

# 食品原材料検出のためのPCRプライマー開発に関する基礎的研究

誌名	日本食品保蔵科学会誌
ISSN	13441213
著者名	内野, 昌孝
発行元	日本食品保蔵科学会
巻/号	36巻2号
掲載ページ	p. 89-94
発行年月	2010年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 食品原材料検出のためのPCRプライマー開発に関する 基礎的研究

平成21年度日本食品保蔵科学会奨励賞

内野 昌孝\*§

\* 東京農業大学応用生物科学部生物応用化学科

## Development of PCR Primer for Detection of Food Material

UCHINO Masataka\*§

\* Department of Applied Biology and Chemistry, Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture,  
1-1-1, Sakuragaoka, Setagaya-ku, Tokyo 156-8502

**Key words** : food detection, food safety, PCR, primer

食品検出, 食品安全, 遺伝子増幅装置, プライマー

### はじめに

アレルギーとは本来人間がもつ防御反応が異物などに対して過敏に反応し、体に不都合な症状を引き起こす現象である。このアレルギーは免疫学的に4つのタイプに分類されるが、食物アレルギーは症状が短時間で現れる即時型アレルギー（I型）である。一般的な症状はかゆみや湿疹などの皮膚症状であるが、その他、口症状や眼症状、呼吸症状、消化器症状などがあり、希にアナフラキシーショックなど生命にかかわる重篤な症状もみられる。現在、様々なアレルギー原因物質の報告があり、発症数は年々増加している。

日本の食物アレルギーの発症状況は年齢別では乳児が約10%、3歳児が約5%、小学生～高校生では約1.5～2.5%である<sup>1),2)</sup>。また、小児の場合には成長とともに耐性を獲得するケースが多いが、成人ではその可能性は低い<sup>3)</sup>。乳児の比率が高いのは消化器官が未熟なため、アレルギータンパク質の消化が不十分となる場合があり、その結果、症状を引き起こす。治療法に関する研究は多数行われているものの、根本的な治療法はないため、該当食物の摂取を避けることが現実的な対処法になっている。

ところで、世界的には食物アレルギーに対する対応は以下のようになっている。平成11年にFAO/WHO合同食品規格委員会（CODEX委員会）総会で、アレルギー物質として知られている8種の原材料を含む食品においては、それを含まない旨を表示することで合意され、今後加盟国において各国の制度に適した具体的な表示方法を検

討することが求められることになった<sup>4)</sup>。その品目は①グルテンを含む穀類及びその製品、②甲殻類及びその製品、③卵及び卵製品、④魚及び魚製品、⑤ピーナッツ、大豆及びその製品、⑥乳・乳製品（ラクトースを含むもの）、⑦木の実及びその製品、⑧亜硫酸塩を10mg/kg以上含む食品、である。

日本では、食物アレルギーの表示は食品衛生法で定められている。平成13年に同法律が改正され、乳、小麦、そば、卵、落花生の5品目の表示を義務化し、さらに、あわび、イカ、いくら、エビ、オレンジ、カニ、キウイフルーツ、牛肉、くるみ、さけ、さば、ゼラチン、大豆、鶏肉、豚肉、まつたけ、もも、やまいも、りんごの19品目を推奨表示対象とした。さらに、平成16年には推奨表示にバナナが追加され、また、平成20年にエビ、カニが推奨表示から義務表示に変更された。

食品衛生法の改正におけるアレルギー食材の表示の義務化に伴い、対象食品の公定検査法が公表され、現在、その方法に基づき検査されている<sup>5)</sup>。具体的にはスクリーニング検査としてELISA法を行い、次いで確認検査として乳、卵はウェスタンブロット法で、エビ、カニ、小麦、そば、落花生はPCR法を行う。各方法の詳細は次に述べる。

