

LAMP 法を用いた *Campylobacter* の検出

国井 悦子 花木 陽子*1 佐藤 真帆 築地 裕美
田内 敦子 末永 朱美*2 井澤 麻由 宮野 高光
坂本 綾 京塚 明美 伊藤 文明 橋本 和久
笠間 良雄

カンピロバクターの培養法では同定までに1週間程度かかり、迅速な推定のための検査法の導入が望まれる。そこで今回、我々はLAMP法の検討を行った。LAMP法の感度試験の結果、*Campylobacter jejuni/coli* (以下 *C. jejuni/coli*) は 10^3 CFU/ml あれば確実に検出できることが示唆された。また、鶏肉からの検出試験の結果、培養法で分離されるものはLAMP法でも陽性となり、培養開始の翌日には *C. jejuni/coli* の存在を推定することができた。

キーワード：カンピロバクター, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, Loopamp[®]カンピロバクター検出試薬キット, LAMP法, 食中毒

はじめに

カンピロバクターによる食中毒は、近年、わが国で発生している食中毒の中で、発生件数が最も多い食中毒である¹⁾²⁾。厚生労働省の平成21年食中毒発生状況によれば、患者数もノロウイルスに続いて多い³⁾。

現在、カンピロバクターの検出・同定は培養法によって行われており、確実な菌種同定には1週間程度かかっているため、食中毒等の原因究明には、遺伝子検出試験など迅速な検査法の導入を検討していく必要がある。

そこで今回、遺伝子検査法の1つであり、簡易に短時間で *C. jejuni/coli* を検出できるLAMP法の検討を行った。

方 法

1 供試菌株

当所で分離された、*C. jejuni* と *C. coli* を感度試験に使用した。

2 使用検体

検体からの検出試験には、鶏肉6検体を使用した。

3 感度試験

C. jejuni および *C. coli* の懸濁液から、増菌培養に用いるプレストンブイヨンで10倍希釈列を作成し、菌数測定を行うと同時に各希釈列を用い

て常法に従いLAMP法を実施した。菌数測定には、非選択性の血液寒天培地を用いた。LAMP法は、Loopamp[®]カンピロバクター検出試薬キット(栄研化学)を使用した。

4 検体からの検出試験

鶏肉25gに増菌培養液プレストンブイヨン225ml加えて、ストマッカーで攪拌後した後、常法に従いLAMP法を実施すると同時に、微好気状態で42℃24時間培養した。その後、再びLAMP法を実施するとともにバツラー培地を用いて菌数測定を行った。また、増菌液をmCCDA培地とバツラー培地に一白金耳を塗抹し微好気状態で42℃24時間~48時間培養した。平板上に発育したカンピロバクターと推定される集落をバツラー培地に塗抹し、純培養を行ったのち、顕微鏡検査、および馬尿酸塩加水分解試験、ラテックス凝集試験による生化学的性状検査を行った。

結果および考察

1 感度試験

C. jejuni についてはLAMP法で4回とも陽性であった菌数は、 5.0×10^3 CFU/ml以上であり、*C. coli* においては、 4.2×10^2 CFU/ml以上であった。(表1)これらのことから、*C. jejuni/coli* は 10^3 CFU/ml あれば確実にLamp法で検出できることが示唆された。

2 検体からの検出試験

増菌前では、分離培養・LAMP法ともに陰性であった。増菌後は、6検体中4検体から *C. jejuni* が

*1：現 経済局工業技術センター

*2：現 健康福祉局保健部環境衛生課

表 1 感度試験

<i>C. jejuni</i>	菌数 (CFU/ml)	5.0 × 10 ⁴	5.0 × 10 ³	5.0 × 10 ²	5.0 × 10 ¹
	LAMP 法	++++	++++	-+++	----
<i>C. coli</i>	菌数 (CFU/ml)	4.2 × 10 ⁴	4.2 × 10 ³	4.2 × 10 ²	4.2 × 10 ¹
	LAMP 法	++++	++++	++++	-+++

※LAMP 法は 4 回実施 + : 陽性 - : 陰性

表 2 検体からの検出

No.	増菌前		増菌後		菌種
	培養法	LAMP 法	菌数 (CFU/ml)	LAMP 法	
1	-	-	1.0 × 10 ⁶	+	<i>C. jejuni</i>
2	-	-	3.6 × 10 ⁴	+	<i>C. jejuni</i>
3	-	-	-	-	
4	-	-	9.5 × 10 ⁵	+	<i>C. jejuni</i>
5	-	-	-	-	
6	-	-	8.2 × 10 ³	+	<i>C. jejuni</i>

+ : 陽性 - : 陰性

分離された。*C. jejuni* が分離された 4 検体は、LAMP 法でも陽性であった。また培養法で分離されなかった 2 検体は LAMP 法でも陰性であった。陽性となった 4 検体の *C. jejuni* の菌数を測定したところ、すべて 10³CFU/ml 以上で LAMP 法で確実に検出される菌数まで増えていた。

従来の検査では、判定までに 1 週間程度を要していたが、LAMP 法を取り入れることで、検査開始 2 日目には、*C. jejuni/coli* の存在を推定することができ、LAMP 法は迅速な推定試験法であることが示唆された。今後、さらにほかの検体についても検討していきたい。

文 献

- 1) 厚生労働省：食品安全情報「カンピロバクター Q&A」, (<http://www.mhlw.go.jp/qa/syokuhin/campylo/>)
- 2) 国立感染症研究所：〈特集〉カンピロバクター腸炎，2006～2009，病原微生物検出情報，31，1～3（2010）
- 3) 厚生労働省：食中毒統計，(<http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>)
- 4) 上野潤二：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-, 環境衛生と微生物検査の葉「es」, 042（2006）