

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5年度 分担研究報告書

核酸等温増幅反応技術に関する需要調査および RPA 法による食中毒菌の検出

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

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一般的ではあるが、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一般的に PCR や real-time PCR 法が使用されているが、これらの機器は導入に費用が高額であること、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。特に、近年着目されている Recombinase Polymerase Amplification (RPA) 法は 37℃ 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。

昨年度は、RPA 法による微生物分野における既往の論文報告をリスト化し実態を明らかにしてきた。そこで、今年度では、衛生研究所、食肉衛生検査所及び検疫所において、核酸等温増幅反応技術における需要調査を行った。全 95 施設から回答を得られ、集計した結果、微生物分野において、31.6%の検査員から、現行の検査法で困ることが有ると回答を得ると共に、37.9%の検査員からマルチプレックスを用いた検査法の必要性が有ると回答を得た。また、オンサイトでの検査需要に関しては、有ると回答した検査員は 6.3%と低い結果であった。さらに、微生物検査法の改善を要するものとして、病原性大腸菌、ノロウイルス、カンピロバクターの順番で必要性が高いと感じている検査員が多いことが明らかとなった。

また、論文に記載されている RPA 用プライマーを用いて、サルモネラ及びカンピロバクターの検出を行った。39℃、30 分で RPA 反応後、両菌の標的遺伝子を確認した結果、両菌共に DNA 濃度 0.5 pg から 5 ng の間で、それぞれ遺伝子の増幅が確認された。さらに両菌が分離された鶏肉増菌液を用いて、簡易的 DNA 抽出後に両遺伝子の検出を行ったところ、緩衝ペプトン水増菌液からサルモネラ遺伝子は検出できなかったが、プレストン増菌液からカンピロバクター遺伝子は検出できた。サルモネラに関しては、更なる検討が必要であるが、カンピロバクターでは、選択増菌培地から標的遺伝子検出が可能であったことから、食品微生物分野に応用できる有用な手法であると考えられた。

A. 研究目的

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は必要である。

迅速簡便法の一つとして、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 法は 37℃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、非常に簡便であり、医療分野を中心に、現在、論文数が増加している。

昨年度までの検討で、文献調査で有力視された RPA 法による検出法を検討し、温度管理及び反応時間で、PCR 法より有用なことが確認された。

本年度は、微生物分野における核酸等温増幅反応を用いた遺伝子検査の需要調査を、地方衛生研究所、食肉衛生検査所及び検疫所を対象に実施し、現場の声を明らかにすること目的とした。さらに、需要調査から、検査法の改善の要望が高かったカンピロバクターの検査について、既知論文をもとに、RPA 用プライマーを作製し、RPA 法を用いて、両菌からサルモネラ及びカンピロバクター特異的遺伝子を検出すること、また、サルモネラ及びカンピロバクター陽性鶏肉増菌液から両菌特異的遺伝子を検出することを目的とした。

B. 研究方法

等温増幅反応検査の需要調査

地方衛生研究所、食品衛生検査所及び検疫所の合計 95 カ所を対象とし、任意で回答可能なアンケート型の調査を実施した。検査項目としては、遺伝子検査実施例のある微生物分野について、①現行の検査法において困り事の有無、②マルチプレックスを用いた検査需要の有無、③オンサイト検査の需要の有無に関して調査した。

試料

RPA 法による菌の検出として、以前、本研究室で市販鶏肉から分離されたサルモネラ (*Salmonella enterica*) 及びカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*) を使用した。また、東広島市で購入した市販鶏肉から、サルモネラ及びカンピロバクターを分離し、分離された鶏肉増菌液 (サルモネラでは緩衝ペプトン水 (BPW)、カンピロバクターではプレストン液体培地) をそれぞれ 1 袋使用して、サルモネラ及びカンピロバクターの遺伝子検出を行った。

