

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4年度 分担研究報告書

核酸等温増幅反応技術における微生物分野に関する文献調査

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 准教授

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、十分に食品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スタンダードではあるが、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サーマルサイクラー（PCR）やライトサイクラー（real-time PCR）が一般的に使用されているが、これらの機器は導入に高額費用がかかること、さらに、核酸増幅から判定までに3時間程度、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。

そこで、本研究では、食品衛生微生物分野における RPA 法の文献調査を実施し、食品遺伝子検査として利用可能な情報収集を行うとともに、昨今、ニュース等のメディアで報道されている薬剤耐性問題に関する情報収集も同時に行った。食品衛生微生物分野に関連したものを選択した結果、単一属菌検出法と複数属菌検出法の2種類あることが判明した。最も報告が多いものとして、サルモネラ属菌の検出に関するもの、次いでビブリオ属菌の検出に関するものの順であった。複数属菌を検出している報告として、サルモネラ属菌と大腸菌 O157、サルモネラ属菌とリステリア、黄色ブドウ球菌と大腸菌 O157 の検出に関するものが報告されていた。また、食品衛生微生物分野におけるプラスミド性薬剤耐性遺伝子に関する報告を探索した結果、基質特異性拡張型 β ラクターマーゼ産生遺伝子である CTX-M 遺伝子に関わる報告が1報のみ公表されていた。これら RPA による食中毒菌及び薬剤耐性遺伝子の報告はすべて37°C前後、30分以内の反応で標的遺伝子増幅を可能としているため、食品衛生微生物分野に応用できる有用な手法であると考えられる。

本文献調査から、RPA は微生物検出の簡易的・迅速法として有用な技術であることは十分に理解できた。今後、本技術を必要とする場所の選定、需要調査を行うことが必要であると考えられる。

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1%程度を食品検査しているが、今後、益々輸入食品が増加することで

検査率が低下し、それによる違反食品が日本市場に出回ることが懸念され、食品の安全を損なうことが危惧される。そこで、輸入食品が増加しても、検査率を低下させないために、効率的に行える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、ノロウイルス、アニサキスの病因物質があげられる。2022 年度の食中毒統計によると、これら 3 つの病因物質における食中毒事件数は、日本全体の 84.6% をしめる (厚生労働省 食中毒統計 2022)。世界では日本とは違う食中毒菌に着目していることが多い。日本では食中毒事件数が少ないサルモネラは、環境中に幅広く生息しているために、諸外国では特に注意されている (Osimani et al. 2016)。また、水産物の食中毒菌の危害として着目されているのが腸炎ビブリオを含むビブリオ属菌である (Li et al 2023)。東南アジアでは海産物を主要な輸出品としている国が多く (Ndraha et al. 2019)、海産物を生で食す可能性もあることから、東南アジアでは、特にビブリオ属菌に着目している。

一方で、2050 年には薬剤耐性菌による死者がガンを抜いて世界でトップとなると試算されていることから (Antimicrobial Resistance 2016)、薬剤耐性菌制御に関する研究、対策が国家レベルで行われている。食品における薬剤耐性菌はヒト薬剤耐性菌保菌に直結するために注目されている。世界保健機関 (WHO) によると、薬剤耐性菌の中でも、カルバペネム及び基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ (ESBL) 産生腸内細菌科菌群は最も危険度が高い Priority 1 と位置付けされており、最も対策を講じるべき耐性菌として報告されている (World Health Organization 2017)。カルバペネム及び ESBL 産生に関連する耐性遺伝子はプラスミドにコードされていることが多く (Bush et al, 2020)、これらの耐性はプラスミドの水平伝播によって、同種間よりもより他の菌種にも伝播することからも注意が必要とされている (Dolejska et al 2018)。

本研究は、RPA 法の核酸等温増幅反応の現状の情報収集を食品衛生微生物分野で行い、サンプリングから DNA 抽出法、核酸増幅後の判定を明らかにし、試験法の開発に繋げることを目的とする。

B. 研究方法

文献調査

文献データベースは論文情報検索エンジン PubMed を用い、「RPA、Detection」をキーワードとし、2006 年以降を調査対象とした。該当した論文はタイトル、要旨を確認し、食中毒菌と関係のあるもの及びプラスミド性薬剤耐性 (ESBL 及びカルバペネマーゼ産生) に関係あるものを分別し、論文を精査した。

