報 文

Multiplex PCR 法を用いた食品中の特定原材料の検出

(平成 19 年 3 月 27 日受理)

橋 本 博 之* 眞 壁 祐 樹 長谷川康行 佐二木順子 宮 本 文 夫

Detection of Allergenic Substances in Foods by a Multiplex PCR Method

Hiroyuki HASHIMOTO*, Yuhki MAKABE, Yasuyuki HASEGAWA,
Junko SAJIKI and Fumio MIYAMOTOChiba Prefectural Institute of Public Health: 666-2 Nitona-cho,
Chuo-ku, Chiba 260-8715, Japan; * Corresponding author

A multiplex PCR (M-PCR) method was developed for the detection of DNAs of plant and three allergenic substances (wheat, buckwheat, and peanut) in foods. Genomic DNAs were extracted from allergenic substances with a commercial ion-exchange type kit. Four primer pairs suitable for the specific detection of plant DNA were designed to establish a M-PCR method detecting simultaneously the specific DNAs of plant and allergenic substances. Our four designed primer pairs and the primer pair described in the Japanese official method were applied to the specific detection of plant DNA. A primer pair of Plant01-5' and Plant01-3' (amplicon size; 161 bp) was the most suitable for the specific detection of plant DNA. M-PCR was performed to detect the specific DNAs of allergenic substances using four primer pairs, a pair of Plant01-5' and Plant01-3', and three pairs for allergenic components described in the Japanese official method. The four specific PCR bands were simultaneously amplified from genomic DNAs of allergenic substances. The proposed method is simple, rapid and inexpensive.

(Received March 27, 2007)

Key words: 特定原材料 allergenic substances; ポリメラーゼ連鎖反応 polymerase chain reaction; マルチプレックス PCR 法 multiplex PCR method; 植物 DNA plant DNA; プライマー primer; 食品 food; 小麦 wheat; そば buckwheat; 落花生 peanut

緒 言

わが国における食物アレルギー患者数は乳児では 5~10%, 乳児以外では 1.3%程度という報告^{*1}があり, 年々増加傾向を示している. 平成 12~13 年度に厚生労働省の研究班により食物アレルギーの実態調査が行われ, アレルギー原因食品と年齢分布, 発症数などが明らかとなった^{*2}. この調査結果から, 発症数や重篤度を考慮し, 卵, 牛乳, 小麦, そば, および落花生の 5 品目が省令により特定原材料として定められ, すべての流通段階での表示が

義務付けられた^{*3}. 平成 14 年 11 月にはこの 5 品目についての検査法が通知され, 現在平成 18 年 3 月に最終改訂された検査法 (通知法)^{*4}により, 表示が適正か否かを判定するための検査が行われている.

通知法では, 2 種類の ELISA キットを用いてスクリーニング検査を実施し^{1), 2)}, どちらか一方が陽性 (10 µg/g 以上) となった場合に, 通知法記載の判断樹に基づいて確認検査を実施し, 最終結果を出すことになっている. スクリーニング検査で陽性となった検体は卵と乳についてはウエスタンブロット法³⁾, 小麦, そば, および落花生についてはポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法⁴⁾による確認試験を実施し, その試験結果と製造記録などにより最終判断を行っている.

PCR 法は抽出した DNA について, PCR 用鋳型としての妥当性確認のために植物 DNA 検出用プライマー対による PCR を実施し, 次に目的項目検出用プライマー対で 2 度目の PCR を行い, 特定原材料の存在を確認する. その

* 連絡先

千葉県衛生研究所: 〒260-8715 千葉市中央区仁戸名町 666-2

*1 厚生労働科学研究班, 「食物アレルギー診療の手引き」検討委員会「厚生労働科学研究班による食物アレルギー診療の手引き 2005」(2005).