DNA 簡易抽出

カンピロバクターは CHROMagar *Campylobacter*、サルモネラは Nutrient agar 培地で前培養を行った後、カンピロバクターは 42℃、サルモネラは 37℃ でそれぞれ 48 及び 24 時間培養後、白金耳により、菌塊を採取し、TE バッファーに懸濁した。懸濁した菌液は 95℃、10 分加熱した。その後、11,000g、10 分間で遠心し、上清を採取した。採取した上清は DNA 結合蛍光測定 QuantiFluor (Promega) によって DNA 量を測定した。

RPA 法におけるサルモネラ及びカンピロバクター検出

RPA 法に用いるプライマーはサルモネラ及びカンピロバクターとも論文報告のある RPA 用プライマーを用いた。サルモネラは 188bp 増幅を可能とする *invA/E* 遺伝子を標的にしたもの (Wu et al 2020)、カンピロバクターは 254bp 増幅を可能とする *hipO* 遺伝子を標的するものをデザインした (Geng et al. 2019) (表 1)。また、サルモネラ及びカンピロバクターの DNA 量は、1 ng/μL から 0.001 pg/μL まで希釈系列を作製し、DNA テンプレートとして使用した。さらに、TwistAmp exo (TwistDx 社) に含まれる試薬を用い、反応溶液を下記の通りに調製した。

Primer free rehydration buffer	14.8 μL
Super-purified Water	8.2 μL
Primer-F (10 μM)	1.2 μL
Primer-R (10 μM)	1.2 μL
280mM MgOAC	1.25 μL

上記組成で PCR チューブ内において十分にピペッティングした後、DNA テンプレートを 5 μL 加え、反応を開始した。39℃、30 分反応後に、10 μL の反応液をアガロースゲル 1.5% に滴下し、電気泳動を行った。電気泳動後に、増幅遺伝子を確認した。本実験は、1 検体あたり 3 回繰り返して実験を行った。

RPA 法における鶏肉増菌培養液からのサルモネラ及びカンピロバクター検出

市販鶏肉 25 g を BPW225 mL に混合し、ストマッカー処理後に 37℃、24 時間培養し、その後 4℃ で約 1 週間保管した増菌培養液をサルモネラ検出に使用した。一方、ストマッカー処理後に 1 mL をプレストン培地 9 mL に滴下し、42℃、48 時間培養した後、4℃ で約 1 週間保管した培養液をカンピロバクター検出に使用した。それぞれの増菌培養液は、4℃ で保管される前に、サルモネラは BPW 増菌培地から Rappaport-Vassiliadis 液体培地、さらに CHROMagar Salmonella 寒天培地に塗抹され、サルモネラが分離されたもの。カンピロバクターはプレストン増菌培地から CHROMagar Campylobacter 寒天培地に塗抹され、カンピロバクターが分離されたものを、それぞれ 1 袋使用した。それぞれの増菌培養液を 1 mL 採取し 95℃、10 分で煮沸法による DNA 簡易抽出をし、11,000g、10 分間遠心後、上清を採取した。前述した RPA 法によるサルモネラ及びカンピロバクター検出と同様条件、39℃、30 分にて RPA 反応を行った。反応後、10 µL をアガロースゲル 1.5% に滴下し、電気泳動を行い、増幅遺伝子を確認した。本実験は、1 検体あたり 2 回繰り返して実験を行った。

C. 研究結果

等温増幅反応検査の需要調査

全 95 施設から回答を得た結果、現行の検査法で困ることが有ると答えた割合は 31.6% (30/95) であることが判明し、困ることとして、「検査法が煩雑である」「検査結果まで時間が要する」といったことが多かった。マルチプレックスを用いた検査需要に関しては、37.9% (36/95) で需要が有ると答えており、具体的な内容として、病原性大腸菌、カンピロバクター、ノロウイルスの分類に使えるものを希望するものが多かった。さらに、オンラインでの検査需要に関しては、6.3% (6/95) で需要有りと回答を得た (表 2)。特に、地方衛生

