

博士論文

系統分類に利用される DNA 領域を標的とした
食物アレルギー原因食物検出技術の開発研究

田口 大夢

目次

緒論	・ ・ ・ ・ ・	・ 1 - 10
第 1 章 : キウイフルーツとその近縁種の識別 PCR 検出技術に関する研究	・ ・ ・ ・	・ 11 - 34
第 2 章 : エビならびにカニの識別 PCR 検出技術に関する研究	・ ・ ・ ・	・ 35 - 69
第 3 章 : エビ / カニ識別 PCR 検出技術の実務検査への適用に関する研究	・ ・ ・ ・	・ 70 - 88
総括	・ ・ ・ ・ ・	・ 89 - 95
引用文献	・ ・ ・ ・ ・	・ 96 - 100
謝辞	・ ・ ・ ・ ・	・ 101

緒論

食物アレルギーの実態

日本では食物アレルギーを有する患者の正確な把握はなされていないが、全人口の 1~2%、乳児に限定すると、約 10%が何かしらの食物アレルギーを有すると考えられている。消費者庁が実施した「平成 24 年度即時型アレルギーによる健康被害の全国実態調査報告書（平成 25 年 3 月，消費者庁）」ならびに「平成 27 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書（平成 28 年 3 月，消費者庁）」によると、調査の協力医師数はほぼ変わらず、方法も変更していない状況で、平成 24 年度と比較して平成 27 年度で食物アレルギーの症例報告数は 57%増加している。また、これら調査以外に、地方自治体の調査においても、アレルギー患者が増加傾向であることが報告されている。

原因食物に関しては、鶏卵、牛乳、小麦が主で、これら上位 3 品目で 70%、落花生、果物類までの上位 5 品目で 80%、魚卵類、甲殻類、木の実類、魚類、そばまでの上位 10 品目で 95%を占める。また、これら原因食物の内訳は平成 24 年度と平成 27 年度とで変わっていないことから、特定の原因食物によってアレルギーを発症していることが分かる（図：緒 - 1）。年齢別の初発の原因食物をみると、平成 27 年度の調査において、魚卵類（1-2 歳：2 位、3-6 歳：1 位）、落花生（1-2 歳：3 位、3-6 歳：4 位）、木の実類（1-2 歳から増加、3-6 歳：2 位）となり、幼児で発症が多く見られた。また、果物類（3-6 歳：2 位、7-17 歳：1 位、18 歳以上：2 位）、甲殻類（3-6 歳：5 位、7-17 歳：2 位、18 歳以上：3 位）、小麦（7-17 歳：3 位、18 歳以上：1 位）については、学童から成人で発症が多く見られ、加齢と共に原因食物が多様化する傾向があった。食物アレルギーの主な症状は、痒み、蕁麻疹、唇・脛の腫れ、嘔吐、咳・ぜん鳴などがある。また、複数の臓器にわたり、急速に症状が現れるアナフィラキシー等のショック発生率は 10%前後と、一定の頻度で存在することも確認されている。ショック症状としては、血圧低下、意識障害などがある。

食物アレルギーの発症機会としては、平成 27 年度の調査（2540 症例）において、初発が 55.3%、誤食が 44.7%で、誤食のうち、表示ミスによる発症が 3.0%（140 例）であった。表示ミスによる誤食事故の原因食物の内訳は鶏卵、牛乳、小麦、落花生で全体の 90.7%を占めた。なお、平成 24 年

度の報告においても、表示ミスによる発症は同程度報告されている（表：緒 - 1）。このように食物アレルギーの実態を整理すると、患者の安全・安心の向上ならびに食の選択性拡大において、加工食品における食物アレルギー表示の重要性が理解できる。

食物アレルギーのメカニズム

食物アレルギーは、「食物によって引き起こされる抗原特異的な免疫学的機序を介して、生体にとって不利益な症状が惹起される現象」と定義される。食物アレルギー反応は、主に即時型のI型と遅延型のIV型があるが、アレルギー患者のほとんどはI型で、多くの場合、食後2時間以内に発症する。I型アレルギーのメカニズムの概要は次のとおりである。経口摂取後、吸収されたアレルゲンタンパクは異物として認識され、抗原提示細胞内に取り込まれる。その後、抗原提示されたナイーブT細胞はヘルパーT細胞（Th2型）に分化し、免疫反応が引き起こされる。Th2細胞が産生したインターロイキン-4は、B細胞を活性化し、活性化されたB細胞は各アレルゲン特異的なImmunoglobulin E (IgE) 抗体を産生する。IgE抗体は、マスト細胞上のIgE受容体に結合して感作が成立する。感作成立後、再度吸収されたアレルゲンタンパクはIgE抗体と架橋結合することで、ヒスタミン、ロイコトリエンなどの化学メディエーターが放出されて、アレルギー症状が誘発される。IV型アレルギーは、IgE抗体を介さず、T細胞が引き起こす反応で、アレルゲンタンパクを体内に取り込んで半日～数日経って発症する。メカニズムは未解明であるが、吸収されたアレルゲンタンパクはマクロファージ（Mφ）に取り込まれ、T細胞を刺激し、感作が成立する。感作成立後、再度吸収されたアレルゲンタンパクは、再びMφを介してT細胞に伝わり、活性化したT細胞が分泌する各種サイトカインによってリンパ球、好中球、好酸球、Mφが活性化し、炎症反応が誘発されると考えられている。

食物アレルギー表示

日本の食物アレルギー原因食物の表示制度ならびにその考え方については、穂山らが整理している（Akiyama et al., 2011）。日本では、2001年3月、アレルギー物質を含む食品に起因する健康危害の発生を防止する観点から、「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部

を改正する省令（平成 13 年厚生労働省令第 23 号）」に基づき、卵、乳、小麦、そば、落花生の 5 品目が特定原材料として定められた。これら 5 品目は、症例数、重篤度を勘案して表示する必要性が高いと判断され、表示が義務付けられた。また、併せて、あわび、いか、いくら、えび、オレンジ、かに、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんご、ゼラチンの 19 品目が特定原材料に準ずるものとして定められた。これら 19 品目は、特定原材料と比較して、症例数や重篤な症状を呈する患者数は少ないものの、継続して一定数存在するとして、表示が推奨された。表示制度の運用にあたっては、およそ 3 年ごとに行なわれる食物アレルギーによる健康被害の実態調査ならびに科学研究による新たな知見をふまえ、見直しが行なわれている。これまでに、2004 年にはバナナが推奨表示に追加、2008 年には推奨表示のえび、かにが義務表示に格上げ、2013 年には、ごま、カシューナッツが推奨表示に追加され、2017 年 6 月時点では、義務表示 7 品目、推奨表示 20 品目となっている。これら 27 品目で食物アレルギーによる症例全体ならびにショック症例のおよそ 95%がカバーされている。また、表示を必要とする原因食物の総タンパク量は、アレルギー症状を誘発しないであろうと考えられている ng/ml 濃度レベルより高い、数 μ g/g ならびに数 μ g/ml 以上含まれている場合とされている。

食物アレルギー原因食物の検査方法

アレルギー物質を含む食品の表示が定められた翌年の 2002 年には、「アレルギー物質を含む食品の検査方法について（厚生労働省医薬局食品保健部長通知 食発第 1106001 号）」によって、特定原材料 5 品目の検査方法が示された。これら方法は、地方衛生研究所などの公的試験研究機関による食品表示の検証に用いるために通知されたものである。検査法は技術進歩に対応し、見直しを行なうこととされており、これまでに改訂、追加が行なわれ、現在はスクリーニング検査（卵、乳、小麦、そば、落花生、甲殻類）と確認検査（卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに）となっている。なお、本研究に着手した 2004 年時点では、特定原材料に準ずる品目の検査法は開発されていなかった。2005 年からは厚生労働科学研究として、「食品の安心・安全確保推進研究事業：食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究」が始まり、特定原材料に準ずる品目の表示に対する信頼性確保のため、症例数の多い品目や重篤な症状の報告がある品目を優先して、検査法の開発が行なわれた。

なお、本研究の一部は上記研究事業において我々が取り組んだ内容を含む。

現在、食品中の食物アレルギー原因食物の検査は、平成22年9月に食品衛生法に基づく表示の所管が消費者庁に変更されるに伴い通知された「アレルギー物質を含む食品の検査方法について（平成22年9月10日付け 消食表第286号）」（「通知」）に示されている。検査は、スクリーニング検査としてEnzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) による定量検査、製造記録の確認、確認検査として卵、乳はWestern Blot、小麦、そば、落花生、えび、かにはPolymerase Chain Reaction (PCR) による定性検査の3段階で構成されている。検査手順ならびに判定は、「通知」別添2の判断樹に従い、食品への原材料表示、スクリーニング検査、製造記録、確認検査の結果を元に総合的に判断する。

検出技術に求められる性能

原料として使用していない食物アレルギー原因食物が製品に混入する場面は、栽培、収穫、貯蔵、輸送、製造など様々で、このような意図しない混入は極微量であると考えられる。そのため、食品製造において、工程の管理（専用ラインの使用、製造ラインの洗浄など）ならびに最終製品の保証に用いる検査には、極微量の原因食物を検出できる高い感度が求められる。また、生物分類学的に近縁な食物に共通して含まれるアレルゲンタンパクは、エピトープ部分のアミノ酸配列やタンパク全体の立体構造が類似するため、交差反応性を示す可能性が高いと考えられている。したがって、原因食物の検出対象は、主要な種に限らず、交配種、野生種も含めて、幅広く特異的に検出する必要がある。その一方で、食物アレルギー原因食物の種類、発症する摂取量、症状の程度、交差反応性の有無は、人それぞれで異なる。つまり、近縁種であっても、ある人にとっては原因食物であるが、他のある人にとっては摂取可能な食物となる場合がある。原因食物を回避する視点と共に、患者各々の食の選択性拡大の視点に立つと、交差反応性を示す割合が高い近縁食物であっても、一括表示ではなく、区別した個別表示が有益であり、検査にはその区別を可能にする識別能力が求められる。

DNA 配列をターゲットとした識別

食物アレルギー原因食物の総タンパク量測定の定量検査として ELISA がある。ELISA は抗原抗体反応を用いるため、高い感度を有する一方で、類似のアミノ酸配列や高次構造を持つアレルゲン

タンパクが存在する近縁種に対して偽陽性を示す場合がある。例えば、2017年6月現在、FASPEK エライザⅡ（森永生科学研究所社製）の交差反応性リストには、小麦 ELISA（No.040～）：ライ麦、大麦、エン麦などの穀類、そば ELISA（No.017～）：ごま、ナッツなどの果実類、落花生 ELISA（No.014～）：あわ、きびの穀類が偽陽性として公開されている。

ELISA 同様、原因食物を検出する方法として PCR がある。PCR は、アレルゲンタンパク自体を検出するわけではないが、原因食物に特徴的な DNA 配列を標的とすることで、食品中の原因食物の有無を検査できる。標的 DNA 領域はアレルゲンタンパクをコードする遺伝子の他に、系統分類に利用される領域として、核 DNA 上の rRNA 遺伝子の ITS 領域 (internal transcribed spacer region) や葉緑体 DNA 上の *matK* 遺伝子 (maturase K gene)、*rbcL* 遺伝子 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene)、ミトコンドリア DNA 上の 12S, 16S rRNA 遺伝子 (ribosomal RNA gene) などが挙げられる (表：緒 - 2)。ITS 領域は DNA 上にマルチコピー存在し、葉緑体やミトコンドリアは細胞内に多数存在する。また、これら領域は進化の過程で塩基配列が変異しやすい。このような性質を有することから、系統分類に利用される領域には高い感度と特異性が期待できる。(Poms et al., 2004、Sharma et al., 2002、Zhang et al., 1990)。系統分類に利用される DNA の塩基配列情報は、GenBank に多数登録されている。また、近年、DNA バーコーディング、つまり DNA の塩基配列情報を元に生物を同定する手法が提唱され、植物では葉緑体 DNA の *matK* や *rbcL* 遺伝子、動物ではミトコンドリア DNA の COI 遺伝子 (cytochrome c oxidase subunit I gene) の塩基配列の解読が進み、同定システムの整備が進められている。このように系統分類に利用される DNA 領域に着目することで、主要な食物ならびにその近縁種を含め、入手困難な種についても DNA 情報を取得可能である。幅広い食物の DNA 情報の比較は、PCR シミュレーションによるプライマーの特異性予測を可能にし、PCR 検出技術の識別能向上に繋がる。

検出技術の食品検査への適用性

タンパクと DNA とでは加工によるダメージの受け方が異なる。加工食品は製造工程や製品形態が多様なため、ELISA と PCR の両方で結果が一致しない場合も予想される。スクリーニング検査後の確認検査として PCR 試験を使用する場合、様々な加工食品において、原材料表示と ELISA 試験結果

に対して、PCR 試験結果の整合性が得られる必要がある。また、加工食品の検査においては、PCR 検出技術の性能だけでなく、抽出 DNA の品質も結果に影響を与える。そのため、DNA 抽出・精製ならびに抽出 DNA の品質評価は、より適した方法を用いる必要がある。

本研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では、核 DNA 上の rRNA 遺伝子の ITS 領域ならびにミトコンドリア DNA 上の rRNA 遺伝子といった系統分類に利用される領域をターゲットとして、食物アレルギー原因食物のうち、症例数が多く、また重篤な症状を引き起こす報告のあるキウイフルーツ、エビ/カニを対象に、近縁種を識別できる PCR 検出技術の開発を目的として、以下の研究を行なった。

第 1 章：キウイフルーツとその近縁種の識別 PCR 検出技術に関する研究

第 2 章：エビならびにカニの識別 PCR 検出技術に関する研究

第 3 章：エビ/カニ識別 PCR 検出技術の実務検査への適用に関する研究

第 1 章 キウイフルーツとその近縁種の識別 PCR 検出技術に関する研究

食物アレルギーの原因食物として推奨表示品目に指定されているキウイフルーツを対象に、キウイフルーツならびにその近縁種を PCR により特異的かつ高感度に識別検出する分析技術の開発を試みた。開発したキウイフルーツ PCR 検出技術の特異性、感度は、各種植物試料ならびに市販加工食品を用いて評価した。

第 2 章：エビならびにカニの識別 PCR 検出技術に関する研究

甲殻類アレルギー患者の中にはエビ/カニどちらか一方でのみ発症する方が存在する。そのため、食の選択性拡大の観点からは、エビとカニを甲殻類としての一括表示ではなく、別々に表示する個別表示が望まれる。そこで、生物分類学上の近縁種であるエビとカニを対象として、PCR により特異的かつ高感度に両者を識別検出する分析技術の開発を試みた。開発したエビ/カニ PCR 検出技術の特異性、感度は、各種甲殻類試料、モデル加工食品ならびに市販加工食品を用いて評価した。

第3章：エビ／カニ識別 PCR 検出技術の実務検査への適用に関する研究

開発したエビ／カニ識別 PCR 検出技術を検査に使用する場合、原材料、製造条件、食品形態が多様な加工食品に対して幅広く適用できる必要がある。そこで、市販加工食品を対象として、原材料表示と ELISA 試験結果に対する PCR 試験結果の整合性を評価するとともに、DNA 抽出ならびに抽出 DNA の品質評価について検討、考察した。

本論文は上記結果をまとめたものである。なお、内容については以下のとおり公表済である。

- 1) Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Watanabe T, Matsuda R, Urisu A, Maitani T. (2007). Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction. J. Agric. Food Chem. 55, 1649-1655.
- 2) Taguchi H, Watanabe S, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Sakata K, Urisu A, Teshima R. (2011). Differential detection of shrimp and crab for food labeling using polymerase chain reaction. J. Agric. Food Chem. 59, 3510-3519.
- 3) 田口大夢, 永富靖章, 菊池亮, 平尾宜司. (2014). 特定原材料えび・かこの PCR 確認検査法の適用性. 食品衛生学雑誌. 55, 1-12.

表：緒 - 1 表示ミスによる食物アレルギー発症の割合

	初発	誤食		表示ミス原因食物の内訳			
		表示ミス以外	表示ミス (症例数)	乳	小麦	鶏卵	その他
平成 24 年度	58.5%	39.0%	2.5% (75)	29	18	17	11
平成 27 年度	55.3%	41.7%	3.0% (140)	45	46	23	26

平成 24 年度、平成 27 年度食物アレルギー実態調査で報告された総症例数のうち、表示ミスによる症例割合ならびに原因食物の種類の内訳を示す。表は調査報告書の数値を元に作成した。

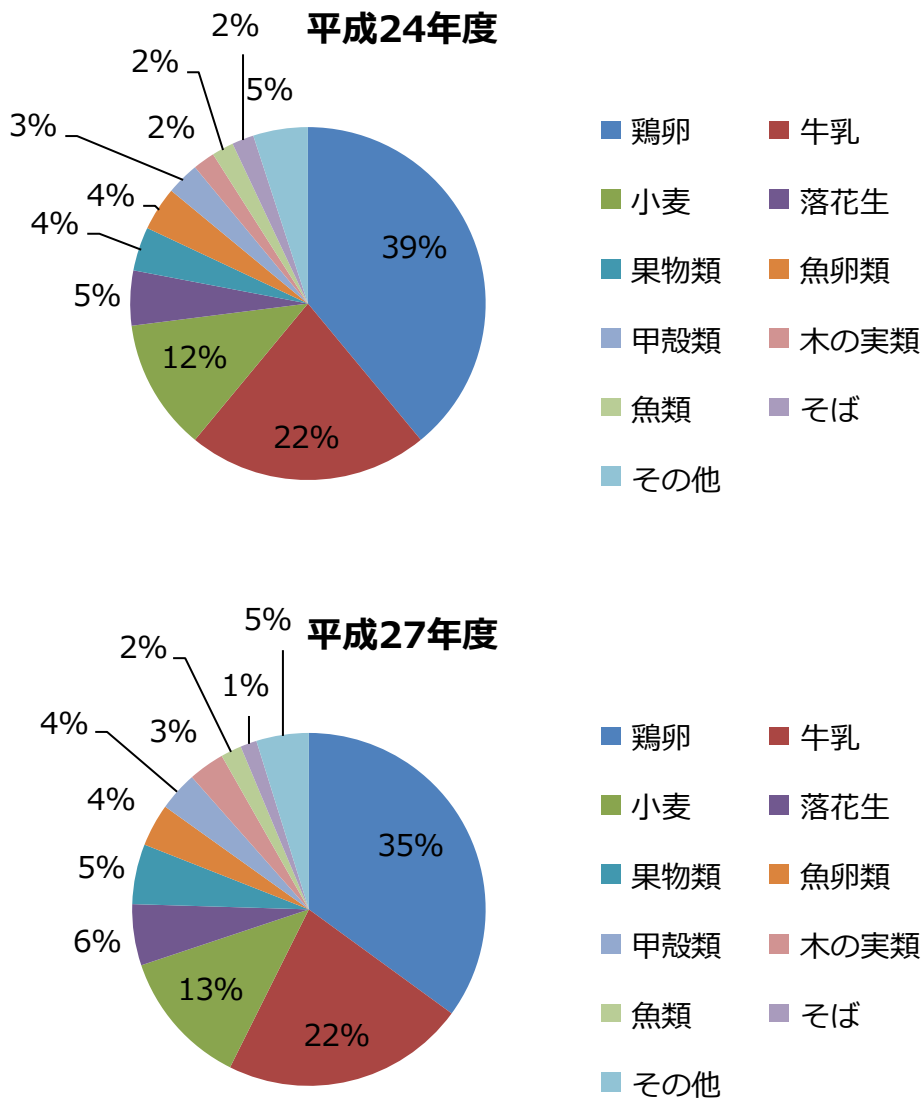
出典：平成 24 年度即時型アレルギーによる健康被害の全国実態調査報告書（平成 25 年 3 月，消費者庁）

出典：平成 27 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書（平成 28 年 3 月，消費者庁）

表：緒 - 2 系統分類に利用される DNA 領域

対象	領域	DNA
	rRNA 遺伝子の ITS 領域 internal transcribed spacer region	核
植物	<i>matK</i> 遺伝子 maturase K gene	葉緑体
	<i>rbcL</i> 遺伝子 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene	葉緑体
動物	rRNA 遺伝子 ribosomal RNA gene	ミトコンドリア
	COI 遺伝子 cytochrome c oxidase subunit I gene	ミトコンドリア

植物ならびに動物の系統分類に利用される代表的な DNA 領域を示す。本研究では、ITS 領域ならびに rRNA 遺伝子領域をプライマー設計に用いた。



図：緒 - 1 食物アレルギー原因食物の種類の内訳

平成 24 年度、平成 27 年度食物アレルギー実態調査で報告された食物アレルギー原因食物の種類の内訳を示す。図は調査報告書の数値を元に作成した。数値は総症例数に対する割合で示した。

出典：平成 24 年度即時型アレルギーによる健康被害の全国実態調査報告書（平成 25 年 3 月，消費者庁）

出典：平成 27 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書（平成 28 年 3 月，消費者庁）

第 1 章 キウイフルーツとその近縁種の識別 PCR 検出技術に関する研究

【序論】

キウイフルーツの種類と流通状況

キウイフルーツは、日本をはじめ、世界中で広く栽培されている果物の一つである。主にグリーンキウイ (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) とゴールドンキウイ (*A. chinensis* cv. Hort16A) の 2 種類の栽培品種がある。これらキウイフルーツに加え、同じアクチニジア属に属する植物であるサルナシ (*A. arguta*)、マタタビ (*A. polygama*) も生産量は少ないが、流通している。特にサルナシはキウイフルーツと形態が類似しているため、商業的にベビーキウイの名称で販売されている品種もある。また、日本においては、キウイフルーツと、サルナシやシマサルナシ (*A. rufa*) の交配種が作出、生産され、ジュースやジャムなどの加工食品としても消費されている。

キウイフルーツによる食物アレルギー

キウイフルーツによる食物アレルギーは、果物の中でも深刻なアレルギーの一つで、世界的に多数の臨床事例が報告されている (Eriksson et al., 2004)。平成 27 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書 (平成 28 年 3 月, 消費者庁) において、キウイフルーツは即時型症例で 7 位、ショック症例で 8 位であり、食物アレルギーを引き起こす果物の中で最多の症例数が報告されている。一般的な症状としては口腔アレルギー症候群 (口唇、舌、咽頭の痒みや腫れ) や蕁麻疹が挙げられる (Lucas et al., 2003、Lucas et al., 2004、Möller et al., 1998)。また、低血圧、動悸、アナフィラキシー発症事例も報告されている。なお、日本では 2001 年の食物アレルギー表示制度施行以降、キウイフルーツはアレルギー推奨表示品目に指定されている。

キウイフルーツの近縁種に対する交差反応性

キウイフルーツには幾つかのアレルゲンタンパクが報告されている。中でも、主要なアレルゲンであるアクチニジンは、サルナシやキウイフルーツとの交配種にも含まれることが報告されている (Boyes et al., 1997、Nishiyama et al., 2002、Pastorello et al., 1998、Yamanaka et al., 2004)。

そのため、キウイフルーツアレルギー患者は近縁種に対して交差反応性を示す可能性がある。一方、マタタビにはアクチニジンに含まれておらず、その他のアレルゲンに関する報告もないため、交差反応性を示すかどうかは不明である。

キウイフルーツの検出技術

アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック(平成 26 年 3 月, 消費者庁)に記載のとおり、果物の食物アレルギー表示を推奨しているのは日本(キウイフルーツ、オレンジ、モモ、リンゴ、バナナ)と韓国(モモ)に限られている。研究当時の 2005 年、DNA 配列を元にしたアクチニジア属植物のグループ分けに関する報告はあったが、PCR によって食品中のキウイフルーツを検出する技術に関する報告はなかった(Li et al., 2002)。

本章の目的

食物アレルギーの発症頻度ならびに重篤性が高いキウイフルーツとその近縁種を対象として、食物アレルギーの交差反応性を考慮した検出範囲の設定ならびに、それら対象を特異的かつ高感度に検出する PCR 検出技術の開発について研究を行なった。

【方法】

検出対象範囲の設定

キウイフルーツならびにその近縁種であるアクチニジア属植物において、交差反応性、アレルゲンタンパク含有の有無、育種実態、流通状況に関する情報を元に、アレルギー患者の安全と食の選択性拡大の観点から、検出範囲を設定した。

プライマー設計

プライマー設計には核 DNA 上の rRNA 遺伝子の ITS 領域を用いた。アクチニジア属 26 種を含むアクチニジア科 28 種ならびに食品として利用される 29 種類の植物、合計 57 種の DNA 配列を GenBank から収集した。複数の配列が登録されている場合は、グリーンキウイ (*A. deliciosa*) と最も相同性が高い配列を代表配列として使用した。さらに、市場に流通しているヘイワード (グリーンキウイ)、ホート 16A (ゴールデンキウイ)、ベビーキウイ (サルナシ)、マタタビについては、ダイレクトシーケンス解析で ITS 領域の塩基配列を同定した。解析ソフト CLUSTAL X、FROG-Win、SEQ-09 を用いて、これら塩基配列をアラインメントしたのち、プライマーを設計した。また、プライマーセットによる標的サイズの増幅産物の予想は、Amplify 1.0 software (Engels, 1993) を用いた PCR シミュレーションによって評価した。

ダイレクトシーケンス解析

ITS 領域を増幅するプライマーセット (Masamura et al., 2014) を用いて PCR を行なった。増幅産物を QIAquick PCR purification kit (QIAGEN 社製) で精製し、DNA Sequencing Ready Reaction PreMix (Applied Biosystems 社製) のマニュアルに従い、BigDyePCR を行なった。増幅産物を AutoSeq™ G-50 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) で精製し、シーケンスを実施した。試薬、機器はそれぞれ POP-6™ (Applied Biosystems 社製)、シーケンサーABI PRISM 310 (Applied Biosystems 社製) を用いた。

植物試料ならびに市販加工食品

ハイワード（グリーンキウイ）、ホート 16A（ゴールデンキウイ）、一オ（サルナシ）、ベビーキウイ（サルナシ）、さぬきゴールド（キウイフルーツの交配種）、香粹（サルナシとグリーンキウイの交配種）、信山（サルナシとグリーンキウイの交配種）、マタタビ を市場で入手した。その他の食用植物として、リンゴ、アロエ、アズキ、アボカド、バナナ、ブルーベリー、チェリー、イチジク、ブドウ、カキ、マンゴ、メロン、オレンジ、パパイア、ピーチ、ナシ、パイナップル、プラム、ラズベリー、ミカン、イチゴ、ウメ、トウモロコシ、コメ、ダイズ、コムギを市場で入手した。市販加工食への検出技術の適用性確認に用いる試料として、ヨーグルト 2 品（キウイフルーツ／サルナシ）、シリアル（キウイフルーツ）、クッキー（キウイフルーツ）、ジャム（キウイフルーツ）、ジャム（サルナシ）、ドライキウイフルーツ、ジュース 2 品（キウイフルーツ）、ジュース（サルナシ）、グミキャンディ（キウイフルーツ）の計 11 製品ならびにキウイフルーツを含有しない 3 製品（ドライフルーツ入りシリアル、果物・野菜入りジュース、グレープフルーツ入りクッキー）を入手した。

植物試料の DNA 抽出

DNA 抽出は Genomic-tip 20/G（QIAGEN 社製）を用いて行なった。植物試料を MM300 ミキサーミル（Retsch 社製）で粉碎したのち、50 ml 容のプラスチック製の遠心チューブに、2 g を量り込み、20 ml の Buffer G2 ならびに 20 μ l の RNase A (100 mg/ml)、200 μ l の proteinase K (20 mg/ml) を加えて、よく混合し、50℃で 2 時間保温した。その後、3,000 \times g で 10 分間遠心分離し、上清を得た。得られた上清を、予め 1 ml の Buffer QBT で平衡化した Genomic-tip 20/G に供して DNA をカラムに吸着させた。その後、4 ml の Buffer QC でカラムを洗浄し、50℃に加熱した 1 ml の Buffer QF で溶出し、イソプロパノール沈澱により回収した沈澱物を 20 μ l の TE 溶液（pH 8.0）に溶解した。DNA 濃度は 260 nm の吸光度より算出し、DNA 溶液は TE 溶液（pH 8.0）で 20 ng/ μ l に調製して、PCR の鋳型として使用した。

希釈系列の調製

感度確認のために用いた DNA 200 pg~2 fg/μl 溶液は、各 DNA 溶液をサケ精子 DNA (20 ng/μl、Sigma Chemical 社製) 含有 TE 溶液 (pH 8.0) で段階希釈して調製した。

市販加工食品の DNA 抽出

製品は包装内容物全てをミキサーミルで均質に粉砕したのち、植物試料同様に、Genomic-tip 20/G を用いて DNA 抽出を行なった。なお、DNA 収量が少ない、または PCR 検査適用不能と判定された製品については、試料スケールならびに試料の洗浄工程の追加を検討した。