*2 平成 12, 13 年度厚生科学研究費補助金 免疫・アレルギー等研究事業 厚生労働省研究報告書「食物アレルギーの実態及び誘発物質の解明に関する研究」海老澤元宏

*3 厚生労働省医薬局食品保健部長通知「食品衛生法施行規則及び乳及び乳製品の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令の施行について」平成 13 年 3 月 15 日, 食発第 79 号 (2001).

*4 厚生労働省医薬局食品安全部長通知「アレルギー物質を含む食品の検査方法について (一部改正)」平成 18 年 6 月 22 日, 食安発第 0622003 号 (2006).

ため、操作が煩雑になり、コストもかかるという問題点があった。

著者らは今回、1本の反応チューブで複数のPCRが実施できる Multiplex PCR (M-PCR) 法を用い、植物も含めた4項目の同時検出法について検討し、簡便、迅速、コスト性に優れた検出法を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料

特定原材料として市販の小麦粉、そば粉および千葉県産の生落花生を用いた。加工食品として五穀そうめん（小麦、そば表示）、よもぎそば（小麦、そば表示）、南部せんべい（小麦、落花生表示）、揚げあられ（落花生表示）、およびソーセージ（小麦表示）を用いた。

2. プライマー

通知法記載の植物DNA検出用プライマー対（CP03プライマー）、小麦DNA検出用プライマー対（Wtr01, Wtr10プライマー）、そばDNA検出用プライマー対（FAG19, FAG22プライマー）、落花生DNA検出用プライマー対（agg04, agg05プライマー）および著者らがミトコンドリアDNA (mtDNA) 遺伝子のCoxI遺伝子塩基配列情報（GenBank™ Accession No. X14409: 5265 bp）を基に設計した植物DNA検出用プライマー対（Plant01～04プライマー対）を用いた。各プライマーはグライナー・ジャパン社に合成委託した逆相カラム精製品を用いた。各プライマーの配列と増幅バンド長をTable 1に示す。

3. 試薬および試液

3.1 DNA抽出

DNAの抽出にはイオン交換樹脂タイプのキットである Genomic-Tip20/G（QIAGEN(株)製）を用いた。滅菌水は Millipore 社製 Milli-Q PLUS および Milli-RO5 PLUS で精製した超純水を 121℃で20分間オートクレーブ滅菌したものをを用いた。 α -アミラーゼ（SIGMA(株)製）は滅菌水により 1 mg/mL となるように調製し、ろ過滅菌したものをを用いた。ProteinaseK および RNaseA は QIAGEN (株)製を用い、イソプロピルアルコールおよびエタノールは和光純薬(株)製を用いた。70%エタノール溶液は滅菌水で調製した。DNAの溶出には滅菌水を用いた。

3.2 PCR反応およびM-PCR反応

PCR反応には Ampli Taq GOLD&10×PCR buffer II/MgCl₂ with dNTPs（アプライドバイオシステムズジャパン(株)製）を用い、M-PCR反応には Multiplex PCR KIT（QIAGEN(株)製）を用いた。DNAの希釈調製にはTE緩衝液（各最終濃度 10 mmol/L Tris/塩酸, 1 mmol/L EDTA (pH8.0)）を用いた。

PCRに用いた各プライマーはTE緩衝液で溶解し、25 μ mol/Lの濃度に希釈調製した。M-PCRに用いた混合プライマー溶液（100 μ mol/L、各プライマーの濃度 12.5 μ mol/L）は、Plant01-5′, Plant01-3′, Wtr01-5′, Wtr10-3′, FAG19-5′, FAG22-3′, agg04-5 および agg05-3′の8

種のプライマーの各々をTE緩衝液で溶解し、100 μ mol/Lの濃度となるように調製した後、各溶液を等量ずつ混合して調製した。PCR用各プライマー溶液およびM-PCR用混合プライマー溶液は-30℃で保存した。

