

2013年11月

15. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穂山 浩、手島 玲子、佐々木 伸大、山口 友紀絵、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏: DNA マイクロアレイによる GMO スクリーニング検査法の開発、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月

16. 中村公亮、穂山浩、小林友子、野口秋雄、高島令王奈、橋田和美、橋本博之、川上浩、近藤一成、手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来 DNA を高感度に検出するための PCR プライマー設計について、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月

17. 中村公亮、穂山浩、河野徳昭、小林友子、吉松嘉代、真野潤一、橋田和美、大森清美、野口秋雄、近藤一成、手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定、日本食品化学学会 第19回 総会・学術大会、名古屋、2013年8月

18. 真野潤一、原田美央子、波田野修子、布藤聡、峯岸恭孝、則武寛通、飯塚太由、中村公亮、穂山浩、手島玲子、高島令王奈、古井聡、橋田和美: 遺伝子組換え農産物網羅的検知法の単一試験室による妥当性確認、2013年度 AOAC International 日本セクション年次大会、東京、2013年6月。

19. 真野潤一、中村公亮、近藤一成、手島玲子、高島令王奈、橋田和美: デジタル PCR を利用した遺伝子組換え農産物の高精度定量、日本食品衛生学会第105回大会、東京、2013年5月。

平成26年度論文発表

1. Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K. Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control*, 50, 949-955, 2015
2. Tanaka, H., Kitazaki, Y., Nakamura, K., Akiyama, H., Akashi, R. Development of a simple detection method for

genetically modified papaya PRSV-YK, *Ikushugaku Kenkyu*, 16, 158-161, 2014

3. Kondo, K., Nakamura, K. Scientific review on novel genome editing techniques, *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 231-246, 2014
4. Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H. Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 247-253, 2014
5. Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T. A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *European Food Research and Technology*, 2014. DOI 10.1007/s00217-014-2340-7
6. Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H. Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 21, 48-56, 2014
7. Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K. Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products. *Food Hygiene and Safety Science*, 55, 25-33, 2014

平成26年度学会発表

1. Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Plouffe, D., Buchanan, J., Nishimaki-Mogami, T. A novel transgenic construct-specific real-time PCR detection method for genetically modified salmon in foods, 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, USA, 2014年9月。

2. Fukasawa, A., Sakagami, H., Nakahara, Y., Nakamura, K., Ogawa, H. Immobilization method of glycosylated Fmoc-amino acid for SPR and interaction analysis between *Pleurocybella porrigens* lectin and carbohydrates, 27th International Carbohydrate Symposium, India, 2014年1月.
3. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子:標的DNAのメチル化の頻度およびパターン解析による新規GM検知法確立の試み、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
4. 中村公亮、近藤一成、小林友子、野口秋雄、高畠令王奈、橘田和美、最上(西巻)知子:CaNCED配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
5. 東城 雄満、西野 浩史、中村 公亮、近藤 一成、深谷 崇、大平 真義、中西 和樹:加工食品中の遺伝子組換えコメ検出のためのシリカモノリスカラムを用いた新しいDNA抽出精製法の検討、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
6. 中西希代子、中村公亮、近藤一成、池田恵:食品中に含有する添加物のDNA精製効率に与える影響について、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
7. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子:Multiplex real-time PCRを用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
8. 野口秋雄、中村公亮、真野潤一、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子:遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発、第108回日本食品衛生学会学術講演会、金沢、2014年12月
9. 中村公亮、近藤一成、小林友子、坂田こずえ、野口秋雄、名古屋博之、真野潤一、橘田和美、最上(西巻)知子:成長ホルモン遺伝子を組換えた遺伝子組換えサケ検知法の試験室間共同試験による妥当性確認、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
10. 野口秋雄、坂田こずえ、真野潤一、中村公亮、高畠令王奈、峯岸恭孝、橘田和美、穂山浩、手島玲子、近藤一成、最上(西巻)知子:2010年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
11. 坂田こずえ、近藤一成、中村公亮、野口秋雄、小林友子、福田のぞみ、最上(西巻)知子:RFLPおよびReal-time PCR法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法、第51回全国衛生化学技術協議会年会、大分、2014年11月
12. 高畠令王奈、大西真理、布籐聡、峯岸恭孝、野口秋雄、中村公亮、近藤一成、手島玲子、真野潤一、橘田和美:遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討、2014年度AOAC International日本セクション年次大会、東京、2014年6月
13. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子:次世代ゲノム編集技術を用いた人工プロモーター挿入によるグロビン遺伝子クラスター内での遺伝子発現量の調節、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
14. 中村公亮:未承認遺伝子組換え食品の検知法の開発に関する研究、日本食品化学学会 第20回 総会・学術大会、東京、2014年5月
15. 伊東 篤志、田口 朋之、田名網 健雄、羽田 聖治、中村 公亮、近藤 一成、穂山 浩、手島 玲子、何 思巖、宮原 平、山田 晃世、小関 良宏:DNAマイクロアレイによる未承認遺伝子組換えパ

パイヤのスクリーニング検査法、日本食品化学学会 第 20 回 総会・学術大会、東京、2014 年 5 月

16. 中村公亮、小林友子、近藤一成、最上(西巻)知子：遺伝子組換えに汎用されるウィルスプロモーターのエピジェネティックメチル化修飾パターン解析、日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月

H. 知的財産権の取得状況

特許取得

1. 小川温子、中村公亮、坂上ひろみ、棚元憲一：抗ウイルス剤、特許第 5633717 号、登録日：2014 年 10 月 24 日。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

な

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
「新開発バイオテクノロジー応用食品の安全性確保並びに国民受容に関する研究」
分担研究報告書（平成 25~26 年度）

