

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4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。

第一に、等温核酸増幅反応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った。近年の論文数は LAMP が一番多く、次に RPA と続いた。国内食品検査として未検討の RPA について 5 年間の論文を調査したところ、臨床で使われることが多かったが、日本以外の国では動植物や食品の検査への応用例も見られた。反応温度帯は 37~39°C で、30 分以内で終わるラテラルフローアッセイで利用され、簡便検査法として実績が多く有用な技術であると考えられた。さらに、食品衛生微生物分野における RPA の文献を深掘りするとともに、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。報告数は、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に多かった。単一属菌検出法の他に、複数属菌検出法も報告されていた。複数属菌を検出するものとして、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ところ、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 遺伝子に関わるものが 1 報のみ報告されていた。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。

次に、RPA による検出法開発を検討するために、遺伝子組換えとうもろこし MON863 系統をモデルに、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (SSIIB) 及び多くの遺伝子組換え作物に導入されているカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配列 (P35S) を標的とした方法を検証した。検討した RPA-SSIIB に関しては、特異性は良好であるが、検出限界値が 260~2,600 コピーとリアルタイム PCR と比べて感度が悪かった。RPA-P35S に関してはバックグラウンドが高く、検査法の開発にはさらに検討が必要であった。しかし、各反応は 37°C、15 分間以内に完了することから、簡易的に検査求められる場合の時間短縮やオンサイト利用には有用な技術と考えられた。よって、今後、RPA の食品遺伝子検査への応用・導入を検討する際は、その需要調査を行うことも重要と考えられる。

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 准教授

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すと考えられる。現在、国内輸入食品は全体の 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。

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., 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、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) 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、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。

本研究は、LAMP や RPA 等の核酸等温増幅反応を用いた遺伝子検査についての情報収集を行い、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。

B. 研究方法

文献調査

文献調査では論文情報検索エンジン PubMed を用い、直近 5 年分 (2022 年 4 月まで) の報告に関して核酸等温増幅反応に関するキーワード検索を行った。各反応の検出法に関するデータを抽出するため、キーワードはその反応の正式名称、略語及び検出の 3 語を用いた。例えば、RPA 反応では #Recombinase Polymerase Amplification, #RPA,

#detection の 3 種類の単語を含む論文を検索した。出版年が 2017 年以降でヒットした論文から無関係の論文や Review を除き、論文の Abstract・本文から検査対象、検出に用いた手法、温度、時間、感度、国名等を抽出し、集計を行った。

食品衛生微生物検査分野の詳細調査では、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。

Recombinase Polymerase Amplification

RPA のモデルとして遺伝子組換え (GM) とうもろこしを標的とするため、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (SSIIB) 及び多くの遺伝子組換え作物に導入されているカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター配列 (P35S) を標的とした RPA 用プライマー及びプローブを、FASMAC 社から購入した。TwistDx 社の RPA 説明書を参考に、各標的のプローブを 1 種類設計し、その周辺の領域でプライマーを複数設計して、プライマーセットの性能を検証した。SSIIB ははフォワード (Fw) プライマー 10 種、リバース (Rv) プライマー 10 種を設計した。P35S のプライマーはフォワード (Fw) プライマー 10 種、リバース (Rv) プライマー 3 種を設計した。

測定試料は GM とうもろこし MON863 系統の認証標準物質 (ERM-BF416d MON863 MAIZE nominal 10% GMO) から抽出したゲノム DNA を用いた。特異性評価では、ナス、ジャガイモ、レモン、インゲンマメ、玉ねぎ、キャベツ、ライ麦、カブ、真鯛、サケ、ブタ及びウシのゲノム DNA を用いた。

プライマー及びプローブの最良なペアを検討するために、10%MON863 (1 ng/μL) を標的とし、加水分解 Probe を用いてリアルタイム蛍光検出を行った。試薬は TwistAmp exo (TwistDx 社) を用いた。

Rehydration Buffer	29.6 μL
Primer-F (10 μM)	2.0 μL (400 nM)
Primer-R (10 μM)	2.0 μL (400 nM)

