



LAMP 法による食中毒起因菌の迅速検査 —新しい遺伝子増幅法の原理—

栄研器材株式会社 LAMP 事業部

橋本喜久男

1. はじめに

近年の食品に関わる様々な事件により、食品の品質に対して厳しさが増し、「農場から食卓」まで一貫した安全確保が求められています。食品の製造や加工などに携わる企業では、製品の安全性の管理はもとより、迅速なクレーム対応や素早い工程の修正・改善を行うために検査時間が短縮できる検査法や、検査数の増加に伴う労力の軽減ができる検査法が要望されています。

従来の食品の微生物検査は培養法が基本です。増菌培養・分離培養および確認試験と、結果を得るまでに数日間を要しています。さらに、数々の培地を使用するために多くの労力が必要となっています。

このような状況で従来の培養法に代わる簡易・迅速な微生物検査が各種開発されています¹⁾。なかでも迅速性と検出感度に優れている遺伝子増幅法が食品検査に応用されつつあり、注目される検査法です。今回は栄研化学株式会社が開発した新規遺伝子増幅法である LAMP 法の原理について説明します。

2. 反応原理

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法は現在広く普及している遺伝子増幅法です。段階的に温度をコントロール(2本鎖 DNA の変性(95°C)→プライマーのアニール(50°C付近)→DNA 鎖の伸長(72°C付近))できる装置が必要であり、増幅が終了するまで2~3時間かかり、また増幅産物の確認にはゲル電気泳動等の装置が必要です。PCR 法は広範な分野で用いられる不可欠な技術である反面、装置が高価であり、操作も煩雑で、研究分野での使用に限定されているのが実情です。それに対して、LAMP 法は約 65°Cという等温で行うため操作が簡単にでき、1時間程度で増幅副産物を濁度により測定することができます。以下 LAMP 法原理の詳細を述べます。

LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)法は、合成された1本鎖の DNA の 3' 末端が常にループを形成して次の DNA の合成起点となるように設計されたプライマーと一種類の鎖置換型 DNA 合成酵素を用いることによって、65°Cの一定温度で、DNA を 15分~1時間で $10^9 \sim 10^{10}$ 倍に増幅でき、かつ特異性の高い、新しい遺伝子増幅法です²⁾³⁾。

LAMP 法に用いる特殊なプライマー構造(図 1)と反応機構(図 2、図 3)を簡単に示します。LAMP 法は 6つの領域を含む 4種類のプライマー(図 1)を用いて増幅反応を行います。これら 4種類のプライマーと鎖置換型の DNA 合成酵素、反応基質(デオキシヌクレオチド 3リン酸)、検体(標的遺伝子)を混合して 65°Cで反応させます。2本鎖 DNA は、65°C付近では動的平衡状態にあり、4種類のプライマーのうちいずれかが 2本鎖 DNA の相補的領域にアニールし、伸長することで片側の鎖が剥がされ、1本鎖状態になります(図 2(1))。鎖置換型 DNA 合成酵素を用いるため、こうした一連の反応は、PCR 法のようにあらかじめ 2本鎖 DNA を 1本鎖 DNA に熱変性する過程を必要としません。1本鎖状態になった鋳型に FIP プライマーがアニールし、さらにいくつかの反応ステップ(図 2(2)~(7))を踏んで、FIP、BIP プライマーの構造上の特徴から両方の末端でループをまいたダンベル様構造をした一本鎖 DNA(図 2(8))が生成されます。この構造が LAMP 法

の増殖サイクルの起点構造となります。このダンベル様構造の DNA からは相補的な配列のダンベル様構造(図 3(11))が生成され、さらにこの(図 3(11))から再び(図 3(8))が生成されます(サイクリング反応)。その間に(図 3(9))、(図 3(10))を経て自分自身を鋳型として、お互いに相補的な配列が交互に繰り返した構造の増幅産物 DNA が蓄積します。そしてその過程でまた(図 3(8))、(図 3(11))の構造をもつものが生成してサイクリング反応に加わり、それによって増幅反応が等温で連続的に進みます。

増幅の検出は、DNA の増幅に伴い大量に放出されるピロリン酸が反応液中のマグネシウムと結合して白濁することを増幅の指標とし⁴⁾、LAMP 法専用の Loopamp リアルタイム濁度測定装置にて測定します。

