

腸管感染症における LAMP 法の応用

Detection and identification of enteropathogenic bacteria by LAMP method

松下 秀¹⁾ : 加藤 玲¹⁾
Shigeru MATSUSHITA : Rei KATOH

尾形 和恵¹⁾ : 倉園 貴至²⁾
Kazue OGATA : Takayuki KURAZONO

はじめに

わが国で開発された新規遺伝子増幅法である Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法¹⁾を測定原理として、栄研化学より「Loopamp SARS コロナウイルス検出試薬キット」が市販され、世界的に注目されている SARS (重症急性呼吸器症候群) 診断の補助、ならびに検疫所、衛生研究所、医療機関等での本症に対する水際防御、感染拡大阻止に役立つものと大きな期待が寄せられている²⁾。また、同じく LAMP 法による腸管感染症起因菌の食品・環境からの検出キットとして、現在のところ「Loopamp サルモネラ検出試薬キット」, 「Loopamp 腸管出血性大腸菌検出試薬キット」および「Loopamp ペロ毒素 (VT) タイピング試薬キット」が栄研器材を通じて販売されている。

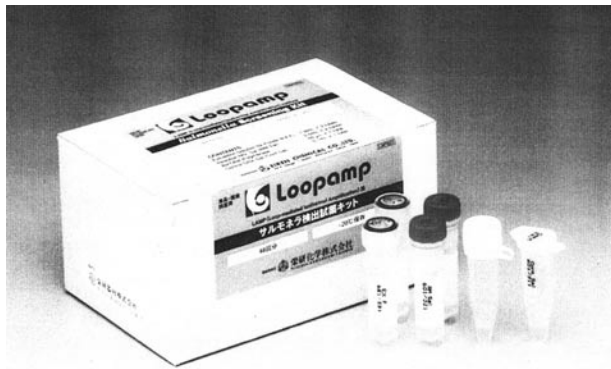


写真1 LAMP法による腸管感染症起因菌の検出試薬キット

写真は「Loopamp サルモネラ検出試薬キット」。ほかに「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」が市販されている。

筆者らは、この「Loopamp サルモネラ検出試薬キット」の有用性を明確にする目的で、標的としている病原遺伝子 *invA* の各種血清型サルモネラ属菌における保有について、本キットと従来の PCR 法³⁾で検討した。「Loopamp VT タイピング試薬キット」に関しては、従来の PCR 法⁴⁾ およびラテックス凝集法⁵⁾により同定された腸管出血性大腸菌 (EHEC) 菌株を用いて、その特異性の確認を行った。これらの成績について紹介する。

なお、LAMP 反応原理の詳細については、栄研化学からの解説書やウェブサイト (<http://loopamp.eiken.co.jp/>) を参照されたい。

I. 検出試薬キットと操作手順

LAMP 法による 3 種類の検出試薬キットを写真 1 に示す。キットは 48 回 (VT タイピング試薬キットでは 24 回) 用で、内容は表 1 に示したように、基本的に (1)Extraction Solution for Foods, (2)Reaction Mix (VT タイピング試薬キットでは 2 種類), (3) *Bst* DNA Polymerase, (4)Control DNA (VT タイピング試薬キットでは 2 種類) の 4 種類からなり、反応チューブは別売となっている。操作手順の概略を「Loopamp サルモネラ検出試薬キット」を用いた場

表 1 LAMP 法による検出試薬キットの内容 (48 回用)

(1) Extraction Solution for Foods	1.8mL × 2tubes
(2) Reaction Mix.	0.5mL × 2tubes
(3) <i>Bst</i> DNA polymerase	60 μL × 1tube
(4) Control DNA	0.1mL × 1tube

反応チューブは別売

1) 東京都健康安全研究センター 多摩支所

☎ 190-0023 東京都立川市柴崎町 3-16-25

2) 埼玉県衛生研究所

☎ 338-0824 埼玉県さいたま市上大久保 639-1

1) Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

(3-16-25 Shibasaki-cho Tachikawa-city Tokyo)

2) Saitama Institute of Public Health

(639-1 Kamiokubo Saitama-city Saitama)

