

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査
の新規プラットフォーム開発に係る研究

令和 6 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 曾我 慶介

令和 7 年（2025 年） 5 月

目次	1
I. 総括研究報告（別添 3）	
核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究	2
曾我 慶介	
II. 分担研究報告（別添 4）	
1. 核酸等温増幅反応を用いた簡易核酸クロマト検査の検討	9
曾我 慶介	
2. 核酸等温増幅反応技術を用いた食中毒細菌検出	25
中山 達哉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表（別添 5）	39
IV. 倫理審査等報告書（別添 6）	40

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

総括研究報告書

「核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究」

研究年度終了報告書（令和6年度）

研究代表者：曾我 慶介 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部

研究要旨：近年の食品種の多様化、世界各国からの食品の輸入量及びその安全性確保需要増加に伴い、食品遺伝子検査の需要も増すものと考えられる。現在の食品遺伝子検査はリアルタイム PCR がゴールドスタンダードになっているが、機械が高価かつ時間がかかることが問題視されていた。一方で、遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法や Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は等温で数十分で反応が完了することから、定性検査法として医療分野では普及してきている。しかし、国内の食品遺伝子検査としては検討が進んでいないのが実情である。そこで本研究は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応の現状の情報収集を行い、その中から実用的な方法を選択して、サンプリングから結果の解析までの流れを鑑みて食品行政に係る遺伝子試験としての適用性を評価し、試験法として開発することを目的とする。

本年度は、オンサイトで結果を確認できる迅速検査法として、食中毒菌カンピロバクター (*Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli*) および遺伝子組換え (GM) トウモロコシ検査をモデルに、RPA または LAMP を用いた核酸クロマト目視判定試験紙 Printed Array Strip (C-PAS) を検討した。

カンピロバクター検査では、第一に RPA に用いるカンピロバクター用プライマー (*C. jejuni* 用及び *C. coli* 用) 及び細菌用陽性コントロール (PC) プライマーを複数設計し、検討を行った。検出限界濃度を評価したところ、反応温度 39°C 反応時間 30 分以内に *C. jejuni* 用 mapA-4 プライマーにおいて 0.1 pg/μL から 1 pg/μL、*C. coli* 用 ceuE-1 プライマーで 1 pg/μL、PC 用 16S-2 プライマーで 10 pg/μL と良好な感度を示した。次に、*C. jejuni* 陽性の鶏肉から増菌培養後のプレストン培地を用いて、RPA によるカンピロバクター検出を試みたところ、mapA の増幅が確認されたことから、迅速検出法として有用なことが示唆された。しかしながら、RPA-C-PAS の検討では、陰性試料からも増幅が確認され、偽陽性が多いことから適用することができなかった。

GM トウモロコシ検査では、陽性対照としてとうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (*SSIb*) を、GM の共通配列としてカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) および土壌細菌由来ノパリン合成酵素ターミネーター (TNOS) を標的とした RPA-C-PAS を検討した。しかしながら、陰性試料においても非特異的な増幅が検出されてしまい、現時点での適用はカンピロバクター検査同様に困難と考えられた。LAMP-C-PAS では、*SSIb*、P35S および TNOS において、Simplex-C-PAS が機能することを確認した。マルチプレックス化を検討した際、プライマー濃度を調整することで Duplex の *SSIb*/TNOS、P35S/TNOS は機能することを確認できた。しかし、Triplex 試験では増幅すべきものが確認できないことや、非特異的増幅が確認される等課題が残った。さらに、公定検査法として運用する際には、今回の検討でも確認された反応チューブ開閉時の作業環境汚染の問題を解決する必要がある、そのためには閉鎖系で実験から解析まで完了できる新たな検討が必要と考えられた。

以上を踏まえ、PCR を核酸等温増幅反応で完全に代替することは現時点では難しいとみられるが、まずは検査数の多いスクリーニング検査や即時結果を求められる場面で蛍光検出等の閉鎖系を前提とした核酸等温増幅反応の導入を検討していくことが、食品検査体制の効率化に繋がるものと考えられる。

研究分担者

中山 達哉 広島大学大学院統合生命科学研究科 教授

A. 研究目的

世界の食品安全性検査市場は 2022 年に 211 億米ドルと推定され、2027 年には 311 億米ドルに達し、8.1%の年次成長率になると予測されている (MarketsandMarkets 社報告、2022)。近年では、「培養肉」等の新規技術で開発された食品種が増えるとともに、世界の食品取引及び規制遵守を満たすための安全性確保需要も増加することから、結果的に食中毒等のリスクを低減し、かつ食品表示不正を防止するために世界各国で食品検査の需要が増大すると考えられる。そこで、今後輸入食品届出件数が増加し、検査すべき件数が増加した際に、迅速な対応が可能な食品の迅速簡便検査法の開発が有用と考えられる。

食品行政にかかる遺伝子検査（遺伝子組換え食品、アレルギー、微生物）はリアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) がゴールドスタンダードになっている。その理由として、特異性が高いことおよび高感度なことが挙げられる。しかし、PCR はサーマルサイクラーを用いて一定温度の多段階ステップを複数サイクル繰り返す必要があるため、高価な機械が必要なこと及び結果を得るまでに数時間がかかることが課題であった。従って、今後はリアルタイム PCR と同等の特異性・感度・精度を有しつつ、より簡便で検査速度を向上させた試験法の開発が求められている。

近年、遺伝子検出技術として様々な核酸等温増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、60-65°C の等温反応であり、インキュベーション時間も数十分と短時間で済むことから、世界的にも近年の

Covid-19 検査などの感染症診断の分野で適用され始めており、我々も LAMP 法を用いた DNA 粗抽出法や核酸ペーパークロマトグラフィの検討を進めている (Takabatake et al, 2018., Narushima et al, 2020)。Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は 20-45°C の反応温度でインキュベーション時間が最短 10 分未満という利便性を備えた核酸増幅であり、感染症診断分野での簡便迅速検査法として注目されている。一般に核酸等温増幅反応では、用いる酵素類が夾雑物に強いという特徴もあることから、DNA 抽出も簡便な方法に代替できる。しかしながら、食品行政に関わる公定検査法としての検討はあまり進んでいないのが実情である。

本年度は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応を用いたオンサイト利用を想定した検査法を開発するために、LAMP および RPA の核酸クロマト目視判定試験紙 Printed Array Strip (C-PAS) の開発を検討する。モデルとして、遺伝子組換え (GM) とうもろこし、及び食中毒菌カンピロバクターを標的とした。

B. 研究方法

1. 試料

国産とうもろこし穀粒および遺伝子組換え (GM) とうもろこし MON863 系統の認証標準物質 (ERM-BF416d、10%GMO、Merck) を用いた。

2. DNA 抽出

とうもろこし: Genomic-Tip 100G (QIAGEN) を用い、添付プロトコルに従い、ゲノム DNA を抽出した。

カンピロバクター煮沸法: 42°C で 48 時間前培養した菌を CHROMagar Campylobacter (CHROMagar, Paris, France) に画線塗抹し、42°C で 48 時間培養した後、シングルコロニーを釣菌した。TE バッファー 200 µL に菌を懸濁し、95°C で 10 分間、煮沸

した後、10,000 g で 10 分間遠心し、上清を採取し、DNA 液とした。

3. カンピロバクター特異的 RPA

プライマーの設計は *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*)用プライマーとして、*hipO* 及び *mapA* 遺伝子を標的に 8 セットのプライマー、*Campylobacter coli* (*C. coli*) 用プライマーとして、*ceuE* 遺伝子を標的に 9 セットのプライマーを設計した。また、細菌用陽性コントロール (PC) プライマーとして、16S rRNA 遺伝子を標的にしたプライマーを 5 セット設計した。

各プライマーと TwistAmp basic reaction (TwistDx) と混合し、39°C で 30 分間保温した。その後、アガロースゲル 3% で電気泳動し増幅産物を評価した。

研究室で保管されている *C. jejuni* 2 株 (14-492 及び 14-493) 及び *C. coli* 2 株 (14-1097 及び 14-1098) の DNA 1 ng/μL を用いて、上記の RPA 条件で標的遺伝子を増幅した。また、*C. jejuni* が CHROMagar *Campylobacter* から分離された鶏肉において、増菌後のプレストン培地 1 mL を採取し、煮沸法によって DNA 抽出し、RPA によって DNA を増幅後、アガロースゲル 3.0% にて泳動し、増幅産物を確認した。

3. RPA-C-PAS

クロマト目視判定試験紙 Printed Array Strip (以後、C-PAS と表記)、展開液、ラテックスビーズ、標的タグプライマーを TBA 社に生産委託した。GM とうもろこし：とうもろこしの陽性対照として、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (*SSIb*) を標的とした。GM の共通配列として、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) および土壌細菌由来ノパリン合成酵素ターミネーター (TNOS) を標的とした。カンピロバクター：*C. jejuni* 用プライマーとして *mapA*-4 (289 bp)、*C. coli* 用プライマーとして *ceuE*-

1 (199 bp) 及び PC 用プライマーとして 16S-2 (209 bp) を標的とした。

C-PAS 用に各フォワードプライマーに C-PAS とのハイブリタグ DNA を付加した。各リバープライマーには、アビジンコートされたラテックスと複合体を形成させるために、ビオチンを標識した。TwistAmp Basic Kit (TwistDx) に含まれる試薬を用い、GM とうもろこし検出では 37°C、カンピロバクター検出では 39°C で、30 分間保温した。保温後、チューブ蓋をあけ、増幅産物を純水で 5 ～10 倍希釈し、展開液 (塩濃度 150 mM)、ラテックス溶液、C-PAS を挿入し、約 10 分常温で静置し、着色を目視で確認した。

4. LAMP-C-PAS

RPA 同様に GM とうもろこしをモデルに検討した。*SSIb* 用プライマーは、PrimerExplorer (栄研化学) を用いて作成した。P35S は以前開発したもの (Takabatake et al, 2018, *J Agric Food Chem*) を、TNOS は既報のもの (Hardinge et al, 2018, *Sci Rep*) を利用した。Master Mix はニッポンジーン社製の LAMP MASTER を用いた。

各プライマーとマスターミックスを混合し、65°C、30 分間保温して反応させた。反応後、チューブ蓋をあけ、増幅産物を純水で 5 ～10 倍希釈し、展開液 (塩濃度 150 mM)、ラテックス溶液、C-PAS を挿入し、約 10 分常温で静置し、着色を目視で確認した。マルチプレックス LAMP を行う場合は、プライマー総モル量を変えず、標的毎にモル比を調節した。

増幅の確認を蛍光検出で行う場合は、反応は等温増幅蛍光測定装置 GeneLyzer FIII (日立キャノンメディカル) を用いて 65°C で 30 分間保温し、蛍光シグナルをリアルタイムで検出した。融解曲線分析では、LAMP 後に 1 秒当たり 0.05°C のスピードで 98°C から 80°C まで温度を下降させ、蛍光シグナルデータを取得した。

C. 研究結果

1. カンピロバクター特異的 RPA

本研究では *C. jejuni* 及び *C. coli* からそれぞれ 2 株ずつ使用し、*C. jejuni* 用 8 セット、*C. coli* 用 9 セット及び PC 用 5 セットのプライマーを用いて、標的遺伝子の RPA 増幅産物を評価した結果、*C. jejuni* 用プライマーでは、hipO-1、mapA-1、mapA-4 において、*C. coli* 用プライマーでは、ceuE-1、ceuE-3、ceuE-6 において、また、PC 用プライマーでは 16S-2、16S-3 において、アガロースゲル電気泳動にて標的遺伝子の増幅が良好に確認できた。

良好な結果を示したプライマーについて感度を評価したところ、*C. jejuni* 用では mapA-1、mapA-4、*C. coli* 用では ceuE-1、ceuE-6、PC 用では 16S-2、16S-3 のプライマーセットで DNA 濃度依存的に増幅産物が増加した。それぞれの検出限界濃度は、hipO-1 は 1~10 pg/μL で一部不明瞭、mapA-1、mapA-4 は 0.1~1 pg/μL、ceuE-1 は 0.1~1 pg/μL、ceuE-3 は一部不明瞭で、ceuE-6 は 10 pg/μL、16S-2 及び 16S-3 は 10 pg/μL であった。本結果から、mapA-1、mapA-4、ceuE-1、ceuE-6、16S-2 が良好にプライマーセットとして次の検討に用いた。

上記プライマー5 セットにおいて、プライマーの特異性を評価するために、鶏肉を汚染する可能性が高い病原菌である *Salmonella* 及び指標菌である *E. coli* との交差反応を試験した。本結果から、*C. jejuni* 用 mapA-1 及び mapA-4 と *C. coli* 用 ceuE-1 及び ceuE-6 のプライマーからはバンドは検出されなかった。一方、PC 用 16S-2 では *Salmonella*2023-S2 のみバンドが確認されたが、他の菌株では確認できなかった。

カンピロバクター公定法として使用されるプレストン培地の増菌液に関して、添加実験で RPA によるカンピロバクター検出を試みたところ、mapA-1、mapA-4 とともに検出された。さらに、鶏肉陽性検体からも同様に検出することを確認した。また、陰性コントロールでは不検出であった。PC

用 RPA においても、バンドは薄いながらも、すべてにおいて増幅が確認できた。

2. RPA-C-PAS (カンピロバクター)

プライマーセット (mapA-4、ceuE-1、16S-2) を用いて、オンサイト試験が可能な C-PAS を検討した。*C. jejuni* 用 mapA-4 及び *C. coli* 用 ceuE-1 の特異的プライマーのみを用いて、標的遺伝子を増幅し、クロマトグラフィにて検出した結果では、*C. jejuni* の DNA では、mapA-4 のみならず、ceuE-1 のバンドも確認された。また、*C. coli* の DNA から同様に、ceuE-1 だけではなく、mapA-4 のバンドも確認された。

さらに、マルチプレックスでプライマー mapA-4、ceuE-1 及び 16S-2 を混在させた結果では、*C. jejuni* 及び *C. coli* 両方の DNA で、3 カ所全てのバンドで陽性が確認された。

3. RPA-C-PAS (GM とうもろこし)

本検討では RPA をオンサイト検査が可能なプラットフォームとして、C-PAS による検出に適用できないか検討した。シングルプレックスで *SSIIb*、*P35S* および *TNOS* の各領域の増幅を確認したところ、陽性コントロールである GM とうもろこしの増幅指標位置に着色が確認されたが、陰性コントロールでも同様の濃さの着色が確認された。非特異的増幅はプライマー濃度および展開液にも起因することから、プライマー濃度を下げ、かつ展開液も非特異的増幅抑制剤が含まれるものを用いて検討を行ったところ、5 倍希釈時は陰性・陽性両コントロールで着色が認められた。10 倍希釈時は陰性・陽性両コントロールで着色が見られなかった。

陰性コントロールの増幅原因を調べるために、本法で用いたプライマーに加え、既報 (Liu et al, 2021, Food Chem) のプライマーを用いた RPA の増幅産物のアガロースゲル電気泳動で確認したが、