3.3 電気泳動

15%ポリアクリルアミドゲル「e-パジェル」（アトー(株)製）、Tris-Glycine 緩衝液（最終濃度 25 mmol/L Tris, 192 mmol/L Glycine）を用いた。DNAマーカーはEZ Load Molecular Ruler 20 bp（バイオラッド(株)製）を用いた。PCR反応液、M-PCR反応液およびDNAマーカーのアプライには6×ローディング緩衝液（ニッポンジーン(株)製）を用いた。DNAの染色には0.5 μ g/mL になるように調製したエチジウムブロマイド（インビトロジェン(株)製）を用いた。

4. 装置および器具

ミルサー：IFM-700 G（イワタニ(株)製）、冷却遠心機：5922（クボタ(株)製）、恒温槽：ドライサーモバス ALB-221（イワキ(株)製）、マイクロチューブ遠心機：1-13（クボタ(株)製）、タッチミキサー：MT-31（ヤマト科学(株)社製）、分光光度計：BioSpec-mini（島津製作所(株)製）、サーマルサイクラー：PCR Express II（サーモエレクトロン(株)製）、電気泳動装置：AE-6500, AE-8450（アトー(株)製）、ゲル振とう機：ベリータンサーシェーカー（東和科学(株)製）、ゲルイメージ解析装置：FAS-III MODEL-TM2（東洋紡績(株)製）を用いた。

5. DNA溶液の調製

小麦粉、そば粉は均一化処理を行わず、市販品を調製試料とした。生落花生および加工食品はミルサーで粉碎し、調製試料とした。各調製試料2gについて、通知法に従い Genomic-Tip20/G を用いて抽出した。小麦、そば、および落花生の抽出DNA溶液を20 ng/ μ Lに希釈調製し、単一DNAもしくは各種等量混合DNA溶液を複数作製した。加工食品の抽出DNAはそれぞれ20 ng/ μ Lに希釈調製した。希釈調製したDNAは使用するまで-30℃に保存した。

6. PCRおよびM-PCR条件

6.1 PCR条件

PCR反応液は最終濃度が1×PCR緩衝液（アプライドバイオシステムズジャパン(株)製）、0.2 μ mol/L プライマー、0.2 mmol/L dNTP, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.625 U Taq polymerase となるように混合し、20 ng/ μ Lに希釈調製したDNA溶液を2.5 μ L加え、滅菌水により全量を25 μ Lとした。すべての試液を十分混合した後、酵素の活性化のために95℃に10分間保ち、95℃ 30秒間、60℃ 30秒間、72℃ 30秒間を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℃ 7分間最終伸張反応を行った。

6.2 M-PCR条件

M-PCR反応液は最終濃度が1×Multiplex PCR Master Mix（QIAGEN(株)製）、1.6 μ mol/L 混合プライ

Table 1. List of PCR primers

Common name	Organism (Target gene)	Accession No. (GenBank)	Primer name	Sequence5'-3'	Amplicon size
Tropical tree	<i>Corythophora alla</i> (chloroplast <i>TrnL-TrnF</i>)	AF076774	CP03-5'	CGGACGAGAAATAAAGATAGAGT	124 bp
			CP03-3'	TTTGTGGGATAGAGGGACTTGA	
Wheat	<i>Triticum aestivum</i> (triticin precursor)		Wtr01-5'	CATCACAAATCAACTTATGGTGG	141 bp
			Wtr10-3'	TTTGGGAGTTGAGACGGGTTA	
Buckwheat	<i>Fagopyrum esculentum</i> (major allergenic storage protein)		FAG19-5'	AACGCCATAACCCAGCCCCGATT	127 bp
			FAG22-3'	CCTCCTGCCTCCCATTCCTC	
Peanut	<i>Arachis hypogaea</i> (agglutinin precursor)	S42352	agg04-5'	CGAAGGAAACCCCGCAATAAAAT	95 bp
			agg05-3'	CGACGCTATTACCTTGTGAG	
Pea	<i>Pisum sativum</i> (mitochondrial cytochrome oxidase subunit I [<i>Cox I</i>])	X14409	Plant01-5'	AAACCCGGTCTTCGGGGTATC	161 bp
			Plant01-3'	TTCCAGTGGGGACAGCTATG	
			Plant02-5'	GCCTGGATCCGGTATCATTAAG	163 bp
			Plant02-3'	GGCACGGGTATCAACGTCTA	
			Plant03-5'	GGGAGGGTACCACATTGACAT	179 bp
			Plant03-3'	GCTTGGAAAGCAAGCTACCTGT	
			Plant04-5'	TTACCAGCCATTCTGGAGGAG	171 bp
			Plant04-3'	CTGTTACTGGAACGGACCACA	