植物検出 PCR

抽出 DNA の PCR 検査適用可否の判定に用いる植物検出 PCR には、葉緑体 DNA 上の一部領域を増幅する植物検出用プライマー (CP03-F&CP03-R) (Watanabe et al., 2006) を用いた。PCR の反応液組成と反応条件は表 : 1 - 1, 2 に示す。なお、プライマーは FASMAC 社製、PCR 反応試薬は Life Technologies 社製を用いた。

キウイフルーツ検出 PCR

F151&R182 ならびに F123&R178 の 2 種類のプライマーセットによる PCR は、AmpliTaq Gold (Applied Biosystems 社製) を用いて行なった。PCR は、表 : 1 - 3 に示す組成の溶液 25 μl を 0.2 ml 容 PCR チューブ (Applied Biosystems 社製) に入れ、表 : 1 - 4, 5 に示す PCR 反応条件に設定した PCR 装置 (Applied Biosystems 社製、GeneAmp PCR system 9600) で行なった。増幅産物の解析は、PCR 反応液 10 μl をエチジウムブロマイド含有の 3%アガロース電気泳動に供して、蛍光イメージアナライザー (Bio-Rad Laboratories 社製、ChemiDoc XRS illuminator) で解析した。なお、アガロースは、高濃度での調製が可能な NuSieveTM アガロース (LONZA 社製)、検出用プライマーは FASMAC 社製、PCR 反応試薬は Life Technologies 社製を用いた。

【結果】

検出範囲の設定

アクチニジア属食用植物を対象に、主要アレルゲンタンパクであるアクチニジンを含むか否かで線引きして2パターンの検出範囲を設定した。一つは、アクチニジア属植物を対象とした（グループ A）。もう一つは、キウイフルーツと交差反応性が予想されるサルナシ、シマサルナシならびにそれらの交配種を対象とした（グループ B）（表：1 - 6）。

プライマー設計

高い感度と特異性を得るため、核 DNA 上にマルチコピー存在し、系統分類に利用される ITS-1 領域を標的とした。プライマーの 3' 末端塩基に、検出対象のアクチニジア属植物に共通し、アクチニジア科の他属（*Clematoclethra* 属、*Saurauia* 属）ならびに他の食用植物とは異なる塩基を用い、アクチニジア属食用植物を検出するプライマーセット A ならびにマタタビを除くアクチニジア属食用植物を検出するプライマーセット B を設計した（表：1 - 7）。さらに、プライマーセット B のフォワードプライマーは、検出範囲の植物に幅広く対応するため、プライマーの 3' 末端から 2、3 塩基目が異なる塩基からなる 3 種類のプライマーを混合して採用した。各プライマーセットの増幅産物長は、A で 74 bp、B で 92 bp であった（図：1 - 1）。

PCR シミュレーションによる増幅予測

設計したプライマーセット A、B において、検出対象のアクチニジア属食用植物から標的サイズの増幅産物が予想された（表：1 - 8）。なお、プライマーセット A では、野生種を含むすべてのアクチニジア属植物から標的サイズの増幅産物が予想された。その他の食用植物については、プライマーセット A でメロンから 49 bp、アボカドから 39 bp の標的サイズとは異なる増幅産物が予想されたが、その他の植物からは予想されなかった。

プライマーセット A の特異性と感度

実際の PCR により、アクチニジア属植物検出用のプライマーセット A の特異性ならびに感度を評価した。特異性の結果を図：1 - 2 に示す。ハイワード、ホート 16A、一才、ベビーキウイ、マタタビ DNA 各 50 ng から、74 bp の標的サイズの増幅産物が得られた。得られた増幅産物の塩基配列を解析した結果、全ての産物でアクチニジア属植物の ITS-1 領域内の標的配列を増幅していることが確認された。なお、ミカン、カキ、オレンジ DNA から非特異的な増幅産物が得られたが、標的サイズとは明確に異なり、区別できるものであった。次に、感度については、図：1 - 3 に示すとおり、3 種類の交配種（香粹、信山、さぬきゴールド）を含む、アクチニジア属植物 DNA 各 50 fg から標的サイズの増幅産物が得られた。

プライマーセット B の特異性と感度

実際の PCR により、マタタビを除くアクチニジア属植物検出用のプライマーセット B の特異性ならびに感度を評価した。特異性の結果を図：1 - 4 に示す。ハイワード、ホート 16A、一才、ベビーキウイ DNA 各 50 ng から、92 bp の標的サイズの増幅産物が得られた。一方、マタタビからは増幅産物は得られなかった。得られた増幅産物の塩基配列を解析した結果、全ての産物でアクチニジア属植物の ITS-1 領域内の標的配列を増幅していることが確認された。なお、いくつかの果物や穀物 DNA からは非特異的な増幅産物が得られたが、標的サイズとは明確に異なり、区別できるものであった。次に、感度については、図：1 - 5 に示すとおり、3 種類の交配種（香粹、信山、さぬきゴールド）を含む、アクチニジア属植物 DNA 各 500 fg から標的サイズの増幅産物が得られた。

市販加工食品の分析

キウイフルーツまたはサルナシを原材料として含有する 11 種類ならびに不含有の 3 種類の加工食品を用いて、キウイフルーツ PCR 検出技術の性能を評価した。その結果を表：1 - 9 に示す。抽出 DNA 濃度は、ヨーグルト、シリアル、クッキーで 20 ng/μl 以上、その他製品では 20 ng/μl 未満で、中でもジャム、ドライフルーツ、グミキャンディは低濃度であった。また、PCR 試験では、キウイフルーツまたはサルナシを含有する 11 製品のうち、No.5 ジャム、No.7 ドライキウイ、No.11 グミキ

キャンディを除く 8 製品で、標的サイズの増幅産物が得られた。不含有の 3 製品からは増幅産物は得られなかった。両キウイフルーツ検出 PCR で「陰性」であった No.5 ジャムならびに No.11 グミキャンディは、試料重量を 10 倍にして抽出を行なった結果、検出可能であった。また、No.7 ドライキウイは、表面の洗浄を行なったのち、試料粉碎、DNA 抽出することで増幅産物が得られた。なお、「キウイフルーツ検出 PCR : 陽性」でも「植物検出 PCR : 陰性」であった No.9 ジュースについては、抽出 DNA のゲル電気泳動の結果、100 bp 付近にスメアバンドが広がり、DNA の断片化が確認された（データ示さず）。

PCR 試験キットの提供

開発したキウイフルーツ PCR 検出技術のうち、マタタビを含むアクチニジヤ属植物を検出可能なプライマーセット A については、陽性コントロールプラスミドの作製を試薬メーカーと共同で行なった。現在、プライマーとプラスミドをセットにした「キウイフルーツ検出プライマー」（FASMAC 社製）としてキットが提供、販売されている。

【考察】

キウイフルーツと近縁種の交差反応性を考慮した検出範囲の設定

キウイフルーツは日本だけでなく、ニュージーランドをはじめ世界中で広く栽培、消費される果物の一つである。主に市場に流通するキウイフルーツは、グリーンキウイ (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) とゴールデンキウイ (*A. chinensis* cv. Hort16A) の2種類がある。また、キウイフルーツと比較して流通量は少ないものの、キウイフルーツの近縁種、具体的にはサルナシ、シマサルナシ、マタタビならびにキウイフルーツとそれら近縁種との交配種が市場で入手可能である。このようにキウイフルーツ以外にも近縁種が食用として流通していることから、検出対象範囲の設定が必要であった。キウイフルーツによる食物アレルギーは日本だけでなくヨーロッパを中心に数多く報告されており、中には極微量の摂食によって発症するケースも報告されている (Yamamoto et al., 1995)。キウイフルーツのアレルゲンタンパクとしては、キウイフルーツ中タンパク質の約 50%を占めるアクチニジン (分子量約 25,000) がよく知られており、その他にもキチナーゼ関連タンパク質などの報告がある (Bublin et al., 2004)。西山らは、アクチニジンがグリーンキウイ以外に、一オ (サルナシ) や信山 (グリーンキウイとサルナシの交配種) にも含まれることを報告している (Nishiyama et al., 2002)。一方、Lucas らは、グリーンキウイアレルギー患者の IgE 抗体に対して、アクチニジン含有量が少ないゴールデンキウイが交差反応を示し、アレルギー症状を引き起こしたことを報告している (Lucas et al., 2005)。このことから、主要アレルゲンタンパクであるアクチニジンの含有量だけでは交差反応性を判断できないことが分かる。なお、マタタビは、キウイフルーツと形態、サイズが大きく異なる。また、アレルゲンタンパク含有量に関する情報が乏しく、さらにサルナシやシマサルナシとは違い、マタタビにキウイフルーツを交配する場合、結実する可能性が極めて低い (Matsumoto et al., 2009)。以上の情報を元に、食物アレルギーの原因食物としてのキウイフルーツの範囲は、まずは健康危害の防止を第一に、キウイフルーツとその近縁種をまとめて検出対象とすべきと考えられた。次に、日本の市場で流通する食用となるアクチニジア属植物のうち、キウイフルーツやサルナシと比較して果実の外観で区別が可能で、他の近縁種との交配の可能性が少ないマタタビを除いたキウイフルーツ近縁種をもう一つの検出対象に設定した。

PCR シミュレーションを用いたプライマーの設計

核 DNA 上に存在し、系統分類に利用される ITS-1 領域を候補として用いた。Genbank には種々の植物由来 ITS 領域が登録されており、2017 年 6 月時点で、検索キーワード「internal transcribed spacer region」で約 7 万の配列が登録されている。本研究では、キウイフルーツが属するアクチニジヤ科植物 33 配列、うちアクチニジヤ属植物 31 配列を収集した。食用として利用されるキウイフルーツ、サルナシなどの配列は 10 配列で、その他 23 配列は野生種の配列であった。Genbank 登録配列をプライマー設計に用いるメリットは 3 つある。一つ目は、日本で流通していない種や野生種など、入手困難な近縁種の配列情報を予め考慮して設計できる点、二つ目は、アクチニジヤ属と同科に属する他属の配列を比較することで、アクチニジヤ属特徴的な配列を見出すことができる点、三つ目は、PCR シミュレーションによって、プライマーセットにおける様々な植物種に対するキウイフルーツの特異性ならびに増幅効率を評価できる点である。本研究では、アクチニジヤ属植物に特徴的な領域にプライマーセットを設計できた。また、PCR シミュレーション予測結果と実際の PCR 結果が一致した。これまでに、平尾らや渡辺らも穀物ならびに果物検出用プライマーの設計に PCR シミュレーションを利用しており、本研究でもその有効性を確認できた(Hirao et al., 2005、Hirao et al., 2006、Watanabe et al., 2012)。

PCR シミュレーションでは、標的配列におけるプライマーセットによる増幅の有無を予測評価する。プライマー配列は 20~30 塩基からなるため、特異性は高く、その組み合わせであるプライマーセットによって、非標的配列から標的サイズの増幅産物が得られる可能性は低いと考えられる。ただし、実際の PCR はゲノム DNA を鋳型とするため、非特異的に増幅が生じる可能性はある。そこで、さらなるプライマーの特異性予測としては、「対象植物：アクチニジヤ科を除く植物、対象 DNA：ITS 領域を除く DNA 配列」に対して、フォワード/リバーズ各プライマー配列で Blast 検索を行ない、そこでヒットした相同性の高い配列に対して、PCR シミュレーションを実施する方法が考えられる。

キウイフルーツ検出 PCR の特異性と感度

プライマーセット A、B を用いた PCR で、キウイフルーツ、サルナシ、交配種ならびにマタタビを特異的かつ高感度に検出できることを示した。特異性については、アクチニジア属植物の野生種は食品としての利用はなく、また食品への混入の可能性も低いため、検出の有無を考慮する必要はないと考えられたが、安全性を優先して、プライマーセット A では全てのアクチニジア属植物を検出できるようにした。感度については、両プライマーセットともに、マトリクス DNA 50 ng 中のキウイフルーツ DNA 50~500 fg、DNA 濃度換算で 1~10 ppm (w/w)、を検出可能であった。この DNA 濃度レベルは、既存の小麦、そば、落花生、大豆 PCR 検出技術の感度 (50 fg~5 pg DNA) と同等で、高い感度を有すると考えられた (Hirao et al., 2009)。

市販加工食品の分析

キウイフルーツ、サルナシを原料に使用した製品を用いて、開発したキウイフルーツ検出 PCR の性能を評価した。プライマーセット A、B とともに、グミキャンディ (グミ) を除き、全ての製品で標的サイズの増幅産物が得られた。グミでは、キウイフルーツ香料や色素としてキウイフルーツジュースが使用されていた。このことから、不検出の原因はグミ中のキウイフルーツ原料が極微量であったためと予想される。なお、キウイフルーツタンパク濃度の正確な算出には、ELISA による定量が必要である。グミの他、抽出 DNA 量が 20 ng/μl 以下のジャム、ジュース、ドライフルーツでは、試料表面洗浄による狭雑物の除去ならびにサンプル量のスケールアップが効果的であった。単一植物の DNA 溶液とは異なり、食品の検査では様々な原料由来の成分が混在するため、PCR にも影響を及ぼすことが確認できた。

【まとめ】

日本の食物アレルギー表示制度において、食物アレルギーの原因食物として推奨表示品目に指定されているキウイフルーツを対象に、キウイフルーツならびにその近縁種を PCR により特異的かつ高感度に識別検出する分析技術の開発を試みた。なお、開発したキウイフルーツ検出 PCR の感度、特異性は、各種植物試料ならびに市販加工食品を用いて評価した。

- 1) アレルゲンタンパク含有量の有無、キウイフルーツとの育種交配の可否、交差反応の可能性など、アレルゲン性を有するかどうかの視点から、検出対象範囲を 2 パターン設定した。一つはキウイフルーツ、サルナシ、マタタビなどのアクチニジア属食用植物、もう一つはマタタビを除いたアクチニジア属食用植物である。
- 2) 系統分類で利用される核 DNA 上の rRNA 遺伝子の ITS-1 領域の配列に、検出対象特徴的な塩基をフォワード/リバース両プライマーの 3' 末端塩基に設置したプライマーセットを設計した。実際の PCR では、キウイフルーツをはじめとする検出対象のアクチニジア食用植物を特異的かつ高感度に検出できた。
- 3) キウイフルーツ検出 PCR によって、キウイフルーツならびにサルナシ原料が使用される市販加工食品の検査が可能であった。検査困難な製品については、DNA 抽出スケールのアップならびに試料洗浄による改善効果が見られたことから、加工食品の検査にはさらなる DNA の量、品質の向上が必要であると考えられた。

表：1 - 1 植物検出 PCR の反応液組成

	final con.
10xPCR buffer II	1×
dNTP (2 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0.025 U/ml
F-primer (25 μM)	0.2 μM
R-primer (25 μM)	0.2 μM
template DNA	
distilled Water	
total vol.	25 μl

表：1 - 2 植物検出 PCR の反応条件

initialization	:	95°C	-	10 min	} ×40 cycles
denaturation	:	95°C	-	0.5 min	
annealing	:	60°C	-	0.5 min	
extension	:	72°C	-	0.5 min	
final extension	:	72°C	-	7 min	

表：1 - 3 キウイフルーツ検出 PCR (A、B) の反応液組成

	final con.
10xPCR buffer II	1×
dNTP (2 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0.025 U/ml
F-primer (25 μM)	0.5 μM
R-primer (25 μM)	0.5 μM
template DNA	
distilled Water	
total	25 μl

表：1 - 4 キウイフルーツ検出 PCR (A) の反応条件

initialization	:	95°C	-	10 min	} ×50 cycles
denaturation	:	95°C	-	0.5 min	
annealing	:	60°C	-	0.5 min	
extension	:	72°C	-	0.5 min	
final extension	:	72°C	-	7 min	

表：1 - 5 キウイフルーツ検出 PCR (B) の反応条件

initialization	:	95°C	-	10 min	} ×40 cycles
denaturation	:	95°C	-	0.5 min	
annealing	:	60°C	-	0.5 min	
extension	:	72°C	-	0.5 min	
final extension	:	72°C	-	7 min	

表：1 - 6 キウイフルーツ検出 PCR の検出範囲

	taxonomic name (common name)	primer set	
		A	B
genus Actinidia	<i>A. deliciosa</i> (Kiwifruit)		
	<i>A. chinensis</i> (Kiwifruit)		
	<i>A. arguta</i> (Sarunashi)	target	target
	<i>A. rufa</i> (Shimasarunashi)	target	
	interspecific hybrids ^{*1}		
	<i>A. polygama</i> (Matatabi)		non-target

プライマーセット A、B の検出範囲を示す。^{*1} キウイフルーツ間、またはキウイフルーツと近縁種間の交配種。

表：1 - 7 プライマーの塩基配列

primer set	No.	sequence (5' → 3')	blend ratio	PCR product (bp)
A	forward	F151 GTGACACTCTCATTCCCCG	0.5	74
	reverse	R182 TTGCATTCTTGTTCAAGTTCCTTGA	0.5	
B		F123-1 CGGGTGTGCTCGTGCTG	0.5	92
	forward ^{*1}	F123-2 CGGGTGTGCTCGTGTTG		
		F123-3 CGGGTGTGCTCGTGCCG		
	reverse	R178 CTTGTTCAAGTTCCTTGACGCG		

プライマーセット A、B のフォワード、リバース各プライマーの塩基配列、フォワードとリバースプライマーの混合割合ならびに PCR 増幅産物長を示す。一本下線：混合塩基を設定した位置。^{*1} F123 フォワードプライマーは、F123-1, 2, 3 を等量混合して用いた。

表 : 1 – 8 プライマーセット A、B の特異性予測

taxonomic name (common name)	GenBank accession No.	weight No. ^a (amplicon size) ^b	
		A	B
family Actinidiaceae			
genus Actinidia			
e.g., <i>Actinidia deliciosa</i> (Kiwifruit, Hayward)	AB253775	6	6
<i>Actinidia chinensis</i> (Kiwifruit, Hort16A)	AB253776	5	6
<i>Actinidia deliciosa</i>	AF323830	6	6
<i>Actinidia arguta</i> (Sarunashi, Issai)	AB253777	5	5
<i>Actinidia arguta</i> (Sarunashi, Baby kiwi)	AB253778	5	6
<i>Actinidia arguta</i>	AY216736	5	6
<i>Actinidia arguta</i>	AF323836	5	6
<i>Actinidia arguta</i>	AF323835	5	6
<i>Actinidia polygama</i> (Matatabi)	AB253779	5	–
<i>Actinidia polygama</i>	AF323796	5	–
<i>Actinidia callosa</i>	AF323829	6	6
<i>Actinidia glaucophylla</i>	AF323798	5	6
<i>Actinidia hemsleyana</i>	AF323802	4	–
<i>Actinidia henanensis</i>	AF323841	6	6
<i>Actinidia indochinensis</i>	AF323810	5	6
<i>Actinidia kolomikta</i>	AF323837	5 (75 bp)	–
<i>Actinidia latifolia</i>	AF323825	5	6
<i>Actinidia macrosperma</i>	AF323834	5	6
<i>Actinidia melanandra</i>	AF443211	5	6
<i>Actinidia melliana</i>	AF323821	5	5
<i>Actinidia persicina</i>	AF323814	5	–
<i>Actinidia rufa</i>	AF323838	5	6 (93 bp)
<i>Actinidia rufa</i>	AF323839	5	5 (93 bp)
<i>Actinidia sabiifolia</i>	AF323813	5	6
<i>Actinidia zhejiangensis</i>	AF323819	5	–
other genera			
e.g., <i>Clematoclethra lasioclada</i>	AF323805	–	–
<i>Saurauia zahlbruckneri</i>	AF396452	–	–

表：1 - 8 プライマーセット A、B の特異性予測（続き）

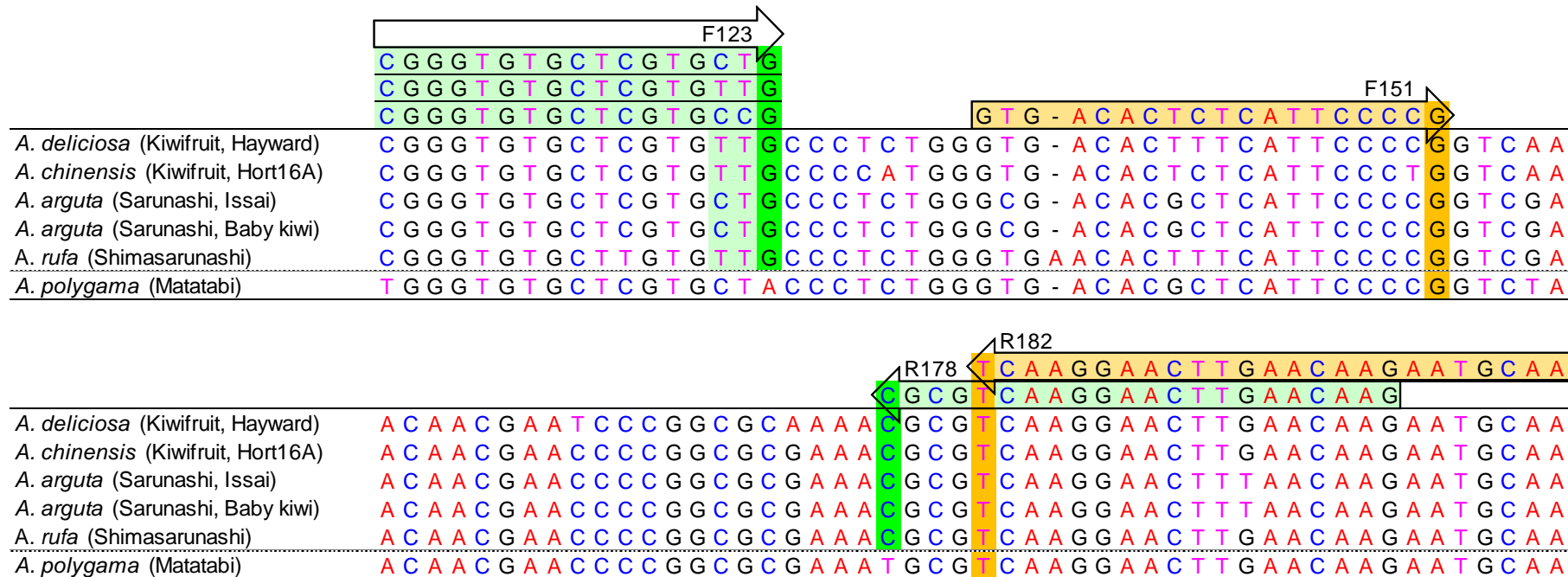
taxonomic name (common name)	GenBank accession No.	weight No. ^a (amplicon size) ^b	
		A	B
plants used for food (containing major fruits)			
e.g., <i>Carica papaya</i> (papaya)	AY461547	—	—
<i>Cucumis melo</i> (melon)	CME488233	2 (49 bp)	—
<i>Fragaria x ananassa</i> (strawberry)	AF163494	—	—
<i>Malus domestica</i> (apple)	MDU16195	—	—
<i>Mangifera indica</i> (mango)	AB071674	—	—
<i>Musa beccarii</i> (relative of banana)	AF434900	—	—
<i>Persea americana</i> (avocado)	AF272322	2 (39 bp)	—
<i>Prunus armeniaca</i> (apricot)	AF318756	—	—
<i>Prunus avium</i> (cherry)	AF318737	—	—
<i>Prunus domestica</i> (plum)	AF318713	—	—
<i>Prunus mume</i> (japanese apricot)	AF318728	—	—
<i>Prunus persica</i> (peach)	AF318741	—	—
<i>Pyrus calleryana</i> (pear)	PCU16202	—	—
<i>Rubus idaeus</i> (raspberry)	AF055757	—	—
<i>Vaccinium corymbosum</i> (blueberry)	AF419778	—	—
<i>Vitis rotundifolia</i> (grape)	AY037922	—	—
<i>Arachis hypogaea</i> (peanut)	AF156675	—	—
<i>Fagopyrum esculentum</i> (soba)	AB000330	—	—
<i>Glycine max</i> (soybean)	AF144654	—	—
<i>Oryza sativa</i> (rice)	AF169230	—	—
<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	AM040486	—	—
<i>Zea mays</i> (corn)	U46648	—	—

プライマーセット A、B によって、各植物種の ITS 領域の DNA 配列から予想された増幅産物のサイズならびに増幅反応の起こりやすさを示す。^a プライマーと標的配列の合致度と結合強度から算出された増幅反応の起こりやすさの目安 (1 - 6) で、数値が大きいと可能性が高い。^b Taq DNA polymerase が有する terminal transferase 活性を加味せず、シミュレーションソフトで予想されたよりも 2 bp 短いサイズで示した。標的サイズ (A, 74 bp; B, 92 bp) とは異なるサイズの増幅産物が予想された場合にサイズを記載した。

表：1 - 9 市販加工食品を用いたプライマーセットの評価

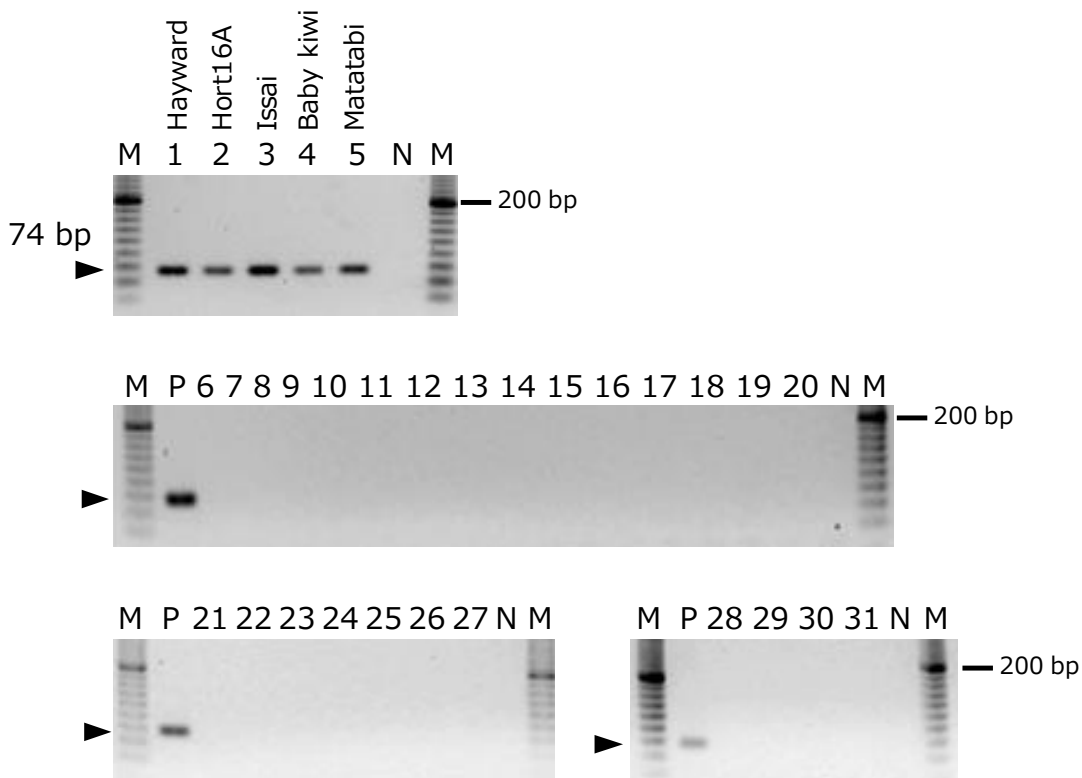
No.	sample	concentration of template DNA (ng/ μ l)	plant PCR ^a	kiwifruit PCR ^a	
				A	B
commercial products containing kiwifruit or sarunashi					
1	yogurt with mixed fruit pieces	20	+	+	+
2	yogurt with kiwifruit pieces only	20	+	+	+
3	cereal with dry fruit mix	20	+	+	+
4	kiwifruit cookie	20	+	+	+
5	a kiwifruit jam (\times 1)	<10	+	-	-
	b kiwifruit jam (\times 10)	20	+	+	+
6	sarunashi jam	<10	+	+	+
7	a dried kiwifruit	<10	+	-	-
	b dried kiwifruit (washing)	<10	+	+	+
8	fruit drink mixed fruits including kiwifruit	11	+	+	+
9	a 100% kiwifruit juice (\times 1)	<10	\pm	+	+
	b 100% kiwifruit juice (\times 10)	20	-	+	-
10	10% sarunashi juice	<10	+	+	+
11	a gummy candies (\times 1)	<10	+	-	-
	b gummy candies (\times 10)	<10	+	\pm	-
commercial products without kiwifruit in the list of ingredients					
12	cereal with dry fruit mix	20	+	-	-
13	cookie with grapefruit jam	20	+	-	-
14	fruit and vegetable drink	15	+	-	-

キウイフルーツならびにサルナシを使用した市販加工食品に対する植物検出 PCR ならびにキウイフルーツ検出 PCR の結果を示す。^a 試料ごとに N=2 で DNA 抽出、PCR を実施した。標的サイズの増幅産物の検出数 (分子) / 総試験 (分母) の結果を以下のように示した。+, 2/2 ; \pm , 1/2 ; -, 0/2。



