



## LAMP 法による食中毒起因菌の迅速検査 —Loopamp サルモネラ検出試薬キット—

栄研器材株式会社 営業管理本部

石塚康男

### 1. はじめに

新規遺伝子増幅法である LAMP 法を用いた食中毒起因菌検出試薬キットは、高い検出感度と、検査日数の短縮を可能にするとともに、検査に関連する作業の軽減など、現状の課題解決に有効な方法です。esNo.037 では、LAMP 法の原理についてご紹介いたしました。

今回は、LAMP 法を用いた Loopamp サルモネラ検出試薬キット(写真 1)についてご紹介いたします。



写真1 Loopamp サルモネラ検出試薬キット

### 2. Loopamp サルモネラ検出試薬キット

本キットは、サルモネラ属菌が特異的に保持している侵入性関連因子 *invA* 遺伝子<sup>1)</sup>の核酸配列を認識するプライマーを用い、その増幅反応からサルモネラ属菌の有無を判定します。

本キットは、反応チューブに試薬を分注し、増菌培養液を入れ、専用測定装置にセットすればパソコンのモニター上に増幅グラフが表示され、1 時間で判定するといった、いたって簡単な操作で検査を行うことができます。

### 3. 操作法

#### 3.1 増菌培養

食品中のサルモネラ属菌の汚染菌量は極めて少なく、また少数の菌数で発症する場合があるので、食材から検出するには増菌培養が必要です。

検体 25g に緩衝ペプトン水 225mL を加えてスタマッカーでホモジナイズし、36.0°C±1.0°Cで 20~24 時間培養します。(図1)



図1 増菌培養

#### 3.2 検体の前処理(サンプル溶液の調製)

菌体から遺伝子を抽出するために検体前処理用滅菌チューブに増菌培養液と食品用抽出溶液である Extraction Solution for Foods を混合します。(図2)その後、加熱(95°C, 5分間)処理(図3)し、室温で1分間遠心してサンプル溶液とします。サンプル溶液は、氷上にて保管し4時間保存可能です。



図2 検体の前処理  
(サンプル溶液の調製)



図3 95°C・5分間加熱処理

### 3.3 マスターミックスの調製

氷上にて、キット中の Reaction Mix と *Bst* DNA Polymerase を混合して、マスターミックスとします。Reaction Mix の主な組成はプライマー、デオキシヌクレオチド3リン酸(反応基質)および塩類で、遺伝子増幅反応に必要な材料となる物質が含まれています。

*Bst* DNA Polymerase は、鎖置換型 DNA 合成酵素で、DNA 合成が伸長していった先に 2 本鎖 DNA が存在しても剥がしながら DNA 合成を伸長させる性質があります(図4)。



図4 マスターミックスの調製

### 3.4 サンプル溶液の添加

氷上にて、専用の反応チューブにマスターミックス 20  $\mu$ L を分注し、これに前処理したサンプル溶液 5  $\mu$ L を加えて全量 25  $\mu$ L の反応液とします。なお、陽性コントロールとして、Control DNA 5  $\mu$ L、陰性コントロールとして Extraction Solution for Foods 5  $\mu$ L をサンプル溶液の代わりに添加します。(図5)



図5 サンプル溶液の添加

### 3.5 LAMP反応

測定は Loopamp リアルタイム濁度測定装置(写真2)で行います。65°C、1時間反応させて、付属のパソコン画面上で濁度の上昇の有無を確認します。

グラフ画面で反応時間内(1時間)に濁度上昇した場合を「陽性」、濁度上昇が見られない場合を「陰性」とします。陽性コントロールの濁度が上昇し、陰性コントロールの濁度が上昇しなければ LAMP 反応は正常に進行しています。また、判定を補助する目的で判定用ソフトもインストールされています。一定間隔の濁度増加値を経過時間ごとにプロットし(判定グラフ)、それを条件設定した判定値によって自動的に判定を行い、結果グラフ画面に濁度の最大値(青)と判定結果(陽性:赤、陰性:緑)が表示されます。(図6)



写真2 Loopamp リアルタイム濁度測定装置(LA-320C)

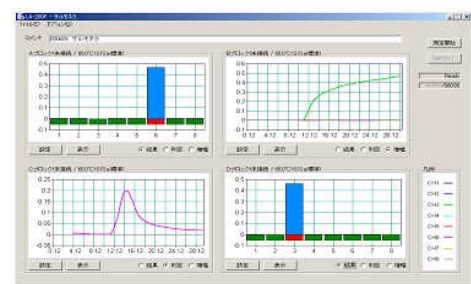


図6 リアルタイム濁度測定装置 LA-320C 測定画面

## 4. 試薬性能

### 4.1 検出感度

培養サルモネラ希釈菌液を操作法に従ってサンプル溶液調製後、LAMP 反応に供試した結果、60 colony forming unit(cfu)/test まで検出することができました。