C. 研究結果

RPA 法に関する文献調査

2022 年 9 月に PubMed 検索で、2006 年以降の論文を調査した結果、738 件が該当した。738 件を調べた結果、その多くは病原菌や病原ウイルス等の医療分野における病原微生物の検出に関わるものであった。

RPA 法と食中毒菌に関係するものを調べた結果、合計 38 件が該当した (表 1)。該当した論文を病因物質別で仕分けした結果、サルモネラ及びビブリオに関する論文が、それぞれ 10 報 (表 2) 及び 8 報 (表 3) と最も多いことが判明した。次いで病原性大腸菌及びリステリアが、ともに 5 報であった (表 1)。また、単一属菌のみならず、複数属菌を同時に検出した報告もあり、サルモネラと病原性大腸菌、サルモネラとリステリア、黄色ブドウ球菌と病原性大腸菌、さらには食中毒ウイルスと腸管感染性ウイルスの同時検出の報告があった (表 1)。

一方で、プラスミド性薬剤耐性遺伝子に関しては食品検査を念頭に入れた ESBL 産生遺伝子に関する報告が 1 報あり、臨床分野を想定したカルバペネマーゼ産生遺伝子検出に関する報告が 3 報あ

った。これら RPA 法の両耐性遺伝子の検出報告は 2021 年及び 2022 年と直近の論文である (表 4)。

食品検査分野におけるサルモネラ検出について

サルモネラ検出に用いた RPA 法に関する論文報告は全部で 10 報確認された。国別に見ると中国が 9 報、米国が 1 報である。供試食品は牛乳を対象としたものが 6 報と最も多く、次いで肉類 (ラム肉、豚肉、鶏肉) 3 報、野菜 (ブロッコリー、キャベツ、トマト) 3 報、卵 2 報、貝やヨーグルトを対象としたものもある (一部の論文では複数食品をテストしているために重複しているものもある。) (表 2)

RPA 法を行うために検体中へ DNA を溶出させる必要がある。本検索論文では煮沸法を用いているものが 5 報、市販 DNA 抽出キットを用いているものが 5 報であった。また、RPA 法によって増幅した遺伝子の検出は、ラテラルフローによるものが 7 報と最も多く、次いでゲル泳動によるもの 2 報、CRISPR/Cas システムを使ったもの 2 報、比濁 1 報、リアルタイム PCR 1 報 (一部の論文では複数検出技術を採用しているために重複しているものもある。) 反応時間は 10 から 60 分の間で、反応温度は 25 から 42°C の範囲で反応させている。サルモネラ検出のための標的遺伝子は多くが *invA* を標的としているものが多く、中には T7 promoter、*fimY*、DLH (dienelactone hydrolase) を *invA* と合わせてもしくは単独で使用している報告もあった。

(表 2)

RPA 法によるサルモネラ遺伝子の検出結果は、PCR 法やリアルタイム PCR 法による検出と比較しても、交差反応はなく、さらに検出感度が 10 から 100 倍高い (表 2)。

食品検査分野におけるビブリオ検出について

サルモネラに次いで、ビブリオの報告は全部で 8 報確認された。発表国は全て中国である。供試食品は魚 5 報、オイスター 4 報、エビ 4 報、カニ 2

報と対象にしている (一部の論文では複数食品をテストしているために重複しているものもある。)

(表 3) DNA 抽出法に関しては、6 報が市販 DNA 抽出キット、2 報が煮沸法であった。増幅遺伝子の検出法はラテラルフローによるものが 4 報、リアルタイム PCR によるものが 3 報であった。反応時間は 5 分、2 から 14 分と 10 分前後で検出可能としているもの、35 分で検出可能としている報告もあった。また、反応温度の多くは 37 もしくは 38°C での報告が多く、比較的溫度範囲が広い 35 から 45°C なら検出可能としている報告もあった。ビブリオ検出のための標的遺伝子に関しては、*empV* での報告が 3 報と最も多かった。

RPA 法によるビブリオ遺伝子の検出結果は、サルモネラと同様に、交差反応はなく、さらに、リアルタイム PCR 法と比較しても、同等もしくはそれ以上の感度を示していた (表 3)。