承認組換え生物の検知技術の開発

研究分担者 野口 秋雄 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 主任研究官

研究要旨：

我が国に輸入される安全性承認済みの遺伝子組換え（GM）作物の種類は増加の一途を辿っている。なかでもトウモロコシは品種数が多く、表示の妥当性を検証するために多くの検査法が開発されているが、消費者庁から通知されている現行の検査法は新開発 GM 品種には対応しておらず、また実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。そこで本研究では、新開発 GM 品種を検出できるシステムを導入し、実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法ならびに改良型粒検査法の開発を行った。新開発 GM 品種を検出するために、GM 品種に広く存在している組換え遺伝子 P35S および tNOS を検出対象とした。新規スクリーニング検査法においては、実験操作の簡便化のために表示義務の閾値である GM 混入率 5% の判定に multiplex リアルタイム PCR から得られた内在性遺伝子（*SSI1b*）と組換え遺伝子（P35S および tNOS）の C_t 値あるいは C_q 値の差（ ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値）を用いた。プラスミドや genomic DNA を用いた実験から、本検査法は十分な定量性と検出感度を有していることが示され、擬似試料を用いた検証試験から、本スクリーニング検査法は実際のトウモロコシ検体にも適用できることが示唆された。改良型粒検査法においては、実験操作の簡便化のためにダルマピンおよび紙ヤスリを用いた DNA 抽出法を検討した。その結果、ダルマピンを用いた場合のほうが紙ヤスリを用いた場合に比べ、良好な結果が得られ、さらに紙ヤスリを用いた場合にはコンタミネーションや大きな労力が懸念された。以上のことから、DNA 抽出にはダルマピンを用いた方法を採用することにした。DNA 抽出液を蒸留水で希釈する条件で PCR 増幅の効率が低下したことから、GM 系統の検出試験には DNA 試料液の原液を用いた。本検査法は高い感度を示し、抽出バッファー成分による PCR 阻害の影響は少なかった。これらの検査法は、新規開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、簡便化により実験の労力を減らすことによって検査の精度を向上させることができ、現行の検査法に置き換わる新規検査法として期待される。

A. 研究目的

近年、多種多様な遺伝子組換え（GM）作物が開発され、我が国に輸入される安全

性承認済みの GM 作物の種類は増加の一途を辿っている。我が国においては、安全性承認済みの GM ダイズおよびトウモロコシ

は重量割合で 5%を超えた場合、その旨の表示が義務づけられており、表示の妥当性を検証するための定量法が消費者庁より通知されている。特にトウモロコシは品種数が多く、多くの検査法を必要とする。GM トウモロコシの検査は、(1) スクリーニング検査、(2) 系統特異的定量法による検査、(3) 粒単位検査の手順で行うことになっている。しかし、現行のこれらの検査法は新規に開発された数種類の GM 系統を検出することができず、実験操作に大きな労力を要することが問題となっている。新開発 GM 系統の見逃しを防ぎ、実験操作の労力を減らすことは、検査の精度を向上させるために必要不可欠である。そこで本研究では、新開発 GM 品種を検出できるシステムを導入し、実験操作を簡便化した新規スクリーニング検査法ならびに改良型粒検査法の開発を行った。

B. 研究方法

(1) 新規スクリーニング検査法の開発

[試料]

非組換え (non-GM) トウモロコシならびに GM トウモロコシ MON810 の種子は MONSANT 社、MIR162 および 3272 の種子は Syngenta Seed 社、TC1507 および DAS59122 の種子は PIONEER 社から入手した。

[擬似試料の調製]

non-GM と GM トウモロコシ MON810 または MIR162 の粉末試料同士を重量比 1, 2, 3, 4, 5% で混合した擬似試料を調製した。

[DNA 抽出]

トウモロコシ種子の粉砕には Mixer Mill MM200 (Retsch) を用いた。トウモロコシ

粉末試料からの DNA 抽出精製は、シリカ膜タイプカラムの DNeasy Plant Maxi Kit (QIAGEN) を用い、以下の手順で行った。粉末試料 1 g に 100 mg/mL RNase 10 μ L および Buffer AP1 5 mL を添加し、よく攪拌した後、65°C で 1 時間保温した (15 分ごとに攪拌した)。次いで試料に Proteinase K (QIAGEN) 200 μ L を加え、よく攪拌した後、65°C で 1 時間保温した (15 分ごとに攪拌した)。保温後、Buffer AP2 1.8 mL を添加し、よく攪拌した後、氷水中に 15 分間静置した。スイング式遠心分離器にて遠心分離し (2,300 \times g, 室温, 15 分間), 上清を 4.2 mL 採取し, QIAshredder Maxi spin column に負荷した。スイング式遠心分離器にかけ (2,300 \times g, 室温, 5 分間), 素通り液 3.4 mL を回収した。この溶液に Buffer AP3/E 5.1 mL を添加し、よく攪拌した後、DNeasy Maxi spin column に負荷した。スイング式遠心分離器にかけ (2,300 \times g, 室温, 5 分間), 素通り液を廃棄した。カラムに Buffer AW 12 mL を加え、スイング式遠心分離器にかけた (2,300 \times g, 室温, 15 分間)。カラムを新しいチューブに移し、あらかじめ 65°C に温めておいた滅菌水 1 mL を加え、室温で 5 分間静置した。スイング式遠心分離器にかけ (2,300 \times g, 室温, 10 分間), 溶出液を回収した。等量のイソプロパノールを添加し、上下にゆっくり 10 回転倒混和後、室温で 5 分間静置した。遠心分離を行い (12,000 \times g, 4°C, 15 分間), 沈殿物を 70% (v/v) エタノール 500 μ L でリンスし、遠心分離した (12,000 \times g, 4°C, 3 分間)。上清を丁寧に廃棄し、沈殿を風乾後、蒸留水 100 μ L に溶解させた。タッピングにて攪拌後、4°C で一晩静置し、DNA 試料原液とした。

DNA 試料原液の 260 nm の吸光度の値 1 を 50 ng/μL として DNA 濃度を算出した。得られた DNA 濃度から、DNA 試料原液をリアルタイム定量 PCR 試験に必要な 20 ng/μL に滅菌蒸留水で希釈して DNA 試料液とし、使用するまで -30°C で冷凍保存した。

[コントロールプラスミドの作製]

スクリーニング試験に用いるリアルタイム PCR を評価するために、内在性遺伝子 *starch synthase IIb* (*SSIIb*), GM 遺伝子 cauliflower mosaic virus 35S promoter (P35S) および *Agrobacterium tumefaciens* nopaline synthase terminator (tNOS) の部分配列を組み込んだコントロールプラスミドを作製した。PCR にて各部分配列を増幅し、pUC19 の HincII サイトに組み込んだ (pUC-SSIIb, pUC-P35S および pUC-tNOS)。増幅した配列に PCR エラーが無いことを確認したのち、各プラスミドを NdeI で処理し、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した。さらに、エタノール沈殿を行い、乾燥後の沈殿を TE 溶液に溶解した。各プラスミドのコピー数は、後述する singleplex リアルタイム PCR にて定量し、TE 溶液にて希釈試料を調製した。

[リアルタイム PCR]