合を例に、従来の培養法と比較して図1に示す。従来の培養法では、1日目に検査材料を前増菌培地で培養、2日目にその培養液を選択増菌培地に移植、3日目に選択分離平板に分離培養、4日目に疑わしいコロニーが認められたら各種確認培地に移植、5日目に判定となり、その結果を得るまで4～5日を要する。一方、LAMP法では直接前増菌培養液を用いて実施するので2日目には結果が得られる。LAMP法の実施手順は、指定された前増菌培養液を用い（VTタイピング試薬キットの場合は、被検菌株の培養液あるいは寒天培地上のコロニーから菌液を調製）、その50 μ Lと(1)50 μ Lと混合、95 $^{\circ}$ C 5分間加熱後遠心、その上清5 μ Lを(2)と(3)を混合（1件当たり前者20 μ L、後者1 μ L）したマスターミックス20 μ Lと反応チューブ内で混合、反応を行う。核酸増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム（白色沈殿物）による濁度の増加による⁶⁾。この濁度の測定は、濁度測定器内蔵恒温装置とパソコンからなる「Loopampリアルタイム濁度測定装置」（写真2）を用いて行う。使用キットに合わせてプログラムを選択し、表示温度が規定温度に達していることを確認後、調製した試料をセット（8連のチューブが4ブロックにセットできる）、測定を開始する。なお、陽性コントロールと陰性コントロールの濁度上昇の有無により、増幅反応が正常に進行しているか否か確認できる。さらに

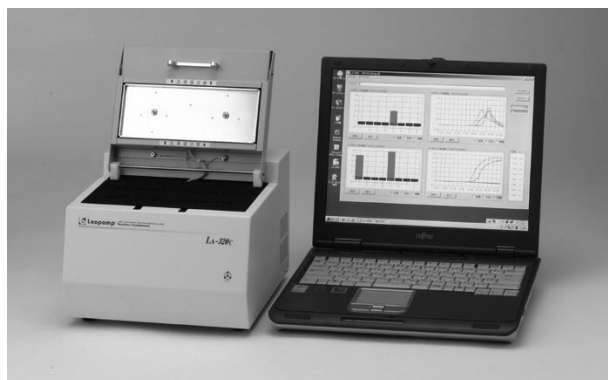


写真2 Loopampリアルタイム濁度測定装置

各ブロックごとに増幅、判定、結果の表示が可能である。写真3にその例を示す。写真3のAブロックは各反応チューブごとにリアルタイムで測定、グラフで示した増幅画面である。写真3のBブロックは、測定値を移動平均微分法で演算した結果をグラフで示した判定画面である。写真3のCブロックは、その結果画面で、反応後1時間以内に濁度が一定基準以上に上昇した場合「陽性」、上昇が認められない場合「陰性」と判定される。反応終了後自動的に酵素失活処理がなされるので、それを確認後装置から反応チューブを取り外し、そのままキャップを開けずに廃棄する。なお、DNA産物を電気泳動する必要はない。検出感度は、反応当たり菌体60cfuと報告されている^{7,8)}。操作および判定法の詳細は、各キットの添付文書を参照されたい。