Exo probe (10 μM)	0.8 μL (250 nM)
-------------------	-----------------

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 17.2 μL ずつ分注した。分注した各チューブにテンプレート DNA (0.01~10 ng/μL) またはネガティブコントロールサンプルを 6.6 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。サンプルの保温及び蛍光検出は LightCycler 480 (Roche Diagnostics 社) を用いた。反応中は 37°C で 30 分間保温した。プライマー評価時は 37°C、20 秒を 1 サイクルとし、45 サイクル時 (15 分後) の蛍光強度の時の蛍光強度を指標に性能を評価した。陽性の閾値は 15 分後の蛍光強度が 2 を超えるかどうかで判定した。

RPA の確認を電気泳動で行う場合は TwistAmp Basic (TwistDx 社) を用いた。

Rehydration Buffer	29.6 μL
Primer-F (10 μM)	2.4 μL (500 nM)
Primer-R (10 μM)	2.4 μL (500 nM)
超純水	11.2 μL (up to 45.6 μL)

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 22.8 μL ずつ分注した。分注した各チューブにテンプレート DNA (10 ng/μL) またはネガティブコントロールサンプルを 1.0 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。反応は Verti pro サーマルサイクラー (Thermo fisher Scientific 社) を用いて 37°C で 30 分間保温した。電気泳動にはアガロースゲル (2%) を用い、核酸の染色には GelRed™ を用いた。

C. 研究結果 情報調査 (全体)

現在知られている核酸等温増幅技術に関して順に調べた。PubMed を用いてキーワードは技術の名称のみで検索したところ、「リアルタイム PCR」は 2001 年から 2011 年にかけて顕著に増加し、2012 年以降年間 6000 報以上の論文が発刊され、

累計論文数は 90000 報以上に上った。「LAMP」は 2001 年から論文数が増え、2021 年には年間 600 報、累計論文数も 4000 報以上に上った。その他に増加傾向にあるのは「RPA」で、2013 年から論文数が増え始め、2021 年には年間 200 報を越えた。Rolling circle amplification (RCA) は徐々増えており、2001 年から緩やかに増加しており、2022 年もまだ増加している傾向が見て取れ、総数も 1600 報以上に上った。Strand displacement amplification (SDA) 等も論文数は伸びてきているが、年間多くて数十報で、LAMP や RPA 等より数は少なかった。よって、主に国内食品検査として未検討の RPA に関して調査・検討することとした。

RPA に関する文献調査

2020 年以降論文数が約 2 倍に増えた RPA に着目し、RPA を用いた検出法に関する論文調査を行った。用途は臨床診断が 200 報以上で、その次に動物検査、作物検査、食品検査、環境検査と続いた。検査対象はウイルスが 200 報以上、バクテリアが 150 報以上と多く、寄生虫、その他微生物の報告数が多かった。他にもわずかながら GM 作物検査の報告も数件あった。反応温度は 37~39℃帯での報告が多かった。RPA のアッセイ系はラテラルフローアッセイが最も多く、約 200 報に上った。その他に CRISPR/Cas 技術やリアルタイムの検出も報告が 50 報以上あった。アガロースゲル電気泳動で確認する報告は数報であった。発表国は中国が一番多く 250 報以上、続いて米国の 50 報以上と続いた。日本は僅かに 5 報であった。検出限界値は、コピー数標記の場合、1 反応 20 コピー未満と評価されているものも多かった。

食品衛生微生物検査での利用をより詳細に調査した。RPA 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。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）。RPA 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 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℃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。RPA によるサルモネラ遺伝子の検出結果は、従来 PCR やリアルタイム PCR 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 10~100 倍高いとされていた。

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）。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、2~14 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℃での報告が多く、比較的溫度範囲が広い 35~45℃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 報と最も多かつ

た。RPA 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。

RPA 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。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 37~39°C、反応時間は 10~30 分で核酸増幅可能としている。RPA 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。

RPA の検証

GM とうもろこしの検出をモデルとして RPA を新たにデザインした。RPA 試薬を販売している TwistDx 社の説明書 (TwistDx 社ホームページより) によると、下記の通り指示及び提案がなされている。

