

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）

令和4～6年度 総合研究報告書

「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。また、遺伝子組換え (GM) 食品および微生物検査においてそれぞれ分野の特徴も踏まえ検討する。

第一に文献調査を中心に、食品遺伝子検査として利用可能な核酸等温増幅反応に関する情報収集を行った。近年の論文数は LAMP が一番多く、次に RPA と続いた。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℃で、30 分以内で終わる核酸ペーパークロマトグラフィで利用され、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。食品微生物試験分野において今までに論文報告が多いものとして、サルモネラ属菌やビブリオ属菌に関するものが多く、また、薬剤耐性遺伝子に関する報告も公表されていた。

次に、公的検査機関の GM 食品、アレルゲン、自然毒、微生物の遺伝子検査担当者を対象とした核酸等温増幅反応の需要調査を実施し、核酸等温増幅反応のメリット、オンサイト検査、現在の課題に関する情報収集を行った。GM 食品検査等の分野において、通常の検査では迅速性が必要な半面、通知試験法と同等の感度・精度を有しなければ利用しにくいという意見が大多数であった。よって、PCR と同等の性能を持つ迅速な核酸等温増幅反応の開発が重要と考えられた。また、加工食品からの前処理時にカラムが詰まる等の現行通知試験法の問題点も多数意見があり、粗抽出 DNA でも適用可能な方法として夾雑物にも強いと言われる核酸等温増幅反応は需要が見込まれた。微生物試験分野では、現行の検査法で困ることが有る (32%)、マルチプレックスを用いた検査法の必要性が有る (38%) との回答を得た。また、オンサイトでの検査需要に関しては、有るとの回答は 6% と低かった。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機関が多いことが明らかとなった。

昨今の核酸検出技術および需要調査結果を踏まえ、迅速検査法開発として遺伝子組換え (GM) トウモロコシ検査では RPA、LAMP を、食中毒菌カンピロバクター (*Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli*) 検査では RPA を検討した。

RPA を用いた 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 (*SSIIB*) 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) を標的とし評価したところ、特異性は良好であったが感度がリアルタイム PCR と比較して悪かった (検出限界値が 260～2,600 コピー)。とうもろこし加工食品をモデルに、粗抽出 DNA の適用性を評価したところ、リアルタイム PCR、LAMP と比較して、RPA が最も食品マトリクスへの適用範囲が広がった。さらに、PCR が約 2 時間かかるのに対し、同様の検査が 30 分以内でわかることから、DNA 簡易抽出から実施は検査の大幅の迅速化が見込まれ、有用と考えられた。オンサイトで迅速に結果を確認できる試験法として、核酸クロマト技術を応用したクロマト目視判定試験紙 Printed Array

Strip (C-PAS) を検討したが RPA-C-PAS では、非特異的な増幅が検出され、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 *SSIIb*、GM の共通配列として P35S および土壌細菌ノパリン合成酵素ターミネーター配列 (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 *SSIIb*/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増幅が確認される等課題が残った。

検査改善の需要が高いカンピロバクターについて、RPA のプライマーを新たに開発して、性能評価を行った。設計したプライマーをアガロースゲル電気泳動により評価した結果、検出限界 DNA 濃度は *C. jejuni* 用プライマー mapA-4 : 0.1 pg/μL から 1 pg/μL、*C. coli* 用プライマー ceuE-1 : 1 pg/μL、細菌検出共通プライマー 16S-2 : 10 pg/μL と良好な結果を示した。また、これらのプライマーは、*C. jejuni* が分離された鶏肉の増菌プレストン培地からも *C. jejuni* が検出可能で、RPA を用いたカンピロバクター検査が食品の迅速検査として適用可能なことが示唆された。しかしながら、RPA-C-PAS によるカンピロバクターの検出に関しては、GM とうもろこし検査同様、陰性コントロールでの非特異的検出など課題を残す結果となった。

PCR に代わる新たな核酸検出技術として RPA の検討を主に行ったが、37°C という機械不要な温度帯での反応、夾雑物への適用性が見込める半面、プライマーデザインツールの不在、加水分解プローブのコスト、C-PAS への展開の困難など、開発面での障壁がいくつか確認された。しかし、ポリメラーゼ試薬の販売元は増加しており、今後汎用性が上がるとみられ、改善が期待される。LAMP はその反応温度が PCR と RPA の中間温度帯 65°C であり、C-PAS への展開も見込まれることから、今後迅速検査法開発を検討する場合は第一選択肢になりえる。しかし、C-PAS を公定検査法として運用するには、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。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現場の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

