



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

食品中危害因子の生物発光酵素免疫測定法に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福田, 賢 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/3149

氏名（本籍）	福 田 賢（東京都）		
学位の種類	博士（獣医）		
学位記番号	獣医博乙第76号		
学位授与年月日	平成18年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当		
学位論文題目	食品中危害因子の生物発光酵素免疫測定法に関する研究		
審査委員	主査	岐阜大学 教授	山本茂貴
	副査	帯広畜産大学 教授	牧野壮一
	副査	岩手大学 教授	品川 隼 汎
	副査	東京農工大学 教授	廣田好和
	副査	岐阜大学 教授	高鳥浩介

論 文 の 内 容 の 要 旨

本論文はホタルルシフェラーゼを利用した高感度生物発光酵素免疫測定法(BLEIA)の開発と、食品中の危害因子検出への応用に関する研究について述べられている。

第1章は、BLEIAに利用可能なビオチン化ルシフェラーゼの開発について述べられている。ホタルルシフェラーゼはその発光効率が高いため、EIAに用いる標識酵素として期待されながら、従来の化学修飾による標識法では十分活性を保持した標識物が得られていなかった。そこで、ホタルルシフェラーゼを用いて実用的な標識酵素を得るため、遺伝子工学的手法を用いて大腸菌の菌体内でビオチンが付加されるペプチドと耐熱性変異ホタルルシフェラーゼLIL-217Lを融合タンパクとして発現させて、2種のビオチン化ルシフェラーゼbL203とbL248を作製した。両ビオチン化ルシフェラーゼはLIL-217Lと同等な活性を維持していた。マウスIgG₁を検出する系において、ビオチン化ルシフェラーゼを用いたBLEIAと汎用されている高感度検出系であるビオチン化アルカリフォスファターゼを用いた化学発光酵素免疫測定法(CLEIA)を比較したところ、BLEIAはCLEIAの2倍高感度であった。以上より、開発されたビオチン化ルシフェラーゼは高感度なEIA系に利用可能であると考えられ、以下の章において食品中の危害因子検出への応用が検討された。

第2章は、カビ毒フモニシンに対するモノクローナル抗体の作製と測定法の開発について述べられている。作製したモノクローナル抗体のうちの一つ、MabKLH17C10は毒性の強いフモニシンB群に対して100～143%の交差反応性を示した。発色系の競合ELISAによりウモロコシ中のフモニシンの測定を行なったところ、フモニシンB₁の定量範囲は1.25～12.5 ppmであった。サンプル抽出後約1.5時間で複数の試料を同時に測定できるため、スクリーニング方法として有用であると考えられた。さらに、競合法へのビオチン化ルシフェラーゼの応用について検討するため、アビジン-ビオチン系を利用したフモニシン測定系を構築した。ビオチン化ペルオキシダーゼを標識酵素とした発色系とbL248を用いた発光系を比較したところ、発光系においてより高感度な検出が可能であった。

第3章は、黄色ブドウ球菌の迅速高感度測定法の研究について述べられている。黄色ブドウ球菌プロテインAに対する抗体を用いた測定系を構築し、bL248を標識酵素としたBLEIAによる黄色ブドウ球菌の検出を行った。約2時間の操作でプロテインAを1 pg/mlより検出可能であった。また、ヒト由来

の黄色ブドウ球菌 35 株を初発菌数約 50 CFU/ml で非選択培地を用いて 5 時間培養後、BLEIA を行なったところすべて検出可能であった。選択増菌培養条件についても検討を行い、塩化リチウムとグリシンを選択増菌物質とした場合に、選択性とプロテイン A 生産性ともに良好な結果が得られることを見出した。選択増菌培地を用いることにより、初発菌数約 60 CFU/ml の黄色ブドウ球菌と他の菌種が 10^5 CFU/ml 共存する条件において、培養時間 5 時間で BLEIA による検出が可能となった。さらに、食品への添加試験においても 5 時間培養で検出が可能であった。

第 4 章は、サルモネラの迅速高感度測定法の研究について述べられている。サルモネラの LPS のコア多糖領域に対するモノクローナル抗体 M183 とビオチン化 M183 抗体を用いた BLEIA を開発した。市販鶏肉からのサルモネラの検出を、通常の前増菌培養 1 日と選択増菌培養 1 日後に BLEIA を用いて実施した場合、従来法によるサルモネラの分離と確認を行なった結果とよく一致した。より短時間で検査を可能にするため BLEIA の高感度化を検討した。固相に用いるサルモネラ抗原の捕捉試薬として M183 抗体の代わりにポリミキシン B を用い、サルモネラから抗原を露出させるための界面活性剤として CHAPS を用いた場合の検出感度が優れていることを見出した。改良した BLEIA は、*Salmonella* Typhimurium ATCC23564 を最少 7.3×10^2 CFU/ml から検出可能であった。さらに、BLEIA と市販の迅速増菌培地 S.P.R.I.N.T. による 24 時間培養を組み合わせる場合に、従来の増菌培地では検出できなかった損傷した少数のサルモネラを検出することが可能であった。