・プライマー長について

迅速な増幅するには、プライマーのデザインには、PCR で利用される長さ (18~23 塩基) より長めの 30~35 塩基が推奨されているが、配列と性能に関する規則性が分かっていないため、いくらかのオリゴ DNA ペアを試す必要がある。現在挙げられている注意点としては、1) 長いポリマー配列、2) 反復配列、3) 二次構造を取りうる配列、

4) GC 含量 70%以上の配列、5) プライマーペア間で相互作用がある配列は避けるべきである。また、5'末端は G の連続を避け、3'末端に G または C を 3 連続以上配置し、GC 含量は 30~70%とする。

・各試薬濃度について

試薬濃度幅は、酢酸マグネシウムは 12~20 mM、プライマーは 150~600 nM、プローブは 50~150 nM で検討する。メーカー推奨プロトコールは、短い標的核酸の高速増幅を意図しているため、プライマー濃度 500 nM、プローブ濃度 120 nM と高濃度に設定されている。プライマー濃度を下げると得られるアンプリコンの最終産物量は低下するが長いものが増える。

・増幅塩基長について

増幅塩基長は 1,500 塩基対以上を増幅可能だが、TwistDx 社の試薬では迅速な増幅を目的としているため、100~200 塩基対の合成に最適化している。短いアンプリコンほど短時間で合成可能なため、結果的に、他の増幅される配列との差別化に寄与し、特異性が高くなる。

・反応温度について

37~42°C で最適化され、これ以上高温の場合は酵素が最高活性から徐々に失活するため、望ましくない。一方で、37°C 以下で反応させると、反応速度は下がるが、反応は継続される。よって、一定時間当たりの変化をより高い解像度で解析したい場合は、反応温度を下げることも選択肢の一つになる。

・蛍光プローブについて

RPA で使用される DNA ポリメラーゼは 5'⇒3' 方向のエキソヌクレアーゼ活性を欠いた鎖置換型なため、TaqMan プローブは適用不可で、メーカーからは別の加水分解プローブの系 (RPA-exo) が開発されている。RPA-exo では 46-52 塩基というリアルタイム PCR より長めのプローブが使われ、そのプローブ内にエキソヌクレアーゼの認識配列として脱塩基ヌクレオチドアナログ (テトラヒドロ

フラン残基や d スペーサー) が導入されており、標的配列にアニーリングした際に鎖置換とともに、エキソヌクレアーゼでクエンチャから分断された蛍光色素が蛍光を発するようになる。この RPA-exo プローブは、クエンチングの効率を考慮して、脱塩基部位を蛍光色素及びクエンチャで 6 塩基間に挟む必要がある。すなわち、蛍光色素を標識可能なチミジンが 6 塩基間に認められる部位に設計するという制限がある。しかし、このプローブは増幅プライマーの 1 つと一部重ねることが可能である。その場合、プライマーの伸長する 3' 側下流に脱塩基ヌクレオチドアナログがあり、その下流にさらに 15 塩基の相同配列をもつプローブとして設計する必要がある。

SSIIb 用 RPA の検討

GM とうもろこしをモデルに RPA を検討するため、とうもろこしの内在性遺伝子 SSIIb のプライマーの検討及びその性能評価を行った。迅速法開発が目的なため、反応開始から 15 分後時点での核酸増幅進行程度を、蛍光強度を指標に評価した。SSIIb-Rv1、Rv2、Rv7 及び Rv10 と SSIIb-Fw1~10 のプライマーの組み合わせを検討したところ、用いた 4 種類全ての SSIIb-Rv プライマーと SSIIb-Fw9 の各ペアで蛍光強度 5~13 と増幅曲線の立ち上がりが他の Fw プライマーより速かった。次に、Rv プライマーと相性の良かった SSIIb-Fw9 と SSIIb-Rv1~10 の組み合わせを検討したところ、SSIIb-Fw9&Rv8 (蛍光強度 10~18)、Fw9&Rv9 (蛍光強度 7~17) 及び Fw9&Rv10 (蛍光強度 7~13) の組み合わせは再現性良く増幅曲線の立ち上がりが速かった。今回は 3 回実施した RPA で平均的に蛍光強度が高かった Fw9&Rv8 (増幅領域長: 183 bp) を採用することとした。RPA で増幅する塩基長を確認するために、増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認したところ、目的の大きさ付近にバンドが確認できた。