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

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、

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℃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 粗抽出法や核酸クロマトグラフィ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℃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。

本研究では、食品衛生の遺伝子検査において LAMP や RPA 等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。本研究班では食品検査の中でも、遺伝子組換え (GM) 食品検査および微生物検査の 2 つのモデルで検討を行う。

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。鶏肉は *C. jejuni* が CHROMagar Campylobacter から分離されたものを用いた。

文献調査

文献調査では論文情報検索エンジン PubMed を用い、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。

核酸等温増幅反応検査需要調査

地方衛生研究所及び検疫所を対象とし、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 GM 食品検査、アレルゲン検査、自然毒検査、微生物検査別に、主に下記の 5 つの点に関して①核酸の抽出・精製法、②PCR との代替可能性、③オンサイト検査需要、④マルチプレックス検査需要、⑤その他困りごとに関して調査した。

DNA 抽出

とうもろこしからは Genomic-Tip 100G (QIAGEN) を用いて、添付プロトコルに従い、ゲノム DNA を抽出した。簡易抽出では、下記の 3 通りの方法 GenCheck® DNA Extraction Reagent (FASMAC)、Template Prepper for DNA (ニッポンジーン) および成島らの方法を検討した。成島らの方法 (Narushima et al, 2020) を用い、アルカリ試薬 (25 mM NaOH、0.2 mM EDTA) を 70 µL 加え、10 秒間ボルテックスで攪拌後、中和試薬 (40 mM Tris-HCl, pH 5.0) を 70 µL 加え、軽く攪拌後 1 分間静置した。100℃で加熱 1 分間の有無、

静置（氷上、常温）1 分後、15,000×g、1 分間遠心し、上清を DNA 抽出液試料とした。

微生物からの 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、10,000×g で 10 分間遠心し、上清を採取した。CHROMagar Campylobacter から分離された鶏肉においては、増菌培養後のプレストン培地から煮沸法で DNA を抽出した。

RPA

GM とうもろこしの検出をモデルとして、とうもろこし内在性遺伝子スターチ合成酵素 IIb (*SSIIB*) 及び多くの GM 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)、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設計した。

カンピロバクター *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) 用プライマーとして、*hipO* 及び *mapA* 遺伝子を標的に、*Campylobacter coli* (*C. coli*) 用プライマーとして、*ceuE* 遺伝子を標的に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 遺伝子を標的にプライマーを設計した。

試薬はプローブを用いる際は TwistAmp exo (TwistDx)、用いない場合は TwistAmp Basic (TwistDx) を用い、37°C で 30 分間反応させた。蛍光検出は LightCycler 480 (Roche Diagnostics) または装置 GeneLyzer FIII (Canon メディカルシステムズ) を用いた。

LAMP

GM とうもろこしの検出をモデルに検討した。*SSIIB* 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を、

TNOS は既報のもの (Hardinge et al, 2018, *Sci Rep*) を利用した。ポリメラーゼは LAMP MASTER (ニッポンジーン) を用い、65°C で 30 分間反応させた。蛍光検出は LightCycler 480 (Roche Diagnostics) または装置 GeneLyzer FIII (Canon メディカルシステムズ) を用いた。

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。C-PAS 用に各フォワードプライマーに C-PAS とのハイブリ DNA タグを付加した。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。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 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

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。

C. 研究結果

文献調査

遺伝子検査は PCR に加え、LAMP、RPA、Strand displacement amplification (SDA)、Helicase-dependent amplification (HDA)、Rolling circle amplification (RCA)、Exponential amplification reaction (EXPAR)、Cross-priming amplification (CPA)、NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) 等が報告されている。本研究では報告数が増加している LAMP 及び RPA について

検証することにした。LAMP はプライマーを 4～6 種類使い、65℃付近で反応させる系で、約 30 分で反応が完了することができる。近年はプライマーデザインツールが複数開発されており、汎用性が高い等温反応といえる。RPA はプライマー 2 種、37℃付近で反応させる系で、約 30 分で反応を完了することができる。酵素類の販売会社が少ないことやプライマーデザインが自動化されていないなど課題はあるが、体温付近で反応できるというメリットが大きく、オンサイト検査でも期待されている。

RPA と食中毒菌に関係するものを調べ、該当論文を病因物質別で仕分けした結果、まだ数本に留まるが、サルモネラ、ビブリオ、病原性大腸菌、リステリアの順に関連する論文が最も多かった。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。また、プラスミド性薬剤耐性遺伝子に関して、食品検査を念頭に入れた基質特異性拡張型 β ラクターゼ産生遺伝子に関する報告や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もみられた。