以上のように、新たに開発された標識酵素であるビオチン化ルシフェラーゼを用いた BLEIA は、従来汎用されている高感度な CLEIA と同等以上の検出感度を有しており、今後食品衛生分野のみならず臨床的な応用も期待される。また、ビオチン化ルシフェラーゼはカビ毒測定などにおける競合法にも利用可能であった。黄色ブドウ球菌の場合は 1 日の作業時間内、サルモネラの場合は翌日には検査結果が得られるため、迅速なフィードバックが可能になり、食品原料、製造工程あるいは製品の品質管理の向上に貢献できる技術であると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文の研究は、まず始めに、化学修飾ではビオチン化ルシフェラーゼを作成することが困難であるため、遺伝子工学的手法を用いて大腸菌の菌体内でビオチンが付加されるペプチドと耐熱性変異ホタルルシフェラーゼ LIL-217L を融合タンパクとして発現させて、2 種のビオチン化ルシフェラーゼ bL203 と bL248 を作製した。この系は従来のビオチン化アルカリフォスファターゼを用いた化学修飾系と比べてマウス IgG を測定するモデル系において約 2 倍の感度を有していた。このビオチン化ルシフェラーゼを用いた生物発光酵素免疫測定法の系の開発が本論文において新規性を有する点である。

ビオチン化ルシフェラーゼを用いる系を応用して、新たに開発した抗体を用いてカビ毒であるフモニシンを測定する競合免疫測定系を確立した。この系を用いてトウモロコシ中のフモニシンを測定したところ、1.25ppm~12.5ppm の範囲で測定可能であった。サンプル抽出後 1.5 時間で測定可能であり、スクリーニング検査に有用な方法と考えられた。

次にプロテイン A を測定するブドウ球菌測定系を開発した。選択増菌培地を用いることにより、初発菌数 60 CFU/ml の黄色ブドウ球菌と 10^5 CFU/ml の他の菌種が混在する条件下で 5 時間培養後に検出可能であった。また、食品への添加試験においても 5 時間培養で検出可能であった。

最後にサルモネラの LPS に対する抗体を用いた測定系を開発し食品からの病原因子を高感度に検出する系を開発した。サルモネラの増菌培地に S.P.R.I.N.T. を用いて 24 時間培養することにより、従来の増菌培地で検出できなかった熱損傷を受けた 10^2 CFU/ml 程度のサルモネラを検出することが可能となった。

以上のように、新たに開発されたビオチン化ルシフェラーゼを用いた免疫測定系は、従来汎用されている酵素免疫測定系と同等以上の検出感度を有しており、今後、食品原料、製造工程あるいは製品の品質管理の向上に貢献できる技術であると考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Preparation and characterization of anti-fumonisin monoclonal antibodies
著 者 名 : Fukuda, S., Nagahara, A., Kikuchi, M. and Kumagai, S.
学術雑誌名 : Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry に発表・発表予定
巻・号・頁・発行年: 58(4): 765-767, 1994
- 2) 題 目 : Bioluminescent enzyme immunoassay with biotinylated firefly luciferase
著 者 名 : Fukuda, S., Tatsumi, H. and Maeda, M.
学術雑誌名 : Journal of Clinical Ligand Assay
巻・号・頁・発行年: 21(4): 358-362, 1998
- 3) 題 目 : Rapid detection of *Staphylococcus aureus* using bioluminescent enzyme immunoassay
著 者 名 : Fukuda, S., Tatsumi, H., Igarashi, H. and Igimi, S.
学術雑誌名 : Letters in Applied Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 31(2): 134-138, 2000
- 4) 題 目 : Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of *Salmonella* in chicken meat samples
著 者 名 : Fukuda, S., Tatsumi, H., Igimi, S. and Yamamoto, S.
学術雑誌名 : Letters in Applied Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 41(5): 379-384, 2005

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Physical mapping of the mitochondrial DNA from *Aspergillus niger*
著 者 名 : Kirimura, K., Fukuda, S., Abe, H., Kanayama, S. and Usami, S.
学術雑誌名 : FEMS Microbiology Letters
巻・号・頁・発行年 : 90(3): 235-238, 1992
- 2) 題 目 : Construction of biotinylated firefly luciferases using biotin acceptor peptides
著 者 名 : Tatsumi, H., Fukuda, S., Kikuchi, M. and Koyama, Y.
学術雑誌名 : Analytical Biochemistry
巻・号・頁・発行年 : 243(1): 176-180, 1996

- 3) 題 目 : 抗プロテイン A 鶏卵抗体を用いた黄色ブドウ球菌の簡易検出法
著 者 名 : 長原 歩, 福田 賢, 菊地 護, 五十君静信, 五十嵐英夫
学術雑誌名 食品衛生学雑誌
巻・号・頁・発行年 : 39(5): 318-323, 1998
- 4) 題 目 : Development of a rapid positive/absent test for coliforms using
sensitive bioluminescence assay
著 者 名 : Masuda-Nishimura, I., Fukuda, S., Sano, A., Kasai, K. and
Tatsumi, H.
学術雑誌名 : Letters in Applied Microbiology
巻・号・頁・発行年 : 30(2): 130-135, 2000
- 5) 題 目 : Evaluation of a 24-hour bioluminescent enzyme immunoassay for
the rapid detection of *Salmonella* in chicken carcass rinses
著 者 名 : Valdivieso-Garcia, A., Desruisseau, A., Riche, E., Fukuda, S. and
Tatsumi, H.
学術雑誌名 : Journal of Food Protection
巻・号・頁・発行年 : 66(11): 1996-2004, 2003

その他の論文

- 1) 題 目 : Cloning and restriction mapping of the mitochondrial DNA form
Aspergillus niger
著 者 名 : Fukuda, S., Kirimura, K., Iwata, K., Sarangbin, S., Kanayama, S.
and Usami, S.
学術雑誌名 : Bulletin of Science and Engineering Research Laboratory, Waseda
University
巻・号・頁・発行年 : 138: 10-15, 1992
- 2) 題 目 : Comparison of HPLC and ELISA methods in the detection of
fumonisins
著 者 名 : Fukuda, S., Nagahara, A., Kikuchi, M. and Kumagai, M.
学術雑誌名 : Mycotoxins
巻・号・頁・発行年 : 39: 19-22, 1994