



LAMP法による食中毒起因菌の迅速検査 — Loopamp® *L.monocytogenes* 検出試薬キット —

栄研化学株式会社 マーケティング統括部 上野 潤二

「es」とは、栄研：Eikenグループがお届けする、環境：Environment 衛生：Sanitationを主体とした微生物検査：Examinationの葉(しおり)です。

環境微生物検査 始めませんか？

環境微生物検査は・・・手間がかかる・難しい、大掛かりな設備がないとできない、
すばやくコストがかかる・・・と思いませんか？

FPセットⅡ



セット内容 (100検体用)

FPセットⅡ AC…………… PL2000

- ふきふきチェックⅡ
- ペトリフィルム™ AC (一般生菌数測定用)
- スプレッター

FPセットⅡ CC…………… PL2100

- ふきふきチェックⅡ
- ペトリフィルム™ CC (大腸菌群数測定用)
- スプレッター

簡単・手軽

一般生菌数測定用
大腸菌群数測定用 **1検体あたり約225円**



栄研器材株式会社

〒114-0002 東京都北区王子5-26-21
TEL 03-3927-5191 FAX 03-3927-5184
栄研器材(株)ホームページ <http://www.eikenkizai.co.jp/>

1. はじめに

es季刊誌では、これまで遺伝子増幅法であるLAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法の反応原理、LAMP法の原理を応用した各種食中毒起因菌検出試薬キット、およびその操作法の概要について紹介してきました(No.037、039、040、042)。今回は、LAMP法を利用した *Listeria monocytogenes* (以下、*L.monocytogenes*) 検出用のキットである「Loopamp® *L.monocytogenes* 検出試薬キット」(販売元：富士通システムソリューションズが運営するサイト e Genome Order (<http://genome.e-mp.jp/>)) の概要と性能について紹介します。

2. キットの概要

「Loopamp® *L.monocytogenes* 検出試薬キット」は、*L.monocytogenes* の保持する侵入性関連遺伝子*iap*の核酸配列を認識するLAMP用プライマーを用いて核酸の増幅反応を行い、その増幅の有無から特異的に*L.monocytogenes*を検出します。

他の食中毒起因菌検出キットと同様に、専用の「Loopamp®リアルタイム濁度測定装置」を用いることにより、検出に電気泳動を必要とせず、核酸の増幅反応から検出までを同一反応チューブ内で行うことが可能で、食品検体を増菌培養後、簡易な操作で*L.monocytogenes*を検出することができます。

3. キットの使用方法

「Loopamp® *L.monocytogenes* 検出試薬キット」を用いた検査の手順は、図1の通りです。

本キットでは検体として、食品または環境由来検体を half-Fraser培地、UVM培地またはEB培地と混合し、ストマッカー処理後、30℃で24時間培養した前増菌培養液を使用します。前増菌培養液を遠心、上清を吸引後、キット内のDNA抽出液である Extraction Solution for Foods (EX F) および1M Tris-HCl (pH7.0) を用いてサンプル溶液を調製します。一方、キット内の残りの試薬のうち、Reaction Mix. Lis 20μL (RM Lis)、*Bst* DNA Polymerase 1μLを、それぞれ必要なテス

ト数分、滅菌チューブに分注し、マスターミックスを調製します。

次に、Loopamp®反応チューブにマスターミックス20μLを分注し、サンプル溶液5μLを添加して全量を25μLとします。また、コントロール反応用として、サンプル溶液の代わりに陽性コントロールにはPositive Control Lis 5μLを、陰性コントロールにはEX F 5μLを用います。

混合後、Loopamp®リアルタイム濁度測定装置にセットし、65℃で60分LAMP反応させ、濁度の上昇を確認することにより、簡単に*L.monocytogenes*の有無を判定することができます。

4. キットの性能

1) 特異性

当社保存の *Listeria* 属54株の発育コロニーを滅菌生理食塩水に懸濁し、菌濃度をマクファーランド1.0に調整し、その希釈菌液を95℃、5分間熱処理した後に検体として用いました。

L.monocytogenes 39株は60CFU/testで試験した結果、すべての株でLAMP反応を認めました。一方、*L.monocytogenes*と遺伝的に相同性が高い *L.innocua* などを含む *Listeria* 属5菌種15株について60,000CFU/test相当以上で試験しましたが、いずれもLAMP反応は認められませんでした(表1)。

表2は *Listeria* 属以外の食中毒原因菌、腸内細菌など58菌種113株との反応性を試験した結果です。培養菌体から市販DNA抽出キットを用いて精製したgenomic DNAを用い、それ

