成績概要書（2008 年 1 月作成）

研究課題：LAMP 法による生乳のエンテロトキシンＡ産生黄色ブドウ球菌検出技術
（LAMP 法を用いたエンテロトキシンＡ産生黄色ブドウ球菌検出技術の開発）
担当部署：道立畜試　基盤研究部　遺伝子工学科
協力分担：（株）フロンティア研究所
予算区分：外部資金（都市エリア）
研究期間：2005～2007 年度（平成 17～19 年度）

１．目的

乳製品から検出されることがある黄色ブドウ球菌は、エンテロトキシンを産生して食中毒を起こす代表的な毒素型食中毒菌である。エンテロトキシンにはいくつかの型があるが、食中毒事例において分離される黄色ブドウ球菌はそのほとんどがＡ型単独あるいはＡ型との複合型のエンテロトキシンを産生する株である。本研究では乳製品の安全性確保のための迅速かつ正確な黄色ブドウ球菌検出技術の開発を目的として、LAMP 法を用いたエンテロトキシン A(SEA)産生黄色ブドウ球菌の検出技術を開発する。

２．方法

１）エンテロトキシン A 産生黄色ブドウ球菌検出のための LAMP 用プライマーの設計とその評価

２）LAMP 法を用いた生乳および乳製品からのエンテロトキシン A 産生黄色ブドウ球菌の検出

３．成果の概要

１）エンテロトキシン A 産生黄色ブドウ球菌検出のための LAMP 用プライマーの設計とその評価

①SEA 産生黄色ブドウ球菌検出用にデザインしたプライマーを用い、SEA 産生黄色ブドウ球菌 DNA を試料として LAMP 反応を行ったところ、検出が確認された。さらに、ループプライマーを加えてプライマーを計 6 本にすることで検出時間が短縮した（表 1、図 1）。 ②LAMP の反応温度について検討を行ったところ、61℃の条件で最も検出時間が短いことが確認された。 ③作製したプライマーでは SEA 遺伝子を保有する黄色ブドウ球菌以外の菌種は検出されず、特異性の高いプライマーであることが確認された。 ④黄色ブドウ球菌ゲノム DNA を試料とした検出感度の検討では、DNA の量が 5pg/tube 以上で検出が確認された。

２）LAMP 法を用いた生乳および乳製品からのエンテロトキシン A 産生黄色ブドウ球菌の検出

①作製したプライマーを用いた LAMP 法による生乳からの SEA 産生黄色ブドウ球菌検出について DNA 抽出法を検討したところ、溶菌酵素であるアクロモペプチダーゼと DNA 抽出試薬 InstaGene™ を組み合わせる方法を用いた場合に検出感度が最も良好であり、黄色ブドウ球菌数が 10^1 cfu/ml 以上の場合において検出が確認された（図 2、図 3）。 ②生乳からの黄色ブドウ球菌検出について LAMP 法と従来法との比較を行ったところ、LAMP 法では検出までに要する時間は 120 分間であり、他の方法と比較して短時間での検出が可能であった（表 2）。 ③LAMP 法による生乳からの黄色ブドウ球菌検出限界を確認したところ、菌数 10^3 cfu/ml レベルで 100%が検出された。 ④黄色ブドウ球菌を添加したナチュラルチーズ二種を用いて LAMP 法による SEA 遺伝子検出を行ったところ、それぞれ、菌数が 10^2cfu/g および 10^5 cfu/g 以上の場合において検出が可能であった。このことから一部のナチュラルチーズにおいても LAMP 法による黄色ブドウ球菌検出が利用可能であることが推察された。

以上のように、LAMP 法による迅速かつ正確な生乳のエンテロトキシン A 産生黄色ブドウ球菌検出技術を開発した。

表１　設計したプライマーの配列（SEA 遺伝子検出用、６本１組）

名称	配列	塩基数
F3	GCCGATCAATTTATGGCTAG	20
B3	TTGAATACTGTCCTTGAGC	19
FIP	TCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGAACAGTACCTTTGGAAACGG	43
BIP	CTGATGTTTTTGATGGGAAGGTTCGTAATTAACCGAAGGTTCT	43
LF	ACAGTTACATTTTTCTTATTCGT	23
LB	CAGAGGGGATTAATCGTGT	19

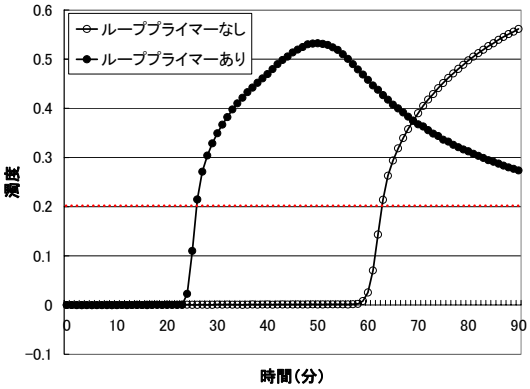

図１　作製プライマーを用いた
黄色ブドウ球菌遺伝子の検出

1. 生乳1mlを1.5mlチューブへ。
2. 12000rpm.、3min.、遠心。
3. 上清を捨てる。
4. 緩衝液1mlを沈澱に加え撹拌。
5. 12000rpm.、3min.、遠心。
6. 上清を捨てる。
7. 酵素液100μlを沈澱に加え懸濁。
8. 55℃、10min.培養。
9. InstaGene100μlを加える。
10. 56℃、15～30min.培養。
11. 10sec.撹拌。
12. 100℃、8min.ボイル。
13. 10sec.撹拌。
14. 10000rpm.、3min.遠心。
15. 上清を別のチューブに回収。
16. LAMP反応または-20℃保管。

図２　生乳からの黄色ブドウ球菌 DNA 抽出法
（アクロモペプチダーゼ＋InstaGene™ 法）

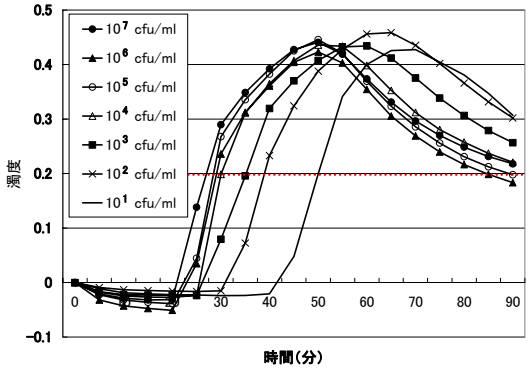

図３　LAMP による生乳中からの
SEA 遺伝子の検出

表２　各種黄色ブドウ球菌検出法の比較

方法	検出感度（生乳）	検出時間	価格（1テスト）
培養法	10^0 cfu/ml	48 時間	150～250 円
LAMP	10^3 cfu/ml	2 時間	約 3500 円
PCR	10^2～10^4cfu/ml	2.5～3 時間	約 3000 円
ELISA	10^6 cfu/ml	約 2 時間	約 3000 円
RPLA	10^7 cfu/ml	約 19 時間	約 1500 円

※RPLA:逆受身ラテックス凝集反応法

４．成果の活用面と留意点

１）LAMP 法を用いたエンテロトキシン A 産生黄色ブドウ球菌の検出技術は、食品加工現場および検査機関における検査法の一つとして利用できる。

２）本技術は作製したプライマーを含む試薬としてキット化されており、自主検査の一環として使用可能である。

５．残された問題とその対応

他の食中毒原因菌との同時検出の検討