ESBL 及びカルバペネマーゼ産生遺伝子検出について

RPA 法を用いた ESBL 産生遺伝子の検出報告は食品分野を想定した報告が 1 報あった。発表国はタイからの報告で豚肉及びブタの盲腸内容物から、ESBL 産生遺伝子である *bla_{CTX-M}*、*bla_{OXA}*、*bla_{SHV}* グループの検出を可能にしている。RPA 法による増幅反応は 37°C、30 分で可能とし、ラテラルフローにより確認している (表 4)。

一方で、カルバペネマーゼ産生遺伝子の検出報告は、3 報すべて臨床分離株から耐性遺伝子を検出したものである。発表国はオーストラリア、中国、タイから発表されており、*bla_{NDM}*、*bla_{VIM}*、*bla_{KPC}*、*bla_{OXA}*、*bla_{IMP}* グループを標的遺伝子として、増幅を可能としている。DNA 抽出法は煮沸法及び市販 DNA 抽出キットを用いており、また、反応温度は 37°C から 39°C、反応時間は 10 分から 30 分で核酸増幅可能としている (表 4)。

RPA 法による ESBL およびカルバペネマーゼ遺伝子の検出結果は、食中毒菌検出と同様に、交差

反応はなく、さらに検出感度は PCR 法の 100 倍高い報告であった (表 4)

D. 考察

食中毒菌の検出について

RPA 技術を用いた、食品検査分野における食中毒菌の検出を調査した結果、サルモネラ及びビブリオが最も報告が多かった。サルモネラは環境や動物と至る所で生息していること、世界的にもサルモネラによる食中毒報告がされていることから論文数も多いことが考えられる。RPA 法で使用されるサルモネラ標的遺伝子は、既存のサルモネラの遺伝子同定試験で一般的に用いられる *invA* を用いたものが大半で、*invA* はなじみがある遺伝子であることから浸透しやすく、有用である。また、ビブリオに関しては、近年の寿司ブームもあり、海産物を生で喫食する可能性もあることから、ビブリオの論文数増加に繋がっていると考えられる。ビブリオの標的遺伝子に関しては、*empV* 遺伝子 (*Vibrio vulnificus*) を利用した報告が多いが、多くの論文で各種ビブリオの特異的毒素遺伝子を標的としているために、サルモネラのように共通しているわけではない。

RPA 法を行うためには DNA 抽出が必要となることから、DNA 抽出法の選択は非常に重要である。本検索論文では、煮沸法及び市販 DNA 抽出キットと両方の使用報告がある。煮沸法は市販キットよりも簡易で安価である。幾つかの論文では、煮沸法を用いた検出を可能としていることから、煮沸法は RPA 法に適用可能な DNA 抽出法と考えられる。

また、RPA 法により増幅した標的遺伝子を検出するための手法として、ラテラルフローとリアルタイム PCR と大きく 2 つが使用されている。現場で適したものと考ええると、より簡易的であるラテラルフローで検出させる方が良いと考える。

特異性・感度に関しては、検出システムを考える上で非常に重要となる項目である。本検索論文

によると、食中毒菌・薬剤耐性論文ともに、交差反応は認められないことから、特異性は非常に高い。加えて、検出感度に関しても、どの報告からも既存の PCR 法よりも高い検出感度を示しており、特異性・感度に関して、申し分のない結果を示している。さらに、反応温度・時間に関しては、37°C、30 分以内で標的遺伝子は十分に増幅することが確認されているために、RPA 法による増幅は非常に短時間で行えることが確認された。

以上を踏まえると、RPA 法は現場で簡易的に遺伝子検出を可能にする方法として非常に適した手法であるといえる。しかしながら、論文報告では、最適条件の結果、上手く設計されたプライマーを用いているために、新規の遺伝子を検出する場合には、種々の条件検討が必須であり、そのための開発時間も考慮する必要がある。

E. 結論

本課題では RPA による食中毒菌及びプラスミド性薬剤耐性遺伝子の検出した論文を検索し、論文の内容を精査した。その結果、食中毒菌であるサルモネラやビブリオ及びプラスミド性薬剤耐性遺伝子である ESBL 産生やカルバペネマーゼ産生遺伝子の検出において、RPA 法は非常に有効な手法であることが判明した。

F. 参考文献

- 厚生労働省 食中毒統計 2022.
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>
- Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for health and wealth of nations. UK, December 2014
- Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. UK, May 2016