### アレルギー食材検出法について

#### 1. 抗原抗体法（ELISA法、ウェスタンブロット法）

抗原抗体法の基礎である抗原抗体反応は元々生物において生体内の防御機構の一つとして機能しているもので、

\* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

§ 連絡先 E-mail:muchino@nodai.ac.jp

体外から進入した異物に対して反応し、無毒化を促している。実際は抗体タンパク質が異物を認識し、以後の同異物の進入に対して特異的に結合し、以後の生体反応を阻害する。抗原抗体法はこの原理を応用した方法であり、あらかじめ目的対象物を抗原としてラットなどを用いて抗体を作成し、それを回収、精製したものを利用する。目的対象物が含まれた材料と抗体を反応させると、互いに会合を行う。その後、抗体を特異的に発色させ、その発色を元に検出、定量が可能となる。ちなみに、この反応は特異性がかなり高いため、精製度の低いサンプルの高感度検出などに優れている。食品衛生法において、表示義務化された食品原材料の検出法として第一次スクリーニングとして、この方法を利用したELISA法、さらに、乳、卵では二次スクリーニング法としてウェスタンブロット法が利用されている。

表示義務のある食材のアレルギー物質はタンパク質であり、抗原抗体法がすべて適用できる。また、この方法はほかの検出技術に比べ、比較的高感度で短時間で検出できるのが特徴である。しかし、系統的に近縁な関係の生物（食材）に対して擬陽性を示したり、食品によっては擬陰性を示す場合もある。また、ポリフェノールや多糖など反応阻害剤による反応の低下も考慮して試験を進めなければならない。

## 2. PCR法

特定の遺伝子の増幅の有無を利用した試験である。まず、この反応の原理を説明すると、以下のようになる（図1）。あらかじめ目的の遺伝子配列の両末端に相補的なオリゴDNA（プライマー）を作成する（その際、この配列は20~30程度のヌクレオチド長であり、ほかの領域にはない配列部分を選択する）。鋳型となる目的遺伝子を含むDNAにこれを混合し、その他の材料としてDNAポリメラーゼ、dNTP（ATP, GTP, CTP, TTP）

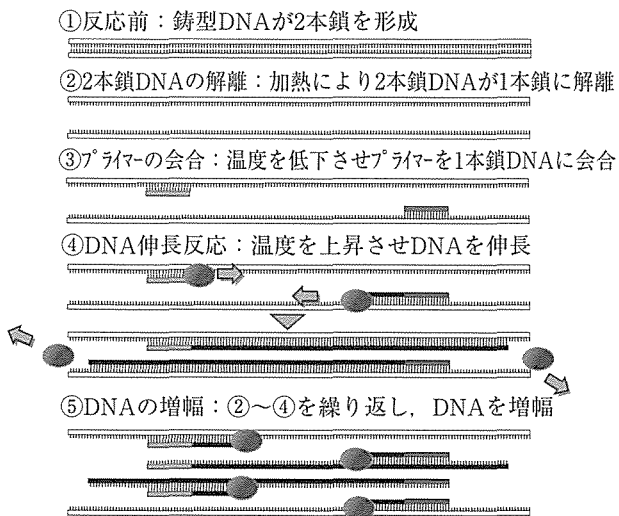


図1 PCR増幅の原理

を混合した溶液を調製する。①この際、DNAは生物体内と同様、二本鎖を形成している。②この混合液の温度を上げると、鋳型DNAの二本鎖DNAの水素結合が切断され一本鎖DNAに解離する。③この状態で温度を下げると鋳型DNAが元に戻ろうとするが、その前に低分子であり、量的にも多いプライマーが会合し、部分的な二本鎖DNAを形成する。④次に温度を少し上げると、DNAポリメラーゼがこの二本鎖DNAを認識し、ここをスタート地点として伸長反応を始める。⑤この三段階の温度変化（②~④）を繰り返していくと、プライマーで挟まれた領域が増幅し、その増幅は2nで進むため、20~30サイクル程度の反応で、実に元の100万倍を越えた量に到達する。ちなみに、このように増幅性が優れるのは、伸長反応により生産された合成DNAは、さらに新たな鋳型となるためである。