研究所の検査員からは需要は低い結果であった。

さらに、現行の微生物検査法において、改善を望むものとして、病原性大腸菌が最も多く、次いでノロウイルス、カンピロバクターの順であった (表 3)。

病原性大腸菌では、病原性大腸菌の同定方法、O 血清の分類方法、シガ毒素及び病原因子の検出方法に関する改善を望む回答が多く得られた。また、ノロウイルス及びカンピロバクターでは、同定と型別 (ノロウイルスでは G1、GI2、カンピロバクターでは *Campylobacter jejuni* か *Campylobacter coli*) に関する要望が多かった。

RPA 法による検出

・サルモネラ及びカンピロバクター

本研究では、なるべく安価で簡易的な方法として、煮沸法による DNA 抽出を試みた。サルモネラ及びカンピロバクター菌体からは白金耳 1 µL の 1 ループの大きさほどを懸濁し、DNA 抽出に用いたが、この菌体量で検査に必要な DNA 量 1 ng/µL から 10 ng/µL が抽出できた。RPA 法による、両菌の検出感度を明らかにするために、両菌ともに、DNA 量 5 ng から 0.005 pg の間で RPA 反応を行い、標的遺伝子の増幅を確認した結果、両菌共に、5 ng から 0.5 pg の間で、標的遺伝子の増幅を確認することができた。(図 1)。

・鶏肉増菌培養液

サルモネラもしくはカンピロバクターが分離された鶏肉増菌液 1 mL を用いて、そのまま煮沸法によって、DNA を抽出した。抽出後 RPA 反応を行い、両菌の遺伝子を確認した結果、BPW 増菌液を用いたサルモネラでは、サルモネラ遺伝子は検出されなかった (図 2)。一方、プレストン増菌液を用いたカンピロバクターでは、カンピロバクター遺伝子は検出された (図 2)。

D. 考察

等温増幅反応検査需要調査

約3割の検査員において、現行の検査法について困ることが有ると答えているが、特に、培養による検査法は、微生物の種類によって、それぞれ培地や条件が違ふこと、さらに、培養法に加えて、遺伝子検査もあることから煩雑で有るとしている。また、特に微生物の分離培養では、培養時間に48時間必要とする検査もあるために、困難と感じる要因になっている。マルチプレックスを用いた検査需要に関しては、一度の検査で多検出を可能とすることから、検査量の減少につながり、多くの検査員から望まれていることが容易に理解できた。また、オンサイト需要に関しては、地方衛生研究所では、オンサイト需要は非常に低い結果であった。これは研究環境が整っているために、需要が低いと思われる。一方で食肉検査所や検疫所では、ある程度のオンサイト需要の支持があった。このことから、検査所・研究所の置かれている立場・環境によって、オンサイト需要も違ふということが判明した。

現行の微生物検査法について、改善を望むものとして、病原性大腸菌への要望が多かった。現行の検査法では、他の微生物と比較しても病原性大腸菌は検査事項（菌株同定、O血清型、病原毒素や因子等）が多いために、必要以上に労力を費やす傾向であることから、要望が多いと考えられる。また、ノロウイルス・カンピロバクターでは、同定と型別に関する要望が多く、これらの微生物における検査法に関しては、今後、現行法と妥当性の有る簡易検査法の構築が必要な分野であると考えられる。

RPA 法における菌体及び増菌培養液からの菌体検出

菌体を用いた検出では、サルモネラ及びカンピロバクターともにDNA量0.5 pgから5 ngの範囲で検出が可能であった。また、鶏肉増菌培養液を用いた結果、今回、サルモネラでは一次増菌液で