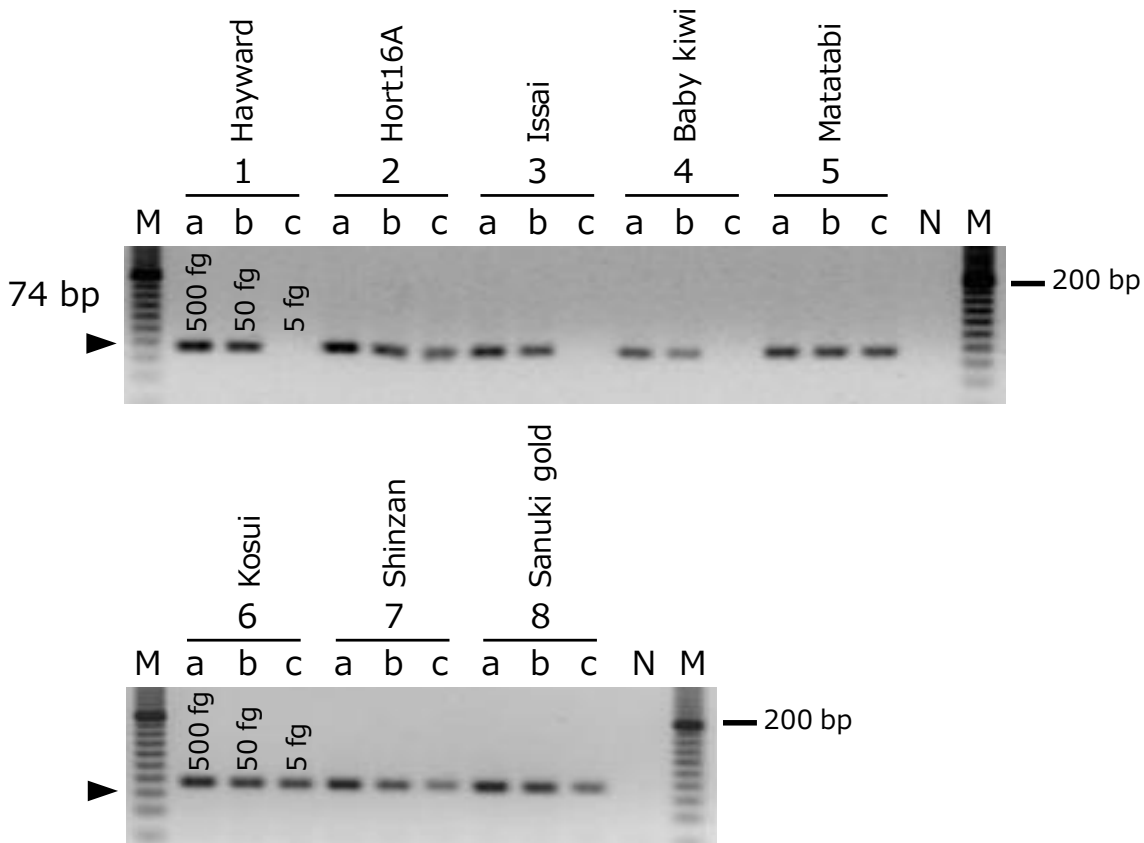
図：1-1 ITS-1 領域上のプライマーの設計位置

プライマーセット A (F151&R182) ならびに B (F123&R178) のフォワード/リバース各プライマーの位置を示す。F123 と R178 の 3' 末端塩基は、マタタビの配列に対して mismatches を設置した。F123 は 3' 末端塩基から 2、3 塩基目を C と T の混合塩基とした。



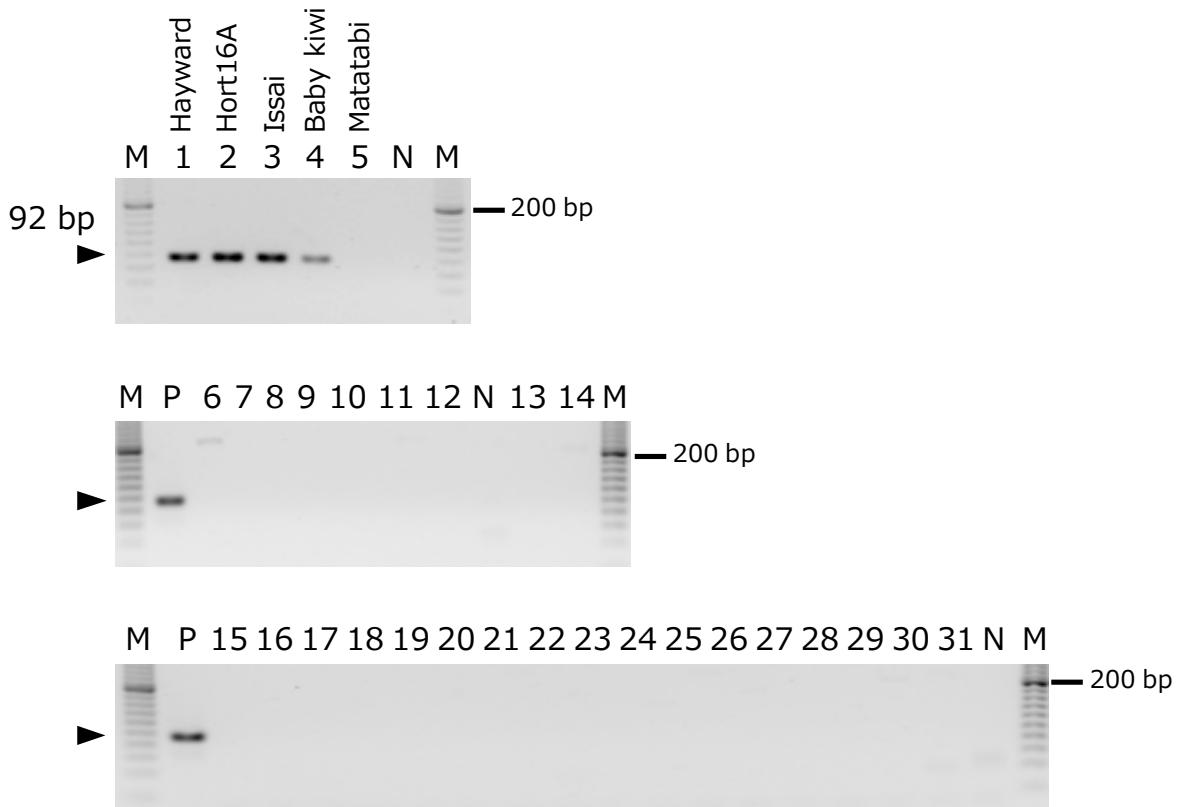
図：1-2 プライマーセットAの特異性

プライマーセットAを用いたキウイフルーツ検出PCRの増幅産物の電気泳動結果を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。lanes 1 - 5, ヘイワード (1), ホート 16A (2), 一才 (3), ベビーキウイ (4), マタタビ (5); lanes 6 - 20, アロエ (6), パイナップル (7), パパイア (8), オレンジ (9), ミカン (10), メロン (11), カキ (12), イチジク (13), イチゴ (14), リンゴ (15), マンゴ (16), バナナ (17), アボカド (18), アズ (19), サクラambo (20); lanes 21 - 27, ウメ (21), モモ (22), スモモ (23), ナシ (24), ラズベリー (25), ブルーベリー (26), ブドウ (27); lanes 28 - 31, コムギ (28), コメ (29), ダイズ (30), コーン (31) DNA 50 ng; N, 陰性コントロール (水); P, 陽性コントロール (ヘイワード DNA 50 ng); M, 20 bp ladder marker。



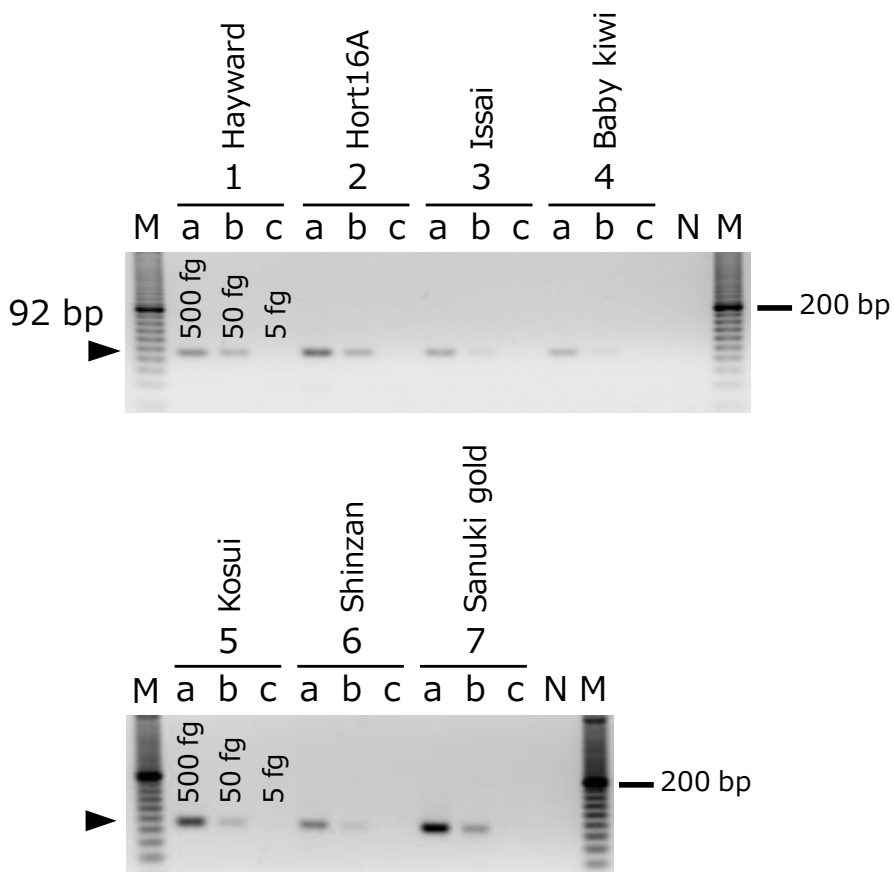
図：1-3 プライマーセットAの感度

プライマーセット A を用いたキウイフルーツ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。lanes 1 - 5, ヘイワード (1), ホート 16A (2), 一才 (3), ベビーキウイ (4), マタタビ (5); lanes 6 - 8, 香粹 (6), 信山 (7), さめきゴールド (8); lanes a - c, DNA 500 fg (a), 50 fg (b), 5 fg (c); N, 陰性コントロール (水); M, 20 bp ladder marker.



図：1-4 プライマーセットBの特異性

プライマーセット B を用いたキウイフルーツ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。lanes 1 - 5, ヘイワード (1), ホート 16A (2), 一才 (3), ベビーキウイ (4), マタタビ (5) ; lanes 6 - 14, アロエ (6), パイナップル (7), パパイア (8), オレンジ (9), ミカン (10), メロン (11), カキ (12), イチジク (13), イチゴ (14) ; lanes 15 - 31, リンゴ (15), マンゴ (16), バナナ (17), アボカド (18), アンズ (19), サクランボ (20), ウメ (21), モモ (22), スモモ (23), ナシ (24), ラズベリー (25), ブルーベリー (26), ブドウ (27), コムギ (28), コメ (29), ダイズ (30), コーン (31) DNA 50 ng ; N, 陰性コントロール (水) ; P, 陽性コントロール (ヘイワード DNA 50 ng) ; M, 20 bp ladder marker。



図：1-5 プライマーセットBの感度

プライマーセット B を用いたキウイフルーツ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。lanes 1 - 4, ヘイワード (1), ホート 16A (2), 一才 (3), ベビーキウイ (4) ; lanes 5 - 7, 香粹 (5), 信山 (6), さぬきゴールド (7) ; lanes a - c, DNA 500 fg (a), 50 fg (b), 5 fg (c) ; N, 陰性コントロール (水) ; M, 20 bp ladder marker。

第2章：エビならびにカニの識別 PCR 検出技術に関する研究

【序論】

甲殻類の食物アレルギー

エビ、カニなどの甲殻類は日本をはじめ、多くの沿岸諸国で消費されている。特にエビはアジア各国から日本に輸出され、製品の原料としても加工されている。甲殻類は食物アレルギー原因食物として知られており、臨床事例も多く報告されている (Lehrer et al., 2003)。一般的な症状としては、皮膚症状 (蕁麻疹、痒みなど) や呼吸器系症状 (呼吸困難、喘鳴など) が知られており、さらに、過敏な患者は極微量の摂取によってアナフィラキシーを引き起こすこともある (Tomikawa et al., 2006)。食物アレルギー表示に関しては、食物アレルギー患者への注意喚起のために、エビ、カニは多くの国々で甲殻類として表示が推奨されている。日本においても、2002年4月に表示に関する制度が施行され、この時点では義務表示ではなく、推奨表示に指定された。その後、海老澤らは、「食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質の確定、予防・予知法の確立に関する研究 平成17年度総括・分担研究報告書」において、エビやカニに対してアレルギーを有する患者数は義務表示5品目に次いで多いことを報告している。また、この報告では、約65%のエビアレルギー患者がカニと交差反応性を有していること、つまり約35%のエビアレルギー患者はカニに反応を示さず、摂食可能であることも示されている。このような情報をふまえ、2008年の表示制度の改定では、エビとカニは甲殻類としての一括表示ではなく、個別表示として、義務表示品目に格上げされた。

エビとカニの分類

食用となる甲殻類は、主にエビ、カニ、オキアミ、アミ、シャコがある。オキアミ、アミはエビと外観が類似するが、分類学上は上目 (superorder) や目 (order) ドメインで異なる。一方、エビとカニは外観での区別が可能だが、分類学上は図:2-1に示したとおり、同じ十脚目 (decapoda) に属し、下目 (infraorder) 内で区別される。つまり、エビは Dendrobranchiata (根鰓亜目) ならびに Pleocyemata (抱卵亜目) の Caridea (コエビ下目)、Astacidea (ザリガニ下目)、Achelata (イセエビ下目) に分類され、カニは Pleocyemata (抱卵亜目) の Brachyura (短尾下目) ならびに Anomura (異尾下目) の Lithodidae (タラバガニ科) に分類される。

甲殻類の検出技術

日本の表示制度における加工食品中の食物アレルギー原因食物の検査は、ELISA によるスクリーニング検査と PCR による確認検査を組み合わせて実施する。PCR は、ELISA で陽性となった試料の偽陽性を排除するために用いられ、正確な食物アレルギー原因食物の検査のために必要である。現在、「通知」には2種類の ELISA 試験が記載されており、「通知」別添 5「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」で示された基準を満たしている (Sakai et al., 2008、Seiki et al., 2007、Shibahara et al., 2007)。ELISA はエビとカニ共通のアレルゲンタンパクであるトロポミオシンを標的としている。トロポミオシンは甲殻類間で高いアミノ酸相同性を有するため、ELISA ではエビとカニを区別することは困難である。日本の表示制度では、エビとカニを区別して記載する必要があり、加工食品における表示の妥当性を確認するためには、エビとカニを識別できる検査方法の開発が必要である。

本章の目的

特定原材料 5 品目に次いで症例数が多く、推奨表示品目に指定されていた (2008 年には義務表示品目に格上げ) エビならびにカニを対象として、生物分類学的に近縁に位置する両者を特異的かつ高感度に識別検出する PCR 技術の開発について研究を行なった。

【方法】

プライマー設計

エビとカニが属する十脚目ならびに近縁のオキアミ目、アミ目、シャコ目において、属ドメイン毎に少なくとも 1 配列以上、合計約 400 の 16S rRNA 遺伝子領域の配列を GenBank から入手した。さらに、市場で購入した各種甲殻類について、ダイレクトシーケンス解析によって 16S rRNA 遺伝子配列を決定した。解析ソフト CLUSTAL X、FROG-Win、SEQ-09 を用いて、これら塩基配列をアラインメントしたのち、プライマーを設計した。また、プライマーセットによる標的サイズの増幅産物の予想は、Amplify 1.0 software (Engels, 1993) を用いた PCR シミュレーションによって評価した。

動植物試料

エビ 15 種 (クルマエビ, アカエビ, ブラックタイガー, シバエビ, サクラエビ, シマエビ, アマエビ, ボタンエビ, スキャンピー, オマールエビ, アメリカザリガニ, イセエビ, ウチワエビ, キューバロブスター, アキアミ)、カニ 13 種 (ズワイガニ, ベニズワイガニ, タカアシガニ, ケガニ, ダンジネスクラブ, オオエンコウガニ, ワタリガニ, シャンハイガニ, アサヒガニ, タラバガニ, アブラガニ, ハナサキガニ, イバラガニ)、その他の甲殻類 3 種 (オキアミ, イサザアミ, シャコ) ならびに甲殻類以外の魚介類、植物は市場で購入し、幾つかはマルハニチロ社から提供頂いた。

モデル加工食品の作製

PCR の感度を評価するために 6 種類のモデル加工食品を作製した。ブラックタイガー/タラバガニの凍結乾燥筋粉末 (マルハニチロ社より提供) を可溶性タンパク 10 $\mu\text{g/g}$ 製品重量 (最終濃度) で材料に添加した。なお、筋粉末タンパク濃度は 2-D Quant Protein assay kit (GE Healthcare 社製) を使用して測定した。モデル加工食品は以下のとおり作製した。

凍結乾燥スープ ; 玉葱のみじん切りをサラダ油で炒め、馬鈴薯デンプンを入れたのち、水、チキンコンソメ、みりん、凍結乾燥筋粉末を入れ、中火 (100°C 達温) でとろみが付くまで攪拌した。ポイルしたブロッコリーとニンジンのスープに加え、冷蔵庫で -80°C に冷却したのち、50°C で凍結乾燥した。

米粥 ; 米、水、凍結乾燥筋粉末を混合し、炊飯器で調理した。

味噌スープペースト；味噌、水、凍結乾燥筋粉末をフードプロセッサーで混合したのち、レトルトパウチに入れ、86℃の恒温オーブンで5分間処理し、その後5分間流水で冷却した。最後に麩と乾燥ネギを混合した。

しらたき麺スープ；乾燥しらたき、市販の粉末スープを別々にフードプロセッサーで混合したのち、凍結乾燥筋粉末とともに製品中の重量比に合わせて再度混合した。

ふりかけ；揚げおかき（もち米、植物油、でんぷん、食塩、タンパク加水分解物、アミノ酸などの調味料）、粉けずり（かつお、かれぶし）、有機すりごま（黒ごま、白ごま）、塩、凍結乾燥筋粉末を混合したのち、105℃、5分間乾燥した。

クリームコロッケ（日本水産社より提供）；バターを溶かし、小麦粉を入れ、焦がさないように弱火で4分間炒めたのち、温めておいた牛乳を少しずつ加え、泡立器で混ぜながら、なめらかなソースを作製した。でん粉、塩、砂糖、胡椒、凍結乾燥筋粉末を加え、調味した。混合物をパン粉で包み、-20℃の冷蔵庫で冷却した。

チキンミートボール（マルハニチロ社より提供）；鶏ササミ、ラード、砂糖、片栗粉、凍結乾燥筋粉末をプロセッサーで均質混合した。練り混ぜた混合物をケースに入れ、-20℃の冷蔵庫で冷却した。

DNA 抽出

DNA 抽出は Genomic-tip 20/G (QIAGEN 社製) を用いて行なった。50 ml 容のプラスチック製の遠心チューブに、生原料 0.2 g または加工食品の場合は 2 g を量り込み、2 または 20 ml の Buffer G2、ならびに 20 μ l の RNase A (100 mg/ml)、200 μ l の proteinase K (20 mg/ml) を加えて、よく混合し、50℃で2時間保温した。その後、3,000 \times g で10分間遠心分離し、上清を得た。得られた上清を、予め1 ml の Buffer QBT で平衡化した Genomic-tip 20/G に供して DNA をカラムに吸着させた。その後、4 ml の Buffer QC でカラムを洗浄し、50℃に加温した1 ml の Buffer QF で溶出し、イソプロパノール沈殿により回収した沈殿物を20 μ l の TE 溶液 (pH 8.0) に溶解した。DNA 濃度は 260 nm の吸光度より算出し、DNA 溶液は TE 溶液 (pH 8.0) で 20 ng/ μ l に調製して、PCR の鋳型として使用した。

希釈系列の調製

感度確認のために使用した 2 ng~2 pg/ μ l の DNA 溶液は、各エビ/カニ DNA 溶液をサケ精子 DNA 20 ng/ μ l TE 溶液 (pH 8.0) (Sigma Chemical 社製) で段階希釈して調製した。

PCR

エビ検出用 (ShH12-05&ShH13-03)、アキアミ検出用 (AsH11-05&ShH13-03)、カニ検出用 (CrH16-05 &CrH11-03)、シャコ検出用 (StH12-05&StH12-03) の4種類のプライマーセットによるPCRは、AmpliAq Gold DNA ポリメラーゼ (Applied Biosystems 社製) を用いて行なった (表: 2 - 1~表: 2 - 10)。PCRは溶液 25 µl を 0.2 ml 容PCR チューブ (Applied Biosystems 社製) に入れ、PCR 装置 (Applied Biosystems 社製、GeneAmp PCR system 9700) で行なった。増幅産物の解析は、PCR 反応液 10 µl をエチジウムブロマイド含有の 3%アガロース電気泳動に供して、蛍光イメージアナライザー (Bio-Rad Laboratories 社製、ChemiDoc XRS illuminator) で解析した。エビ検出 PCR の産物の制限酵素消化は制限酵素 *Hae*III (タカラバイオ社製) を用いた。消化後の制限断片の解析は、上記同様、アガロース電気泳動で解析した。

ダイレクトシーケンス解析

16S rRNA 遺伝子領域を増幅するプライマーセットとして、SPP1 (5'- CAA ATA TTG TTT CTG CCT GTT TAT C -3' & 5'- AAG ATT TAT AGG GTC TTA TCG TC -3') ならびに SPP2 (F-primer : 5'- TTA AAG GGA CGA TAA GAC CCT ATA A -3' & 5'- TAG ATA GAA ACC AAC CTG GCT -3') を用いてPCRを行なった後、増幅産物を QIAquick PCR purification kit (QIAGEN 社製) で精製し、DNA Sequencing Redy Reaction PreMix (Applied Biosystems 社製) のマニュアルに従い、BigDyePCRを行なった。増幅産物を AutoSeq™ G-50 (Amersham Pharmacia Biotech 社製) で精製し、シーケンスを実施した。試薬、機器はそれぞれ POP-6™ (Applied Biosystems 社製)、シーケンサーABI PRISM 310 (Applied Biosystems 社製) を用いた。

ELISA

FA テストEIA-甲殻類「ニッスイ」(日水製薬社製) と甲殻類キット「マルハニチロ」(マルハニチロ社製) を用いて、甲殻類タンパク質量を測定した。試料 1 g に 19 mL の抽出緩衝液を加え、室温で一晩水平に振とうし、pH 6.0~8.0 に調整したのち、3,000 x g で 20 分間遠心分離した。必要に応じて上清をろ過し、各キット希釈 Buffer で 20 倍に希釈し、キットの説明書に従って ELISA を行なった。なお、各試料抽出物を 2 ウェルで分析し、平均吸光度を算出した。

【結果】

検出範囲の設定

エビ、カニの検出範囲は日本標準商品分類（平成2年6月改定）に沿って設定した。つまり、エビは日本標準商品分類の商品コード「7133 えび類（いせえび・ざりがに類を除く。）」ならびに「7134 いせえび・うちわえび・ざりがに類」、カニは「7135 かに類」、その他甲殻類は「71361 しゃこ類」、「71362 あみ類」、「71363 おきあみ類」を範囲に設定した。また、生物分類学的なドメインとしては、エビは十脚目の根鰓亜目ならびに抱卵亜目のコエビ下目、ザリガニ下目、イセエビ下目、カニは十脚目の抱卵亜目の短尾下目ならびに異尾下目のタラバガニ科を対象とした。

プライマー設計

ミトコンドリア DNA 上の 16S rRNA 遺伝子領域をプライマー設計領域に選定した。ミトコンドリアは細胞内に数百存在し、環状 DNA を複数個有すること、また属ならびに種間の変異が多いことから、特異的かつ高感度な PCR 技術の開発に適していると考えられた。収集した甲殻類（エビ、カニ、その他甲殻類）の 16S rRNA 遺伝子配列をアラインメントしたのち、エビ、カニに特徴的な塩基配列に、プライマーセット（エビ検出用：ShH12-05&ShH13-03、カニ検出用：CrH16-05&CrH11-03）を設計した（表：2 - 11）。

エビ検出 PCR のプライマーを設計する際のポイントを以下に示す。各プライマーの 3' 末端塩基には、検出対象の標的配列と一致し、検出対象外の非標的配列と一致しない塩基を設置した。フォワード/リバース両プライマーともに非標的配列と一致しない塩基を配置することが理想であるが、甲殻類の塩基配列は多様であるため、少なくともどちらか一方の 3' 末端塩基が一致しないフォワード/リバースプライマーを組み合わせることとで区別する方法を採用した。具体的には、フォワードでエビとカニを、リバースでエビとオキアミ・アミ・シャコを区別できる塩基を見出し、それら塩基を 3' 末端に設置したプライマーを組み合わせた（図：2 - 2）。また、エビの範囲は根鰓亜目ならびに抱卵亜目のコエビ下目、ザリガニ下目、イセエビ下目と幅広く、塩基配列が多様であるため、単一配列のプライマーでは十分な相同性を確保できなかった。そこで、種々の配列に相同性の高いフォワード 2 種類、リバース 3 種類の混合プライマーとした。なお、エビ検出 PCR におけるカニの偽陽性を抑制するため、PCR 後に制限酵素消化による処理を追加して、エビに対する特異性を向上させた。エビ検出 PCR の偽陰性（サクラエビ科のアキアミ）に対しては、別途アキアミ検出 PCR を組み合わせ、補完した。

次にカニ検出 PCR のプライマーを設計する際のポイントを以下に示す。エビ検出プライマー同様に、多様な甲殻類と区別するため、フォワード/リバース少なくとも一方の 3' 末端塩基が非対象配列と一致しないことで区別する方法を採用した。具体的には、フォワードでカニとエビ（根鰓亜目と抱卵亜目のザリガニ下目）、オキアミ、アミを、リバースでカニとエビ（根鰓亜目、抱卵亜目のコエビ下目、イセエビ下目）を区別できる塩基を見出し、それら塩基を 3' 末端に設置したプライマーを組み合わせた（図：2 - 3）。さらに、カニ検出用プライマーでは、非標的配列からの増幅産物を抑制するため、標的、非標的配列に関わらず、プライマーの 3' 末端塩基から 2 番目の塩基がミスマッチとなるように設計した。この方法は PCR のミスを防ぎ、偽陽性の抑制が期待できる一方、標的配列に対する感度低下を引き起こすリスクもあるが、特異性の確保を優先して採用した。なお、感度の確保にあたっては、最適な PCR 条件、具体的には PCR 反応液の Mg^{2+} 濃度、アニーリング温度、サイクル数を検討し、設定した。また、カニの範囲は抱卵亜目の短尾下目ならびに異尾下目のタラバガニ科と幅広く、塩基配列が多様であるため、単一配列のプライマーでは対応できなかった。そこで、種々の配列に相同性の高いフォワード 6 種類の混合プライマーとした。なお、プライマーの設計上、カニ検出 PCR で偽陽性を示したシャコについては、別途シャコ検出 PCR を設計することで、シャコの有無について情報を取得できるようにした。

PCR シミュレーションによる増幅予測

収集した甲殻類の 16S rRNA 遺伝子配列を用いて PCR シミュレーションを実施した結果、設計したエビ/カニ検出用プライマーセットにおいて、検出対象の多種多様な幅広いエビ/カニから標的サイズの増幅産物が予想された（表：2 - 12, 13）。エビ検出用プライマーセットでは、エビ以外の甲殻類で一部増幅が予想されたが、それらは食用としての利用はないため、食品への混入の可能性は小さいと考えられた。また、エビの範囲に含まれるアキアミでは、増幅が予想されなかった。カニ検出用プライマーセットでは、対象範囲ではないシャコから増幅が予想された。上記、偽陰性を示したアキアミ、偽陽性を示したシャコについては別途検出用のプライマーセットを設計した。アキアミ検出用プライマーセットでは、アキアミで標的増幅産物が予想され、カニならびにその他の甲殻類からの増幅は予想されなかった（データ示さず）。シャコ検出用プライマーセットでは、シャコで増幅が予想され、シャコ以外の甲殻類からの増幅は予想されなかった（データ示さず）。