陰性コントロールでもスメア状バンドが確認された。

4. LAMP-C-PAS (GM とうもろこし)

GM とうもろこし検査をモデルとした *SSIIb*、P35S、TNOS マルチプレックス検査を検討した。昨年度利用した LAMP-*SSIIb* は、融解曲線ピークがブロードな形状を示していた。このブロードなピークは増幅産物が多様に含まれ、非特異的な増幅が多いことを示している。そこで、本研究では最初に *SSIIb* のプライマーの改良のため、PrimerExplorer によりプライマーを新たに 3 種類設計し、それらを用いて LAMP を行った検討した。プライマー *SSIIb*-Original-1 は増幅が確認されなかった。昨年度の検討で用いたプライマー *SSIIb*-Original-2 では陽性及び陰性の両コントロールで 12~13 分で増幅が確認され、融解曲線解析では 86~96°C でブロードな蛍光値変化が認められた。なお、陰性コントロールでの増幅は、前回の増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性とみられる。プライマー *SSIIb*-Original-3 は増幅が確認されたが、曲線の立ち上がりは 20 分以降と遅く、融解曲線も 85~91°C とブロードなピークが確認された。プライマー *SSIIb*-Original-4 は、16 分で陽性コントロールでのみ増幅が確認され、かつ 90°C 付近をピークとしたシャープな融解曲線が確認された。よって、非特異的な増幅が少ないと考えられる以後は *SSIIb*-Original-4 のプライマーペアを用いることにした。

次に、C-PAS を行うためのハイブリダイゼーションタグとビオチン標識の組み合わせを検討した。LAMP はプライマー 6 種類用いるため、様々な標識パターンが想定されうるが、今回はハイブリダイゼーションタグを FIP または LoopF プライマーに、ビオチンを BIP または LoopB に標識し、それぞれの組み合わせの中からシグナル感度が高く、特異性が良好なものを選抜することにした。LAMP-C-PAS を行ったところ、今回検討した全て

の組み合わせにおいて、陽性コントロールでのみ目的のラインに青の着色が確認された。続いて、その増幅産物の有無をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、全ての組み合わせにおいて、陽性コントロールでのみ LAMP 特有のラダー状のバンドが認められた。よって、用いた組み合わせのどれに関しても C-PAS で検出が可能と判断されたが、以降の検討は FIP に F1 タグ、BIP にビオチンを標識した組み合わせを利用した。次に P35S と TNOS による蛍光検出および C-PAS での増幅を確認した。リアルタイム蛍光検出では、P35S は約 14 分後に、TNOS は約 20 分後に増幅が確認でき、融解曲線ピークもそれぞれ 86~87°C、80~81°C 付近にシャープなものが認められた。C-PAS では、P35S および TNOS どちらも目的の位置に着色が確認された。よって、Simplex-LAMP は全て機能することが確認された。

次に C-PAS のマルチプレックス化の検討のため、各プライマーセットを混合して、Duplex あるいは Triplex-LAMP-C-PAS を検討した。リアルタイム蛍光検出結果より、TNOS-LAMP 速度は *SSIIb* と P35S の LAMP 速度と比較して遅いため、TNOS プライマー濃度を濃く調製して検討したところ、*SSIIb*/TNOS の Duplex-LAMP ではプライマーモル比 1 : 7 の時に GM とうもろこしで *SSIIb* と TNOS の両方で着色が認められた。また、非 GM とうもろこしでは *SSIIb* の着色のみ認められた。P35S/TNOS の Duplex-LAMP では TNOS の着色が薄いプライマーモル比 1 : 2 時に、GM とうもろこしで両方の着色が確認された。また、非 GM とうもろこしでは着色が認められなかった。よって、*SSIIb*/TNOS および P35S/TNOS の Duplex-LAMP はマルチプレックス検査として機能することが示唆された。一方で、*SSIIb*/P35S の Duplex-LAMP および *SSIIb*/P35S/TNOS の Triplex-LAMP も検討を行ったが、増幅されるべき反応が認められないことや非特異的な増幅が認められる等の運用するための問題が残った。

D. 考察

1. カンピロバクター特異的 RPA

既往の研究では RPA 法を用いて、*C. jejuni* の検出を報告している (Geng et al. 2023)。Chen らの報告では *C. jejuni* の *hipO* 遺伝子を主に標的としたものであり、検出限界濃度は 46 CFU/mL と結果を報告している。DNA 抽出法は煮沸法を用いているが、加えて cellulose paper dipstick を用いて、効率的に DNA を抽出している。本研究では、*mapA* 遺伝子を主標的とした RPA 用プライマーを設計し、検出限界濃度は DNA 濃度 0.1~1 pg/ μ L を示した。本研究において、我々も CFU での計測を試みたが、カンピロバクターのコロニー計算は若干工夫が必要なことから、本研究では正確に計測できなかった。しかしながら、*C. jejuni* 1 コロニーあたりの DNA 濃度は 0.142 ng/ μ L であったことから、本結果における感度は、低いものではないと考える。また、*C. coli* 特異的 RPA に関しては、未だ報告はない。それゆえ、今回設計したカンピロバクターの RPA 用プライマーは新規性が高いと考えられる。一方で、細菌用陽性コントロールプライマーとして 16S rRNA を標的にプライマーを設計したが、一部のサルモネラや大腸菌で増幅を確認できなかったことから、プライマーの特異性に関しては、今後、さらに改良が必要と考えている。

本研究ではカンピロバクターの公定法で用いられるプレストン増菌液からの RPA による検出を検討し、*mapA* を指標に検出が可能であった。本結果のように増菌液からカンピロバクターが直接検出可能であれば、遺伝子検査で用いられる PCR と同等に利用できると考えられ、通常の培養による検査法よりも時間を短縮することが可能と考えられる。

2. RPA-C-PAS

オンサイト検査での応用を見据えて、本研究ではカンピロバクターおよび GM とうもろこしに 2

種類のモデルで RPA を C-PAS への応用を検討した。しかしながら、カンピロバクターおよび GM とうもろこしどちらの場合も陰性コントロールで本来出るべきでない着色バンドが認められた。増幅産物のゲル電気泳動図でもスメアとみられるものが確認されており、非特異的な増幅産物により、偽陽性が多い検出系と考えられる。よって、RPA を用いた検査法を検討する際は、ゲル電気泳動による増幅産物の確認、または加水分解蛍光プローブを用いたリアルタイム蛍光検出が適当と考えられる。温度帯は 37°C 付近、反応速度も 30 分以内というメリットが活かされる検査法開発が望まれる。

3. LAMP-C-PAS

今回、GM とうもろこしのスクリーニング検査として適用することを念頭に、GM とうもろこしの C-PAS を検討した。とうもろこし内在性遺伝子検査は *SSIIB* を標的として、蛍光検出から、C-PAS の Simplex-検査までを良好なプライマーセットをデザインすることができた。続いて、P35S や TNOS を対象とした C-PAS も既存の方法を用いて良好な Simplex-検査結果を得ることができた。しかし、C-PAS のマルチプレックス化において、プライマーの組み合わせの最適な条件を組むことが難しく、今回機能することが確認できたのは *SSIIB*/TNOS または P35S/TNOS の Duplex-LAMP-C-PAS に留まった。LAMP ではプライマーを 6 種類添加するため、標的が増えるにつれて、プライマー間の相互作用の組み合わせは PCR と比較して劇的に増加していく。すなわち、予期せぬプライマーダイマーが生じる可能性が高くなり、PCR と比較してマルチプレックス化を難化させている。今回 3 セットのプライマーで検討を行ったが、各反応のマルチプレックス化を行う場合は、さらに多数の組み合わせの検討を要すると考えられる。さらには、C-PAS は一度反応を終えたチューブを開封して、クロマト試験紙を挿入することから、開封時に増

幅した多数の DNA が大気中に拡散し、作業環境を汚染するリスクが大いにある。実際に、検討実験の後半においては陰性コントロールで本来増幅する可能性のない反応系で非特異的な増幅が多数確認され、本研究進捗の足枷となった。作業環境汚染による偽陰性が生じる系では、公定試験法として運用する上の大きな障壁となるだろう。この問題をクリアするには、閉鎖系で反応からクロマト試験紙に展開するような器具を専用で開発することが望ましい。本研究班ではそこまで至らなかったが、実用に向けて検討を続ける。

4. 核酸等温増幅反応の今後の活用について

これまでの検討を踏まえると、PCR を核酸等温増幅反応で完全に代替することは現時点では難しいとみられるが、まずは検査数の多いスクリーニング検査や即時結果を求められる場面で、LAMP や RPA といった蛍光検出等の閉鎖系を前提とした核酸等温増幅反応の導入を検討していくことが、食品検査体制の効率化に繋がるものと考えられる。

E. 結論

本研究では鶏肉からカンピロバクター迅速検出を目的に RPA を検討した。カンピロバクター用及び細菌用陽性プライマーを検討したところ、*C. jejuni* 用 mapA-4 プライマーでは検出限界濃度 0.1 ~1 pg/μL、*C. coli* 用 ceuE-1 では検出限界濃度 0.1 ~1 pg/μL、PC 用 16S-2 プライマーでは検出限界濃度 10 pg/μL と良好な感度であった。mapA-4、ceuE-1 プライマーは特異性に関して問題は確認されなかったが、16S-2 プライマーでは、一部細菌において増幅されなかった。*C. coli* 特異的 RPA は報告がないため、体温付近温度帯で実行可能な迅速検査として新規性が高い。さらに、カンピロバク

ター陽性の鶏肉検体を用いて、プレストン増菌液から RPA によるカンピロバクター迅速検出が可能であったことから、RPA 法を簡便検査法として使用できる可能性を示した。しかしながら、オンサイト検査を想定し、C-PAS に応用した結果では、良好な結果が得られなかったことから、C-PAS への展開には更なる改良が必要と考える。

GM とうもろこし検査でも同様に RPA の C-PAS を検討したが、RPA-C-PAS は陰性コントロールでも増幅が確認され、適用が難しい結果となった。LAMP-C-PAS では Simplex 検査および一部 Duplex 検査は機能することを確認したが、Triplex 検査ではうまく機能しなかったことから、今後検討が必要である。さらに、今後公定検査法として C-PAS を適用するには、作業環境汚染による偽陽性の問題をクリアする必要がある、閉鎖系の反応を構築することが必要と考えられた。

今後は、検査数の多いスクリーニング検査や現場の即時結果を求められる場面で、LAMP や RPA といった蛍光検出等の閉鎖系を前提とした核酸等温増幅反応の導入を検討していくことが、食品検査体制の効率化に繋がるものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表・業績

・曾我慶介、中山達哉、柴田識人「全国検査機関を対象とした核酸等温増幅反応による迅速遺伝子検査需要調査」第 61 回全国衛生化学技術協議会年会、堺市、2024 年 11 月 22 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究」
令和6年度 分担研究報告書

核酸等温増幅反応を用いた簡易核酸クロマト検査の検討

研究分担者 曾我 慶介 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 室長

研究要旨：近年の食品種の多様化、世界各国からの食品の輸入量及びその安全性確保需要の増加に伴い、我が国における食品遺伝子検査数も増すことが見込まれる。現在の食品遺伝子検査はリアルタイム PCR がゴールドスタンダードになっているが、機械が高価かつ時間がかかることが問題視されていた。一方で、他分野では遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。特に、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法や Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は等温でかつ数十分で反応が完了することから、定性検査法として医療分野では普及が進んでいる。しかし、国内の食品遺伝子検査としては検討が進んでいないのが実情である。そこで本研究は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応の現状の情報収集を行い、その中から実用的な方法を選択して、サンプリングから結果の解析までの流れを鑑みて食品行政に係る遺伝子試験としての適用性を評価し、試験法として開発することを目的とする。

本研究では、オンサイトで迅速に結果を確認できる試験法として、遺伝子組換え (GM) トウモロコシ検査をモデルに、RPA または LAMP を用いた核酸クロマト目視判定試験紙 Printed Array Strip (C-PAS) を検討した。とうもろこしの陽性対照として、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素IIb (SSI**IIb**) を、GM の共通配列として、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) および土壌細菌由来ノパリン合成酵素ターミネーター (TNOS) を標的とした。RPA-C-PAS では、非特異的な増幅が検出されて、偽陽性が多いことから現時点での適用は困難と考えられた。LAMP-C-PAS では、SSI**IIb**、P35S および TNOS において、Simplex-C-PAS が機能することを確認した。しかし、マルチプレックス化を検討した際に、プライマー濃度を調整することで Duplex の SSI**IIb**/TNOS、P35S/TNOS は機能することを確認できたが、Triplex 試験などは増幅するべきものが確認できないことや、非特異的な増幅が確認される等課題が残った。さらに、公定検査法として運用する際には、反応チューブ開閉時の作業環境汚染の問題を解決する必要がある、そのためには閉鎖系で実験から解析まで完了できる新たな検討が必要と考えられた。

A. 研究目的

世界の食品安全性検査市場は 2022 年に 211 億米ドルと推定され、2027 年には 311 億米ドルに達し、8.1%の年次成長率になると予測されている (MarketsandMarkets 社、2022)。近年では、「培養肉」等の新規技術で開発された食品種が増えるとともに、世界の食品取引及び規制遵守を満

たすための安全性確保需要も増加することから、結果的に食中毒等のリスクを低減し、かつ食品表示不正を防止するために世界各国で食品検査の需要が増すと考えられる。

食品行政にかかる遺伝子検査（遺伝子組換え食品、アレルゲン、微生物）はリアルタイム Polymerase Chain Reaction (PCR) がゴールドスタ

ンダードになっている。その理由として、特異性が高いことおよび高感度なことが挙げられる。

しかし、PCR はサーマルサイクラーを用いて特定温度の多段階ステップを複数サイクル繰り返す必要があるため、高価な機械が必要なこと及び結果を得るまでに数時間がかかることが課題であった。従って、今後はリアルタイム PCR と同等の特異性・感度・精度を有しつつ、より簡便で検査速度を向上させた試験法の開発が求められる。

近年、遺伝子検出技術として様々な等温核酸増幅反応の有用性が報告されている。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法は、60-65°Cの等温反応であり、インキュベーション時間も数十分と短時間で済むことから、世界的にも近年の Covid-19 検査などの感染症診断の分野で適用され始めており、我々も LAMP 法を用いた DNA 粗抽出法やラテラルフロー法の検討を進めている (Takabatake et al, 2018, *J Agric Food Chem*, Narushima et al, 2020, *Biosci Biotechnol Biochem*)。Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は 20-45°Cの反応温度でインキュベーション時間が最短 10 分未満という利便性を備えた核酸増幅であり、蛍光プローブで検出する方法に加え、CRISPR-Cas システムを応用した DNA endonuclease-targeted CRISPR trans reporter (DETECTR) (Chen et al, 2018, *Science*) 等は感染症診断分野での高感度検査法として特に注目されている。一般に等温核酸増幅反応では、PCR と比べて DNA ポリメラーゼが夾雑物に強いという特徴を有することから、DNA 抽出も簡便な方法に代替されうる。しかしながら、食品行政に関わる公定検査法としての検討はあまり進んでいないのが実情である。

昨年度までの検討で、文献調査や簡易 DNA 抽出のしやすさから RPA の有用性を確認している。

本年度は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応を用いた核酸クロマト技術の検査法として応用について検討を行う。

B. 研究方法

試料

国産とうもろこし穀粒および遺伝子組換え (GM) とうもろこし MON863 系統の認証標準物質 (ERM-BF416d、10%GMO、Merck) を用いた。

ゲノム抽出

Genomic-Tip 100G (QIAGEN) を用いて、添付プロトコールに従い、ゲノム DNA を抽出した。

RPA-C-PAS

クロマト目視判定試験紙 Printed Array Strip (以後、**C-PAS** と表記)、展開液、ラテックスビーズ、標的タグプライマーを TBA 社に生産委託した。GM とうもろこしをモデルに、とうもろこしの陽性対照として、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (*SSIIB*) を標的とした。GM の共通配列として、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) および土壌細菌由来ノパリン合成酵素ターミネーター (TNOS) を標的とした。RPA 用プライマー及びプローブを用いた (表 1)。C-PAS 用に各フォワードプライマーに C-PAS とのハイブリタグ DNA を付加した。各リバースプライマーには、アビジンコートされたラテックスと複合体を形成させるために、ビオチンを標識した。RPA-C-PAS の概要を図 1 に示した。TwistAmp Basic Kit (TwistDx) に含まれる試薬を用い、下記の通りに反応溶液を調製した。

