

光過敏症原因物質のPCRスクリーニング法の開発

Development of the PCR screening for causative agent of light hypersensitivity

山口 仁孝・藤田 千春*

キーワード：食物アレルギー、光過敏症、PCR

はじめに

現在、様々な原因物質に起因する食物アレルギーについての報告があり、その発症数は年々増加している。日本においては、食品衛生法施行規則により、特に、特定原材料7品目（エビ、カニ、小麦、そば、落花生、乳、卵）については表示義務が規定され、検査方法等も示されている¹⁾。

一方、表示義務がない食品の摂取に起因する食物アレルギーの1つとして、光過敏症が知られている。光過敏症については、厚生労働省の通達により、原因物質フェオフォルバイド等を含むクロレラ加工品について、食品での重量パーセントおよびフェオフォルバイド生成酵素の酵素活性度が規定され、これらの物質を摂取後に光を感知して起こる皮膚障害について、注意を喚起している²⁾。

光過敏症の原因食品としては、春先のアワビの内臓、クロレラ加工食品などがこれまでに報告されている³⁾が、それ以外のクロロフィル含有食品におけるリスク等の詳細については不明な点が多い⁴⁾。

アレルギー特定原材料の確認検査法にも指定されているPCR法は、わずか数分子（生化学反応では解析することのできない低濃度）のターゲット核酸から数百万分子のDNAを増幅することが可能である^{5) 6)}。

PCR法は生物本来のDNA複写過程を真似た反応で、増幅したいターゲットDNA配列の両端に位置す

る2つのオリゴヌクレオチドプライマーにより、増幅するターゲット配列を指定する。これらのプライマーはそれぞれ相対するDNA鎖にハイブリダイズし、新たなDNA鎖の合成開始点となり、Taq DNAポリメラーゼなどの耐熱性DNAポリメラーゼが、このDNA合成を触媒することで新たなDNA複製鎖が得られる。このPCR法を用いることで食品中に含まれるごく微量のDNAを感度よく特異的に検出することが可能になる^{7) 8)}。

本研究では、食品中に含まれるごく微量の光過敏症原因物質に着目し、その原因物質遺伝子のPCRスクリーニング検査方法について検討した。

材料と方法

光過敏症原因物質は、クロロフィルaの分解により産生されることから、今回はクロロフィルaおよびクロロフィラーゼ（分解酵素）をターゲットとしてプライマーを設計し、市販食品からの遺伝子の検出を試みた（図1）。

(1) 市販食品からDNA抽出法の検討（フェノール・クロロホルム抽出法）

生鮮食品『グレープフルーツ（果実、皮、種）、ミカン（果実、皮）、バレンシアオレンジ（種）、マーコットオレンジ（果実、種）』および加工（乾燥）食品『とろろ昆布、塩っぺ、乾燥ワカメ2種類（1, 2）、乾燥コンブ、アラメ、昆布だし』サンプルにつ

