

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 μ L 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は変えず、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