Rehydration Buffer	29.6 μ L
純水	9.2 μ L
Primer-F (10 μ M)	2.4 μ L (480 nM)
Primer-R (10 μ M)	2.4 μ L (480 nM)
Total	43.6 μ L

上記組成で PCR チューブ内に調製・混和し、2 個の PCR チューブにそれぞれ 21.8 μL ずつ分注した。

分注した各チューブに DNA 抽出液 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$) を 2.0 μL 加えた後、蓋に MgOAc (280 mM) 1.2 μL を滴下し、遠心で落とすことで混合し、反応を開始した。反応中は Veriti サーマルサイクラー (ThermoFisherScientific) を用いて、37°C、30 分間保温した。保温後、チューブ蓋をあけ、増幅産物を純水で 5~10 倍希釈し、展開液 (塩濃度 150 mM)、ラテックス溶液、C-PAS を挿入し、約 10 分常温で静置し、着色を目視で確認した。

LAMP-C-PAS

RPA 同様に GM とうもろこしをモデルに検討した。*SSI**II**b* 用プライマーは、PrimerExplorer (栄研化学) を用いて作成した。P35S は以前開発したもの (Takabatake et al, 2018, *J Agric Food Chem*) を、TNOS は既報のもの (Hardinge et al, 2018, *Sci Rep*) を利用した。配列を表 2 に示した。LAMP-C-PAS の概要を図 4 に示した。Master Mix はニッポンジーン社製の LAMP MASTER を用いた。

・ 10×LAMP プライマー Mix

50 μM FIP	12.8 μL (16 μM)
50 μM BIP	12.8 μL (16 μM)
50 μM F3	1.6 μL (2 μM)
50 μM B3	1.6 μL (2 μM)
50 μM LoopF	6.4 μL (8 μM)
50 μM LoopB	6.4 μL (8 μM)
純水	38.4 μL
Total	80 μL

C-PAS の場合は以下の組成で反応させた。

・ 反応溶液調製 (1 ウェル当たり)

DNA 抽出液 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	4 μL
2×LAMP MASTER	10 μL
5×LAMP プライマー Mix	4 μL
純水	2 μL
Total	20 μL

65°C、30 分間保温後、チューブ蓋をあけ、増幅産物を純水で 5~10 倍希釈し、展開液 (塩濃度 150 mM)、ラテックス溶液、C-PAS を挿入し、約 10 分常温で静置し、着色を目視で確認した。マルチプレックス LAMP を行う場合は、プライマー総モル量を変えず、標的毎にモル比を調節した。

増幅の確認を蛍光検出で行う場合は、以下の組成で行った。

・ 反応溶液調製 (1 ウェル当たり)

DNA 抽出液 (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$)	4 μL
2×LAMP MASTER	10 μL
5×LAMP プライマー Mix	4 μL
10×インターカラータ Mix	2 μL
Total	20 μL

反応は等温増幅蛍光測定装置 GeneLyzer FIII (日立キャノンメディカル) を用いて 65°C で 30 分間保温し、蛍光シグナルをリアルタイムで検出した。融解曲線分析では、LAMP 後に 1 秒当たり 0.05°C のスピードで 98°C から 80°C まで温度を降させ、蛍光シグナルデータを取得した。

C. 研究結果

RPA-C-PAS (核酸クロマト法)

RPA はこれまで電気泳動および蛍光プローブを用いたリアルタイム検出ではワークすることが確認されている。本検討では RPA を C-PAS による検出に適用できないか検討した。GM とうもろこしをモデルに、RPA-C-PAS の系を設計した (図 1)。シングルプレックスで *SSI**II**b*、P35S および TNOS の各領域の増幅を確認したところ、陽性コントロール GM とうもろこしの増幅指標位置に着色が確認されたが、陰性コントロールでも同様の濃さの着色が確認された (図 2A)。非特異的増幅はプライマー濃度および展開液にも起因することから、プライマー濃度を下げ、かつ展開液も非特異的増幅抑制剤が含まれるもの

を用いて検討を行ったところ、5 倍希釈時は陰性・陽性両コントロールで着色が認められた（図 2B）。10 倍希釈時は陰性・陽性両コントロールで着色が見られなかった。

陰性コントロールの増幅原因を調べるために、本法で用いたプライマーに加え、既報（Liu et al, 2021, Food Chem）のプライマーを用いた RPA の増幅産物のアガロースゲル電気泳動で確認したところ、陰性コントロールでもしばしばスメア状バンドが確認されることがあった（図 3）。

LAMP-C-PAS（核酸クロマト法）

LAMP は既に、C-PAS の報告がなされているが、本検討で図 4 に示した構想で、GM とうもろこし検査をモデルとした *SSI**II**b*、P35S、TNOS マルチプレックス検査を検討した。昨年度利用した LAMP-*SSI**II**b* は、融解曲線ピークがブロードな形状を示していた。このブロードなピークは増幅産物が多様に含まれ、非特異的な増幅が多いことを示している。そこで、本研究では最初に *SSI**II**b* のプライマーの改良を検討した。PrimerExplorer によりプライマーを新たに 3 種類設計し、それらを用いて LAMP を行った検討結果を図 5 に示した。プライマー *SSI**II**b*-Original-1 は増幅が確認されなかった。昨年度の検討で用いたプライマー *SSI**II**b*-Original-2 では陽性及び陰性の両コントロールで 12～13 分で増幅が確認され、融解曲線解析では 86～96℃でブロードな蛍光値変化が認められた。なお、陰性コントロールでの増幅は、前回の増幅産物のキャリーオーバーによる偽陽性とみられる。プライマー *SSI**II**b*-Original-3 は増幅が確認されたが、曲線の立ち上がり方が 20 分以降と遅く、融解曲線も 85～91℃とブロードなピークが確認された。プライマー *SSI**II**b*-Original-4 は、16 分で陽性コントロールでのみ増幅が確認され、かつ 90℃付近をピークとしたシャープな融解曲線が確認された。よって、非特異的な増幅が少ないと考えられる以後は

*SSI**II**b*-Original-4 のプライマーペアを用いることにした。

次に、C-PAS を行うためのハイブリゼーションタグとビオチン標識の組み合わせを検討した。LAMP はプライマー 6 種類用いるため、様々な標識パターンが想定されるが、今回はハイブリダイゼーションタグを FIP または LoopF プライマーに、ビオチンを BIP または LoopB に標識し、それぞれの組み合わせ①～④（図 6A）の中からシグナル感度が高く、特異性が良好なものを選抜することにした。LAMP-C-PAS を行ったところ、組み合わせ①～④全てにおいて、陽性コントロールでのみ F1 のライン（図 4）に青の着色が確認された（図 6B）。続いて、その増幅産物の有無をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、全ての組み合わせにおいて、陽性コントロールでのみ LAMP 特有のラダー状のバンドが認められた（図 6C）。よって、用いた組み合わせのどれに関しても C-PAS で検出が可能と判断されたが、以降の検討は標識の組み合わせ①を利用した。P35S と TNOS による蛍光検出および C-PAS での増幅を確認し、その結果を図 7 に示した。リアルタイム蛍光検出では、P35S は約 14 分後に、TNOS は約 20 分後に増幅が確認でき、融解曲線ピークもそれぞれ 86～87℃、80～81℃付近にシャープなものが認められた。C-PAS では、P35S および TNOS どちらも目的の位置に着色が確認された。よって、Simplex-LAMP は全て機能することが確認された。

次に C-PAS のマルチプレックス化の検討のため、各プライマーセットを混合して、Duplex あるいは Triplex-LAMP-C-PAS を検討した。図 5、7 に示した通り、TNOS-LAMP 速度は *SSI**II**b* と P35S の LAMP 速度と比較して遅いため、TNOS プライマー濃度を濃く調製して検討したところ、*SSI**II**b*/TNOS の Duplex-LAMP ではプライマーモル比 1 : 7 の時に GM とうもろこしで *SSI**II**b* と TNOS の両方で着色が認められた（図 8A）。ま

た、非 GM とうもろこしでは *SSI**II**b* の着色のみ認められた。P35S/TNOS の Duplex-LAMP では TNOS の着色が薄いプライマーモル比 1 : 2 時に、GM とうもろこしで両方の着色が確認された (図 8B)。また、非 GM とうもろこしでは着色が認められなかった。よって、*SSI**II**b*/TNOS および P35S/TNOS の Duplex-LAMP はマルチプレックスとして機能することが示唆された。一方で、*SSI**II**b*/P35S の Duplex-LAMP および *SSI**II**b*/P35S/TNOS の Triplex-LAMP も検討を行ったが、増幅されるべき反応が認められないことや非特異的な増幅が認められる等の運用するための問題が残った (データ示さず)。

D. 考察

RPA-C-PAS

RPA を C-PAS で取り扱った報告がまだ存在しないため、本研究で初めて検討を行ったところ、標的とした 3 つの配列についていずれも陰性コントロールにおいて非特異的なシグナルが認められた。既に RPA の加水分解プローブ法および、核酸クロマト技術で既に論文で報告されているプライマーを用いても、RPA は電気泳動時に陰性コントロールでスミアが確認されることから、C-PAS で検出されるものは必ずしも標的の増幅を示すものではなく、プライマーダイマーや非特異的な増幅を検知していると考えられる。RPA の加水分解プローブを用いた系では、Tetrahydrofuran および C3-Spacer をオリゴに導入することが一般的で、生産コストが高いという問題点があり、RPA の低コスト化のための導入には適さない。また、既報 (Hardinge et al, 2018, *Sci Rep*) では、オリゴ DNA の 5'側に蛍光標識またはビオチンの抗体をマウントした抗原抗体反応を利用した試験紙であるのに対し、本研究では DNA タグとのハイブリダイゼーションする核酸をマウントした C-PAS のため、増幅産物のト

ラップ様式が異なっている。最適化にはさらなる検証が必要であると考えられる。

研究開始時は RPA で利用するポリメラーゼは TwistDx 社しか取り扱いがなかったが、ThermoFisher 社などからも販売が開始している。今後、試薬に関しては汎用性が高くなると予想されるが、第一は蛍光検出や電気泳動による確認がメインになると考えられる。

LAMP-C-PAS

LAMP-C-PAS に関しては GM 食品検査においては、パパイヤ等で既に報告されている (Takabatake et al, 2018, *J Agric Food Chem*, Takabatake et al, 2023, *Biol Pharm Bull*)。今回、GM とうもろこしのスクリーニング検査として適用することを念頭に、GM とうもろこしの C-PAS を検討した。とうもろこし内在性遺伝子検査は *SSI**II**b* を標的として、蛍光検出から、C-PAS の Simplex-検査までを良好なプライマーセットをデザインすることができた。続いて、P35S や TNOS を対象とした C-PAS も既存の方法を用いて良好な Simplex-検査結果を得ることができた。しかし、C-PAS のマルチプレックス化において、プライマーの組み合わせの最適な条件を組むことが難しく、今回機能することが確認できたのは *SSI**II**b*/TNOS または P35S/TNOS の Duplex-LAMP-C-PAS に留まった。LAMP ではプライマーを 6 種類添加するため、標的が増えるにつれて、プライマー間の相互作用の組み合わせは PCR と比較して劇的に増加していく。すなわち、予期せぬプライマーダイマーが生じる可能性が高くなり、PCR と比較してマルチプレックス化を難化させている。今回 3 セットのプライマーで検討を行ったが、各反応のマルチプレックス化を行う場合は、さらに多数の組み合わせの検討を要すると考えられる。さらには、C-PAS は一度反応を終えたチューブを開封して、クロマト試験紙を挿入することから、開封時に増幅した

多数の DNA が大気中に拡散し、作業環境を汚染するリスクが大いにある。実際に、作業の後半においては陰性コントロールで本来増幅する可能性のない反応系で非特異的な増幅が多数確認され、本研究の足枷となった。作業環境汚染による偽陰性が生じる系では、公定試験法として運用する上の大きな障壁となるだろう。この問題をクリアするには、閉鎖系で反応からクロマト試験紙に展開するような器具を専用で開発することが望ましい。本研究班ではそこまで至らなかったが、実用に向けて検討を続ける。

E. 結論

RPA および LAMP のクロマト試験検査として GM とうもろこし検査をモデルに C-PAS を検討した。RPA-C-PAS は陰性コントロールでも増幅が確認され、適用が難しい結果となった。LAMP-

C-PAS では Simplex 検査および一部 Duplex 検査は機能することを確認したが、Triplex 検査ではうまく機能しなかったことから、今後検討が必要である。さらに、今後公定検査法として C-PAS を適用するには、作業環境汚染による偽陽性の問題をクリアする必要がある、閉鎖系の反応を構築することが必要と考えられた。

F. 研究発表・業績

・曾我慶介、中山達哉、柴田識人「全国検査機関を対象とした核酸等温増幅反応による迅速遺伝子検査需要調査」第 61 回全国衛生化学技術協議会年会、堺市、2024 年 11 月 22 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

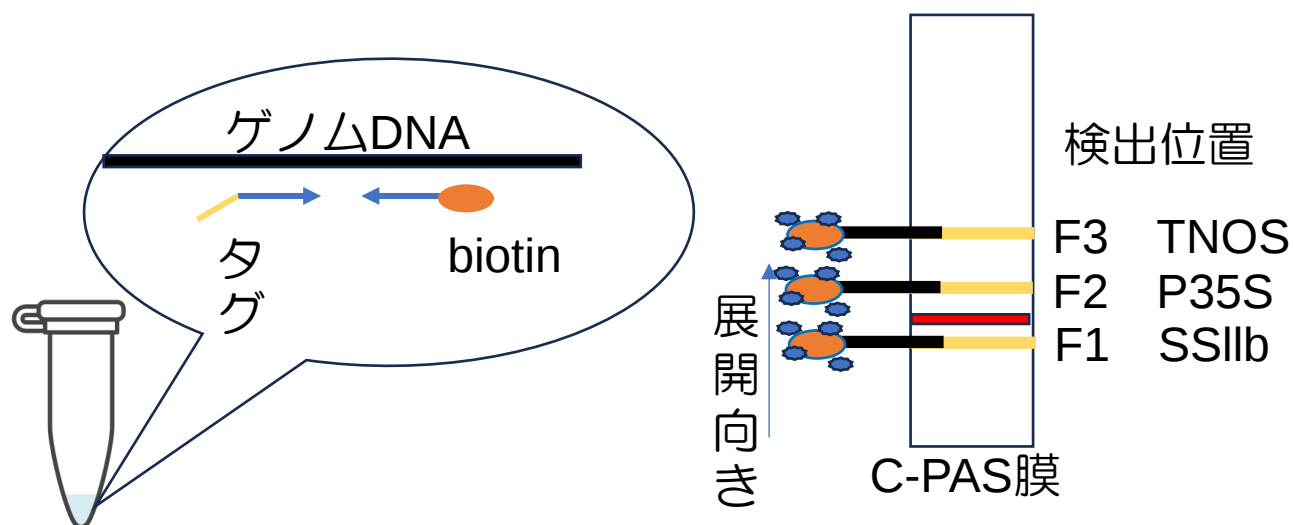
表 1 RPA用プライマー

	遺伝子名	プライマー名	オリゴ配列(5'-3')	増幅長	C-PAS時	参照
とうもろこし 内在性遺伝子	SSIIb	SSIIb-rpa-fw9	ccgaagcaaagtcagagcgctg caatgcaa	183 bp	F1タグ	オリジナル
		SSIIb-rpa-rv8	gctttccaccggcttagcatcatc acctgc		ビオチン タグ	
GM配列	P35S	p35s-rpa1-Fw5	tgatatctccactgacgtaaggg atgacgc	100 bp	F2タグ	オリジナル
		p35s-rpa1-Rv	ccctgtcctctccaaatgaaatg aactcc		ビオチン タグ	
	P35S- 2"	RPA-P-35s-F2	cctctgccgacagtgggtccaaa gatggacc	123 bp		Liu et al Food Chem, 2021
		RPA-P-35s-R	cccttacgtcagtgagatatca catcaatcc			
	TNOS	12-NOS-F	gatcgttcaaacatttggaata aagtttct	220 bp	F3タグ	Ding et al, JAR, 2024
		12-NOS-R	atttatcctagtttgcgcgctata ttttgtt		ビオチン タグ	