エビ検出 PCR の感度と特異性

実際の PCR ならびにその後の制限酵素消化により、エビ検出 PCR の感度ならびに特異性を評価した。エビ 15 種のうち、アキアミを除く 14 種で、各 DNA 5 pg から標的サイズの増幅産物が得られた (図: 2-4, A)。また、その後の増幅産物の制限酵素消化でも、標的サイズの制限断片が得られた (図: 2-4, B)。なお、アキアミ DNA からは増幅産物は得られなかった (図: 2-4, C)。カニ 13 種のうち、ベニズワイガニ、タカアシガニ、ダンジネスクラブ、オオエンコウガニ、ワタリガニ、シャンハイガニ、6 種の各 DNA 50 ng から標的サイズの増幅産物が得られたが、シャンハイガニ以外のカニの増幅産物からは標的サイズの制限断片は得られなかった (図: 2-5, A, B)。偽陽性となるシャンハイガニに対するエビ検出 PCR の感度は、エビ DNA 5 pg と比較して、シャンハイガニ DNA 500 pg と 100 倍低かった。甲殻類以外の魚介類からも増幅産物は得られたが、そのサイズは標的産物と明確に異なった (データ示さず)。

アキアミ検出 PCR の感度と特異性

エビ検出 PCR で偽陰性を示したアキアミは、乾燥品として流通しており、適切な表示を保証する上で検出できなければならない。そこで、別途エビ検出 PCR と組み合わせて使用するアキアミ検出用プライマーセット (AkH11-05&ShH13-03) を設計した。アキアミの 16S rRNA 遺伝子配列は GenBank に登録がなかったため、市場でアキアミ試料を購入し、ダイレクトシーケンス解析を用いて配列を解読した。解読の結果、同じサクラエビ科に属するサクラエビとは、フォワードプライマー (ShH12-05) の 3' 末端塩基の結合する位置の塩基が異なることが判明した。そこで、アキアミに共通かつカニとは異なる塩基を 3' 末端に有する新たなフォワードプライマー (AkH11-05) を設計した。アキアミ検出 PCR では、アキアミならびに幾つかのエビ DNA 5 pg から標的サイズ 82 bp の増幅産物が得られた (図: 2-6, A)。一方で、カニ、オキアミ、アミ、シャコならびに魚介類からは増幅産物は得られなかった (図: 2-6, B)。

カニ検出 PCR の感度と特異性

実際の PCR により、カニ検出 PCR の感度ならびに特異性を評価した。カニ 13 種、各 DNA 5 pg から標的サイズの増幅産物が得られた (図 : 2 - 7, A)。また、PCR シミュレーションで増幅が予測されたシャコでは、カニと同様、DNA 5 pg から増幅産物が得られた (図 : 2 - 7, B)。エビならびにその他の甲殻類では、スキャンピー、オマールエビから散発的に増幅産物が得られた。ただし、感度は各 DNA 50 ng と低かった。また、その他魚介類からも増幅産物は得られたが、そのサイズは標的産物と明確に異なった (データ示さず)。

シャコ検出 PCR の感度と特異性

カニ検出 PCR で増幅産物が得られたシャコについては、カニを含まない加工食品中にシャコが微量に混入した場合、「カニ : 陽性」の誤判定、つまり偽陽性となる可能性が考えられる。そこで、カニ検出 PCR で陽性判定となった加工食品において、シャコの混入が疑われる場合に検査できるように、シャコ検出プライマーセット (StH12-05 & StH12-03) を設計した。シャコ検出 PCR の反応サイクル数は、カニ検出 PCR のシャコに対する感度と同程度となるように 34 サイクルに設定し、シャコ DNA 5 pg から標的サイズの増幅産物が得られた (図 : 2 - 8, A)。なお、エビ、カニならびにその他の甲殻類 DNA 50 ng から増幅産物は得られなかった (図 : 2 - 8, B)。

モデル加工食品を用いたエビ/カニ検出 PCR の感度評価

エビ/カニそれぞれで、可溶性タンパク重量として 10 ppm のモデル加工食品を作製して、両検出 PCR の感度を評価した。図 : 2 - 9 に示したとおり、増幅産物のバンドの強弱に違いは見られるものの、全ての陽性モデル 6 試料から標的サイズの増幅産物が得られ、陰性モデル 6 試料からは得られなかった。

PCR 試験キットの提供

開発したエビ、カニ、アキアミ、シャコ検出用プライマーセットについては、陽性コントロールプラスミドの作製を試薬メーカーと共に行なった。現在、プライマーとプラスミドをセットにした各検出プライマー (FASMAC 社製) が提供、販売されている。

【考察】

食物アレルギー表示におけるエビ/カニ個別表示の必要性

甲殻類は食物アレルギーの原因食物として広く知られており、「平成 27 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書（平成 28 年 3 月，消費者庁）」において多数の症例が報告されている。アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック（平成 26 年 3 月，消費者庁）に記載のとおり、諸外国では、交差反応性を考慮して、エビやカニは甲殻類として一括表示することが推奨されている。日本では、「食物等によるアナフィラキシー反応の原因物質（アレルゲン）の確定、予防・予知法の確立に関する研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書」におけるエビならびにカニによる食物アレルギー症例数を考慮して、2008 年にエビとカニは推奨表示から義務表示に格上げされた。なお、日本の表示制度では、エビとカニは甲殻類としての一括表示ではなく、個別に表示する。この点は、諸外国と異なる特徴の一つである。

上記平成 17 年度報告にエビアレルギー患者の 65%がカニと交差反応性を有することが記載されているように、これまでに甲殻類間での高い交差反応性はいくつも報告されている。甲殻類の主要アレルゲンとしては、筋原繊維タンパク質のトロポミオシンがあり、分子量約 35,000 のサブユニット 2 本からなる 2 量体で、加熱に対して非常に安定であることが知られている（Reese et al., 1999）。トロポミオシンのアミノ酸配列の相同性は甲殻類内で約 88~100%と非常に高く、IgE 抗体結合エピトープも類似性が高い（Leung et al., 1996、Motoyama et al., 2007）。このように類似性の高いアレルゲンタンパクが存在すると、近縁種間で交差反応性を有する可能性は高くなる。ただし、アレルギー発症摂取量、アレルギー症状、交差反応性の有無などのアレルギー反応は患者それぞれで異なるため、一様に全ての患者で交差反応性があるわけではない。上述したように、これまでに一部のエビアレルギー患者でカニに対する交差反応性が認められなかったことをふまえ、患者の食の選択性拡大の観点からエビとカニの個別表示は十分に意義あるものと考えられる。

エビ/カニ特異的プライマーの設計

Shen らは、甲殻類のミトコンドリア DNA の全長配列を解読し、タンパクをコードする 12 遺伝子ならびに 12S/16S rRNA 遺伝子の塩基配列比較によって、十脚目における進化として、根鰓亜目から抱卵亜目のコエビ下目が分かれ、その後、歩行類（ザリガニ下目、イセエビ下目）、最後にカニ類（短尾下目、異尾下目）が分岐した予想を報告している（Shen et al., 2013）。このことは、ミトコンドリア DNA がエビ（根鰓亜目、抱卵亜目

のコエビ下目、ザリガニ下目、イセエビ下目) とカニ (短尾下目、異尾下目) を区別できる可能性を有していることを示している。本研究では、ミトコンドリア DNA に存在し、系統分類に利用される 16S rRNA 遺伝子領域を候補として用いた。なお、動物の核 DNA 上の rRNA 遺伝子にも植物同様、ITS 領域は存在するが、動物では属や種の間で変異が少ないことが分かっている。Genbank に登録されている甲殻類由来の 16S rRNA 遺伝子領域は、2017 年 6 月時点で、Crustacea (甲殻亜門) を対象とした検索ワード「16S rRNA」で、約 2,000 の配列が登録されている。本研究ではエビ、カニ、オキアミ、アミ、シャコが属する科ならびに属から約 400 配列を収集した。エビ、カニ、アキアミ、シャコ検出用プライマーセットは、これら情報を元に設計し、プライマーの特異性は PCR シミュレーションによって評価した。

エビ/カニ検出用プライマーセットを設計する上での課題は 2 つある。一つ目は、同じ十脚目に属する近縁のエビとカニを区別すること、二つ目は、多種存在するエビならびにカニの多様な配列に対応することである。エビまたはカニに対する非標的的近縁種の排除は、フォワードとリバースプライマーの組み合わせで達成した。ただし、プライマーのどちらか一方のみが非標的配列に結合しない設計であるため、PCR の際にプライマーのアニーリングミスが生じ、非標的配列から増幅産物が得られる場合が考えられる。そこで、エビ検出 PCR では制限酵素消化の組み合わせ、またカニ検出 PCR ではプライマーの 3' 末端から 1、2 塩基目にエビの配列に対してミスマッチする塩基を連続挿入する PCR 伸長反応の抑制 (Pettersson et al., 2003) によって特異性を高めた。なお、配列の多様性に対しては、混合のプライマーを用いた。

エビ/カニ検出 PCR の感度と特異性

エビ/カニ検出 PCR は、エビならびにカニを特異的かつ高感度に検出できることを示した (表: 2 - 14)。なお、エビ検出 PCR は *Hae*III による制限酵素消化を含む。感度に関しては、両検出 PCR とともに、マトリクス DNA 50 ng 中のエビ/カニ DNA 5 pg、DNA 濃度換算で 10 ppm (w/w)、を検出可能であった。特異性に関しては、一部の甲殻類で偽陽性や偽陰性が確認されたが、両検出 PCR とともに食品に使用される標的に対しては陽性、非標的に対しては陰性の判定が可能であった。エビ検出 PCR で偽陰性であったアキアミには、アレルギー原因食物の検査として対応が必須であったため、アキアミ検出 PCR を別途開発し、補った。また、偽陽性であったシャンハイガニについては、PCR の感度がエビ DNA 5 pg と比較して、シャンハイガニ DNA 500 pg と低いことから、大きな問題にはならないと考えられた。カニ検出 PCR では、スキャンピー、オマールエビ、

シャコが偽陽性であった。これらのうち、2種類のエビについては、PCRの感度がDNA 50 ngで散発的に検出される程度であったため、大きな問題ではないと考えられた。なお、シャコについては、シャコの混入に関する情報を提供する目的で別途シャコ検出PCRを開発した。

モデル加工食品による感度評価

10 ppm モデル加工食品（ブラックタイガー／タラバガニ可溶性タンパク 10 µg/g 製品重量）6種類の抽出DNAから標的サイズの増幅産物が得られた。日本の表示制度では、食品中の総タンパク量として10 ppm (µg/g または µg/ml) 以上含有する場合、原材料表示への記載が必要である。そのため、多種多様な加工食品において、PCR試験にもELISA試験と同程度の検出感度が求められる。本研究では、一部の製品形態に絞った評価ではあるが、動物／植物性原料の使用、加熱加工条件が異なるモデル加工食品において、エビならびにカニの検出が可能であったことから、PCR試験はELISA試験と同程度の感度を有すると考えられた。ELISAが食物アレルギーの原因となるタンパクを検出する一方、PCRは食物アレルギー原因食物のDNAを検出する。食品の加工条件は様々で、また同じ加工条件においてもタンパクとDNAの変性・分解程度は異なるため、より幅広い製品形態でELISA試験とPCR試験の整合性評価が必要と考えられる。また、DNAの分解のみならず、原料マトリクスによるPCR阻害作用も懸念される。これらの点に関しては、一部のモデル加工食品を対象とした評価では判断できないため、次章で実際の製品を用いて評価した。

エビ／カニ検出PCRの試験室間バリデーション

義務表示である特定原材料の検査に用いる方法は、「通知」別添5に記載されている「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に準拠する必要がある。定量検査法であるELISA試験では、試験室数8以上、試料数5以上で実施した試験室間バリデーションで、50%以上、150%以下の回収率ならびに25%以下の室間精度が要求されている。一方、定性検査法であるウェスタンブロット試験とPCR試験では、試験室数6以上、試料数5以上で実施した試験室間バリデーションで、特定原材料タンパク質を含む試料についての陽性率90%以上、ブランク試料における陰性率90%以上の精度が要求されている。通知法に記載される検査法は、すべて上記ガイドラインの条件を満たしており、試験室間バリデーションの結果ならびに偽陽性、偽陰性のデータは説明書、HPなどで公開されている。なお、開発したエビ／カニ検出PCRは、本研究とは別に、酒井ら

によって、10 ppm モデル加工食品を用いた多機関バリデーションが実施され、上記基準を満たすことが確認された (Sakai et al., 2013)。また、その結果を元に、エビ/カニ検出 PCR は、2010 年に確認検査として「通知」に記載された。

「通知」における確認検査の位置付け

「通知」には特定原材料 7 品目 (卵、乳、小麦、そば、落花生、えび、かに) の検査法ならびに検査結果の判断基準が示されている。検査は、原材料表示への記載の有無、スクリーニング検査 (ELISA 試験)、製造記録への記載の有無、確認検査 (ウェスタンブロット試験もしくは PCR 試験) から構成され、ELISA 試験ならびに PCR 試験の結果だけでなく、原材料、配合、製造工程の情報から総合的に評価される。エビ/カニ検出 PCR を用いる確認検査を実施するケースは 2 つある (図: 2 - 10)。一つ目は、「エビ・カニ表示: なし、ELISA 試験: 陽性、製造記録: エビ・カニ記載なし」の場合、確認検査が必須となる。二つ目は、「エビ・カニ表示: あり、ELISA 試験: 陽性、製造記録: エビ・カニ記載なし」で、表示した根拠がない場合、必要に合わせて確認検査を実施する。「通知」には、確認検査として、エビ検出 PCR (制限酵素消化を含む) ならびにカニ検出 PCR が示されている。アキアミならびにシャコ検出 PCR は「通知」の範囲ではないが、偽陰性の回避ならびに偽陽性の可能性の有無を確認することができるため、エビ/カニ検出 PCR と組み合わせることで、より精度が高い判定が可能となる (図: 2 - 11)。

【まとめ】

「通知」において推奨表示品目に指定されていたエビならびにカニを対象に、PCR により特異的かつ高感度に両者を識別検出する分析技術の開発を試みた。なお、開発したエビ/カニ検出 PCR の特異性ならびに感度は、各種動物試料ならびに市販加工食品を用いて評価した。本章では精製度の高い単一 DNA に対する感度と特異性の評価を実施したが、本 PCR 検出技術を食品検査に使用する場合、様々な加工食品に対して幅広く適用できる必要があるため、その評価については、次章「エビ/カニ PCR 識別 PCR 検出技術の実務検査への適用に関する研究」にて実施した。

- 1) 系統分類で利用される 16S rRNA 遺伝子領域をプライマーの設計領域に用いることで、エビとカニを識別検出するプライマーセットを設計した。特異性の確保は、エビまたはカニに特徴的な塩基を 3' 末端に設定したフォワード/リバースプライマーの組み合わせ、非標的配列に対するプライマー 3' 末端側塩基の相同性低下、PCR 後の制限酵素消化などの手法を組み合わせで達成した。
- 2) 実際の PCR で、対象とするエビまたはカニを特異的かつ高感度に検出できた。特異性については、エビの一種であるアキアミで偽陰性、シャコで偽陽性を示したが、それらに関しては、別途検出 PCR を開発して、エビ検出 PCR の補完ならびにシャコ混入の有無を確認できる方法とした。感度については、エビまたはカニ DNA 5 pg/マトリクス DNA 50 ng ならびに食物アレルギー表示基準の 10 ppm モデル加工食品を検出可能であった。
- 3) 開発した PCR 試験は、上記のとおりエビとカニを識別可能で、ELISA 試験と同程度の感度を有したことから、食物アレルギー原因食物の検査において、ELISA 試験によるスクリーニング検査後の確認検査に利用できると考えられた。なお、本 PCR 検出技術については、本研究とは別に、外部機関による多機関バリデーションが実施され、「アレルギー物質を含む食品の検査方法を評価するガイドライン」の基準を満たすことが確認された。

表：2 - 1 エビ検出PCRの反応液組成

	final con.
10xPCR buffer II	1×
dNTP (2 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0.025 U/ml
F-primer (25 μM)	0.3 μM
R-primer (25 μM)	0.3 μM
template DNA	
distilled Water	
total vol.	25 μl

表：2 - 2 エビ検出PCRの反応条件

initialization	:	95°C	-	10 min	} ×45 cycles
denaturation	:	95°C	-	1 min	
annealing	:	56°C	-	1 min	
extension	:	72°C	-	1 min	
final extension	:	72°C	-	7 min	

表：2 - 3 制限酵素消化の反応液組成

	final con.
10x M buffer	1×
<i>Hae</i> III (10 units/μl)	0.5 units/μl
Shrimp PCR Product	17 μl
total vol.	20 μl

表：2 - 4 制限酵素消化の反応条件

restriction digestion	:	37°C	-	16 hr
-----------------------	---	------	---	-------

表：2 - 5 アキアミ検出PCRの反応液組成

	final con.
10xPCR buffer II	1×
dNTP (2 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0.025 U/ml
F-primer (25 μM)	0.3 μM
R-primer (25 μM)	0.3 μM
template DNA	
distilled Water	
total vol.	25 μl

表：2 - 6 アキアミ検出PCRの反応条件

initialization	:	95°C	-	10 min	
denaturation	:	95°C	-	0.5 min	×45 cycles
annealing	:	56°C	-	0.5 min	
extension	:	72°C	-	0.5 min	
final extension	:	72°C	-	7 min	

表：2 - 7 カニ検出PCRの反応液組成

	final con.
10xPCR buffer II	1×
dNTP (2 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	2.0 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0.025 U/ml
F-primer (25 μM)	0.2 μM
R-primer (25 μM)	0.2 μM
template DNA	
distilled Water	
total vol.	25 μl

表：2 - 8 カニ検出PCRの反応条件

initialization	:	95°C	-	10 min	} ×40 cycles
denaturation	:	95°C	-	0.5 min	
annealing	:	56°C	-	0.5 min	
extension	:	72°C	-	0.5 min	

表：2 - 9 シャコ検出 PCR の反応液組成

	final con.
10xPCR buffer II	1×
dNTP (2 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0.025 U/ml
F-primer (25 μM)	0.3 μM
R-primer (25 μM)	0.3 μM
template DNA	
distilled Water	
total vol.	25 μl

表：2 - 10 シャコ検出 PCR の反応条件

initialization	:	95°C	-	10 min	} ×34 cycles
denaturation	:	95°C	-	0.5 min	
annealing	:	54°C	-	0.5 min	
extension	:	72°C	-	0.5 min	

表：2 - 11 各プライマーの塩基配列

detection method for	No.	sequence 5' →3' (with IUPAC mixed base codes)	blend ratio	length of the PCR product (bp)
shrimp	F ShH12-05'-1, 2	TTATATAAAGTCTRGCTGCC	0.3	185-194
	ShH13-03'-1	GTCCCTCTAGAACATTTAAGCCTTTTC	0.1	
	R ShH13-03'-2	GTCCCTTTATACTATTTAAGCCTTTTC	0.1	
	ShH13-03'-3	GTCCCCCAAATTATTTAAGCCTTTTC	0.1	
crab	CrH16-05'-1, 2	GCGTTATTTTTTTTGAGAGTTCWTATCGTA	0.10	62
	F CrH16-05'-3	GCGTAATTTTTTCTGAGAGTTCTTATCATA	0.01	
	CrH16-05'-4, 5	GCGTTATTTTTTTTAAGAGTACWTATCGTA	0.06	
	CrH16-05'-6	GCGTTATTTCTTTTGAGAGCTCATATCGTA	0.03	
	R CrH11-03'	TTTAATTCAACATCGAGGTCGCAAAGT	0.2	
akiame paste shrimp	F AsH11-05'	GGTTGTACAAAAAGAAAGCTGTCTCA	0.3	82
	R ShH13-03'-1, 2, 3 ^{*1}		0.3	
mantis shrimp	F StH12-05'-1, 2	TTGTATGAATGGTCSGACAAGAT	0.2	95
	R StH12-03'-1, 2	ATCGTCCCTCCATATYATTTAAGCTTTTTT	0.2	

エビ、カニ、アキアミ、シャコ検出用プライマーセットのフォワード、リバース各プライマーの塩基配列、フォワードとリバースプライマーの混合割合ならびに PCR 増幅産物長を示す。^{*1} アキアミ検出用リバースプライマーは、エビ検出用リバースプライマーを用いた。

表：2 - 12 エビ検出用プライマーセットの特異性予測

	taxonomic name of crustacea	GenBank accession No.	match with 3'-end nucleotide of primers ^a	weight No. ^b
shrimp	suborder Dendrobranchiata		40/40 ^c	7/8 ^d
	e.g., <i>Metapenaeus affinis</i>	AY264904	+	5
	<i>Metapenaeus ensis</i>	AF279810	+	5
	<i>Metapenaeus joyneri</i>	FJ435636	+	5
	<i>Penaeus monodon</i>	EU105471	+	/
	<i>Penaeus semisulcatus</i>	EU024679	+	5
	infraorder Caridea		20/20	15/15
	e.g., <i>Palaemon debilis</i>	FM986647	+	4
	<i>Macrobrachium nipponense</i>	FM986632	+	4
	<i>Exopalaemon modestus</i>	EU493144	+	4
	<i>Pandalus latirostris</i>	AB244633	+	4
	<i>Plesionika ensis</i>	AY612883	+	4
	infraorder Astacidea		21/21	7/7
	e.g., <i>Homarus americanus</i>	DQ666843	+	4
	<i>Cherax tenuimanus</i>	AF492809	+	/
	<i>Nephropsis stewarti</i>	AY583891	+	4
	<i>Paranephrops zealandicus</i>	EF060258	+	5
	<i>Procambarus clarkii</i>	DQ666844	+	4
	infraorder Achelata		45/45	8/8
	e.g., <i>Palinurus delagoae</i>	EF546312	+	/
	<i>Palinurus mauritanicus</i>	DQ062208	+	4
<i>Jasus edwardsii</i>	AF337979	+	3	
<i>Jasus lalandii</i>	EU221225	+	/	
<i>Scyllarides latus</i>	DQ377974	+	/	

表：2 - 12 エビ検出用プライマーセットの特異性予測（続き）

	taxonomic name of crustacea	GenBank accession No.	match with 3'-end nucleotide of primers ^a	weight No. ^b
	infraorder Brachyura		2/34 ^c	2/2 ^d
	e.g., <i>Eriocheir sinensis</i>	AJ250642	+	4
	<i>Metacarcinus magister</i>	AY789473	+	4
	<i>Callinectes sapidus</i>	AJ130813	-	-
	<i>Chaceon affinis</i>	AF100914	-	-
	<i>Telmessus cheiragonus</i>	AB220027	-	-
crab	infraorder Anomura		1/10	1/1
	family Lithodidae			
	e.g., <i>Lithodes aequispinus</i>	AF425329	-	-
	<i>Lithodes maja</i>	AF425330	-	-
	<i>Paralithodes brevipes</i>	AF425337	-	-
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	AF425338	-	-
	<i>Paralomis granulosa</i>	AF425339	-	-
	<i>Paralithodes</i> sp.	AY789472	+	3
	family Euphausiidae		0/38	
	e.g., <i>Euphausia longirostris</i>	AF281273	-	-
other	order Mysida		0/19	
	e.g., <i>Mesopodopsis slabberi</i>	AJ966898	-	-
	suborder Stomatopoda		0/15	
	e.g., <i>Squilla mantis</i>	AY639936	-	-

エビ検出用プライマーセットによって、各種甲殻類の 16S rRNA 遺伝子領域の DNA 配列から予想された増幅産物ならびに増幅反応の起こりやすさを示す。^a ShH12-05' & ShH13-03' 両プライマーの 3' 末端塩基と標的 DNA 領域の塩基の一致 (+) / 不一致 (-) を示した。^b プライマーと結合領域の配列の合致度と結合強度から算出された増幅反応の起こりやすさの目安 (1 - 6) で、数値が大きいと可能性が高い。増幅産物が予想されなかった場合は (-)、予測に必要な塩基配列の情報が得られなかった場合は (/) で示した。^c GenBank から取得した代表配列 (分母) のうち、両プライマーの 3' 末端塩基と標的 DNA 領域の塩基が一致した配列 (分子) の数を示した。^d GenBank から取得した代表配列 (分母) のうち、標的サイズの増幅産物が予想された (分子) の数を示した。

表：2 - 13 カニ検出用プライマーセットの特異性予測

	taxonomic name of crustacea	GenBank accession No.	match with 3'-end nucleotide of primers ^a	weight No. ^b
	infraorder Brachyura		49/53 ^c	46/53 ^d
crab	e.g., <i>Atelecyclus undecimentatus</i>	AM946018	+	4
	<i>Callinectes sapidus</i>	AJ298189	+	4
	<i>Cancer irroratus</i>	AJ130812	+	4
	<i>Chaceon affinis</i>	AF100914	+	4
	<i>Chionoecetes opilio</i>	AY227445	+	4
	<i>Erimacrus isenbeckii</i>	AB197677	+	4
	<i>Eriocheir sinensis</i>	AJ250642	+	4
	<i>Loxorhynchus crispatus</i>	EU682798	+	4
	<i>Maja brachydactyla</i>	EU000850	-	-
	<i>Maja squinado</i>	DQ079723	-	-
	<i>Portunus trituberculatus</i>	AM410527	+	4
	<i>Scylla serrata</i>	AF109318	+	4
	<i>Telmessus cheiragonus</i>	AB220027	+	4
	infraorder Anomura		12/12	12/12
	family Lithodidae			
	e.g., <i>Lithodes aequispinus</i>	AF425329	+	4
	<i>Lithodes maja</i>	AF425330	+	4
	<i>Paralithodes brevipes</i>	AF425337	+	4
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	AF425338	+	4
	<i>Paralomis granulosa</i>	AF425339	+	4

表：2 - 13 カニ検出用プライマーセットの特異性予測（続き）

	taxonomic name of crustacea	GenBank accession No.	match with 3'-end nucleotide of primers ^a	weight No. ^b
	suborder Dendrobranchiata		0/69 ^c	
	e.g., <i>Metapenaeus affinis</i>	AY264904	-	-
	infraorder Caridea		0/49	
	e.g., <i>Palaemon debilis</i>	FM986647	-	-
	infraorder Astacidea		0/35	
	e.g., <i>Homarus americanus</i>	DQ666843	-	-
shrimp	infraorder Achelata		6/60	6/6 ^d
	family Palinuridae			
	e.g., <i>Palinurus delagoae</i>	EF546312	-	-
	<i>Palinurus mauritanicus</i>	DQ062208	-	-
	<i>Jasus edwardsii</i>	AF337979	-	-
	<i>Jasus lalandii</i>	EU221225	-	-
	family Scyllaridae			
	e.g., <i>Scyllarides herklotsii</i>	FJ174906	+	2
	<i>Scyllarides latus</i>	DQ377974	+	2
	<i>Thenus orientalis</i>	FJ174914	+	2
	<i>Thenus unimaculatus</i>	FJ174915	+	2
		family Euphausiidae		0/39
	e.g., <i>Euphausia longirostris</i>	AF281273	-	-
other	order Mysida		0/19	
	e.g., <i>Mesopodopsis slabberi</i>	AJ966898	-	-
	suborder Stomatopoda		15/15	15/15
	e.g., <i>Squilla mantis</i>	AY639936	+	4

