.3 ± 11	—	—	—
Veillonella	6.5 ± 2.2	83	6.3 ± 0.6	78	7.4 ± 1.4	7.1 ± 1.7
Selenomonas	—	—	—	—	—	—
Clostridium	5.3 ± 1.7	100	9 ± 0.6	67	8.7 ± 1.3	7.1 ± 2.1
C. perfringens	5.2 ± 0.3	67	4.7 ± 1.1	44	—	—
Enterobacteriaceae	7.5 ± 1.8	100	7.9 ± 0.6	100	7.7 ± 1.1	8.2 ± 0.5
Enterococcus	7.4 ± 1.3	100	7.1 ± 1	100	7.3 ± 1	8.4 ± 0.7
Lactobacillus	5.7 ± 2	100	3.9 ± 0.9	88	6.5 ± 1.5	6.3 ± 1.9
Staphylococcus	3 ± 0.9	67	2.4 ± 0.2	44	3.4 ± 0.9	4 ± 1.9
Corynebacterium	—	—	—	—	—	—
Yeast	2.6 ± 0.4	67	3.1 ± 0.6	78	3.8 ± 1.2	4.6 ± 1.4

	文献11 大腸癌	健常人	文献12 健常人	文献19 健常人	文献23 健常人	文献26 健常人
Total	10.9 ± 0.3	100	10.6 ± 0.2	100	10.7 ± 0.2	100
Bacteroides	10.4 ± 0.2	100	10.4 ± 0.2	100	10.1 ± 0.2	100
Eubacterium	9.7 ± 0.3	100	9.9 ± 0.2	100	9.4 ± 0.6	100
Peptococcus	8.8 ± 0.8	100	9.4 ± 0.3	100	9.4 ± 0.4	100
Bifidobacterium	9.8 ± 0.6	89	9.5 ± 0.5	100	10.1 ± 0.3	100
Megasphaera	—	—	—	—	—	—
Veillonella	5.7 ± 1.1	33	5.3 ± 20	—	—	—
Selenomonas	—	—	—	—	—	—
Clostridium	8.6 ± 1.2	33	9 ± 20	—	—	—
C. perfringens	5.3 ± 0.7	56	4.7 ± 14	4	4.1 ± 2.2	58
Enterobacteriaceae	8.1 ± 0.6	100	7.5 ± 0.7	100	6.6 ± 1.5	100
Enterococcus	7.9 ± 1	89	7.3 ± 1.2	100	6.8 ± 1.2	100
Lactobacillus	8.3 ± 1.2	89	5.2 ± 1.9	100	5 ± 1.7	83
Staphylococcus	3.7 ± 0.4	56	0 ± 0	0	2.9 ± 0.7	58
Corynebacterium	—	—	—	—	—	—
Yeast	4.2 ± 0.5	89	3.8 ± 0.3	60	—	—

	文献34 高齢者	健常人	文献38 健常人	文献41 健常人	文献44 健常人	
Total	10.8 ± 0.2	100	11 ± 0.1	100	10.1 ± 0.8	100
Bacteroides	10.3 ± 0.2	100	10.8 ± 0.2	100	10.3 ± 0.3	100
Eubacterium	10.1 ± 0.4	100	9.8 ± 0.2	100	9.7 ± 0.4	100
Peptococcus	9.2 ± 1.2	33	9.6 ± 0.2	100	8.7 ± 0.4	56
Bifidobacterium	8.8 ± 1.1	100	10 ± 0.1	100	8.7 ± 1.3	67
Megasphaera	—	—	9.2 ± 0.2	63	9.6 ± 0.5	100
Veillonella	6.9 ± 2.1	33	7.4 ± 12	88	6.3 ± 1.2	83
Selenomonas	—	—	9 ± 0.5	75	—	—
Clostridium	9.6 ± 0.3	100	9 ± 0.4	88	9.3 ± 0.4	100
C. perfringens	—	—	5.7 ± 1.4	88	5.3 ± 0.7	55
Enterobacteriaceae	9 ± 1.2	100	8.6 ± 1.1	100	8 ± 0.7	100
Enterococcus	7.3 ± 1.7	100	8.4 ± 0.9	100	7.7 ± 1.1	100
Lactobacillus	5.9 ± 1.6	88	6.6 ± 1.2	88	4.7 ± 1.1	100
Staphylococcus	3 ± 0.9	88	4 ± 1.2	88	2.8 ± 0.5	69
Corynebacterium	3.7 ± 1.6	33	—	—	6.6 ± 1.2	100
Yeast	—	—	3.4 ± 0.6	88	3.5 ± 1.1	64

	Finegold, 1983 Vegetarian	Japanese	Western	Total		
Total	12.6 ± 0	100	11.8 ± 0	100	12.2 ± 0	100
Bacteroides	11.7 ± 0	100	10.8 ± 0	93	11.3 ± 0	100
Eubacterium	11 ± 0	92	10.6 ± 0	93	10.7 ± 0	94
Peptococcus	11.1 ± 0	23	10.2 ± 0	80	10.2 ± 0	45
Bifidobacterium	10.9 ± 0	69	9.7 ± 0	80	10.4 ± 0	74
Megasphaera	—	—	—	—	—	—
Veillonella	10.3 ± 0	85	10.7 ± 0	100	10.6 ± 0	94
Selenomonas	—	—	—	—	—	—
Clostridium	9.4 ± 0	92	9.7 ± 0	100	9.8 ± 0	100
C. perfringens	—	—	—	—	—	—
Enterobacteriaceae	—	—	—	—	—	—
Enterococcus	8.6 ± 0	100	8.7 ± 0	100	9.1 ± 0	100
Lactobacillus	11.1 ± 0	85	9 ± 0	73	9.3 ± 0	78
Staphylococcus	—	—	—	—	—	—
Corynebacterium	—	—	—	—	—	—
Yeast	—	—	—	—	—	—

資料5-2 (光岡原図を改変)