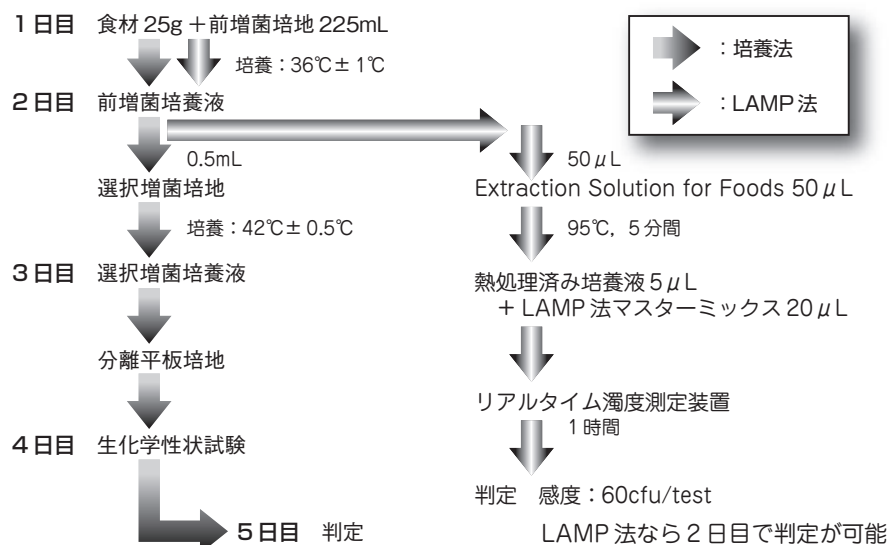
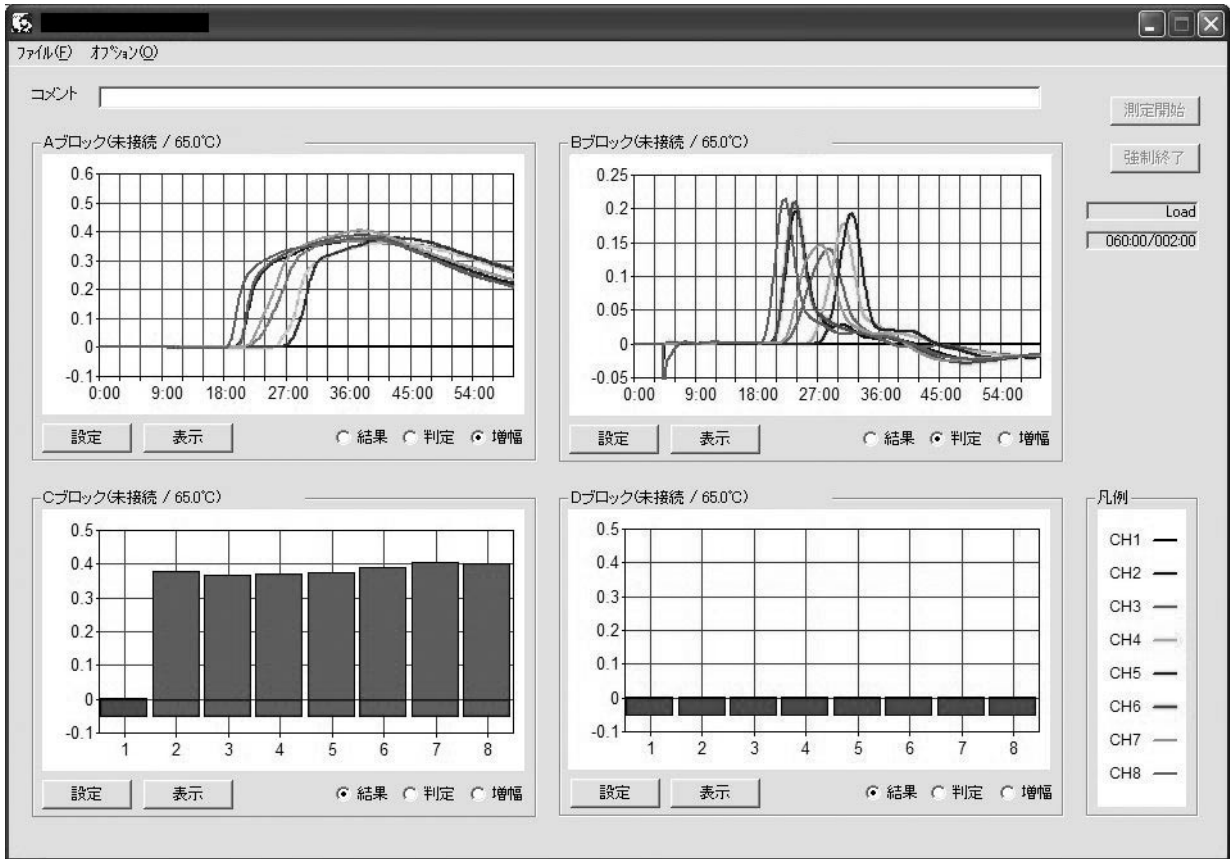


図1 「Loopamp サルモネラ検出試薬キット」を用いた場合のLAMP法と培養法の検査工程比較



(A～Cのデータは、同一データについて表示方法を変えたものです。)

写真3 判定画面例

表2 サルモネラ属菌 <i>invA</i> 遺伝子の検出法と供試菌株	
LAMP法	Loopamp サルモネラ検出試薬キット(栄研化学)
PCR法	<i>invA</i> 遺伝子検出用 Primer Set SIN-1,2 (TaKaRa)
供試菌株: <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	
	19種 O群, 100種血清型 568株
	血清型不明 35株
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i> 5株
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> 4株
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> 4株
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> 2株