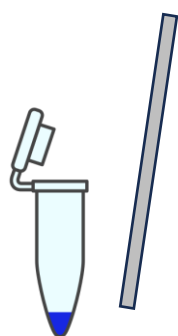
表 2 LAMP-C-PAS用プライマー

遺伝子	プライマー 役割	オリゴ配列	C-PAS時	参考文献
SSIIb	F3	GCTCCGAAGCAAAGTCAGA		Original-1
	B3	CTTAGCATCCACCGTTTCTAG		
	FIP	CAGCTTTGGGTCCGGACACCGCGCTGCAATGCAAAACG		
	BIP	AGAGAAATCGATGCCAGTGCGGGCTTCCACCGGTCTAGC		
	LoopF	TGCTGCCCCCACTCGTT		
	LoopB	TGAAGCCAGAGCCCGCA		
	F3	GATTCTGCTTCACCTCCCAA		Original-2 令和5年度 研究報告書 で用いたもの
	B3	GTCTAGCATCATCACCTGCG		
	FIP	GCCCCCACTCGTTCCGTTTTGCCTTTGACATCTGCTCCGAA		
	BIP	GGTGTCCGGACCCAAAGCTGGCACTGGCATCGATTCTCT		
	LoopF	GCAGCGCTCTGACTTTGC		
	LoopB	TCATCCATCAGCTCCTGTCAC		
F3	GACCCAAAGCTGATCATCCA		Original-3	
B3	GGCCAGGTTTATTATCCTCC			
FIP	CATCATCACCTGCGGGCTCTG-TCAGCTCCTGTCACCAAGA			
BIP	AAGCATAGGCATCGCTGAACCG-CATAAGGAGCACTCGCCG			
LoopF	CGCACTGGCATCGATTCTC			
LoopB	CTAAGGCTGATGCAGCTCCGG			
F3	GATGCCAGTGCGGTGAAG		Original-4	
B3	GGAGCACATTGAGAAGCCA			
FIP	CCGGAGCTGCATCAGCCTTAGATGATGCTAGACCGGTGGAA	F1タグ ビオチン標識		
BIP	GGCGGCGAGTGCTCCTTATGCACATTAGGCCAGCCAA			
LoopF	GGTTCAGCGATGCCTATGCT			
LoopB	ACAGGGAGGATAATGAACCTGG			
P35S	F3	ATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCG		Takabatake et al, 2018, J Agric Food Chem
	B3	ACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTC		
	FIP	GAAGACGTGGTTGGAACGTCTTCTTAGTGGTCCCAAAGATGGA		
	BIP	GCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCTTGCGAAGGATAGTGGGA		
	LoopF	TTTCCACGATGCTCCTCG	F2タグ	
	LoopB	CGTAAGGGATGACGCACA	ビオチン標識	
TNOS	F3	CGCGATAATTTATCCTAGTTTG		Hardinge et al, 2018, Sci Rep
	B3	CGTTCAAACATTTGGCAAT		
	FIP	GCATGACGTTATTTATGAGATTTTCGCGCTATATTTGTTTTCTA	F3タグ	
	BIP	CATGCTTAACGTAATTCAACATTTTGAATCCTGTTGCCGGTC		
	LoopF	GATTAGAGTCCCGCAATTATAC		
	LoopB	AAATTATATGATAATCATCGCAA		

①増幅 37°C、30分



②ラテックス液（展開液）
＋C-PASを挿入



③展開（常温、10分）
目視検出

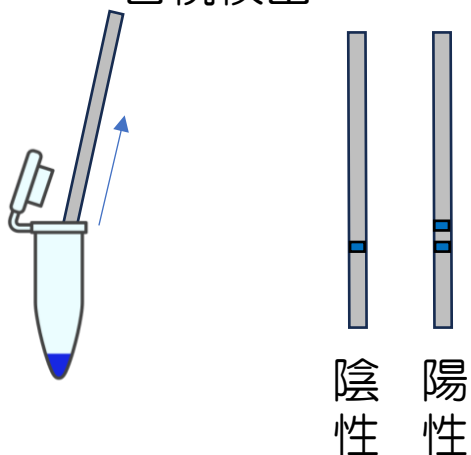


図1 RPA-C-PAS概略図

クロマト目視判定試験紙Printed Array Strip (C-PAS) をRPAを用いて実施。

① ビオチンプライマーとシングルタグDNA付プライマーにより標的DNAを増幅、② その増幅液をアビジンコートラテックス（青）と混合してメンブレンストリップに展開、③ ライン状に固相化された相補タグDNAとタグDNAの強いハイブリダイゼーション反応により増幅産物をトラップ、④ トラップされたラテックス標識RPA増幅産物でラインが青色になることにより、検体中の標的DNAの有無を目視判別。実際は、37°C、30分で増幅後、増幅液と展開液を混合した溶液中にC-PASを挿入し、約10分静置。着色を目視で判定。

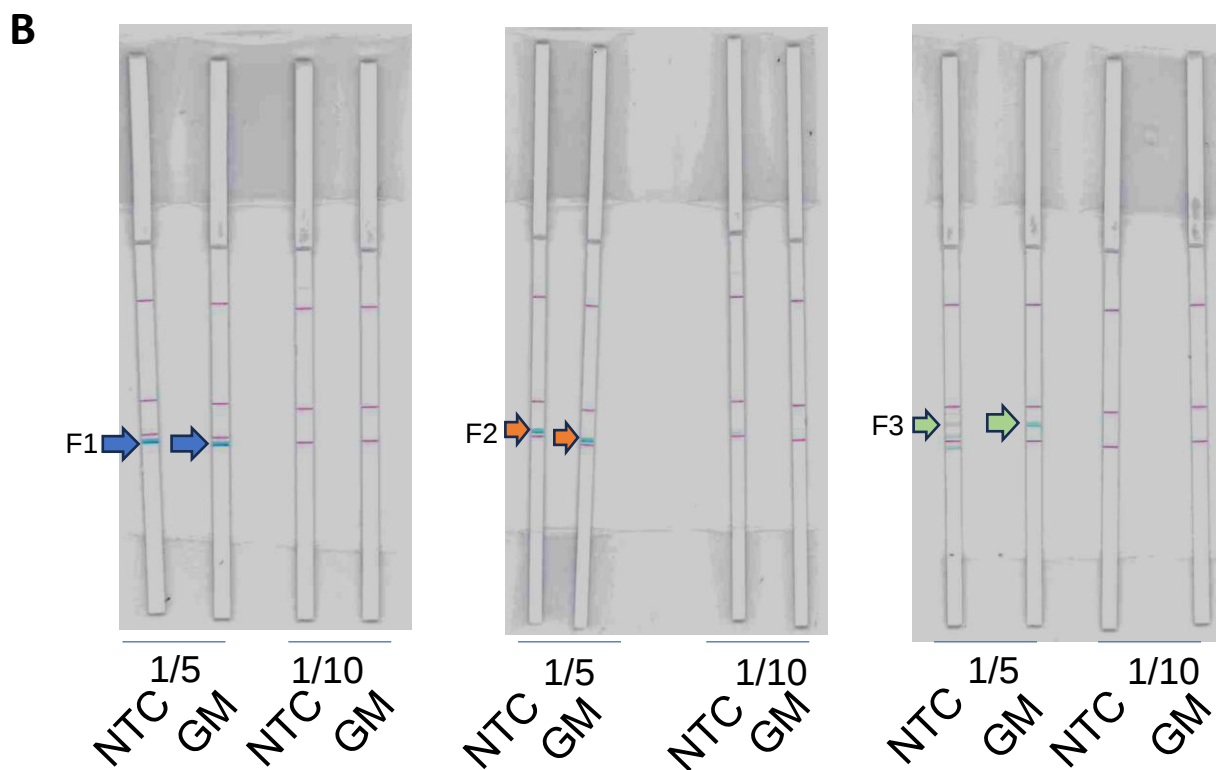
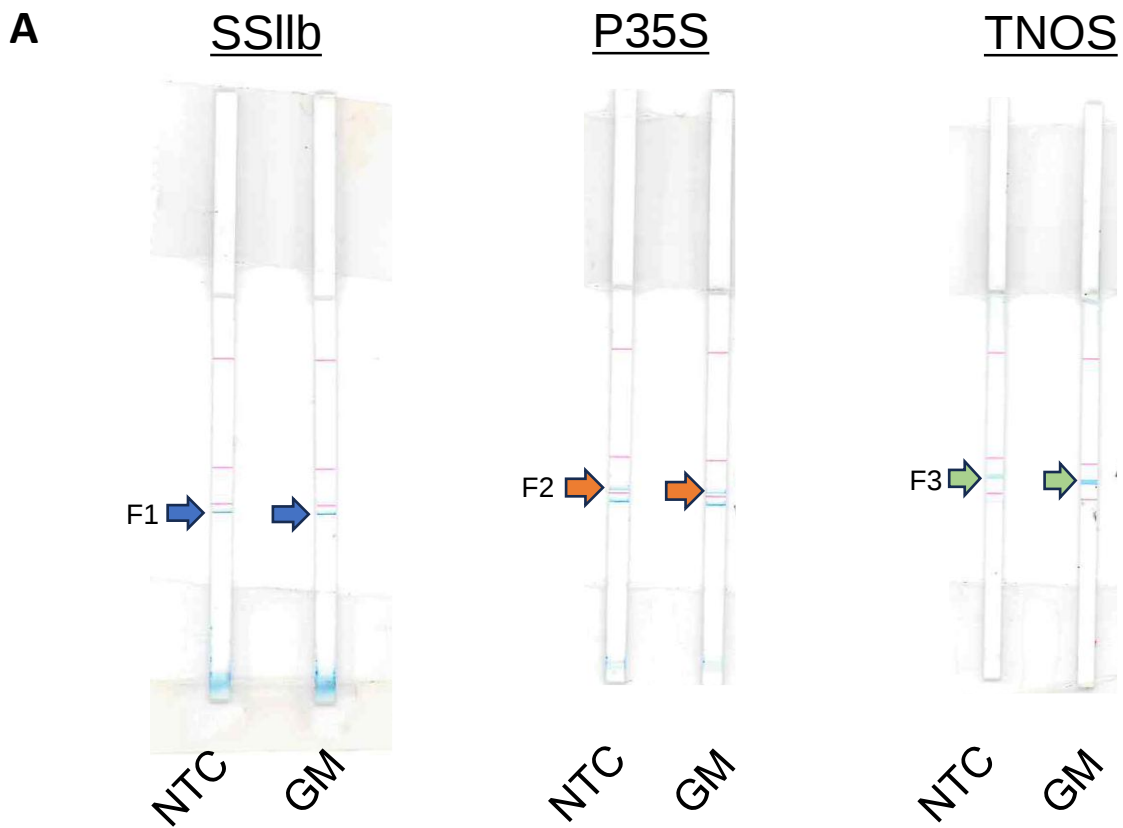


図2 RPA-C-PASのSimplexの検討結果

SSIIb、P35SおよびTNOSに関して、テンプレート無し（NTC）、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNA（GM）からSimplex RPAを行い、C-PASで判定を行った。F1はSSIIb、F2はP35S、F3はTNOSのフォワードプライマーに相補的なタグがそれぞれマウントされている。A) 従来プライマー濃度、B) プライマー濃度5倍希釈、10倍希釈。非特異的増幅を抑える展開液（改）を用いた。

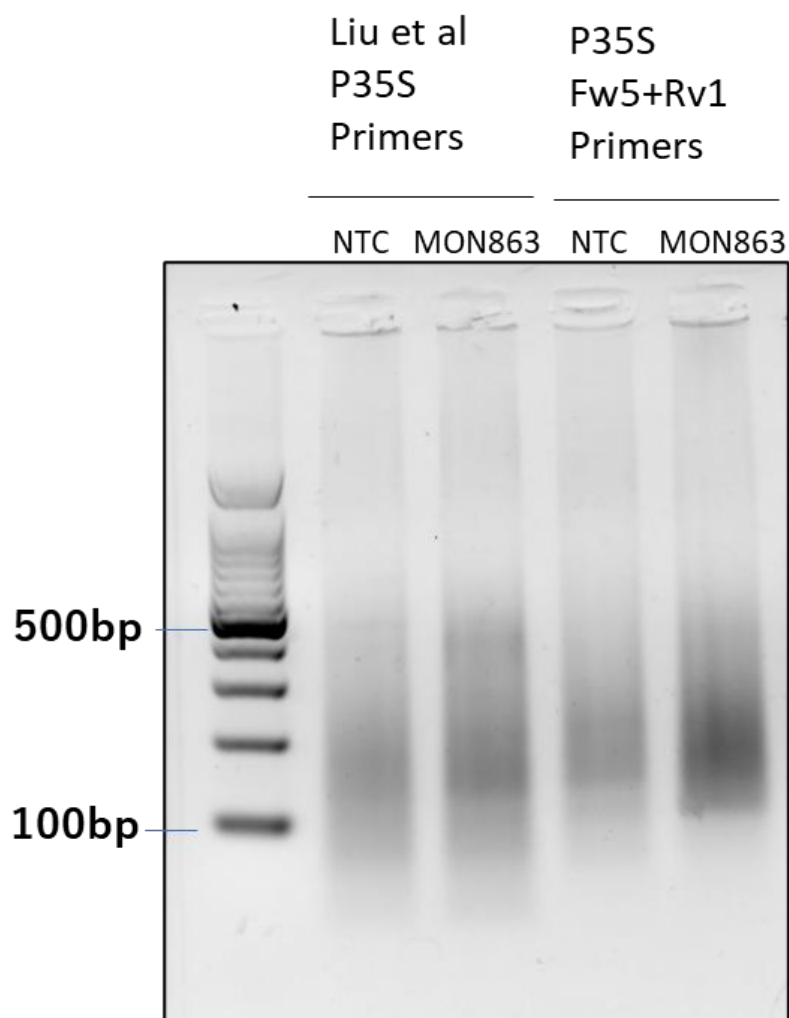
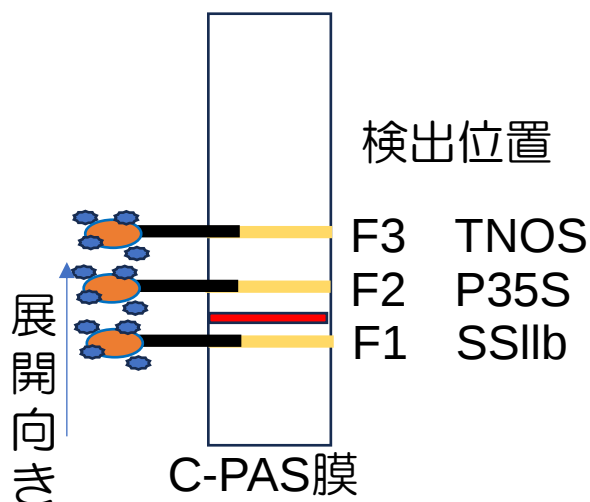
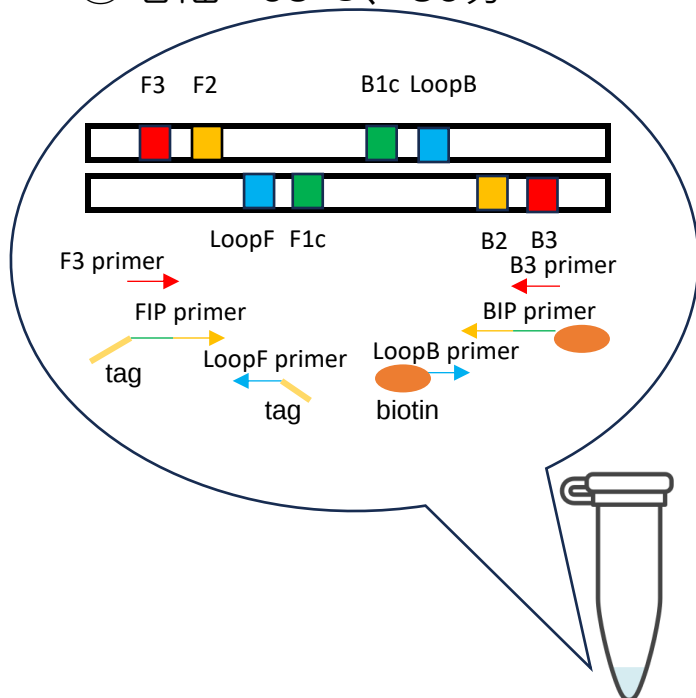


