

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 平尾 宜司

食物アレルギーの発症は極めて微量のアレルゲンの摂取によっても起こり、重篤な場合には患者が死に至る危険性がある。患者の健康危害の発生を防止する観点から、日本をはじめとする諸外国においても食物アレルギー表示制度の整備がなされている。食物アレルギーは、分類学的に近縁な場合に共通抗原性がある可能性も報告されており、栽培品種として知られている食用種だけに限定せず、例えば同じ植物属に含まれる野生種の植物も含めて、広く特異的に、高感度で検出する技術の確立が望まれている。

本研究では、small subunit ribosomal RNA 遺伝子と large subunit ribosomal RNA 遺伝子に挟まれた internal transcribed spacer (ITS) 領域に着目して、主要な食物アレルゲンを高感度かつ特異的に検出する技術の開発を目的として、そばの定性 PCR 法、そばの定量 PCR 法、落花生、大豆、小麦の定性 PCR 法の開発研究を行なった。

第 1 章では、そばの定性 PCR 法の開発研究に関して述べている。PCR シミュレーションソフトウェアを活用することにより、普通そばやダツタンそばなどの栽培種だけでなく、野生種を含むそば属 (*Fagopyrum* spp.) の植物全般を広く検出できるプライマーを設計した。また、このプライマーを用いることで、普通そば、ダツタンそばを既存法よりも高感度 (50~500 fg DNA) で検出することのできる PCR 法を確立した。特異性に関しては、そばの近縁植物の一つであるそばかずらが偽陽性となったが、PCR 産物の配列を解析することにより、そばとの識別が可能であった。また、PCR 増幅産物由来の蛍光シグナルを、インターカーレーターである SYBR Green による real-time PCR により測定した結果、そば DNA 50 fg~5 ng と広いダイナミックレンジにおいて直線性の高い検量線を作成することができた。これらの結果から、ITS 領域を PCR 標的とすることで、そばを高感度かつ特異的に検出できることを明らかとした。また、real-time PCR による増幅産物のモニタリング結果から、定量 PCR 法への応用の可能性が示された。

第 2 章では、そばの定量 PCR 法の開発研究に関して述べている。DNA 抽出前に分析対象とする食品試料に観賞用の植物であるスターチスの種子を標準として添加して、real-time PCR で測定された食品試料中のそばの持つ ITS 領域の DNA 配列のコピー数を、標準が持つ ITS 領域の DNA 配列のコピー数により補正して、そばを定量する方法を検討した。この方法により、幾つかの異なるマトリックス (小麦粉、コメ粉、小麦+コメ粉、黒コショウ、塩コショウ) で作製したモデル食品中のそば粉 10、100 ppm (wt/wt) を精度良く分析できた。この結果から、添加したスターチス標準により、それぞれのマトリックスの DNA 含量 (抽出 DNA 量) を加味した補正ができ、食品試料中のそばを精度良く定量できることが明らかとなった。なお、そばの ITS 領域の DNA 配列のコピー数を測定する

PCR 法については、第 1 章のそばの定性 PCR 法に用いていたプライマーのうちの一つ、リバースプライマーを再設計することにより、そばに対する特異性を向上したものをを用いた。

第 3 章では、落花生、大豆、小麦の定性 PCR 法の開発研究に関して述べている。第 1 章のそばの定性 PCR 法の場合と同様に、PCR シミュレーションソフトウェアを活用することにより、GenBank に登録されている落花生属 (*Arachis* spp.)、大豆属 (*Glycine* spp.)、小麦属 (*Triticum* spp.) の植物を広く検出できるプライマーを設計した。また、これらのプライマーを用いることで、それぞれ、落花生、大豆、小麦を既存法と比べて同等以上の高感度（それぞれ 50~500 fg DNA）で検出することのできる PCR 法を確立できた。これらの結果から、ITS 領域を PCR 標的とすることで、そばだけでなく、主要な食物アレルギーである落花生、大豆、小麦についても高感度かつ特異的に検出できることを明らかとした。

以上、本研究は、internal transcribed spacer 領域を標的とした食物アレルギー（そば、落花生、大豆、小麦）の分析技術の開発を通して、アレルギーとなりうる食品成分の存在を感度および精度良く測定するための理論面・応用面の基盤を提供したもので、学術的、応用的に貢献するところは少なくない。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。