検査を行ったが、不検出であった。この結果から、選択増菌液である二次増菌液を使用すれば、検出は可能となった可能性が考えられる。しかしながら、需要調査結果からも検査法の煩雑は望まれていないことから、来年度、プライマーの改良によって、一次増菌液からサルモネラ検出を可能にしたいと考えている。また、カンピロバクターに関しては、選択増菌液であるプレストン培地で検出できたことから、増菌培養を経ればカンピロバクターの検査は十分に可能であることが判明した。今後の課題として、独自プライマー設計と組み合わせによって、*Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* の判別を可能にしたいと考えている。

E. 結論

地方衛生研究所、食品衛生検査所及び検疫所における需要調査の結果から、①約32%の検査員が現行の検査法に困る事が有る、②約38%の検査員からマルチプレックス検査に需要が有る、そして、③約6.5%の検査員で検査法のオンサイト需要が有ると回答を得た。さらに、病原性大腸菌、ノロウイルス、カンピロバクターの検査法に関して、改善を望む検査員が多いことが明らかとなった。これらの要望は、今後の微生物試験法を改善するための有用なデータに成り得るものである。

また、既知論文をもとに、RPA法において、サルモネラ及びカンピロバクターを検出した結果、両菌ともDNA量0.5 pgから5 ngで検出が可能であった。さらに、鶏肉増菌液から両菌を検出した結果、BPW増菌液からサルモネラは不検出であったが、プレストン増菌液からカンピロバクターは検出されたことから、本結果から、RPA法を用いた今後の検査法への応用が期待された。

F. 参考文献

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.

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. Microbiological Methods.* 2019, 157: 31-36.

G. 研究発表・業績

1. Nakayama T, Soga K. Simple and quick detection of extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase-encoding genes using isothermal nucleic acid amplification techniques. *J Microorganism Control*, 2023; 28(4):145-152.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