*美作大学食物学科学学生

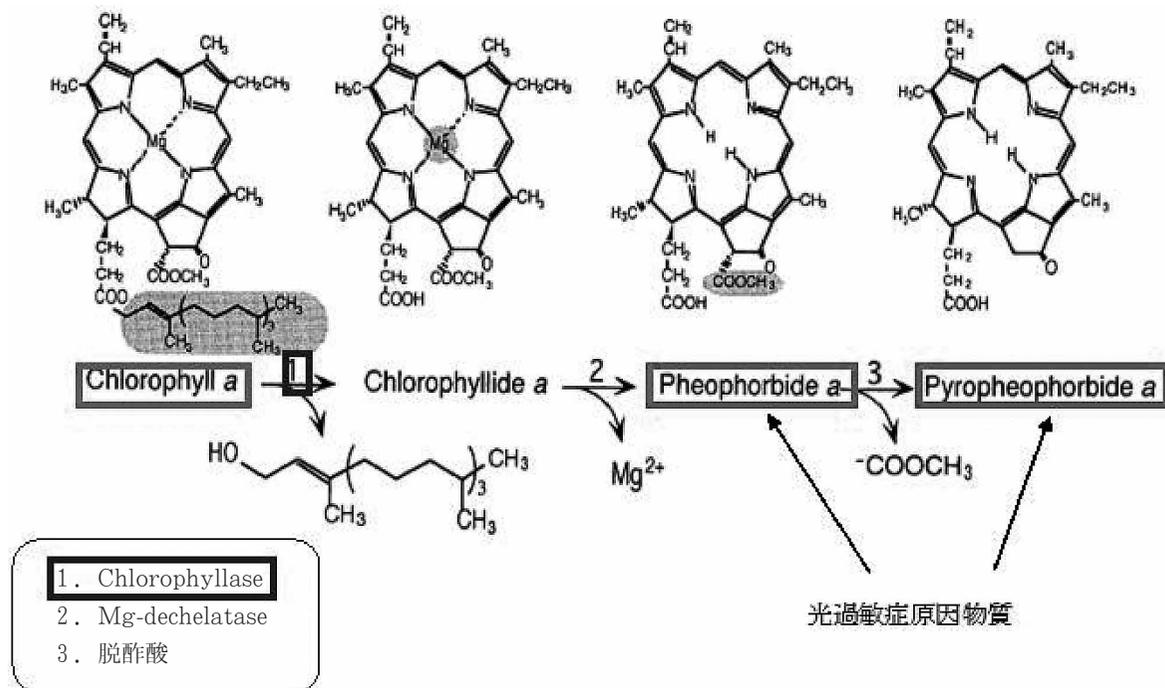


図1 光過敏症原因物質の生成過程

いて、塩抜き（水漬けO/N）細切後、1.5 mL tubeに入れ、Proteinase K (PK) 添加Tail buffer（1 mg/mL proteinase K、1 % SDS、0.1M NaCl、0.1M EDTA、50mM Tris-HCL (pH8.0)、up to 500mL by DW) を1 mL 加え（35°C O/N）、上清を新しいtubeに移し、フェノール・クロロホルム抽出法による抽出を試みた。

(2) PCRスクリーニング法の検討

①プライマー設計

NCBI GenBank Geneデータベースから『クロロフィルa』および『クロロフィラーゼ』の塩基配列の検索を行い、データベースの塩基配列をもとに、市販ソフト (Genetyx) を用いてクロロフィルaおよびクロロフィラーゼのプライマーを設計し、各プライマーを株) グライナー・ジャパンに合成委託した。

②陽性コントロール（乾燥コンブおよびオレンジ）

DNAを用いてのPCR条件の検討

サーマルサイクラーのサイクル数、アニーリング時

間・温度の検討を行った。

(3) 市販食品を用いたPCRスクリーニング

『スイカ（黄、赤）、パインアップル、キウイフルーツ、ブドウ、パッションフルーツ、ゴーヤ（果実、種）、ピンクグレープフルーツ（果実、皮）、かぼちゃの種（生、乾燥）、キュウリ、巻貝（トコブシ、アワビ、サザエ、ツブガイ）、二枚貝（アサリ、アカガイ、ホタテ）中腸腺』サンプルから抽出したDNAについて、スクリーニング試験（特異性の検討）を行った。

結果および考察

(1) 市販食品からDNA抽出法の検討

PK加Tail bufferによるタンパク溶解とフェノール・クロロホルム法によるDNA精製で、サンプルからDNAの抽出をすることができた。

DNA精製が良好の場合、白い糸くず状のものが見えたが、若干精製が不良のものでは、やや透明で粘性があり、DNAの間に気泡を含んでいた（図2）。



精製良好



精製不良

図2 精製DNA

<PCR condition>
 94℃ 5 min
 94℃ 30sec
 55℃ 30sec
 72℃ 30sec
 72℃ 5 min
 4℃ ∞
 } 34cycles



サーマルサイクラー

図3 PCR条件

(2) PCRスクリーニング法の検討

①『クロロフィルa』についてはコンブの配列を、『クロロフィルaゼ』についてはオレンジ、ミカン、レモンの塩基配列を参考に、クロロフィルaおよびクロロフィルaゼのプライマーを設計した(表1)。

②陽性コントロール(乾燥コンブおよびオレンジ)

DNAを用いてのPCR条件の検討

サーマルサイクラーのサイクル数、アニーリング時間・温度は、遺伝子組み換え大豆のPCR conditionと同様とし(図3)、コントロールDNAの増幅を試みた結果、乾燥コンブ、乾燥ワカメ1、2およびオレンジ、グレープフルーツから抽出したDNAにおいてampliconが確認された。