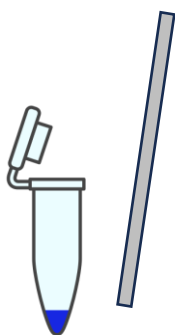
図3 RPAの増幅産物確認

P35Sに関して、既報（Liu et al, 2021, Food Chem）の方法と本法で、テンプレート無し（NTC）、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNAからRPAを行い、アガロースゲル電気泳動で増幅産物の確認した。既報は増幅産物123 bp、本法は100 bp。

①増幅 65°C、30分



②ラテックス液（展開液） ＋C-PASを挿入



③展開（常温、10分） 目視検出

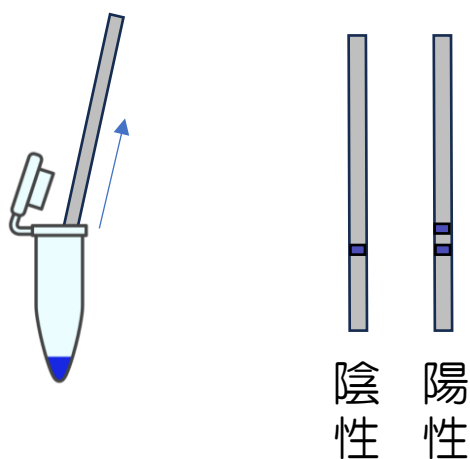


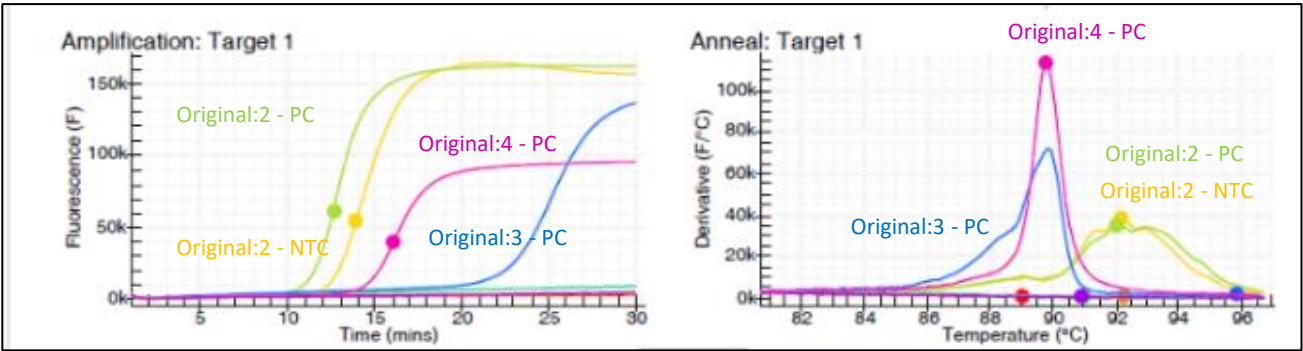
図4 LAMP-C-PAS概略図

クロマト目視判定試験紙Printed Array Strip (C-PAS) をLAMPを用いて実施。

① ビオチンプライマーとシングルタグDNA付プライマーにより標的DNAを増幅、② その増幅液をアビジンコートラテックス（青）と混合してメンブレンストリップに展開、③ ライン状に固相化された相補タグDNAとタグDNAの強いハイブリダイゼーション反応により増幅産物をトラップ、④ トラップされたラテックス標識LAMP増幅産物でラインが青色になることにより 検体中の標的DNAの有無を目視判別。

実際は、65°C、30分で増幅後、増幅液と展開液を混合した溶液中にC-PASを挿入し、約10分静置。着色を目視で判定。

A



B

SSIIb プライマーペア	試料	時間 (分)	融解温度 (°C) ピーク
Original:1	NTC	—	—
	PC	—	—
Original:2	NTC	13:55	92.20
	PC	12:36	92.06
Original:3	NTC	—	
	PC	— *	— *
Original:4	NTC	—	—
	PC	16:07	89.79

* 蛍光値プロットでは目視で増幅が確認されたが、ソフトウェアで値が算出されなかった。

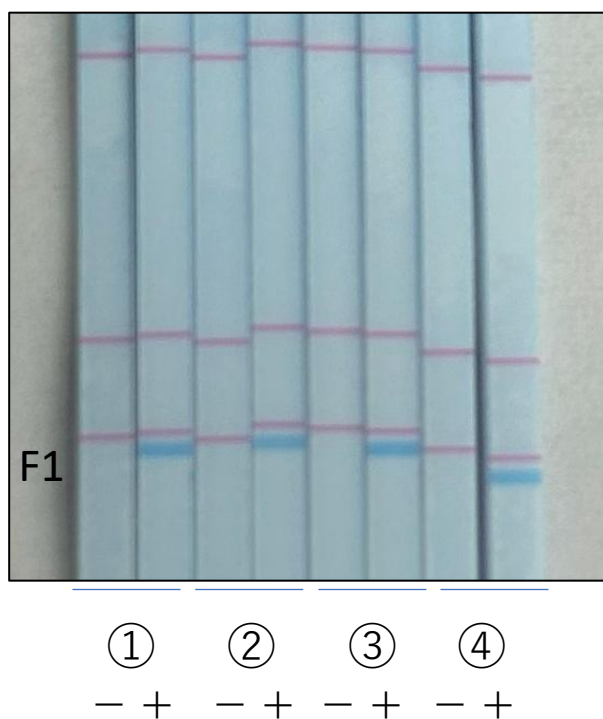
図5 LAMP-SSIIbのシングルプレックスの検討結果

SSIIbを標的としたLAMPに関して、4種類のプライマーセット（Original:1～4）を用い、テンプレート無し（NTC）またはとうもろこし由来ゲノムDNA（PC）を鋳型として検討した。A）Genelyzerにより蛍光を検出した際の増幅曲線（左）と融解曲線（右）、B）増幅の閾値を超えるまでの時間と、融解温度

A

組み合わせ	①	②	③	④
F1タグ	FIP	LoopF	FIP	LoopF
Biotinタグ	BIP	LoopB	LoopB	BIP

B



C

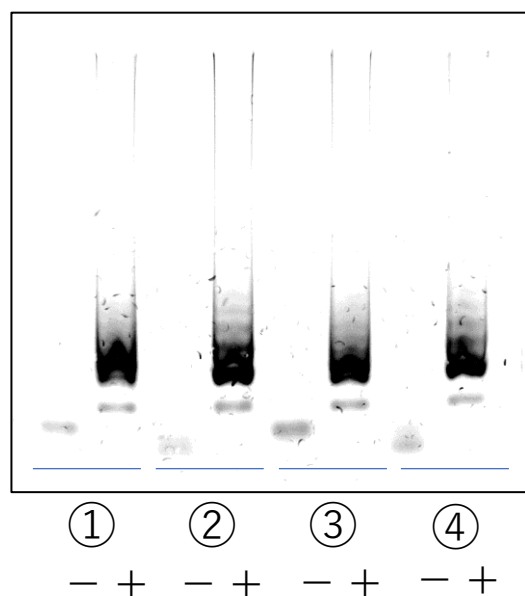


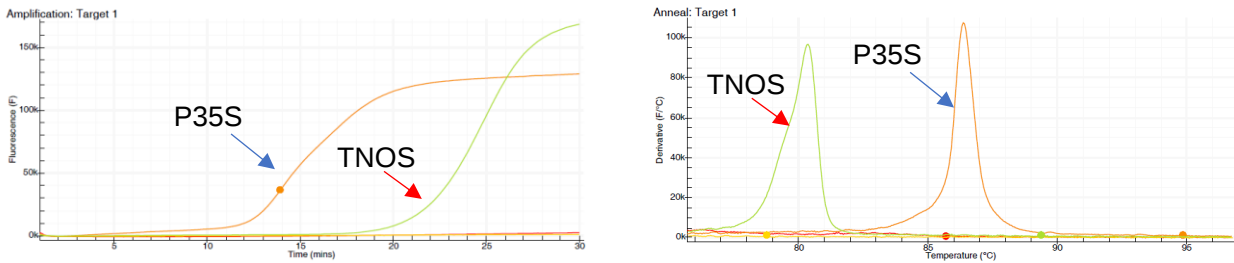
図6 LAMP-SSIIbのC-PASの検討結果

SSIIbを標的としたLAMP-C-PASに関して、プライマー②を用い、テンプレート無し（NTC）またはとうもろこし由来ゲノムDNA（PC）を鋳型として検討した。－がNTC、＋がPCを示す。A) 標識パターンの組み合わせ4種類、B) C-PAS結果、F1はSSIIbのプライマーに付加したシングルDNAタグに相補なDNAがマウントされている。C) アガロースゲル電気泳動による増幅産物の確認

A

プライマーペア	試料	時間（分）	融解温度（℃）ピーク*2
P35S	NTC	—	—
	GM	13:56	86～87
TNOS	NTC	—	—
	GM	—*	80～81

*蛍光値プロットでは目視で増幅が確認されたが、ソフトウェアで値が算出されなかった。
*2ソフトウェアにより融解温度ピークが正しく算出されなかったため、目安を示した。



B

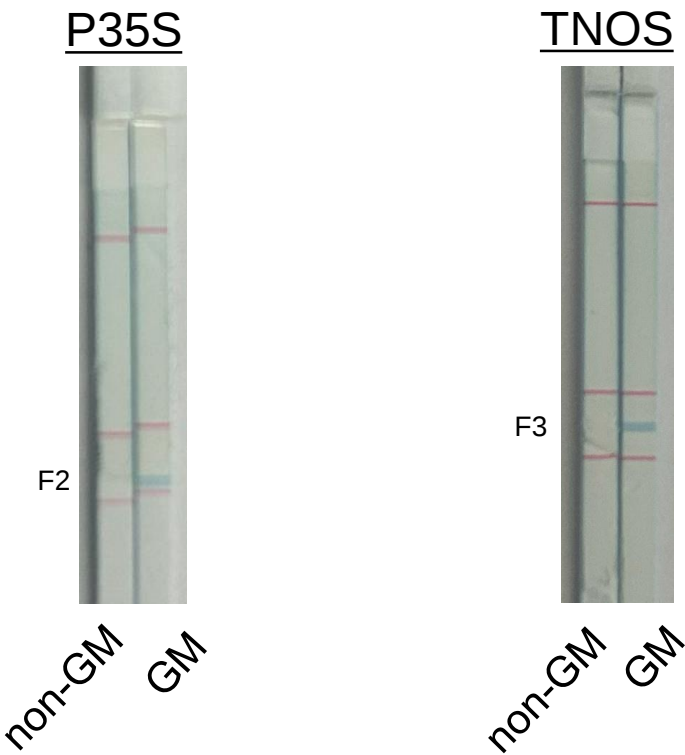


図7 LAMP-C-PAS（P35S, TNOS）

P35SおよびTNOSに関して、非GMとうもろこし由来ゲノムDNA（non-GM）、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNA（GM）を鋳型にLAMPを行った。A）左がリアルタイム蛍光検出の増幅曲線、右が融解曲線、B）C-PASでの目視判定。F2はP35S、F3はTNOSのプライマーに付加したシングルDNAタグに相補なDNAがそれぞれマウントされている。

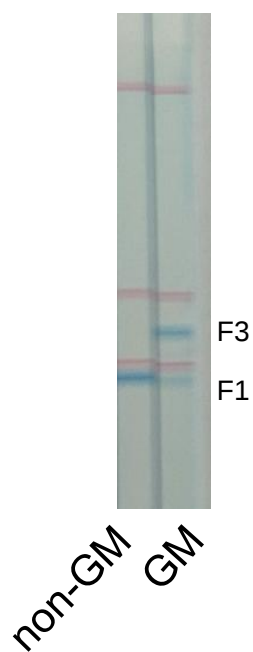
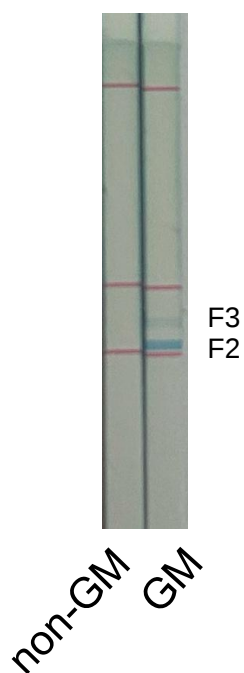
A**B**

図8 マルチプレックスLAMP-C-PAS

非GMとうもろこし由来ゲノムDNA (NTC) 、GMとうもろこしMON863由来ゲノムDNA (GM) を鋳型にマルチプレックスLAMP-C-PASを行った。F1はSSIIb、F2はP35S、F3はTNOSのプライマーに付加したシングルDNAタグに相補なDNAがそれぞれマウントされている。A) SSIIbおよびTNOSのDuplex-LAMP (SSIIb : TNOS = プライマー濃度比 1 : 7) 結果、B) P35SおよびTNOSのDuplex-LAMP (P35S : TNOS = プライマー濃度比 1 : 2) 。

厚生労働省科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究」
研究年度終了報告書（令和6年度）

核酸等温増幅反応技術を用いた食中毒細菌検出

研究分担者 中山 達哉 広島大学大学院 統合生命科学研究科 教授

研究要旨：近年、貿易の自由化による食品輸入量の増加に、検疫所等の輸入食品の安全性を担保する機関では、十分に検査が追いついておらず、輸入食品に対する検査率は低下傾向である。食品の微生物危害に関わる安全性の確認方法は、一般的に培養法により病因物質を確認する方法が標準ではあるが、より迅速に多検体を処理できることから、遺伝子検査による手法が導入されつつある。

