

LAMP法を用いたウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子検出の検討

佐藤秀美

Development of detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin gene using the LAMP assay

Hidemi Sato

はじめに

ウェルシュ菌による食中毒は、大量に調理された食品を原因とすることが多く、しばしば大規模になるため、原因物質の迅速な検出と判断が求められている。なお、ウェルシュ菌は常在菌でもあるため、食中毒の原因菌と判断するためにはエンテロトキシンの産生を確認する必要がある。

LAMP法(Loop-Mediated Isothermal Amplification)による検出法は、その特異性に加え、手技が簡単で、電気泳動等の操作は不要であり短時間に結果が得られる利点をもつ¹⁾。これらのことから、ウェルシュ菌食中毒の迅速判断に適していると考えて、ウェルシュ菌エンテロトキシン産生遺伝子(以下 *cpe* とする)を検出するプライマーを設計し、食品および便から培養操作を省いて *cpe* を直接検出する方法として検討したので報告する。

材料および方法

1 LAMP法の設定

(1) *cpe* の設計

ウェルシュ菌の *cpe* 領域を標的 (Gen Bank accession *Clostridium Perfringens* NCTC 8239/gene="cpe" CDS 4140..5039) として特異的に検出できるよう4種類のプライマー(F3, B3, FIP, BIP)および1種類のループプライマー(LF)を設計し(表1)、LAMP法に使用した²⁾。

なお、プライマーの設計には支援ソフトPrimer Explore V4(富士通)を使用した。LAMP反応はLoopamp DNA増幅試薬キット(栄研化学)を使用した。

(2) 検出条件

条件設定には *Clostridium Perfringens* (P800 Hobbs:1, *cpe*+)およびATCC12915の菌株を用いた。これらの菌株はBrain Heart Infusion Broth(BD製、以下BHI)で嫌気培養し、培養後の菌液を生理食塩水で $10\sim 10^6$ cfu/mlに希釈した後、各1mlを使用してDNAを抽出した。反応チューブには抽出後のDNA 2μ lとプライマーおよび反応試薬を調整したマスターミックス 23μ l(表2)を混和して、検出器で核酸増幅反応による濁度を測定した。反応温度は58, 60, 61, 62, 63, 64°Cを設定し、それぞれの反応液の濁度の上昇曲線を確認した。検出器にはリアルタイム濁度測定装置LA-320C(栄研化学)を使用した。

DNAの抽出にはPrepMan Ultra Reagent(A. Biosystems, 以下PUR), DNA Mini Kit(QIAGEN)およびインスタジーンマトリクス(Bio-Rad)を使用した。

(3) 精度および特異性の確認

検出精度の確認には、食中毒患者由来のウェルシュ菌 *cpe*(+)20株および *cpe*(-)10株から抽出したDNAを用いた。

また、特異性の確認には *Bacillus cereus*等の食中毒菌15株のDNAを使用した(表4)。

2 患者便の検査

食中毒患者便のうち培養法によりウェルシュ菌 *cpe*(+)が検出された23検体を陽性便、不検出5検体の便を陰性便として検査の対象とした。なお、培養法はクックドミート培地(BD製、以下COOK)およびCW寒天基礎培地(日水製薬、以下CW)により嫌気培養し、検出したコロニーをその生化学性状から同定して、PCR法で *cpe* を確認した。

対象の便はDNA Stool Mini kit (QIAGEN)を使用して、DNAを直接抽出して検査に供した。

さらに、陽性便はCOOKの培養液からPURを使用してDNAを抽出し検査を実施した。

3 食品菌添加試験

食品成分の影響を調べるため、ウェルシュ食中毒事例に多い食品である、カレー、あんかけ、ミートソースのレトルト製品を対象食品としウェルシュ菌を添加した。ウェルシュ菌 *cpe* (+)は以下の菌株を使用した。

a : 患者由来(P479, Hobbs:6)

b : 患者由来(P465, Hobbs:UT)

c : 食品由来(P798, Hobbs:1)