図4左のとおり、乾燥コンブ、乾燥ワカメ1、2のampliconのバンドは、437bp付近に確認され、コ

ンブ、乾燥ワカメ1についてはやや薄いバンドであったが、目的遺伝子の増幅を確認することができた。

一方、クロロフィルaゼについては、図4右の通り、オレンジ、グレープフルーツで237bp付近のバンドが明瞭に確認された。

これらの結果から、乾燥ワカメ2をクロロフィルa、グレープフルーツをクロロフィルaゼの陽性コントロールとした。

しかしながら、今回陽性コントロールとして検討した乾燥コンブにおけるクロロフィルaのampliconは、増幅が弱く検出安定性に欠けていた。今回Geneデータベースに登録されているマコンブのクロロフィルa構成タンパク質の塩基配列をもとに、全部で5種類のプライマー対で増幅を試みたが、乾燥コンブでの増幅バンドは容易には認められなかった。このことは、targetとしたクロロフィルa構成蛋白質の配列データが1つのみしかデータベースに

表1 合成したprimer

Primer	Sequense (5'-3')	Tm (°C)	GC%	Amplicon size (bp)
<Chlorophyllase>				
Chlase1-s	gaacttaacagcgcagcaga	59.5	50.00	
Chlase1-as	ggtgccaatcacagtaacgg	59.9	55.00	273
Chlase2-s	gcgtcccatggattcatcgt	61.4	55.00	
Chlase2-as	agaaacgccaccacaatccc	61.9	55.00	593
<Chlorophyll a>				
ChlA1-s*	ccaattatggcgtgctgaagg	68.3	50.50	
ChlA1-as1	accaaaagtccacctgttacgg	64.8	50.50	437
ChlA1-as2	ttaaccaaagtccacctgttac	59.4	47.30	435
ChlA2-s	ttgtagtggtgcagcacatgg	70.2	52.90	
ChlA2-as*	ggcaagtaccacctctcctg	67.8	54.70	749、*1298
ChlA3-s	attattagatgctggtgttcttcac	64.9	51.00	
ChlA3-as	tacaatacaaaaatcccccaatccaac	67.0	50.60	532

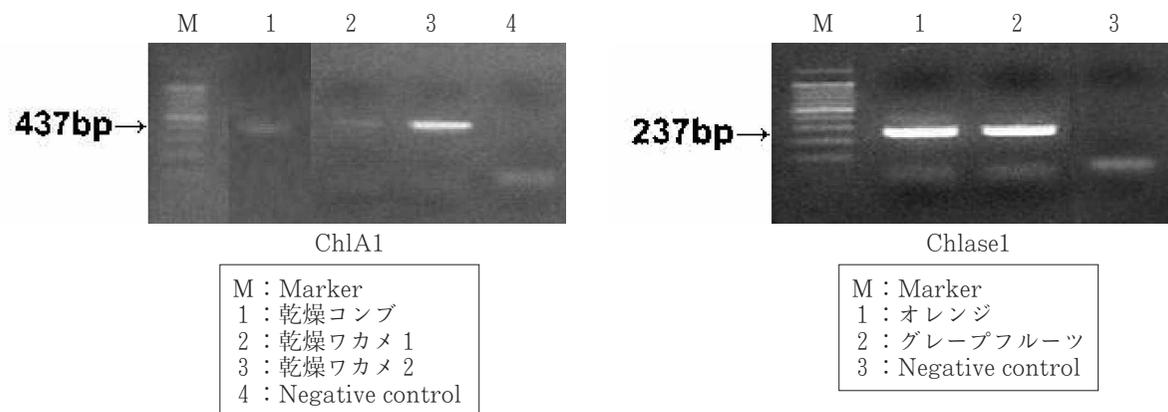


図4 コントロールDNAの増幅確認

登録しておらず、登録されている配列以外に、亜型等の他の塩基配列があるものと考えられた。

(3) 市販食品を用いたPCRスクリーニング

市販されている食品からのPCRスクリーニング結果は、クロロフィルaのプライマーセット (ChlA1-s & as1) では遺伝子の増幅が確認されなかった。一方クロロフィラーゼ (Chlase1) では、市販生ワカメおよびサザエから増幅遺伝子を確認することができた (図5)。果物および野菜のPCRスクリーニングでは、すべての食品でChlase1遺伝子の増幅は確認されなかった (図6、表2)。