ぞれ60,000CFU/test相当以上となる過剰量を添加し検討しました。その結果、試験したすべての株でLAMP反応が認められず、本キットは *L.monocytogenes* に対し高い特異性を持っていることがわかりました。

2) 感度

図2は、LAMP法およびプライマーの異なる2種類のPCR法により、*L.monocytogenes*の生菌を鋳型として用いて行った感度試験の結果です。PCR法では電気泳動により検出を行いました。その結果、MonoA/B *iap* PCRでは6,000CFU/testまで、MFLP-78 *hly* PCRでは60CFU/testまで検出できました。それに対し、LAMP法では6CFU/testを40分以内に検出でき、今回のPCR法の結果と比べ、感度、迅速性共に優れた結果でした。

5. 培養法とLAMP法

現在、*L.monocytogenes*の食材からの標準的な検査法は分離培養法です。図3では、培養法とLAMP法による食品および飼料からの *L.monocytogenes* 検出手順の一例を示しています。培養法ではまず、検体を half Fraser培地と1:9となるように混合し、30℃、24時間培養後、さらにその培養液を Fraser培地に接種し、35~37℃、48時間培養します。さらに、Oxford 寒天培地およびPALCAM寒天培地に塗抹し、培養します。ここで疑わしい集落を採取し、分離株を同定します。そのため、最終的な判定まで5~6日

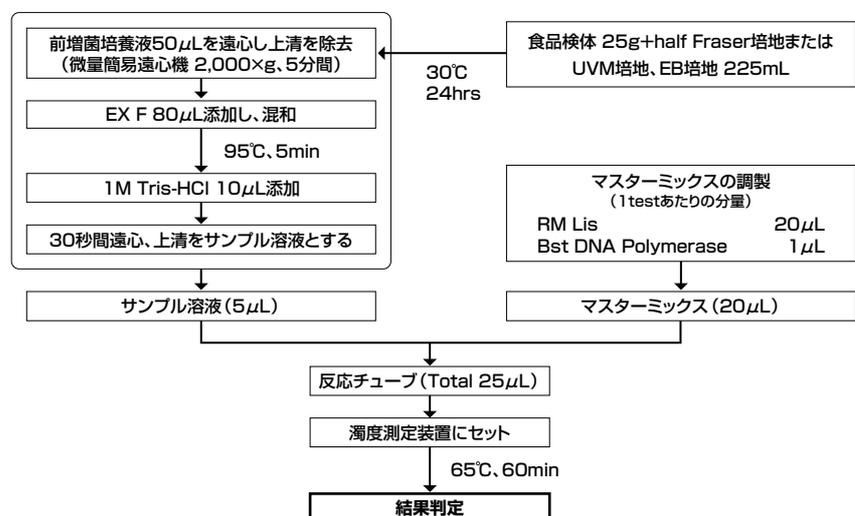


図1 Loopamp® *L.monocytogenes* 検出試薬キットの測定手順

表1 特異性試験 (*Listeria* 属)

Strains	Serotype	No. of strains tested	LAMP
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a	8	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2b	7	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2c	6	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	3a	4	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	3b	1	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	4a	1	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	4b	6	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	4c	1	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	4d	1	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	4e	1	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	unknown	3	+
(Total)		(39)	
<i>Listeria innocua</i>		6	-
<i>Listeria ivanovii</i>		3	-
<i>Listeria grayi</i>		3	-
<i>Listeria seeligeri</i>		1	-
<i>Listeria welshimeri</i>		2	-
(Total)		(15)	

表2 特異性試験 (*Listeria* 属以外)

Strains	Serotype	No. of strains tested	LAMP
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	1/2a	1	-
<i>Citrobacter freundii</i>	1/2b	6	-
<i>Coxiella burnetii</i>	1/2c	1	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	3a	3	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3b	3	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	4a	2	-
<i>Escherichia coli</i>	4b	9	-
<i>Escherichia coli</i> (VT1)	4c	1	-
<i>Escherichia coli</i> (VT2)	4d	1	-
<i>Escherichia coli</i> (VT1/2)	4e	1	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	unknown	1	-
<i>Hafnia alvei</i>		2	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>		3	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		6	-
<i>Legionella pneumophila</i>		7	-
<i>Legionella bozemanii</i>		1	-
<i>Legionella micdadei</i>		1	-
<i>Legionella dumoffii</i>		2	-
<i>Legionella gormanii</i>		1	-
<i>Legionella longbeachae</i>		1	-
<i>Morganella morganii</i>		3	-
<i>Proteus vulgaris</i>		3	-
<i>Proteus mirabilis</i>		3	-
<i>Providencia stuartii</i>		1	-
<i>Providencia alcalifaciens</i>		2	-
<i>Providencia rettgeri</i>		2	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		2	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		1	-
<i>Salmonella</i> Paratyphi A		1	-
<i>Salmonella</i> Typhi		1	-
<i>Salmonella</i> Typhimurium		1	-
<i>Salmonella</i> Enteritidis		1	-