Table 2. Spectrophotometric analysis of extracted DNAs^{a)}

Sample	Ratio		Concentration of DNA (ng/ μ L)
	260 nm/280 nm ^{b)}	260 nm/230 nm ^{c)}	
Wheat	1.95	2.45	1,200
Buckwheat	1.88	2.00	620
Peanut	1.84	2.32	92
Somen	1.90	2.36	1,860
Yomogi-soba	1.92	2.33	2,920
Nanbu-senbei	1.71	0.94	1,460
Age-arare	1.94	1.80	63
Sausage	1.91	2.45	496

a) DNA extractions were carried out using Genomic-Tip20/G kit (QIAGEN).

b) Criterion: 1.2–2.5

c) Criterion: ≥ 2.0

マーとなるように混合し、20 ng/ μ L の DNA 溶液を 2.5 μ L 加え、キット添付の RNase-free water により全量を 25 μ L とした。すべての試液を十分混合した後、酵素の活性化のために 95°C に 10 分間保った後、95°C 30 秒間、60°C 30 秒間、72°C 30 秒間を 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 7 分間最終伸張反応を行った。

7. 電気泳動条件

PCR 反応液の 7.5 μ L を 6 $\times$ ローディング緩衝液 1.5 μ L と混合後、15%ポリアクリルアミドゲルにより Tris/Glycine 緩衝液を泳動バッファーとし、ゲルプレート 1 枚あたり 20 mA の定電流により 70 分間電気泳動した。泳動終了後、0.5 μ g/mL エチジウムブロマイド溶液で 20 分間染色し、Tris/Glycine 緩衝液で 20 分間脱色した後、ゲルイメージ解析装置により UV (312 nm) を照射し、増幅バンドを確認した。

結果および考察

1. DNA 溶液中の DNA 濃度

DNA 抽出溶液中の DNA 濃度の測定結果を Table 2 に示した。

DNA 溶液の 230 nm、260 nm、280 nm および 320 nm の吸光度を測定し、320 nm の吸光度をバックグラウンド値として減算補正し、260 nm の吸光度から DNA 濃度を算出した。DNA の純度を確認するため、260 nm/280 nm の吸光度比からタンパク質の量を、260 nm/230 nm の吸光度比から多糖などの夾雑物の量を評価した。吸光度比は、260 nm/280 nm が 1.71–1.95、260 nm/230 nm が 0.94–2.45 の範囲であった。南部せんべい、および揚げあられでは 260 nm/230 nm の吸光度比が 0.94 および 1.80 であり、夾雑物の混入が若干認められたが、それ以外の試料では夾雑物は認められなかった。

2. プライマーの検討

2.1 植物 DNA 検出用プライマーの設計

通知法のプライマー対を用いた M-PCR では、増幅バンド長は植物で 124 bp、小麦で 141 bp、そばで 127 bp、

落花生では 95 bp であり、同時検出する場合、通常の電気泳動では植物とそばの 3 bp 差の分離が不可能である^{*5}。そこで、小麦、そば、および落花生の増幅バンドと分離可能な増幅バンド長として、160–180 bp の範囲で植物 DNA 検出用プライマー対を新たに設定した。