核酸等温増幅反応検査需要調査

DNA 抽出法に対する不便さを訴える回答が GM 食品検査担当からは 46%、アレルギー担当からは 40%に上った。特に意見が多かったのは、現在の公定法に記載されているキットのカラムを用いた DNA 抽出法に関するもので、加工食品等に適用した際にカラムが詰まってしまい時間がかかり作業が煩雑になる点であった。また、コストがかかる点も問題点として挙げられた。

20 分前後で反応が終了する核酸等温増幅反応による地方衛研の業務改善可能性に関しては、「改善される」と回答されたのは 40%に留まり、

「不明」あるいは「改善されない」と回答されたのは 60%に上った。迅速性は有用とされる半面、PCR の反応時間（2 時間）は別作業に時間を取れること、迅速性よりも正確性が問われるため PCR と同等の感度・特異性を有するか現時点で不明なこと、装置・実施経験が無く判断ができないこと等が「不明」または「改善されない」という回答が多い原因として挙げられた。また、新しく標準手順書を作成する手間がある等の新技術導入への抵抗を示す回答も見られた。迅速な点でのメリットが考慮されても、その他の懸念点が払拭されない限りは総合的に見た場合のデメリットが厳しいと判断されるようである。地方衛研や検疫所では公定法に準じた業務を実施することから、感度、精度の観点で公定法との同等性が担保されない場合は導入メリットが低いとされる傾向にあった。

オンサイト需要に関しては、地方衛研の業務では「需要無し」あるいは「わからない」と回答した割合が 94%に上った。一部の意見で、保健所との連携業務では嘔吐物や加工食品からのアレルギーのオンサイト検査や、製造業者の自主点検や収去前の簡易検査等のニーズは有りうると回答された。

マルチプレックス検査の需要に関しては、28%の回答者から需要があり、その内約はアレルギー検査の特定原材料 8 種の同時検査需要が高く、6 割に上り、続いて GM 大豆検査、GM バレイショ検査と続いた。

困っていることの有無を問うアンケートでは、困っていることがあると答えた回答は全体の 54%に上った。加工度の高い食品に対する適切な前処理法が確立されていない点や、キットや試薬の高騰が主な問題として挙げられた。地方衛研では、理化学分析の中でも遺伝子検査の割合が低いところもあり、技術習得やその継承、および予算確保に関する問題点も確認された。また、検査法の通知されたタイミングにより、従来

PCR からリアルタイム PCR、核酸ペーパークロマト技術まで試験項目によって、技術的な差が見られ、DNA 抽出キット、PCR 試薬等も統一されていない点で指摘があり、全体の通知試験法のバランスを考慮した見直しの必要性について問われた。

自然毒の遺伝子検査では国で定める公定法が存在しないため、各地方衛生研究所が各地域の需要に応じて検査を実施している。DNA 抽出に対する不便さは 43%を占めた。オンサイト検査需要に関しては「需要あり」と回答したのは 14%であった。検査対象が地域特有なことも特徴的であり、ツキヨタケ、トリカブト、ホンシメジ等が挙げられた。マルチプレックス検査の需要に関しては「需要あり」と回答したのは 18%に留まり、「無し」と回答されたのは 60%弱に上った。またその検査対象もクワイズモ等の地域特有な植物が挙げられた。

微生物検査では、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、オンサイト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。特に、地方衛生研究所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。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 *C. jejuni* か *C. coli*) に関する要望が多かった。

RPA の検討

SSIIb 及び P35S 用プライマーを蛍光強度の S/N 比が良好なものを選抜した。*SSIIb* の特異性は良好で、検出限界は 260~2,600 コピーの間と推定された。P35S はバックグラウンドが高いことが確認された。

C. jejuni 用プライマーで、濃度依存的に増幅が確認された。検出限界濃度は、mapA-1、mapA-4 は 0.1 pg/μL から 1 pg/μL、*C. coli* 用プライマーでは *ceuE*-1 は 0.1 pg/μL から 1 pg/μL、*ceuE*-6 は 10 pg/μL、PC 用プライマーでは 16S-2 及び 16S-3 は 10 pg/μL であった。

簡易 DNA 抽出法を用いた溶出液での検討

とうもろこし粉末から簡易抽出法により得た DNA を標的に検出を試みたところ、成島らの方法によって抽出された DNA 溶液において、リアルタイム PCR、LAMP では検出できなかったが、RPA では検出された。また、コーングリッツでは、加熱を行わない成島らの方法では RPA でのみ増幅が確認された。スナック菓子では、2つの製品のうち、1つの製品ではどの方法でも検出されなかったが、もう 1つの製品で RPA、LAMP では3種類の簡易抽出法全てで、リアルタイム PCR では GenCheck と成島らの方法で増幅が確認された。これらの結果より、RPA が食品のマトリクス影響が小さい核酸等温増幅反応であること示唆された。