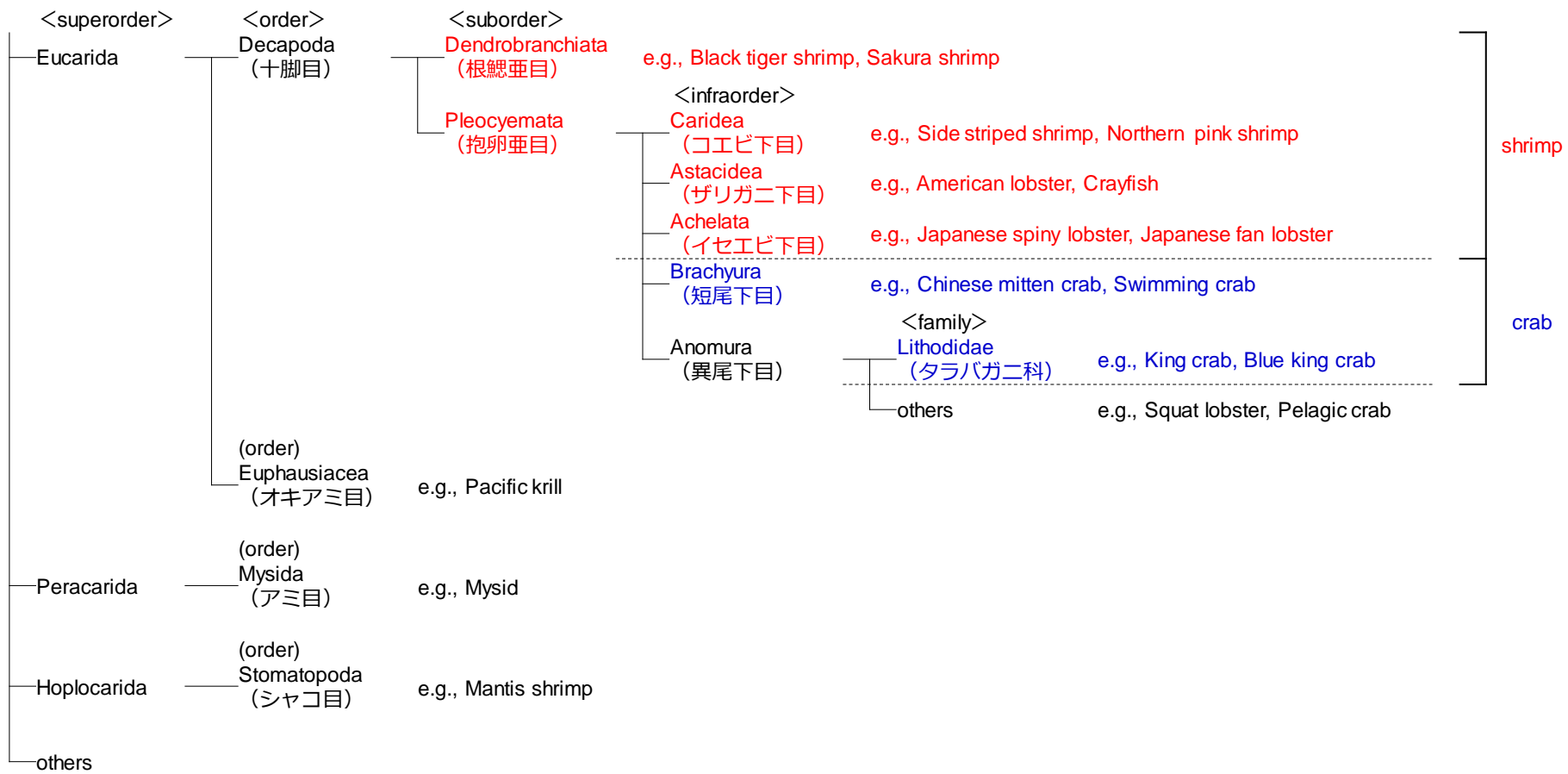
カニ検出用プライマーセットによって、各種甲殻類の 16S rRNA 遺伝子領域の DNA 配列から予想された増幅産物ならびに増幅反応の起こりやすさを示す。^a CrH16-05' と CrH11-03' 両プライマーの 3' 末端塩基と標的 DNA 領域の塩基の一致 (+) / 不一致 (-) を示した。^b プライマーと結合領域の配列の合致度と結合強度から算出された増幅反応の起こりやすさの目安 (1-6) で、数値が大きいと可能性が高い。増幅産物が予想されなかった場合は (-)、予測に必要な塩基配列の情報が得られなかった場合は (/) で示した。^c GenBank から取得した代表配列 (分母) のうち、両プライマーの 3' 末端塩基と標的 DNA 領域の塩基が一致した配列 (分子) の数を示した。^d GenBank から取得した代表配列 (分母) のうち、標的サイズの増幅産物が予想された (分子) の数を示した。

表：2 - 14 エビ/カニ検出 PCR の特異性のまとめ

PCR method		shrimp (15)	crab (13)	other (3)
		+	-	-
shrimp	PCR & Restriction digestion	Akiami paste shrimp (false negative)	Chinese mitten crab 500 pg DNA (false positive)	

		-	+	-
crab	PCR	Japanese lobster & American lobster 50 ng DNA (false positive)		Mantis shrimp (false positive)

エビ/カニ検出 PCR の各種甲殻類に対する特異性のまとめを示す。エビ検出 PCR ではシャンハイガニ DNA 500 pg、カニ検出 PCR ではスキャンピー、オマールエビ DNA 50 ng、シャコ DNA 5 pg で偽陽性を示した。また、エビ検出 PCR で偽陰性を示したアキアミならびにカニ検出 PCR で偽陽性を示したシャコについては、別途検出 PCR を開発して対応した。



図：2 - 1 甲殻類の分類ならびにエビとカニの範囲

エビ／カニ検出 PCR の対象範囲を示す。赤文字：エビの範囲、青文字：カニの範囲。

Taxonomy				No.	ShH12-05'	ShH13-03'
order	suborder	infraorder	family			
	Dendrobranchiata			1	TTATATAAGAGTCTGGCCTGCC	CAAAAAGGCTTAAATGTTCTAGAGGGAC
Decapoda	Caridea	Astacidea	shrimp	2	TTATATAAGAGTCTGGCCTGCC	GAAAAGGCTTAAATAGTATAAAGGGAC
				3	GTTTATAAAGTCTAACCTGCC	GAAAA-----
	Pleocyemata	Achelata		4	T CATGTAAAAGTCTAGCCTGCC	GAAAAGGCTTAAATGAGATAGGGGAC
		Brachyura	crab	5	T - ATTTATAAGTCTAGCCTGCT	GAAAAGGCTTAGATATTTTAGAGGGAC
	Anomura	Lithodidae		6	T - GTATATAAGTTTGGCCTGCT	GAAAAGGCTTAAATAAATCAAAAGGAC
Euphausiacea			krill	7	- TTTATAATGTCTGGCCTGCC	AAAAAGGCTTAAATAAATTAAGGGAC
Mysida			mysid	8	-----CCTGCC	AAAAAGCAGTAGTGAACCTAAGGGAC
Stomatopoda			mantis shrimp	9	TTTTATATGGTCTGGCCTGCC	AAAAAGCTTAAATAATATGGAGGGAC

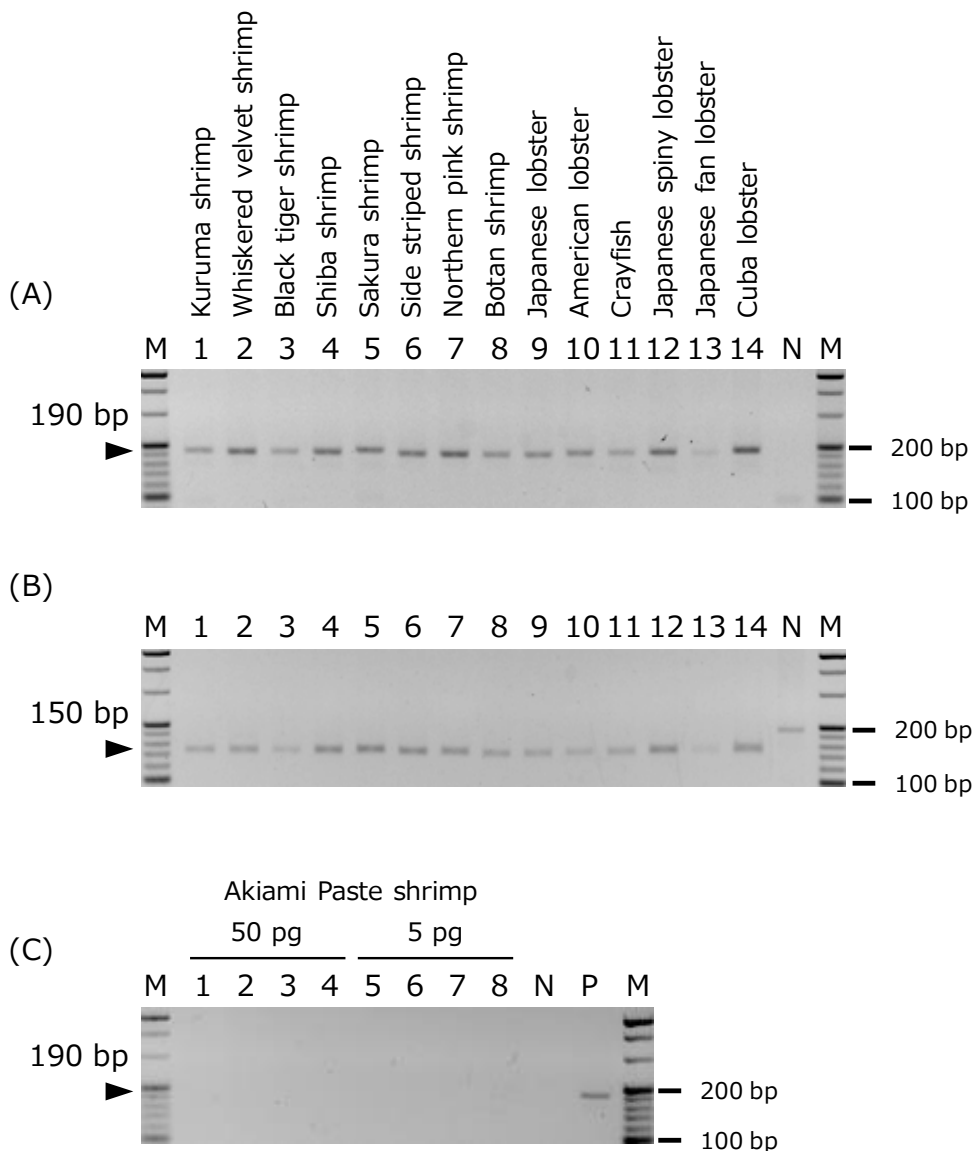
図：2 - 2 エビ検出プライマーの設計位置

エビ検出プライマーセット（ShH12-05' & ShH13-03'）のフォワード/リバースプライマーの位置を示す。ShH12-05'プライマーの3'末端塩基はカニと、ShH13-03'プライマー3'末端塩基はオキアミ、アミ、シャコとミスマッチする塩基を設定した。なお、各種エビの多様な配列に対応するため、内部の塩基配列が異なるプライマーをShH12-05'では2種類、ShH13-03'では3種類を採用した。

Taxonomy				No.	CrH16-05'		CrH11-03'		
order	suborder	infraorder	family						
		Brachyura	crab	1	GCGTTATTTT	TTT	GAGAGTT	CWTATCGTA	
				2	GCGTAATTTT	CTT	GAGAGTT	CTTATCAT	
				3	GCGTTATTTT	TTT	AAGAGT	ACWTATCGTA	
				4	GCGTTATTTT	CTTT	GAGAGCT	CATATCGTA	
Decapoda	Pleocyemata	Anomura	Lithodidae	5	GCGCAATCTT	GCCT	GAGAGT	CCATTATCGTA	
		Achelata		6	GCGTAATTTT	TTT	GAGAGTT	CTTATCGAT	
		Astacidea	shrimp	7	GCGTAATTT	CTCTT	GAGAG	ACCTAATCGAC	
		Caridea		8	GCGTAATCTT	CTTT	GAGAGT	CCATATCGAC	
		Dendrobranchiata		9	GCGTAATTT	CTTT	AAGAGT	TCATATCTAC	
Euphausiacea			krill	10	GCGTTATA	GCTCGG	AAGAG	ACCATATCTAT	
Mysida			mysid	11	GCGTAATTTT	CTT	GAGAGT	CTTATCGA	
Stomatopoda			mantis shrimp						

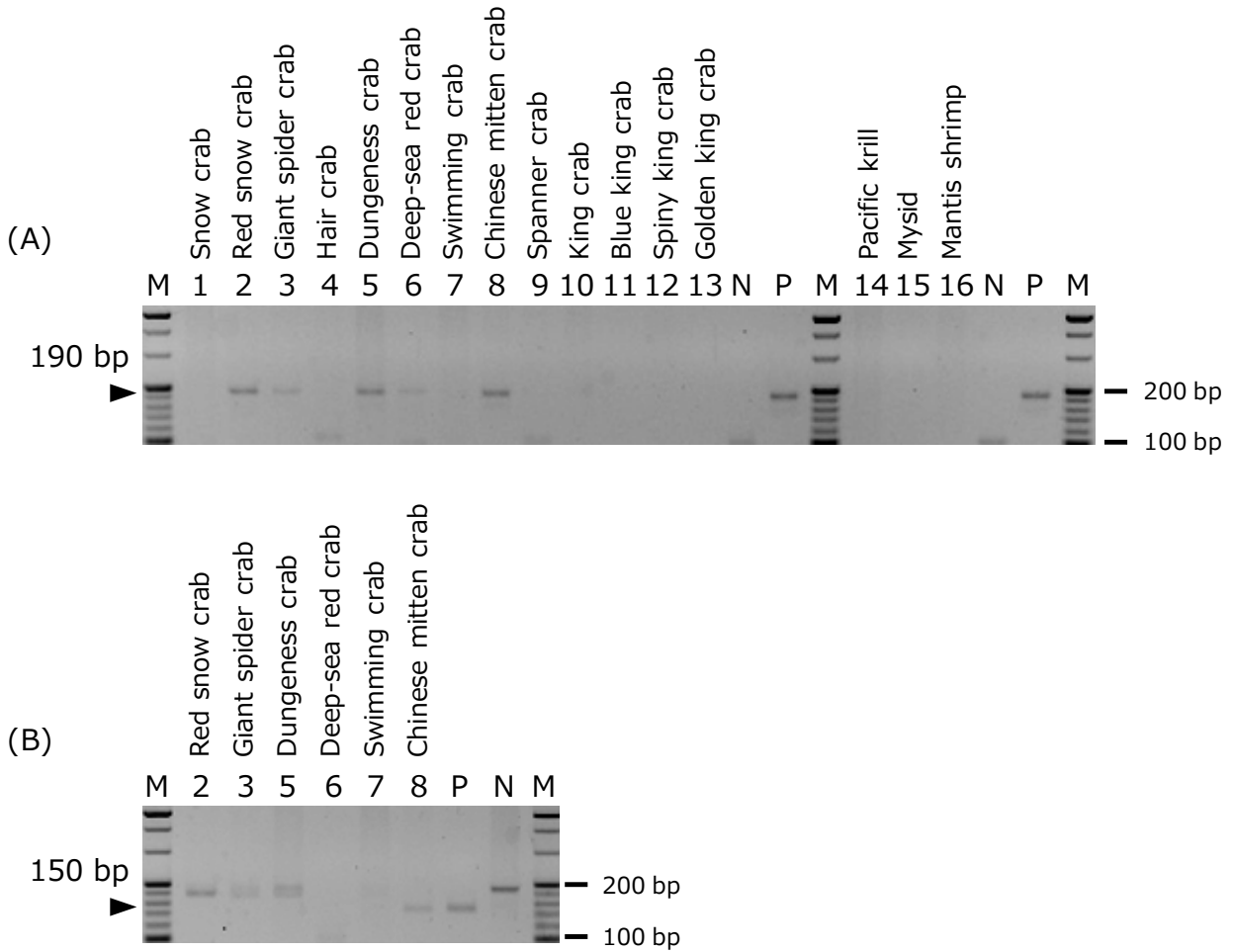
図：2 - 3 カニ検出プライマーの設計位置

カニ検出プライマーセット（CrH16-05' & CrH11-03'）のフォワード/リバースプライマーの位置を示す。CrH16-05'プライマーの3'末端塩基は根鰓垂目ならびにコエビ下目のエビ、オキアミ、アミと、CrH11-03'プライマー3'末端塩基は根鰓垂目ならびにザリガニ下目、イセエビ下目とミスマッチする塩基を設定した。さらにカニ以外の甲殻類からの増幅を抑える目的で、両プライマーの3'末端塩基から2塩基目にカニならびにその他の甲殻類全てでミスマッチする塩基を設定した。なお、各種カニの多様な配列に対応するため、内部の塩基配列が異なるプライマーを CrH16-05'で6種類を採用した。



図：2-4 エビに対するエビ検出 PCR と制限酵素消化の特異性と感度

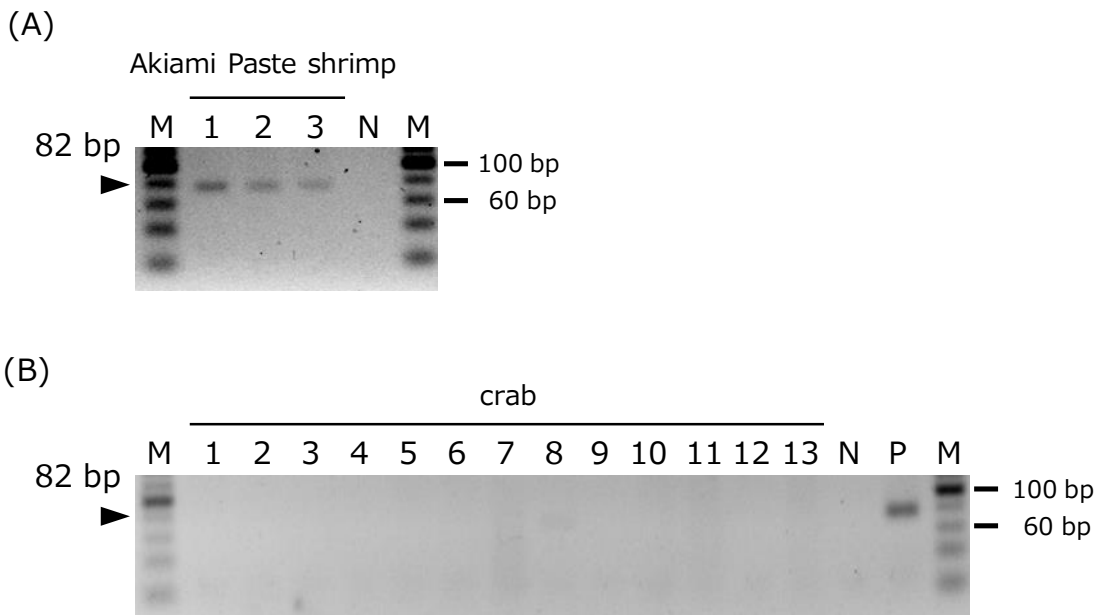
各種エビ DNA を用いたエビ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (A)、その後の増幅産物の *Hae*III制限酵素消化結果 (B)、アキアミ DNA を用いたエビ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (C) を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。(A) & (B) lanes 1 - 14, クルマエビ (1), アカエビ (2), ブラックタイガー (3), シバエビ (4), サクラエビ (5), シマエビ (6), アマエビ (7), ボタンエビ (8), スキャンピー (9), オマールエビ (10), アメリカザリガニ (11), イセエビ (12), ウチワエビ (13), キューバロブスター (14) DNA 5 pg ; N, (A) 陰性コントロール (水) & (B) クルマエビ DNA 由来 PCR 増幅産物の制限酵素未消化産物 ; M, 20 bp ladder marker、(C) lanes 1 - 8, アキアミ DNA 50 pg (1 - 4), 5 pg (5 - 8) ; N, 陰性コントロール (水) ; P, 陽性コントロール (クルマエビ DNA 5 pg) ; M, 20 bp ladder marker。



図：2 - 5 カニならびにその他の甲殻類に対するエビ検出 PCR の特異性

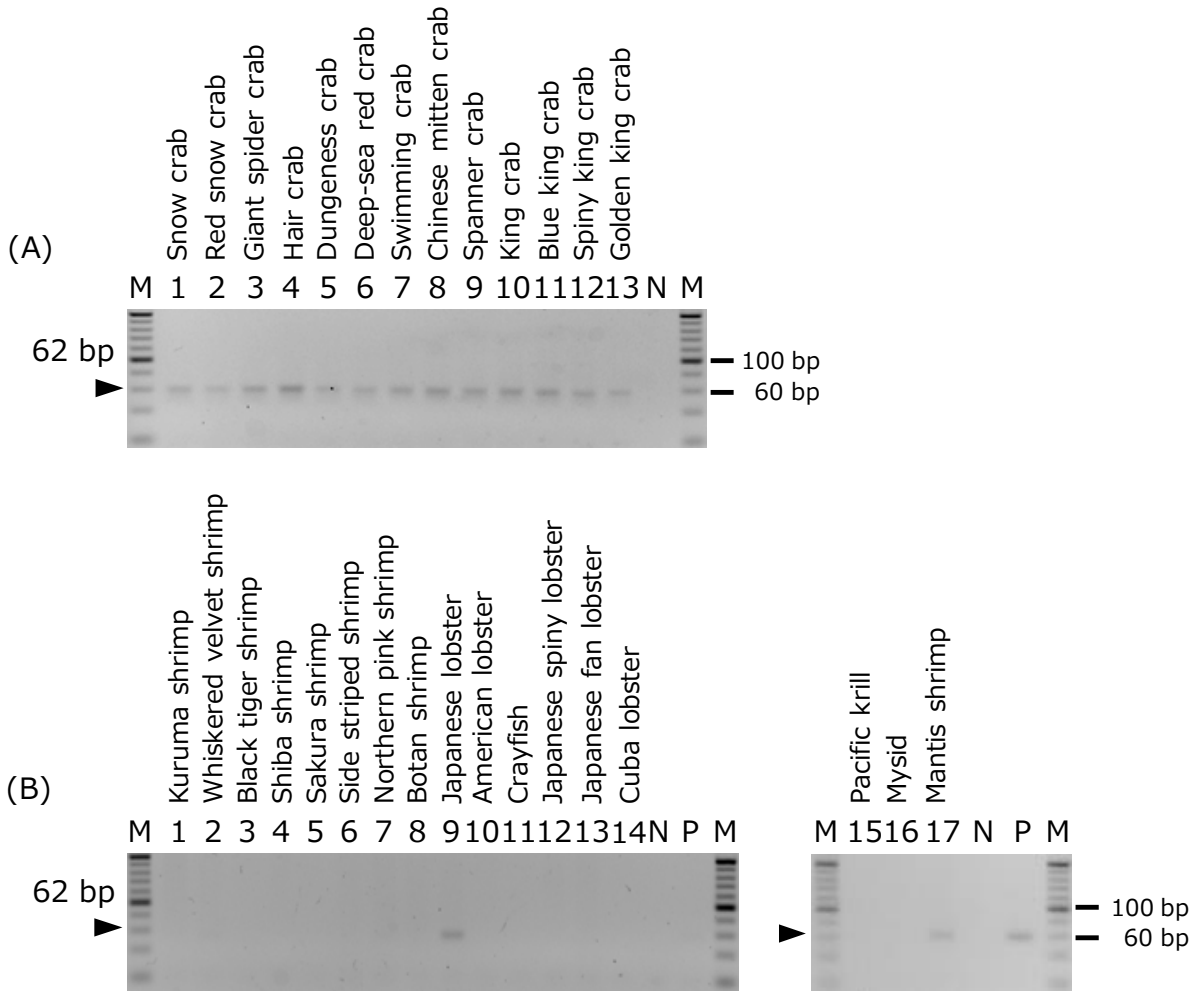
各種カニ DNA ならびにその他の甲殻類 DNA を用いたエビ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (A)、その後の増幅産物の *Hae*III制限酵素消化結果 (B) を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。

(A) & (B) lanes 1 - 16, ズワイガニ (1), ベニズワイガニ (2), タカアシガニ (3), ケガニ (4), ダンジネスクラブ (5), オオエンコウガニ (6), ワタリガニ (7), シャンハイガニ (8), アサヒガニ (9), タラバガニ (10), アブラガニ (11), ハナサキガニ (12), イバラガニ (13), オキアミ (14), イサザアミ (15), シャコ (16) DNA 50 ng ; N, 陰性コントロール (水) ; P, 陽性コントロール (クルマエビ DNA 5 pg) ; M, 20 bp ladder marker.



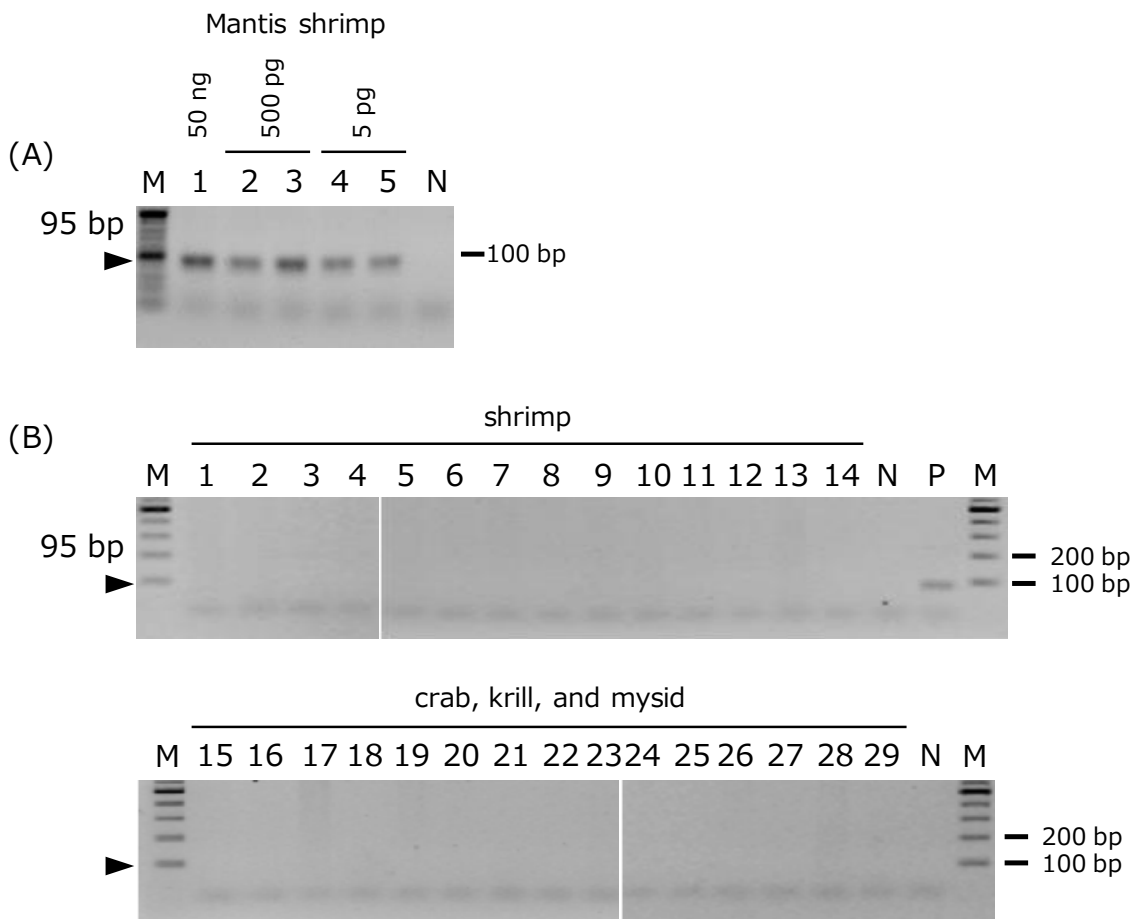
図：2 - 6 アキアミ検出 PCR の特異性と感度

アキアミ DNA を用いたアキアミ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (A)、各種カニ DNA ならびにその他の甲殻類 DNA を用いたに対するアキアミ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (B) を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。(A) lanes 1 - 3, アキアミ日本産 (1), 台湾産 (2), 中国産 (3) DNA 5 pg ; N, 陰性コントロール (水) ; M, 20 bp ladder marker、(B) lanes 1 - 13, ズワイガニ (1), ベニズワイガニ (2), タカアシガニ (3), ケガニ (4), ダンジネスクラブ (5), オオエンコウガニ (6), ワタリガニ (7), シャンハイガニ (8), アサヒガニ (9), タラバガニ (10), アブラガニ (11), ハナサキガニ (12), イバラガニ (13) DNA 50 ng ; N, 陰性コントロール (水) ; P, 陽性コントロール (アキアミ DNA 5 pg) ; M, 20 bp ladder marker。



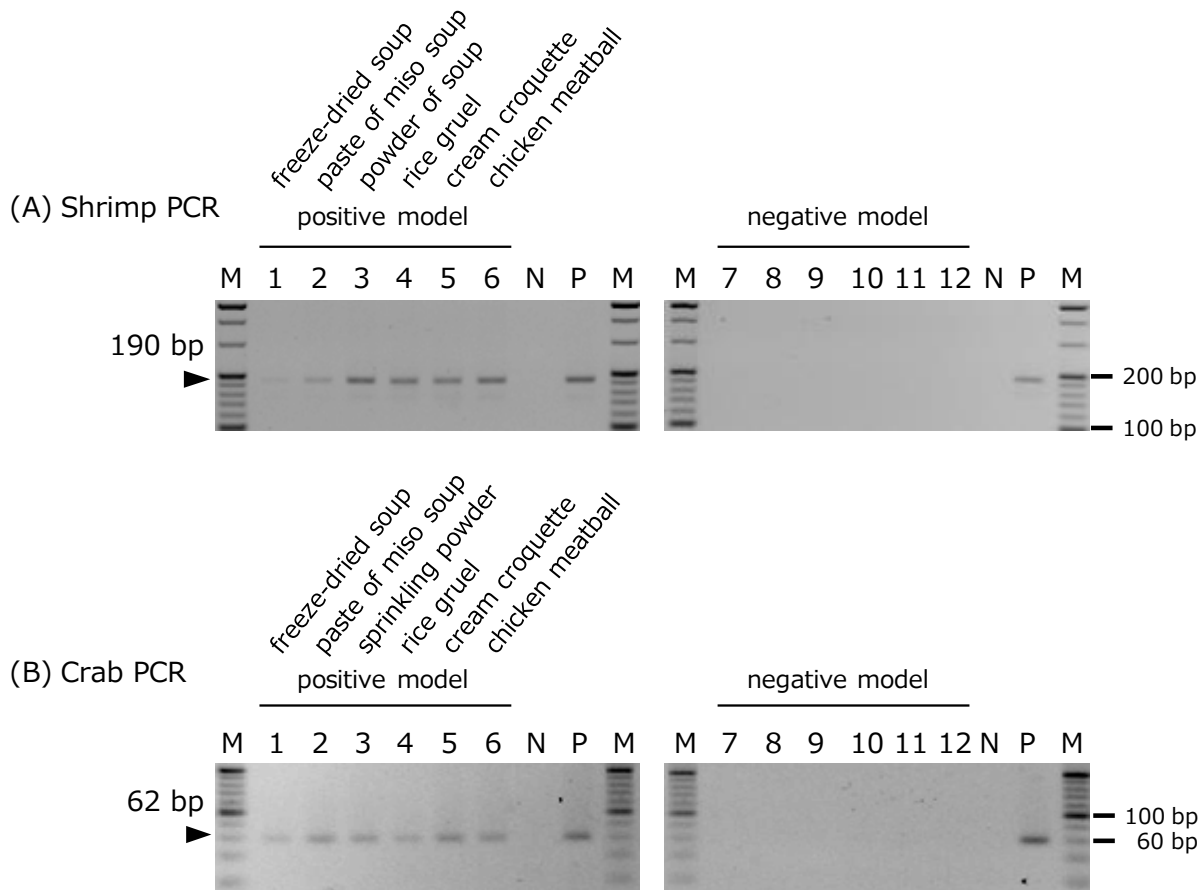
図：2 - 7 カニ検出PCRの特異性と感度

各種カニ DNA を用いたカニ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (A)、各種エビ DNA ならびにその他の甲殻類 DNA を用いたカニ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (B) を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。(A) lanes 1 - 13, スワイガニ (1), ベニズワイガニ (2), タカアシガニ (3), ケガニ (4), ダンジネスクラブ (5), オオエンコウガニ (6), ワタリガニ (7), シャンハイガニ (8), アサヒガニ (9), タラバガニ (10), アブラガニ (11), ハナサキガニ (12), イバラガニ (13) DNA 5 pg ; N, 陰性コントロール (水) ; M, 20 bp ladder marker. (B) lanes 1 - 17, クルマエビ (1), アカエビ (2), ブラックタイガー (3), シバエビ (4), サクラエビ (5), シマエビ (6), アマエビ (7), ボタンエビ (8), スキャンピー (9), オマールエビ (10), アメリカザリガニ (11), イセエビ (12), ウチワエビ (13), キューバロブスター (14), オキアミ (15), アミ (16), シャコ (17) DNA 50 ng ; N, 陰性コントロール (水) ; P, 陽性コントロール (タラバガニ DNA 5 pg) ; M, 20 bp ladder marker.



