



# LAMP法による食中毒起因菌の迅速検査 — Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット—

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

遺伝子増幅法であるLAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) 法の反応原理については、es季刊誌 No.037で紹介しました。その原理を応用した食中毒起因菌検出試薬キットである「Loopamp®サルモネラ検出試薬キット」とLAMP法操作概要については同誌No.039で、さらに、「Loopamp®腸管出血性大腸菌検出試薬キット」については同誌No.040で紹介しました。LAMP法を利用した食中毒起因菌検出試薬キット製品としては他にも、ベロ毒素タイピング、大腸菌 O157、*Listeria monocytogenes* の検出キットが既に発売されています。

このたび、このシリーズのラインナップに「Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット」が加わりましたので、その概要と性能について紹介します。

今回発売しました「Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット」(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/>)) は、検査に要する日数を短縮し、かつ簡易に *Campylobacter jejuni* と *C. coli* を検出できるキットです。

## 2. キットの概要

「Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット」は、*C. jejuni* の保持する酸化酵素関連遺伝子 Oxidoreductase gene の核酸配列を認識する LAMP 用

プライマー、および *C. coli* の保持するアミノ酸合成酵素関連遺伝子 Aspartate kinase gene 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 *C. jejuni* および *C. coli* を検出します。本キットは *C. jejuni* 用プライマーと *C. coli* 用プライマーを混合しており、2種の菌のいずれか一方、あるいは両方が存在した場合に検出することができます。

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 *C. jejuni* および *C. coli* を検出することができます。

## 3. キットの使用方法

「Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット」を用いた検査の手順は、図1のとおりです。

食品または環境由来検体をプレストン培地等と混合、ストマッカー処理後、42℃で24時間微好気培養した増菌培養液を使用します。キット内の試薬のうち、Ex F (Extraction Solution for Foods) 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、2×Reaction Mix. 12.5μL、Primer Mix. Cam 2.5μL、Distilled Water 4μL、

*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 Cam 5μL を、陰性コントロールには Distilled Water 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 *C. jejuni* および *C. coli* 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

当社保管の *Campylobacter* 属 51 株の発育コロニーを滅菌生理食塩水に懸濁し、分光光度計を用いてマクファーランド 1.0 に調整し、その希釈菌液を 95℃、5 分間熱処理をした後に検体として用いました。

*C. jejuni* および *C. coli* は 60CFU/test で試験した結果、*C. jejuni* 37 株および *C. coli* 4 株すべての株で LAMP 反応を認めました。一方、*C. jejuni*、*C. coli* 以外の *Campylobacter* 属 10 菌種 10 株は 60,000cfu/test で試験しましたが、全て LAMP 反応は認められませんでした (表1)。

表2は *Campylobacter* 属以外の 36 菌種 38 株を用いた特異性試験の結果

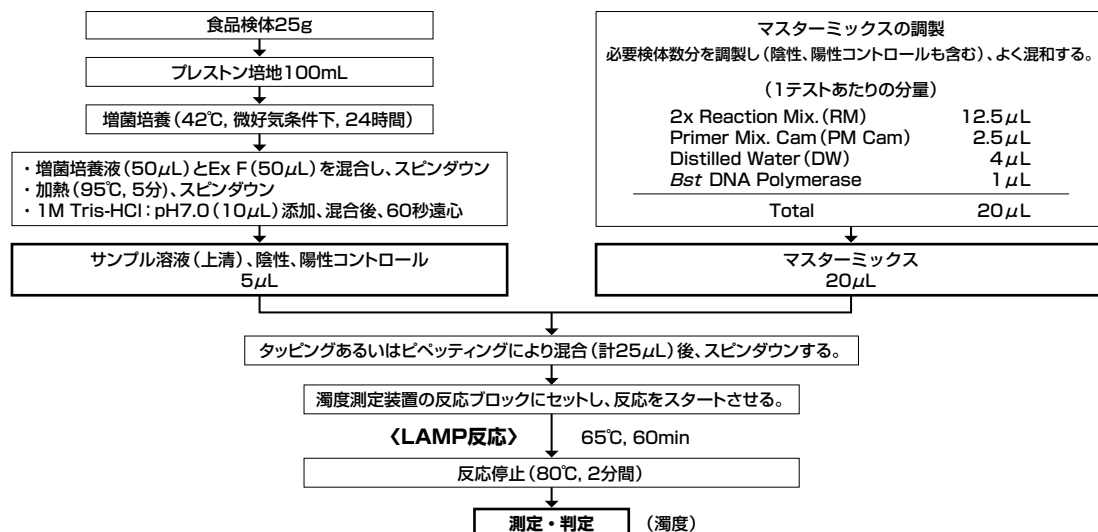


図1 Loopamp®カンピロバクター検出試薬キットの測定手順

果です。検体として市販DNA抽出キットで処理したGenomic DNAを用い、鋳型量として過剰量と思われる10ng/testになるよう添加し検討しました。*Campylobacter*属に近い*Arcobacter*属や*Helicobacter*属も確認しましたが、試験したすべての株でLAMP反応が認められず、本キットは