スクリーニング試験は *SSIIb*, P35S および tNOS を検出する multiplex リアルタイム PCR にて実施した。機種は ABI PRISM™ 7900HT (Life Technologie) および LightCycler® 96 (Roche Applied Science) を使用した。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science) 5 μL, SSIIb3-5'/SSIIb3-3' (各 0.08 μM),

P35S1-5'/P35S1-3' (各 0.25 μM), NOS ter 3-5'/NOS ter 2-3' (各 0.3 μM), SSIIb-TaqV (0.08 μM), P35S-Taq (0.1 μM), NOS-Taq (0.12 μM) を混合し、DNA 試料液またはブランク試料液 (蒸留水) 1 μL を添加し、滅菌水で全量 10 μL に調製した。反応条件は以下の通りである。50°C で 2 分間保温した後、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, 30 秒, 59°C, 1 分 30 秒を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。定量試験では、singleplex リアルタイム PCR を行った。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche Applied Science) 5 μL, 対象プライマー対溶液 (各 0.5 μM), 対象プローブ溶液 (0.2 μM, *SSIIb* に対しては SSIIb-Taq を使用した) を混合し、DNA 試料液、標準プラスミド DNA 溶液 [GM トウモロコシプラスミドセット -ColE1/TE- ((株)ニッポンジーン); 20, 125, 1,500, 20,000, 250,000 copies/2.5 μL] またはブランク試料液 (5 ng/μL ColE1/TE) 1 μL を添加し、滅菌水で全量 10 μL に調製した。反応条件は以下の通りである。50°C で 2 分間保温した後、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, 30 秒, 59°C, 1 分を 1 サイクルとして、45 サイクルの増幅反応を行った。PCR 反応は、各 DNA 試料液あたり 3 ウェル併行して行い、平均値を求めた。使用したプライマー・プローブの配列は下記の通りである。

SSIIb

SSIIb3-5' : CCAATCCTTTGACATCTGCTCC

SSIIb3-3' : GATCAGCTTTGGGTCCGGA

SSIIb-TaqV : VIC-AGCAAAGTCAGAGCGCT
GCAATGCA-TAMRA

SSIIb-Taq : FAM-AGCAAAGTCAGAGCGCTG
CAATGCA-TAMRA

P35S

P35S1-5' : ATTGATGTGATATCTCCACTGAC
GT

P35S1-3' : CCTCTCCAAATGAAATGAACTTC
CT

P35S-Taq : FAM-CCCACTATCCTTCGCAAGA
CCCTTCCT-TAMRA

tNOS

NOS ter 2-5' : GTCTTGCGATGATTATCATAT
AATTTCTG

NOS ter 3-5' : GCATGTAATAATTAACATGT
AATGCATGAC

NOS ter 2-3' : CGCTATATTTTGTCTTCTATC
GCGT

NOS-Taq : FAM-AGATGGGTTTTTATGATTA
GAGTCCCGCAA-TAMRA

[測定結果の解析]

ABI PRISM™ 7900HT においては、ベースラインは3サイクルから15サイクルで設定し、 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 として 0.2 に設定した。得られた *SSIIb* と P35S および tNOS の C_t 値 (ABI PRISM™ 7900HT) あるいは C_q 値 (LightCycler® 96) の差 [ΔC_t 値 (= $C_{t(P35S+tNOS)} - C_{t(SSIIb)}$) あるいは ΔC_q 値] で評価した。

[スクリーニング検査法の評価]

定量性の評価は、コントロールプラスミ

ド (pUC-SSIIb: 50~10,000 copies/ μ L, pUC-P35S および tNOS: 15~750 copies/ μ L*, *7,500 copies/ μ L pUC-SSIIb にて希釈) および各種 GM 品種から抽出した genomic DNA を non-GM 品種の genomic DNA で希釈した試料 (genomic DNA 希釈試料; 混入率 0.15~10%) を用いて行った。検出限界の算出は、コントロールプラスミド (pUC-SSIIb: 1.25~10 copies/ μ L, pUC-P35S および tNOS: 1.25~10 copies/ μ L*, *7,500 copies/ μ L pUC-SSIIb にて希釈) および genomic DNA 希釈試料 (混入率 0.025~0.15%) を用いて行った。pUC-SSIIb に対する評価は C_t 値あるいは C_q 値にて行い、その他は ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値にて行った。

(2) 改良型粒検査法の開発

[試料]

非組換え (non-GM) トウモロコシ 3 品種ならびに GM トウモロコシ MON810, GA21, NK603, MON863, MON89034 および MON88017 の種子は MONSANT 社, Bt11, MIR162, MIR604 および 3272 の種子は Syngenta Seed 社, TC1507 および DAS59122 の種子は PIONEER 社から入手した。

[DNA 抽出]

各トウモロコシ種子につき 4 粒ずつを 1% SDS にて洗浄した後、蒸留水にて数回すすいだ。洗浄後のトウモロコシ種子を市販のダルマピンまたは紙ヤスリ (#100) にて傷をつけた。その際、ダルマピンを用いた場合は 2 ヲ所穴をあけ、紙ヤスリを用いた場合は胚乳がむき出しになる程度に傷をつけた。1 ウェルあたり 1 粒を 48 ウェルユニプレート (Whatman) に入れ、各ウェルに抽出バッファー (20 mM Tris/HCl (pH8.0),

5 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.3% SDS) 0.5 mL を添加した。75 mm 幅のビニールテープにて蓋をし、恒温槽にて 50°C で 1 時間保温した。その際、20 分ごとにビニールテープに液体が付かない程度に軽く振盪させた。保温後、スイング式遠心分離器にて遠心分離し (1,000×g, 室温, 10 分間), 上清を 0.25 mL 採取し, DNA 試料液とした。

[リアルタイム PCR]

GM 系統の検出試験は (1) と同様に *SSIIb*, P35S および tNOS を検出するプライマー・プローブを用い, multiplex リアルタイム PCR にて実施した。リアルタイム PCR 機器には LightCycler® 96 を用いた。PCR 用反応液の組成は以下の通りである。DirectAce qPCR Mix ((株)ニッポンジーン) 5 μL, *SSIIb*3-5′/*SSIIb*3-3′ (各 0.08 μM), P35S1-5′/P35S1-3′ (各 0.25 μM), NOS ter 3-5′/NOS ter 2-3′ (各 0.3 μM), *SSIIb*-TaqV (0.08 μM), P35S-Taq (0.1 μM), NOS-Taq (0.12 μM) を混合し, DNA 試料液またはブランク試料液 (蒸留水) 1 μL を添加し, 滅菌水で全量 10 μL に調製した。反応は (1) と同様の条件で行った。後述する DNA 抽出液の希釈条件の検討に用いたコントロールプラスミド pUC-551 の検出は, 下記の PCR 用反応液の組成にて行った。DirectAce qPCR Mix 5 μL, 55-1 primer1/55-1 primer2 (各 1.25 μM), 55-1 probe (0.5 μM) を混合し, DNA 試料液またはブランク試料液 (蒸留水) 1 μL を添加し, 滅菌水で全量 10 μL に調製した。反応は (1) と同様の条件で行った。PCR 反応は, 各 DNA 試料液あたり 3 ウェル併行して行い, 平均値を求めた。pUC-551 の検出に使用したプライマー・プローブの配列は