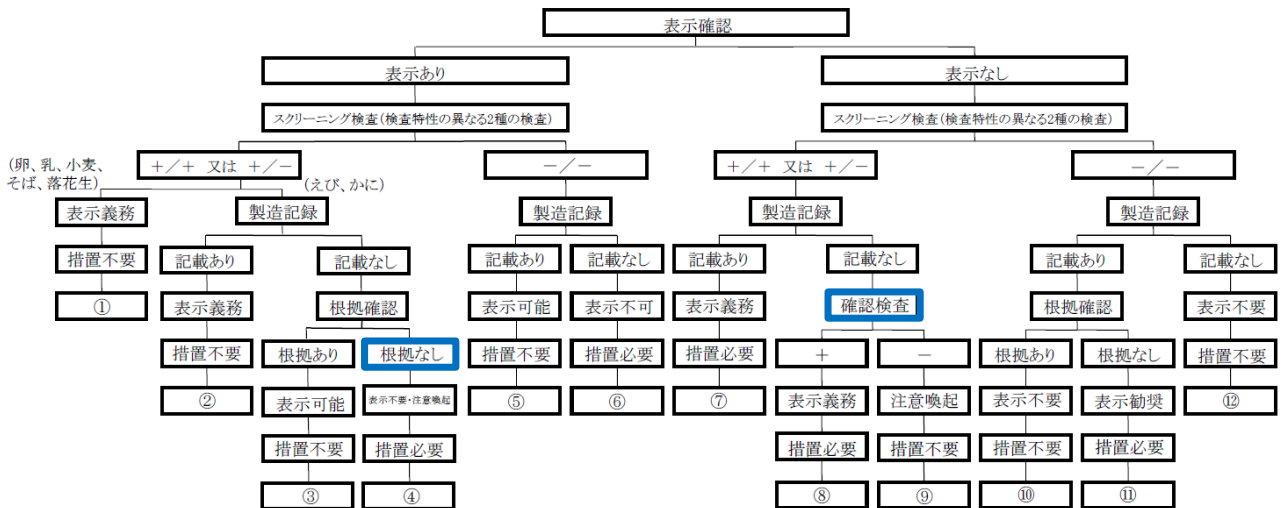
図：2 - 8 シャコ検出 PCR の特異性と感度

シャコ DNA を用いたシャコ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (A)、各種エビ、カニ DNA ならびにその他の甲殻類 DNA を用いたシャコ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果 (B) を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。(A) lanes 1 - 5, シャコ DNA 50 ng (1), 500 pg (2, 3), 5 pg (4, 5); N, 陰性コントロール (水); M, 20 bp ladder marker。(B) lanes 1 - 29, クルマエビ (1), ボタンエビ (2), オマールエビ (3), イセエビ (4), アカエビ (5), ブラックタイガー (6), シバエビ (7), シマエビ (8), サクラエビ (9), アマエビ (10), スキャンピー (11), アメリカザリガニ (12), ウチワエビ (13), キューバロブスター (14), ベニズワイガニ (15), タカアシガニ (16), ケガニ (17), マルズワイガニ (18), ワタリガニ (19), アサヒガニ (20), アブラガニ (21), ハナサキガニ (22), イバラガニ (23), ズワイガニ (24), シャンハイガニ (25), ダンジネスクラブ (26), タラバガニ (27), オキアミ (28), アミ (29) DNA 50 ng; N, 陰性コントロール (水); P, 陽性コントロール (シャコ DNA 5 pg); M, 20 bp ladder marker。



図：2 - 9 モデル加工食品を用いたエビ/カニ検出 PCR の感度評価

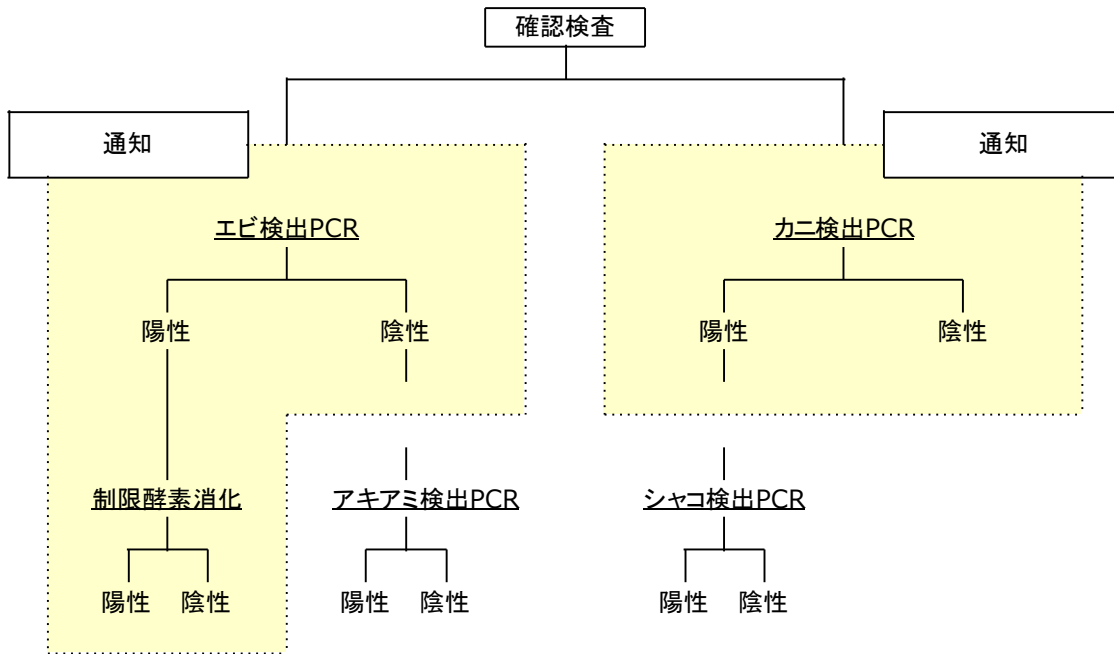
各種モデル加工食品抽出 DNA を用いたエビ/カニ検出 PCR の増幅産物の電気泳動結果を示す。矢印は、予測される標的サイズの増幅産物の位置を示す。(A) lanes 1 - 6, 10 ppm モデル加工食品 FD スープ (1), 味噌汁ペースト (2), 粉末スープ (3), お粥 (4), クリームコロッケ (5), 鶏団子 (6) 抽出 DNA 50 ng、lanes 7 - 12, 0 ppm モデル加工食品 FD スープ (7), 味噌汁ペースト (8), 粉末スープ (9), お粥 (10), クリームコロッケ (11), 鶏団子 (12) 抽出 DNA 50 ng ; N, 陰性コントロール (水) ; P, 陽性コントロール (クルマエビ 5 pg DNA) ; M, 20 bp ladder marker、(B) lanes 1 - 6, 10 ppm モデル加工食品 FD スープ (1), 味噌汁ペースト (2), ふりかけ (3), お粥 (4), クリームコロッケ (5), 鶏団子 (6) 抽出 DNA 50 ng、lanes 7 - 12, 0 ppm モデル加工食品 FD スープ (7), 味噌汁ペースト (8), ふりかけ (9), お粥 (10), クリームコロッケ (11), 鶏団子 (12) 抽出 DNA 50 ng ; N, 陰性コントロール (水) ; P, 陽性コントロール (タラバガニ 5 pg DNA) ; M, 20 bp ladder marker。



図：2-10 「通知」における確認検査の位置付け

「通知」の判断樹における確認検査の実施タイミングを青枠で示す。「エビ・カニ表示：なし、ELISA 試験：陽性、製造記録：エビ・カニ記載なし」の場合は確認検査が必須で、「エビ・カニ表示：あり、ELISA 試験：陽性、製造記録：エビ・カニ記載なし（表示した根拠がない）」の場合は必要に合わせて確認検査を実施する。

出典：「アレルギー物質を含む食品の検査方法について（平成22年9月10日付け 消食表第286号）」別添2



図：2-11 エビ/カニ/アキアミ/シャコ検出 PCR の関係

エビ/カニ検出 PCR ならびにその他検出 PCR の関係を示す。確認検査には、エビ検出 PCR と制限酵素消化、カニ検出 PCR が定められている。アキアミ検出 PCR ならびにシャコ検出 PCR は「通知」の範囲には含まれない。

第3章：エビ/カニ識別 PCR 検出技術の実務検査への適用に関する研究

【序論】

エビならびにカニの検査法に関する通知

エビとカニは、2008年6月に推奨表示品目から義務表示品目に格上げされ、2年間の猶予期間を経た2010年6月から加工食品への表示が義務化されている。食品中のアレルギー原因食物の検査は、①スクリーニング検査（ELISA 試験）、②製造記録の確認、③確認検査（PCR 試験）の3段階で構成されている。最終的な判定は、「通知」別添2の判断樹に記載のとおり、原材料表示、スクリーニング検査、製造記録への記載、確認検査の結果から総合的に判断される。検査方法は、甲殻類全般を検出するスクリーニング検査用の ELISA と、エビとカニそれぞれに特有の DNA 配列を検出する確認検査用の PCR（本研究第2章で開発した方法）があり、2010年9月に食品衛生法に基づく表示の所管が消費者庁に変更されるに伴い通知された「アレルギー物質を含む食品の検査方法について（平成22年9月10日付け消食表第286号）」（「通知」）に示されている。

スクリーニング検査（ELISA 試験）

「通知」には、スクリーニング検査に用いる ELISA 試験は特性の異なる2種類の検査キットを用いることが示されている。甲殻類の ELISA 試験は、「通知」の「参考：アレルギー物質を含む食品の検査方法について」に記載の2種類を用い、少なくともどちらか一方で 10 ppm（甲殻類総タンパク重量/食品重量）以上であった場合に陽性と判定される。ELISA はタンパクを標的とし、類似のタンパクでは交差反応を示す場合がある。甲殻類キットⅡ「マルハニチロ」（マルハニチロ社製）では、ブラックタイガーに対する反応性を 100%とした場合の各種甲殻類の反応性が開示（2014年9月作成）されており、それぞれブラックタイガー：100%、ホッコクアカエビ：66%、イセエビ：114%、キューバロブスター：106%、タラバガニ：39%、ガザミ：29%となっている。また、その他の甲殻類では数値は低いものの、一定の反応性（シャコ：7.6%、オキアミ：1.2%、フレカラ：1.7%）が見られている。FA テスト EIA-甲殻類Ⅱ「ニッスイ」（日水製薬社製）では、検出感度（ppm）で反応性が開示（2012年6月第1版）されており、エビとカニ以外のその他の甲殻類（ナンキョクオキアミ、シャコ、カメノテ、ミネフジツボ、アミ）でも 20 ppm 以上の数値が得られている。また、食用となる昆虫として蜂（幼虫）、蟻、イナゴ、カイコガなどが偽陽性リストに、キチン、キトサン、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、一部のエキス・色素・香料が偽陰性リストに挙げられている。

確認検査 (PCR 試験)

「通知」では、PCR 試験はエビ検出プライマーならびにカニ検出プライマーを用いた PCR を実施する。試験の流れは、試料からの DNA 抽出、抽出 DNA の品質確認、エビ/カニ検出 PCR の順である。DNA 抽出は、イオン交換樹脂タイプキット法、シリカゲル膜タイプキット法、Cetyl trymetyl ammonium bromide (CTAB) 法が示されている。DNA の品質確認、つまり PCR 検査適用可否の判定は、植物または動物由来の DNA を検出する植物/動物検出 PCR による増幅確認によって判定する。エビ/カニ検出 PCR は、PCR 検査適用可能と判定された DNA に対して実施し、陽性/陰性を判定する。PCR 検査は、食物アレルギーの原因タンパクを検出する方法ではないが、DNA の塩基配列を対象とすることで高い識別能を有するため、スクリーニング検査後の確認検査として用いられている。

PCR 検出技術の食品検査への適用性評価

本研究の第 2 章エビならびにカニの識別 PCR 検出技術に関する研究では、単一 DNA ならびにモデル加工食品に対する高い特異性と感度を有することを確認した。ただし、本検出 PCR を食品中の食物アレルギー原因食物の検査に使用する場合、様々な食品に対して幅広く適用できなければならない。つまり、スクリーニング検査である ELISA 試験と確認検査である PCR 試験の結果に整合性が得られる必要がある。さらに、上記「確認検査 (PCR 試験)」の項目で記載したとおり、PCR 試験は検出技術の性能だけでなく、検査に供する DNA の品質も検査結果に影響を与えるため、その点も注意が必要になる。

本章の目的

本章では、エビ/カニ PCR 検出技術開発の第 2 ステップとして、エビ/カニ検出 PCR の加工食品への適用性を ELISA 試験との整合性から評価するとともに、一連の PCR 検査における DNA 抽出ならびに PCR 適用可否判定用の植物/動物検出 PCR の課題を整理し、正確な検査結果の提供に繋がる方法を検討することで、確認検査の視点からエビ/カニ PCR 検出技術の開発について研究を行なった。

【方法】

試料

原材料表示にエビやカニの記載がある原料ならびに加工食品 46 試料（1.えび混合パウダーⅠ、2.えび混合パウダーⅡ、3.えび混合パウダーⅢ、4.えびオイルⅠ、5.えびオイルⅡ、6.えびエキスⅠ、7.えびエキスⅡ、8.えびみそ、9.XO 醤、10.えびのチリソースあえ、11.えびピラフ、12.えびシュウマイ、13.さつまあげ、14.中華丼の素、15.ちゃんぽんの素、16.グルタン、17.えびの塩辛、18.パエリアの素、19.パエリア、20.乾燥えび、21.味付け海苔、22.スナック、23.ポテトスナック、24.せんべい、25.旨煮の素、26.チリソース、27.シチュールウ、28.餅、29.かにエキス、30.かにコロツケ、31.かに漬け、32.かに乾燥品、33.雑炊の素、34.コーンスナック、35.味噌汁、36.雑炊、37.かに玉、38.カレー炒めの素、39.かにフレーク、40.かにみそ、41.かにかまぼこ、42.魚肉ソーセージ、43.キトサン、44.スパゲッティ、45.白菜キムチ、46.グルコサミン）を検査した（表：3-1）。

スクリーニング検査

「通知」の「参考：アレルギー物質を含む食品の検査方法について」に記載の 2 種類の ELISA キット（FA テスト EIA-甲殻類Ⅱ「ニッスイ」：日水製薬社製、甲殻類キットⅡ「マルハニチロ」：マルハニチロ社製）を用いて、試料からのタンパク質抽出ならびに甲殻類総タンパク質濃度の算出を行なった。通常、「通知」の判定では 10 ppm 以上で陽性、10 ppm 未満で陰性とするが、本研究では整合性をより詳しく議論するために、10 ppm 未満 1 ppm 以上、1 ppm 未満と細かく設定して、整合性を評価した。

DNA 抽出

「通知」では 3 種類の DNA 抽出精製方法が示されている。そのうち、キットが販売され、実際の検査で用いられる頻度が高い 2 種類の方法を用いた。シリカゲル膜タイプキットは DNeasy Plant Mini (QIAGEN 社製)、イオン交換樹脂タイプキットは Genomic-tip 20/G (QIAGEN 社製) を使用した。抽出した DNA 溶液の 230, 260 ならびに 280 nm の吸光度 (A_{230} , A_{260} , A_{280}) を測定し、DNA 濃度は A_{260} 、精製度はタンパク質など不純物除去の指標である A_{260}/A_{280} 比（基準：1.2~2.5）、糖やフェノールなどの低分子化合物の不純物除去の指標である A_{260}/A_{230} 比（基準：2.0 以上）から算出、評価した。

各種検出 PCR

PCR 検査適用可否の判定に用いる植物/動物検出 PCR (植物/動物 PCR) は「通知」に記載の方法に従い、エビ/カニ検出 PCR (エビ/カニ PCR) は第 2 章で開発した方法で実施した。植物 PCR の反応液組成と反応条件は第 1 章の表: 1-1, 2、動物 PCR の反応液組成と反応条件は表: 3-2, 3 に示す。植物、エビ、アキアミ、カニ検出用プライマーは FASMAC 社製を、動物検出用プライマーはオリエンタル酵母工業社製を用いた。陽性コントロールとして、植物、エビ、アキアミ、カニ PCR では甲殻類検出用陽性コントロールプラスミド (FASMAC 社製) を、動物 PCR では陽性コントロールテンプレート (オリエンタル酵母工業社製) を用いた。PCR 反応試薬は Life Technologies 社製を用いた。

新規動物検出 PCR

「通知」に記載の動物 PCR の増幅産物の標的サイズ 370~470 bp と比較して、80 bp 程度と短く、DNA 分解や PCR 阻害作用に対する頑健性が高いと考えられる新規動物 PCR を用いた (Watanabe et al., 2011)。PCR 反応液組成ならびに反応条件は文献に記載の方法に従って実施した。PCR 装置は GeneAmp PCR System 9700 または Veriti サーマルサイクラー (ともに Life Technologies 社製) を用いた。

PCR 阻害作用の確認

市販加工食品の抽出 DNA に各種陽性コントロールプラスミド 2.5 μ l を添加したのち、「通知」に記載の植物、動物、エビ、カニ PCR を実施した。PCR 阻害作用の有無ならびに程度は、ゲル電気泳動時の標的サイズの増幅産物の有無ならびに染色強度で評価した。

適用性評価ならびに一連の PCR 試験工程の検討

エビやカニ原料を使用した市販加工食品を用いて、原材料表示、2 種類の ELISA 試験の定量値、PCR 試験結果の整合性を確認した。さらに、各種食品の抽出 DNA の量と質、PCR 検査適用可否に用いる植物/動物 PCR、PCR 阻害作用確認試験の結果を照らし合わせ、加工食品中のエビならびにカニの有無をより適切に判定するための方法について検討した。

【結果】

試料

原材料、加工方法、形態が異なる幅広い食品カテゴリーから、エビやカニを使用した原料ならびに加工食品 46 試料を揃えた。内訳は、エビ表示のある 28 製品（粉末原料、オイル、ペーストエキス、冷凍食品、スナック、レトルト、ルウなど）、カニ表示のある 15 製品（ペーストエキス、スナック、レトルト、缶詰など）、エビ・カニ表示のある 3 製品（冷凍食品、タブレットなど）である。

DNA 抽出方法の比較

DNeasy 法（D 法）と Genomic-tip 法（G 法）の 2 つの DNA 抽出法について、DNA 濃度ならびに精製度を比較した。結果の一部を表：3 - 4 に示す。DNA 濃度に関しては、「20 ng/μl 以上」であった試料数は D 法 30 試料/G 法 36 試料と G 法の方が多く、また全体的に G 法で濃度が高い傾向にあった。フレーバーオイルやタブレットでは植物や動物原料の使用量が少ないため、D 法、G 法共通して DNA 濃度が低い傾向にあった。なお、「8. えびみそ」、「23. ポテトスナック」、「31. かに漬」では、どちらか一方の方法でのみ DNA が抽出できるなど、試料によって適した抽出法が異なっていた。DNA 精製度に関しては、タンパク質等の不純物除去の指標が 1.2~2.5 の範囲内の基準を満たしたものは、D 法 44 試料/G 法 40 試料と大きな差は見られなかった。一方、糖、フェノール等の低分子化合物の不純物除去の指標が 2.0 以上の基準を満たしたものは、D 法 1 試料/G 法 23 試料と G 法で精製度が高かった。

加工食品検査へのエビ/カニ検出 PCR の適用性評価

ELISA 試験による総甲殻類タンパク質濃度（ELISA 値）と PCR 試験の結果の詳細を表：3 - 5 に記載した。また、両試験の陽性/陰性判定の比較結果は表：3 - 6 にまとめた。全 46 試料において、スクリーニング検査で陽性判定（ELISA 値：10 ppm 以上）であった 32 試料のうち、PCR 検査適用可能（植物/動物 PCR：陽性）と判定された試料は G 法抽出 DNA で 27 試料、D 法抽出 DNA で 23 試料であった。それらのうち、「エビ/カニ PCR：陽性」であった試料は G 法抽出 DNA で全 27 試料、D 法抽出 DNA で 21 試料であった。D 法抽出 DNA の残りの 2 試料（「44. スパゲッティ」、「45. 白菜キムチ」）は表示とは異なり、「カニ PCR：陰性」であった。これら 2 試料は、エビ・カニ表示のある製品で、エビ原料が多く使用されている一方、「44. スパゲッティ」では試料全体量の 1%に満たない原料の一部にカニエキスが使用され、また「45. 白菜キムチ」では、

試料全体の1%に満たない量のキトサン（カニ外皮由来）が含まれる程度であった。

ELISA 値 10 ppm 未満 1 ppm 以上の 5 試料のうち、D 法、G 法両抽出 DNA で「カニ PCR：陰性」であった「42. 魚肉ソーセージ」では、原材料表示に「原料の一部にカニを含む」との記載があり、実際に試料全体量の1%に満たない原料の一部にカニエキスが含まれる程度で、ELISA 値も 2 ppm 程度と低値であった。なお、主原料由来の DNA が多量に抽出された場合、相対的に抽出 DNA 中のエビ／カニ DNA の割合が低下し、検出が困難になる可能性も考えられる。

ELISA 値 1 ppm 未満の 9 試料のうち、D 法、G 法少なくともどちらか一方の抽出 DNA において「エビ PCR：陽性」であった試料は 3 試料「5. えびオイル II、18. パエリアの素、27. シチュールウ」存在した。これら全ての試料にはエビエキス原料が使用されている。詳細な製造工程は不明であるが、エキス原料製造時のタンパクと DNA で変性や分解程度が異なることが結果の違いに現れたと考えられる。

なお、ELISA 値の大小に関わらず、9 試料では D 法、G 法いずれの抽出 DNA でも PCR 検査適用不能（植物／動物 PCR：陰性）と判定された。PCR 検査適用不能な食品が多数存在することは、エビ／カニ表示の妥当性評価において課題と考えられ、これら食品について適正な結果を出すことが求められる。そこで、これら 9 試料について、DNA 抽出方法、植物／動物 PCR による判定、PCR 阻害作用の有無を評価して、原因の考察、改善のための方法検討を行なった。

PCR 阻害作用の確認

D 法、G 法いずれの抽出 DNA においても PCR 検査適用不能と判定された 9 製品において、PCR 阻害作用を確認した（表：3-7）。なお、試験には精製度の高い G 法抽出 DNA を用いた。9 試料のうち、5 試料「6. えびエキス I、1. えび混合パウダー-I、2. えび混合パウダー-II、38. カレー炒めの素、8. えびみそ」では、陽性コントロール添加での PCR においても「植物、動物、エビ、カニ PCR：陰性」であり、PCR 阻害作用が大きいと考えられた。これら試料の多くは、殻付きのエビを加工した原料、製品と予想され、殻由来成分が阻害作用を有する可能性が考えられた。実際に乾燥エビにおいて、殻を除去した身から抽出した DNA では PCR 阻害は見られなかった（データ示さず）。なお、原料として利用される「6. えびエキス I」、「1. えび混合パウダー-I」、「2. えび混合パウダー-II」は加工食品への使用量は少なく、最終製品ではその他の原料マトリクスによって阻害作用は低減されると考えられるが、「38. カレー炒めの素」と「8. えびみそ」は、ELISA 値が 10 ppm 未満と低いものの、最終製品であり、DNA 抽出・精製方法の改良による阻害作用の低減が望まれる。

次に、3 試料「9. XO 醬、20. 乾燥えび、35. 味噌汁」では、「植物、エビ、カニ PCR : 陽性」であった一方「動物 PCR : 陰性」で、前述の 5 試料と比較すると程度は小さいものの、PCR 阻害作用を有すると判断した。これら 3 試料は、陽性コントロール未添加の検査で「エビ/カニ PCR : 陽性」であったことから、エビ/カニ PCR と比較して、「通知」の動物 PCR が阻害作用を受けやすいと考えられた。一般に PCR 阻害を引き起こす食品中の物質としては、タンパク質、ポリフェノール類、多糖類等が知られている。本研究で PCR 阻害作用が確認された試料において、 A_{260}/A_{280} 比は基準 (1.2~2.5) 範囲内に収まっていたことから、タンパクによる影響は小さいと判断した。また、試料の多くがエビとカニを主原料とすることから、果物や穀物に多く含有されるポリフェノールである可能性も低いと判断した。一方、多糖類としては、甲殻類の外皮を構成するキチンが考えられる。なお、PCR 阻害作用が確認されている殻付きサクラエビ乾燥品の抽出 DNA では、通知法とは原理が異なる磁気ビーズを用いた抽出・精製方法を用いたところ、改善が認められた (データ示さず)。

最後に、残りの 1 試料「40. かにみそ」では、抽出 DNA の陽性コントロール添加/未添加において同程度の増幅強度を有する標的サイズの増幅産物が検出されたことから、阻害作用は問題ないレベルと考えられた。なお、「40. かにみそ」の抽出 DNA は、濃度・精製度とも良好な結果であったが、抽出 DNA は数百塩基以下まで分解されていることが確認された。「かにみそ」は缶詰で、調理後、レトルト殺菌などの加工がなされているため、標的 DNA の断片化が進んだと推測される。そのため、カニ PCR よりも増幅産物の標的サイズが長く、感度が低い植物/動物 PCR では検出されなかったと考えられた。

植物/動物検出 PCR による PCR 検査適用可否の判定

PCR 検査適用不能と判定された 9 製品のうち、「エビ/カニ PCR : 陽性」であった 5 試料 (G 法抽出 DNA) について、渡辺らが開発した新規動物 PCR を用いて検査を行なった。(表 : 3 - 8)。結果、「6. えびエキス I」は不検出であったが、その他の 4 試料「9. XO 醬、20. 乾燥えび、35. ぞうすいの素 2、40. かに漬」で「新規動物 PCR : 陽性」であった。それら 4 試料のうち、特に発酵食品の「9. XO 醬」と「40. かに漬」では、ゲノム電気泳動の結果、200 bp 以下まで DNA 分解が進んでいることが確認された。このような食品では、動物 PCR と並行してエビ/カニ PCR を実施することで、動物 PCR で陰性であった場合でも、エビ/カニの含有に関する情報は得られる。なお、DNA 分解が激しい加工食品を新規動物 PCR で検査する場合、「新規動物 PCR : 陽性」、「エビ/カニ PCR : 陰性」の結果が得られ、偽陰性判定となるリスクがあるため、新規動物 PCR の使用場面としては、「通知動物 PCR : 陰性」の場合に、確認用として用いる等の使用が考えられる。

