

出した。またO. D. 260/O. D. 280を計算する。DNA試料原液の濃度がPCRで規定された濃度に達しないときは、そのままDNA試料液として用いた。

4. real-time PCRを用いたプライマー対およびプローブ

① コメ陽性対照用

KVM159 : 5' -TGGTGAGCGTTTTGCAGTCT-3'
KVM160 : 5' -CTGATCCACTAGCAGGAGTCC-3'
TM013 : FAM-TGTTGTGCTGCCAATGTGGCCTG-TAMRA

② 害虫抵抗性GMコメ検出用

1) 63Btコメ検出試験用 (Bt63)

T51-SF : 5' -GCAGGAGTGATTATCGACAGTTC-3'
OsNOS-R2 : 5' -AAGACCGGCAACAGGATTCA-3'
GM63-Taq :
FAM-AATAAGTCGAGGTACCGAGCTCGAATTTCCC-TAMRA

2) NNBtコメ検出試験用 (KMD1)

T51-SF : 5' -GCAGGAGTGATTATCGACAGTTC-3'
OsNOS-R2 : 5' -AAGACCGGCAACAGGATTCA-3'
NGMr-Taq :

FAM-AATGAGAATTCGGTACCCGACCTGCA-TAMRA

3) CpTiコメ検出用 (CpTi)

CpTi-1F : 5' -CGTGTCACTCGGCTTGCA-3'
CpTi-1R : 5' -AACGACACTGCCTGGCATT-3'
CpTi-P : FAM-ATCCTGCATGTGTACACG-MGB

③ 除草剤抵抗性GMコメ検出用 (Bar)

RapB-F1 : 5' -ACAAGCACGGTCAACTTCC-3'
RapB-R1 : 5' -GAGGTCGTCCGTCCTCACTC-3'
RapB-S1 : FAM-TACCGAGCCGAGGAACC-TAMRA

④ GMコメコンストラクト検出用

1) CaM配列検知試験用 (35Sp)

35S-F : 5' -GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'
35S-R : 5' -AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'
35S-P : FAM-CAAAGATGGACCCACCCACG-TAMRA
2) nos ターミネーター配列検知試験用 (Nost)
tNOS-F :
5' -GTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTG-3'
tNOS-R :
5' -CGCTATATTTGTTTTCTATCGCGT-3'
tNOS-P :
VIC-AGATGGGTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-TAMRA

5. 定性PCR用プライマー対

① コメ陽性対照用 (OsSPS)

OsSPS-F : 5' -GATCGCTTCGCCATTAGCA-3'
OsSPS-R : 5' -AACCGAGCGGATCACTTGC-3'

② 除草剤抵抗性GMコメ検出用 (epsps)

35S-RR : 5' -GAAGACGTTCACACCAGTCTCTT-3'

epsps-R : 5' -AACGGACGCATCGCGGTTCC-3'

③ 病害抵抗性GMコメ検出用 (Xa21)

U1 : 5' -CGATCGGTATAACAGCAAAAC-3'

I1 : 5' -ATAGCAACTGATTGCTTGG-3'

6. real-time PCR反応および結果解析と判定

PCR用反応液は25 μ L /wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。Universal PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μ mol/L）各0.4 μ L、対象プローブ溶液（10 μ mol/L）0.25 μ Lを混合し、DNA試料液（5 μ L（10 ng/ μ L）を添加し滅菌蒸留水で全量25 μ Lに調製した。PCRのブランク反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Padをのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、95°Cで10分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 20秒、60°C 1分を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度（FAM）の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン（3サイクルから15サイクル）の ΔR_n のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. Line 0.2)を選択した。そのTh. lineからCt値を得た。2つのDNA抽出液のうち1 wellでも48未満のCt値が得られた場合、陽性と判定した。

7. 定性PCR反応および結果解析と判定

PCR用反応液は25 μ L /wellとして調製した。その組成は以下のとおりである。AmpliAq Gold® PCR Master Mix 12.5 μ L、対象プライマー対溶液（各プライマー、50 μ mol/L）各0.5 μ Lを混合し、DNA試料液（10 ng/ μ L）5 μ Lを添加し滅菌蒸留水で全量25 μ Lに調製した。除草剤抵抗性遺伝子組換えコメ検出の反応条件は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 1分、63°C 1分、72°C 2分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応を行った。また、病害抵抗性遺伝子組換えコメ検出は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始し、その後、95°C 1分、56°C 1分、

72°C 2分を1サイクルとして、45サイクルの増幅反応で行った。

PCR産物は3% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 µg/mL 含有) で電気泳動後、UV 下で検出した。次いで、0sSPS は約 110 bp のバンド、epsps は約 500bp のバンド、Xa21 の感受性品種は約 1.3 bp のバンド、抵抗性品種は約 1.3 bp と約 1.4 bp の2バンドと検出された PCR 産物は、シーケンス配列を確認し、陽性または陰性を判断した。

4. 安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性 GM コメ Xa21 系統の検知法確立

1. 試験試料

国産うるち米 (R1) 及びもち米 (R2) と GM コメ KMD 陽性検体 (R4) 及び Bt63 陽性検体 (R3、R5、R6) を使用した。

2. 白葉枯病菌 *Xanthomonas oryzae* に耐性を持つアフリカの野生イネ *Oryza longistaminata* 由来遺伝子を有する GM コメ Xa21 検出用プライマー対 (図2)

U1: 5' -CGATCGGTATAACAGCAAAAC-3'

I1: 5' -ATAGCAACTGATTGCTTGG-3'

3. GM コメ Xa21 コンストラクト検出用プライマー対 (図2)

PHP-FT1: 5' -TATTTACCCGCAGGACATATC-3'

PHP-FT2: 5' -ATGCAATAGGTCAGGCTCTC-3'

PHP-RT1: 5' -TATAGCAGGGATGACTTGAAAG-3'

PHP-RT2: 5' -ATGGAATCTCTCCTGACAAAC-3'

gusA-F: 5' -GGTGGGAAAGCGGTTACAAG-3'

gusA-R: 5' -TGGATTCCGGCATAGTAAA-3'

hpt-lacZa-F: 5' -CTTGCGGTCCGAATGGGC-3'

hpt-lacZa-R: 5' -GGATGTGCTGCAAGCGATTAAG-3'

4. 35S プロモーター検出用プライマー対及びプローブ

35S-F: 5' -GCCTCTGCCGACAGTGGT-3'

35S-R: 5' -AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC-3'

35S-P: FAM -CAAAGATGGACCCACCCACG-TAMRA

5. 定性PCR

① プライマー対 I1/U1 を使用した Xa21 の検出

PCR用反応液は25 µL /wellとして以下のとおり調製した。AmpliTaQ Gold® PCR Master Mix 12.5 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、

50 µmol/L) 各0.5 µLを混合し、DNA試料液 (10 ng/µL) 5 µLを添加し滅菌蒸留水で全量 25 µL に調製した。また、反応条件は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 1分、56°C 1分、72°C 2分を1サイクルとして、40サイクルの増幅反応を行った。その後、72°C 10分伸長反応、4°C保存を行った。

PCR産物は1% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド0.1 µg/mL含有) で電気泳動後、UV照射下で検出した。

② GM コメ Xa21 コンストラクトの検出1

PCR用反応液は25 µL /wellとして以下のとおり調整した。10×LA Taq buffer 2.5 µL、dNTP 4 µL、対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各0.5 µL、LA Taq 0.25µLを混合し、DNA試料液 (10 ng/µL) 5 µLを添加し滅菌蒸留水で全量 25 µLに調製した。forwardプライマー

(PHP-FT1、PHP-FT2) とreverseプライマー

(PHP-RT1、PHP-RT2) の各組合せのPCR反応条件

は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始する。その後、95°C 30秒、57°C 30秒、72°C 5分を1サイクルとして、45サイクルの増幅