下記の通りである。

55-1 primer1: CAGCCTTAGATGCTTCAAGA
AAAGA

55-1 primer2: TCCGCCTCCATCCAGTCTATT

55-1 probe: FAM-TCTTCTAGCTTCCCGCA
ACAAT-TAMRA

[DNA 抽出液の希釈条件の検討]

MON810 または MIR162 の種子を Mixer Mill MM200 (Retsch) を用いて粉碎した。粉末試料 0.25 g を 2 mL チューブに入れ, 抽出バッファーを 1 mL 添加した。ボルテックスミキサーにて 10 秒間激しく攪拌した後, 室温で 20 分静置した。遠心分離を行い (14,000×g, 室温, 10 分間), 上清を回収した。上清を蒸留水あるいは抽出バッファーにて 2, 5, 10, 100 倍に希釈し, GM 系統の検出試験を行った。また, GM トウモロコシのゲノム配列と相同性を示さない GM パパイア 55-1 系統の部分配列を組み込んだコントロールプラスミド pUC-551 (40 copies/μL) を DNA 抽出液の希釈系列に添加し, 55-1 系統の検出試験を行った。

[リアルタイム PCR 系の評価]

検出限界の算出は, (1) で作製したコントロールプラスミド (pUC-*SSIIb*: 5~40 copies/μL, pUC-P35S および tNOS: 5~40 copies/μL*, *10~80 copies/μL pUC-*SSIIb* にて希釈) を用いて行った。抽出バッファー成分の PCR への影響については, 各コントロールプラスミド 40 copies/μL を鋳型として, 0.03~0.5% SDS, 40~200 mM NaCl, 0.5~2 mM EDTA (それぞれ終濃度) または抽出バッファーを反応溶液に添加し, リアルタイム PCR を行った。

C. 研究結果

(1) 新規スクリーニング検査法の開発

[tNOS プライマー・プローブの検討]

新開発 GM 品種の検出のために、GM 品種に広く存在している P35S と tNOS を検出する反応系を用いることにした。tNOS を検出するプライマー・プローブは既に開発されているが、増幅鎖長が 151 bp と他のもの (SSIIb: 114 bp, P35S: 101 bp) に比べて長い。そこで増幅鎖長を揃えるために、以前から使われている NOS ter 2-5' の代わりとして新たに NOS ter 3-5' (108 bp) を設計した。両者を比較した結果、PCR 効率 (E) に関して NOS ter 3-5' ($E = 96.1\%$) を使用した場合のほうが、NOS ter 2-5' ($E = 94.5\%$) を使用した場合に比べ高かった。そのため、本研究では tNOS の検出には NOS ter 3-5' を使用することにした。

[プライマー・プローブ濃度の検討]

我が国の標準定量法を参照し、通常の singleplex リアルタイム PCR で使用するプライマー・プローブ濃度で ABI PRISM™ 7900HT にて multiplex リアルタイム PCR を行ったところ、P35S を 1 コピー有する MON810 では混入率 1%, tNOS を 1 コピー有する MIR162 では混入率 10%までしか検出できなかった。そこで、プライマー・プローブ濃度を検討した結果、「B. 研究方法」に記述した条件において両者とも混入率 0.1%においても検出可能であった。これ以降はこの条件のプライマー・プローブ濃度にて行うことにした。

[スクリーニング検査法の評価]

本研究のスクリーニング検査法では ΔCt 値あるいは ΔCq 値にて GM 混入率 5%以下

であるかを判定する。そのため、 ΔCt 値あるいは ΔCq 値の定量性を評価する必要がある。コントロールプラスミドを用いた検討から、両機種ともに Ct 値あるいは Cq 値において pUC-SSIIb では 50~10,000 copies/ μ L, ΔCt 値あるいは ΔCq 値において pUC-P35S, tNOS では 15~750 copies/ μ L の範囲で高い直線性 ($R^2 = 0.9921\sim 0.9992$) と PCR 効率 ($E = 92.3\sim 100.3\%$) が得られた。また、MON810, TC1507, DAS59122 (以上 P35S を 1 コピー有する), MIR162, 3272 (以上 tNOS を 1 コピー有する) から抽出した genomic DNA 希釈試料を用いた検討から、両機種ともに ΔCt 値あるいは ΔCq 値において 0.15~10% の範囲で高い直線性 ($R^2 = 0.9912\sim 0.9998$) と PCR 効率 ($E = 92.7\sim 103.2\%$) が得られた。一方、コントロールプラスミドを用いた検討から、両機種ともに検出限界は Ct 値あるいは Cq 値において pUC-SSIIb では 2.5 copies/ μ L, ΔCt 値あるいは ΔCq 値に対し pUC-P35S および tNOS では 5 copies/ μ L であった。また、MON810, TC1507, DAS59122, MIR162, 3272 から抽出した genomic DNA 希釈試料を用いた検討から、検出限界は ABI PRISM™ 7900HT では ΔCt 値において 0.10~0.15%, LightCycler® 96 では ΔCq 値においてすべて 0.10%であった。

[擬似混入試料を用いた検証]

本研究で開発したスクリーニング検査法を用いて、作製した擬似試料に対する検証試験を行った。ABI PRISM™ 7900HT および LightCycler® 96 の両機種において、 ΔCt (あるいは ΔCq) vs 混入率の対数値をプロットしたところ、直線性が見られた。さらに MON810 と MIR162 の間で直線性に大きな差は見られなかった。

(2) 改良型粒検査法の開発

[DNA 抽出液の希釈条件の検討]

