

## 学位論文の審査結果の要旨

申請者、内ヶ島美岐子さんから提出された上記題目の学位論文に関して、4名の学内審査委員と1名の学外審査委員が独立にその内容を、信州大学大学院において博士（農学）の学位を授与するにふさわしいかを審査した。

本論文は、食品の安全上で大きな問題となっている残留農薬やカビ毒の分析において、簡易・迅速な分析法としてその利用が広がっている酵素免疫法（ELISA）や、定量分析における前処理の精製手段として多用されているイムノアフィニティカラム（IAC）に必須の抗体作製に関するものであった。抗体はウサギ等の温血動物を免疫しその血清を利用するポリクローナル抗体（PoAb）と、マウスの免疫しその脾臓細胞等を細胞融合、クローニングと言ったステップをかいして特定の抗体（モノクローナル抗体（MoAb））を作製するものと大きく2つのものがある。本論文で取り上げたのは、後者のモノクローナル抗体である。本論文の著者は、この抗体のスクリーニングの過程を工夫することにより、抗体の使用目的に応じた一定の有機溶媒耐性を持ったものを作製する事を試み、成功し、実用上優れた特性を持つ抗体を作製する手法を確立した。

まず、残留農薬測定用ELISAの開発では、10%メタノール中で反応を行うため、MoAbの開発は10%メタノール中で細胞のスクリーニングを行った。得られたMoAbを用いて構築した直接競合ELISA（dc-ELISA）は、50%阻害濃度（IC<sub>50</sub>値）が4.4 ng/mL、測定範囲（IC<sub>20</sub>値～IC<sub>80</sub>値）が1.5～15 ng/mLであった。また、農産物を用いた添加回収試験では、104～124%と良好な回収率で、HPLCによる分析とほぼ同等の結果が得られた。またこの抗体の作製において、免疫源となるクロチアニジン誘導体を新規化合物として合成し、目的の検出の特異性を高めていた。

次に、さらに高濃度の有機溶媒でも反応するMoAbを作製のため、よりも高いメタノール濃度でスクリーニングを行うことで、高有機溶媒耐性MoAbの開発を目指した。まず、発がん性のカビ毒で、日本においても規制（総量として10 μg/kg）のあるアフラトキシン（AF）のMoAb開発では、通常、免疫原として用いられるAFB<sub>1</sub>ではなく、AFB<sub>2</sub>を免疫原とし、40%メタノールでスクリーニングを行った。得られたMoAbのAF群（AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>）に対するIC<sub>50</sub>値が、1.9～2.8 ng/mLであり、その汚染が問題となるAFすべてに対し高い反応性を示していた。また、アセトニトリル濃度40%まで耐性が確認で

きた。このMoAbを用いて作製したIACでAFの添加回収試験を行った結果、既存のIACでは適用が困難だった香辛料を含む試験をしたすべての食品において78～127%と良好な回収率が得られている。

同様に、欧米で規制が進み、我が国でも規制の可能性が議論されているオクラトキシンに対する有機溶媒耐性MoAbを開発し、IACを構築した。開発したMoAbのELISAでの性能評価の結果、OTA、OTBに対するIC<sub>50</sub>値は、27 ng/mLと17 ng/mLであった。また、メタノール濃度60%まで、アセトニトリル濃度40%まで、エタノール濃度20%まで耐性が確認できた。小麦、ココア、ワインについてのOTA、OTBの添加回収試験の結果、いずれの食品でも73%～100%と良好な回収率が得られた。

構築したクロチアニジン用ELISA、カビ毒用IACは、分析の現場で使用されており、有機溶媒耐性MoAbの有用性を示している。この有機溶媒耐性MoAbの作製技術は、さらに広範な対象に応用可能な基礎技術であり、今後食品のみならず多方面への展開が見込まれる。

2014年8月1日に行った公開での発表会における申請者の発表は、論文の内容を的確に説明するものであり、内容に関しての申請者の理解度の高さが認められた。その後の口頭による最終試験においても、申請者の受け答えは、的確であった。

試験終了後、審査委員会を開催した結果、全員一致で、申請者：内ヶ島美岐子さんから提出された論文は学位論文に値し、最終試験は「合格」で、博士（農学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。

#### 公表主要論文名

1. M. Uchigashima, M. Saigusa, H. Yamashita, S. Miyake, K. Fujita, M. Nakajima, M. Nishijima: Development of Novel Immunoaffinity Column for Aflatoxin Analysis Using an Organic Solvent-Tolerant Monoclonal Antibody. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 8728–8734 (2009)
2. M. Uchigashima, Y. Yamaguchi(Murakami), H. Narita, M. Nakajima, S. Miyake: Development of an Immuno-affinity Column for Ochratoxin Analysis Using an Organic Solvent-Tolerant Monoclonal Antibody. *Methods*, 56, 180-185 (2012)
3. M. Uchigashima, E. Watanabe, S. Ito, S. Iwasa, S. Miyake: Development of an Immunoassay Based on Monoclonal Antibody Reacted with the Neonicotinoid Insecticides Clothianidin and Dinotefuran. *Sensors*, 12, 15858-15872 (2012)