現在の食品遺伝子検査は PCR 法や real-time PCR 法によって標的遺伝子を検出する方法が、一般的に使用されているが、これらの機器は導入費用が高額であること、さらに、核酸増幅から判定までに時間を要することから、より簡便で安価な方法が現場では求められている。1990 年以降、遺伝子検出技術の向上に伴い、様々な等温核酸増幅反応に関する報告がなされてきた。特に、近年着目されている Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は 37°C でかつ 30 分以内で標的遺伝子の増幅が完了することから、従来法よりも簡便で安価な方法であり、医療・食品分野での応用が期待されている。RPA 法による既往の報告は、未だ多くはないが、それでも、食品衛生微生物分野では、報告が多いものとして、サルモネラ属菌やビブリオ属菌の検出に関するものがある。しかしながら、日本の食中毒原因菌として多い、カンピロバクターに関しての報告は限定的で少ない。

そこで、本研究では、食中毒原因菌であるカンピロバクター菌 (*Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli*) の検出について、RPA 用のプライマーを設計し、RPA 酵素による標的遺伝子増幅における妥当性を評価した。また、カンピロバクター検査法で使用するプレストン培地を使用し、増菌後において、RPA 法によるカンピロバクター検出を評価した。さらに、最適と判断したプライマーセットにおいて、核酸クロマトグラフィを作製し、同様に標的遺伝子の検出について、妥当性を確認した。

RPA 法に用いるカンピロバクター用プライマー (*C. jejuni* 用 8 セット及び *C. coli* 用 9 セット) 及び細菌用陽性コントロール (PC) として 5 セット設計した。設計したプライマーセットを評価した結果、*C. jejuni* 用では *hipO-1*、*mapA-1*、*mapA-4* を、*C. coli* 用では *ceuE-1*、*ceuE-3*、*ceuE-6*、PC 用では 16S-2、16S-3 で良好な標的遺伝子の増幅を得られた。さらに、検出限界濃度を評価した結果、*mapA-4* において 0.1 pg/μL から 1 pg/μL、*ceuE-1* で 1 pg/μL、16S-2 で 10 pg/μL と良好な感度を示した。次に、*C. jejuni* 陽性の鶏肉から増菌培養後のプレストン培地を用いて、*mapA* プライマーによってカンピロバクターを検出した結果、その増幅が確認された。最後に、各プライマーセットを用いた核酸ペーパークロマトグラフィを検討した結果、どの DNA 試料からも添加したプライマー依存的にバンド陽性となり、菌株の判別ができなかった。RPA 法による標的遺伝子の増幅は良好な結果であったが、ペーパー核酸クロマトグラフィによるカンピロバクター検出に関しては、課題を残す結果となり、更なる検討が必要である。

A. 研究目的

2010 年以降、人・物の諸外国との交流は増加の一途を辿っていたが、COVID-19 の拡大により、2020 年は人だけでなく、輸入貿易額は大幅に減少したが（財務省貿易統計 年別輸出入総額）、コロ

ナ禍を経た 2023 年では、貿易額はコロナ禍前に達する勢いであり、今後、人・物の流れは益々活発化すると考えられる。

現在、輸入食品は全体の 8.5% 程度（厚生労働省 輸入食品監視統計）を食品検査している。食品検査の中心である検査法では、ある程度検査に時間

を要することから、今後、妥当性のある効率的な迅速簡便法を用いた検査法の開発が必要と考えられる。

迅速簡便法の一つとして、1990年代以降、等温核酸増幅技術が発表され、近年までに様々な技術報告がされている (Glokler et al. 2021)。特に近年注目されている技術として Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法がある (Piepenburg et al. 2006)。RPA は 37°C 前後の温度で増幅反応が進み、30 分以内で反応が終わることからも、迅速簡便法として着目されており、医療分野を中心に、現在、論文数が増加している。

食品衛生における微生物危害で、特に注目されるものとして、カンピロバクターがあげられる。2024 年度の食中毒統計によると、カンピロバクターは細菌性食中毒事件数で第 1 位、全食中毒事件数の中で 20.1% を占める (厚生労働省 食中毒統計 2024)。しかしながら、RPA 法の検出報告は、サルモネラやビブリオの検出については、報告数は徐々に増加しているが (Gao et al. 2018、Geng et al. 2019、Hice et al. 2019、Hu et al. 2019、Jiang et al. 2020、Li et al. 2021、Wang et al. 2021)、RPA 法に関するカンピロバクター検出の報告は未だ報告は少ない (Geng et al. 2019、Chen et al. 2023)。

そこで、本研究では、RPA 法を用いたカンピロバクター検出法を構築することを目的に、研究を行った。

B. 研究方法

RPA 用プライマー設計

プライマーの設計は *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 用プライマーとして、*hipO* 及び *map* 遺伝子を標的に 8 セットのプライマーを設計し、*Campylobacter coli* (*C. coli*) 用プライマーとして、*ceuE* 遺伝子を標的に 9 セットのプライマーを設計した。また、細菌用陽性コントロール (PC) プライマーとして、16S rRNA 遺伝子を標的にしたユニバーサルプライマーを 5 セット設計した (表 1)。

DNA 抽出法

DNA 抽出には、42°C で 48 時間前培養した菌を CHROMagar *Campylobacter* (CHROMagar, Paris, France) に画線塗抹し、42°C で 48 時間培養した後、シングルコロニーを釣菌した。TE バッファー 200 µL に菌を懸濁し、95°C で 10 分間、煮沸した後、10,000g で 10 分間遠心し、上清を採取した。採取した上清は QuantiFluor dsDNA system (Promega, Madison, USA) によって DNA 濃度を測定した。

RPA 反応条件及びプライマー検討

RPA 反応は TwistAmp Basic (Nippon genetics, Tokyo, Japan) を使用し、反応条件は、基本的にプロトコールに準じた方法を選択した RPA 反応の配合は、下記の通り調整した。

Distilled Water	1.7 µL
RPA buffer	3.0 µL
Primers Forward (10 µM)	0.25 µL
Primers Reverse (10 µM)	0.25 µL
DNA template	1.0 µL

調整後、TwistAmp basic reaction (RPA 酵素) と混合し、280 mM MgOAC を 0.25 µL 滴下し、39°C で 30 分間保温した。その後、アガロースゲル 3% で電気泳動し増幅産物を評価した。

設計されたプライマー 22 セット (*C. jejuni* 用 8 セット、*C. coli* 用 9 セット及び PC 用 5 セット) を用いて、研究室で保管されている *C. jejuni* 2 株 (14-492 及び 14-493) 及び *C. coli* 2 株 (14-1097 及び 14-1098) の DNA 1ng/µL を用いて、上記の RPA 条件で標的遺伝子を増幅した。

RPA 用プライマーの感度及び交差反応試験

上記、プライマー検討の結果から 1 次選択で選ばれた *hipO*-2、*mapA*-1、*mapA*-4、*ceuE*-1、*ceuE*-3、*ceuE*-6、16S-2、16S-3 の 8 セットのプライマーを用いて、検出限界濃度を明確にするために、*C.*

jejuni (14-492 及び 14-493) 及び *C. coli* (14-1097 及び 14-1098) の DNA 濃度 (1 ng/μL から 0.1 pg/μL) を用意し、上記 RPA 反応条件 (39°C 30 分間) で、RPA 反応による標的遺伝子を増幅した。増幅後、アガロース 3% で電気泳動し増幅産物を確認した。

加えて、検出限界濃度評価の結果から 2 次選択で選択したプライマーセット (*C. jejuni* 用 : mapA-1、mapA-4、*C. coli* 用 : ceuE-1、ceuE-6、PC 用 : 16S-2) の特異性を明らかにするために、鶏肉汚染する主要な病原菌である *Salmonella* 2 株 (2023-S1 及び 2023-S2) と指標菌である *E. coli* 2 株 (ATCC25922 及び IFO3301) を用いて交差反応試験を行った。*Salmonella* 及び *E. coli* とともに DNA を煮沸法で抽出後、DNA 濃度 1 ng/μL に調整し、RPA 法によって、標的遺伝子を増幅した。

鶏肉食品からの検出

カンピロバクターの検査法として、公定法では鶏肉をプレストン培地でストマッカー処理し、増菌培養後に、CHROMagar *Campylobacter* 等のカンピロバクター選択培地に塗抹する。そこで、本項目では、*C. jejuni* が CHROMagar *Campylobacter* から分離された鶏肉において、増菌培養後のプレストン培地から、RPA 法によって *C. jejuni* 検出を試みた。

増菌後のプレストン培地 1 mL を採取し、煮沸法によって DNA 抽出し、RPA 法によって増幅させ、アガロースゲル 3.0% にて泳動し、増幅産物を確認した。

核酸クロマトグラフィによる検出

交差反応試験の結果から、*C. jejuni* 用プライマーとして mapA-4 (289 bp)、*C. coli* 用プライマーとして ceuE-1 (199 bp) 及び PC 用プライマーとして 16S-2 (209 bp) を選択し、TBA 社に核酸ペーパークロマトグラフィ作製を依頼した。

C. jejuni 14-492 及び *C. coli* 14-1097 について、菌株をそれぞれ煮沸法によって DNA を抽出した

ものに、ビオチンを付加した mapA-4 又は ceuE-1 プライマーセットを混合し、RPA 反応後、核酸クロマト試験紙のサンプルパッド部位を反応液に浸漬させ、15 分間後にバンドを確認した。

さらに、mapA-4、ceuE-1 及び 16S-2 を *C. jejuni* 14-492 又は *C. coli* 14-1097 の DNA テンプレートと混在させ、RPA 反応後、核酸クロマト試験紙を反応液に浸漬させ、15 分後にバンドを確認した。

C. 研究結果

プライマーの検討について

本研究では *C. jejuni* 及び *C. coli* からそれぞれ 2 株ずつ使用し、*C. jejuni* 用 8 セット、*C. coli* 用 9 セット及び PC 用 5 セットのプライマーを用いて、標的遺伝子の増幅産物を評価した結果、*C. jejuni* 用プライマーでは、hipO-1、mapA-1、mapA-4 において (図 1A)、*C. coli* 用プライマーでは、ceuE-1、ceuE-3、ceuE-6 において (図 1B)、また、PC 用プライマーでは 16S-2、16S-3 (図 1C) において、標的遺伝子の増幅が良好に確認できた。

プライマー感度について

上記 1 次選択で良好な結果を示したプライマー 8 セット (*C. jejuni* 用 3 セット (hipO-1、mapA-1、mapA-4)、*C. coli* 用 3 セット (ceuE-1、ceuE-3、ceuE-6)、PC 用 2 セット (16S-2、16S-3)) について、DNA 濃度を 0.1 pg/μL から 1 ng/μL の範囲に調整し、RPA 法によって標的遺伝子の増幅を検証した結果、*C. jejuni* 用では mapA-1、mapA-4 (図 2A)、*C. coli* 用では ceuE-1、ceuE-6 (図 2B)、PC 用では 16S-2、16S-3 (図 2C) のプライマーセットで DNA 濃度依存的に増幅産物量の差が判明した。それぞれの検出限界濃度は、hipO-1 は 1~10 pg/μL で一部不明瞭、mapA-1、mapA-4 は 0.1~1 pg/μL、ceuE-1 は 0.1~1 pg/μL、ceuE-3 は一部不明瞭で、ceuE-6 は 10 pg/μL、16S-2 及び 16S-3 は 10 pg/μL であった (図 2ABC)。本結果から、mapA-1、mapA-4、ceuE-1、ceuE-6、16S-2 を濃度依存的で比較的良

好にバンドが検出できたプライマーとして、次の交差反応試験に用いた。

交差反応試験について

上記 2 次選択で選ばれたプライマー 5 セットにおいて、プライマーの特異性を評価するために、鶏肉を汚染する可能性が高い病原菌である *Salmonella* 及び指標菌である *E. coli* との交差反応を試験した。本結果から、*C. jejuni* 用 mapA-1 及び mapA-4 と *C. coli* 用 ceuE-1 及び ceuE-6 のプライマーからはバンドは検出されなかった。一方、PC 用 16S-2 では *Salmonella*2023-S2 のみバンドが確認されたが、他の菌株では確認できなかった（図 3）。

プレストン増菌液によるカンピロバクター検出

カンピロバクター公定法として使用されるプレストン培地の増菌液について、RPA 反応によるカンピロバクター検出を試みた。

カンピロバクターを添加し、増菌後の培地から検出した結果、mapA-1、mapA-4 の両方とも検出された。また、陰性コントロールでは不検出であった。よって、鶏肉陽性検体からも良好に検出できることが示唆された。PC 用ではバンドは薄いながらも、すべてにおいて検出できた（図 4）。

核酸ペーパークロマトグラフィによるカンピロバクター検出

上記試験にて最適と思われたプライマーセット（mapA-4、ceuE-1、16S-2）を用いて、オンサイト試験が可能な核酸ペーパークロマトグラフィを検討した。*C. jejuni* 用 mapA-4 及び *C. coli* 用 ceuE-1 の特異的プライマーのみを用いて、標的遺伝子を増幅し、クロマトグラフィにて検出した結果では、*C. jejuni* の DNA では、mapA-4 のみならず、ceuE-1 のバンドも確認された。また、*C. coli* の DNA から同様に、ceuE-1 だけではなく、mapA-4 のバンドも確認された（図 5A）。

さらに、マルチプレックスでプライマー mapA-4、ceuE-1 及び 16S-2 を混在させた結果では、*C. jejuni* 及び *C. coli* 両方の DNA で、3 カ所全てのバンドで陽性が確認された（図 5B）。

D. 考察

既往の研究では RPA 法を用いて、*C. jejuni* の検出を報告している（Geng et al. 2023）。Chen らの報告では *C. jejuni* の *hipO* 遺伝子を主に標的としたものであり、検出限界濃度は 46 CFU/mL と結果を報告している。DNA 抽出法は煮沸法を用いているが、加えて cellulose paper dipstick を用いて、効率的に DNA を抽出している。本研究では、mapA 遺伝子を主標的とした RPA 用プライマーを設計し、検出限界濃度は DNA 濃度 0.1~1 pg/μL を示した。本研究において、我々も CFU での計測を試みたが、カンピロバクターのコロニー計算は若干工夫が必要なことから、本研究では正確に計測できなかった。しかしながら、正確な比較はできないが、*C. jejuni* 1 コロニーあたりの DNA 濃度は 0.142 ng/μL であったことから、本結果における感度は、低いものではないと考えられる。

また、*C. coli* に関しては、未だ報告はない。それゆえ、我々の設計したカンピロバクターの RPA 用のプライマーは独自性があり、新規性が高いものであると考えている。

一方で、細菌用陽性コントロールプライマーとして 16S rRNA を標的にプライマーを設計したが、交差反応試験の結果から、一部のサルモネラや大腸菌で増幅を確認できなかったことから、プライマーの特異性に関しては、今後、さらに検討が必要と考えている。

さらに、本研究では、カンピロバクター公定法で用いられるプレストン増菌液からカンピロバクター検出を試み、検出が可能であった。本結果から、増菌液からのカンピロバクター検出が直接可能であれば、遺伝子検査で用いられる PCR 法等と同等なものとして使用できると考えられ、通常の

培養による検査法よりも時間を短縮することが可能と考える。

加えて、本研究ではオンサイト検査での応用を見据えて核酸ペーパークロマトグラフィを用いて、カンピロバクターの検出を試みたが、どの DNA を用いても、用いたプライマーに対する遺伝子で陽性バンドが確認された。本研究では、これに関して原因を十分に検証することができなかった。RPA 反応または核酸ペーパークロマトグラフィに問題があるのかを今後、検討する必要があると考える。

E. 結論

本研究では鶏肉からカンピロバクター検出を目的に RPA 法の構築を検討した。カンピロバクター用及び細菌用陽性プライマーとして、合計 22 セットを評価した結果、*C. jejuni* 用では検出限界濃度 0.1~1 pg/μL である mapA-4、*C. coli* 用では検出限界濃度 0.1~1 pg/μL である ceuE-1、PC 用では検出限界濃度 10 pg/μL である 16S-2 が最も適切であると判断した。mapA-4、ceuE-1 プライマーは特異性に関しても、問題は確認されなかったが、16S-2 プライマーでは特異性において、一部増幅に失敗したのもあった。

さらに、カンピロバクター陽性の鶏肉のプレストン増菌液から RPA 法によって検出可能であったことから、RPA 法を簡易検査法として使用できる可能性を示した。

しかしながら、これらのプライマーを核酸ペーパークロマトグラフィに応用した結果では、良好な結果が得られなかったことから、更なる改良が必要と考える。

F. 参考文献

厚生労働省 食中毒統計 2024.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html

財務省貿易統計 年別輸出入総額（確定値）.
<https://www.customs.go.jp/toukei/suii/html/nenbet.htm>

厚生労働省 令和 5 年度輸入食品監視統計.
<https://www.mhlw.go.jp/content/001296449.pdf>

Chen Y, Hu Y, Lu X. An Integrated Paper Microfluidic Device Based on Isothermal Amplification for Simple Sample-to-Answer Detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl Environ Microbiol*. 2023; 89:e0069523.