RPA-C-PAS (カンピロバクター) の検討

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、C-PAS 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 ヲ所全てのバンドで陽性が確認された。

RPA-C-PAS (GM とうもろこし) の検討

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 *SSIb*、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、本法同様に陰性コントロールでも偽陽性の要因と考えられるスメア状バンドがしばしば確認された。

LAMP-C-PAS (核酸クロマト法) の検討

GM とうもろこし検査で検討した。 *SSIb* に関して、PrimerExplorer により設計したプライマーを検討し、非特異的増幅が無く、融解曲線がシャープなものを選択した。P35S と TNOS は既報のプライマーを用いた。リアルタイム蛍光検出で

は、いずれも、融解曲線ピークはシャープなものが認められた。

C-PAS の検討では、Simplex-LAMP-*SSIb*、P35S および TNOS に関して、陽性コントロールでのみ目的位置に青のラインが確認され、Simplex-LAMP は全て機能することが確認された。次に、マルチプレックス化の検討では、各標的の反応速度を考慮し、プライマーのモル比を検討した。*SSIb*/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 *SSIb* と TNOS の両方で着色が認められた。一方で、非 GM とうもろこしでは *SSIb* 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。一方で、非 GM とうもろこしでは着色が認められなかった。よって、これらの Duplex-LAMP-C-PAS は機能することが確認された。*SSIb*/P35S の Duplex-LAMP および *SSIb*/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

文献調査について

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みられる。各核酸等温増幅反応は開発されているものは検出限界値、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。

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。

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 法で使用す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 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、核酸ペーパークロマトグラフィとリアルタイム 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、より簡易的である核酸ペーパークロマトグラフィで検出させる方が良いと考える。特異性・感度に関しては、本検索論文によると、食中毒菌・薬剤耐性論文とともに、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 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℃、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 は現場で微生物を簡易的検出する方法として非常に適した手法であるといえる。

DNA 抽出について

加工食品からの DNA 抽出に関して、各検査機関で困っているところが多く、特に公定法で記載されているキット類では加工食品への適用性が低い点で問題視されている点が多くみられた。加工食品では PCR の阻害物質やキットのカラムが詰まってしまう要因ともなる油などの不純物が多く含まれるため、より正確な DNA 抽出法の開発が期待されている。現在検討を進める核酸等温増幅反応で用いられる *Bacillus stearothermophilus* や *Bacillus subtilis* フェージ phi29(φ29)由来の鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼは夾雑物に強いことが知られており、粗抽出 DNA を用いた増幅では従来の PCR によ

る増幅より利点があり、核酸等温増幅法を導入することで時間短縮が見込める可能性がある。

核酸等温増幅反応に対する期待

40%以上の業務が改善されたとした回答者が核酸等温増幅反応に期待するのは多くの場合は迅速性であった。しかし、地方衛研などの担当者で未経験な場合や、感度、精度がまだ明らかになっていない点で導入メリットはわからないと判断されることが多かった。地方衛研では PCR の反応時間は、別の作業に充てられることから、そこまで迅速性の需要が無いことや、別試験を行うとなれば新たに標準手順書を作成する労力が新たに発生すること等、新しい手法に対する不安等も障壁となっていると考えられた。核酸等温増幅反応を実際の試験で使われるようにするには、PCR との性能比較データを示し、同等性を確認することやその手順書を示す必要があると考えられた。

微生物試験においても約3割の回答において、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、困難とを感じる要因になっており、迅速化が課題である。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、現行法と性能が同等な簡易検査法の構築が必要な分野であると考えられる。

オンサイト検査需要

地方衛研や検疫所の検査では GM 食品やアレルゲンのオンサイト検査の需要がほとんどないことがわかった。一部保健所と連携している部署では需要があるが、オンサイト検査が必要な場所等を再度検討する必要がある。例えば事業所での自主検査等まで利用者を拡大する場合は需要があるかもしれない。一方、地方によっては、自然毒に関するオンサイト検査需要が見られたことから、トリカブトやツキヨタケ等の有毒植物やキノコの検査法開発は有用と考えられる。近年の厚生労働科学研究「我が国で優先すべき生物学的ハザードの特定と管理措置に関する研究」（平成28～29年度）及び「植物性自然毒による食中毒対策の基盤整備のための研究」（平成30年～令和2年度）では、ツキヨタケ、クワウラベニタケ、スイセン、パイケイソウ、イヌサフラン、チョウセンアサガオ及びトリカブトに関しては LAMP 法が既に開発されていることから（Sugano et al, 2022, 厚生労働科学研究費報告書）、これらを応用することで実現することが期待される。