ではこれを利用することで、なぜ食品の原材料判別ができるかという点、プライマーにカラクリがある。このプライマーの配列に目的生物のみがもつ配列を利用することで、増幅性に生物特異性がからみ、判断が可能となる。それゆえ、このプライマーは重要であり、その設計には少々の技術が必要となる。

## 3. PCR法の実験の実際と注意点

PCR法では食品原材料のDNA（鋳型DNA）が反応に必須であるが、これの取得には注意が必要な場合がある。試料として原材料を使う場合では、主要夾雑物としてデンプンやタンパク質、脂質が考えられ、それぞれの量や種類に適切な抽出・精製法の選択が必要になる。前処理として、デンプンが多い場合にはアミラーゼを用いた分解処理、脂質が多い場合にはヘキサンなどによる脱脂処理、タンパク質ではプロテイナーゼKなどのタンパク分解酵素処理などが効果的だが、タンパク質の場合は精製過程で容易に除去できるので、それ程注意する必要性は高くない。

公定法では抽出、精製にはシリカゲル膜タイプキット法やイオン交換樹脂タイプキット法が示され、これらで十分な状態のDNAが得られない場合はCTAB法を薦めている。もちろん、これらも前処理として各種酵素分解などを設けている。ただし、筆者の経験では食品によってはもう一手間加えることで検出が容易になる場合があった。これはほかの原材料や加工工程による影響が大きい。油脂含量が多い場合はヘキサンなど有機溶媒を用いた脱脂が効果的であり、一部の食品については磁器ビーズを利用したほうが精製度の高いDNA溶液の調製が可能であった。

DNAの濃度や精製度を確認するには通常は紫外部吸収を利用して行う。DNA自身は260nm付近に極大吸収波長をもち、260nmの吸光度が1.0のとき、その溶液内のDNA濃度は約50ug/mlとされる<sup>9)</sup>。また、280nmはタンパク質の吸収波長、230nmは多糖などの吸収波長とされ、経験的にOD 260nmに対し、OD 280nmまたはOD 230nm

で割った値が1.5を超えていれば、PCRは問題なく反応している。ただし、PCR反応はこれらの吸光度に反映されない物質によっても阻害され、結果として偽陰性を導き出す場合があり、注意が必要である。そのため、公定法では動物DNA検出用プライマーと植物DNA検出用プライマーが用意され、それによる調製DNAのPCR増幅性の確認を行い、そのうえで本試験を行うことが記載されている。筆者もこの部分は検討を行っている。コピー数が多いと検出感度の向上をねらいやすいため、いくつかのrRNA遺伝子をターゲットに比較試験を行い、18 S rRNA遺伝子領域を使用したPCR増幅性確認用のプライマーセットがよいと判断した(図2)<sup>9)</sup>。なお、本プライマーはカビに汚染された食品を試料とした場合に、カビを検出してしまいうため、現在では植物のみ増幅する*rbcL*遺伝子をターゲットとしたプライマーを利用している(ただし、植物を対象とする場合)。

報告されている食品原材料判別用プライマーセットをみると様々な遺伝子領域が利用されている。呼吸に関与し、ミトコンドリアに存在するチトクロームbやタンパク質合成器官のリボソームの一部であるリボソームRNA群やこれらの遺伝子をつなげているITS(Intergeneric spacer)領域など生物の系統解析に利用されやすい遺伝子が利用されやすい。それ以外では、アレルギータンパク質をコードする遺伝子やDNA塩基配列情報登録機関(DDBJ/GenBanK/EMBL)に情報が蓄積されている遺伝子が利用されている。私たちは現在ITS領域を中心にプライマーセットを構築している。これはITS領域が①すべての真核生物が保持し、②近縁植物との系統距離(塩基置換状況)が食品原材料植物間