Gao W, Huang H, Zhu P, Yan X, Fan J, Jiang J, Xu J. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for equipment-free detection of *Salmonella* in shellfish. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2018; 41:603-611.

Geng Y, Liu G, Liu L, Deng Q, Zhao L, Sun XX, Wang J, Zhao B, Wang J. Real-time recombinase polymerase amplification assay for the rapid and sensitive detection of *Campylobacter jejuni* in food samples. *J Microbiol Methods* 2019; 157:31-36.

Geng Y, Tan K, Liu L, Sun XX, Zhao B, Wang J. Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *BMC Microbiol*. 2019; 19:186.

Glökler J, Lim TS, Ida J, Frohme M. Isothermal amplifications - a comprehensive review on current methods. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2021; 56:543-586.

Hice SA, Clark KD, Anderson JL, Brehm-Stecher BF. Capture, concentration, and detection of *Salmonella* in foods using magnetic ionic liquids and recombinase polymerase amplification. *Anal Chem*. 2019; 91:1113-1120.

Hu J, Huang R, Sun Y, Wei X, Wang Y, Jiang C, Geng Y, Sun X, Jing J, Gao H, Wang Z, Dong C. Sensitive and rapid visual detection of *Salmonella* Typhimurium in milk based on recombinase polymerase

amplification with lateral flow dipsticks. *J Microbiol. Methods* 2019; 158:25-32.

Jiang W, Ren Y, Han X, Xue J, Shan T, Chen Z, Liu Y, Wang Q. Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. *Anal Bioanal Chem.* 2020; 412:2903-2914.

Li X, Zheng T, Xie YN, Li F, Jiang X, Hou X, Wu P. Recombinase polymerase amplification coupled with a photosensitization colorimetric assay for fast *Salmonella* spp. testing. *Anal Chem.* 2021; 93:6559-6566.

Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006; 4:e204.

Wang P, Liao L, Ma C, Zhang X, Yu J, Yi L, Liu X, Shen H, Gao S, Lu Q. Duplex on-site detection of *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* by recombinase polymerase amplification and three-segment lateral flow strips. *Biosensors.* 2021; 11:151.

G. 研究発表・業績

該当なし

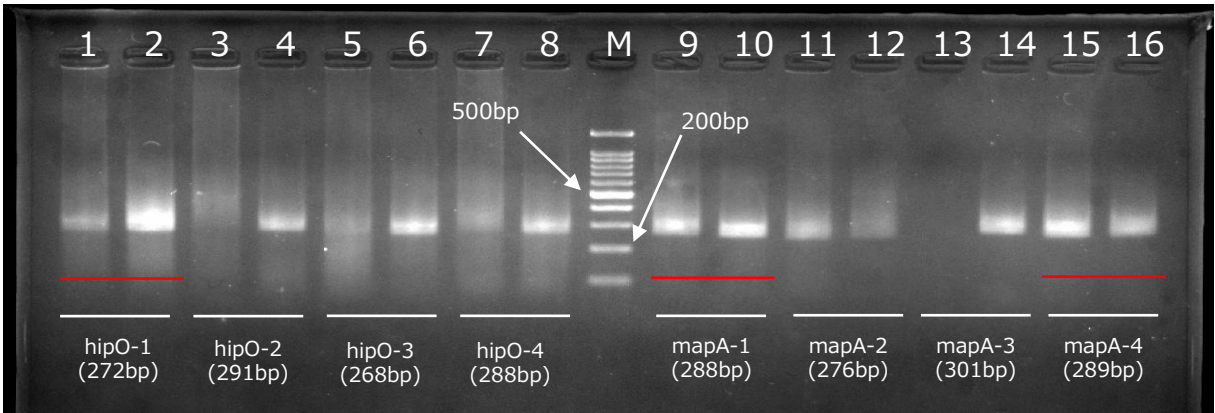
H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1 RPA用プライマー

Target bacteria	Target gene	Primer name	Sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)
<i>C. jejuni</i>	<i>hipO</i>	hipO-1 Forward	CTTCTTCGGATAGTTATAGCATTGAAGTTATTG	272
		hipO-1 Reverse	CAAATTTTATAAATTTTTCTTCAGTTAGC	
		hipO-2 Forward	CTTCTTCGGATAGTTATAGCATTGAAGTTATTG	291
		hipO-2 Reverse	CTTTACAAATTTTATAAATTTTTCTTCAG	
	<i>mapA</i>	hipO-3 Forward	GATAGTTATAGCATTGAAGTTATTGGAAGAGG	268
		hipO-3 Reverse	CAAATTTTATAAATTTTTCTTCAGTTAGC	
		hipO-4 Forward	GATAGTTATAGCATTGAAGTTATTGGAAGAGG	288
		hipO-4 Reverse	CTTTACAAATTTTATAAATTTTTCTTCAG	
<i>C. coli</i>	<i>ceuD</i>	mapA-1 Forward	CTAGAGGAATAGTTGTGCTTGACAATAACG	288
		mapA-1 Reverse	CACCTCAAAGTTCAGAGATTAACTAGCTGC	
		mapA-2 Forward	CTAGAGGAATAGTTGTGCTTGACAATAACG	276
		mapA-2 Reverse	CAGAGATTAACTAGCTGCTTTATTGGCC	
		mapA-3 Forward	CAAGAACTTTGAAGCTAGAGGAATAGTTGTGC	301
		mapA-3 Reverse	CACCTCAAAGTTCAGAGATTAACTAGCTGC	
		mapA-4 Forward	CAAGAACTTTGAAGCTAGAGGAATAGTTGTGC	289
		mapA-4 Reverse	CAGAGATTAACTAGCTGCTTTATTGGCC	
	<i>ceuE</i>	ceuD-1 Forward	CAAGAACTTTGAAGCTAGAGGAATAGTTGTGC	199
		ceuD-1 Reverse	CACCTCAAAGTTCAGAGATTAACTAGCTGC	
		ceuD-2 Forward	CAAGAACTTTGAAGCTAGAGGAATAGTTGTGC	174
		ceuD-2 Reverse	CAGAGATTAACTAGCTGCTTTATTGGCC	
		ceuD-3 Forward	GACCTCAATCTCGCTTTGGAATCATTGATG	121
		ceuD-3 Reverse	CAAGTATGCCTTGCGCGCTTCTTTATTGGCC	
		ceuD-4 Forward	GACCTCAATCTCGCTTTGGAATCATTGATG	106
		ceuD-4 Reverse	CGCGTTCTTTATTGCCACAATGATATTTTC	
Bacterial universal	16S rRNA	ceuD-5 Forward	GTGCATTATCAAGTAGGCCTTGTCGGCGCTC	127
		ceuD-5 Reverse	GGCACACATGGAAAAAGTATCAATTCTG	
		ceuD-6 Forward	GTGCATTATCAAGTAGGCCTTGTCGGCGCTC	189
		ceuD-6 Reverse	CCTCAATCTCGCTTTGGAATTATTCACGATG	
		ceuD-7 Forward	GGCATTGATTCCTAAAACATCGTGAATAATTC	100
		ceuD-7 Reverse	CAAAGAGCCCTTATCGTCCTAACAAATTC	
		ceuD-8 Forward	GGCATTGATTCCTAAAACATCGTGAATAATTC	198
		ceuD-8 Reverse	GCGTTGCAAACTTTATGGCTTGAAAAAG	
		ceuD-9 Forward	GGCATTGATTCCTAAAACATCGTGAATAATTC	107
		ceuD-9 Reverse	CCTCAATCTCGCTTTGGAATTATTCACGATG	
	16S rRNA	16s-1 Forward	GCTTACCAAGGCTATGACGCTTAAGTGGTC	121
		16s-1 Reverse	GGTTTCCCCATTGCGCAATATTTCCCTAC	
		16s-2 Forward	GAGAACTGATAATCTAGAGTGAGGGAGAGG	116
		16s-2 Reverse	CAGTTGAGTTCTAGCAGATCGCCTTCGCAATG	
		16s-3 Forward	GAGAACTGATAATCTAGAGTGAGGGAGAGG	209
		16s-3 Reverse	CTAGCAGAGCAACAACTAGTATACATCG	
	16S rRNA	16s-4 Forward	CGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGATATCC	128
		16s-4 Reverse	CCCAACATCTCACGACGAGCTGACGAC	
	16S rRNA	16s-5 Forward	CGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGATATCC	202
		16s-5 Reverse	CCTCCTCTTACGAAGGCAGTCTATTTAG	

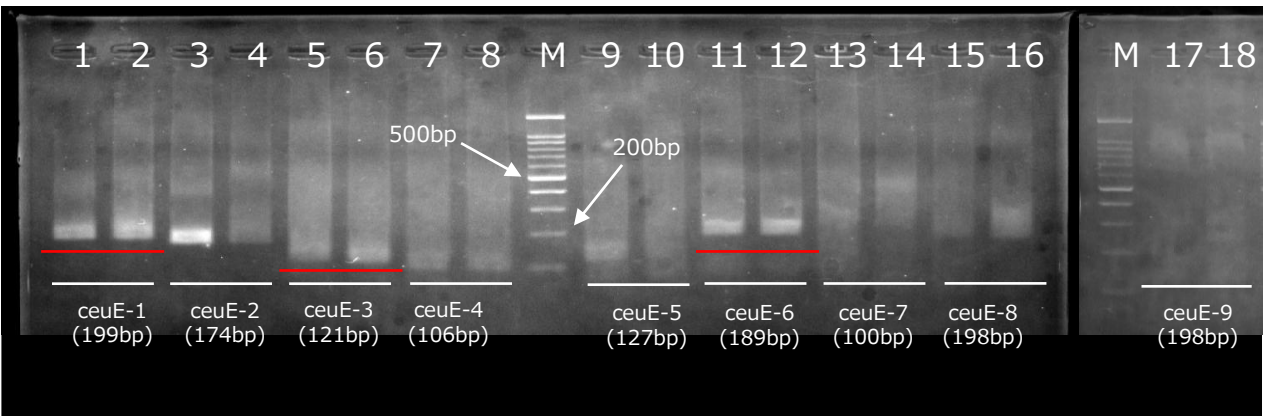
A) *C. jejuni*用プライマー



Lane	DNA
1	<i>C. jejuni</i> 14-492
2	<i>C. jejuni</i> 14-493
3	<i>C. jejuni</i> 14-492
4	<i>C. jejuni</i> 14-493
5	<i>C. jejuni</i> 14-492
6	<i>C. jejuni</i> 14-493
7	<i>C. jejuni</i> 14-492
8	<i>C. jejuni</i> 14-493

Lane	DNA
9	<i>C. jejuni</i> 14-492
10	<i>C. jejuni</i> 14-493
11	<i>C. jejuni</i> 14-492
12	<i>C. jejuni</i> 14-493
13	<i>C. jejuni</i> 14-492
14	<i>C. jejuni</i> 14-493
15	<i>C. jejuni</i> 14-492
16	<i>C. jejuni</i> 14-493

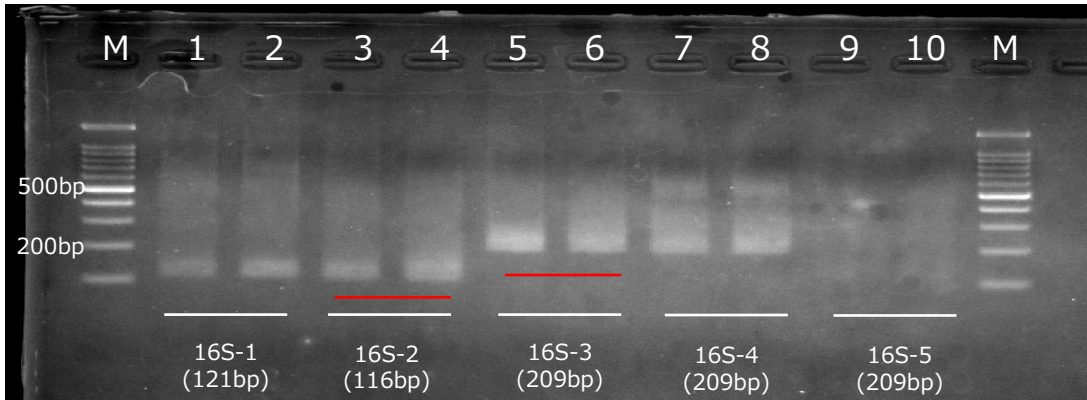
B) *C. coli*用プライマー



Lane	DNA
1	<i>C. coli</i> 14-1097
2	<i>C. coli</i> 14-1098
3	<i>C. coli</i> 14-1097
4	<i>C. coli</i> 14-1098
5	<i>C. coli</i> 14-1097
6	<i>C. coli</i> 14-1098
7	<i>C. coli</i> 14-1097
8	<i>C. coli</i> 14-1098
9	<i>C. coli</i> 14-1097

Lane	DNA
10	<i>C. coli</i> 14-1098
11	<i>C. coli</i> 14-1097
12	<i>C. coli</i> 14-1098
13	<i>C. coli</i> 14-1097
14	<i>C. coli</i> 14-1098
15	<i>C. coli</i> 14-1097
16	<i>C. coli</i> 14-1098
17	<i>C. coli</i> 14-1097
18	<i>C. coli</i> 14-1098