反応を行った。プライマー対 I1/gusA-R、

gusA-F/gusA-Rの組合せのPCR反応条件は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 30秒、60°C 30秒、72°C 2

分を1サイクルとして、30サイクルの増幅反応を行った。プライマー対hpt-lacZa-F/

hpt-lacZa-Rの組合せのPCR反応条件は、95°Cで5分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 30秒、56°C 30秒、72°C 10

分を1サイクルとして、30サイクルの増幅反応を行った。それぞれのPCR反応後は、72°C 10分伸長反応、4°C保存を行った。

PCR産物は1% (w/v) アガロースゲル (エチジウムブロマイド溶液 0.1 µg/mL) で電気泳動後、UV照射下で検出した。

③ GM コメ Xa21 コンストラクトの検出2

PCR用反応液は25 µL /wellとして以下のとおり調整した。Universal PCR Master Mix 12.5 µL、

対象プライマー対溶液 (各プライマー、50 µmol/L) 各0.4 µL、対象プローブ溶液 (10 µmol/L) 0.25 µLを混合し、DNA試料液 5 µL (10 ng/µL) を添加し滅菌蒸留水で全量 25 µLに調製した。PCRのブランク

反応液として、必ずDNA試料液を加えないものについても同時に調製した。DNA試料液あたり2ウェル並

行して試験を行った。プレートはシールし、軽く遠心後、MicroAmp Optical Cover Compression Pad をのせ、装置にセットした。その後、反応とデータの取り込みを開始した。反応条件は、95°Cで10分

間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、95°C 20秒、60°C 1分を1サイクルとして、50サイクルの増幅反応を行った。測定結果の解析は、Amplification plot上で指数関数的な増幅曲線とCt値の確認、及び、multicomponent上での対象色素由来の蛍光強度(FAM)の指数関数的な明確な増加の確認をもって行った。目視でAmplification plot上に指数関数的な増幅曲線が確認された場合には、ベースライン(3サイクルから15サイクル)の ΔRn のノイズ幅の最大値の上側で、安定した指数関数的な増幅曲線上で交わるThreshold line (Th. Line 0.2)を選択した。そのTh. lineからCt値を得た。

5. シークエンス解析

PCR 増幅産物は、アガロースゲルで電気泳動後、目的のバンド(約 1.3 kb と約 1.4 kb)をそれぞれ切り出し、DNA を精製した。それをpGEM-T easy に TA クローニングし得たプラスミドを大腸菌に導入した。培養後、精製したプラスミドをシークエンス解析に用いた。解析用のプライマーは、M13F、M13R を使用し、シークエンス解析を行った。

M13F:5' -TGTAACGACGGCCAGT-3'
M13R:5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3'

5. パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査

①試薬及び試料

GM パパイヤ 55-1 系統品種(SunUp、Rainbow)及び非 GM パパイヤ(Sunset)は消費者庁を通じて、ハワイパパイヤ協会から入手したものを使用した。パパイヤ加工製品はインターネットより購入したものを使用した。

DNA 抽出には QIAGEN 社製陰イオン交換系樹脂タイプキット(Genomic tip100/G)を用いた。G2 緩衝液、QBT 緩衝液、QC 緩衝液、及び、QF 緩衝液は Genomic tip 100/G に付属しているものを使用した。また、抽出の際に使用した RNase (100 mg/mL)及びプロテインキナーゼ K (20 mg/mL)は QIAGEN 社製、 α -Amylase(高濃度品)はニッポンジーン社製、セルラーゼはシグマアルドリッチ社製を使用した。陽性プラスミド作製には Promega 社製 pGEM-T Easy vector system 及び TOYOBO 社製 Competent high DH5 α を使用した。リアルタイム PCR の調製には Taqman[®] Gene Expression Master Mix (Life Technologies 社製)を使用した。プライマーはファスマック社製を使用した。実験に使用した水は、すべて日本ミリポア社製 Milli-Q Synthesis

A10 で精製した超純水を用いた。

②パパイヤ DNA の抽出精製と調整

生鮮パパイヤ果実の種子・果皮を除いた果肉部分を使用し、滅菌蒸留水で洗浄した後、キムタオルでよく水分を除去、ミルサーで粉碎した。粉碎した試料 10 g を遠沈管(50 mL 容)に量り採り、G2 緩衝液 30 mL を加え、よく転倒混和して均質にした。試料前処理を行った試料は、イオン交換樹脂カラムの QIAGEN 社製 Genomic-Tip100/G を使用し、以下の通り DNA の抽出及び精製を行った。RNase A 20 μ L、Cellulase 500 μ L を加えて(果肉含量ゲル状製品のジャム製品に限り、 α -Amylase 20 μ L を加える)、転倒混合し均質化した後、50°C で 1 時間放置した。その間 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。次いで、Proteinase K 200 μ L を加え 50°C で 1 時間放置した。その間も 2~3 回遠沈管を反転させて試料を転倒混和した。その遠沈管を 3000 \times g で 20 分間低温下(4°C)にて遠心を行い、得られた上清を採取し、あらかじめ QBT 緩衝液 4 mL を用い平衡化した陰イオン交換樹脂カラム(QIAGEN Genomic-tip 100/G)に負荷した。ただし、漂白剤(亜硫酸塩)が使用されているドライフルーツでは、上清の pH を確認した後、1 mol/L 塩酸で pH6~7 に調製後、再度遠心を行い、得られた上清をカラムに負荷した。次いで、カラムを QC 緩衝液で 7.5 mL ずつ 3 回洗浄した後、予め 50°C に温めておいた QF 緩衝液 1 mL を負荷し、はじめの溶出液は捨てた。新しい遠沈管に移し、再度 50°C に温めておいた QF 緩衝液 2 mL を負荷し、DNA を溶出させた。溶出液を遠沈管(1.5 mL 容)に分注し、分注した溶出液と等量のイソプロピルアルコール加えよく混合し、15000 \times g で 15 分間低温下(4°C)遠心した後、上清を捨てる。70%(v/v)エタノール 1 mL を加え、15000 \times g で 5 分間低温下(4°C)にて遠心を行う。さらに上清を捨て、残った沈殿を乾燥させた後、予め 50°C に温めた滅菌蒸留水 50 μ L に溶解し、DNA 試料原液とする。抽出した DNA 試料原液は分光光度計 NanoDrop 1000 を用いて、200-350 nm の UV 吸光度を測定して DNA 濃度を測定した。

③陽性プラスミドの作成

パパイヤの果肉より抽出した DNA を鋳型とし、リアルタイム PCR 反応後の反応液を電気泳動で分離し、目的の標的増幅断片を切り出し、精製を行った。その後、pGEM -T Easy vector system (Promega 社製)のプロトコールに従い、標的増幅断片を pGEM-T Easy vector を用いて TA クローニングを行った。DH5 α 大腸菌コンピテントセルを使

用し、TA クローニングを行ったプラスミドで大腸菌の形質転換を行った。大腸菌はブルー・ホワイトコロニーセレクションを行うため、IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)、X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 及びアンピシリンを添加した培地で培養を行った。白コロニーを選別し、プラスミドの抽出、精製を行い、検知法の擬似陽性 DNA 試料として使用した。

③リアルタイム PCR 反応

リアルタイム PCR 機器は Applied Biosystems 社製 7900HT を使用した。

PCR 条件

PCR 用反応液は 25 μ L/well として調製した。組成は以下のとおりである。PCR Buffer (Taqman[®] Gene Expression Master Mix)12.5 μ L、対象プライマー対溶液(各プライマー、50 μ mol/L)各 0.4 μ L、対象プローブ溶液(10 μ mol/L)0.25 μ L を混合し、滅菌蒸留水で全量 22.5 μ L に調製後、10 ng/ μ L DNA 試料 2.5 μ L (25 ng)を添加する。ただし、10 ng/ μ L に達しない場合は、抽出した DNA 試料原液をそのまま 2.5 μ L 使用した。また、PCR のブランク反応液として、必ず DNA 試料を加えないものについても同時に調製した。分注操作終了後、真上からシールした後、完全にウェルを密閉し、測定を行った。

