

博士学位論文内容の要旨

学位申請者氏名

山崎 朋美

論文題目

Multicomponent analysis by surface plasmon resonance- based immunosensor for control of food hygiene
(食品衛生管理へ向けた表面プラズモン共鳴イムノセンサーによる多成分解析法の開発)

論文審査担当者

主査	八田 一	Ⓔ
審査委員	川添 禎浩	Ⓔ
審査委員	成田 宏史	Ⓔ

表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance) を利用したイムノセンサー (SPR イムノセンサー) は、標識せずに抗原抗体反応を計測できる免疫化学的測定法であり、迅速な多成分分析を可能にすることから近年注目されている。本研究は、残留農薬と腸管出血性大腸菌を分析対象に SPR イムノセンサーを開発し、さらにこの技術を動物細胞の表面タンパク質の検出に応用したものであり、今後の食品衛生や細胞表面因子の研究に貢献できる技術として期待されている。以下にその研究を要約する。

第1章 3 農薬の同時分析

アニリド系殺菌剤ボスカリド (2005 年登録)、ネオニコチノイド系殺虫剤クロチアニジン (2002 年登録) とニテンピラム (1995 年登録) は、いずれも国内で汎用されている代表的な農薬である。また、殺菌剤と殺虫剤は農作物へ同時に使用されることが多いため、これらの同時分析方法が求められてきた。しかし、これまで開発されてきた直接競合 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) は単成分分析法であり、適用できなかった。そこで、各々の農薬に対するモノクローナル抗体を用いて、これら 3 種類の農薬を同時に測定できるマイクロ流路型の SPR イムノセンサーを開発した。使用したセンサーチップには、独立した流路が 4 本ある。その 1 本ずつに、各農薬の誘導体と牛血清アルブミン (BSA) の結合体を固相し、残りの流路にコントロールとして BSA を固相し、SPR 装置に装着した。各農薬に対するモノクローナル抗体と各農薬の標準液を全て混合して反応させ、その反応液を SPR 装置に注入して測定した結果、ボスカリドは 15~93 ng/mL、クロチアニジンは 6.7~27 ng/mL、ニテンピラムは 7.3~62 ng/mL の範囲で特異的に各農薬を測定できた。野菜に添加した農薬は 72~105% の添加回収率で測定でき、直接競合 ELISA とも高い相関性を示した。本測定法は、実用的な残留農薬分析法であることが確認できた。

第2章 腸管出血性大腸菌 O 抗原(10 種類)の同時型別

腸管出血性大腸菌は、O 抗原の型別により迅速検査が行われている。現在、検査されている O 抗原は、O26、O103、O111、O121、O145、O157 の 6 種類であり、9 割以上の腸管出血性大腸菌がカバーされる。しかし、他の O 抗原の感染報告も多数あることから、より多種類の O 抗原を同時に型別できる方法が求められていた。そこで、前述の 6 種類に加えて腸管出血性大腸菌としての報告がある O91、O115、O128、O159 の合計 10 種類の抗原型を同時に型別できるマイクロアレイ型の SPR イムノセンサーを開発した。まず、10 種類の O 抗原に対する市販ウサギ抗血清から抗体を精製し、センサーチップ表面の異なる位置に固相して SPR 装置に装着した。そこに、腸管出血性大腸菌の各菌株の懸濁液をインジェクションすると、その O 抗原をいずれも 1 分以内に型別できた。さらに、ゼラチンゲルを用いて、これまで困難であったセンサーチップの再生（固相抗体の反応性を損なわずに結合した大腸菌を除去）にも成功し、100 回以上繰り返し使用できた。この結果は、論文発表だけでなく国際特許も出願された。

第3章 開発した大腸菌 O 抗原型別試験法による臨床分離株の試験

第2章で開発した測定法を臨床検査に適用した。試験に用いた O 抗原は、前述の O 抗原に O45 を加えた合計 11 種類である。腸管出血性大腸菌の臨床分離株（188 株）を用いて、従来法であるスライド凝集法と比較した。その結果、SPR イムノセンサーの感度は 98.9%だった。また、菌の検出下限は、 $1.1 \times 10^6 \sim 1.8 \times 10^7$ CFU/ml だった。開発した SPR イムノセンサーは、腸管出血性大腸菌の O 抗原血清型別に有用な方法であると結論づけられた。

第4章 動物細胞表面の膜タンパク質 c-Kit の検出

第2章で開発した測定技術を動物細胞の膜タンパク質 c-Kit の検出に応用した。c-Kit は、チロシンキナーゼ活性をもつ細胞膜受容体で、細胞外で受け取ったシグナルを細胞内シグナルに変換し、細胞の増殖・分化・生存・代謝・移動を制御する。c-Kit は、消化管間質の腫瘍や、セミノーマなどの胚細胞腫瘍、悪性黒色腫、急性骨髄性白血病などで高発現することが知られており、腫瘍マーカーとして重要である。そこで、SPR イムノセンサーを用いて細胞表面に発現した c-Kit の検出方法を開発した。センサーチップ表面に市販の抗 c-Kit 抗体を固相し SPR 装置に装着した。そこに、ヒト巨血芽球性白血病細胞株 (MEG01s) および、ヒト胎児腎細胞株 (HEK293T) の懸濁液をインジェクションした結果、c-Kit を検出できたものの非特異的反応によるバックグラウンドの顕著な上昇が認められた。この抑制条件を探索した結果、ゼラチンを抗体に混合することにより大きく減少できた。また、大腸菌と同様にゼラチンゲルを用いたセンサーチップの再生にも成功し、c-Kit 特異的な動物細胞の連続検出系を構築できた。