検出限界値を評価するために、とうもろこしゲノム DNA 1 ng/μL、0.1 ng/μL、0.01 ng/μL を用いて

検出限界を評価した。リアルタイム PCR の定性検査の場合は、国際的にハーモナイズされたガイドラインが無いが、ドイツ連邦消費者保護・食品安全庁 (BVL) が発刊するガイドラインには、検出限界値評価の一つの方法として LOD12 (12 回の繰り返し試験で全て検出される最低濃度) を挙げている。今回の 12 回繰り返し試験で、全て検出される最低濃度は 1 ng/μL であった。この時の SSIIb コピー数をアボガドロ数 $6.02 \times 10^{23}/\text{mol}$ 、トウモロコシ倍体のゲノムサイズ 2.3×10^9 塩基対として計算すると、約 2,600 コピーである。よって、検出限界値は 260~2,600 コピーの間と推定される。供与した DNA 濃度が高いほど、15 分間反応時の蛍光強度が高い傾向があった。

特異性を評価するために、とうもろこしの他に 12 種類の作物および動物のゲノム DNA を用いて RPA を行ったところ、とうもろこしにのみ特異的な増幅が確認された。

P35S 用 RPA の検討

GM とうもろこしの共通配列として標的とされる P35S の RPA のプライマーの検討及びその性能評価を行った。

P35S-Rv1 プライマーと P35S-Fw1~10 それぞれとのプライマーペアで RPA を行ったところ、P35S-Fw2&Rv1 が蛍光強度 12~13、P35S-Fw5&Rv1 が蛍光強度 11~16 と良好であった。その結果に基づき、P35S-Fw2 及び Fw5 と相性の良い P35S-Rv プライマーを同様に探索したところ、P35S-Fw5&Rv1 の蛍光強度 13、P35S-Fw5&Rv2 の蛍光強度 10~17 と良好であった。しかし、これらのプライマーペアで行う RPA はテンプレート無し (NTC) の場合でも 15 分以上経過すると、蛍光強度 10 以上の増幅曲線が立ち上がることもあり、バックグラウンドが高いことも確認された。エンドポイントアッセイでは、このような非特異的な増幅がみられる場合は、結果解釈が困難となるため、別のプライマー場所で検討を行う必要がある。Liu らは遺伝子組換えとうもろこしの RPA を開発し

ているため (Liu et al, 2021)、同様に RPA を実施し、電気泳動で増幅産物を確認したところ、今回新たに設計したプライマーと似たような非特異的なバンドが確認された。

D. 考察

文献調査

2020 年以降 LAMP 及び RPA の論文数が顕著に増加していることが確認できたが、これは新型コロナウイルス検査需要が高まり、迅速な検査法が開発された例が多かったためと考えられる。各核酸等温増幅反応は開発されているものは人間の体温付近の温度で、30 分以内に反応が完結し、検出限界値、即ち感度も良好であることから、いかに標的に最適なプライマーを設計し、特異性の高いものを作れるかが適用性を検討するうえでは肝になると考えられる。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ことも報告されている。

各核酸等温増幅反応の中で食品の遺伝子検査で簡便なオンサイト利用を考慮すると反応温度は体温付近で実施可能な酵素反応が望ましい。よって、選択肢として挙げられるのは Klenow fragment や Phi29 DNA ポリメラーゼを利用する RCA、HDA、SDA や RPA である。一般試験室で恒温インキュベーターがあれば、LAMP や CPA も視野に入る。核酸増幅の確認には、蛍光色素によるリアルタイム検出等も利用可能だが、最も近年診断で利用されているのは、オンサイトで即時目視確認可能なラテラルフローアッセイである。その他には CRISPR/Cas を用いた増感法 (DETECTR) 等も近年利用されている。この技術は Cas12a という Cas ファミリーのヌクレアーゼを利用するが、この Cas12a は標的核酸にガイド RNA 依存的に結合することで一本鎖 DNA を非選択的に分解するヌクレアーゼ活性 (コラテラル活性) が活性化される。そのため、核酸増幅で標的を増やした後、その標的にハイブリダイズするようなガイド RNA と