各種標的遺伝子配列特異的検知法に使用したプライマープローブは以下の通りである。

パパイヤ内在性遺伝子キモパイン遺伝子検出用 :

Q-Chy-1F2:

CCATGCGATCCTCCCA

Q-Chy-2R:

CATCGTAGCCATTGTAACACTAGCTAA

Q-Chy-P:

FAM-TTCCCTTCAT(BHQ1)CCATCCCCTCTTG
AGA

GM パパイヤ PRSV-YK 検出用 :

YK-1F: GATCCCCGGGTGGTCAGT

YK-1R: CCGGTATCCACAGCTTCATTTT

YK-P: FAM-AGACGCCATGGAAGG-MGB

GM パパイヤ Huanong No.1 系統検出用 :

qHN-F:

GACGAGTACAAGGAGACGCC

qHN-R:

GTTGTCACTGAAGCGGGAAG

qHN-P:

FAM-TGGCTGCTATTGGGCGAATCAACTAC-BH
Q1

GM パパイヤ 55-1 系統検出用 :

PRSV-cp F:

CAGCCTTAGATGCTTCAAGAAAAGA

PRSV-cp R:

TCCGCCTCCATCCAGTCTATT

PRSV-cp P

FAM-TCTTCTAGCTTCCCGGCAACAAT-TAMRA

CaMV 35S プロモーター検出用 :

TM-35S-F: GCCTCTGCCGACAGTGGT

TM-35S-R: AAGACGTGGTTGGAACGTCTTC

TM-35S-p:

FAM-CAAAGATGGACCCCCACCCACG-TAMRA

NOS ターミネーター検出用 :

180-F: CATGTAATGCATGACGTTATTTATG

180-R: TTGTTTTCTATCGCGTATTAAATGT

TM-180:

FAM-ATGGGTTTTTTATGATTAGAGTCCCGCAA-T
AMRA

PCR 増幅条件

反応条件は 50°C 2 分間の条件で保持した後、95°C 10 分間加温し、ホットスタート法で反応を開始した。その後、94°C 15 秒間、60°C 1 分間を 1 サイクルとして、50 サイクルの増幅反応を行った。

リアルタイム PCR 結果の解析と判定

ベースラインを3~15サイクルに設定した。Ct値をプロットするため、 ΔRn Thresholdは指数関数的な増幅の間、0.2~0.5に設定した。PCR増幅産物の指数関数的な増幅が確認できる48サイクルを反応の陽性・陰性の指標とした。Ct値が48未満の場合、反応は陽性と判定した。Ct値を得ることができない場合及びCt値が48以上の場合は、反応は陰性と判定した。

C. 研究結果

1. コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良

Nippon Gene GM quicker2(現法)、QIAGEN Genomic-tip 100、mono FAS、FAST ID の4種のDNA精製キットを使用し比較検討を行った。それぞれの方法から精製したDNAの回収効率(図1A)及びDNA精製効率(図1B)を比較した。その結果、こ

れまでにコメ DNA の検出が困難であった加工度の高いタピオカ入りライスペーパー(rp-1)において回収効率は Nippon Gene GM quicker2 は高かったが、非常に塩濃度が高く、精製度では QIAGEN Genomic-tip 100 が優れていた(表 1)。real-time PCR の結果からも、QIAGEN Genomic-tip 100 で精製した DNA の方は最も Ct 値の低い値と安定した結果が得られた(表 2)。また、QIAGEN Genomic-tip を使用することによりビーフン及びフォーにおいては精製度が向上し米粉については回収効率の上昇が見られたが、Ct 値においては大きな差は見られなかった。mono FAS、FAST ID では、設定サンプル量が少ないため比較は難しいが、real-time PCR の結果より Nippon Gene GM quicker2 と同等の Ct 値が得られているが、同様に、十分に塩の除去できていなかったことが考えられた。これらの結果より、検討した 4 種類の方法の中で QIAGEN Genomic-tip 100 は DNA の抽出精製に最も適していると考えられた。比較的に加工度の低い米粉からの DNA の抽出精製は、500 mg の試料から回収率が高いシリカゲル膜タイプキット法(Nippon Gene GM quicker2 変法)及びイオン交換樹脂タイプの DNA 抽出精製キット(QIAGEN Genomic-tip)を使用すれば十分可能であると考えられた。

2. コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の開発

新コメ陽性対照用(PLD)プライマー・プローブは、トウモロコシ、オオムギ、カラスムギ、ヒヨコマメ、テンサイ、コムギ、ワタ、コメ、ダイズ、アマ、ナタネ、コマツナ、ジャガイモ、パパイヤ、パッションフルーツ、パイナップル、パッションフルーツに交差反応はなく、コメのみを検出した(表 3)。現コメ陽性対照用(KVM)プライマー・プローブは、トウモロコシと交差反応性があるため、今回作成した PLD プライマー・プローブは、より特異性が高いことが分かった。また、コメ陽性対照用プライマー・プローブの 3 セットを比較したところ、加工度の高いビーフン(rice19)及びライスペーパー(rp-1)において得られた Ct 値に差が見られた(表 4)。本研究で開発した PLD 検出用プライマー・プローブ(新 KVM)は、これまでに使用していたもの(現 KVM)又は SPS を標的としたもの(旧 SPS)よりも得られる Ct 値は低いことから、感度の高いプライマー・プローブを開発したことが示唆された。

3. 安全性未承認 GM コメのモニタリング検査

GM コメ Bt63 系統と KMD 系統が有するコンストラクト配列(63Bt, NNBt)、除草剤グルホシネート耐性遺伝子 *Bar* (*Bar*)、NOS ターミネーター

配列(tnos)及び 35S プロモーター配列(35S)にそれぞれ特異的なプライマー・プローブを用いてリアルタイム PCR による定性試験を試みた(表 5)。計 32 検体中に 63Bt は 5 検体、NNBt は 9 検体、tnos は 9 検体、35S は 9 検体に検出された。*Bar* 除草剤耐性遺伝子は検出されなかった。35S 陽性検体 9 検体において、除草剤グルホサート耐性遺伝子 *epsps* を検出するプライマー対を用いて定性 PCR により検査した結果、いずれの検体も陰性であった。

4. 安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性 GM コメ Xa21 系統の検知法確立

GM コメ Xa21 のコンストラクト構造を文献調査から得た情報を基に、その配列に特異的な検出用プライマー対を設計し PCR を行った(図 2)。GM コメ Bt63 系統陽性であった R3、R5、R6 検体において I1 及び U1 プライマーを使用して PCR を行った結果、約 1.3 kb と約 1.4 kb の増幅産物が確認された(図 3)。約 1.4 kb の増幅産物は非 GM コメには検出されなかった。そこで、R5、R6 検体から得られた約 1.3 kb と約 1.4 kb の両 PCR 産物のシーケンス解析を行った。約 1.4 kb の PCR 産物は NCBI データベースに登録されているアフリカの野生イネ由来 *Xa21* の配列と比較し、相同性は R5 が 99.2%、R6 が 99.9% と高かった(図 4)。また、R5 の内在性 Xa21 (約 1.3 kb) と外来性 Xa21 (約 1.4 kb) は部分的に約 20 bp の異なる 2 つの塩基配列を持つほか、全体的に異なる塩基が分散しており、内在性と外来性の塩基配列の相同性は 91.3% と低かった(図 5)。R6 も R5 と同様に塩基配列の違いがみられ、内在性と外来性の塩基配列の相同性は 91.5% であった(図 6)。また、他の PCR 用プライマー対(図 2)を用いて検出を試みたが、R5、R6 検体に予想される PCR 増幅は得られなかった(表 6)。

5. パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査

GM パパイヤのコンストラクト構造に共通して使用されている 35S プロモーター及び NOS ターミネーターを検出するためのリアルタイム PCR 用プライマー及びプローブを用いて、安全性承認済み GM パパイヤ 55-1 系統以外の GM パパイヤのパパイヤ加工品への混入に関する実態調査を行った。その結果、漬物 A、B の 2 製品、茶 A、B の 2 製品及びジャム A の 1 製品に 35S プロモーター及び NOS ターミネーターを検出し、その内、安全性未承認の GM パパイヤ 55-1 系統以外の GM パパイヤの混入の可能性が示唆された製品は、

漬物A,Bの2製品と茶Bの1製品であった(表7)。35Sプロモーター及びNOSターミネーターは他のGMパパイヤのプロモーター、ターミネーターとして使用されていることから、55-1系統GMパパイヤ以外のGMパパイヤの検出試験を行った。昨年、我々が開発した台湾産安全性未承認GMパパイヤPRSV-YK系統検知法(*Biol. Pharm. Bul.*, 34, 1648-1651, 2011)、及び、中国の華南農業大学で独自開発されたGMパパイヤ系統Huanong No. 1系統検知法(*J. Agric. Food Chem.*, 57, 7205-7212, 2009) (図7)を使用して安全性未承認のGMパパイヤの検出を試みた。その結果、GMパパイヤPRSV-YKの混入を漬物A,B、茶A,B、ジャムAに検出した。一方、35Sプロモーター及びNOSターミネーター陽性検体にGMパパイヤHuanong No. 1系統のコンストラクト構造を有する検体は検出されなかった(表7)。GMパパイヤPRSV-YKと55-1の混入量を概算するため、プラスミドに*Chy*とGMパパイヤPRSV-YKの増幅断片を導入した陽性プラスミドを構築した。予め既知濃度に調節した陽性プラスミドを用いて、リアルタイムPCRで得られたCt値をもとに検量線を作成した。検量線から、混入が確認されている5検体のリアルタイムPCRから得られたCt値を使用し、コピー数を算出した。GMパパイヤPRSV-YKのコピー数/*Chy*のコピー数を算出したところ、ジャム製品Aは0.1527、茶製品Bは0.1403となり、他の3製品(0.0003~0.0065)と比較し、GMパパイヤPRSV-YKの混入率が高いことが示唆された(表8)。また、GMパパイヤ55-1系統のコピー数/*Chy*のコピー数を算出したところ、茶製品Bはジャム製品Aと比較して混入量が多いことが示唆された(表8)。

D. 考察

1. コメ加工品からのコメDNA抽出精製法の改良

Genomic-tip100/Gを使用したDNA抽出精製法は比較を行った他のDNA精製法よりも高感度に検出が可能なDNA検体を精製することが可能であることが示唆された。また、従来のシリカゲル膜タイプのGM quicker2を用いてコメDNAが抽出できなかったタピオカ入りの一部のコメ加熱加工品を含むすべての試料については、イオン交換樹脂ベースのGenomic-tip100/Gを用いることによってリアルタイムPCRを用いたコメDNAの標的遺伝子配列の検出が可能であることが示唆された。

2. コメDNAに特異的なコメDNA検出法の開発

他の作物と交差反応を示さず従来のコメ内在性検知法よりも高感度に検出できる方法を開発した。

3. 安全性未承認GMコメのモニタリング検査

文献等の情報を基に白葉枯病抵抗性GMコメや除草剤耐性GMコメの混入検査を含めたコメ加工品のGMコメのモニタリング検査の結果、計32検体中に63Btは5検体、NNBtは9検体、tnosは9検体、35Sは9検体に検出された。今後、特定できていないGMコメ検体について詳細に調べる必要があると考えられた。

4. 安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性GMコメXa21系統の検知法確立

GMコメBt63陽性検体(R3、R5、R6)においてGMコメXa21コンストラクト構造の一部をPCRにより検出を試みたところ非GM検体には検出されない約1.4kbの増幅産物を得た。シークエンス解析を行った結果、白葉枯病菌*Xanthomonas oryzae*に耐性を持つ野生イネ*Oryza longistaminata*由来遺伝子*Xa21*の配列と同一であった。このことから、GMコメXa21の混入もしくは野生イネとの掛け合わせ品種の可能性が示唆された。今後、導入ベクターと*Xa21*の境界領域である配列を解析することで、GMコメXa21を検出可能な高感度で特異的なリアルタイムPCR用プライマー・プローブの構築を行う予定である。

5. パパイヤ加工品の安全性未承認GMパパイヤ混入に関する実態調査

9種類のパパイヤ加工品計38検体のGMパパイヤ混入に関する実態調査を行ったところ、安全性承認済みのGMパパイヤ55-1系統の混入を茶1製品とジャム1製品に検出し、安全性未承認のGMパパイヤPRSV-YKを漬物2製品、茶2製品、ジャム1製品に検出した。近年、パパイヤリングスポットウイルス(PRSV)病に抵抗性を示すGMパパイヤの開発が世界中で進められており、我が国では食品衛生法により55-1系統のみの流通・販売が認められている。しかし、2011年2月に未承認GMパパイヤ(PRSV-YK)が国内で流通していることが報告され、また、中国国家生物安全委員会が2006年9月に中国国内で商業栽培を認可したPRSV由来のレプリカーゼ(*NiB*)を導入したHuanong No. 1系統に関しては、2008年時点で、広東省で栽培されたパパイヤ5100ヘクタールのうち9割弱にあたる4500ヘクタールとされている。中国からのパパイヤの生果実、種子及び苗の輸入実績は報告されておらず、本研究結果においても、Huanong No. 1の混入は確認されなかったが、日本国内では未承認GMパパイヤであるため本研究で行った方法を用いて実態調査を続ける必要があると考えられた。

E. 結論

1. コメ加工品からのコメ DNA 抽出精製法の改良

コメ加工品からコメDNAを精製する方法を開発した。

2. コメ DNA に特異的なコメ DNA 検出法の開発

高感度かつ特異的にコメDNAを検出できる方法を開発した。

3. 安全性未承認 GM コメのモニタリング検査

32検体中GMコメと判断した試料は18検体であり、その内訳はKMD1が9検体、Bt63が2検体、Bt63+Xa21 (R) が3検体、35SpもしくはNostが4検体であった。

4. 安全性未承認の白葉枯れ病抵抗性GMコメ Xa21系統の検知法確立

野生イネ由来遺伝子Xa21を検出する特異的プライマー対を用いて輸入コメ加工品を検査したところ、非GMコメからは検出されないXa21の増幅産物を確認した。

5. パパイヤ加工品の安全性未承認 GM パパイヤ混入に関する実態調査

我が国で流通しているパパイヤ加工食品に安全性未承認のPRSV-YK系統の混入が確認された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

1. 論文発表

- 1) Nakamura, K., Ohtsuki, T., Mori, H., Hoshino, H., Hoque, A., Oue, A., Kanou, F., Sakagami, H., Tanamoto, K., Ushijima, H., Kawasaki, N., Akiyama, H., Ogawa, H. Novel anti-HIV-1 activity produced by conjugating unsulfated dextran with polyL-lysine. *Antiviral Research* (2012), in press
- 2) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R. Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 34(10), 1648-1651 (2011).
- 3) Matemu, A.O., Nakamura, K., Kayahara, H., Murasawa, H., Katayama, S., Nakamura, S. Enhanced Antiviral Activity of Soybean β -Conglycinin-Derived Peptides by Acylation with Saturated Fatty Acids. *Journal of Food*

Science, 76(6), 299-304 (2011).