II. 各種血清型サルモネラ属菌における *invA* の保有

わが国では、サルモネラ属菌に起因する疾病のうち、チフス菌およびパラチフスA菌を原因とする2類感染症である腸チフスとパラチフスは、近年激減を見るに至った⁹⁾。一方、いわゆる非チフス性菌による細菌性食中毒あるいは感染性胃腸炎(下痢症)として扱われる疾病は、食生活の欧米化、外食産業の隆盛などとも関連して、毎年多数の集団発生事例や散発例が報告されており、依然として食品衛生上あるいは公衆衛生上対策が求められている重要

な存在である¹⁰⁾。

サルモネラ属菌は、哺乳類、鳥類、爬虫類などが保菌、さらには下水等の環境にも広く生息分布している。近年のわが国におけるサルモネラ属菌による食中毒は、本菌で汚染された禽獣肉や鶏卵を主な原因として発生している¹⁰⁾。その予防・制御のためには、これら食品におけるサルモネラ属菌汚染の有無をできるだけ早期に認識することが重要である。しかし従来の培養法では、本菌の検出に日時を要することより、迅速かつ高感度な検出法の開発が急がれていた。

近年、サルモネラ属菌の迅速・高感度検出法として、本菌が特異的に保有するとされる侵入性関与遺伝子 *invA*、あるいはエンテロトキシン産生性関与遺伝子 *stx* を標的とした、遺伝子増幅法を利用した検出方法が開発されている^{7, 11, 12)}。しかしながら、この両遺伝子の保有に関しては、一部の血清型菌しか検討されておらず、*Salmonella enterica* subspecies *enterica* だけでも1,400種類以上の血清型に分類される本菌が、普遍的にこれらの遺伝子を保有してい

表3 各種血清型サルモネラ属菌における *invA* の保有

O 群	血清型	供試株数	保有率%		O 群	血清型	供試株数	保有率%		
			LAMP	PCR				LAMP	PCR	
2	Paratyphi A	8	100	100	9	Dublin	2	100	100	
4	Agona	13	100	100		Eastbourne	2	100	100	
	Brandenburg	2	100	100		Enteritidis	101	99.0	99.0	
	Chester	5	100	100		Javiana	2	100	100	
	Derby	15	100	100		Miyazaki	1	100	100	
	Eppendorf	1	100	100		Panama	5	100	100	
	Haifa	1	100	100		Typhi	3	100	100	
	Heidelberg	5	100	100	3,10	Amager	2	100	100	
	Indiana	1	100	100		Amsterdam	2	100	100	
	Lagos	1	100	100		Anatum	36	100	100	
	Paratyphi B	2	100	100		Give	1	100	100	
	Reading	2	100	100		Lekke	1	100	100	
	Saintpaul	5	100	100		Lexington	9	100	100	
	Sandiego	2	100	100		London	15	100	100	
	Schwarzengrund	2	100	100		Muenster	1	100	100	
	Stanley	10	100	100		Newbrunswick	1	100	100	
	Typhimurium	21	100	100		Orion	2	100	100	
	Untypable	13	100	100		Uganda	2	100	100	
7	Bareilly	9	100	100		Weltevreden	29	100	100	
	Branderup	11	100	100		Zanibar	1	100	100	
	Colindale	1	100	100	Untypable	4	100	100		
	Hartford	1	100	100	1,3,19	Krefeld	1	100	100	
	Infantis	5	100	100		Liverpool	1	100	100	
	Isangi	2	100	100		Senftenberg	7	100	100	
	Mbandaka	5	100	100	11	Rubislaw	1	100	100	
	Mikawasima	1	100	100		13	Cubana	1	100	100
	Montevideo	8	100	100			Havana	4	100	100
	Ohio	3	100	100			Idikan	1	100	100
	Othmarschen	2	100	100			Kedougou	2	100	100
	Potsdam	3	100	100			Poona	1	100	100
	Richmond	2	100	100			Telekebir	1	100	100
	Rissen	8	100	100	Untypable		2	100	100	
	Singapore	1	100	100	6,14	Lindern	1	100	100	
	Tennessee	9	100	100		Madelia	2	100	100	
	Thompson	5	100	100		Sundsvall	1	100	100	
	Virchow	12	100	100	16	Gaminara	1	100	100	
	Untypable	5	100	100		Hivttingfoss	2	100	100	
	8	Albany	3	100		100	Orientalis	2	100	100
Altona		1	100	100	18	Cerro	2	100	100	
Bellevue		1	100	100		21	Ruiru	1	100	100
Blockley		13	100	100	28		Pomona	1	100	100
Bovismorbificans		2	100	100		30	Urbana	1	100	100
Breda		1	100	100	35		Adelaide	1	100	100
Corvallis		3	100	100		Untypable	1	100	100	
Duesseldorf		2	100	100	38	Lansing	2	100	100	
Emek		5	100	100		Untypable	1	100	100	
Hadar		48	100	100	39	Chanpaign	4	100	100	
Kentucky		1	100	100		Wandworth	1	100	100	
Kottbus		3	100	100		Untypable	1	100	100	
Litchfield		7	100	100	40	Johannesburg	3	100	100	
Manhattan		1	100	100						
Muenchen		3	100	100						
Nagoya		3	100	100						
Narashino		1	100	100						
Newport		8	100	100						
Untypable		8	100	100						