【考察】

エビ／カニ検出 PCR の加工食品検査への適用性

「通知」の陽性判定基準である「ELISA 値 10 ppm 以上」であった 32 試料のうち、PCR 検査適用可能と判定された全 27 試料において「エビ／カニ PCR：陽性」であった。また、「PCR 検査判定不能」となった 5 製品のうち 4 製品でも「エビ／カニ PCR：陽性」であった。このように、エキス等の原料、調味料、冷凍食品、菓子、レトルト食品、缶詰等の様々な加工食品において、原材料表示、ELISA 試験結果に対する PCR 試験結果の整合性が得られたことから、エビ／カニ PCR の適用性が高いことが示された。一方で、「ELISA：陰性」に対して、「エビ PCR：陽性」と判定された試料が存在し、それら試料にはエキス原料が使用されていた。ELISA 試験と PCR 試験は検出対象がそれぞれタンパクと DNA で異なり、これら標的分子は加工条件によって変性、分解の進み易さは異なると予想される。製品に用いられたエキス原料に関しては、タンパクが変性、分解しやすい加工条件であったと考えられた。また、No.44, 45 のようにエビとカニ両方を含有する試料の場合、エビ／カニどちらか一方が極微量に含有されている程度であると、「ELISA：陽性」であっても、エビ／カニを個別に検出する PCR 試験では、微量に含有されている一方が不検出となり、「陰性」と判定される可能性が考えられた。このような判定は ELISA 試験がエビ／カニを区別なく検出するのに対して、PCR 試験では区別して検出するために生じる。「通知」の判断樹では、「エビ／カニ原材料表示：なし、ELISA：陽性」の場合、確認検査を実施するが、上記の点をふまえ、製造履歴の確認とともに総合的な判定が必要になる。

DNA 抽出方法の比較

タンパク質等の不純物除去の指標では、D 法、G 法両者で差は見られなかった。一方、DNA 濃度ならびに糖、フェノール等の低分子化合物の不純物除去の指標では G 法で良好な値が得られた。また、実際の PCR 試験では、「ELISA：陽性」の 32 試料のうち、「植物／動物 PCR：陽性」で PCR 検査適用可能と判定された試料は D 法 23 試料に対して G 法 27 試料、そのうち、「エビ／カニ PCR：陽性」であった試料は D 法 21 試料、G 法 27 試料であった。以上の結果から、大きな見逃しなく原料や加工食品中のエビ／カニを検出するためには G 法を第一選択肢とすることが有効と考えられた。

水産加工食品からの DNA 抽出に関しては、これまでにいくつかの報告がなされている。橋本らは、海苔加工品に対するエビ／カニ PCR の適用性を評価しており、本研究と同様、D 法、CTAB 法と比較して G 法で良好な結果を得ている。また、海苔加工品では抽出溶液の粘性が高くなるため、試料採取量の変更ならびに含水操作の

追加が有効であることを示している。さらに、海苔の抽出 DNA では PCR 阻害作用が大きく、その対応方法として、Ampdirect[®] Plus DNA ポリメラーゼ（島津製作所社製）を用いることで検出を可能にしている（Hashimoto et al., 2015）。本研究においても、乾燥エビの殻の抽出 DNA において PCR 阻害作用が確認されている。DNA の品質向上ならびに PCR 阻害作用の低減に関しては、前述した磁気ビーズを用いた方法や異なるタイプの精製カラムの組み合わせの採用、ポリビニルピロリドンによる阻害物質の除去（Temmei et al., 2008）、DNA 溶液の希釈による阻害作用の低減などによる改善が考えられる。個々の食品によって適した方法は異なると予想されるが、抽出 DNA の品質を高めることは適切な PCR 試験結果を得ることに繋がるため、今後も DNA 抽出・精製技術の進展が期待される。

PCR 検査適用可否の判定方法

「動物 PCR：陰性」によって PCR 検査適用不能の判定となる原因としては、DNA 分解ならびに PCR 阻害が考えられる。DNA の分解程度は食品の加工条件で異なり、100 bp 程度まで断片化する場合もある。植物／動物 PCR ならびにエビ／カニ PCR の増幅産物の標的サイズは、植物：124 bp、動物：350～470 bp、エビ：190 bp、カニ：62 bp で、他と比較して動物 PCR で長い。実際の PCR 試験では、DNA 分解程度が大きい試料で「動物 PCR：陰性」となる場合が見られた。PCR 阻害作用は、プライマーの標的配列への結合ならびに伸長反応において生じると考えられる。阻害作用に対する PCR の耐性は、プライマーと標的配列との結合力（相同性、GC 含量）、PCR の進み易さ（反応液組成、反応条件）、増幅産物長などの要因に影響される。本研究で動物 PCR が阻害作用の影響を受けやすかった原因は標的サイズの長さにあると予想した。なお、PCR 反応液組成は MgCl₂ 濃度が 3 mM と高値で、さらにアニーリング温度は 50℃と低値であることから、プライマーと標的配列との結合ならびに PCR は進みやすい条件であった。

エビ／カニ PCR と比較して、植物／動物 PCR の感度が著しく高いと、偽陰性リスクが高まる。食品中の食物アレルギー原因食物の検査において、偽陰性判定は致命的であるため、その点においては PCR 検査適用不能の判定も許容する必要がある。ただし、アレルギー患者への適切な情報提供のためには、判定不能となる試料を出来る限り減らす努力が求められる。本研究では、抽出 DNA の精製度を高めると同時に、植物／動物 PCR とエビ／カニ PCR の並行実施、新規動物 PCR の活用が有効と考えられた。

PCR 試験の手順

加工食品の検査では、DNA 分解や PCR 阻害作用などの DNA 品質の低下によって、植物/動物 PCR が不検出となり、PCR 試験を適用できない製品が存在することが懸念される。そこで、加工食品中のエビ/カニの有無を適切に判定するために有効と考えられる一連の PCR 試験の手順として、以下の流れが考えられた。まず DNA 抽出法は陰イオン交換膜を用いた Genomic-tip 法を採用する。次に植物/動物 PCR と並行してエビ/カニ PCR を実施する。そして、その結果から品質低下が疑われる抽出 DNA について DNA 分解程度と PCR 阻害作用を評価する。DNA 分解への対応は難しいが、阻害作用に関しては、異なる抽出原理の DNA 抽出方法ならびに DNA 精製方法を検討する。

水産加工食品における甲殻類の混入

本研究では、適用性評価に一部海苔製品を用いたが、すり身などの水産加工品は使用しなかった。これまでに国立医薬品食品衛生研究所ならびに地方衛生研究所が実施した調査では、水産加工品における甲殻類の混入率が高いことが報告されている。酒井らは、海苔製品、いわし稚魚製品、すり身、二枚貝を測定し、海苔：27 検体/85 検体、いわし稚魚：48/52、すり身：59/132、二枚貝：3/36 で甲殻類タンパク質が検出されたことを報告している (Sakai et al., 2008)。また、渡邊らは、小魚を含む水産加工品として煮干、ちりめんじゃこ、佃煮などを測定し、33 検体/52 検体で甲殻類タンパク質が検出されたことを報告している (Watanabe et al., 2014)。加工程度が低い水産加工品への混入は、漁における混獲ならびに魚による捕食後の胃内容物によって引き起こされると考えられている。現在、表示制度では、「入っているかもしれない」、「入っている場合がある」等の可能性表示は認められていない。ただし、上記のようにエビ/カニの混入頻度や混入量が高いと想定される製品では注意喚起表示が認められている。水産加工品のように明らかに可能性が高い製品以外にも魚介類を原料に使用する加工食品については、上記視点を持ち、試験結果の総合的な判断が必要と考える。

【まとめ】

第 2 章の単一 DNA に対するエビ/カニ PCR 検出技術の評価に続き、本章では、市販加工食品への適用性を ELISA 試験との整合性の観点から評価した。また、抽出 DNA の品質ならびに PCR 検査適用可否の判定方法に関する実態の把握と正確な検査結果の提供に繋がる方法の検討を行なった。

- 1) 「ELISA : 陽性」であった 32 製品中、31 製品でエビ/カニが検出されたことから、エビ/カニ PCR 検出技術の感度は、「通知」に記載の ELISA 試験と同レベルで、様々な原材料、製造工程、食品形態を有する加工食品に対する適用性を有することを確認できた。なお、DNA 分解程度が大きいレトルトや発酵食品、PCR 阻害作用が大きいエビ/カニ原料高含有製品は、PCR 検査が適用し難いと考えられた。
- 2) DNA 抽出方法としては、DNA 量、PCR 阻害作用の観点から Genomic-tip 法が第一選択肢になると判断した。ただし、Genomic-tip 法でも精製が十分でない試料も見られたことから、更なる改良が期待された。
- 3) 動物 PCR は、植物/エビ/カニ PCR と比較すると、DNA 分解や PCR 阻害作用への頑健性が低い可能性が示唆された。PCR 検査適用可否の判定は、動物 PCR のエビ/カニ PCR との並行実施ならびに新規動物 PCR の活用などが PCR 検査適用不能試料の減少のために有効と考えられた。
- 4) 加工食品中のエビ/カニの有無を適切に判定するための一連の PCR 試験の手順として、①陰イオン交換膜を用いた Genomic-tip 法による DNA 抽出、②植物/動物 PCR とエビ/カニ PCR の並行実施、③抽出 DNA の品質評価 (DNA 分解程度と PCR 阻害作用)、④DNA 抽出・精製方法の検討による PCR 阻害作用の低減を提示した。

表：3-1 市販加工食品の種類

No.	sample		description	declaration
1	shrimp powder mix I	えび混合パウダー I	dry powder	shrimp
2	shrimp powder mix II	えび混合パウダー II	dry powder	shrimp
3	shrimp powder mix III	えび混合パウダー III	dry powder	shrimp
4	shrimp-flavored oil I	えびオイル I	oil	shrimp
5	shrimp-flavored oil II	えびオイル II	oil	shrimp
6	shrimp extract paste I	えびエキス I	thick paste	shrimp
7	shrimp extract paste II	えびエキス II	thick paste	shrimp
8	salted shrimp paste	えびみそ	seasoning paste	shrimp
9	XO sauce	XO醤	seasoning paste	shrimp
10	shrimp with chili sauce	えびのチリソースあえ	prepared frozen food	shrimp
11	shrimp pilaf	えびピラフ	prepared frozen food	shrimp
12	steamed dumpling with shrimp; shrimp shumai	えびシューマイ	prepared frozen food	shrimp
13	fried fish cake	さつまあげ	prepared frozen food	shrimp
14	chukadon sauce; chopsuey over rice	中華丼の素	prepared frozen food	shrimp
15	champon sauce; a dish of noodles with stir-fried pork, seafood and vegetables in soup	ちゃんぽんの素	prepared frozen food	shrimp
16	shrimp gratin	グラタン	prepared frozen food	shrimp
17	shiokara; salted and fermented shrimp	えびの塩辛	fermented food	shrimp
18	seafood paella seasoning mix	パエリアの素	dry powder	shrimp
19	seafood paella mix	パエリア	dry food mix	shrimp
20	dried shrimp	乾燥えび	dry food	shrimp
21	seasoned laver	味付け海苔	dry food	shrimp ^{*1}
22	wheat flour based fried snacks	スナック	snack food	shrimp
23	potato flour based fried chips	ポテトスナック	snack food	shrimp
24	rice flour based fried crackers	せんべい	snack food	shrimp
25	seasoning mix for braised seaweed, shrimps and squid	旨煮の素	retort food	shrimp ^{*1}
26	chili sauce	チリソース	retort food	shrimp ^{*1}
27	white stew roux	シチュールウ	roux	shrimp ^{*1}
28	mochi; rice cake	餅	rice cake	shrimp
29	crab extract paste	かにエキス	thick paste	crab
30	croquette with crab meat	かにコロッケ	prepared frozen food	crab
31	shiokara; salted and fermented crab	かに漬け	fermented food	crab
32	dried crab	かに乾燥品	dry food	crab
33	zousui seasoning mix for rice soup with crab meat	雑炊の素	dry food mix	crab
34	corn starch and rice flour based fried snacks	コーンスナック	snack food	crab
35	miso soup with crab meat	味噌汁	freeze-dried food	crab
36	zousui; rice soup with crab meat	雑炊	retort food	crab
37	sauce for crab omelet	かに玉	retort food	crab
38	curry flavored sauce for stir-fried crab and egg	カレー炒めの素	retort food	crab
39	canned crabmeat	かにフレーク	canned food	crab
40	kani miso; crab viscera	かにみそ	canned food	crab
41	fish sausage I	かにかまぼこ	sausage-like fish paste product	crab ^{*1}
42	fish sausage II	魚肉ソーセージ	sausage-like fish paste product	crab
43	chitosan dietary supplement	キトサン	tablet	crab ^{*2}
44	spaghetti with cream sauce	スパゲッティ	prepared frozen food	shrimp, crab ^{*1}
45	chinese cabbage kimchi; korean pickle	白菜キムチ	fermented food	shrimp ^{*1} , crab
46	glucosamine dietary supplement	グルコサミン	tablet	shrimp ^{*2} , crab ^{*2}

適用性評価に使用した加工食品の一覧を示す。*¹ 原材料の一部にエビ/カニ使用の記載有。*² エビ/カニ由来原料使用の記載有。

表：3－2 動物検出 PCR の反応液組成

	final con.
10xPCR buffer II	1×
dNTP (2 mM)	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	3.0 mM
AmpliTaq Gold (5 U/ml)	0.025 U/ml
F-primer (25 μM)	0.2 μM
R-primer (25 μM)	0.2 μM
template DNA	
distilled Water	
total vol.	25 μl

表：3－3 動物検出 PCR の反応条件

initialization	:	95°C	–	10 min	
denaturation	:	95°C	–	0.5 min	×40 cycles
annealing	:	50°C	–	0.5 min	
extension	:	72°C	–	0.5 min	
final extension	:	72°C	–	7 min	

表：3-4 DNA 抽出方法の比較（一例）

No.	sample	declaration	DNeasy				Genomic-tip			
			lot	DNA con. (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	lot	DNA con. (ng/ μ L)	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
10 ppm \leq X										
6	shrimp extract paste I えびエキス I	shrimp	A	14	1.6	0.8	A	28	1.5	0.6
			B	14	1.6	0.8	B	20	1.6	0.7
9	XO sauce XO醬	shrimp	A	107	1.4	0.6	A	70	1.9	2.2
			B	155	1.4	0.6	B	61	1.9	2.1
20	dried shrimp 乾燥えび	shrimp	A	58	1.5	0.6	A	163	1.9	1.7
			B	31	1.6	1.3	B	1063	1.7	1.9
35	miso suop with crab meat 味噌汁	crab	A	49	1.4	0.5	A	129	1.9	1.6
			B	61	1.6	0.5	B	33	1.9	1.6
40	kani miso; crab viscera かにみそ	crab	A	86	1.7	0.9	A	101	1.9	2.1
			B	69	1.8	1.0	B	52	1.8	2.2
1 ppm \leq X < 10 ppm										
1	shrimp powder mix I えび混合パウダー I	shrimp	A	28	1.6	0.6	A	8	1.6	0.4
			B	35	1.6	0.7	B	10	1.4	0.4
2	shrimp powder mix II えび混合パウダー II	shrimp	A	33	1.6	0.6	A	52	1.9	1.3
			B	58	1.5	0.6	B	78	1.9	1.0
38	curry flavored sauce カレー炒めの素	crab	A	24	1.8	0.4	A	12	1.2	0.5
			B	19	1.9	0.4	B	13	1.4	0.4
X < 1 ppm										
8	salted shrimp paste えびみそ	shrimp	A	62	1.5	1.0	A	0.3	0.1	0.0
			B	18	1.4	0.7	B	<0	-0.1	0.0

「通知」に記載の 2 種類の DNA 抽出法によって抽出した DNA の品質を示す。 A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} は各波長の吸光度を示した。DNA 濃度は A_{260} 、タンパク質など不純物除去の指標は A_{260}/A_{280} 比、糖やフェノールなどの低分子化合物の不純物除去の指標は A_{260}/A_{230} 比から算出した。

表：3-5 原材料表示、ELISA 試験、PCR 試験の結果

No.	sample	declaration	ELISA			PCR													
			M kit	N kit	judgement	DNeasy						Genomic-tip							
			ppm	ppm		lot	P	A	S	AP-S	C	judgement	lot	P	A	S	AP-S	C	judgement
10 ppm ≦ X																			
3	shrimp powder mix Ⅲ えび混合パウダーⅢ	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
6	shrimp extract paste I えびエキスI	shrimp	17.3	20<	pos	A	-	-	-	ind	A	-	-	-	ind	B	-	-	-
						B	-	-	-		B	-	-	-					
7	shrimp extract paste II えびエキスII	shrimp	20<	20<	pos	A	+	-	+	pos	A	+	-	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
9	XO sauce XO醤	shrimp	4.5	11.8	pos	A	-	-	+	ind	A	-	-	+	ind	B	-	-	+
						B	-	-	+		B	-	-	+					
10	shrimp with chili sauce えびのチリソースあえ	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	-	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	-		B	+	+	+					
11	shrimp pilaf えびピラフ	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
12	shrimp shumai えびシュウマイ	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
13	satsuma-age さつまあげ	shrimp	20<	20<	pos	A	-	-	-	ind	A	+	-	+	pos	B	+	-	+
						B	-	-	-		B	+	-	+					
14	chukadon sauce 中華丼の素	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
15	champon sauce ちゃんぽんの素	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
16	shrimp gratin グラタン	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
17	shiokara えびの塩辛	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	-	pos	A	+	+	-	pos	B	+	+	-
						B	+	-	+		B	+	+	-					
19	seafood paella mix パエリア	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
20	dried shrimp 乾燥えび	shrimp	20<	20<	pos	A	-	-	-	ind	A	-	-	+	ind	B	-	-	-
						B	-	-	-		B	-	-	-					
22	wheat flour based fried snacks スナック	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
23	potato flour based fried chips ポテトスナック	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
24	rice flour based fried crackers せんべい	shrimp	20<	20<	pos	A	+	+	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	+	+
						B	+	+	+		B	+	+	+					
25	seasoning mix for braised seaweed, shrimps and squid 旨煮の素	shrimp*1	14.9	20<	pos	A	+	-	+	pos	A	+	+	+	pos	B	+	-	+
						B	+	-	+		B	+	-	+					
28	mochi; rice cake 餅	shrimp, shrimp*1	20<	20<	pos	A	+	-	+	pos	A	+	-	+	pos	B	+	-	+
						B	+	+	+		B	+	-	+					
30	croquette with crab meat かにコロッケ	crab	20<	20<	pos	A	+			pos	A	+			pos	B	+		
						B	+				B	+							
31	shiokara かに漬け	crab	10.5	5.8	pos	A	-	-		ind	A	-	+		pos	B	-	-	
						B	-	-			B	-	-						
32	dried crab かに乾燥品	crab	20<	20<	pos	A	-	-		ind	A	+			pos	B	+		
						B	-	-			B	+							
33	zousui seasoning mix for rice soup with crab meat 雑炊の素	crab	20<	20<	pos	A	+			pos	A	+			pos	B	+		
						B	+				B	+							
34	corn starch and rice flour based fried snacks コーンスナック	crab	20<	20<	pos	A	+			pos	A	+			pos	B	+		
						B	+				B	+							
35	miso suop with crab meat 味噌汁	crab	20<	20<	pos	A	-	-		ind	A	-	-		ind	B	-	-	
						B	-	-			B	-	-						

表：3-5 原材料表示、ELISA 試験、PCR 試験の結果 (続き)

No.	sample	declaration	ELISA			PCR													
			M kit ppm	N kit ppm	judgement	DNeasy						Genomic-tip							
						lot	P	A	S	AP-S	C	judgement	lot	P	A	S	AP-S	C	judgement
10 ppm ≤ X																			
36	zousui; rice soup with crab meat 雑炊	crab	20<	20<	pos	A	-	-	-	-	-	ind	A	+	-	-	-	+	pos
						B	-	-	-	-	-	-	B	+	-	-	-	-	+
37	sauce for crab omelet かに玉	crab	20<	20<	pos	A	+	-	-	+	+	pos	A	+	-	-	-	+	pos
						B	+	-	-	-	+	+	B	+	-	-	-	-	+
39	canned crabmeat かにフレーク	crab	20<	20<	pos	A	-	+	-	+	+	pos	A	-	+	-	-	+	pos
						B	-	+	-	-	+	+	B	-	+	-	-	-	+
40	kani miso かにみそ	crab	20<	20<	pos	A	-	-	-	-	-	ind	A	-	-	-	-	+	ind
						B	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	+
41	kamaboko かにかまぼこ	crab	20<	20<	pos	A	-	+	-	+	+	pos	A	-	+	-	-	+	pos
						B	-	+	-	-	+	+	B	-	+	-	-	-	+
44	spaghetti with cream sauce スパゲッティ	shrimp, crab*1	20<	20<	pos	A	+	-	+	+	-	shrimp:pos	A	+	-	+	+	+	shrimp:pos
						B	+	-	+	+	-	crab:neg	B	+	-	+	+	+	crab:pos
45	chinese cabbage kimchi 白菜キムチ	shrimp*1, crab*1	20<	20<	pos	A	+	-	+	-	-	shrimp:pos	A	+	-	+	+	+	shrimp:pos
						B	+	-	+	-	-	crab:neg	B	+	-	+	+	+	crab:pos
1 ppm ≤ X < 10 ppm																			
1	shrimp powder mix I えび混合パウダー I	shrimp	3.6	1.1	neg	A	-	-	-	-	-	ind	A	-	-	-	-	ind	
						B	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	
2	shrimp powder mix II えび混合パウダー II	shrimp	7.5	4.8	neg	A	-	-	-	-	-	ind	A	-	-	-	+	ind	
						B	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	
21	seasoned laver 味付け海苔	shrimp*1	1.5	2.9	neg	A	+	-	+	+	+	pos	A	-	-	-	-	ind	
						B	-	+	+	+	+	+	B	-	-	-	-	-	
38	curry flavored sauce for stir-fried crab and egg カレー炒めの素	crab	3.1	8.3	neg	A	-	-	-	-	-	ind	A	-	-	-	-	ind	
						B	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	
42	fish sausage 魚肉ソーセージ	crab*1	2.3	2.7	neg	A	-	+	-	-	-	neg	A	-	+	-	-	neg	
						B	-	+	-	-	-	-	B	-	+	-	-	-	
X < 1 ppm																			
4	shrimp-flavored oil I えびオイル I	shrimp	<1.0	<1.0	neg	A	-	-	+	-	-	neg	A	-	-	-	-	ind	
						B	+	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	
5	shrimp-flavored oil II えびオイル II	shrimp	<1.0	<1.0	neg	A	-	+	+	+	+	pos	A	-	+	+	+	pos	
						B	-	+	+	+	+	+	B	-	+	+	+	+	
8	salted shrimp paste えびみそ	shrimp	<1.0	<1.0	neg	A	-	-	-	-	-	ind	A	-	-	-	-	ind	
						B	-	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	
18	seafood paella seasoning mix パエリアの素	shrimp	<1.0	<1.0	neg	A	-	-	-	-	-	ind	A	+	-	-	-	pos	
						B	-	-	-	-	-	-	B	+	+	-	-	-	
26	chili sauce チリソース	shrimp*1	<1.0	<1.0	neg	A	+	-	-	-	-	neg	A	+	-	-	-	neg	
						B	-	-	-	-	-	-	B	+	-	-	-	-	
27	white stew roux シチュールー	shrimp*1	<1.0	<1.0	neg	A	-	-	-	-	-	ind	A	+	-	+	-	pos	
						B	-	-	-	-	-	-	B	+	+	+	-	-	
29	crab extract paste かにエキス	crab	<1.0	<1.0	neg	A	-	+	-	-	-	neg	A	-	-	-	-	ind	
						B	+	-	-	-	-	-	B	-	-	-	-	-	
43	chitosan dietary supplement キトサン	crab*2	<1.0	<1.0	neg	A	-	-	-	-	-	ind	A	-	+	-	-	neg	
						B	-	-	-	-	-	-	B	-	+	-	-	-	
46	glucosamine dietary supplement グルコサミン	shrimp*2, crab*2	<1.0	<1.0	neg	A	+	+	-	-	-	shrimp:neg	A	-	-	-	-	shrimp:neg	
						B	-	-	-	-	-	-	B	-	+	-	-	-	crab:neg

加工食品の原材料表示、ELISA 試験結果、PCR 試験結果の一覧を示す。ELISA 試験は n=1、PCR 試験は n=2 で実施した。M kit, マルハニチロ社製; N kit, 日水製薬社製。P, 植物 PCR; A, 動物 PCR; S, エビ PCR; AP-S, アキアミ PCR; C, カニ PCR。*1 原材料の一部にエビ/カニ使用の記載有。*2 エビ/カニ由来原料使用の記載有。ELISA は 10 ppm 以上を陽性 (pos)、10 ppm 未満を陰性 (neg) で示した。「植物/動物 PCR: 検出 (+)」において、「エビ/カニ PCR: 検出 (+)」の場合は陽性 (pos)、「不検出 (-)」の場合は陰性 (neg)、「植物/動物 PCR: 不検出 (-)」の場合は不適用 (ind) で示した。

表：3－6 ELISA 試験と PCR 試験の整合性

		pos. (PCR 検査適用可能)		neg. (PCR 検査適用不能)		
		37		9		
PCR	plant/animal PCR					
	shrimp/crab PCR	pos.	neg.	pos.	neg.	
		31	6	5	4	
ELISA	10 ppm ≤ X	pos.	27	0	4	1
	1 ppm < X < 10 ppm	neg.	1	1	1	2
	X < 1 ppm		3	5	0	1

加工食品 46 製品に対する PCR 試験結果（植物／動物 PCR&エビ／カニ PCR）と ELISA 試験結果のまとめを示す。植物／動物 PCR ならびにエビ／カニ PCR は検出（pos）、不検出（neg）で示した。ELISA は 10 ppm 以上を陽性（pos）、10 ppm 未満を陰性（neg）で示した。

表：3-7 PCR 阻害作用の確認

No.	sample	declaration	DNA extraction method	PCR																
				extracted DNA						extracted DNA + positive control					PCR inhibition					
				lot	P	A	S	AP-S	C	judgment	P	A	S	C		judgment				
10 ppm ≤ X																				
6	shrimp extract paste I えびエキス I	shrimp	G	A	-	-	-	-												
				B	-	-	-	-												
9	XO sauce XO醬	shrimp	G	A	-	-	+	+												
				B	-	-	+	+												
20	dried shrimp 乾燥えび	shrimp	G	A	-	-	+	-												
				B	-	-	-	-												
35	miso suop with crab meat 味噌汁	crab	G	A	-	-				+										
				B	-	-						+								
40	kani miso かにみそ	crab	G	A	-	-				+										
				B	-	-						+								
1 ppm ≤ X < 10 ppm																				
1	shrimp powder mix I えび混合パウダー I	shrimp	G	A	-	-	-	-												
				B	-	-	-	-												
2	shrimp powder mix II えび混合パウダー II	shrimp	G	A	-	-	-	+												
				B	-	-	-	-												
38	curry flavored sauce カレー炒めの素	crab	G	A	-	-				-										
				B	-	-						-								
X < 1 ppm																				
8	salted shrimp paste えびみそ	shrimp	G	A	-	-	-	-												
				B	-	-	-	-												

陽性コントロールを添加した抽出 DNA に対する各種 PCR の結果を示す。P, 植物 PCR ; A, 動物 PCR ; S, エビ PCR ; AP-S, アキアミ PCR ; C, カニ PCR。「植物/動物 PCR : 検出 (+)」において「エビ/カニ PCR : 検出 (+)」の場合は陽性 (pos)、「植物/動物 PCR : 不検出 (-)」の場合は不適用 (ind) で示した。

表：3-8 新規動物 PCR を用いた PCR 検査適用可否の評価

No.	sample	declaration	PCR							judgment	New-A	judgment	
			lot	P	A	S	AP-S	C					
10 ppm ≦ X													
6	shrimp extract paste I えびエキス I	shrimp	A	-	-	-	-				ind	-	ind
9	XO sauce XO 醬	shrimp	A	-	-	+	+				ind	+	pos
20	dried shrimp 乾燥えび	shrimp	A	-	-	+	-				ind	+	pos
35	miso suop with crab meat 味噌汁	crab	A	-	-					+	ind	+	pos
40	kani miso かにみそ	crab	A	-	-					+	ind	+	pos

「ELISA：陽性」かつ「PCR 検査適用不能」と判定された試料の抽出 DNA に対する新規動物 PCR の結果を示す。P, 植物 PCR ; A, 動物 PCR ; S, エビ PCR ; AP-S, アキアミ PCR ; C, カニ PCR ; New-A, 新規動物 PCR。「植物/動物 PCR：検出 (+)」において「エビ/カニ PCR：検出 (+)」の場合は陽性 (pos)、「植物/動物 PCR：不検出 (-)」の場合は不適用 (ind) で示した。