- 4) Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K., Teshima R. Inter-laboratory Study of DNA Extraction from Multiple Ground Samples, Multiplex Real-Time PCR and Multiplex Qualitative PCR for Individual Kernel Detection System of Genetically Modified Maize J. *AOAC International*, 94(5), 1540-1547 (2011).
 - 5) Ohashi-Suzuki, M., Yabu, Y., Ohshima, S., Nakamura, K., Kido, Y., Sakamoto, K., Kita, K., Ohta, N., Suzuki, T. Differential Kinetic Activities of Glycerol Kinase among African Trypanosome Species: Phylogenetic and Therapeutic Implications. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 73(5), 615-621 (2011).
 - 6) Suzuki, A., Duc, H. P. N., Nakamura, K., Akiyama, H. and Kasahara, Y. Remarkable growth variation in a natural Japanese population of *Pleurocybella porrigens*. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 81(1), 18-23, 2011.
- ### 2. 学会発表
- 1) Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Noguchi, A., Kondo, K., and Teshima, R. Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain in Processed Food. 125th AOAC Annual Meeting & Exposition (2011.9.)
 - 2) 高橋勇貴、中村公亮、穠山浩、大森清美、笠原正輝、中澤裕之、橘田和美、近藤一成、手島玲子：遺伝子組換え(GM)パパイヤ 55-1 系統検知法のパパイヤ含有食品への適用性と検出感度について、日本薬学会 第132年会 (2012.3.)
 - 3) 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、穠山浩、坂田こずえ、野口秋雄、近藤一成、手島玲子：加工品中の遺伝子組換えサケのコンストラクト構造を標的とした新規検知法の開発、日本薬学会 第132年会 (2012.3.)
 - 4) 中村公亮、穠山浩、濱岡志津子、大森清美、坂田こずえ、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、近藤一成、手島玲子：加工食品からの未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検出について (第二報)、第48回全国衛生化学技術協議会年会 (2011.11)
 - 5) 野口秋雄、穠山浩、中村公亮、坂田こずえ、真野潤一、高島令王奈、峯岸恭孝、布藤聡、橘田和美、近藤一成、手島玲子：スタック品種混入粉末試料における遺伝子組換えトウモロコシの定量法開発 (第一報)、第102回日本食品衛生学会 学術講演会、秋田 (2011.9)
 - 6) 高橋勇貴、中村公亮、穠山浩、明石良、橘田和美、中澤裕之、近藤一成、手島玲子：パパイヤ

- 加工品の未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検出に関する調査について、第 102 回日本食品衛生学会 学術講演会 (2011. 9)
- 7) 北川麻美子、山田千尋、中村公亮、小林武史、川上浩、穂山浩、手島玲子：野菜加工品中の未承認遺伝子組換えトマトの検知法の確立に関する研究 (第一報)、日本食品化学学会第 17 回 総会・学術大会 (2011. 5)
 - 8) 穂山浩、牧山太樹、真野潤一、安井修二、峯岸恭孝、坂田こずえ、中村公亮、橘田和美、手島玲子：2009 年度産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の混入率と系統分析、日本食品化学学会第 17 回 総会・学術大会 (2011. 5)
 - 9) 中村公亮、穂山浩、濱岡志津子、大森清美、坂田こずえ、笠原正輝、高島令王奈、橘田和美、手島玲子：未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) の検知法開発について (第一報)、日本食品化学学会第 17 回 総会・学術大会 (2011. 5)
 - 10) 中村公亮、名古屋博之、伴真俊、坂田こずえ、穂山浩、手島玲子：リアルタイム PCR 法を用いた遺伝子組換え (GM) サケの特異的検知法の開発、日本薬学会第 131 年会 (2011. 3)

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 コメ加工品からのDNA抽出精製の結果

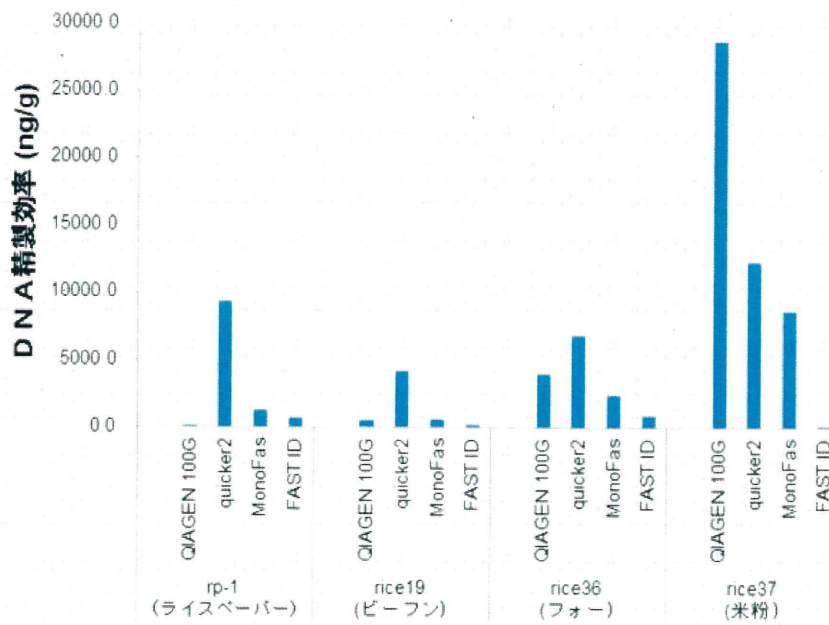
サンプルNO.	抽出kit	試料重 g	溶液 ul	濃度 ng ul	total収量 ng ul	回収効率 ng g	A260	A280	260 280	260 230
rice19 (ビーフン)	QIAGEN 100G	2.0	50	21.24	1062.0	531.0	0.425	0.291	1.46	0.48
		2.0	50	18.81	940.50	470.25	0.376	0.238	1.58	0.52
	quicker2	0.5	50	41.26	2063.0	4126.0	0.825	0.548	1.51	0.61
	MonoFas	0.2	50	2.49	124.5	622.5	0.05	0.038	1.31	0.03
	FAST ID	0.2	50	0.76	38.0	190.0	0.015	0.02	0.77	0.05
rice36 (フォー)	QIAGEN 100G	2.0	50	140.58	7029.0	3514.5	2.812	1.495	1.88	2.09
		2.0	50	157.68	7884.00	3942.00	3.154	1.658	1.9	2.11
	quicker2	0.5	50	68.30	3415.0	6830.0	1.366	0.75	1.82	1.09
	MonoFas	0.2	50	9.47	473.5	2367.5	0.189	0.091	2.09	0.19
	FAST ID	0.2	50	3.31	165.5	827.5	0.066	0.041	1.59	0.04
rice37 (米粉)	QIAGEN 100G	0.5	50	145.19	7259.5	14519.0	2.904	1.581	1.84	2
		2.0	50	1148.5	57425.00	28712.50	22.97	13.352	1.72	1.03
	quicker2	0.5	50	123.03	6151.5	12303.0	2.461	1.307	1.88	2.16
	MonoFas	0.2	50	34.80	1740.0	8700.0	0.696	0.381	1.83	0.71
	FAST ID	0.2	50	0.54	27.0	135.0	0.011	0.012	0.88	0.19
rp-1 (ライスペーパー)	QIAGEN 100G	0.5	50	0.27	13.5	27.0	0.005	-0.023	-0.24	0.22
		2.0	50	4.71	235.5	117.8	0.094	0.059	1.59	1.23
	quicker2	0.5	50	4.90	245.00	122.50	0.098	0.05	1.96	0.66
	MonoFas	0.2	50	93.13	4656.5	9313.0	1.863	1.272	1.46	0.64
	FAST ID	0.2	50	4.90	245.0	1225.0	0.098	0.074	1.33	0.04
		0.2	50	2.63	131.5	657.5	0.053	0.022	2.44	0.01