対象食品は生理食塩水を加えて10倍乳剤を作成し、そこに各菌を $10\sim 10^5$ cfu/mlとなるように添加して試料液とした。試料液1mlからDNA Mini KitおよびPURを使用してDNAを抽出(5倍濃縮)し、LAMP法とPCR法を実施した。なお、PCR法はYuan-Tong Linら³⁾の方法とした。

また、有症苦情事例の残品でウェルシュ菌が検出されたカレーにも同様の方法でDNAを抽出し検査を実施した。

4 食品の保存試験

食品の保存中の菌の消長を調べるためレトルト食品に以下のウェルシュ菌 *cpe*(+)を添加した。

A : 食品由来(P593, Hobbs:UT)

B : 患者由来(P465, Hobbs:UT)

C : 患者由来 (P833, Hobbs:UT)

レトルト食品は①カレー (pH5.0, タンパク質2%, 食塩1.4%)および②豚玉井 (pH5.8, タンパク質4.2%, 食塩1.4%)を使用した。

菌株はそれぞれBHIで4時間嫌気培養し、各食品60gに $10^5 \sim 10^6$ cfu/gとなるように菌液1mlを均一に添加して試料を作製し、50mlの滅菌カップに20gずつ入れて-20℃, 5℃, 25℃に保存した。保存1~9日の間、試料を取り出し、それぞれに検査を実施した。

生菌数の測定方法は、試料に生理食塩水を加えて10倍乳剤を作成し、その希釈系列からTC Sagar (Merck)に混釈して42℃18時間の嫌気培養後、ウェルシュ菌の特徴的コロニーを計数し、希釈倍数を乗じて計算した。

培養法は、10倍乳剤をCOOKに添加し42℃18時間培養後、CWで42℃18時間の嫌気培養をしてコロニーを確認した。

LAMP法およびPCR法は、10倍乳剤1mlからPURにより抽出したDNAに検査を実施した。なお、菌を添加しない食品を対照として同様に検査した。

表1 LAMP法による *cpe* 検出用プライマーの遺伝子配列

name	Sequence(5'-3')
F3	AGGAAATATTGATCAAGGTTTCAT
B3	GTGTAATAAAGCTTTTGGAGTCC
FIP	GCAGCAGCTAAATCAAGGATTTCTTTGAAACTGGTGAAAGATGTG
BIP	TGATGCATTAAGCTAAATCGAGCTAAGGGTATGAGTTAGAAGAACG
LF	TCTGTAGATGGAAGCTGT

表2 マスターミックスの調整量

Reaction Mix	12.5 μL
Primer FIP and BIP	40 pmol
F3 and B3	5 pmol
LF	20 pmol
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1.0μL
Distilled Water	4.5μL

結果

1 LAMP法の設定と精度の確認

(1) 検出結果

反応温度61℃における菌液DNAの濁度曲線を図1に示した。58~64℃の温度条件の中で、61℃の設定は濁度上昇が早く、濁度曲線およびTt時間(陽性判定可能な時間)の再現性は良好だった。陰性コントロールの濁度上昇は認められなかった。反応終了後、増幅産物は2%アガロースゲルにて電気泳動し、LAMP法に特異的な規則的ラダーパターンであることから、LAMP反応による核酸増幅が行われたことを確認した。

なおTt時間は60分以内に濁度が0.1を超える時間とし、陽性の判定時には、スムーズな立ち上がりによる濁度上昇

の反応曲線であることを確認した⁴⁾。

設定した条件による検出下限は、反応チューブに添加する菌数10cfuに相当するDNA量で陽性になることから、試料の菌液濃度に換算し、 10^3 cfu/mlとなった(表3)。

