

氏名(本籍・生年月日) 内ヶ島美岐子 (岐阜県 昭和51年7月2日)
学位の種類 博士(農学)
学位記番号 乙第15号
学位授与の日付 平成26年9月30日
学位授与の要件 信州大学学位規程 第5条第2項該当
学位論文題目 有機溶媒耐性モノクローナル抗体の開発とその応用に
関する研究
論文審査委員 主査 教授 後藤 哲久
教授 廣田 満
教授 真壁 秀文
教授 福田 正樹
中島 正博(名古屋市衛生研究所食品部部長)

論文内容の要旨

酵素抗体法(ELISA)やイムノアフィニティーカラム(IAC)は、食品を汚染する農薬やカビ毒の分析に有効な手段となっている。農薬やカビ毒は、一般にアセトニトリルやメタノールなどの有機溶媒を用いて食品から抽出される。しかし、ELISAやIACは、タンパク質である抗体を用いているため、有機溶媒中では不安定である。そこで、有機溶媒耐性を持つモノクローナル抗体(MoAb)を開発して、ELISAやIACを構築することで、農薬やカビ毒の新しい分析法の実現を目指した。

農薬のELISAでは、食品からのメタノール抽出液を水でメタノール濃度10%に希釈して測定に供する場合が多い。即ち、この条件で安定に反応する抗体が必要になる。そこで、ネオニコチノイド系殺虫剤の一つであるクロチアニジンにおいても、細胞スクリーニングを10%メタノール中で行うことにより、この条件でクロチアニジンと高い反応性を示すMoAbを得た。構築した直接競合ELISA(dc-ELISA)は、50%阻害濃度(IC₅₀値)が4.4 ng/mL、測定範囲(IC₂₀値~IC₈₀値)が1.5~15 ng/mLとなり、食品中のクロチアニジンを測定するうえで好適な反応特性を示した。また、農産物の添加回収試験では、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。

クロチアニジンにおいて、測定に適した有機溶媒耐性MoAbを得たので、カビ毒への応用を試みた。カビ毒は、一般的に有機溶媒を用いて食品から抽出し、HPLCで測定される。近年、測定を妨害する夾雑物質を効果的に取り除く前処理法としてIACが用いられるようになってきたが、抗体の有機溶媒耐性が低いために適用可能な食品は限定されていた。そこで、有機溶媒耐性MoAbを作製してIACの構築に用いることにより、適用可能な食品の大幅な拡大を試みた。

カビ毒の一つであるアフラトキシン(AF)では、クロチアニジンよりも高いメタ

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。AFB₂を免疫原とし、40%メタノールでスクリーニングを行った結果、得られた抗体のAF群（AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁）に対するIC₅₀値は、間接競合ELISAにおいて1.9~2.8 ng/mLと、いずれのAFとも高い反応性を示した。また、アセトニトリル濃度40%まで耐性が確認できた。この抗体を用いてIACを作製し、ピーナッツや種々の香辛料での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た。

次に、同じカビ毒であるオクラトキシン（OT）についても、AFと同様に有機溶媒耐性MoAbを開発し、IACを構築した。その結果、OTA、OTBに対するIC₅₀値は、間接競合ELISAで27 ng/mLと17 ng/mLで、両方に高い反応性を示す抗体が得られた。

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。この抗体を用いて作製したIACの添加回収試験では、小麦、ココア、ワインについて、いずれの食品でも73%~100%と良好な回収率が得られた。

ここで確立した有機溶媒耐性を持つMoAb作製方法は、今回取り上げた農薬やカビ毒に限定されるものではなく、今後より広範な物質を対象に、多方面での応用が可能な基礎的な技術である。