表2 リアルタイムPCRを使用したコメDNAの検出と検出感度の比較

サンプル	QIA	Quicker	mono	ID
rp-1	36.13	40.66	37.62	37.82
	35.89	-	38.02	42.60
rice19	25.31	28.86	28.65	33.20
	24.92	28.81	28.57	33.17
rice36	23.88	24.97	24.80	27.39
	23.97	24.95	24.74	27.45
rice37	23.33	23.29	21.93	25.94
	23.19	23.18	21.89	25.92

図1 DNA抽出精製法におけるコメ加工品からのDNAの回収効率及び精製効率の比較

A. DNA 回収効率



B. DNA 精製効率

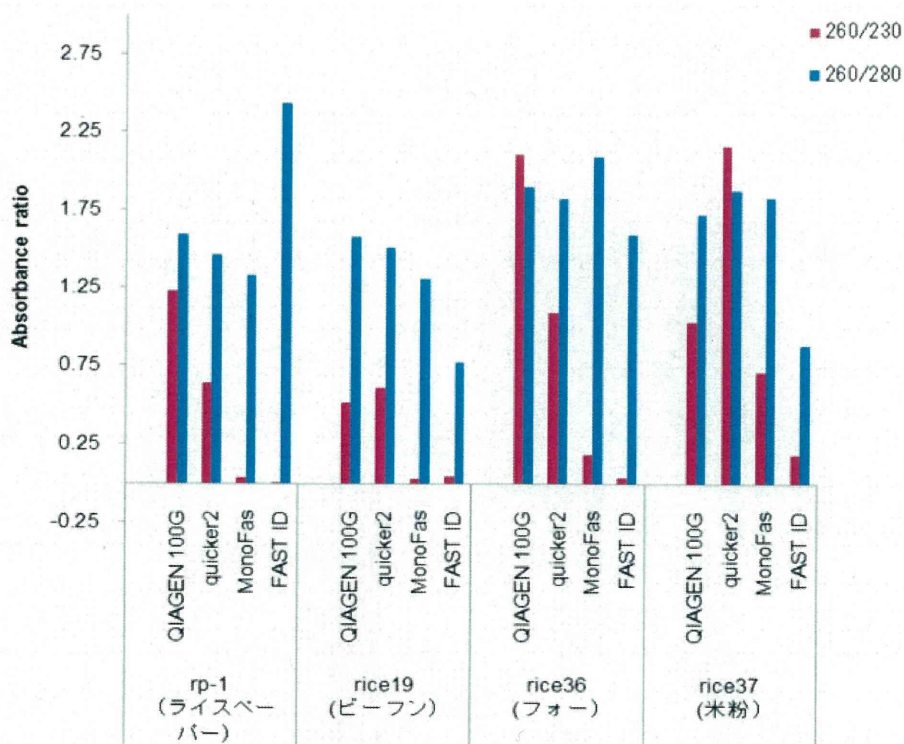


表3 コメ特異的検査法のリアルタイム PCR 結果

	Ct値 (threshold 0.2)	
	1回目	2回目
コメ	23.87/23.92	23.79/23.81
トウモロコシ	-/-	-/-
オオムギ	-/-	-/-
カラスムギ	-/-	-/-
コムギ	-/-	-/-
ダイズ	-/-	-/-
ヒヨコマメ	-/-	-/-
テンサイ	-/-	-/-
アマ	-/-	-/-
ジャガイモ	-/-	-/-
ワタ	-/-	-/-
パパイヤ	-/-	-/-
パッションフルーツ	-/-	-/-
パイナップル	-/-	-/-

表4 コメ特異的リアルタイム PCR 法の試験結果

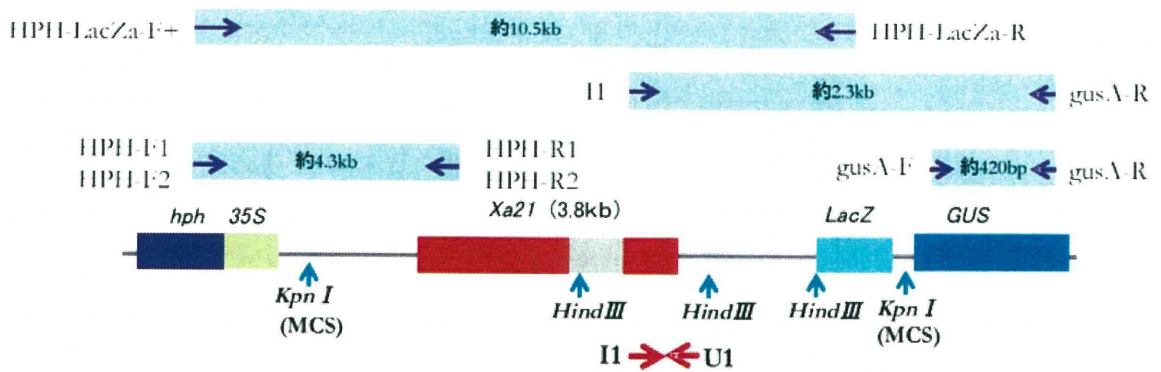
サンプル	現KVM	新KVM	旧SPS
rp-1	36.13	31.19	-
	35.89	31.39	-
rice19	25.31	24.82	-
	24.92	24.80	-
rice36	23.88	23.87	45.15
	23.97	23.89	46.71
rice37	23.33	23.05	46.68
	23.19	23.12	-
日本晴	22.44	22.36	49.32
	22.36	22.30	

表5 コメ加工品中のGMコメ含有に関する試験結果^{a)}

検 NO.	加工	real-time PCR					定性PCR				判定結果
		63Bt	NNBt	trios	35S	Bar	Xa21		SPS26		
							R	S	O+SPS	35S+spss	
1	ビーフン(タイ産米)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	検出不能
2	ビーフン	Δ	-	-	-	-	-	-	-	-	Bt63微量混入
3	ビーフン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
4	ビーフン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
5	ビーフン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
6	ビーフン	-	-	-	+	-	-	-	-	-	GMOの混入の可能性
7	もち米粉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
8	ビーフン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
9	ビーフン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
10	ビーフン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
11	ビーフン	-	-	-	-	-	-	-	-	-	検出不能
12	もち米粉	-	+	+	+	-	-	-	-	-	KMD
13	ビーフン	-	+	-	+	-	-	-	-	-	KMD
14	ビーフン	-	-	-	+	-	-	-	-	-	GMOの混入の可能性
15	もち米粉	-	+	+	+	-	-	-	-	-	KMD
16	ビーフン	Δ	-	-	-	-	-	-	-	-	Bt63微量混入
17	もち米粉	-	+	-	-	-	-	-	-	-	KMD
18	ビーフン	-	-	-	+	-	-	-	-	-	GMOの混入の可能性
19	米粉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	non-GM
20	もち米粉	-	+	-	+	-	-	-	-	-	KMD
21	もち米粉	-	+	-	-	-	-	-	-	-	KMD
22	もち米粉	-	-	-	-	-	-	-	-	-	陰性
23	もち米粉	-	+	-	-	-	-	-	-	-	KMD
24	もち米粉	-	+	+	+	-	-	-	-	-	KMD
25	ビーフン	-	-	-	+	-	-	-	-	-	GMOの混入の可能性
26	国産もち米	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GMOの混入の可能性
R1	国産うるち米、モミ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GMOの混入の可能性
R2	国産もち米、精米	-	-	-	-	-	-	-	-	-	GMOの混入の可能性
R3	中国Bt1米混入	+	-	-	-	-	-	-	-	-	non-GM
R4	中国Bt1米混入	-	+	+	+	-	-	-	-	-	O longtarnate 由来のXa21有、GMO Bt63
R5	中国Bt1米混入	+	-	-	-	-	-	-	-	-	KMD
R6	中国Bt1米混入	+	-	-	-	-	-	-	-	-	O longtarnate 由来のXa21有、GMO Bt63