るか否かは不明である。筆者らはこのことを明確にする目的で、近年分離された各種血清型サルモネラ属菌、すなわち通常ヒトから分離される大半の血清型菌株について、「Loopamp サルモネラ検出試薬キット」を用いた LAMP 法⁷⁾ 及び従来の PCR 法³⁾ の両者で *invA* の保有を検討した。

表 2 に示したように、供試菌株は 1995～2003 年に東京においてヒト散発例および集団事例から分離¹³⁾ され、ドルセット卵培地に保存されていた *S. enterica* subsp. *enterica* の 19 種 O 群に属する 100 種血清型菌 568 株と血清型不明 35 株、計 603 株、およびその他の subsp. に属する *salamae* 5 株、*arizonae* 4 株、*diarizonae* 4 株、*houtenae* 2 株、合計 618 株のサルモネラ属菌である。なお、集団事例由来株については代表 1 株を供試した。

subsp. *enterica* の 19 種 O 群に属する 100 種血清型および血清型不明の計 603 株における *invA* の保有率を、O 群別・血清型別に表 3 にまとめた。O2 群の ParatyphiA (パラチフス A 菌) 8 株では全株が保有していた。O4 群の Agona, Chester, Derby, Heidelberg, Saintpaul, Stanley, Typhimurium など 16 種血清型 (血清型不明を除く: 以下同様) 101 株 (血清型不明を含む: 以下同様) では、全株が保有していた。O7 群の Bareilly, Braenderup, Infant-is, Mbandaka, Montevideo, Oranienburg, Ri-ssen, Tennessee, Thompson, Virchow など 20 種血清型 106 株では、全株が保有していた。O8 群の Blockley, Emek, Hadar, Litchfield, Newport など 18 種血清型 114 株では、全株が保有していた。O9 群では Enteritidis, Panama, Typhi (チフス菌) など 7 種血清型 116 株のうち、1 株が LAMP 法および PCR 法とも陰性、すなわち *invA* 非保有であった。この非保有株は 101 株検討した Enteritidis のうちの 1996 年分離株 (散発例由来) であった。他の本血清型 100 株は保有していることより、この菌株も分離当初は *invA* を保有していたが、保存中に変異あるいは脱落が起こったものと推察された。O3, 10 群の Anatum, Lexington, London, Weltevreden など 13 種血清型 106 株では、全株が保有していた。その他、検出頻度の低い O 群である O1, 3, 19 群 (3 種血清型 9 株), O11 群 (1 種血清型 1 株), O13 群 (6 種血清型 12 株), O6, 14 群 (3 種血清型 4 株), O16 群 (3

表 4 *Salmonella enterica*
各 subsp. における *invA* の保有

subsp.	供試株数	保有率 (%)	
		LAMP	PCR
<i>enterica</i>	603	99.8	99.8
<i>salamae</i>	5	100	100
<i>arizonae</i>	4	100	100
<i>diarizonae</i>	4	100	100
<i>houtenae</i>	2	100	100