なお、DNA抽出法による差は認められなかった。

(2) 精度および特異性の確認

ウェルシュ菌食中毒株のLAMP法の結果、*cpe*(+)株は特異的な増幅反応を示してすべて陽性、*cpe*(-)株では反応を示さずすべて陰性だった。また *Bacillus cereus* 等の15菌株のLAMP法の結果はすべて陰性だった。(表3)

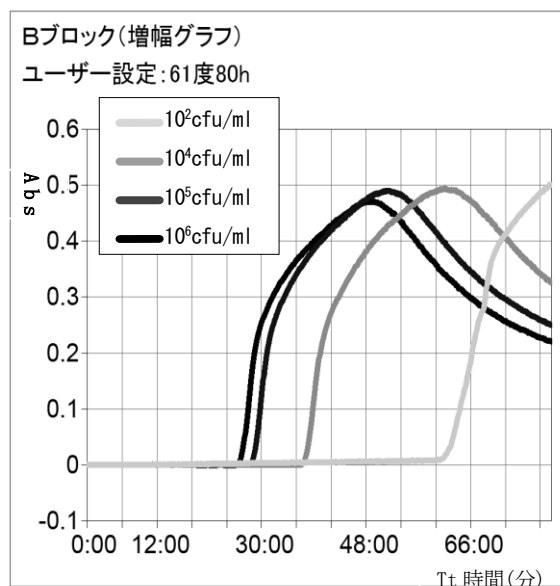


図1 *cpe* のLAMP反応による濁度曲線

表3 LAMP法によるウェルシュ菌液濃度別検出結果

菌液濃度	反応チューブ	LAMP 判定	Tt 時間
10^7 /ml	10^5 cfu	+	35分
10^6 /ml	10^4 cfu	+	34分
10^5 /ml	10^3 cfu	+	37分
10^4 /ml	10^2 cfu	+	40分
10^3 /ml	10cfu	+	45分
10^2 /ml	1cfu	-	65分
0/ml	0	-	-

2 患者便の検査結果

ウェルシュ菌の陽性便23検体のLAMP法による結果は、陽性18検体、陰性5検体だった。一方、PCR法では陽性14検体、陰性9検体だった。患者便から抽出したDNAを対象とした場合、検出感度はLAMP法78.2%、PCR法60.8%だった。なお、COOK培養液のLAMP法による検出感度は100%であった。

また、陰性便の5検体はLAMP法、PCR法ともに陰性だった。

表 4 各種菌株DNAの *cpe* 検査結果

菌株	由来	結果	
		LAMP	PCR
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC10876	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC6538	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC27853	-	-
<i>Salmonella</i> Anatum	ATCC9270	-	-
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC35667	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	ATCC8724	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC8090	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> 1	食中毒株	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> 2	食中毒株	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 1	食中毒株	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 2	食中毒株	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 1	食中毒株	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> 2	食中毒株	-	-
<i>Escherichia coli</i> 1	食中毒株	-	-
<i>Escherichia coli</i> 2	食中毒株	-	-
<i>Clostridium perfringens cpe</i> (-)	下痢患者株	-	-
<i>Clostridium perfringens cpe</i> (+)	ATCC12915	+	+

3 食品菌添加試験

対象食品の検出下限値は、LAMP法およびPCR法ともに、菌 a は 3.2×10^3 cfu/ml、菌 c は 2.1×10^3 cfu/ml だった。菌 b はあんかけにおいてLAMP法およびPCR法ともに 7.8×10^3 cfu/ml だったが、カレーとミートソースにおいて、LAMP法は 7.8×10^2 cfu/ml、PCR法は 7.8×10^3 cfu/ml であり、PCR法に比べて同等以上の検出感度だった(表5)。