*C. jejuni*および*C. coli*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Nested PCR法を用い、*C. jejuni*の生菌を鋳型として用いた感度試験の結果です。LAMP法では6cfu/testまで検出されました。

一方、nested PCR法も6cfu/testまで検出でき、LAMP法とnested PCR法は同等の成績でしたが、LAMP法は1時間以内に検出されたのに対し、今回用いたnested PCR法は反応から電気泳動まで5~6時間を必要とし、LAMP法は迅速性に優れていました。

図3は、*C. coli*の感度試験の結果

表1 特異性試験 (*Campylobacter* 属)

菌名	LAMP判定
<i>C. jejuni</i>	37株 +
<i>C. coli</i>	4株 +
<i>C. concisus</i>	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	-
<i>C. fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	-
<i>C. helveticus</i>	-
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	-
<i>C. lari</i>	-
<i>C. mucosalis</i>	-
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>bubulus</i>	-
<i>C. sputorum</i> subsp. <i>sputorum</i>	-
<i>C. upsaliensis</i>	-

表2 特異性試験 (*Campylobacter* 属以外)

菌名	LAMP判定	菌名	LAMP判定
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	-	<i>Morganella morganii</i>	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	<i>Proteus mirabilis</i>	-
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	<i>Providencia alcalifaciens</i>	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	<i>Providencia rettgeri</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	<i>Providencia stuartii</i>	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Haemoph. ilusinfluenzae</i>	-	<i>Salmonella</i> Enteritidis	-
<i>Hafnia alvei</i>	-	<i>Salmonella</i> Typhimurium	-
<i>Helicobacter pylori</i>	-	<i>Salmonella</i> Virchow	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Shigella boydii</i>	-
<i>Legionella bozemanii</i>	-	<i>Shigella dysenteriae</i>	-
<i>Legionella dumoffii</i>	-	<i>Shigella flexneri</i>	-
<i>Legionella gormanii</i>	-	<i>Shigella sonnei</i>	-
<i>Legionella longbeachae</i>	-	<i>Vibrio cholerae</i>	-
<i>Legionella micdadei</i>	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

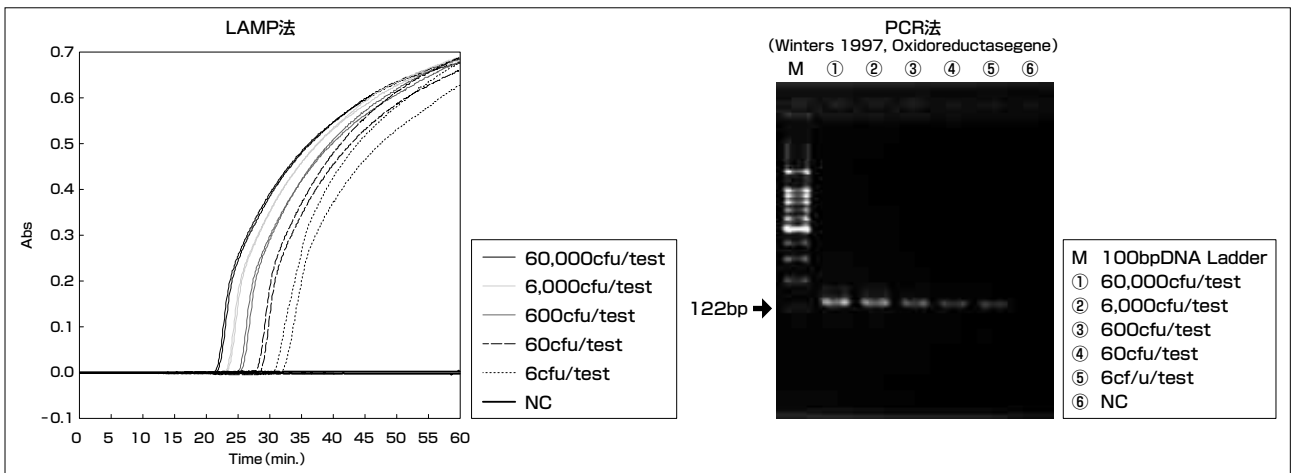


図2 感度試験 (*C. jejuni* EKN6532)



