

## 論文の内容の要旨

論文題目：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

氏名：田口大夢

### 背景と目的

消費者庁ならびに地方自治体の報告によると、食物アレルギー患者は年々増加傾向にある。日本の食物アレルギーに関する表示制度では、現在、表示義務 7 品目と表示推奨 20 品目が指定されており、食物アレルギー原因食物の約 95%をカバーできている。ただし、食物アレルギーの発症機会として、誤食（表示ミス）は一定数報告されており、患者の健康危害予防、さらには食の選択性拡大のために、食品表示の充実はますます求められている。加工食品中の原因食物の有無に関して適切な情報を提供するためには、原料管理、製造工程管理の徹底と併せて、原料、最終製品における食物アレルギー原因食物の有無の検証が必要になる。特に原料、製品への意図しない混入は極微量と考えられる。食物アレルギー患者の中には、原因食物の総タンパク数 $\mu\text{g}$ /食品 $\text{g}$ レベルで発症する患者も存在するため、加工食品中の検査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。また、分類学的に近縁な食物間ではアレルギーの交差反応性を有することも報告されているため、食物アレルギー原因食物の検出対象は、主要品種に限らず、交配種、食品に混入する可能性のある野生種も含めて、幅広く検出することが望まれる。なお、近縁種間の交差反応性の有無は人それぞれで異なり、ある人にとっては近縁種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ため、近縁種でも一括検出するのではなく、区別して検出することも望まれる。

以上の背景をもとに、本研究では、系統分類に利用される DNA 領域をターゲットとして、食物アレルギー症例数が多く、また重篤な症状を引き起こす報告のある原因食物を特異的かつ高感度に検出する PCR 検出技術の開発を目的に、1) キウイフルーツの PCR 検出技術の開発、2) エビ/カニの識別検出技術の開発、3) エビ/カニ検出 PCR 技術の加工食品検査への適用性評価について研究を行なった。

### 1) 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

日本の食物アレルギー表示制度におい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として、キウイフルーツとその近縁種に対する検出範囲の設定ならびにそれら対象範囲を特異的かつ高感度に検出する

PCR 分析技術の開発を行なった。検出範囲は、アレルゲン含有量ならびに育種の可能性など、交差反応性に関連する情報を元に、アクチニジヤ属食用植物内でマタタビを含むか否かで線引きして 2 種類設定した。検出用プライマーセットは、系統分類で利用される internal transcribed spacer (ITS) 領域を用い、フォワード/リバース両プライマーの 3' 末塩基に検出対象特徴的な塩基を設置することで設計した。実際の PCR では、キウイフルーツを含む検出対象を特異的かつ高感度に検出できた。なお、検出感度は食物アレルギー原因食物の検査に用いられる既存の PCR 検出技術と同等レベルの DNA 50~500 fg/マトリクス DNA 50 ng を有した。また、キウイフルーツが使用される主な加工食品に対しても適用可能であることを確認した。

これらの結果から、ITS 領域を標的とすることによって、キウイフルーツならびにその近縁種を種間で特異的かつ高感度に識別検出できることを明らかにした (Taguchi et al. J. Agric. Food Chem. 2007, 55, 1649-1655)。今後は、正確な PCR 検出技術の性能評価のため、食物アレルギー表示基準である原因食物総タンパク濃度として 10 ppm のモデル加工食品を用いた試験室間バリデーションの実施が必要である。

## 2) エビとカニの識別 PCR 検出技術に関する研究

食物アレルギー表示制度施行以降、推奨表示品目に指定され、特定原材料 5 品目に次いで症例数が多く、2008 年に義務表示品目 (特定原材料) に格上げされたエビとカニを対象とした。エビアレルギー患者の多くはカニでも発症するが、カニで発症しない方も一定割合存在する。そのため、患者の食の選択性拡大の観点から、エビとカニは甲殻類としての一括表示ではなく、個別表示が望まれる。エビ、カニの検査法である ELISA は甲殻類で相同性の高いタンパクを標的とするため、エビとカニの区別は困難である。そこで、同じ十脚目に属する分類学上の近縁種であるエビ、カニそれぞれを特異的かつ高感度に識別検出する PCR 分析技術の開発を行なった。検出用プライマーセットは、系統分類で利用される 16S ribosomal RNA (rRNA) 遺伝子領域を用いた。特異性は、エビ/カニ特徴的な塩基を 3' 末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' 末側塩基の結合能低下、PCR 後の制限酵素消化の追加などを組み合わせで達成した。実際の PCR では、エビ/カニそれぞれを特異的かつ高感度に検出できた。なお、エビ検出法で偽陰性を示したアキアミ、カニ検出法で偽陽性を示したシャコについては別途 PCR 検出技術を開発して、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。感度はエビ/カニ DNA 5 pg/マトリクス DNA 50ng ならびにエビ/カニ総タンパク濃度として 10 ppm のモデル加工食品を検出できた。