なおDNA Mini Kit およびPURによるDNA抽出法による差は認められなかった。

また、有症苦情事例の残品であるカレーはLAMP法、PCR法ともに陽性だった。

4 食品の保存試験

(1) 菌の消長と培養法の結果

作成した試料①カレーおよび②豚玉井の保存時における3種類の菌数は 10^5 cfu/g 程度だった。-20℃で保存した試料の菌数は1日後に1オーダー程度減少したが、その後の9日間はほとんど変化がみられなかった。(図3)。

5℃で保存した試料では、①カレーは2日後に菌株Bが2オーダー、菌株AおよびCは4オーダー減少し、4日後に菌数が0となった。②豚玉井では菌株Bが4日後、菌株Aおよび菌株Cは7日後に生菌数が0となった(図4)。なお、培養法によっても生菌は確認できなかった。

25℃で保存した試料では、①カレーは2日後に菌数が0、培養法陰性となった。②豚玉井は1日後に $10^7 \sim 10^8$ cfu/g と菌数が増加したが、3日後には菌数が0になり培養法でも生菌は確認できなかった。

(2) 遺伝子検査の結果

LAMP法の結果は、培養法で陰性となった検体も含めてすべて陽性だった。また、保存温度の違いおよび食品の種類による違いも認められなかった。

PCRの結果は試料①カレーは陰性、試料②豚玉井は陽性だった(表6)。試料①ではPCRの検出限界付近の菌数 (10^5 /g オーダー)であったため陰性になったと思われる。なお、保存時の試料(0日)の検査結果は培養法、LAMP法およびPCR法すべて陽性であり、食品対照の結果はすべて陰性だった。

考 察

1 設定したLAMP法による *cpe* の検出について検討した結果、ほぼ一時間での検出が可能であり、精度も良好だった。また、菌株の検査結果から、*cpe*(+)のウェルシュ菌のみ陽性で、類似の他の食中毒菌には反応を示さず陰性であり、特異性が高いと考えられた。

2 LAMP法による患者便のCOOK培養液の検出感度は良好だったが、患者便の抽出DNAの検出感度は78.2%と培養法に比べて低かった。ウェルシュ菌食中毒の場合、患者便の菌はほとんど芽胞型だが、発症初期患者(発症2日以内)の便からはエンテロトキシンおよび *cpe* を有するウェルシュ菌(栄養型)が高頻度に検出される⁵⁾ため、遺伝子法での検出は可能と考えられる。しかし、今回の検査対象の患者便には発症後2日~4日経過した検体も含まれており、LAMP法の検出感度に影響していると推定される。今後、芽胞からのDNA抽出法を検討することも必要と考える。

しかしながら大規模食中毒の発生時においては、ウェルシュ菌食中毒かどうか判断する迅速な対応が必要とされ、下痢を発症している患者便の検査に本法は有用と思われる。

3 食品への菌添加試験の結果から、LAMP法は、食品マトリックスの影響を受けず、食品乳剤1ml中 $10^2 \sim 10^3$ cfu オーダーとPCR以上の検出感度が確認され、ウェルシュ菌食中毒の原因食品の推定に有用と思われた。

4 食品の保存試験の結果、-20℃の保存条件では、添加したウェルシュ菌数の変化は少なく9日の間1~2オーダーの減少に留まったが、5℃および25℃の保存条件では、2日後以降大きく減少した。

食品中の栄養型ウェルシュ菌は温度の影響を受けやすく、冷蔵保存では損傷して培養法で検出できなくなることが報告されている⁶⁾。食中毒の原因食品と疑われる検体の中には、搬入されるまでの期間、適切な温度で保存されていない場合も想定され、培養法での検出が困難なことも推定される。LAMP法ではこうした影響にも関わらず検出が可能であることが示唆された。

表5 食品菌添加試験の結果

食品	検査法	菌 a (3.2×10^6 cfu/ml)					菌 b (7.8×10^6 cfu/ml)					菌 c (2.1×10^6 cfu/ml)				
		10^5	10^4	10^3	10^2	10	10^5	10^4	10^3	10^2	10	10^5	10^4	10^3	10^2	10
カレー	LAMP	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	PCR	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
あんかけ	LAMP	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	PCR	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
ミートソース	LAMP	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	PCR	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-