クロロフィルaについて遺伝子の増幅が十分に認められなかったため、さらにprimerを再度設計しながら確認を行った結果、ChlA2、(ChlA1-s, ChlA2-as)、ChlA3では、グレープフルーツDNAで遺伝子増幅が確認された。また、(ChlA1-s, ChlA2-as)、ChlA3においては、陽性コントロールの乾燥ワカメ2に遺伝子の増幅が確認された (図7-9)。

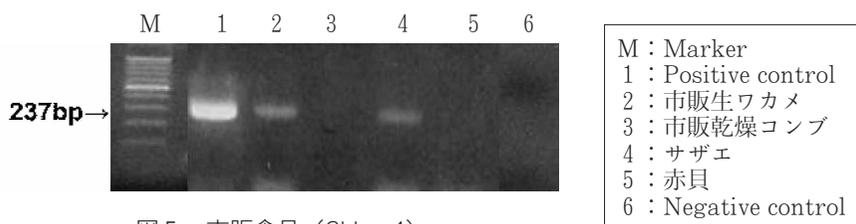


図5 市販食品 (Chlase1)

市販食品を含めた結果を表2に示す。巻貝のアワビおよびサザエにはクロロフィラーゼが確認された。しかしながら、マコンブのクロロフィルaの配列から作成したプライマーを用いた検体において、陽性コントロールの乾燥ワカメ2および市販生ワカメを除いて、クロロフィルaは検出されなかった。

今回のスクリーニングに使用した市販巻貝は長崎県産である。アワビは主にコンブを餌とするが、気候が温かい地域ではマコンブは生息していないため、コンブに似た海藻を餌としていると考えられる。したがって、コンブの生息する地域生産のアワビについてもスクリーニングを行う必要があるものと思われた。

一方、今回作成したプライマーは、マコンブの塩基配列をもとに設計しているが、ワカメのDNAにおいてAmpliconが確認された。したがって、ワカメを餌としている他の巻貝サンプルにおいても同様にampliconが確認される可能性は高いものと考えられた。

また、市販巻貝のアワビ、サザエからクロロフィラー

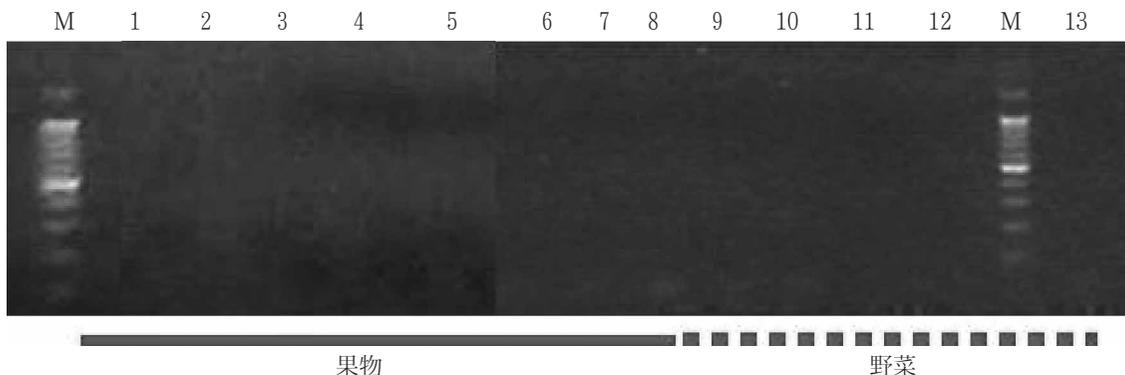


図6 市販食品 (Chlase1)

ゼ遺伝子の増幅が確認されたことから、コンブ・ワカメなどのクロロフィルaを含む褐藻類を餌とする貝類を用いた加工食品の検出に、PCR法を用いた今回のスクリーニング法は有用であると考えられた。

PCR法は、特定の遺伝子について短時間に100万倍程度増幅することが可能であることから、微量のDNAの存在を確認することができる。このことから、加工食品に含まれるごく微量の食材についても、遺伝

子の検出が可能である。したがって、加工食品中に含まれるアレルギーを誘発するごく微量の食材の混入を迅速・簡便に検出する方法として有用であると考えられる。

一方、今回の研究では、加工食材からのDNA抽出やPCRによる遺伝子増幅について、一部再現性が認められない結果も出た。今後はさらにプライマー、DNA抽出法、PCR条件の再検討を行い、スクリーニ

