

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 篠田 直樹

牛海綿状脳症（BSE）は、本病に感染した牛を原料とする飼料（肉骨粉や油脂等）を牛が摂取することにより感染が拡大したとされている。飼料中の規制原料を検出するための分析法には、顕微鏡鑑定法、酵素免疫測定法（ELISA）、遺伝子鑑定法（PCR）等があり、それぞれ原料の形、タンパク質、遺伝子から特定の原料を検出する方法である。そのうち、PCR 法は、検出感度、種特異性、規制動物種のスクリーニング検査の利便性に優れている。家畜飼料検査で使用する PCR プライマーとしては、検出感度、特異性、結果の判別性に優れているものを独自に設計する必要があり、また結果の判別性を向上させるための因子についての知見は十分ではない。

そこで、本研究では、飼料のスクリーニング検査用プライマーを効率的に作成する方法を開発することを目的として、飼料への混入が生じうる代表的な数種類の動物種（豚、鹿、鯨）を選んでそれらの特異的なプライマーを作成すると共に、牛、羊・山羊、鶏、げっ歯類の基礎データを参照しつつ、判別性に優れたプライマーを得るための因子を調べたものである。また、PCR 検査により陽性となった場合の確認法を開発した。

1. 新たなコンピュータープログラムを用いた、飼料中の複数の動物由来原料を検出するための PCR プライマーの開発

種グループ特異的プライマーを容易に設計するために、既存の知見及び経験則をベースとしてコンピュータープログラムを作成した。その特徴は以下のとおりである。

- 1) プライマーの 3'末端配列とターゲット配列の相同性からアニーリングの成否を予測する。
- 2) ターゲットグループから一本の相同配列を作成し、非ターゲットグループとマルチプライメ

ントを行う。

- 3) ターゲットグループと非ターゲットグループを比較し、ターゲットグループのみにアニーリングすると予測されたプライマーを抽出する。

この研究では、*in silico*、*in vitro* を組み合わせたフローチャートを作成し、効率的なプライマー開発法を作成した。作成されたプライマーの内、反すう動物特異的プライマーは特異性、検出感度、判別性において良好な結果を示した。

2. プライマーの 5'末端における GC 含有率と PCR 反応効率との関連性

PCR の反応効率の高さは、電気泳動像の判別性の高さに反映される。71 個 45 対のプライマーについて、電気泳動像の光度を 3 段階に振り分け、各光度とプライマー配列の関係を解析した。その結果、電気泳動像の光度が高いプライマーは、その配列の 5'末端におけるグアニンシトシン (GC) 含有率が高いことが示された。これは、プライマーの 5'末端の GC 含有率を上げた場合、PCR の反応効率が上昇する可能性を示唆している。

3. 豚肉骨粉中の熱処理されたクジラ類を検出するプライマーの開発

近年、飼料規制は新たな段階を迎えており、個々の動物種について BSE のリスクを評価し、その評価によっては規制対象から外す施策が取られている。鯨類は飼料については規制対象種であるが、肥料用には認められている。このような状況下で、現在検出法が存在しない豚由来原料中のクジラ類の検出法について、上述の 1 および 2 の結果を利用してそのプライマーを開発した。

4. 飼料中の鹿類を検出するプライマーの開発

種特異的プライマーにおいて、現在までに牛、羊、山羊が開発されている。しかし、鹿については、その亜種が多いために、鹿類を検出するプライマーは報告されていない。飼料のスクリーニング検査における鹿類の検出需要に対応するため、1 の方法を用いて鹿類由来 DNA を特異的に検出するプライマーを開発した。

5. PCR-RFLP 法による飼料中の動物由来 DNA の同定確認

これまで飼料分析基準となっている PCR 法においては、検出の有無を増幅断片の長さのみから判断するため、陽性となった場合は配列確認等により非特異反応でないことの確認が必要となる。配列確認にはシーケンシングが最も確実な方法であるが、多大な時間やコストがかかるために、ルーチン検査においては実用的ではない。本章では、短時間で簡便に陽性サンプルの同定確認を行うために、PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism) による同定法を開発した。

以上の結果から、本研究は飼料に含まれる様々な組み合わせの動物種を特異的かつ高感度に検出する PCR 法の開発に有効な手法をもたらしているものであり、これらの検出方法は最近の飼料検査に実際的に採用されるようになった。

以上を要するに、本研究は家畜飼料中の動物由来原料を鑑別するための効率的で実用性の高い方法を開発、提供することに一定の成果を挙げたものであり、学術上、応用上寄与する面が少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位を授与するにふさわしいものと認めた。