- Ayfan AKS, Macdonald J, Harris PNA, Heney C, Paterson DL, Trembizki E, Wang CYT, Whiley DM, Zowawi HM, Irwin AD. Rapid detection of NDM and VIM carbapenemase encoding genes by recombinase polymerase amplification and lateral flow-based detection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021; 40:2447-2453.
- Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020; 33:e00047-19.
- Cai Q, Wang R, Qiao Z, Yang W. Single-digit Salmonella detection with the naked eye using bio-barcode immunoassay coupled with recombinase polymerase amplification and a CRISPR-Cas12a system. *Analyst.* 2021; 146:5271-5279.
- Dolejska M, Papagiannitsis CC. Plasmid-mediated resistance is going wild. *Plasmid.* 2018; 99:99-111.
- 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.
- Hemwaranon P, Srisrattakarn A, Lulitanond A, Tippayawat P, Tavichakorntrakool R, Wonglakorn L, Daduang J, Chanawong A. Recombinase Polymerase Amplification Combined with Lateral Flow Strip for Rapid Detection of OXA-48-like Carbapenemase Genes in *Enterobacterales*. *Antibiotics.* 2022; 11:1499.
- 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.
- Kanokudom S, Assawakongkarat T, Akeda Y, Rathawongjirakul P, Chuanchuen R, Chaichanawongsaroj N. Rapid detection of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from fresh pork meat and pig cecum samples using multiplex recombinase polymerase amplification and lateral flow strip analysis. *PLoS One* 2021; 16:e0248536.
- Li J, Ma B, Fang J, Zhi A, Chen E, Xu Y, Yu X, Sun C, Zhang M. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow immunoassay for rapid detection of *Salmonella* in food. *Foods* 2019; 9:27.
- Li M, Xu H, Tian Y, Zhang Y, Jiao X, Gu D. Comparative genomic analysis reveals the potential transmission of *Vibrio parahaemolyticus* from

- freshwater food to humans. *Food Microbiol.* 2023; 113:104277.
- 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.
- Ndraha N, Wong HC, Hsiao HI. Managing the risk of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with oyster consumption: A review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020; 19:1187-1217.
- Osimani A, Aquilanti L, Clementi F. Salmonellosis associated with mass catering: a survey of European Union cases over a 15-year period. *Epidemiol Infect.* 2016;144:3000-3012.
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006; 4:e204.
- Tamer C, Benkaroun J, Kurucay HN, Albayrak H, Weidmann M. Development of a recombinase polymerase amplification assay for viral haemorrhagic septicemia virus. *J Fish Dis.* 2022; 45:1065-1071.
- Wang F, Wang L, Chen H, Li N, Wang Y, Li Y, Liang W. Rapid detection of *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like} and *bla*_{IMP} carbapenemases in *Enterobacterales* using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:772966.
- 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.
- World Health Organization (2017) <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Wu H, Zhao P, Yang X, Li J, Zhang J, Zhang X, Zeng Z, Dong J, Gao S, Lu C. A recombinase polymerase amplification and lateral flow strip combined method that detects *Salmonella enterica* serotype Typhimurium with no worry of primer-dependent artifacts. *Front Microbiol.* 2020; 11:1015.
- Yang HL, Wei S, Gooneratne R, Mutukumira AN, Ma XJ, Tang SZ, Wu XY. Development of a recombinase polymerase amplification assay for *Vibrio parahaemolyticus* detection with an internal amplification control. *Can J Microbiol.* 2018; 64(4):223-230.
- Yang X, Zhang X, Wang Y, Shen H, Jiang G, Dong J, Zhao P, Gao S. A Real-Time Recombinase Polymerase Amplification Method for Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Seafood. *Front Microbiol.* 2020; 11:586981.
- Yang X, Zhao P, Dong Y, Chen S, Shen H, Jiang G, Zhu H, Dong J, Gao S. An isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow strip combined method for rapid on-site detection of *Vibrio vulnificus* in raw seafood. *Food Microbiol.* 2021; 98:103664.
- Yang X, Zhao P, Dong Y, Shen X, Shen H, Li J, Jiang G, Wang W, Dai H, Dong J, Gao S, Si X. An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* with lateral flow strips. *J Food Sci.* 2020;85 :1834-1844.
- Zhao L, Wang J, Sun XX, Wang J, Chen Z, Xu X, Dong M, Guo YN, Wang Y, Chen P, Gao W, Geng Y. Development and evaluation of the rapid and sensitive RPA assays for specific detection of *Salmonella* spp. in food samples. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:631921.

