九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Development of a Rapid and Simultaneous Detection Method for Multiple Foodborne Pathogens Using Surface Plasmon Resonance Biosensor

張, 暁光

https://hdl.handle.net/2324/1441322

出版情報：九州大学, 2013, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

KYUSHU UNIVERSITY

氏　　名　：張　暁　光

論文題目　：Development of a Rapid and Simultaneous Detection Method for Multiple Foodborne Pathogens Using Surface Plasmon Resonance Biosensor
（表面プラズモン共鳴バイオセンサーによる食中毒細菌の一斉迅速検査法の開発）

区　　分　：甲

論　文　内　容　の　要　旨

食の安全に対する社会的関心は高いが、食中毒事件の発生は毎年後を絶たない。食品の安全な提供、食中毒事件の発生防止および被害の拡大防止のため、食中毒細菌検査技術の向上は重要である。しかし、従来の食品の食中毒細菌検査は増菌および選択培養を行うため、長時間を要する。さらに、検査法も検出対象菌ごとに異なり煩雑であるため、より簡易かつ迅速な検査法の開発が求められている。本研究では、主要な食中毒細菌の簡易迅速な同時検出法の開発を目的とし、*Escherichia coli* 0157:H7（0157）、*Salmonella* Enteritidis（SE）および *Listeria monocytogenes*（LM）の 3 種類の主要食中毒細菌を一斉増菌後、特異抗体固定化チップを装着した表面プラズモン共鳴（SPR）バイオセンサーを用いた同時検出について検討した。

まず、SPR バイオセンサーによる食中毒細菌検出のための検査試料の前処理について詳細に検討した。ビーズ破砕処理、超音波破砕処理、熱ショック処理、浸透圧ショック処理、酵素処理、アルカリ処理および煮沸処理の 7 種類の方法で前処理した 0157 菌懸濁液および未処理 0157 菌懸濁液を市販抗βガラクトシダーゼポリクローナル抗体（菌体内抗原に対する抗体）および抗 *E. coli* 0157 モノクローナル抗体（菌体表面抗原に対する抗体）をそれぞれ固定化したチップを装着した Biacore J（GE Healthcare）に供し、SPR シグナルを比較した。その結果、菌体内抗原および菌体表面抗原ともに超音波破砕試料において最も高いシグナルが得られた。

次に、マルチチャンネル SPR バイオセンサーによる 3 菌種の同時検出条件設定のため、超音波破砕菌体について、市販の各細菌特異的ポリクローナル抗体をそれぞれ固定化したチップおよび Biacore J を用いて検討した。各細菌の超音波破砕処理液を混合したものを試料として測定した結果、各細菌特異的抗体によるシグナル強度は、同じ菌濃度でも他の菌が共存した場合は単独の場合よりも有意に大きかった。この非目的細菌由来物質との交差反応は、超音波破砕処理液の遠心分離沈殿を用いることで抑制され、3 菌種の特異的な検出が可能となった。検出下限は 0157：1.8×10^6 CFU/ml、SE：0.9×10^7 CFU/ml、LM：1.8×10^7 CFU/ml であった。また、各細菌を初発菌数が 1～30 CFU/250 ml となるように一斉増菌培地 Simultaneous Enrichment Broth（SEB）に混合接種して培養 24 時間後にもそれぞれの特異抗体固定化チップを用いて 3 菌種の特異的な検出が可能であった。

これらの結果をもとに、5 チャンネルを有するマルチチャンネル SPR バイオセンサー（九州計測器）のチャンネル毎に異なる細菌特異的な市販ポリクローナル抗体を固定化して 3 菌種の同時検出を行った。純粋培養菌を用いて試験した結果、非目的細菌が 10^8 CFU/ml 共存していても本マルチチャンネル SPR バイオセンサー法により、0157 は 0.6×10^6 CFU/ml、SE は 1.8×10^6 CFU/ml、LM は 0.7×10^7 CFU/ml を検出可能であった。各細菌を 1～30 CFU となるように接種した鶏肉 25 g を SEB 225 ml 中で 37℃、24 時間培養後の培養液からも 3 菌種を同時検出できた。

さらに、より高感度、かつ特異的に同時検出するため、各細菌に対するモノクローナル抗体を作製した。

以上、本研究で開発したマルチチャンネル SPR バイオセンサー法により特異抗体を用いて *E. coli* 0157:H7、 *S.* Enteritidis および *L. monocytogenes* の重要度の高い 3 種類の食中毒細菌を一斉増菌培養後に同時検出できた。本法は、食品、特に畜肉および畜肉製品における食中毒細菌のスクリーニング検査に有効と考えられる。