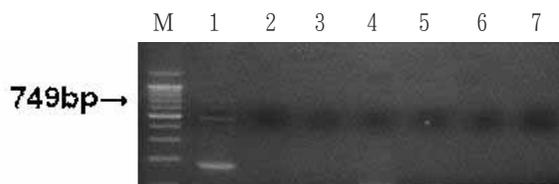


図7 ChIA2



図8 ChIA1-s, ChIA2-as

- | | |
|---|--------------------|
| M | : Marker |
| 1 | : Positive control |
| 2 | : 市販乾燥コンブ |
| 3 | : 市販生ワカメ |
| 4 | : アワビ |
| 5 | : サザエ |
| 6 | : 赤貝 |
| 7 | : Negative control |

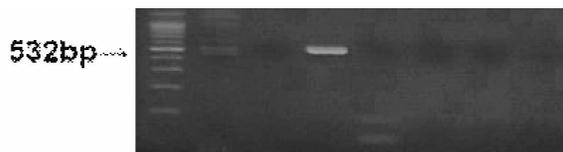


図9 ChIA3

表2 市販食品のスクリーニング結果

市販食品	DNA抽出*	Primers				
		Chlorophyllase	Chlorophyll a			
		Chlase1	ChlA1	ChlA2	ChlA1-s ChlA2-as	ChlA3
スイカ (黄)	—	—	—	—	—	—
スイカ (赤)	—	—	—	—	—	—
パイナップル	—	—	—	—	—	—
キウイフルーツ	—	—	—	—	—	—
ブドウ (デラウェア)	—	—	—	—	—	—
パッションフルーツ	—	—	—	—	—	—
ゴーヤ (果実)	—	—	—	—	—	—
ゴーヤ (種)	△	—	—	—	—	—
ピンクグレープフルーツ (種)	△	—	—	—	—	—
ピンクグレープフルーツ (皮)	—	—	—	—	—	—
かぼちゃの種 (生)	△	—	—	—	—	—
かぼちゃの種 (乾燥)	△	—	—	—	—	—
キュウリ	—	—	—	—	—	—
トコブシ	△	—	—	—	—	—
アワビ	○	w †	—	—	—	—
サザエ	○	+	—	—	—	—
ツブガイ	△	—	—	—	—	—
アサリ	○	—	—	—	—	—
アカガイ	○	—	—	—	—	—
ホタテ	△	—	—	—	—	—
市販乾燥コンブ	○	—	+	—	—	—
市販生ワカメ	○	+	+	—	+	+

*: ○=精製良好、△=精製やや不良、—=精製できず、†=weakly

ング法の精度および感度を向上させる必要があるものと考えられた。

今後は光過敏症原因食品である貝類が含まれる多くの加工食品について、本スクリーニング法を実施し、総フェオフォルバイド量の測定等を加味し、加工食品ごとの光過敏症の発症リスクを明らかにしたい。

参考文献

- 1) 厚生労働省医薬局食品保健部長通知、特定原材料（卵、乳、小麦、そば、落花生）の検査方法、食発第1106001号、平成14年11月6日（最終改正 平成17年10月11日食安発第1011002号）
- 2) 厚生省環境衛生局長通知、フォフォルバイド等クロフィル分解物を含有するクロレラによる衛生上

の危害防止について、環食第九九号、昭和56年5月8日

- 3) Yoshiro Hashimoto, et al. Photosensitization of animals by the viscera of abalones, *Haliotis ssp.* Bulletin of Society of Scientific Fisheries Vol.26, No.12, 1216~1221 (1960)
- 4) 加藤敏光、ピルリナ原末中の総フェオフォルバイド値と光過敏症について、食品衛生学雑誌、Vol. 36, No 5 632~634 (1995)
- 5) 橋本博之、Multiplex PCR法を用いた食品中の特定原材料の検出、食品衛生学雑誌、Vol.48, No. 5 132~138 (2007)
- 6) 内野昌孝、食品原材料検出のためのPCRプライマー開発に関する基礎的研究〔総説〕、日本食品保

蔵科学会誌、VOL.36, NO.2 89~94 (2010)

7) T.A.Brown、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)、ゲノム第2版、メディカル・サイエンス・インターナショナル、p 129~132 (2003)

8) ロシュ・アプライド・サイエンス：PCRアプリケーションマニュアル (第3版) http://roche-biochem.jp/prima/prima_molecular_biology/pcr_j/index.html