リアルタイム PCR 試薬として DirectAce qPCR Mix を使用するにあたり、本試薬の説明書に DNA 抽出液を蒸留水にて 2 倍以上希釈する記述があったため、DNA 抽出液の希釈条件を検討した。SSIIb の増幅を試みた結果、蒸留水で希釈した試料において MON810 では 5 倍以上、MIR162 では 100 倍希釈した試料において検出されなかった。一方で、抽出バッファーで希釈した試料においては、両 GM 系統ともに 100 倍希釈した試料においても検出された。また、P35S+tNOS の増幅を試みた結果、蒸留水で希釈した試料は抽出バッファーで希釈した試料に比べ、 Cq 値が高い傾向を示した。さらに、MON810 の DNA 抽出液の希釈系列に pUC-551 を添加し、55-1 系統の検出試験を行った結果、抽出バッファーで希釈した場合には Cq 値は一定であったが、蒸留水で希釈した場合には希釈倍率の増加に伴い Cq 値の増加がみられた。一方で、抽出バッファーを蒸留水で希釈した試料に pUC-551 を添加した場合には、 Cq 値は一定であった。以上の結果から、本研究での実験条件においてトウモロコシからの DNA 試料液は、蒸留水で希釈した場合、十分な PCR 増幅が得られないことが示唆された。以降の実験では、DNA 試料液の希釈は行わず、原液を用いて GM 系統の検出試験を行った。

[リアルタイム PCR 系の評価]

コントロールプラスミドを用いて検出限界を評価した結果、P35S は 10 copies/ μ L、SSIIb および tNOS は 20 copies/ μ L であった。また、各検出対象の検出限界における平均

Cq 値は、それぞれ 39.2 (SSIIb), 37.6 (P35S), 39.0 (tNOS) であった。抽出バッファーの PCR への影響を評価した結果、0.3% SDS, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA において阻害が見られたが、抽出バッファーと同じ条件では全ての標的配列の増幅が確認された。

[DNA 抽出法の評価]

DNA 抽出の簡便化のために、トウモロコシ種子にダルマピンまたは紙ヤスリにて傷をつけ、抽出バッファーに DNA を溶出させる方法を検討した。ダルマピンを用いた場合には、全ての試料において 3 併行ともに SSIIb を検出することができた。また、non-GM 以外の全ての試料において 3 併行ともに P35S+tNOS を検出することができた。一方で、紙ヤスリを用いた場合には、3272 系統の 1 粒において SSIIb および P35S+tNOS を 2 ウェルおよび 3 ウェルで検出できなかった。また、T25 系統の 1 粒において P35S+tNOS を 1 ウェルで検出できなかった。しかしながら、平均 Cq 値は、ダルマピンを用いた場合には 34.25 (SSIIb), 33.02 (P35S+tNOS) で、紙ヤスリを用いた場合 [32.31 (SSIIb), 31.89 (P35S+tNOS)] に比べ高い傾向を示した。なお、すべての系統の平均 Cq 値は、各検出対象の検出限界における平均 Cq 値を超えることはなかった。

D. 考察

(1) 新規スクリーニング検査法の開発

安全性承認済み GM トウモロコシにおいて、現行のスクリーニング検査法および系統特異的定量法による検査法には二つの問題点がある。問題点の一つとして、新規に開発された数種類の GM 品種を検出できな

いため、それらの品種を見逃してしまうことがあげられる。特に系統特異的定量法による検査法においては、現在主流になっている GM 品種の多くを検出できないため、検査法としては致命的である。二つ目の問題点としては、GM 混入率を定量するために検量線の作成ならびに複数の検出対象に対するリアルタイム PCR が必要であるため、実験操作に大きな労力を要することがあげられる。これらの問題点を解決するために、本スクリーニング検査法では、GM 品種に広く存在している P35S と tNOS を検出対象とし、multiplex リアルタイム PCR から得られた内在性遺伝子 *SSI1b* と組換え遺伝子 P35S および tNOS の C_t 値あるいは C_q 値の差 (ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値) で GM 混入率 5%以下であるかを判定することにした。プライマー・プローブ濃度について我が国の標準定量法を参照し、multiplex リアルタイム PCR を行ったところ、検出感度が著しく低かった。これは、GM 混入率が低い試料においては P35S や tNOS に比べ *SSI1b* が大量に存在するため、DNA polymerase が後者の増幅反応に占有されてしまったためであると考えられる。そこで、*SSI1b* を検出するプライマー・プローブ濃度を低く設定することで、高感度な検出系を構築することができた。

ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値で評価する際、それぞれの検出対象の PCR 効率に大きな差がある場合には定量性が得られない。P35S および tNOS に対する ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値を GM 混入率 5%前後の範囲で評価した結果、高い直線性と PCR 効率を得られたことから、本スクリーニング検査法で算出される ΔC_t 値あるいは ΔC_q 値は十分な定量性

を有することが示された。また、コントロールプラスミドを用いた場合の検出限界は 2.5~5 copies/ μ L、genomic DNA を用いた場合の検出限界は 0.10~0.15%であったことから、本スクリーニング検査法は十分な検出感度を有することが示された。

擬似試料を用いた検証試験の結果、異なる検出対象を有する GM 系統 (MON810 : P35S のみを 1 コピー有する, MIR162:tNOS のみを 1 コピー有する) に対し、同等の定量性を示した。このことから、本スクリーニング検査法は実際のトウモロコシ検体にも適用できることが示唆された。

(2) 改良型粒検査法の開発

数多くのスタック品種が開発・栽培されている現状において、現行で用いられている系統特異的定量法による検査法では混入率の過剰定量が起こる可能性がある。この問題を解決するために、粒検査法が開発されたが、高価な試料粉碎機器を使用し、DNA 抽出・精製操作に大きな労力を要することが問題となっていた。本研究では、これらの問題を解決した改良型粒検査法を開発した。

本検査法を開発するにあたり、DNA 抽出液の希釈条件を検討したところ、本研究の実験条件では DNA 抽出液を蒸留水で希釈すると PCR 増幅の効率が低下することが判明した。この理由として、DNA 抽出液を蒸留水で希釈することで反応液中の SDS 濃度が低下してミセルが崩壊し、PCR 阻害物質が溶け出したためであると予想された。そこで本研究では DNA 試料液の原液を用いて GM 系統の検出試験を行った。

コントロールプラスミドを用いた検討に

より、本検査法は高い感度を示し、抽出バッファー成分による PCR 阻害の影響は少なかった。

DNA 抽出条件を検討した結果、紙ヤスリを用いた場合のほうがダルマピンを用いた場合に比べ、低い平均 Cq 値を示したが、前者は偽陰性試料がいくつか存在した。また、紙ヤスリを用いてトウモロコシ種子に傷をつける際にトウモロコシの粉が散らばり、コンタミネーションの可能性が懸念された。さらに、ダルマピンを用いた場合のほうが紙ヤスリを用いた場合に比べ、労力が少なかった。以上のことから、DNA 抽出にはダルマピンを用いた方法を採用することにした。