Strains	No. of strains tested	LAMP
<i>Serratia marcescens</i>	4	-
<i>Shigella sonnei</i>	1	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	-
<i>Shigella boydii</i>	1	-
<i>Vibrio tryptogenes</i>	1	-
<i>Vibrio cholerae</i> (NAG)	2	-
<i>Vibrio cholerae</i>	2	-
<i>Vibrio fluvialis</i>	2	-
<i>Vibrio metschnikovii</i>	1	-
<i>Vibrio mimicus</i>	2	-
<i>Vibrio hollisae</i>	1	-
<i>Vibrio damsela</i>	1	-
<i>Vibrio furnissii</i>	1	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	-
<i>Vibrio alginolyticus-like</i>	1	-
<i>Vibrio alginolyticus</i>	1	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2	-
<i>Bacillus subtilis</i>	1	-
<i>Bacillus megaterium</i>	1	-
<i>Bacillus pumilus</i>	1	-
<i>Bacillus cereus</i>	1	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> Va	1	-
<i>Lactobacillus fermentum</i> IV	1	-
<i>Lactobacillus casei</i>	1	-
<i>Lactococcus lactis</i>	1	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	-
(Total)	(113)	

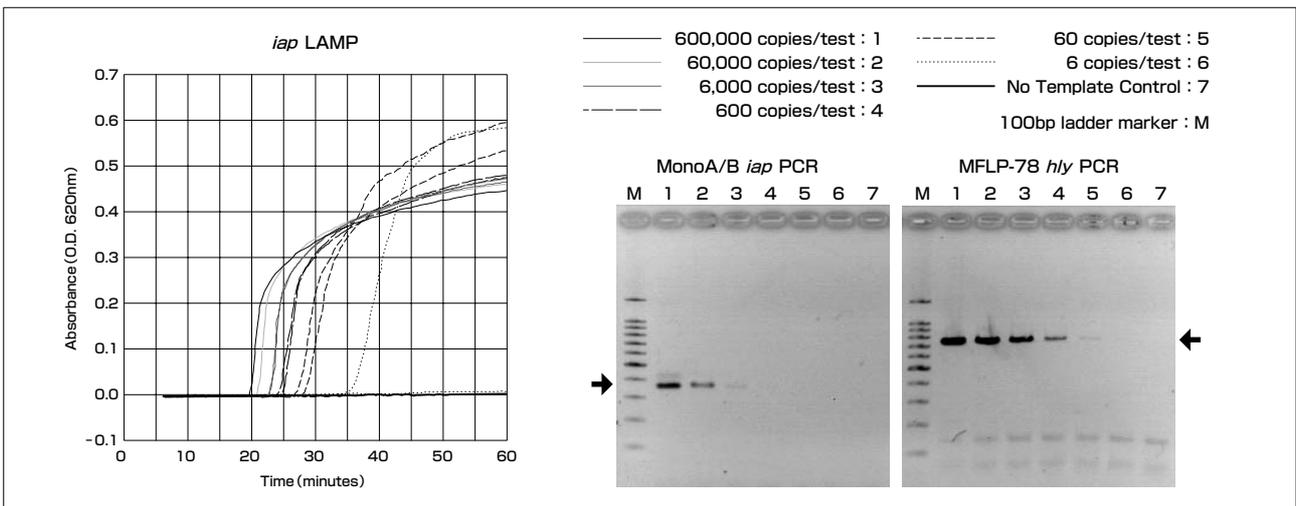


図2 感度試験 (*L.monocytogenes* 4b)

の日数が必要となります。

それに対しLAMP法では、培養法における前増菌培養液を簡易な抽出法で処理することによって、食材中の*L.monocytogenes*をわずか2日以内に検出することができます。

6. 食材の反応への影響

リステリアは輸入チーズや市販の食肉、魚介類等から一定の頻度で検出されることが知られています。これらを検出する際の食材の影響を確

認する目的で、スパイク試験を行いました。図4では、カマンベールチーズ、鶏もも肉、生ハムに対する菌接種の検出結果を示していますが、いずれも60CFU/testの添加で、60分以内に検出することができました。



