

アレルギー物質検査の PCR 法における海藻類検出プライマーの検討

○静木あや子、西純市、小峰愛理、竹下明子、小林宏行
株式会社生活品質科学研究所

【目的】海藻類はアレルギー物質を含む食品の検査方法のスクリーニング検査（ELISA法）において、非特異的吸着に起因する偽陽性反応が生じやすいことから我々はこれまでにELISA法における偽陽性反応の抑制方法を検討し報告¹⁾した。しかし、海藻類による偽陽性反応を完全に抑制することは困難であった。また、海藻類は確認検査（PCR法）においても、DNA抽出後の吸光度測定で十分なDNA濃度が確認されても、生物分類の特性上、植物または動物DNA検出用プライマーで内在性遺伝子が増幅されないことが多い。そのため特定原材料検出用プライマーで増幅しない場合でも、判定ルール上は検知不能となり検査結果の評価が困難となる。そこで、本研究では海藻類のPCR法に適した内在性検出プライマーの検討を行ったので報告する。

【方法】海藻類のうち緑藻類、紅藻類、褐藻類からELISA法で偽陽性反応が確認されたコンブやノリなどの海藻類を含む10種（緑藻類2種、褐藻類6種、紅藻類2種）を選定した。それらの葉緑体DNA上のrbcL遺伝子配列をGenbankから取得し、増幅長が同一になるように各藻類（緑藻類1対、褐藻類2対、紅藻類1対）を検出対象とする計4対のプライマーを作製した。また10種の海藻類および高等植物に対する交差反応確認用として小麦・そば・落花生からDNAを抽出し、作製したプライマーを用いてPCRによる増

幅を確認した。なお、海藻類検出プライマーは単独または複数種を混合した状態でPCRを実施し、増幅産物はシーケンス解析にて塩基配列を確認した。

【結果】10種の海藻類からDNAを抽出し、その吸光度を測定した結果、各海藻類のDNA濃度は20ng/ μ L以上であった。4対のプライマー単独の各検出対象に対応する海藻類は、いずれも検出対象のDNAから増幅が確認された。一方、複数種のプライマーを混合した検討では、4対混合したプライマーでは、増幅されない種が確認され、褐藻類と紅藻類を検出対象とする2対混合したプライマーでは、検出対象外の緑藻類を含む10種全ての海藻類から増幅が確認された。また、2対混合時は小麦・そば・落花生DNAに対する交差反応は確認されなかった。なお、2対混合時に増幅された各藻類の増幅産物の塩基配列はテンプレートDNAで使用した藻類由来のrbcL遺伝子と最も相同性が高かった。

【考察】4対混合から2対混合にプライマー数を減らしたことによって反応性が向上したことから褐藻1対・紅藻1対の2対混合のプライマーは、広範囲な海藻類が検出可能であることが示唆された。なお、本検討では代表的な海藻類のみを検討に使用したため、今後近縁種および同一種で産地が異なる場合でも検出可能かを検討する予定である。

1)小峰愛理ら、平成27年度日本食品衛生学会学術講演会講演要旨集、p134（2015）