背景

海老沢らの調査（「平成 27 年度食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書（平成 28 年 3 月, 消費者庁）」）によると、食物アレルギー患者は年々増加傾向にある。また、原因食物の種類に関しては、これまでに積み重ねた実態調査から特定の食物に起因することが分かっている。2001 年から施行された表示制度は、それら臨床に関する情報を元に整備・改定が行なわれ、現在では義務表示 7 品目と推奨表示 20 品目の計 27 品目で原因食物の 8 割以上をカバーできている。このように食物アレルギー患者の健康を守るため、さらには食の選択性を広げるため、食品表示は充実してきた。ただし、誤食による発症は一定割合報告されており、それら健康危害を予防するためには、食品メーカーや事業者における表示の徹底が求められる。原因食物の含有の有無に関して適切な情報を提供するためには、製品製造において原料管理、製造工程管理の徹底と併せて、原料、最終製品における原因食物の有無の検証が必要になる。食物アレルギーの発症は極微量のアレルゲンによって起こり得るため、検出技術には特定の食物を高い感度で検出する性能が求められる。このような背景のもとに本研究では、食物アレルギー原因食物を検出する技術として、PCR に基づいた検出技術（キウイフルーツ検出 PCR、エビノカニ識別検出 PCR）を開発した。本論文の最後にあたり、本研究で得られた知見をまとめるとともに、食物の識別検出技術に関する課題ならびに展望を述べる。

本研究成果のまとめ

1) キウイフルーツ検出 PCR の性能

核 DNA 上の ITS 領域を標的として、キウイフルーツの近縁種を識別検出するプライマーを設計し、キウイフルーツ検出 PCR 技術を確立した。本法は、キウイフルーツが属するアクチニジア属植物に対して、流通、育種、アレルゲン含有量、交差反応性などの情報を元に設定した 2 種類の検出範囲（アクチニジア属食用植物 ± マタタビ）に対応可能であった。また、検出範囲以外の穀物、野菜、果物などの植物の検出は認められなかった。検出感度はキウイフルーツ DNA 50~500 fg/マトリクス DNA 50 ng であり、食物アレルギー原因食物の検査に用いられている小麦、そば、落花生の検出 PCR

と同等レベルの感度を有していた。また、原材料表示にキウイフルーツならびにサルナシの記載がある市販加工食品を検出可能であった。以上の結果から、本法はキウイフルーツ検出 PCR として加工食品の検査に使用可能であると考えられた。なお、実際の食品検査に向けてキットの提供も実現した。

2) エビ/カニ識別検出 PCR の性能

ミトコンドリア DNA 上の 16S rRNA 遺伝子領域を標的として、甲殻類の近縁種であるエビとカニを識別検出するプライマーを設計し、エビ/カニ識別検出 PCR 技術を確立した。本法は、甲殻類 ELISA で交差反応性が認められているエビとカニに対して、それらを区別して検出が可能であった。一部のエビ、カニにおいては偽陽性を示すが、発生頻度ならびに検出感度の面から大きな問題はないと考えられた。また、エビ検出 PCR におけるアキアミの偽陰性、カニ検出 PCR におけるシャコの偽陽性に関しては、別途検出 PCR を開発して含有の有無に関する情報を得られるようにした。なお、検出範囲以外の魚介類の検出は認められなかった。検出感度はエビ/カニ DNA 5 pg/マトリクス DNA 50 ng と、食物アレルギー原因食物の検査に用いられている小麦、そば、落花生の検出 PCR と同等レベルの感度を有していた。また、10 ppm モデル加工食品を検出可能で、甲殻類 ELISA と同等レベルの感度を有していた。以上の結果から、本法はエビ/カニ識別検出 PCR として、ELISA 試験によるスクリーニング検査後の確認検査に利用できると考えられた。なお、実際の食品検査に向けてキットの提供も実現した。また、酒井らによって試験室間バリデーションによる本法の精度確認が実施され、国が定める食物アレルギー原因食物の PCR 試験に必要な基準を満たしていることが確認され、その結果を元に確認検査として「通知」に記載された

3) ITS 領域ならびに rRNA 遺伝子領域の利用

加工食品中に存在する極微量の食物アレルギー原因食物を検出するためには、対象となる食物を特異的かつ高感度に検出できる技術が必要である。DNA を対象とする PCR 検出技術を用いる利点として、感度の面からは、DNA 上にマルチコピー存在する領域、または細胞内に多数存在する細胞小器官の DNA を標的とすることで感度の向上が期待できる。特異性の面からは、系統分類に利用される領域を標的とすることで様々な動植物への適用、近縁種間での識別が期待できる。このような条件を満たす

DNA 領域として、我々は核 DNA 上の rRNA 遺伝子の ITS 領域ならびにミトコンドリア DNA 上の rRNA 遺伝子領域を採用した。さらに、これら DNA 領域の利点として、精度の高いプライマーの設計が挙げられる。GenBank には種々の動植物由来の DNA 配列が登録され、中でも分類に用いられる領域の登録配列数は多い。入手困難な近縁種ならびに検出対象以外の動植物由来の配列を使用することが可能で、検出対象以外からの増幅の有無を確認しながらプライマーの特異性を評価できる。また、本研究で同じ ITS 領域内で 2 種類のキウイフルーツ検出プライマーの設計が可能であったように、今後、食物アレルギー原因食物の範囲が変更になった場合も適宜対応できる可能性を有している。

4) PCR 検出技術の特異性向上

プライマーの特異性は、標的配列に対するプライマー 3' 末端塩基の結合の可否で確保する。プライマーの 3' 末端塩基が結合しなければ、PCR の伸長反応は進まず、増幅できない。本研究で設計したキウイフルーツならびにエビ/カニ検出プライマーもその思想に沿って設計した。通常、検出対象のみに特異的な塩基をフォワード/リバース両プライマーの 3' 末端塩基に設置するが、エビ/カニ検出プライマーでは、DNA 上にそのような塩基配列を見い出せず、どちらか一方のプライマーのみで特異性を確保しなければならない状況であった。その場合、PCR 反応液組成、反応条件によっては、PCR の増幅ミスが生じ、検出対象外の近縁種から増幅産物が得られやすくなる。そこで、プライマー 3' 末端側の特異性を高めるため、プライマー 3' 末端から 2 塩基目にもミスマッチ塩基を設置する方法を採用した。また、プライマー設計以外には、PCR 増幅領域内の検出対象に特徴的な塩基配列を利用した制限酵素消化を組み合わせる方法も採用した。

5) エビ/カニ識別検出 PCR の加工食品検査への適用性

市販加工食品を用いて、原材料表示ならびに ELISA 試験結果に対するエビ/カニ検出 PCR 試験結果の整合性を評価し、様々な原材料、製造工程、食品形態を有する加工食品に対して適用できることを明らかにした。「ELISA : 陽性」の 32 製品中、31 製品で「エビ/カニ検出 PCR : 陽性」であったことから、「通知」に記載の ELISA 試験と同等レベルの感度を有していると判断した。一方、DNA 分解が進んだレトルトや発酵食品ならびに PCR 阻害作用が大きいエビ/カニ原料高含有製品には、適用し難い

場合も考えられた。また、PCR 試験に影響する DNA の品質に関して、抽出方法ならびに評価手法の現状課題を整理するとともに、正確なエビ／カニ検出 PCR 試験結果を得るために適した方法や技術を検討し、提示した。具体的には、DNA 抽出方法は濃度、精製度の面から Genomic-tip 法が適すること、頑健性が低い動物検出 PCR への対応策として植物／動物検出 PCR とエビ／カニ検出 PCR の並行実施が有効であること、そして、吸光度測定以外に、DNA 分解程度や PCR 阻害作用の評価が DNA 抽出・精製方法の改善を図る上で有用であることを示した。

課題

1) PCR 検出技術

本研究で開発したキウイフルーツ検出 PCR ならびにエビ／カニ検出 PCR の課題について述べる。キウイフルーツ検出 PCR は、特異性が高く、感度も実用化されている食物アレルギー原因食物検出 PCR と同等であったが、検査に利用するためには 10 ppm モデル加工食品の検出ならびに試験室間バリデーションによる評価を実施する必要がある。また、キウイフルーツによる食物アレルギーに関しては、近縁種におけるアレルゲンタンパクの含有量の報告はあるものの、交差反応性について情報は少ない。本研究では独自にキウイフルーツ、サルナシ、シマサルナシ、その交配種、マタタビを検出対象に設定したが、今後、交差反応性に関する情報が蓄積され、範囲が設定されれば、その範囲に対応した方法への改良が必要となる。

エビ／カニ検出 PCR は、特異性が高く、感度も実用化されている食物アレルギー原因食物検出 PCR と同等であった。また、試験室間バリデーションによって検査法としての基準を満たすことが確認された。ただし、特異性ならびに試験の簡便性に関しては課題が残る。エビ検出 PCR では PCR と制限酵素消化、さらにはアキアミの偽陰性を補完するためのアキアミ検出 PCR が必要である。カニ検出 PCR では、偽陽性となるシャコに対して食品中の有無を判定することは可能であるが、排除には至っていない。また、1 回の PCR でエビ／カニそれぞれを検出できることが理想であるが、現状、エビ／カニ識別の精度向上には、幾つかの方法を組み合わせる必要がある。なお、甲殻類アレルギー患者の交差反応性に関しては、消費量が多いエビ／カニでは情報が蓄積されているが、その他の甲殻類のオキアミ、アミ、シャコは加工食品への利用は少なく、情報は乏しい。今後は交差反応性に関するデータを充実

させるとともに、患者の食の選択性の観点もふまえ、より実態に沿った対象の設定と検査法が必要となる可能性がある。

食品中の食物アレルギー原因食物を検出する技術として、「通知」では ELISA と PCR が採用されている。ELISA は主要アレルゲンタンパクの抗体を用いることによって、原因食物の総タンパク量を ppm オーダーで予測定量可能で、食物アレルギーを発症するリスクを評価できる。抗体はアミノ酸配列を認識するため、相同性が高い類似のタンパクを含有する近縁食物では偽陽性を生じる場合がある。甲殻類の場合、主要アレルゲンタンパク（トロポミオシン）は甲殻類間で約 90%と相同性が高いため、それを標的とすることは甲殻類検出においては問題ない。ただし、エビとカニを区別することは困難である。これまで、トロポミオシン以外にアルギニンキナーゼや Ca^{2+} 結合性筋形質タンパク質（SCP）が報告されており、SCP については、エビアレルギー患者の血清を用いた IgE 反応性試験で、エビ由来 SCP には反応するが、カニ由来 SCP には反応しないことが分かっている。このように、ELISA は食物アレルギー原因食物のタンパクを高い感度で定量的に測定できるため、一部偽陽性は存在するが、食物アレルギー発症リスクを評価するスクリーニング検査として適する。一方、PCR は原因食物特徴的な DNA の塩基配列を標的とするため、近縁種であっても配列に違いがあれば、原因食物の存在の有無を識別検出できる。また、これまでに食品中の混入量を予測するため、外部添加試料を用いた DNA 抽出効率、PCR 効率の補正による定量法の検討もなされている（Hirao et al., 2006）。なお、PCR ではアレルゲンタンパク量に関する情報は得られないため、発症リスクを評価することはできない。現在、「通知」で使用されている PCR は定性試験であり、確認検査の位置付けで使用されている。

以上のように、食品中の食物アレルギー原因食物の検査に使用される ELISA と PCR には、それぞれメリット/デメリットがある。また、食品加工においてタンパクと DNA はともに変性、分解するが、その程度は加工条件で異なるため、両試験結果に違いが生じる場合も考えられる。したがって、食品の検査では、1つの検査で判断せず、原理の異なる検査方法を複数組み合わせ、多面的かつ総合的に判断する必要があると考えられる。最近では、各種アレルゲンタンパクに特徴的な 20 アミノ酸残基以下のペプチドを LC-MS/MS で定量分析する手法なども開発されている。

2) 加工食品の検査

単一 DNA を用いた PCR 検出技術の性能評価だけでは、実際の市販加工食品の検査への適用性を評価したことにはならない。本研究の適用性評価結果から、検出 PCR の試料となる抽出 DNA の品質が PCR 検査に大きく影響を与え、適切な測定結果の算出を困難にする可能性が示唆された。PCR 阻害作用に対しては、抽出原理が異なる DNA 抽出方法の採用、試料スケールや洗浄等の前処理などの実施で一定の改善が見られた。ただし、一部原料や製品では十分な低減には至らなかった。加工食品の検査における偽陰性判定は健康危害の面から回避しなければならない、その意味では PCR 検査適用不能となる試料が存在することも許容しなければならない。ただし、患者の食の選択性の観点からは、原因食物の有無に関して適切な情報を提供すべきである。本研究で分析した加工食品以外でも DNA 分解や PCR 阻害作用の程度、原因は異なると予想されるため、今後も DNA 抽出方法の改良は必要である。

抽出 DNA の品質確認方法については、植物検出 PCR と比較して、動物検出 PCR の頑健性が低いことが示唆された。一般的な加工食品は小麦などの植物原料を含むため、植物検出 PCR で対応可能であるが、動物原料主体の試料では「動物検出 PCR : 陰性」で PCR 検査適用不能となる場合が考えられる。本研究では、エビ/カニ検出 PCR との並行実施ならびに新規動物検出 PCR の使用を提案したが、好ましくは、植物検出 PCR と同程度の増幅産物長と感度を有する動物検出 PCR の開発が望まれる。

展望

PCR 試験を食物アレルギー原因食物の検査に使用する利点は、DNA 配列の違いに基づいて明確に対象を識別できる特異性にある。本研究では、検出対象に特徴的な 3' 末端塩基を有するプライマーの設計をベースに、制限酵素消化やプライマー 3' 側塩基へのミスマッチ導入によって特異性を高めた。特異性を向上させる技術は、その他にも Locked Nucleic Acid、Peptide Nucleic Acid、プローブなどが知られており、検討する価値はある。なお、特異性確保のベースとなるプライマー 3' 末端塩基の設計に関しても、より適した塩基選定の可能性が残されていると考える。ITS 領域のように、DNA 上にマルチコピー存在し、系統分類に用いられる DNA 領域は、全てが単一の塩基配列ではない。Hribova らは、バナナの ITS 領域に関して、単一個体内に複数の塩基配列タイプ（多型）が存在することを報告している（Hribova et al., 2011）。我々も本研究とは別に、クルクマ属（Curcuma）植物のウコンの ITS

領域の NGS 解析において、個体内多型の存在を確認している。進化の過程において、多型が生じたと考え、コピー数が多いメジャー配列は上位ドメインである「属」で共通し、コピー数が少ないマイナー配列は下位ドメインである「種や亜種（系統）」で特異的であることが期待される。本研究で使用した GenBank 登録配列は、従来技術であるクローニングやダイレクトシーケンスによって取得されたメジャー配列と考えられ、マイナー配列はメジャー配列に埋もれ検出できていないと予想した。近年、数千万～数億の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に解読できる次世代シーケンス解析技術が開発されており、今後、網羅的解析によってマイナー配列の情報蓄積が進むことが期待される。なお、コピー数が少ないマイナー多型をターゲットとすることで検出感度低下の懸念はあるため、注意は必要である。新たな DNA 領域の探索ならびにプライマーの特異性向上を引き続き検討したい。

PCR 検査では、DNA 抽出・精製など周辺技術の進展ならびに DNA 品質評価方法の精度向上が望まれる。様々な狭雑物を含む加工食品中の DNA を検出するためには、PCR 検出技術の感度や PCR 阻害作用に対する耐性のみならず、鋳型となる DNA の品質を高める必要がある。本研究において、単一試料ではブルーベリー、ブドウ、殻付きサクラエビで PCR 阻害作用が見られた。さらに様々な原料が含まれる加工食品では PCR 阻害作用の頻度ならびに程度が増加した。「通知」には DNA 抽出方法が 3 種類示されているが、それら抽出方法の改良、原理が異なる方法の組み合わせによる精製、別法の採用など食品に適した方法の選択も有効と考えられる。また、より正確な「確認検査」の結果を得るためには、DNA 品質評価方法の検討も必要である。評価指標を DNA 分解と PCR 阻害作用に分けると、評価手段として、DNA 分解では、ゲノム DNA 電気泳動の利用やエビ／カニ検出 PCR と同程度のサイズの増幅産物をターゲットとする植物／動物検出 PCR の開発が考えられる。また、PCR 阻害作用では、加工食品抽出 DNA 溶液への人工 DNA の添加とそれを検出する PCR の開発などが考えられる。アレルギー患者への適切な情報提供のためには、PCR 検査判定不能となる試料を減らし、原因食物の有無に関して正確な結果を取得する必要がある。今後、DNA 抽出方法の検討と併せて、評価方法についても頑健性を高めていくことが必要である。

引用文献

文献

- Akiyama H, Imai T, Ebisawa M. (2011). Japan Food Allergen Labeling Regulation—History and evaluation. *Adv. Food Nutr. Res.* 62, 139-171.
- Boyes S, Strübi P, Marsh H. (1997). Actinidin levels in fruit of *Actinidia* species and some *Actinidia arguta* rootstock-scion combinations. *Lebensm. Wiss. Technol.* 30, 379-389.
- Bublin M, Mari A, Ebner C, Knulst A, Scheiner O, Hoffmann-Sommergruber K, Breiteneder H, Radauer C. (2004). IgE sensitization profiles toward green and gold kiwifruits differ among patients allergic to kiwifruit from 3 European countries. *J. Allergy Clin. Immunol.* 114, 1169-75.
- Engels W.R. (1993). Contributing software to the internet: the Amplify program. *Trends Biochem. Sci.* 18, 448-50.
- Eriksson N. E, Möller C, Werner S, Magnusson J, Bengtsson U, Zolubas M. (2004). Self-reported food hypersensitivity in Sweden, Denmark, Estonia, Lithuania, and Russia. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* 14, 70-79.
- Hashimoto H, Hongo T, Hayashi C, Nakamura K, Nakanishi K, Ikeda M, Adachi R, Akiyama H, Teshima R, Yano T. (2015). A method for the detection of shrimp/prawn and crabDNAs to identify allergens in dried seaweed products. *Jpn. J. Food Chem. Safety.* 22, 1-10.
- Hirao T, Hiramoto M, Imai S, Kato H. (2006). A novel PCR method for quantification of buckwheat by using a unique internal standard material. *J. Food Prot.* 69, 2478-86.
- Hirao T, Imai S, Sawada H, Shiomi N, Hachimura S, Kato H. (2005). PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 724-731.
- Hirao T, Watanabe S, Temmei Y, Hiramoto M, Kato H. (2009). Qualitative polymerase chain reaction methods for detecting major food allergens (peanut, soybean, and wheat) by

- using internal transcribed spacer region. *J. AOAC Int.* 92, 1464-71.
- Hribova E, Cizkova J, Christelova P, Taudien S, De Langhe E, Dolezel J. (2011). The ITS1–5.8S-ITS2 sequence region in the Musaceae: structure, diversity and use in molecular phylogeny. *PLoS ONE.* 6, e17863.
- Lehrer S. B, Ayuso R, Reese G (2003). Seafood allergy and allergen: A review. *Marine Biotech.* 5, 339-348.
- Leung P. S. C, Chow W. K, Duffey S, Kwan H. S, Gershwin M. E, Chu K. H. (1996). IgE reactivity against a cross-reactive allergen in Crustacea and Mollusca: evidence for tropomyosin as the common allergen. *J. Allergy Clin. Immunol.* 98, 954-961.
- Li J, Huang H, Sang T. (2002). Molecular phylogeny and infrageneric classification of Actinidia (Actinidiaceae). *Systematic Botany.* 27, 408-415.
- Lucas J. S. A, Grimshaw K. E. C, Collins K, Warner J. O, Hourihane J. O' B. (2004). Kiwi fruit is a significant allergen and is associated with differing patterns of reactivity in children and adults. *Clin. Exp. Allergy.* 34, 1115-1121.
- Lucas J. S. A, Lewis S. A, Hourihane J. O' B. (2003). Kiwi fruit allergy: A review. *Pediatr. Allergy Immunol.* 14, 420-428.
- Lucas J. S. A, Lewis S. A, Trewin J. B, Grimshaw K. E. C, Warner J.O, Hourihane J.O'B. (2005). Comparison of the allergenicity of Actinidia deliciosa (kiwi fruit) Actinidia chinensis (gold kiwi). *Pediatr. Allergy Immunol.* 16, 647-654.
- Masamura N, Kikuchi R, Nagatomi Y. (2004). Developments of an Identification Method for Foreign Substances of Plant Origin Using ITS 1 Region. *Jpn. Bunseki Kagaku.* 63, 245-253.
- Matsumoto H, Beppu K, Sakashita T, Kataoka I. (2009). Interspecific cross compatibility of Actinidia polygama. *Hort. Res.* 8, 431.
- Möller M, Kayma M, Vieluf D, Paschke A, Steinhart H. (1998). Determination and characterization of cross-reacting allergens in latex, avocado, banana, and kiwi fruit. *Allergy.* 53, 289-296.

- Motoyama K, Suma Y, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. (2007). Molecular cloning of tropomyosins identified as allergens in six species of crustaceans. *J. Agric. Food Chem.* 55, 985-991.
- Nishiyama I, Oota T. (2002). Varietal difference in actinidin concentration and protease activity in the kiwi fruit juice. *Jpn. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 49, 401-408.
- Pastorello E. A, Conti A, Pravettoni V, Farioli L, Rivolta F, Ansaloni R, Ispano M, Incorvaia C, Giuffrida M. G, Ortolani C. (1998). Identification of actinidin as the major allergen of kiwi fruit. *J. Allergy Clin. Immunol.* 101, 531-537.
- Pettersson M, Bylund M, Alderborn A. (2003). Molecular haplotype determination using allele-specific PCR and pyrosequencing technology. *Genomics.* 82, 390-396.
- Poms R. E, Anklam E. (2004). Polymerase chain reaction techniques for Food Allergen Detection. *J. AOAC Int.* 87, 1391-1397.
- Sakai S, Adachi R, Shibahara Y, Oka M, Abe A, Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Shiomi K, Urisu A, Akiyama H, Teshima R. (2008). A survey of crustacean soluble proteins such as "shrimp" and "crab" content in food ingredients. *Jpn. J. Food Chem.* 15, 12-17.
- Sakai S, Matsuda R, Adachi R, Akiyama H, Maitani T, Ohno Y, Oka M, Abe A, Seiki K, Oda H, Shiomi K, Urisu A. (2008). Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *J. AOAC Int.* 91, 123-129.
- Sakai S, Adachi R, Akiyama H, Teshima R. (2013). Validation of quantitative and qualitative methods for detecting allergenic ingredients in processed foods in Japan. *J. Agric. Food Chem.* 61, 5675-5680.
- Seiki K, Oda H, Yoshioka H, Sakai S, Urisu A, Akiyama H, Ohno Y. (2007). A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. *J. Agric. Food Chem.* 55, 9345-9350.
- Sharma S, Rustgi S, Balyan H. S, Gupta P. K. (2002). Internal transcribed spacer (ITS)

sequences of ribosomal DNA of wild barley and their comparison with ITS sequences in common wheat. *Barley Genetics Newsletter*. 32, 38-45.

Shen H, Braband A, Scholtz G (2013). Mitogenomic analysis of decapod crustacean phylogeny corroborates traditional views on their relationships. *Mol. Phylogenet. Evol.* 66, 776-789.

Shibahara Y, Oka M, Tominaga K, Ii T, Umeda M, Uneo N, Abe A, Ohashi E, Ushio H, Shiomi K. (2007). Determination of crustacean allergen in food products by sandwich ELISA. *Jpn. Food Sci. Technol. Res.* 54, 280-286.

Tomikawa M, Suzuki N, Urisu A, Tsuburai T, Ito S, Shibata R, Ito K, Ebisawa M. (2006). Characteristics of shrimp allergy from childhood to adulthood in Japan. *Jpn. J. Allergol.* 55, 1536-1542.

Watanabe H, Saita K, Akaboshi C, Ohsawa N, Hashiguchi S, Miyazawa M. (2014). Detection of Allergenic Substances (Shrimp, Crab) in Processed Seafood. *Jpn. Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 55, 41-54.

Watanabe S, Taguchi H, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Urisu A, Teshima R. (2012). Specific detection of potentially allergenic peach and apple in foods using polymerase chain reaction. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2108-2115.

Watanabe T, Akiyama H, Maleki S, Yamakawa H, Iijima K, Yamazaki F, Matsumoto T, Futo S, Arakawa F, Watai M, Maitani T. (2006). A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. *J. Food Biochem.* 30, 215-233.

Yamamoto T, Kukuminato Y, Nui I, Takada R, Hirao M, Kamimura M, Saitou H, Asakura K, Kataura A. (1995). Relationship between birch pollen allergy and oral and pharyngeal hypersensitivity to fruit. *Jpn. Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho* 98, 1086-1091.

Yamanaka M, Oota T, Fukuda T, Nishiyama I. (2004). Varietal difference in actinidin concentration and protease activity in fruit juice of *Actinidia* species. *Jpn. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi.* 51, 491-494.

Zhang Q, Maroof M. A. S, Allard R. W. (1990). Effects on adaptedness of variations in ribosomal DNA copy number in populations of wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*). Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 87, 8741-8745.

特許

- Taguchi H, Watanabe S, Hirao T. (2007). キウイ類検出用プライマーセット. Japan Kokai Tokkyo Koho. P2007-282626.
- Taguchi H, Shono J, Temmei Y. (2008). エビ検出用プライマーセット. Japan Kokai Tokkyo Koho. P2008-000128.
- Taguchi H. (2009). カニ検出用プライマーセット. Japan Kokai Tokkyo Koho. P2009-207486.
- Taguchi H. (2011). アキアミ検出用プライマーセット. Japan Kokai Tokkyo Koho. P2011-244746.
- Taguchi H. (2014). シャコ検出用プライマーセット. Japan Kokai Tokkyo Koho. P2010-119351.
- Temmei Y, Watanabe S, Hirao T. (2008). DNA 抽出に用いるための PVPP (ポリビニルポリピロリドン) の処理方法. Japan Kokai Tokkyo Koho. P2008-142078.
- Watanabe S, Hirao T. (2011). 非ヒト動物を検出するためのプライマー・プローブセット. Japan Kokai Tokkyo Koho. P2012-175928.

学会

- Adachi R, Sakai S, Akiyama H, Tashima R, Taguchi H, Watanabe S, Hirao T, Urisu A. (2009). Interlaboratory validation of PCR methods for the detection of shrimp and crab in processed foods. The 123rd AOAC Annual Meeting & Exposition.
- Taguchi H, Watanabe S, Temmei Y, Hirao T, Akiyama H, Sakai S, Adachi R, Teshima R. (2009). PCR methods for differential detection of allergenic shrimp/prawn and crab. The 123rd AOAC Annual Meeting & Exposition.

謝辞

本論文は、ハウス食品株式会社ならびにハウス食品グループ本社株式会社において、2005年から2014年の10年間で行なわれた研究を纏めたものです。

研究を纏めるにあたり、東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授 八村敏志先生に有益なご助言とご指導を頂きました。また、研究の実施におきまして、東京大学大学院農学生命科学研究科 特任教授 加藤久典先生に懇切なるご指導を頂きました。お二方には、学位取得の機会を与えて頂きましたことと併せて、深く感謝致しますとともに、厚く御礼申し上げます。

本研究における多大なるご協力ならびにご助言を頂きました現 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長 穂山浩先生、室長 渡邊敬浩先生、生化学部室長 安達玲子先生、坂田こずえ氏、生活衛生化学部室長 酒井信夫先生に心から感謝申し上げます。また、厚生労働科学研究においてご協力を頂きました各社研究者の皆様、そして、開発技術の性能評価ならびにキット化にご協力頂きました協力研究者の方々に併せて、御礼申し上げます。

本研究の実施ならびに執筆の機会を与えて頂きましたハウス食品グループ本社株式会社 研究開発本部長 田口昌男氏、副本部長 山本佳弘氏に深く感謝申し上げます。また、研究の実施にあたり、ご指導頂きましたハウス食品株式会社 澤田博博士、ハウス食品グループ本社株式会社 柘植信昭博士、平尾宜司博士に心から感謝申し上げます。皆様には食物アレルギー原因食物の検査技術の開発の重要性を早期に認識し、私に技術開発の機会を与えて頂きましたことに心から御礼申し上げます。また、研究を進める中で日々の議論とご協力を頂きましたハウス食品グループ本社株式会社 渡辺聡氏、天明裕介氏に、そして正野仁慈氏に心から感謝申し上げます。

最後に私事ではありますが、これまで温かく見守ってくれた両親、日々支えてくれた妻 祐子をはじめ家族に感謝し、謝辞と致します。

2017年10月

ハウス食品グループ本社 研究開発本部

基礎研究部 田口大夢