種血清型 5 株), O18 群 (1 種血清型 2 株), O21 群 (1 種血清型 1 株), O28 群 (1 種血清型 3 株), O30 群 (1 種血清型 1 株), O35 群 (1 種血清型 2 株), O38 群 (1 種血清型 3 株), O39 群 (2 種血清型 6 株), O40 群 (1 種血清型 3 株) では、いずれの O 群とも全株が保有していた。全体 603 株では 1 株を除く 602 株 (99.8%) が保有していた。

subsp. *enterica* 以外の *salamae* 5 株、*arizonae* 4 株、*diarizonae* 4 株および *houtenae* 2 株について *invA* の保有について検討した結果、表 4 に示したように全株 (100%) が保有していた。これらの subsp. はヒトからの検出はまれで、主として爬虫類などの冷血動物から分離され、その病原性に関しては不明確であったが、遺伝子の面からみればは病原性を有すると考えられる。

全体を通して LAMP 法によるキットと PCR 法による成績は完全に一致しており、サルモネラ属菌は本質的に *invA* を保有していることが確認された。

Ⅲ. 「Loopamp ペロ毒素 (VT) タイピング試薬キット」の検討

ペロ毒素 (VT) を産生する腸管出血性大腸菌 (EHEC) は、出血性腸炎や溶血性尿毒症症候群の原因菌である。本菌は、1990 年に埼玉県の子供園で発生した 2 名の死亡者を含む、血清型 O157:H7 による集団事例¹⁴⁾ を契機に広く認識されるようになり、その重要性に鑑み、腸管出血性大腸菌感染症は 3 類感染症に指定されている。毎年多数の集団・散発下痢症例より本菌の検出が報告されてきている¹⁵⁾ が、その同定には VT 産生性あるいは VT 遺伝子の保有確認が必須である。今回、EHEC の同定・毒素型別用に市販されている LAMP 法⁸⁾ による「Loopamp ペロ毒素 (VT) タイピング試薬キット」の特異性の確認を行った。

表5 供試 EHEC 菌株の血清型と毒素型

血清型	毒素型 (PCR)	株数
O26 : H11	VT1	17
	VT1+VT2	1
: NM	VT1	2
O111 : NM	VT1	2
	VT1+VT2	1
O119 : H2	VT1	1
: H21	VT1	1
O121 : H19	VT2	1
O128 : H2	VT1+VT2	1
O157 : H7	VT2	33
	VT1+VT2	33
: NM	VT2	3
	VT1+VT2	2
OUT : H2	VT1	1
: HUT	VT2	1

供試菌株は、従来の PCR 法⁴⁾ およびラテックス凝集法⁵⁾ により同定された EHEC100 菌株である。それらの血清型と毒素型を表5に示した。血清型は O26 : H11 (18 株), O26 : NM (2 株), O111 : NM (3 株), O119 : H2 (1 株), O119 : H21 (1 株), O121 : H19 (1 株), O128 : H2 (1 株), O157 : H7 (66 株), O157 : NM (5 株), OUT : H2 (1 株), OUT : HUT (1 株) で、毒素型では VT 1 産生 24 株, VT2 産生 38 株, VT1&VT2 産生 38 株である。

PCR 法により確定された毒素型、および血清型別に見た LAMP 法での検討成績を表6にまとめた。VT1 産生と同定されていた 6 種血清型 24 株では、LAMP 法においても全株 VT1 のみ陽性であった。VT2 産生の 4 種血清型 38 株においては、全株 VT2 のみ陽性であった。VT1&VT2 産生の 5 種血清型 38 株では、全株 VT1 および VT2 両者とも陽性であった。さらに、VT2 のバリエーションとして報告されている VT2vp, VT2vha, VT2vhb および VT2vf についても検討した結果、表7に示したように従来の PCR 法と一致する成績であった。従来の PCR 法と LAMP 法の成績は完全に一致、その特異性が確認・証明された。

おわりに

各種血清型サルモネラ属菌について、病原遺伝子 *invA* の保有について検討した結果、血清型などの違いに関係なく、本質的に本遺伝子を保有していることが確認された。すなわち、*invA* を標的とした