通知法の植物 DNA 検出用プライマー対は *Corythophora alba* の葉緑体 DNA (cpDNA) 上に位置する *TrnL* 遺伝子と *TrnF* 遺伝子間の非転写領域から設計されている^{3), 5)}。しかし、この両遺伝子は植物において必須な葉緑体の遺伝子であることから、種や属を超えて高度に保存されている領域であるが、両遺伝子間の非転写領域は変異が大きく、進化の過程で塩基配列の挿入や欠失などが多く見られている^{6)–9)}。

一方、mtDNA は塩基の保存性も比較的高く、ゲノム DNA や cpDNA と比べ、細胞あたりのコピー数が多いため DNA の抽出効率が高いと考えられる。そこで、mtDNA 遺伝子領域を用いて植物検出用のプライマー対を 4 対設計した。プライマーの設計には Primer3^{*6} を用い、設計条件としてプライマーのサイズは 20–22 bp、 T_m 値は 57–64°C、GC% は 50–60% とした。

2.2 各プライマー対における T_m 値の比較

通知法の植物、小麦、そば、および落花生検出用の各プライマー対および著者らが作製した植物 DNA 検出用プライマー対の T_m 値を Table 3 に示した。

PCR では最良の増幅効果を得るためにはプライマー対同士の T_m 値をほぼ同等に設定する必要がある。 T_m 値はプライマーの塩基組成や反応溶液の塩濃度、プライマー長やその使用濃度などから、Wallace 法¹⁰⁾、%G+C 法¹¹⁾、最近接塩基対法 (NN 法)^{12), 13)} などの計算式により計算されるが、計算式によって大きく異なる場合が多い。これらの計算式のうち、NN 法は塩基の組成や塩濃度以外に隣

*5 橋本博之、眞壁祐樹、永田知子、平成 17 年度地方衛生研究所全国協議会関東甲信静支部第 18 回理化学研究部会総会・研究会資料、p. 32–35 (2006)。

*6 [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi\(2007/03/27 16:00\)](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi(2007/03/27 16:00))

Table 3. T_m values of PCR primers

Primer name	T_m value		
	NN method ^{a)}	Wallace method ^{b)}	%G+C method ^{c)}
CP03-5'	56.6	62	53.9
CP03-3'	64.1	64	55.8
Wtr01-5'	60.1	62	53.9
Wtr10-3'	63.9	62	55.6
FAG19-5'	68.8	64	57.6
FAG22-3'	65.6	64	59.5
agg04-5'	67.1	64	55.8
agg05-3'	61.0	64	55.8
Plant01-5'	62.3	60	55.4
Plant01-3'	63.4	62	57.5
Plant02-5'	62.8	64	57.6
Plant02-3'	63.2	62	57.5
Plant03-5'	63.1	64	57.6
Plant03-3'	63.1	64	57.6
Plant04-5'	63.7	64	57.6
Plant04-3'	63.3	64	57.6

a) Nearest neighbor method

$$T_m = \frac{1,000\Delta H}{-10.8 + \Delta S + R \ln(C_t/4)} - 273.15 + 16.6 \log[Na^+]$$

b) Wallace method (for oligos < 18 mers)

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

c) %G+C method

$$T_m = 81.5 + 16.6 \log[Na^+] + 41(G/n + C/n) - 500/n$$

 ΔH (kcal/mol): sum of nearest-neighbor enthalpy changes ΔS (kcal/mol·K): sum of nearest-neighbor entropy changes R (cal/deg·mol): gas constant=1.987 C_t (mol/L): total concentration of oligonucleotide(calculate as 0.2 μ mol/L) $[Na^+]$ (mol/L): concentration of $[Na^+]$ (calculate as 50 mmol/L) n : length of oligonucleotide

A, T, G and C: number of base

接塩基間の熱力学エネルギー安定性を考慮しているため、現在最も信頼性が高い方法として評価されている。以上のことから、NN法による T_m 値の算出が最良と考えられた。