微生物検査においても地方衛生研究所では、オンサイト検査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検査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、オンサイト検査需要も違うということが判明した。

マルチプレックス検査需要

現在、公定法では遺伝子のマルチプレックス試験を採用しているものは少ない。それを加味して、需要調査を行ったところ、アレルゲンとして挙げられる特定原材料8品目及び GM 大豆の3標的、GM とうもろこし2標的、キノコなどの

有毒植物の一斉検査が挙げられた。また、地方ではクワイズモ等の食中毒事例が多いものも需要がある。しかし、PCR としても 8 品目同時は世界的に見ても例がなく、多くても 4 標的までであることから、まずは 2 標的から確認していく必要があると考えられる。

微生物検査におけ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ることも、多くの試験所から望まれている。

RPA の検討

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。その理由の一つに、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ことが挙げられる。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。

本研究で GM とうもろこし検出用にプライマーを数十種類検討した結果、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 (Broaders S et al, 2014; BVL, 2016)、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が、さらなる検討を要し、開発時間がかかることが予想される。

微生物検査では、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 抽出に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。*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。

DNA 簡易抽出法を用いた検出

RPA が食品マトリクス影響への耐性がある系であることが示唆されたが、RPA は蛍光シグナルの強度が LAMP やリアルタイム PCR より弱かったことから、検出方法に関しては今後の検討課題といえる。

加工度の低い食品であれば、市販の粗抽出 DNA 試薬を用いて従来法でも検出可能であったが、PCR の 2 時間と比較すると、LAMP や RPA を用いて 30 分弱で検査結果が判明することから、核酸等温増幅反応の迅速性に関する有用性も確認された。

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を直接検出可能であれば、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

ることに加え、通常の培養による検査法よりも時間短縮が見込めると考えられた。

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。

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/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/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そのべき乗に増加する。よって、予期せぬプライマーダイマーが生じる可能性があり、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

核酸等温増幅反応の文献調査および国内検査機関における需要調査を行い、今後の食品遺伝子検査への展開を考察した。検査機関では PCR と同等の性能を有する核酸等温増幅反応が求められている。近年、論文数の増加している RPA に関して、GM とうもろこし検査をモデルに開発を検討したところ、*SSI/b* 等検出では PCR と同等の感度を達成できなかったが、リアルタイム蛍光検出では、その特異性は PCR と同等で、簡易抽出 DNA への適用性に関しては PCR 以上であり、迅速で反応を完了する事ができた。よって、食品検査として RPA を導入するには、次に感度をクリアする必要がある。

微生物試験ではカンピロバクター迅速検査として、*mapA*, *ceuE* を標的とした特異性および感度の良好な RPA を開発し、*mapA* に関しては陽性鶏肉検体への適用も可能であった。

オンサイト検査でも利用できる RPA および LAMP の核酸ペーパークロマトグラフィとして、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 GM とうもろこしおよびカンピロバクターの両検査において、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。SS//b、P35S、TNOS の 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、マルチプレックス化を導入するにはさらなる検討が必要である。また、今後公定検査法として適用するには、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。

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現場で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、検査体制の効率化に繋がるものと考えられる。

F. 研究発表・業績

・ 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.

・ 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 PCR,RPA,LAMP の比較

項目	PCR	RPA	LAMP
アガロースゲル 電気泳動	○	○	○
リアルタイム 蛍光検出	○	○	○
C-PAS	○	非特異的検出が多い	○
反応時間	2 時間	30 分以内	30 分以内
反応温度	多段階	37～40℃ 体温で反応	65℃
プライマー	2 種類	2 種類	4 ～ 6 種類
蛍光	インターカレーターま たは TaqMan プローブ	加水分解プローブ	インターカレーター
マルチプレックス	4-plex 等実績有	未検討	難
感度	20 コピー未満	GM:260～2600 コピー mapA: 0.1-1 pg/μL ceuE: 1 pg/μL 16S: 10 pg/μL	今回未検討
開発難易度	並 ・プライマーデザイン ツール有	難 ・プライマーデザイン ツールが無い場合、検 証が必要	並 ・プライマーデザイン ツール有
試薬	多数販売有	まだ少ない ・反応に複数の酵素必 要 ・ポリメラーゼは鎖置 換型が一般的	多数販売有 ・ポリメラーゼは鎖置 換型が一般的