

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 張 虹

張 虹氏の提出論文 *Studies on the detection methods for seafood noxious substances* (水産食品における有害物質の検出法に関する研究)は食品安全科学の観点から、水産無脊椎動物アレルゲンのトロポミオシンとフグ毒テトロドトキシンに対するモノクローナル抗体を作製し、これを用いた特異的検出法を確立したものである。その概要を以下に示す。

わが国だけでなく、世界的にも「食の安全」は重要課題として各国でその確保に関する技術開発が急がれている。中でも、食物アレルギーは重要な課題であり、その機構解明からその対処療法まで幅広く研究されている。食物アレルギーは主に IgE が関与する I 型アレルギーに分類され、その代表的な原因物質として卵や牛乳のタンパク質が挙げられる。これらのアレルゲンに対するアレルギー反応は一般に成長に伴って緩やかに改善される（寛解）が、水産物に対する食物アレルギーは成人での発症率が高く、寛解しにくいと考えられている。世界的な水産物の需要の高まりにつれ、食の安全確保のために、そのアレルゲンの特異的検出法の確立が望まれている。特に水産無脊椎動物に対するアレルギーの発症頻度が高く、そのアレルゲンとしてトロポミオシンが注目されている。そこで、本研究では、まず水産無脊椎動物のトロポミオシンに対するモノクローナル抗体 (MAb) を作製し、その迅速検出法の確立を目指した。また、食の安全を脅かす存在として、生物毒が挙げられる。その中でも、フグ毒テトロドトキシン (TTX) は広範な生物種に分布し、我が国でも毎年のように食中毒事例が報告され、死亡例も見受けられる。そこで、本研究では、TTX に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を作製し、検出法の確立につなげることを目的とした。本論文は 4 つの章から構成され、第 1 章では食物アレルギーと TTX 中毒の機序やアレルゲンおよび TTX 検出法の概要をまとめた。第 2 章では、数種の水産無脊椎動物トロポミオシンで共有される IgE エピトープのアミノ酸配列に対して作製した MAb BE9、EB11 および DC3 は甲殻類トロポミオシン以外に硬骨魚類のタンパク質とも交差した。このため、新たにデザインした配列に対して得られた MAb CE7B2 は甲殻類、軟体動物および節足動物・昆虫のトロポミオシンを認識し、脊椎動物のものとは反応しないことが明らかとなった。さらに、本 MAb は加工食品中に存在するトロポミオシン由来断片をも認識し、加工食品中のアレルギー性のあるペプチドの検出にも対応できることが明らかとなった。甲殻類および軟体動物トロポミオシンのサンドイッチ ELISA 定量に MAb CE7B2 を適用したところ、検出限界がクルマエビ・トロポミオシンでは 0.09ng/ml、スルメイカ・トロポミオシンでは 0.64ng/ml となり、いずれも市販のアレルゲンキットの感度を著しく凌駕した。さらに、蛍光共鳴エネルギー転移現象 (FRET)

を利用した新規アレルゲン検出法を開発した。すなわち、FITC を抱合した MAb CE7B2 を蛍光エネルギードナーとして、TRITC を抱合した MAb 2A7H6 をアクセプターとして FRET システムを構築した。本システムでは、トロポミオシン濃度依存的に蛍光強度比が上昇し、アレルギーを引き起こす本体である多重エピトープを有するアレルゲンを固相化することなく混和するだけで検出することが可能であり、迅速簡便な検出法として非常に期待できる。

第3章では、免疫源としてこれまでの TTX の毒性発揮部位にタンパク質を結合させる方法では、毒の中和や毒性の正確な評価に用いることができない抗体が得られると考え、新たな TTX 誘導体を作製し、モノクローナル抗体を作製した。得られた TTX 誘導体を飛行時間型質量分析計で解析したところ、キャリアタンパク質 1 分子に 3 分子の TTX が結合していることが明らかとなった。また、本誘導体はマウスに対して TTX と同等の毒性を示すことが明らかとなった。得られた 5 つの MAb のうち、2 つの MAb は TTX-BSA 複合体をより強く認識するが、質量分析の結果から遊離の TTX をも認識することが明らかとなった。以上のことから、本研究で得られた抗 TTX MAb は TTX の毒性検出の他、毒性の中和やその結合物質の探索などにも用いることができるものと考えられた。

第4章では、本研究の成果から将来の展望について包括的に議論した。

以上、本研究は、食品の安全を確保する上で最も重要な危害物質の高感度検出法を確立したもので、食品科学的な知見の提供だけでなく、産業上の応用に直接つながるものとして、審査委員全員一致で本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認められた。