通知法の植物 DNA 検出用プライマー対である CP03 プライマー対での T_m 値の差は NN 法では 7.5℃であり、また、通知法の小麦、そば、および落花生検出用プライマー対の T_m 値の差は 3.2~6.1℃で、大きな差が見られた。一方、植物検出用に作製した Plant01~04 プライマー対は T_m 値の差が NN 法で最大 1.1℃と小さく、プライマー長、増幅バンド長においても理論上最適なプライマー対であると考えられた。

2.3 植物 DNA 検出用プライマー対の比較

小麦、そば、および落花生の抽出 DNA を鋳型とし、通知法の植物 DNA 検出用プライマー対および作製した Plant01~04 プライマー対を用いて PCR を行い、各プライマー対の増幅を比較した。各プライマー対の PCR にお

Table 4. Detection of PCR products amplified from extracted DNAs using 5 kinds of primer-pairs

Primer name	Wheat	Buckwheat	Peanut
CP03-5'	Tr ^{a)}	+ ^{b)}	+
CP03-3'			
Plant01-5'	+	+	+
Plant01-3'			
Plant02-5'	+	+	+
Plant02-3'			
Plant03-5'	+	+	— ^{c)}
Plant03-3'			
Plant04-5'	+	+	+
Plant04-3'			

a) Tr: trace band

b) +: positive

c) -: negative

Fig. 1. Effects of annealing temperature (54.1–68.8℃) on the sensitivity and specificity of a M-PCR method using 4 primer pairs

M-PCR was performed using 4 primer pairs (Plant01-5' and Plant01-3', Wtr01-5' and Wtr10-3', FAG19-5' and FAG22-3' and agg04-5' and agg05-3') in one tube with M-PCR kit (QIAGEN). PCR products were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis.

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, 54.1℃; 2, 54.9℃; 3, 56.3℃; 4, 58.0℃; 5, 60.0℃; 6, 61.9℃; 7, 63.9℃; 8, 66.2℃; 9, 67.6℃; 10, 68.3℃; 11, 68.8℃.

ける増幅結果を Table 4 に示す。

通知法の植物 DNA 検出用プライマー対、Plant01、Plant02 および Plant04 プライマー対では、3 種の特定原材料由来 DNA から増幅産物が得られたが、Plant03 プライマー対では、落花生 DNA からは増幅産物が得られなかった。また、増幅バンドの濃淡を比較したところ、Plant01 プライマー対を用いた増幅が 3 種の特定原材料由来 DNA において最も良好であった。

以上の結果より、M-PCR 法の植物 DNA 検出用プライマー対は、3 種の特定原材料由来 DNA で増幅が可能であり、増幅が良好であった Plant01 プライマー対とした。

3. M-PCR 法のアニーリング温度の検討

M-PCR 法の至適アニーリング温度を決定するために、小麦、そば、および落花生の混合 DNA 溶液を用いて、M-PCR 用混合プライマー溶液によりグラジェント

Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoresis of PCR products amplified from allergenic substances by a M-PCR method

A: Extracted DNA

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, wheat; 2, buckwheat; 3, peanut; 4, wheat and buckwheat; 5, wheat and peanut; 6, buckwheat and peanut; 7, wheat, buckwheat and peanut; 8, negative control (without DNA).

B: Extracted DNA from processed foods

Lanes: M, 20 bp ladder size standard; 1, Somen (containing wheat and buckwheat); 2, Yomogi-soba (containing wheat and buckwheat); 3, Nanbu-senbei (containing wheat and peanut); 4, Age-arare (containing peanut); 5, Sausage (containing wheat).