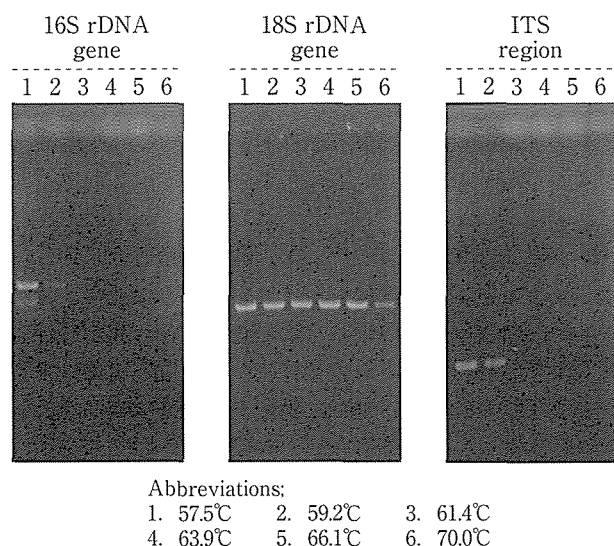
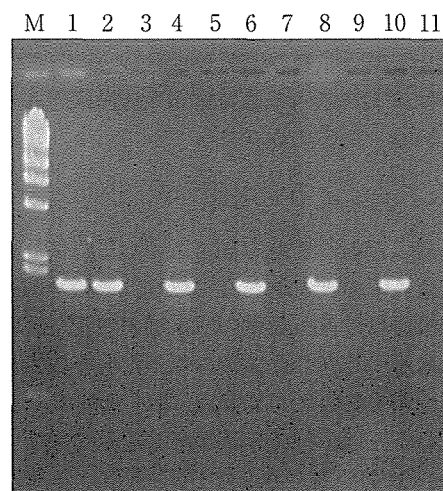


図2 調整DNAのPCR増幅性を確認するための対象遺伝子領域の選定

系統解析に利用され、すべての真核生物が保持し、コピー数も多いので検出しやすい3種類の遺伝子領域の増幅性試験の結果。アニーリング温度を上げ、反応条件が厳しい状態でも増幅を維持するかを確認。結果、18 S rDNAが最適と判断した。

の系統距離に比較的合致し、③コピー数が多いので、検出感度向上が期待され、④DNA塩基配列情報が多く、⑤該当領域が比較的短い、などの理由からである<sup>8)</sup>。①は対象食品原材料ごとに遺伝子を変えていると、複数のプライマー構築時に作業が煩雑になりやすく、追試もしにくくなる可能性があるためである。②は食品という観点から並べると生物系統的に近い植物間の系統的な隔たりは科や属レベルでの隔たりが多く、ITS領域はちょうどその部分をとらえている。③は生命に必須なハウスキーピング遺伝子の一つだが、その中でもタンパク合成に関与する遺伝子領域に位置するため、1細胞あたり約1,000~数千存在するため、数が多い分、PCRの初期反応での増幅性がよくなり、結果、検出感度の向上が期待できる。④は生物系統解析や同定に利用されるため、研究報告数、遺伝子登録数が多く、対象原材料のDNA塩基配列をみずから取得しないで済むという作業効率の向上が期待できる。⑤は該当領域が数百で、この長さで十分判別に利用できることである。DNAは加工過程などにおける加熱条件が厳しとポリヌクレオチド鎖が切断され、低分子化が起こることが知られる(図3)<sup>9)</sup>。そのため、増幅する領域はできる限り短いほうが実用性の向上が期待できる。

この遺伝子領域を中心にプライマーを構築しており、実際には、目的食材および生物的に近縁な食材植物のITS領域をDNA塩基配列情報登録機関から取得、Clustal WやBioEditなどのソフトウェアを用いてアライメント