サルモネラ

カンピロバクター

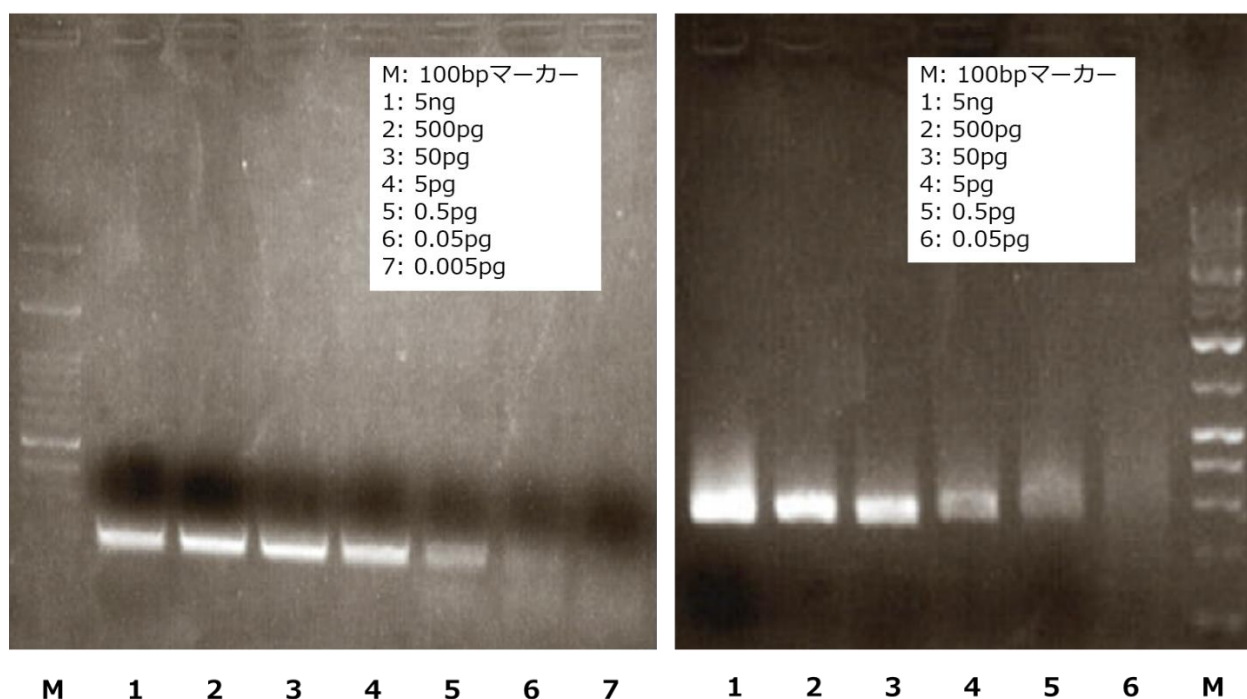


図1 RPA 法によるサルモネラ及びカンピロバクターの検出

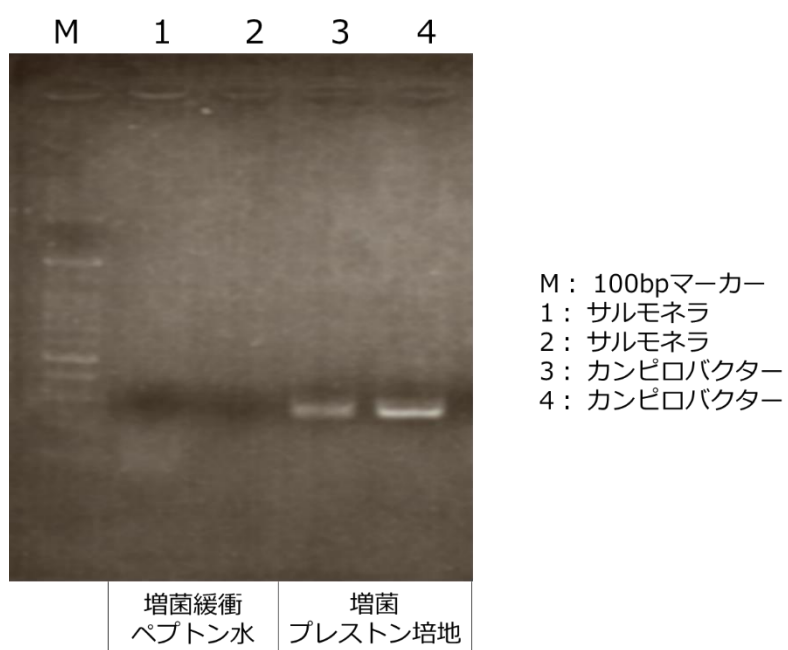


図2 RPA 法による鶏肉増菌液からサルモネラ及びカンピロバクターの検出

表1 サルモネラ及びカンピロバクター検出に用いた RPA 用プライマー

Species	Target gene	Primer name	Sequence 5'-3'	Size (bp)	Reference
<i>Salmonella enterica</i>	<i>invA/E</i>	Sal-Inv4-F	Sal-inv4- F:CTACAAGCATGAAATGGCAGAACAGCG TCG	188	Wu et al. 2020
		Sal-Inv4-R	Sal-inv4- R:CAACCAGATAGGTAGGTAATGGAATG ACGA		
		Ca-hipO-F	Ca-hipO- F:AGAAGTAGTATGTCCATCATGACCGCA AGC		
		Ca-hipO-R	Ca-hipO- R:CTGAGCTTGGTTTTGATGAATTATGTA CTGC		
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hipO</i>			254	Geng et al. 2019

表2 等温増幅反応検査需要調査における回答結果

ウイルス・微生物検査法に関して			
対象研究所 ・検査所数	現行で困る事 (有る)	マルチプレックス 需要 (有る)	オンサイト需要 (有る)
95	30 (31.6%)	36 (37.9%)	6 (6.3%)

表3 改善を希望する微生物検査法

	病原性大腸菌	ノロウイルス	カンピロバクター	コレラ	赤痢
地方衛生研究所	10	12	4	0	0
食肉衛生検査所	4	0	3	0	0
検疫所	3	1	0	3	3
合計	17	13	7	3	3