

## 審査の結果の要旨

氏名 田口 大夢

食物アレルギー患者の健康危害防止のために、日本では食物アレルギー表示制度の法整備がなされている。制度において、PCR によるアレルギー原因食品原材料の検出法は ELISA による方法と補完的に用いることが定められている。食物アレルギーは生物分類学的に近縁な食物間で交差反応性を有することが報告されており、食品中のアレルギー原因食品原材料の検査法には、広範囲の患者を健康危害から守る予防的観点から食品に混入する可能性のある近縁種も含めて広く検出することが望まれる。一方、交差反応性の有無は人それぞれで異なるため、食の選択性拡大の観点から考えて、近縁種を一括ではなく、区別して検出することが望まれる場合もある。

本研究は、アレルギー症例数、症状の重篤度から消費者に情報提供する必要性が高いと考えられる食品原材料を対象に、系統分類に利用される DNA 領域を用いて近縁種を識別できる PCR 検出技術を開発したもので、第一にキウイフルーツを検出する PCR 技術を開発し、第二に同じ甲殻類十脚目に属するエビとカニを識別して検出する PCR 技術を開発し、最後にエビ/カニ識別 PCR 技術の加工食品検査への適用性を評価している。論文は、緒論、本編が 3 章、そして総括よりなる。

緒論では、本研究の背景ならびに意義を概説して、目的ならびに構成について述べている。

第 1 章では、キウイフルーツとその近縁種の識別 PCR 検出技術の開発に関して述べている。発症例、アレルゲン含有量、種間交配の可否など、アレルギー交差反応性に関連する情報を元に、アクチニジア属植物内でマタビを含むか否かで線引きをして、検出範囲を 2 種類設定した。PCR の標的は核 DNA 上の 18S と 5.8S rRNA 遺伝子間の ITS-1 領域を用い、検出対象にのみ共通の塩基を 3'末端に設置したプライマーセットを設計した。これらプライマーセットを用いることで、各検出対象種の DNA 50 fg を検出可能で、またキウイフルーツ含有加工食品の検査も可能であることを検証している。以上の結果から、系統分類に利用される ITS 領域を標的とすることで、加工食品中の微量のキウイフルーツならびにその近縁種を検出できると結論している。

第 2 章では、エビとカニの識別 PCR 検出技術の開発に関して述べている。エビアレルギー一患者の多くはカニでも発症するが、カニでは発症しない患者も約 35%存在するという報告があるため、エビとカニとを区別して食品表示する意義は大きい。これまでに甲殻類タ

ンパク質を検出する ELISA 法が開発されているが、両者の区別はできていないため、PCR 技術による区別を試みている。PCR の標的はミトコンドリア DNA 上の 16S rRNA 遺伝子領域を用い、エビまたはカニに特徴的な塩基をプライマー3'末端に設置し、またエビ検出用プライマーでは特異的制限酵素消化サイトを設定し、さらにカニ検出用プライマーでは非検出対象のエビ配列に対するプライマー3'末端近傍の相同性を低下させたプライマーセットを設計した。これらのプライマーセットを用いることで、エビ/カニ DNA 5 pg ならびにエビ/カニのタンパク質 10 ppm モデル加工食品の検出が可能であることを検証している。以上の結果から、系統分類に利用される 16S rRNA 遺伝子領域を標的とすることで、同じ十脚目に属するエビとカニとを識別して検出できると結論している。

第3章では、エビ/カニ識別 PCR 技術の加工食品への適用性に関して述べている。加工食品は原材料、製造工程が多様なため、DNA 分解や PCR 阻害作用など、抽出 DNA 溶液の品質低下が懸念される。本章では、実際の市場に流通している製品において、通知の ELISA 試験に対して PCR 試験の結果に整合性が得られることを示している。また、一連の PCR 検査における DNA 抽出方法ならびに PCR 適用可否判定方法の性能評価を元に、食品中のエビ/カニの有無の判定には、①陰イオン交換膜タイプの DNA 抽出法、②エビ/カニ PCR と植物 PCR および動物 PCR の並行試験、③DNA 品質評価の実施が適していることを提示した。以上の結果から、エビ/カニ識別 PCR 技術は、アレルギー原因食品原材料の検査におけるスクリーニング検査 (ELISA 試験) 後の確認検査に利用が可能であると結論している。なお、本技術は、日本の「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」に準拠することが確認されている。

総括では、本研究の成果をまとめるとともに、PCR 検出技術や加工食品検査の課題、そして、展望に関して論議している。

このように、本研究の成果は、系統分類に用いられる DNA 領域を標的とした PCR 検出技術の開発を通して、加工食品中の微量の食物アレルギー原因食品原材料を検出するための理論面・技術面の基盤を提供したもので、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。