E. 結論

本研究では、新規開発 GM 品種を検出できる簡便な新規スクリーニング検査法ならびに従来の粒検査法の問題点を改善した簡便な改良型粒検査法を開発した。これらの検査法は、新規開発 GM 品種の見逃しを防ぎ、簡便化により実験の労力を減らすことによって、検査の精度を向上させることができるかと期待される。新規スクリーニング検査法において GM 混入率が 5%以下であることを判定するための閾値を設定し、これを超えた試料に対して改良型粒検査法によって確認試験を行うシステムを構築できれば、これら 2 つの検査法は現行のスクリーニング検査法、系統特異的検査法、粒検査法に置き換わる検査法として期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Interlaboratory Validation Study of an Event-Specific Real-time Polymerase Chain Reaction Detection Method for Genetically Modified 55-1 Papaya. *J. AOAC Int.* **96**, 1054-1058.
- (2) Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitta, K., Akiyama, H., Teshima, R. and Mogami, T. (2013) Identification and Detection Method for Genetically Modified Papaya Resistant to Papaya Ringspot Virus Strains in Thailand. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1-5
- (3) Nakamura, K., Akiyama, H., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods. *Jpn. J. Food Chem. Safety* **20**, 161-169
- (4) Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K.,

- Noguchi, A., Kondo, K. and Teshima, R. (2013) Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct. *Food Chemistry* **141**, 2618-2624
- (5) Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., and Kitta, K. (2013) Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns. *Food Hyg. Saf. Sci.* **54**, 309-315.
- (6) Takabatake, R., Masubuchi, T., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R., Kurashima, T., Mano, J. and Kitta, K. (2014) Development and Validation of an Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Maize MIR162. *Food Hyg. Saf. Sci.* **55**, 205-209
- (7) Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K. and Nishimaki-Mogami, T. (2015) A novel trait-specific real-time PCR method enable quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize. *Eur. Food Res. Technol.* in press
- (8) Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J. and Kitta, K. (2015) Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice. *Food Control* in press
2. 学会発表
- (1) 中村公亮, 穂山浩, 河野徳昭, 小林友子, 吉松嘉代, 真野潤一, 橘田和美, 大森清美, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子: コメ加工食品に混入した未承認遺伝子組換えコメ由来の遺伝子コピー数の測定, 日本食品化学学会 第19回総会・学術大会, 名古屋, 2013年8月
- (2) 中村公亮, 穂山浩, 小林友子, 野口秋雄, 高畠令王奈, 橘田和美, 橋本博之, 川上浩, 近藤一成, 手島玲子: 加工食品中の遺伝子組換えジャガイモ由来DNAを高感度に検出するためのPCRプライマー設計について, 日本食品化学学会 第19回総会・学術大会, 名古屋, 2013年8月
- (3) 野口秋雄, 穂山浩, 中村公亮, 坂田こずえ, 真野潤一, 高畠令王奈, 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50回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013年11月
- (4) 中村公亮, 近藤一成, 小林友子, 野口秋雄, 坂田こずえ, 大森清美, 笠原正輝, 高畠令王奈, 橘田和美, 手島玲子:

- 安全性未承認遺伝子組換えパパイヤ (PRSV-YK) 検知法の試験室間共同試験による妥当性確認, 第50回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013年11月
- (5) 近藤一成, 坂田こずえ, 赤星千絵, 黒飛希美, 中村公亮, 野口秋雄, 小林友子, 手島玲子: 安全性未承認遺伝子組換え食品検知法における感度と精度について(コメ場合), 第50回全国衛生化学技術協議会年会, 富山, 2013年11月
- (6) Kitta, K., Kondo, K., Teshima, R., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Mano, J.: Novel Monitoring Scheme for Authorized GM Maize, GMCC-13, Lisbon, 2013.11
- (7) 野口秋雄, 坂田こずえ, 真野潤一, 中村公亮, 高畠令王奈, 峯岸恭孝, 橘田和美, 穂山浩, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 2010年度米国産不分別遺伝子組換えトウモロコシ試料中の系統分析, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013年11月
- (8) 中村公亮, 小林友子, 野口秋雄, 大森清美, 高畠令王奈, 橘田和美, 穂山浩, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 熱帯・亜熱帯地域で開発の進む遺伝子組換えパパイヤの加工食品からの検出について, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013年11月
- (9) 真野潤一, 西辻泰之, 菊池洋介, 福留真一, 遠藤繁, 林田拓也, 川上裕之, 栗本洋一, 野口秋雄, 近藤一成, 手島玲子, 高畠令王奈, 橘田和美: リアルタイム PCR を用いた食品加工度評価手法の開発, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013年11月
- (10) 中村公亮, 小林友子, 真野潤一, 野口秋雄, 橘田和美, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 漂白剤処理されたドライフルーツからの内在性遺伝子の検知について, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013年11月
- (11) 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 坂田こずえ, 小林友子, 福田のぞみ, 手島玲子, 最上(西巻)知子: 毒きのこのドラフトゲノムシーケンス, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013年11月
- (12) 菅野陽平, 坂田こずえ, 野口秋雄, 中村公亮, 小林友子, 福田のぞみ, 佐藤正幸, 最上知子, 手島玲子, 長澤栄史, 近藤一成: ツキヨタケおよび近縁種のPCR-RFLPを用いた迅速同定法の検討, 第106回日本食品衛生学会学術講演会, 沖縄, 2013年11月
- (13) 高畠令王奈, 大西真理, 布藤聡, 峯岸恭孝, 野口秋雄, 中村公亮, 近藤一成, 手島玲子, 真野潤一, 橘田和美: 遺伝子組換えイネ検出のためのイネ種共通内在性配列の検討, 2014年度 AOAC 日本セクション年次大会, 東京, 2014年6月
- (14) Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Kobayashi, T., Sakata, K., Noguchi, A., Nagoya, H., Takabatake, R., Kitta, K., Nishimaki-Mogami, T. 128th AOAC Annual Meeting & Exposition, Florida, 2014.9
- (15) 野口秋雄, 坂田こずえ, 真野潤一, 中村公亮, 高畠令王奈, 峯岸恭孝, 橘田

和美, 穂山浩, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 2010年度米国産不分別トウモロコシ試料における遺伝子組換えトウモロコシの混入率と系統分析, 第51回全国衛生化学技術協議会年会, 別府, 2014年11月