Zhang Y, Tian J, Li K, Tian H, Xu W. Label-free visual biosensor based on cascade amplification for the detection of *Salmonella*. *Anal Chim Acta* 2019; 1075:144-151.

Zhu P, Cui Y, Pang J, Xiong Z, Huang Z, Guo S, Zhang S, Cai T. Sensitively and quickly detecting *Vibrio vulnificus* by real time recombinase polymerase amplification targeted to *vvhA* gene. *Mol Cell Probes*. 2021; 57:101726.

Zhuang J, Zhao Z, Lian K, Yin L, Wang J, Man S, Liu G, Ma L. SERS-based CRISPR/Cas assay on microfluidic paper analytical devices for supersensitive detection of pathogenic bacteria in foods. *Biosens Bioelectron* 2022; 207:114167.

F. 研究発表・業績

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. 食品衛生微生物分野における RPA 法を用いた論文数

	論文対象属菌	論文数
単一属菌検出	<i>Salmonella</i>	10
	<i>Vibrio</i>	8
	<i>E. coli</i> (O157:H7 を含む)	5
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1
	<i>Bacillus cereus</i>	1
	<i>Campylobacter jejuni</i>	1
	Norovirus Genogroup II (NoVs GII)	1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1
	<i>Streptococcus suis</i> serotype 2 (SS2)	1
複数属菌検出	<i>Salmonella</i> と <i>E. coli</i> O157:H7	1
	<i>Listeria monocytogenes</i> と <i>Salmonella</i>	1
	食中毒ウイルス と 腸管ウイルス	1
	<i>Staphylococcus aureus</i> と <i>E. coli</i> O157:H7	1
合計		38

表2. 食品検査分野における RPA 法を用いたサルモネラ検出論文

著者	ジャーナル名	発表年	発表国	供試食品	DNA 抽出法	検出法	反応温度 & 時間	RPA 感度*1	標的遺伝子
Gao et al	Bioprocess Biosyst Eng.	2018	China	貝	煮沸法	ラテラルフロー	37°C 20 分	100 倍 100fg/20uL	<i>invA</i>
Hice SA et al	Anal Chem.	2019	USA	牛乳、卵	煮沸法	ラテラルフロー とゲル泳動	40°C 20 分	10 ⁴ CFU mL ⁻¹	DLH(dienelactone hydrolase gene), <i>invA</i>
Hu J et al	J Microbiol Methods.	2019	China	牛乳	Ezup Column Bacteria Genomic DNA Purification Kit	ラテラルフロー	40~42°C 10 分	10 倍 1.95CFU/mL	<i>invA</i>
Zhang Y et al	Anal Chim Acta.	2019	China	ヨーグルト	煮沸法	ゲル泳動と比濁	37°C 30 分	6 CFU/mL	<i>invA, B, C, D, E</i>
Li J et al.	Foods.	2019	China	トマト、キャベツ、ブロッコリー	TIANamp Genomic DNA Kit (Tiangen Biotech, China)	ラテラルフロー	37°C 10 分	129 CFU/mL (スパイク試験)	<i>fimY</i>
Wu H et al.	Front Microbiol.	2020	China	牛乳	煮沸法	ラテラルフロー	42°C 30 分	PCR 法より高く qPCR と同等 1 CFU/mL	<i>invA, E</i>
Zhao L et al.	Front Cell Infect Microbiol.	2021	China	鶏肉、ラム肉、ブロッコリー	TIANamp Bacteria DNA Kit	Real-time PCR ラテラルフロー	39°C 20 分	Real time RPA と qPCR は同等 11 fg	<i>invA</i>
Li X et al.	Anal Chem.	2021	China	牛乳、卵、豚肉、鶏肉、ピーナッツバター、キャベツ	A commercial genomic DNA extraction kit	ラテラルフロー	25~42°C 30~60 分	RPA-LF 1.95 CFU/mL	<i>invA</i>
Cai Q et al.	Analyst.	2021	China	牛乳	煮沸法	Cas12a	60 分以内	100 CFU/mL (スパイク試験)	T7 promoter
Zhuang J et al.	Biosens Bioelectron.	2022	China	牛乳、肉検体	InstaGene Matrix kit	Cas12a	45 分以内	3-4 CFU/mL (ミルクスパイク試験) 1 CFU/mL (肉スパイク試験)	<i>invA</i>