表6 毒素型および血清型別 LAMP 法検討成績

毒素型 (PCR)	血清型	株数	LAMP 陽性率 (%)	
			VT1	VT2
VT1	O 26 : H11	17	100	0
	: NM	2	100	0
	O111 : NM	2	100	0
	O119 : H2	1	100	0
	: H21	1	100	0
	OUT : H2	1	100	0
VT2	O121 : H19	1	0	100
	O157 : H7	33	0	100
	: NM	3	0	100
	OUT : HUT	1	0	100
	O 26 : H11	1	100	100
	+ O111 : NM	1	100	100
VT2	O128 : H2	1	100	100
	O157 : H7	33	100	100
	: NM	2	100	100

表7 VT バリエーション株の PCR 法および LAMP 法検討成績

毒素型	株数	PCR 陽性率 (%)		LAMP 陽性率 (%)	
		VT1	VT2	VT1	VT2
VT2 vp	6	0	100	0	100
VT2 vha	1	0	100	0	100
VT2 vhb	1	0	100	0	100
VT2 vf	2	0	0	0	0

LAMP 法によるサルモネラ属菌検出法の妥当性が立証された。

LAMP 法による「Loopamp ベロ毒素 (VT) タイピング試薬キット」の特異性について各種血清型・毒素型の EHEC 菌株を用いて検討した結果、その成績は従来の PCR 法で確定されていた毒素型と完全に一致、その有用性が証明された。

LAMP 法を応用した検出法は、その特異性に加えて、電気泳動が不要なことなど、手技が簡便で短時間で成績が得られる利点を持つ。環境水からのレジオネラ属菌検出用として、「Loopamp レジオネラ検出試薬キット E」も発売されているが、さらに多くの感染症診断にかかわる検査試薬が開発・発売されることを期待する。

謝辞：ご協力いただいた国立感染症研究所感染症情報センター伊藤健一郎博士、栄研器材株式会社有田潤史氏に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28: e63, 2000.

- 2) 田代真人：LAMP法を用いたSARSコロナウイルス核酸増幅検査. モダンメディア 50: 62-67, 2004.
- 3) Galan J.E., Ginocchio C., Costeas P.: Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. J Bacteriol 56: 4338-4349, 1992.
- 4) 小林一寛, 勢戸和子, 牧野正直：PCRによる志賀赤痢菌様毒素遺伝子の検出とその応用. 日細菌誌 45: 649-652, 1990.
- 5) 甲斐明美, 山田澄夫, 松下 秀, 他：ラテックス凝集反応による大腸菌 Verocytotoxin 1 及び 2 の検出とその応用. 日細菌誌 44: 434, 1989.
- 6) Mori Y., Nagamine K., Tomita N., et al.: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 289: 150-154, 2001.
- 7) 吉野 学, 宮島浩志, 砂田亜津子, 他：新規遺伝子増幅法 LAMP 法によるサルモネラ属菌の高感度迅速検出法. 第 23 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 p26, 2002.
- 8) 根本二郎, 百田隆祥, 砂田亜津子, 他：LAMP法を用いた腸管出血性大腸菌の検出. 第 23 回日本食品微生物学会学術総会講演要旨集 p40, 2002.
- 9) 松下 秀：我が国におけるコレラ, 細菌性赤痢, 腸チフス及びパラチフスの発生状況. 食衛誌 41: J221-227, 2000.
- 10) 松下 秀, 観 照雄：サルモネラ食中毒とその発生状況. JVM 獣医畜産新報 56: 672-676, 2003.
- 11) Chiu C., Ou J.T.: Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. J Clin Microbiol 34: 2619-2622, 1996.
- 12) Makino S., Kurazono H., Chongsanguam M., et al.: Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. J Vet Med Sci 61: 1245-1247, 1999.
- 13) 松下 秀, 河村真保, 高橋正樹, 他：東京において最近 5 年間 (1995-1999 年) に分離された国内及び輸入事例由来サルモネラの血清型と薬剤耐性. 感染症誌 75: 116-123, 2001.
- 14) 埼玉県衛生部：「腸管出血性大腸菌による幼稚園集団下痢症」報告書. 1991.
- 15) 感染研感染症情報センター：〈特集〉腸管出血性大腸菌感染症 2004 年 5 月現在. 病原微生物検出情報 25: 138-140, 2004.