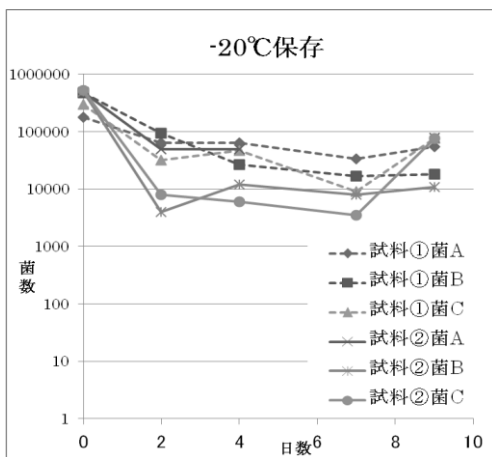


図3 保存温度による菌数の消長(-20°C)

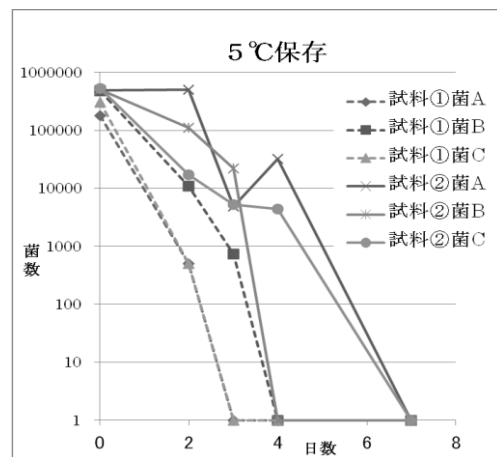


図4 保存温度による菌数の消長(5°C)

表6 品保存による培養検査*と遺伝子検査**の結果

菌株	食品	検査方法	菌添加食品 (保存前)	保存温度と日数								
				-20°C	5°C					25°C		
					1~9日	2日	3日	4日	7日	9日	2日	3~9日
A	①カレー	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		PCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		培養	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	②豚玉井	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		培養	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
B	①カレー	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		PCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		培養	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	②豚玉井	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		培養	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
C	①カレー	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		PCR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		培養	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	②豚玉井	LAMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		培養	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-

* *C.perfringens*(cpe+)の検出 ** LAMP法,PCR法

まとめ

食品および便を対象に、ウェルシュ菌エンテロトキシン遺伝子を直接検出する方法として、新しく設計したプライマーを用いたLAMP法について検討した結果、特異的に検出ができることが確認された。検出精度については培養法およびPCR法に比べて同等かそれ以上であった。

食中毒発生時には、ウェルシュ菌食中毒を迅速に判断することが要求されるため、対象食品や患者便の検査法として有用であると考えられた。

文献

- 1) 松下秀:腸管感染症におけるLAMP法の応用, モダンメディア50巻12号, 2004
- 2) 栄研化学株式会社研究開発統括部: LAMP法プライマー設計の手引き(Ver. 4). (株)栄研化学
- 3) Yuan-Tong Lin, Ronald Labbe: Enterotoxigenicity and Genetic and of *Clostridium perfringens* Isolates from Retail Foods in the United States
A. E. Microbiology, 1642-1646, Mar. 2003
- 4) Akemi Yano, Rika Ishimaru: Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* by Loop-Mediated Isothermal Amplification,
Journal. M. M68, 414-420, 2007
- 5) 門間千枝: 食中毒における毒素産生細菌とその毒素 7-ウェルシュ菌とエンテロトキシン, 食品衛生研究 Vol. 60, No. 3, 2010
- 6) 増谷寿彦, 佐藤秀美: 食品中のウェルシュ菌数に及ぼす保存温度の影響, 食品衛生学会, 埼玉, 2005