図3 感度試験 (*C. coli* EKN5889)

です。LAMP法は6cfu/testまで検出されました。それに対し、PCR法は600cfu/testまでしか検出されず、LAMP法で100倍感度が優れた結果となりました。これは*C. coli*用のプライマー-setが*C. jejuni*用のsetとは違いOne StepのPCR用であること、さらに増幅される領域が比較的長いことが原因であると考えられました。

## 5. 標準法とLAMP法

現在、カンピロバクターの食材からの標準的な検査法は分離培養法です。図4で、食材からの分離方法の一例を示していますが、食材25gを増菌培地である100mLのプレストン培地で42℃、微好気条件下で24時間培養し、その培養液を選択分離培地であるスキロー寒天培地もしくはCCDA培地に接種、42℃、微好気条件下で2日培養し、カンピロバクターと疑わ

れる分離株を同定します。この場合、最終的な判定まで約1週間の日数が必要となります。

それに対しLAMP法では、プレストン培地で培養した培養液を簡易な抽出法で処理することによって、食材検査に必要な日数を現在の1週間からわずか2日とすることができます。

## 6. 食材の反応への影響

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。カンピロバクター食中毒の多く原因となっていると考えられる鶏肉では、鶏もも肉、鶏皮、鶏砂肝、鶏モツ、鶏レバーのいずれも問題なく検出できました。*C. coli*が検出されるとの報告がある豚肉では、挽肉、レバーを試験しましたが、いずれも検査に問題がないと判断されました。調理器具を介して発生する二次汚染を想定して試験

した、鶏からあげ、カット野菜も問題ありませんでした。

ただし、牛肉の場合、挽肉は検査に問題がありませんでしたが、牛レバーは個体によってはLAMP反応を阻害するケースがあり、今回のキットではレバー類を検査の対象から除外し、現在抽出法の検討を進めています。

## 7. おわりに

「Loopamp®カンピロバクター検出試薬キット」は、他の食中毒起因菌検出キットシリーズと同様に、特異性が高く、培養開始の翌日には簡単な操作で、高感度に*C. jejuni*および*C. coli*の検出を確認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。

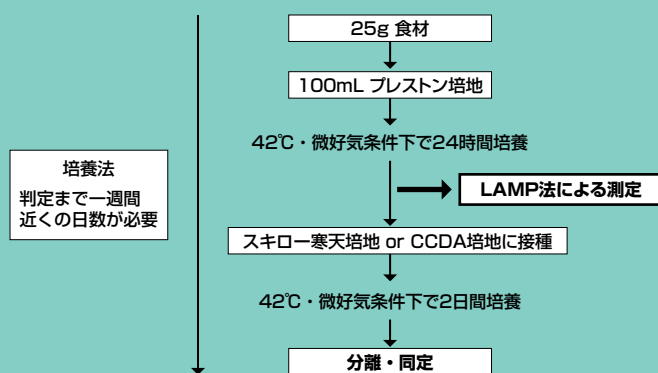


図4 食材からのカンピロバクター検出プロトコル

# eS information

学会・講習会・展示会 2006年5月～7月

名称	会期	会場	問合わせ先	備考
第91回日本食品衛生学会総会・学術大会	5/11-12	東京都： 銀座プロッサム	(社)日本食品衛生学会 第91回学術講演会実行委員会 Tel：03-3470-2933	
第19回インターフェックス ジャパン (医薬品・化粧品・洗剤研究開発・製造技術国際展)	5/17-19	東京都： 東京ビッグサイト	インターフェックス ジャパン事務局 Tel：03-3349-8509	
第5回国際バイオEXPO	5/17-19	東京都： 東京ビッグサイト	国際バイオEXPO事務局 Tel：03-3349-8509	
第33回日本防菌防黴学会年次大会	5/30-31	東京都：きゅりあん (品川区立総合区民会館)	日本防菌防黴学会事務局 Tel：06-6538-2166	
ifia JAPAN 2006 (国際食品素材/添加物展)	5/30-6/1	東京都： 東京ビッグサイト	日本イージェイケイ(株) Tel：03-5772-1321	
FOOMA JAPAN 2006 (国際食品工業展)	6/6-9	東京都： 東京ビッグサイト	国際食品工業展事務局 Tel：03-3503-7661	

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

「es」NO.042 (2006年5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