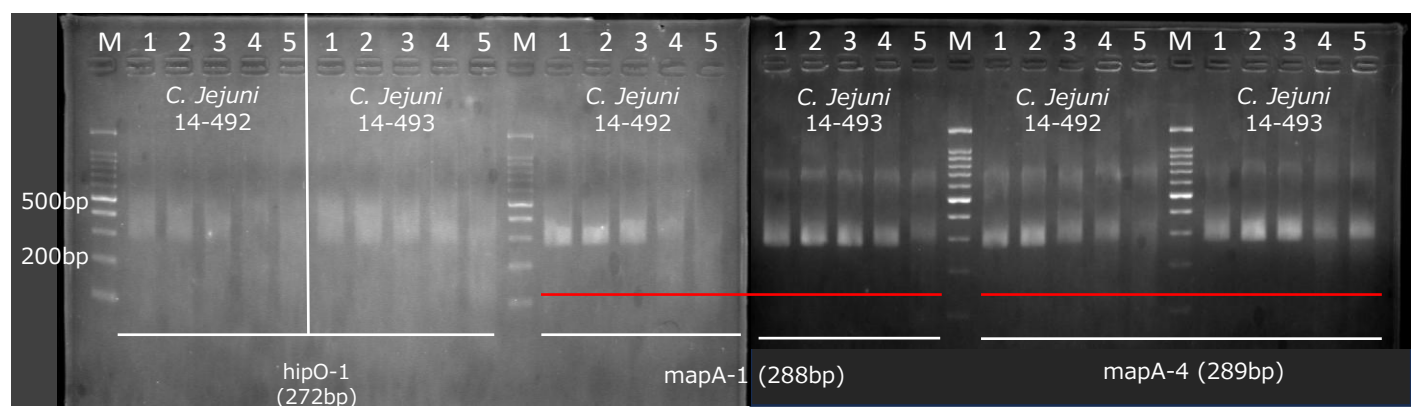
c) 細菌用陽性コントロールプライマー



Lane	DNA
1	<i>C. jejuni</i> 14-492
2	<i>C. coli</i> 14-1097
3	<i>C. jejuni</i> 14-492
4	<i>C. coli</i> 14-1097
5	<i>C. jejuni</i> 14-492
6	<i>C. coli</i> 14-1097
7	<i>C. jejuni</i> 14-492
8	<i>C. coli</i> 14-1097
9	<i>C. jejuni</i> 14-492
10	<i>C. coli</i> 14-1097

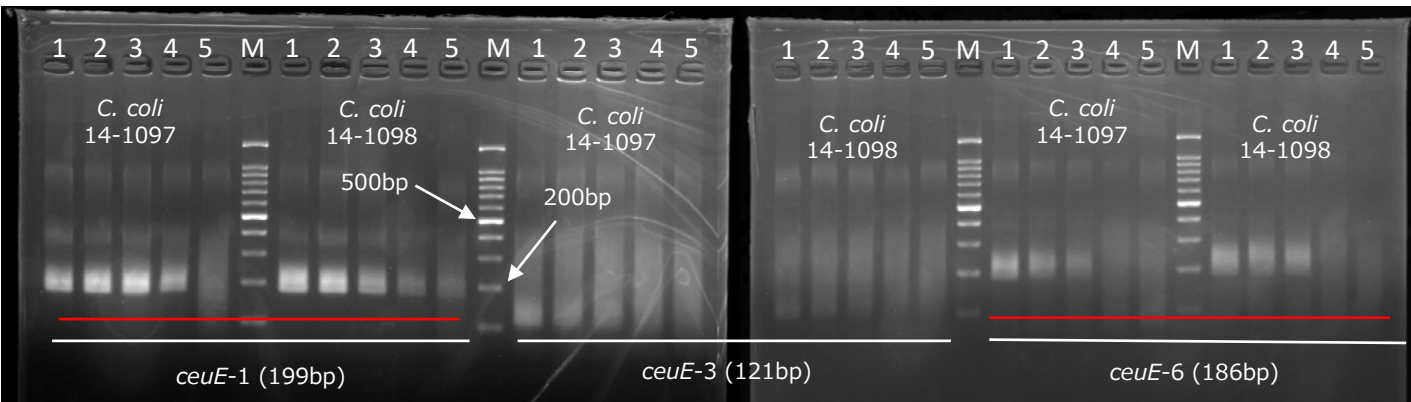
図1 RPA用*Campylobacter*及び細菌用陽性コントロールの検討
A) *C. jejuni*用プライマー、B) *C. coli*用プライマー、C)細菌用陽性コントロールプライマー
1次選択したプライマーの増幅遺伝子を赤線で示す。

A) *C. jejuni*用プライマー



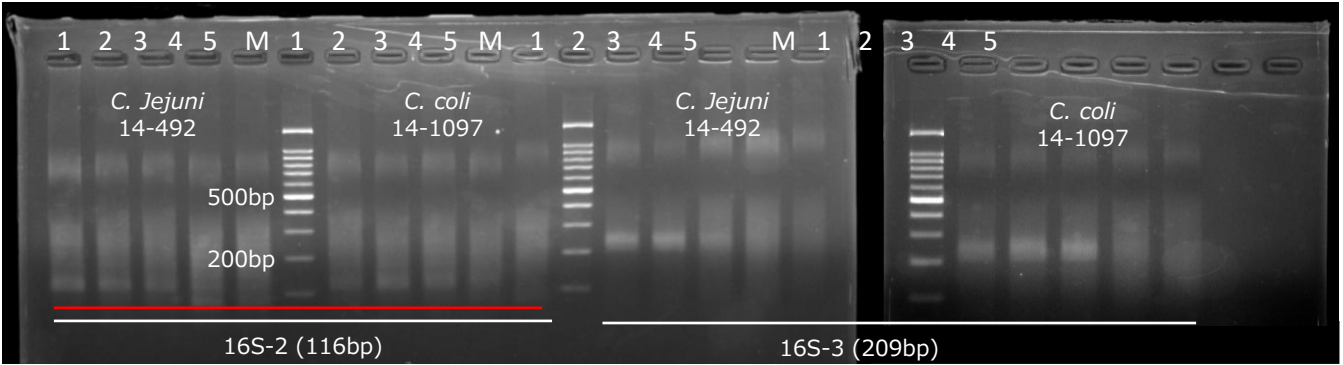
Lane	DNA濃度
1	1 ng/μL
2	100 pg/μL
3	10 pg/μL
4	1 pg/μL
5	0.1 pg/μL

B) *C. coli*用プライマー



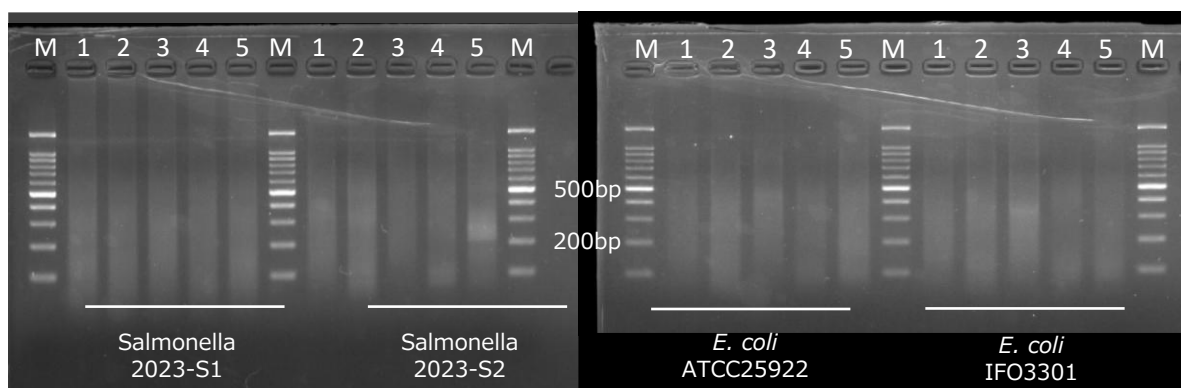
Lane	DNA濃度
1	1 ng/μL
2	100 pg/μL
3	10 pg/μL
4	1 pg/μL
5	0.1 pg/μL

C)細菌用陽性コントロールプライマー



Lane	DNA濃度
1	1 ng/μL
2	100 pg/μL
3	10 pg/μL
4	1 pg/μL
5	0.1 pg/μL

図2 RPA用プライマーにおける最小検出感度
A) *C. jejuni*用プライマー、B) *C. coli*用プライマー、C)細菌用陽性コントロールプライマー
2次選択したプライマーの増幅遺伝子を赤線で示す。



Lane	DNA
1	mapA-1 (288bp)
2	mapA-4 (299bp)
3	ceuE-1 (199bp)
4	ceuE-6 (186bp)
5	16S-2 (116bp)

図3 RPA用プライマーにおける交差反応試験

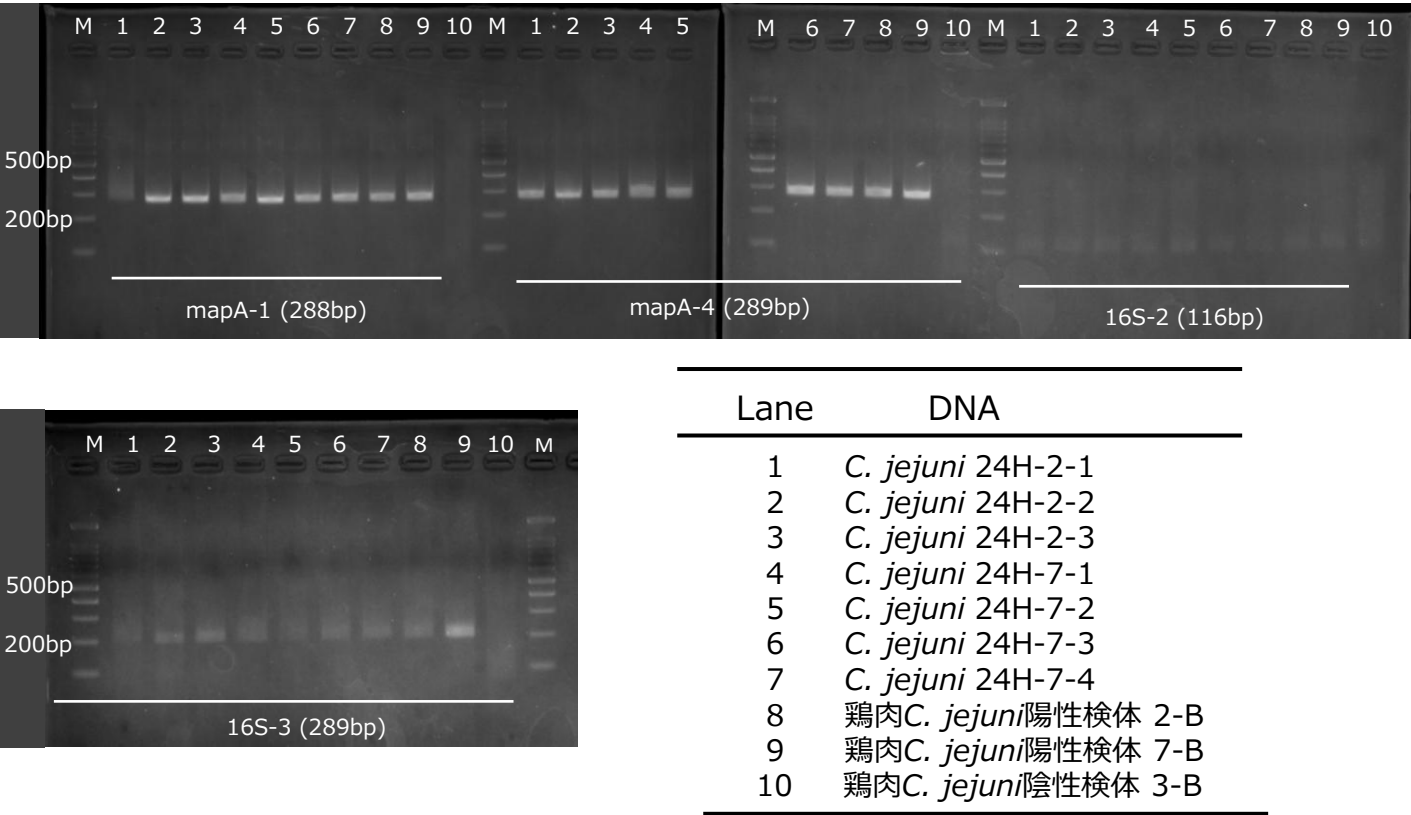
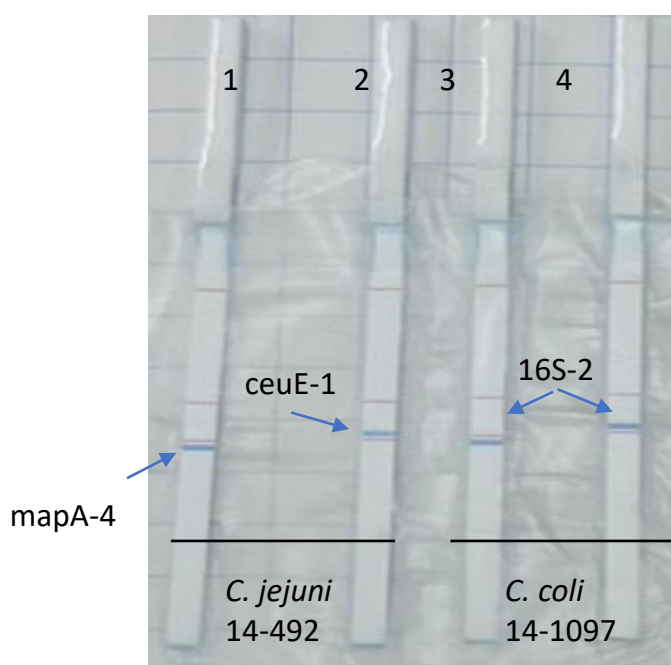


図4 RPA法による増菌培地からのカンピロバクター検出

A) 単一プライマーによる検出



B) マルチプライマーによる検出

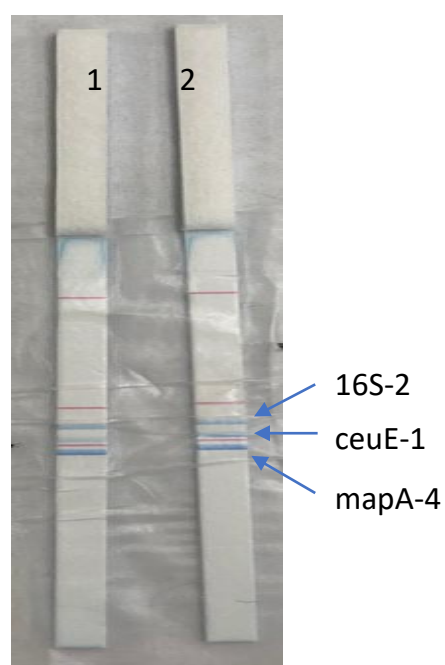


図5 核酸ペーパークロマトグラフィによるカンピロバクター検出

A) 単一プライマーによる検出 1、3レーンはmapA-4、2、4レーンはceuE-1を使用

B) マルチプライマーによる検出 1レーンは*C. jejuni* 14-492のDNA、2レーンは*C. coli* 14-1097のDNAを使用

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ペー ジ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

厚生労働大臣 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 本間 正充

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 食品の安全確保推進研究事業
2. 研究課題名 核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究
3. 研究者名 (所属部署・職名) 生化学部・室長
- (氏名・フリガナ) 曾我 慶介・ソガ ケイスケ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称：)	☐	☐	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

- (※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。
- (※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由：)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関：)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由：)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容：)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 国立大学法人 広島大学

所属研究機関長 職 名 学長

氏 名 越智 光夫

次の職員の令和6年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費 食品の安全確保推進研究事業
- 研究課題名 核酸等温増幅反応を用いた食品遺伝子検査の新規プラットフォーム開発に係る研究
- 研究者名 (所属部署・職名) 大学院統合生命科学研究科・教授
(氏名・フリガナ) 中山 達哉・ナカヤマ タツヤ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針 (※3)	☐	☒	☐		☐
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	☐	☒	☐		☐
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	☐	☒	☐		☐
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	☐	☒	☐		☐

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 ☒ 未受講 ☐
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 ☒ 無 ☐ (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 ☐ 無 ☒ (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。