- (16) 野口秋雄: 遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法, 第51回全国衛生化学技術協議会年会, 別府, 2014年11月
- (17) 坂田こずえ, 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 小林友子, 福田のぞみ, 最上(西巻)知子: RFLP および Real-time PCR 法を用いたクサウラベニタケ複合種の分析法, 第51回全国衛生化学技術協議会年会, 別府, 2014年11月
- (18) 中村公亮, 近藤一成, 小林友子, 坂田こずえ, 野口秋雄, 名古屋博之, 真野潤一, 橘田和美, 最上(西巻)知子: 試験室間共同試験による成長ホルモン遺伝子組換えサケ検知法の妥当性確認, 第51回全国衛生化学技術協議会年会, 別府, 2014年11月
- (19) 野口秋雄, 中村公亮, 真野潤一, 高畠令王奈, 峯岸恭孝, 橘田和美, 手島玲子, 近藤一成, 最上(西巻)知子: 遺伝子組換えトウモロコシの新規スクリーニング検査法の開発, 第108回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢, 2014年12月
- (20) 中村公亮, 近藤一成, 小林友子, 野口秋雄, 高畠令王奈, 橘田和美, 最上(西巻)知子: *CaNCED* 配列を標的としたヒヨコマメ内在性遺伝子検知法, 第108回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢,

2014年12月

- (21) 真野潤一, 西辻泰之, 菊池洋介, 福留真一, 林田拓也, 川上裕之, 栗本洋一, 野口秋雄, 近藤一成, 最上(西巻)知子, 高畠令王奈, 橘田和美: 加工食品中の遺伝子組換え農産物混入率評価手法の検討, 第108回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢, 2014年12月
- (22) 坂田こずえ, 近藤一成, 中村公亮, 野口秋雄, 小林友子, 福田のぞみ, 最上(西巻)知子: Multiplex real-time PCR を用いたクサウラベニタケとその近縁種の同定, 第108回日本食品衛生学会学術講演会, 金沢, 2014年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H24-26 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
梶川揚申、五十君静信	乳酸菌組換えワクチン		新しい乳酸菌の機能と応用	シーエムシー出版	東京		in Press
神奈川芳之、赤羽学、今村知明	第1編 食品衛生管理と食の安全 第6章 フードディフェンスという概念	美研クリエイティブセンター	微生物コントロールによる食品衛生管理 食品の安全・危機管理から予測微生物の活用まで	株式会社エヌ・ティー・エス	東京	2013	91-108
今村知明 他	食品保健	医療情報科学研究所 編集	公衆衛生がみえる	株式会社メディックメディア	東京	2014	302-319
今村知明、神奈川芳行 他	【第2版】第5章 社会における対応の現状と対策 1. アレルギーの表示の現状と対策	中村丁次 他 編	【第2版】食物アレルギー Atopy 医学的基礎知識から代替食献立まで	第一出版	東京	2014	151-158
今村知明		今村知明	【第2版】食品の安全とはなにかー食品安全の基礎知識と食品防衛	日本生活協同組合連合会出版部	東京	2015	p. 1-237
今村知明 他		今村知明	食品防御の考え方とその進め方	日本食品衛生協会	東京	2015	p. 1-270