*1PCR・リアルタイム PCR と比較

表3. 食品検査分野における RPA を用いたビブリオ検出論文

著者	ジャーナル名	発表年	発表国	供試食品	DNA 抽出法	検出法	反応温度&時間	RPA 感度*1	標的ビブリオ菌	標的遺伝子	
Yang HL et al.	Can J Microbiol.	2018	China	シーフード、魚	TIANamp DNA Kit (Tiangen China)	Bacteria Biotech,	RPA-IAC (internal amplification control)	37°C 20 分	培養法と同等 3000 CFU/mL	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>
Geng Y et al,	BMC Microbiol.	2019	China	オイスターソース 魚 (タラ)	TIANamp DNA Kit (Tiangen China)	Genomic Biotech,	Real-time PCR	38°C 20 分	qPCR の方が 感度が高い 1-7 CFU/25g	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>gyrB</i>
Wang P et al.	J Food Sci.	2020	China	エビ、オイスター、 魚切り身 (カツオ)	煮沸法		ラテラルフロー	35°Cから 45°C 25 分	qPCR と同等 10CFU/10 g (スパイク試験)	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>tlh, tdh, trh</i>
Yang X et al.	Front Microbiol.	2020	China	エビ、魚、カニ、 オイスター	TIANamp DNA Kit (Tiangen China)	Genomic Biotech,	Real-time PCR	39°C 2-14 分	qPCR より高い 17copies, 1 CFU/10g (スパイク試験)	<i>V. vulnificus</i>	<i>empV</i>
Jiang W et al.	Anal Bioanal Chem.	2020	China	オイスター	TIANamp DNA Kit (Tiangen China)	Genomic Biotech,	ラテラルフロー	37°C 10 分	10pg, 2 CFU/g (スパイク試験)	<i>V. parahaemolyticus</i>	the specific target gene, (GenBank: NC_004605.1),
Wang P et al.	Biosensors	2021	China	エビ	煮沸法		ラテラルフロー	37°C 5 分	qPCR と同等	<i>V. cholerae</i> <i>V. vulnificus</i>	<i>lolB, empV</i>
Zhu P et al.	Mol Cell Probes.	2021	China	—	MiniBEST Genomic DNA Extraction Kit (Takara Bio, Japan)	Bacterial DNA	Real-time PCR	38°C 20 分	qPCR と同等 120 CFU/mL (スパイク試験)	<i>V. vulnificus</i>	<i>vvhA</i>
Yang X et al.	Food Microbiol.	2021	China	エビ、魚、貝、カニ	TIANamp DNA Kit (Tiangen China)	Genomic Biotech,	ラテラルフロー	37°C 35 分	qPCR と同等か それ以上 2 copies, 1 CFU/ 10g (スパイク試験)	<i>V. vulnificus</i>	<i>empV</i>

*1PCR・リアルタイム PCR と比較

表 4. RPA 法を用いたプラスミド性薬剤耐性遺伝子検出論文

βラクタマーゼ	著者	ジャーナル名	発表年	発表国	対象検体	DNA 抽出法	RPA 技術	反応温度 & 時間	感度	標的遺伝子
ESBL	Kanokudom S et al.	PLoS One	2021	Thailand	食品 (豚肉)	-	ラテラルフロー	37 °C 30 分	2.5 ng/25uL	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{SHV}
Carbapenemase	Ayfan AKS et al.	Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.	2021	Australia	臨床分離株	煮沸法	ラテラルフロー	39 °C 10 分	9.2 copies/uL or 7.5 copies/uL	<i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{VIM}
	Wang F et al.	Front. Cell Infect. Microbiol.	2021	China	臨床分離株	TIANamp Genomic DNA Kit (Tiangen Biotech, China)	ラテラルフロー	37 °C 30 分	100fg/reaction or 1000fg/reaction	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48-like} , <i>bla</i> _{IMP}
	Hemwaranon P et al.	Antibiotics	2022	Thailand	臨床分離株	煮沸法	ラテラルフロー	37 °C 10 分	PCR の 100 倍	<i>bla</i> _{OXA-48}