M-PCR を行い、各プライマー対の特異性および感度に対するアニーリング温度の影響を調べた。Fig. 1 にその結果を示す。

54.1℃および54.9℃ではアニーリング温度が理論上の値より低いため、プライマーのミスプライミングが生じ、300 bp 付近に非特異バンドが検出されたが、56.3～63.9℃の範囲では予測される長さのバンドが4本検出された。以上の結果から、PCRの増幅効率とプライマーのミスプライミングによる非特異反応の抑制を考慮し、M-PCR法におけるアニーリング温度は60℃に設定した。

4. M-PCR 法による特定原材料由来 DNA の検出

M-PCR 用混合プライマー溶液を用いて、通知法の PCR 条件により M-PCR を行った。鋳型 DNA として各種混合 DNA 溶液を用いた。また、加工食品から抽出した DNA を用いて、加工食品への適用性を確認した。各種混合 DNA 溶液の結果を Fig. 2A に、加工食品の結果を Fig. 2B に示す。

各種混合 DNA 溶液では、予測されるバンド長の増幅バンドが鋳型となる DNA の数により2～4本検出された。また、加工食品から抽出した DNA を用いた検討では、いずれの DNA においても食品に記載された表示のとおり、2～3本の増幅バンドが良好に検出され、加工食品への適用は十分可能と考えられた。

M-PCR 法では増幅バンド数が増えることから、特異性や増幅効率の向上のため、PCR 試薬、プライマー対の設計、鋳型 DNA 量、dNTP 量、プライマー濃度および PCR サイクル条件などについて今後検討が必要と思われる。

ま と め

M-PCR 法を用いた特定原材料の同時検出法を確立した。新たに mtDNA 遺伝子から M-PCR 法に適した植物 DNA 検出用プライマー対を4対設計した。小麦、そば、および落花生の原材料について適用性を検討した結果、Plant01 プライマー対が植物 DNA 検出用プライマー対として最も良好であった。

Plant01 プライマー対および小麦、そば、落花生プライマー対を用いて通知法の PCR 条件により M-PCR を行った結果、予測されるバンド長の増幅バンドが鋳型 DNA 種の数により2～4本検出された。また、加工食品を用いた検討により、加工食品への適用が可能であることが確認された。

本検出法は植物、小麦、そば、落花生の同時検出が可能であり、簡便、迅速、コスト性に優れた特定原材料の検出法と考えられる。

なお、本研究の要旨は日本食品衛生学会第92回学術講演会（2006年10月、愛知）において発表した。

文 献

- 1) Takahata, Y., Detection methods for allergic substance in food by enzyme linked immunosorbent assay (1). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J275-J277 (2002).
- 2) Mamegoshi, S., Detection methods for allergic substance in food by enzyme linked immunosorbent assay (2). Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J277-J279 (2002).
- 3) Akiyama, H., Notified detection method for allergic substances. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **44**, J168-J177 (2003).
- 4) Futo, S., PCR testing for food allergens in food products. Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan), **43**, J280-J282 (2002).
- 5) Watanabe, T., Akiyama, H., Maleki, S., Yamakawa, H., Iijima, K., Yamazaki, F., Matsumoto, T., Futo, S., Arakawa, F., Watai, M., Maitani, T., A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction. J. Food Biochem., **30**, 215-233 (2006).
- 6) Palmer, J., Jansen, R., Michaels, H., Chase, M., Manhart, J., Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. Ann. Missouri Bot. Garden, **75**, 1180-1206 (1988).
- 7) Clegg, M. T., Learn G. H., Golenberg, E. H., "Molecular evolution of chloroplast DNA. Chapter 7 In Evolution at the Molecular Level (eds. R. K. Selander, A. G.

- Clark, T. S. Whittam)" Sunderland, Sinauer Associates, 1991, p. 135-149
- 8) Ogiwara, Y., Terachi, T., Sasakuma, T., Structural analysis of length mutations in a hot-spot region of wheat chloroplast DNAs. *Curr. Genet.*, **22**, 251-258 (1992).
- 9) Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., Universal primer for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molec. Biol.*, **17**, 1105-1109 (1991).
- 10) Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T., Itakura, K., Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to $\phi\chi$ 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3543-3557 (1979).
- 11) Meinkoth, J., Wahl, G., Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, **138**, 267-284 (1984).
- 12) Rychlik, W., Spencer, W. J., Rhoads, R. E., Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6409-6412 (1990).
- 13) Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H., Marky, L. A., Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3746-3750 (1986).