図3 食品および飼料からの*L.monocytogenes* 検出手順の一例：培養法とLAMP法

7. おわりに

「Loopamp® *L.monocytogenes* 検出試薬キット」は、LAMP法を用いた食中毒起菌菌検出キットシリーズの一つです。既に市販されている他のキットと同様に、培養開始の翌日には簡単な操作で、特異的かつ高感度に*L.monocytogenes*を検出することができます。他のキットと合わせて利用することにより、食品の安全管理に大いに貢献できるものと期待されます。

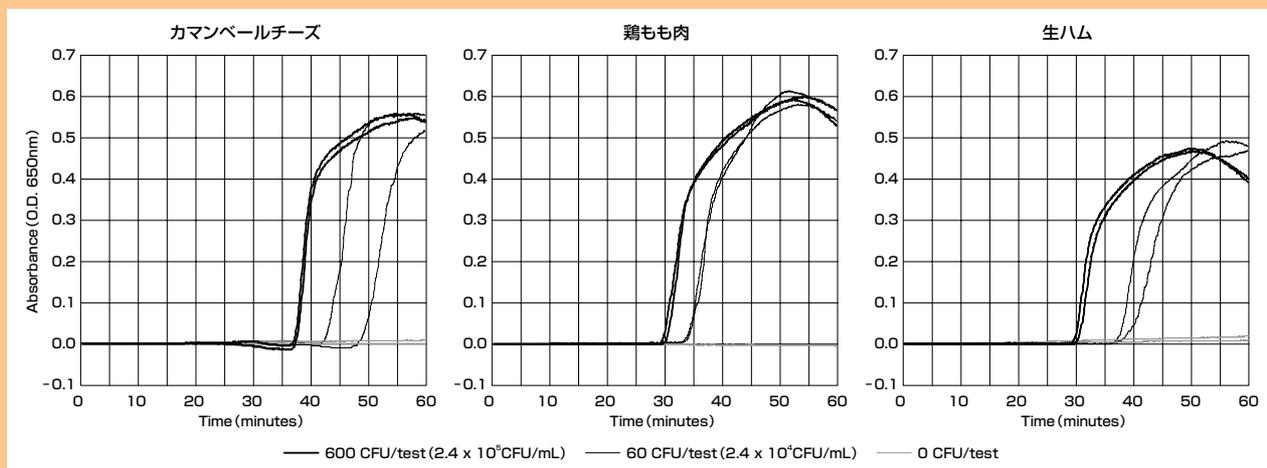


図4 食材の反応への影響

es information

学会・講習会・展示会 2006年7月～12月

名称	会期	会場	問い合わせ先	備考
2006分析展	8/30～9/1	千葉県： 幕張メッセ	(社)日本分析機器工業会 Tel：03-3292-0642	
第27回日本食品微生物学会学術総会	9/21～9/22	大阪府： 大阪府立大学	大阪府立大学大学院生命環境科学研究科感染症 制御学講座獣医感染症学教室 第27回日本食品微生物学会学術総会事務局 Tel：072-255-5078	弊社出展予定
2006東京国際包装展	10/3～7	東京都： 東京ビッグサイト	2006東京国際包装展事務局 Tel：03-3543-1189	
食品開発展2006	10/4～6	東京都： 東京ビッグサイト	食品開発展事務局 Tel：03-5296-1017	弊社出展予定
第92回日本食品衛生学会学術講演会	10/26～10/27	愛知県：中部大学 春日井キャンパス	中部大学応用微生物学部内 第92回学術講演会事務局 Tel：0568-51-6295	

会期・会場等は変更されることがあります。参加される際は必ずご確認ください。

無断複写・無断転載を禁じます

前号No.042のお詫びと訂正

表1 特異性試験(*Campylobacter*属)の菌名の一部に誤りがありました。ご関係者ならびに読者の方々にご迷惑をおかけしました事をお詫びし、ここに訂正させていただきます。

(誤) (正)

Achromobacter xylosoxidans

C.jejuni

「es」NO.043 (2006年7月発行)

●監修／森地敏樹 ●発行／栄研グループ (栄研器材株式会社・栄研化学株式会社) 栄研器材(株) ホームページ <http://www.eikenkizai.co.jp/>

●編集／栄研器材株式会社 es事務局 〒114-0002東京都北区王子5-26-21 Tel03-3927-6495 Fax03-3927-5210 kz_es@kizai.eiken.co.jp