Cas12a 及び加水分解されて蛍光を発するような一本鎖核酸プローブを添加しておくことで、より高感度に反応を検出できる。しかしこの系では使用試薬数が増え、さらに時間もかかることから食品検査の簡便化の観点では検討を要する。反応速度を考慮すると、RPA または LAMP が数分で反応を終えることから、有用である。以上を鑑みて、本研究では、国内で技術が浸透しておらず、体温付近で反応可能でかつ、迅速に反応が進む RPA に関して、食品遺伝子検査への適用性について検討することにした。

RPA 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件数も多いことが考えられる。RPA 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。また、RPA 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 に適用可能な DNA 抽出法と考えられる。

RPA の検証

RPA は PCR 同様、最初にプライマーを設計する必要があるが、適切なプライマーを設計する確かなアルゴリズムがまだ存在しないため、いくつかのプライマーを試作し、その適切な組み合わせを試す必要がある。その理由の一つとして、PCR は温度変化によってプライマーと鋳型鎖の結合・解離が行われるが、一方の RPA では全て定温の酵素反応の一環として行われるため、 T_m 値での性能評価が難しいと考えられる。よって、PCR や LAMP と比べた場合、実験的検証が必要な点が難点である。

今回の結果では RPA-SSIIb の特異性は良好であったが、検出限界値は従来のリアルタイム PCR (数コピー) と比べて一桁以上のオーダーで悪かった。各ガイドラインでは、リアルタイム PCR による定性検査の検出限界値は 20 コピー未満が推奨されているが、これには満たなかった。調査した論文では検出限界値が 20 コピー未満と報告されているものが多かったことから実験手技やデザインしたプライマー改良で改善される可能性もある。RPA は比較的マイルドな温度で反応を進めるため、分子の熱運動による酵素-基質接触確率が悪いことが原因とも考えられる。一部プロトコールでは、加温 4 分後にマニュアルで混和するものもあり、今後低濃度域ではこのような混合操作の追加適用を検討し、感度の改善の余地があるか検討すべきと考えている。また、溶液中のコピー数が少なくなると、蛍光ピークトップが小さくなる傾向が見られた。加えて、反応時間が長くなればなるほどバックグラウンドが徐々に上がることも確認された。以上より、反応時間や増幅有と判断する明確な指標の検討は必要と考えられる。

RPA-P35S に関しては、良好な組み合わせのプライマーの選定までは進んだが、バックグラウンドが高く、非特異的な増幅が検出される頻度が高いため、検出限界評価まで至らなかった。既に論文として発表されているプライマーペアを用いて検証した場合も電気泳動ではスメアのような増幅

が確認されたため、使用試薬の見直し等根本的な見直しが必要かもしれない。

本検討では、ある特定遺伝子の RPA 法の開発までの流れをデモンストレーションし、実験手技や開発に係る難点を把握することができた。実際に 37°C で反応可能な RPA は、検査者の体温で反応が完結する利便性があり、食品の現場検査等是有用と考えられる。例えば、道の駅での食品売り場での簡易確認や、猛毒キノコの現場鑑定などには持ち帰って検査する手間を省けるためメリットは大きいと考えられる。今後 RPA の検査システムを構築する場合は現場検査法として成り立つ方法として開発するのが有用である。よって、次年度は各官公庁及び検査機関等にヒアリングを実施し、現場検査の需要について調査することも開発前段階として重要と考えられた。

E. 結論

等温核酸増幅反応は世界各国の遺伝子検査に使われ、時間短縮やオンサイト利用など幅広くメリットが見出されている。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精査した結果、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。

そこで RPA に関して実験的検討を行ったところ、その開発には偽陽性などの確認を精密に行う必要がある、開発にはそれなりの時間を要すると考えられた。しかし、37°C で反応可能な点はオンサイトでの利便性が考えられ、植物性自然毒等の現場検査や食品衛生微生物検査での需要はあるものと考えられる。本研究においても検査需要調査を行うことを検討する。今後も引き続き、等温核酸増幅反応について調査するとともに、RPA の粗抽出 DNA への適用性や多項目一斉処理を成せるマルチプレックス化、低コスト・検査簡便化を図

るラテラルフロー法への応用性等を評価する予定
である。 該当なし

F. 健康危険情報

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

G. 研究発表・業績