Abbreviations:  
 1. 100°C, 60min    2. 130°C, 20min    3. 130°C, 25min  
 4. 150°C, 15min    5. 150°C, 20min    6. 170°C, 10min  
 7. 170°C, 15min    8. 180°C, 10min    9. 180°C, 15min  
 10. 200°C, 5min    11. 200°C, 10min  
 M.  $\lambda$ -*Hin* dIII(M. W. Maker)

図3 異なる加熱条件で処理した小麦粉由来DNAのPCR増幅性試験

小麦粉を温度や時間を変えて加熱し、増幅性を確認した。結果、加工過程での加熱がおおよそ130°Cを超えるとPCR増幅性が低下していくことが明らかとなった。ただし、ほかの結果で加工食品中の成分によりその状況が変わることも示している。

表1 プライマー設計時に注意すべき事項

特異的な配列を利用する
長さは20~30塩基で、フォワードとリバースの長さをそろえる
近縁生物とのギャップ部位はできるだけ3'末端側にもってくる
3'末端側にGCが3つ以上連続しないようにする
3'末端はGかCにすることが望ましい
単純リピート配列は利用しない
フォワードとリバースがダイマーをつくらないようにする
自己相補的な結合をつくりやすい配列を避ける
ヘアピン構造をつくらないようにする
GC含量は30~60%程度とする
Tm値は50℃以上になるように設定する
フォワードとリバースのTm値の差は5℃以内に収まるようにする

(整列)を行う<sup>10),11)</sup>。その後、表1に示した条件を満たす配列を探し、プライマーを構築する。この探索作業は目視でも可能だが、著者らはAmpliconやFast PCRなどのソフトを利用して候補を算出し<sup>12),13)</sup>、選択する方法をとっている。

さて、目的の食品原材料が含まれているか否かの判断は通常、PCRで目的遺伝子領域を増幅後、電気泳動し、染色を行い、得られたバンドの有無で行う。電気泳動するのはPCR増幅産物と未増幅物などを分離し、さらに、予想された分子量か否かで非特異的増幅でないかを確認するためである。なお、DNAは無色透明のため、エチジウムブロマイドや市販の染色薬にて染色し、紫外線にて可視化して増幅産物の確認を行う。

実際には加工食品への適用範囲、検出限界、バリデーションを行い、完成する。

### PCR法による食品原材料判別の現状

すでに述べたように日本に限らず、食物アレルギーの表示制度は各国で義務化されている。そのため、表示義務食材を中心に様々な食材の検出法が報告されている。一例ではあるが、表2にアレルギー食材をPCR法で検出する論文情報を集めたので参考にして頂きたい。

利用される際は、特に以下の点が重要なので気をつけて欲しい。①加工食品からのDNA抽出は基本的に論文に記載されているものと同じ方法で行う。これは反応を阻害する成分の一部が精製過程で取り除きにくい方法があるため、適切な手法を適用した法が結果の信頼性が上がる。②PCRに使用するDNAポリメラーゼは基本的に論文記載の製品を利用するのが望ましい。これは調製したDNAの精製度が低い場合や加工食品の加熱工程が条件的に厳しい条件などの場合、PCRがうまく進みにくい。その際、DNAポリメラーゼの種類により増幅性が異なる場合があるので、様々な加工食品を対象とする場合には特に気をつけて頂きたい。③PCR条件は変えな

