



LAMP 法による食中毒起因菌の迅速検査
—Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット—
栄研器材株式会社 営業管理部 **石塚康男**

はじめに

新規遺伝子増幅法である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を用いた食中毒起因菌検出試薬キットは、高い検査精度と、検査日数の短縮を可能にするとともに、検査に関する作業の軽減など、現状の課題を解決することができます。

LAMP 法の反応原理につきましては、es 季刊誌 No.037 で、Loopamp サルモネラ検出キットと LAMP 法操作の概要は、es 季刊誌 No.039 で紹介しました。

今回は Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットの概要と食材を用いた測定例を紹介いたします。また、食材の種類が LAMP 反応に及ぼす影響について Loopamp サルモネラ検出試薬キットも含めて検討した結果を紹介いたします。

1. Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット

1-1 標的遺伝子

腸管出血性大腸菌が保持しているペロ毒素 (Verotoxin: VT) 遺伝子の核酸配列を認識するプライマーを用い、その増幅反応から腸管出血性大腸菌の有無を判定します。

1-2 検出感度

VT 産生大腸菌の培養希釈菌液を操作法に従ってサンプル溶液の調製後、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す¹⁾。

1-3 特異性試験

腸管出血性大腸菌の保存株 71 株、腸管出血性大腸菌以外の大腸菌 78 株および大腸菌以外の細菌 65 株を対象にして LAMP 反応を試みたところ、VT1 と VT2 の区別なく全ての腸管出血性大腸菌だけが LAMP 反応陽性でした¹⁾。

1-4 培養法との比較

市販の卵、牛乳、貝割れ大根に各濃度の腸管出血性大腸菌を接種し、本キットと従来の培養法の両方で検査し、結果を比較しました。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後、分離平板培地で培養し、試験開始から 3 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)。

2. 食材による LAMP 反応の影響

食材は肉類、乳製品、卵、野菜類を対象として、増菌培養を行い、サルモネラ培養菌液または VT 産生大腸菌培養液を各食材懸濁液に添加して、Loopamp サルモネラ検出試薬キットまたは L

oopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キットの操作法に従って LAMP 反応を行いました。

その結果、殆どの食材試料では、30分以内に LAMP 特異的な増幅反応を示し、カット野菜では 60cfu/test の感度を示しました(図-1)。牛乳懸濁液は濁りが認められますが、検体処理段階で濁りが軽減され、60cfu/test の感度を示しました(図-2)。また、卵は、他の食材と比較して O.D.値が低いものの LAMP 反応を問題なく確認することができました(図-3)。

しかし、乳製品である生クリーム、プロセスチーズは、食材の濁りが濁度測定に影響すること、牛レバー成分に LAMP 反応を妨害する物質があることが分かりました。これらの食材の LAMP 反応への影響を避けるため、試薬処方を改良中です。

3. おわりに

LAMP 法は遺伝子増幅を用いた検査ということで、手技が難しいと考えられがちですが、Loopamp 試薬キットは反応チューブに試薬を分注し、サンプル溶液を入れ混合後、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時間で判定ができます。

食品の微生物検査にも遺伝子検査法を応用することにより、迅速な検査が実現でき、食品の安全管理に貢献できるものと考えます。

参考文献

- 1) Nemoto, J. et al., American Society for Microbiology The 103 rd General Meeting(2003)

表-1 LAMP 法と培養法の比較

市販食材	VT産生大腸菌 添加量 (cfu/25g)	LAMP法*1	培養法*2
鶏卵	0	-	-
	6.0×10 ⁰	+	+
	6.0×10 ¹	+	+
	6.0×10 ²	+	+
牛乳	0	-	-
	6.0×10 ⁰	+	+
	6.0×10 ¹	+	+
	6.0×10 ²	+	+
貝割れ大根	0	-	-
	6.0×10 ⁰	+	+
	6.0×10 ¹	+	+
	6.0×10 ²	+	+

*1: 増菌培養(ノボジオシン加mEC)→LAMP法

*2: 増菌培養(ノボジオシン加mEC)→分離平板培地(CT-ソルビットマッコンギー寒天培地)

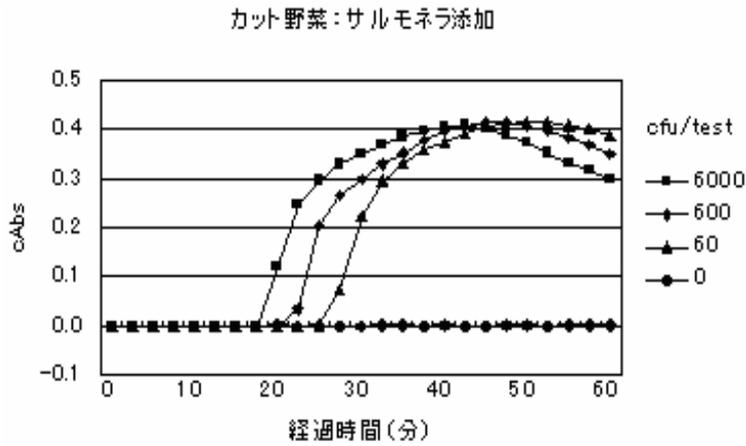


図-1 サルモネラ検出試薬増幅グラフ

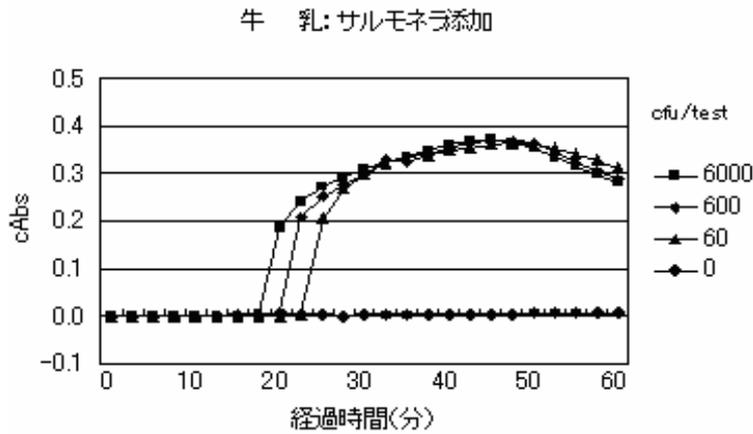


図-2 サルモネラ検出試薬増幅グラフ

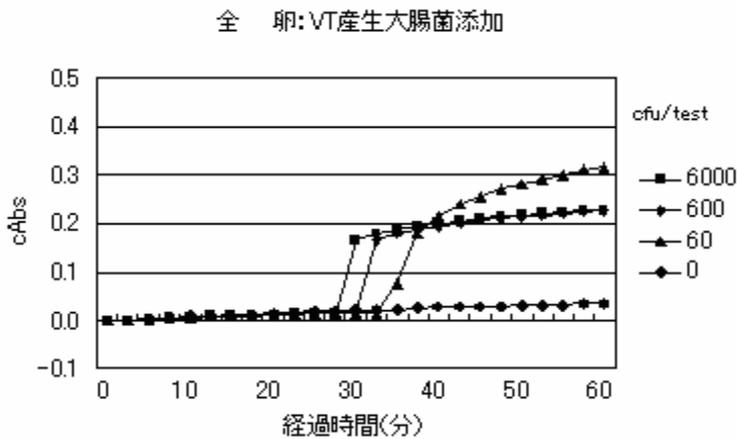


図-3 腸管出血性大腸菌検出試薬増幅グラフ