これらの結果から、16S rRNA 遺伝子領域を標的とすることによって、エビ/カニを同じ十脚目内で特異的かつ高感度に識別検出できることを明らかにした。また、ELISA 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試験に利用できると考えられた (Taguchi et al. J. Agric. Food Chem. 2011, 59, 3510-3519)。なお、幅広い加工食品への適用性については、3) 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において、検討を行なうこととした。今後、本 PCR 検出技術には特異性の更なる向上と試験工程の削減した簡便化が望まれる。

### 3) 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

エビ/カニ PCR 検出技術の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、「通知」で定められた PCR 検査の判定に影響を与える「抽出 DNA の品質」ならびに「PCR 検査適用可否の判定」に関して適切な方法を検討した。評価に用いた全 46 試料のうち、「ELISA : 陽性」であった 32 試料中、31 試料で「エビ/カニ検出 PCR : 陽性」となり、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確認できた。また、DNA 濃度ならびに精製度の面からは Genomic-tip による DNA 抽出法が適しており、PCR 阻害作用の低減には試料スケールならびに抽出法の改良、変更が有効であった。PCR 検査適用可否を判定する動物検出 PCR については、他検出 PCR と比較して頑健性が低い可能性が示唆された。適切なエビ/カニ含有の有無について情報を取得するためには、エビ/カニ検出 PCR との並行実施や新たな動物 PCR の利用などが考えられた。

これらの結果から、エビ/カニ識別検出 PCR 技術は、様々な加工食品に対して適用性を有し、食物アレルギー原因食物の検査において、スクリーニング検査 (ELISA 試験) と組み合わせる確認検査 (PCR 試験) に利用可能と考えられた (田口ら、食品衛生学雑誌. 2014, 55, 1-12)。今後、PCR 検査適用不能試料を低減するために、抽出 DNA の更なる品質向上ならびに PCR 検査適用可否判定方法の改良、工夫が望まれる。

### まとめ

本研究では、系統分類に利用される ITS 領域ならびに 16S rRNA 遺伝子領域にプライマーを設計することによって、食物アレルギー原因食物であるキウイフルーツとその近縁種ならびにエビ/カニに対して、設定した検出範囲の種を特異的かつ高感度に識別検出できる PCR 分析技術を開発した。食物アレルギー原因食物

の検出技術の一つである ELISA は、主要アレルゲンタンパクを高感度で検出できる一方、標的となるアレルゲンタンパクと相同性が高いタンパクを有する食物に対して偽陽性を示すなど、特異性に関しては不得意な部分がある。一方、PCR は、アレルゲンタンパク自体を検出するわけではないため、食物アレルギーを引き起こすアレルゲン性とは直接リンクしないが、原因食物特有の DNA 配列を標的とすることで、その存在の有無を検出できる。また、系統分類に利用される DNA 領域を標的とする利点として、「属、種レベルで識別が可能である」、「DNA 上にマルチコピー存在するため、高い感度が得られる」、「GenBank への配列登録数が多いため、入手困難な野生種の情報の使用、近縁種間の塩基配列の相違抽出、PCR シミュレーションによる特異的プライマー設計が可能である」などが挙げられる。実際に、本研究では、検出対象に特徴的な 3' 末塩基を有するプライマーの設計をベースに、プライマーへのミスマッチ塩基の導入、特徴的な塩基配列を対象とした制限酵素消化の追加で特異性を高めた。今後、新たな食物アレルギー原因食物の PCR 検出技術の開発においても、系統分類に用いられる領域を標的とすることで対応できるものと期待する。

また、本研究では、加工食品の原材料表示とスクリーニング検査結果に対する PCR 検査結果の整合性を評価し、加工食品へのエビ/カニ検出 PCR の適用性を確認できた。一部の製品では、ELISA 試験（陰性）と PCR 試験（陽性）とで異なる判定結果が得られた。食品製造では、加工条件によってタンパクと DNA とで分解、変性の程度は異なる。PCR 検査適用可否に関する食品形態の情報を得るためには、モデル加工食品と併せて、市販加工食品での実施も有効と考えられた。また、より適切な PCR 検査結果の取得ならびに PCR 検査適用不能試料の低減には、抽出 DNA の品質向上ならびにその品質を判定する方法の選定が必要である。抽出 DNA の品質に関しては、前処理の追加や抽出原理が異なる方法の使用による狭雑物の除去など、改良が必要である。PCR 検査適用判定に関しては、品質評価用 PCR と原因食物検出用 PCR との検出感度の差が PCR 検査適用不可や誤判定を引き起こす。本研究で示した動物 PCR に関しては、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 の改良、開発も望まれる。