栄研化学(株)のホームページ(<http://loopamp.eiken.co.jp>)には反応機構をよりご理解いただくために LAMP 法の反応機構のアニメーションを掲載していますのでご参照ください。

3. おわりに

簡易・迅速・精確・安価という特徴を持つ LAMP 法は、直接遺伝子を検査する分野および標的とした遺伝子を検出することで多様な分野に応用できる技術です。

本原理を利用した食品環境分野の検査試薬は、弊社より「Loopamp サルモネラ検出試薬キット」(写真 1)、「Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット」、「Loopamp ペロ毒素(VT)タイピング試薬キット」の3品目の食中毒起因菌検出試薬キットを、栄研化学株式会社より環境水中のレジオネラ属菌を検出する「Loopamp レジオネラ検出試薬キットE」を販売しています。

参考文献

- 1)伊藤武監修,食品微生物の簡便迅速測定法はここまで変わった!,(株)サイエンスフォーラム,東京,2002
- 2)Notomi, T. et al., Nucleic Acids Res., 28, e63, 2000
- 3)納富継宣ほか, BIO INDUSTRY 18(2) 15-23, 2001
- 4)Mori, Y. et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 289, 150-154, 2001



写真1 Loopamp サルモネラ検出試薬キット

図1 LAMPプライマー設計

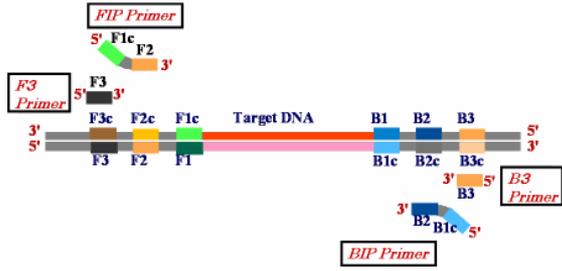


図2 LAMP 進行過程(増幅サイクル起点構造の構築)

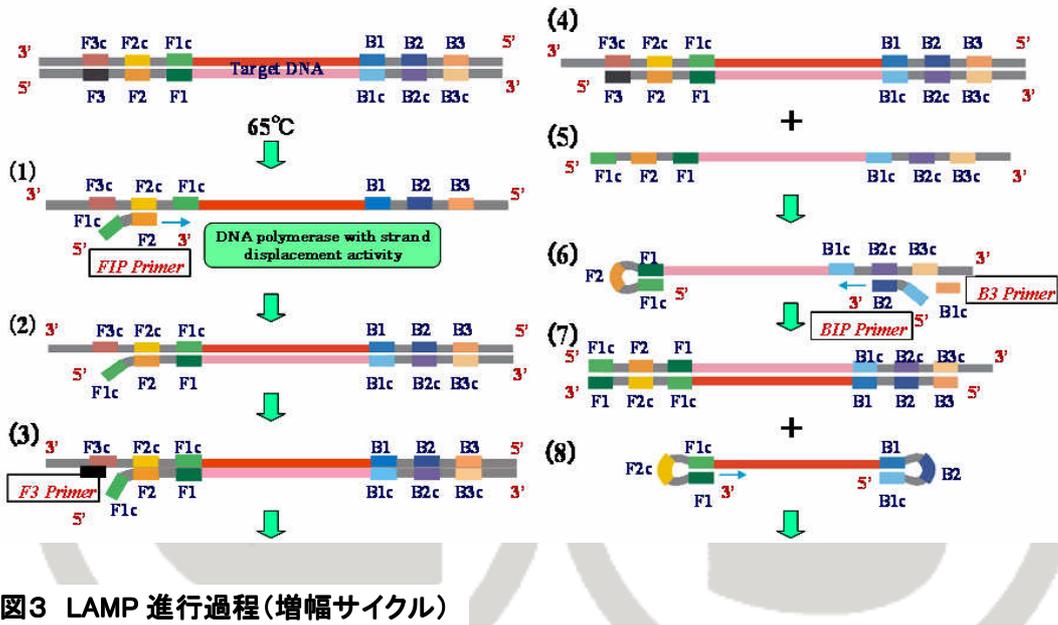


図3 LAMP 進行過程(増幅サイクル)