この時の O.D. 値の立ち上がりは 30 分以内に認められ、反応は極めて迅速でした<sup>2)</sup>。

### 4.2 特異性試験

サルモネラ属菌の保存株 225 株およびサルモネラ属菌以外の保存株 79 株を対象にして LAMP 反応を試みたところ、サルモネラ属菌だけが陽性判定で、特異性に優れていました<sup>2,3)</sup>。

(表1, 2)

### 4.3 培養法との比較

市販の卵、魚肉すり身、牛乳、貝割れ大根に培養サルモネラ希釈菌液を接種し、本キットと培養法とを比較しました。LAMP法は一夜増菌培養した培養液をサンプルとし、試験開始から2日目で測定しました。従来の培養法は前増菌培養し、選択増菌培養後、分離平板培地で培養し、試験開始から4日目で判定しました。両方法とも各検体中に10cfu/25g程度存在すれば検出することができました。

表1 サルモネラ検出試薬キットの特異性:サルモネラ属菌

血清型	菌株数	LAMP判定	血清型	菌株数	LAMP判定
<i>Salmonella</i> Agona	1	+	<i>Salmonella</i> Isangi	1	+
<i>Salmonella</i> Albany(Dusseldorf)	2	+	<i>Salmonella</i> Java	1	+
<i>Salmonella</i> Anatum	2	+	<i>Salmonella</i> Kivu	5	+
<i>Salmonella</i> Arizonae	7	+	<i>Salmonella</i> Montevideo	1	+
<i>Salmonella</i> Blockley	9	+	<i>Salmonella</i> Newport	1	+
<i>Salmonella</i> Braenderup	10	+	<i>Salmonella</i> Nyborg	1	+
<i>Salmonella</i> Bredeney	2	+	<i>Salmonella</i> Obogu	1	+
<i>Salmonella</i> Cerro	1	+	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	11	+
<i>Salmonella</i> Choleraesuis	6	+	<i>Salmonella</i> Paratyphi B	6	+
<i>Salmonella</i> Cremieu	1	+	<i>Salmonella</i> Pollorum	1	+
<i>Salmonella</i> Crvaris	4	+	<i>Salmonella</i> Postdam	1	+
<i>Salmonella</i> Derby	1	+	<i>Salmonella</i> Pullorum	5	+
<i>Salmonella</i> Dubrin	5	+	<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	3	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis	38	+	<i>Salmonella</i> Senftenberg	4	+
<i>Salmonella</i> Epping	1	+	<i>Salmonella</i> Tennessee	3	+
<i>Salmonella</i> Funnik	1	+	<i>Salmonella</i> Thompson	5	+
<i>Salmonella</i> Gallinarum	1	+	<i>Salmonella</i> Typhi	44	+
<i>Salmonella</i> Give	2	+	<i>Salmonella</i> Typhimurium	15	+
<i>Salmonella</i> Haardt	2	+	<i>Salmonella</i> Virchow	3	+
<i>Salmonella</i> Heidelberg	2	+	<i>Salmonella</i> Wassenaar	1	+
<i>Salmonella</i> Infantis	15	+			
合 計			225		

表2 サルモネラ検出試薬キットの特異性:非サルモネラ属菌

血清型	菌株数	LAMP判定	血清型	菌株数	LAMP判定
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	1	-	<i>Proteus vulgaris</i>	3	-
<i>Citrobacter freundii</i>	6	-	<i>Proteus mirabilis</i>	3	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	3	-	<i>Providencia stuartii</i>	1	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	-	<i>Providencia alcalifaciens</i>	2	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	-	<i>Providencia rettgeri</i>	2	-
<i>Escherichia coli</i>	12	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	-
<i>Hafnia alvei</i>	2	-	<i>Serratia marcescens</i>	4	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	-	<i>Shigella sonnei</i>	1	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	2	-
<i>Legionella pneumophila</i>	7	-	<i>Shigella boydii</i>	1	-
<i>Legionella</i> sp.	6	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	-
<i>Morganella morganii</i>	3	-			
合 計			79		

### 参考文献

- 1) Galan, J.E. *et al.*, J. Bacteriol. 174, 4338-49, 1992.
- 2) Yoshino, M. *et al.*, American Society for Microbiology The 103rd General Meeting, 2003.
- 3) 小島禎ほか: (社)日本食品衛生学会総会・第85回学術講演会, 2003.