^{a)} リアルタイムPCRの2並行試験の結果で陽性の判定された検体(+)、陰性と判定された検体(-)、2並行試験中1試験の結果のみ標的配列の増幅を確認した検体(Δ)。斜線は試験を行っていない検体を示す。

図2 GM コメ Xa21 のコンストラクト構造及び検出用プライマー対



pCXK1301 (Shanyou63-Xa21)

Mol Breed 8: 285-293, 2001

图5 R5 rice:1.3 kb (内在性, indica) vs. 1.4 kb (外来性, African wild rice)

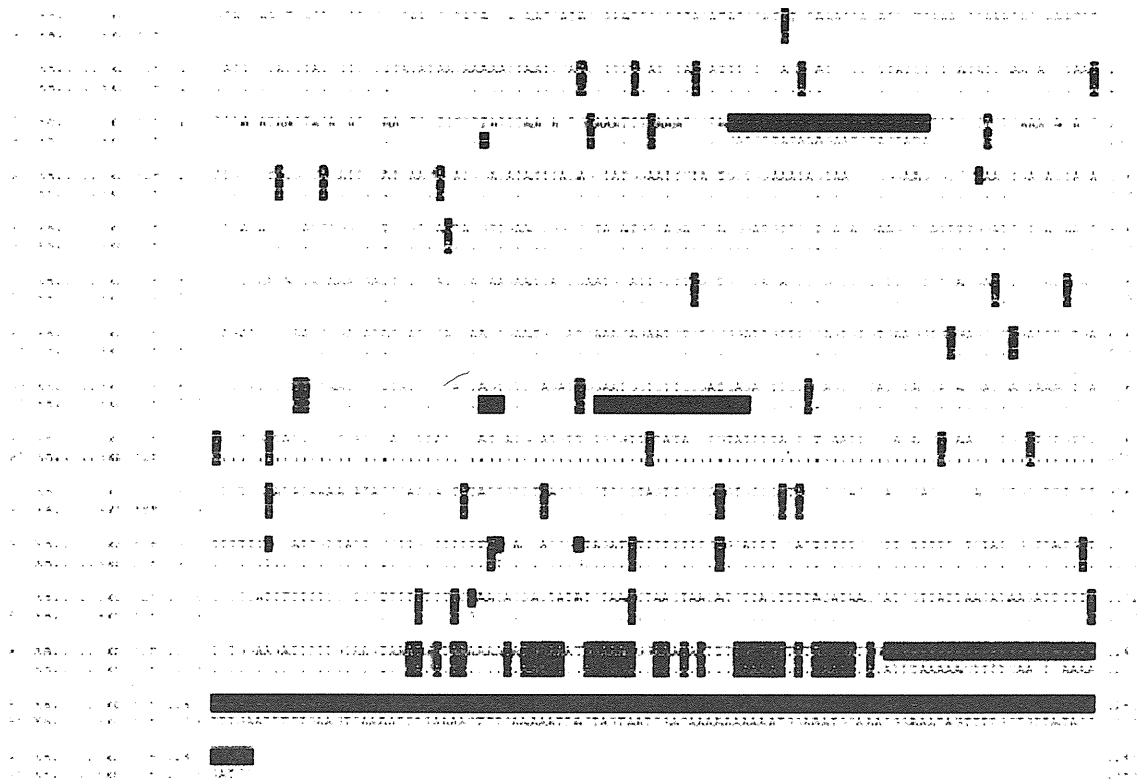


图6 R6 rice:1.3 kb (内在性, indica) vs. 1.4 kb (外来性, African wild rice)

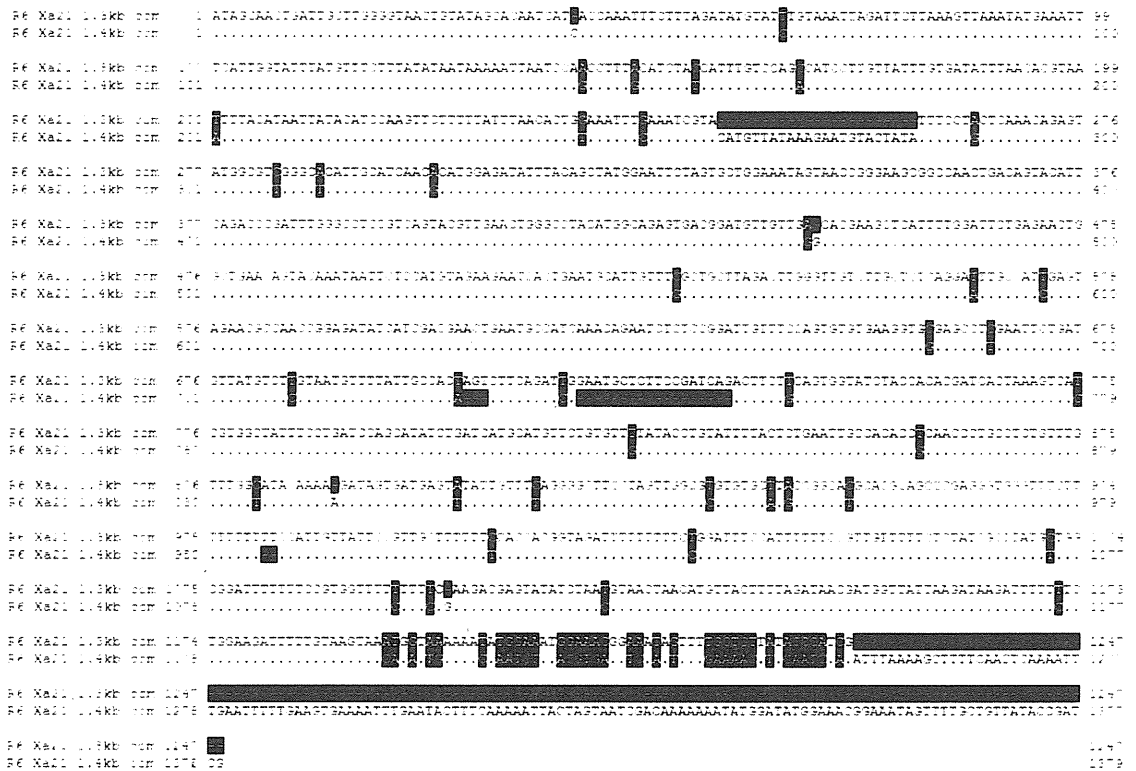


表6 コメ加工品におけるGMコメ混入検査結果

袋 NO.	加工	real-time PCR					定性PCR				コメント
		63Bt	NNBt	tnos	35S	Bar	Xa21		epsps		
							R	S	O _s SPS	35S-epsps	
1	ビーフン(タイ産米)										検出不可
2	ビーフン	Δ									Bt63微量混入
3	ビーフン										陰性
4	ビーフン										陰性
5	ビーフン										検出不可
6	ビーフン										GMO
7	もち米粉										陰性
8	ビーフン										陰性
9	ビーフン										陰性
10	ビーフン										陰性
11	ビーフン										検出不可
12	もち米粉		+	+	+			+	+		KMD1
13	ビーフン		+		+			+	+		KMD1
14	ビーフン			+	+			+	+		GMO
15	もち米粉		+	+	+			+	+		KMD1
16	ビーフン	Δ									Bt63微量混入
17	もち米粉		+					+			KMD1
18	ビーフン				+			+	+		GMO
19	米粉							+			nonGM
20	もち米粉		+		+			+	+		KMD1
21	もち米粉		+					+			KMD1
22	もち米粉							+			陰性
23	もち米粉		+					+			KMD1
24	もち米粉		+	+	+			+	+		KMD1
25	ビーフン			+				+			GMO
26	国産もち米							+			nonGM
R1	国産うるち米(モミ)							+			nonGM
R2	国産もち米(精米)							+			nonGM
R3	中国Bt米混入	+						+			O longstaminata由来のXa21有、GMO:Bt63
R4	中国Bt米混入		+		+			+	+		KMD1
R5	中国Bt米混入	+		+				+	+		O longstaminata由来のXa21有、GMO:Bt63
R6	中国Bt米混入	+						+	+		O longstaminata由来のXa21有、GMO:Bt63