表2 PCR法による食品原材料判別を記載した論文

品目	著者	報告年	文献番号
小麦	ALLMAN <i>et al.</i>	1993	14
	ALARY <i>et al.</i>	2002	15
	JAMES <i>et al.</i>	2004	16
	YAMAKAWA <i>et al.</i>	2007	17
	内野昌孝ら	2007	18
	橋本博之ら	2008	19
	DEBNATH <i>et al.</i>	2009	20
	HIRAO <i>et al.</i>	2009	21
	ソバ	HIRAO <i>et al.</i>	2005, 2006
YAMAKAWA <i>et al.</i>		2008	24
落花生	HIRD <i>et al.</i>	2003	25
	STEPHAN <i>et al.</i>	2004	26
	JAMES <i>et al.</i>	2004	16
	WATANABE <i>et al.</i>	2006	27
	SCARAVELLI <i>et al.</i>	2008	28
	HIRANO <i>et al.</i>	2009	21
	仮性アレルゲン他		
キウイフルーツ	TAGUCHI <i>et al.</i>	2007	29
ウォルナット	YANO <i>et al.</i>	2007	30
カシューナッツ	BRZENZINSKI <i>et al.</i>	2007	31
トビウオ	NAGASE <i>et al.</i>	2009	32
タラ	QUINTEIRO <i>et al.</i>	2001	33
複数魚種	PEPE <i>et al.</i>	2007	34
食肉動物種	HERMAN <i>et al.</i>	2001	35
食肉動物種	OBROVSKA <i>et al.</i>	2004	36
食肉動物種	GIRISH <i>et al.</i>	2004	37
穀類	中村澄子ら	2004	38
アロエ	塩田寛子	2003	39

いで反応させたほうがよい。アニーリング温度を下降させたり、サイクル数を増やしたりすることで、何かの理由で増幅が確認されなかったものも増幅したり、バンド濃度を高くすることができる。細かい部分まで広げるとほかにも考慮すべき部分もあるが、本説ではここまでとする。

### おわりに

今後はアレルギー食材の表示推奨品目の増加や仮性アレルゲンを含む食材の考慮などが考えられ、これに伴いPCR法を含む、より多くの食材の検出技術の開発は必須となると考えられる。また、現在主流の検出法は目的食材の有無のみの判断法であり、内容物が予想できないものには適用しにくい。そのため、未知の食材であっても検出する技術の開発は必要であり、筆者らもその開発を進めている。