H24-26 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Sugiyama M, Takenaga F, Kitani Y, Yamamoto G, Okamoto H, Masaoka T, Araki K, Nagoya H, Mori T.	Homozygous and heterozygous GH transgenesis alters fatty acid composition and content in the liver of Amago salmon (<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>)	Biology Open	1(10)	1035-1042	2012
Kasama, K., Inoue, Y, Akiyama, H., Suzuki, T., Sakata, K., Nakamura, K., Ohshima, Y., Kojima, K., Kondo, K., Teshima, R.	Proficiency testing of unauthorized genetically modified rice using plasmid DNA test samples.	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	19	215-222	2012
Akiyama, H., Minegishi, Y., Makiyama, D., Mano, J., Sakata, K., Nakamura, K., Noguchi, A., Takabatake, R., Futo, S., Kondo, K., Kitta, K., Kato, Y., Teshima, R.	Quantification and Identification of Genetically Modified Maize Events in Non-Identity Preserved Maize Samples in 2009 using an Individual Kernel Detection System.	Food Hyg. Saf. Sci.	53	157-165	2012
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,	94	89-97	2012
Mano J., Harada, M., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Noritake, H., Iizuka, T., Nakamura, K., Akiyama, H., Teshima, R., Takabatake, R., Furui, S., Kitta, K.	Single-laboratory validation of comprehensive GMO detection method using real-time PCR array	Journal of AOAC International	95	508-516	2012
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(2)	307-315	2012
正岡 哲治・岡本 裕之・名古屋 博之・荒木・藤原・小林	遺伝子組換え生物の検査に向けたサケ科魚類発眼卵からのDNA抽出法の開発	DNA鑑定	4	19-28	2012
Toshio Iwaki, Lining Guo, John A. Ryals, Syuhei Yasuda, Takayoshi Shimazaki, Akira Kikuchi, Kazuo N. Watanabe, Mie Kasuga, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Takumi Ogawa, Daisaku Ohta	Metabolic Profiling of Transgenic Potato Tubers Expressing Arabidopsis Dehydration Response Element-Binding Protein 1A (DREB1A)	Journal of Agricultural and Food Chemistry	61	893-900	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitta, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H.	A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products.	Food Control	32	728-735	2013
Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitta, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R.	Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products.	Food Chemistry	136	895-901	2013
佐藤里絵、中村里香、手島玲子	ソバに含まれるIgE結合タンパク質の解析	FFI Journal	218(1)	36-42	2013
Alev, C., Nakano, M., Wu, Y., Horiuchi, H. and Sheng, G.	Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cell.	Methods Mol. Biol.	1074	151-173	2013
Toh H, Oshima K, Nakano A, Takahata M, Murakami M, Takaki T, Nishiyama H, Igimi S, Hattori M, Morita H.	Genomic adaptation of the Lactobacillus casei group.	PLOS one.	8(10)	e75073	2013
Kurokawa S, Nakamura R, Mejima M, Kozuka-Hata H, Kuroda M, Takeyama N, Oyama M, Satoh S, Kiyono H, Masumura T, Teshima R, Yuki Y	MucoRice-cholera Toxin B-subunit, a Rice-based oral cholera vaccine, down-regulates the expression of α -amylase-trypsin inhibitor-like protein family as major rice allergens.	J Proteome Res.	12	3372-3382	2013
Nakamura R., Teshima R.	Proteomics-based allergen analysis in plants.	J. Proteomics	93	40-49	2013
Nakamura, K., Minamitake, Y., Nakamura, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Takabatake, R., Kitta, K., Hashimoto, H., Kawakami, H., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H.	Development of PCR primers designed for sensitive detection of genetically modified potato DNA in processed foods.	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety,	20	161-169	2013
Nakamura, K., Sakagami, H., Asanuma-Date, K., Nagasawa, N., Nakahara, Y., Akiyama, H., Ogawa, H.	Immobilized glycosylated Fmoc-amino acid for SPR: comparative studies of lectin-binding to linear or biantennary diLacNAc structures.	Carbohydrate Research,	382	77-85	2013
Nakamura, K., Akiyama, H., Kawano, N., Kobayashi, T., Yoshimatsu, K., Mano, J., Kitta, K., Ohmori, K., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R.	Evaluation of real-time PCR detection methods for detecting rice products contaminated by rice genetically modified with a CpTI-KDEL-T-nos transgenic construct.	Food Chemistry	141	2618-2624	2013
Nakamura, K., Maeda, Y., Morimoto, K., Katayama, S., Kondo, K., Nakamura, S.	Functional expression of amyloidogenic human stefins A and B in Pichia pastoris using codon optimization.	Biotechnology and Applied Biochemistry	60	283-288	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Nakamura, K., Akiyama, H., Takahashi, Y., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Kasahara, M., Kitto, K., Nakazawa, H., Kondo, K., Teshima, R.	Application of a qualitative and quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting genetically modified papaya line 55-1 in papaya products.	Food Chemistry	136	895-901	2013
Takabatake, R., Noritake, H., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R., Mano, J., Kitto, K.	Comparison of DNA extraction methods for sweet corn and processed sweet corns.	Food Hygiene and Safety Science,	54	309-315	2013
Nakajima, O., Nakamura, K., Kondo, K., Akiyama, H., Teshima, R.	Method of detecting genetically modified chicken containing human erythropoietin gene.	Biological & Pharmaceutical Bulletin,	36	1454-1459	2013
Noguchi, A., Nakamura, K., Sakata, K., Kobayashi, T., Akiyama, H., Kondo, K., Ohmori, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitto, K., Teshima, R.	Interlaboratory validation study of an event-specific real-time polymerase chain reaction detection method for genetically modified 55-1 papaya.	Journal of AOAC International	96	1054-1058	2013
Ohmori, K., Nakamura, K., Kasahara, M., Takabatake, R., Kitto, K., Fujimaki, T., Kondo, K., Teshima, R., Akiyama, H.	A novel DNA extraction and purification method using an ion-exchange resin type kit for the detection of genetically modified papaya in processed papaya products.	Food Control	32	728-735	2013
Nakamura R., Teshima R.	Immunoproteomic analysis of food allergens.	Methods Mol Biol.	1072	725-735	2014
Kurokawa S, Kuroda M, Mejima M, Nakamura R, Takahashi Y, Sagara H, Takeyama N, Satoh S, Kiyono H, Teshima R, Masumura T, Yuki Y.	RNAi-mediated suppression of endogenous storage proteins leads to a change in localization of overexpressed cholera toxin B-subunit and the allergen protein RAG2 in rice seeds.	Plant Cell Rep.	33(1)	75-87	2014
Nakamura R, Nakamura R, Adachi R, Hachisuka A, Yamada A, Ozeki Y, Teshima R.	Differential analysis of protein expression in RNA-binding-protein transgenic and parental rice seeds cultivated under salt stress.	J Proteome Res.	13(2)	489-95	2014
Nakamura, K., Kondo, K., Kobayashi, T., Noguchi, A., Ohmori, K., Takabatake, R., Kitto, K., Akiyama, H., Teshima, R.,	Identification and detection method for genetically modified papaya resistant to papaya ringspot virus strains in Thailand.	Biological & Pharmaceutical Bulletin	37	1-5	2014
Sugiyama M, Takenaga F, Okamoto H, Masaoka T, Araki K, Nagoya H, Mori T	Fatty acid content in muscles of amago salmon homozygous or heterozygous for a growth hormone transgene.	AQUACULTURE	435	377-380	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Takabatake, R., Onishi, M., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Mano, J., Kitta, K	Comparison of the specificity, stability, and PCR efficiency of six rice endogenous sequences for detection analyses of genetically modified rice	Food Control	50	949-955	2015
Tanaka, H., Kitazaki, Y., Nakamura, K., Akiyama, H., Akashi, R.	Development of a simple detection method for genetically modified papaya PRSV-YK	Ikushugaku Kenkyu	16	158-161	2014
Kondo, K., Nakamura, K.	Scientific review on novel genome editing techniques	Food Hygiene and Safety Science	55	231-246	2014
Kitagawa, M., Nakamura, K., Kondo, K., Ubukata, S., Akiyama, H	Examination on the detection of common DNA sequence of genetically modified tomatoes in processed vegetable foods.	Food Hygiene and Safety Science	55	247-253	2014
Noguchi, A., Akiyama, H., Nakamura, K., Sakata, K., Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Futo, S., Kitta, K., Teshima, R., Kondo, K., Nishimaki-Mogami, T.	A novel trait-specific real-time PCR method enables quantification of genetically modified (GM) maize content in ground grain samples containing stacked GM maize.	European Food Research and Technology	240	413-422	2015
Minegishi, Y., Mano, J., Takabatake, R., Nakamura, K., Kondo, K., Kato, Y., Kitta, K., Akiyama, H	Development of pBT63, a positive control plasmid for qualitative detection of genetically modified rice.	Japanese Journal of Food Chemistry and Safety	21	48-56	2014
Mano, J., Hatano, S., Futo, S., Minegishi, Y., Ninomiya, K., Nakamura, K., Kondo, K., Teshima, R., Takabatake, R., Kitta, K	Development of direct real-time PCR system applicable to a wide range of food and agricultural products.	Food Hygiene and Safety Science	55	25-33	2014
Takabatake, R., Masubuchi, T., Futo, S., Minegishi, Y., Noguchi, A., Kondo, K., Teshima, R., Kurashima, T., Mano, J. and Kitta, K.	Development and Validation of an Event-Specific Quantitative PCR Method for Genetically Modified Maize MIR162	Food Hyg. Saf. Sci.	55	205-209	2014
堀内浩幸	ニワトリ胚性幹細胞研究と培養技術	動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術		375-379	2014