表7 パパイヤ加工製品中のGMパパイヤ検出結果

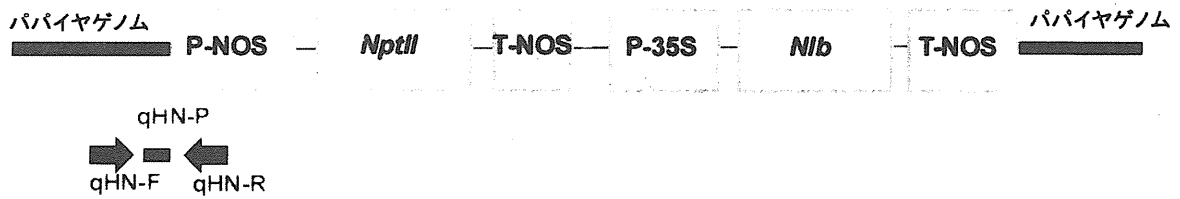
分類	Sample No.	リアルタイムPCR (Ct値)					
		chy	35S	Nos-1	YK-construct	5S-1 event	Huanong no.1 event
缶詰	A	25.90					NT
	B	37.40					NT
漬物		27.68	37.63	36.54	36.47		
		21.19	33.40	33.22	33.24		
	C	21.70					NT
	D						NT
乾燥パパイヤ	A	23.70					NT
	B	22.10					NT
	C	25.50					NT
ドライフルーツ(漂白剤有り)	A						NT
	B						NT
	C						NT
	D						NT
ドライフルーツ(漂白剤無し)	A	24.43					NT
	B	23.50					NT
	C	23.20					NT
	D						NT
茶		22.90	24.03	24.69	26.03	33.3	
		23.98	32.90	32.37	31.60		
	C	28.60					NT
ジャム		27.20	33.57	31.72	30.32	39.72	
	B	25.73					NT
	C						NT
	D						NT
	E						NT
	F						NT
	G	32.98					NT
ピューレ	A	21.96					NT
	B	23.99					NT
	C	23.01					NT
ジュース	A	24.43					NT
	B	34.95					NT
	C						NT
	D	43.14					NT
	E	34.40					NT
シャーベット	A	21.30					NT
	B	21.60					NT

表8 パパイヤ加工品中に含有するGMパパイヤPRSV-YKと55-1系統含有率の推定^{a)}

Product	Lot	Ct Value			Copy number			Contamination		
		Chy	PRSV-YK	55-1	Chy	PRSV-YK	55-1	PRSV-YK Chy	55-1 Chy	
漬物	A	27.68	36.47	—	11155	35	—	0.0031	—	
	B	21.19	33.24	—	1088250	321	—	0.0005	—	
茶	B	23.98	31.60	33.13	151900	992	881	0.0065	0.0027	
	A	22.90	26.03	—	325528	45687	—	0.1403	—	
ジャム	A	27.20	36.32	39.72	15653	2392	12	0.1527	0.0008	

^{a)} — target sequence not detected

図7 中国産GMパパイヤ Huanong No. 1のコンストラクト構造



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Masuda K., Kajikawa A., and Igimi S.	Establishment and evaluation of an in vitro M cell model using C2BBel cells and Raji cells.	Bioscience and Microflora.	30	37-44	2011
Nakano, M., Arisawa, K., Yokoyama, S., Nishimoto, M., Yamashita, Y., Sakashita, M., Ezaki, R., Matsuda, H., Furusawa, S. and Horiuchi, H.	Characteristics of novel chicken embryonic stem cells established using chicken leukemia inhibitory factor.	J. Poult. Sci.	48 (1)	64-72	2011
渡邊伸也	わが国で生産された体細胞クローン牛およびその後代牛の状況	畜産技術	670	27	2011
渡邊伸也	先端技術とそのリスクコミュニケーションに関する主要な論点	日本胚移植学雑誌	33	85	2011
Shinya Watanabe and Takashi Nagai	Survival of embryos and calves derived from somatic cell nuclear transfer in cattle: a nationwide survey in Japan	Animal Science Journal	82	360	2011
Akiyama, H., Sakata, K., Makiyama, D., Nakamura, K., Teshima R.	Interlaboratory Study of DNA Extraction from Multiple Ground Samples, Multiplex Real-Time PCR and Multiplex Qualitative PCR for Individual Kernel Detection System of Genetically Modified Maize	J. AOAC Int.	94	1540-1547	2011
Matemu, A.O., Nakamura, K., Kayahara, H., Murasawa, H., Katayama, S., Nakamura, S.	Enhanced Antiviral Activity of Soybean β -Conglycinin-Derived Peptides by Acylation with Saturated Fatty Acids.	J. of Food Sci.	76	299-304	2011
Nakamura, K., Akiyama, H., Ohmori, K., Takahashi, Y., Takabatake, R., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R.	Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus YK Strain.	Biol. Pharm. Bull.	34	1648-1651	2011
Sato R, Nakamura R, Komatsu A, Oshima M, Teshima R.	Proteomic analysis of known and candidate rice allergens between non-transgenic and transgenic plants.	Regul. Toxicol. Pharmacol.	59	437-444	2011
手島玲子, 中村亮介	食品中のアレルゲンの予測	日本食品衛生学会誌	52	1-9	2011
手島玲子	非組換え植物の生物学的変化の評価とOmics技法の活用に関して	イルシー	104	4-8	2011
手島玲子	わが国の食物アレルギー対策と検査法	月刊フードケミカル	2011-6	19	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
手島玲子	アレルギー検査の現状と課題	日本小児アレルギー学会誌	25(1)	57	2011
中村里香	プロテオミクス技術を用いたアレルギー解析法	ぶんせき	2011-6	350	2011
中村里香、中村亮介、手島玲子	古代米（赤米・黒米）のアレルギー発現プロテオミクス解析	日本食品化学学会誌	18(3)	143-149	2011
佐藤里絵、中村里香、手島玲子	イムノプロテオミクス手法を用いたソバIgE結合タンパク質の網羅的検出	日本食品化学学会誌	18(2)	103-109	2011
Shindo T., Kanazawa Y., Saito Y., Kojima K., Ohsawa M., Teshima R.	Effective induction of oral anaphylaxis to ovalbumin in mice sensitized by feeding of the antigen with aid of oil emulsion and salicylate.	J. Toxicol. Sci.	37	307-315	2012
Teshima R., Nakamura R., Satoh R.	Proteomic and allergenomic analyses of rice and potato proteins.	Proceedings of the 3rd international symposium on "Frontiers in Agriculture Proteome Research"		124-129	2012 Mar
吉松嘉代、河野徳昭、川原信夫、穂山浩、手島玲子、西島正弘	薬用及び環境浄化用遺伝子組換え植物の開発・生産に関する最近の動向	YAKUGAKU ZASSHI	132(5)	629-674	2012
手島玲子	経口感作の成立と消化管粘膜免疫機構	アレルギー・免疫	19(1)	40-44	2012