今回紹介した手法は世界各国で開発が進められているが、食材の輸入大国である日本がその発信源となり、食の安全・安心に関心の高い国であることを示せればと考える。

最後に研究の遂行ならびに本総説を作成するにあたり

ご協力いただいた関係各所の方々に御礼申し上げます。

### 文 献

- 1) EBISAWA, M. and SUGIZAKI, C.: Prevalence Of Pediatric Allergic Diseases In The First 5 Years Of Life, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **121**, S 237, 912 (2008)
- 2) 今井孝成・板橋家頭夫: 学校給食における食物アレルギーの実態, *日本小児科学会雑誌*, **109**, 1117~1122 (2005)
- 3) 文部科学省アレルギー疾患に関する調査研究委員会: アレルギー疾患に関する調査研究報告書 (2007)
- 4) CODEX STAN 1-1985: 包装食品の表示に関するコーデックス一般規格 ([http://www.maff.go.jp/j/syouan/kijun/codex/standard\\_list/pdf/codex\\_stan1.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/kijun/codex/standard_list/pdf/codex_stan1.pdf))
- 5) アレルギー物質を含む食品の検査法について (食安発第06220003号)
- 6) WEISSBACH, A. and WEISSBACK, H.: *Methods for Plant Molecular Biology* (Academic Press, NY) (1988)
- 7) 内野昌孝・野口智弘・高野克己: 抽出DNAのPCR (Polymerized Chain Reaction) 増幅性の確認, *日食保蔵誌*, **29**, 335~338 (2003)
- 8) ALVAREZ, I. and WENDEL, J. F.: Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **29**, 417~434 (2003)
- 9) UCHINO, M., NOGUCHI, T. and TAKANO, K.: Thermostability of DNA from wheat in heated food products, *Food Pres. Sci.*, **30**, 195~198 (2004)
- 10) THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAC, F., JEANMOUGIN, F. and HIGGINS, D. G.: The Clustal X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4876~4882 (1997)
- 11) HALL, T. A.: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, 95~98 (1999)
- 12) JARMAN, S. N.: Amplicon: software for designing PCR primers on aligned DNA sequences. *Bioinformatics*, **20**, 1644~1645 (2004)
- 13) KALENDER, R., LEE, D. and SCHULMAN, A. H.: Fast PCR Software for PCR primer and probe design and repeat search genes, *Genomes and Genomics*, **3**, 1~14 (2009)
- 14) ALLMANN, M., CANDRIAN, U., HOFLEIN, C. and LUTHY, J.: Polymerase Chain-Reaction (PCR)-A possible alternative to immunochemical method assuring safety and quality of food- Detection of wheat contamination in non-wheat food-products, *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **196**, 248~51 (1993)
- 15) ALARY, R., SERIN, A., DUVIAU, M. P., JOUDRIER, P. and GAUTIER, M. F.: Quantification of common wheat adulteration of durum wheat pasta using real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR), *Cereal Chem.*, **79**, 553~8 (2002)
- 16) JAMES, D. and SCHMIDT, A. M.: Use of an intron region of a chloroplast tRNA gene (trnL) as a target for PCR identification of specific food crops including sources of potential allergens, *Food Res. Int.*, **37**, 395~402 (2004)
- 17) YAMAKAWA, H., AKIYAMA, H., ENDO, Y., MIYATAKE, K., SAKATA, K., SAKAI, S., TOYODA, M. and URISU, A.: Specific detection of wheat residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci. Biotech., Biochem.*, **71**, 2561~4 (2007)
- 18) 内野昌孝・増渕菜美子・黒澤有希子・高野克己: 小麦検出用プライマーセットの開発, *日食科工誌*, **54**, 82~86 (2007)
- 19) 橋本博之・眞壁祐樹・長谷川康行・佐二木順子・宮本文夫: ネステッドPCR法を用いた食品中の特定原材料 (小麦) の検出, *食衛誌*, **49**, 23~30 (2008)
- 20) DEBNATH, J., MARTIN, A. and GOWDA, L. R.: A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling, *Food Res. Int.*, **42**, 782~787 (2009)
- 21) HIRANO, T., WATANABE, S., TEMMEI, Y., HIRAMOTO, M. and KATO, H.: Qualitative Polymerase Chain Reaction Methods for Detecting Major Food Allergens (Peanut, Soybean, and Wheat) by Using Internal Transcribed Spacer Region, *J. Aoac. Int.*, **92**, 1464~1471 (2009)
- 22) HIRAO, T., IMAI, S., SAWADA, H., SHIOMI, N., HACHIMURA, S. and KATO, H.: PCR method for detecting trace amounts of buckwheat (*Fagopyrum* spp.) in food, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**, 724~31 (2005)
- 23) HIRANO, T., HIRAMOTO, M., IMAI, S. and KATO, H.: A novel PCR method for quantification of buckwheat by using a unique internal standard material, *J. Food Protect.*, **69**, 2478~86 (2006)
- 24) YAMAKAWA, H., AKIYAMA, H., ENDO, Y., MIYATAKE, K., SAKAI, S., KONDO, K., TOYODA, M., URISU, A. and TESHIMA, R.: Specific detection of buckwheat residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 2228~31 (2008)

- 25) HIRD, H., LLOYD, J., GOODIER, R., BROWN, J. and REECE, P.: Detection of peanut using real-time polymerase chain reaction, *Euro. Food Res. Tech.*, **217**, 265~268 (2003)
- 26) STEPHAN, O. and VIETHS, S.: Development of a real-time PCR and a sandwich ELISA for detection of potentially allergenic trace amounts of peanut (*Arachis hypogaea*) in processed foods, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3754~60 (2004)
- 27) WATANABE, E. T., AKIYAMA, H., MALEKI, S., YAMAKAWA, H., IJIMA, K., YAMAZAKI, F., MATSUMOTO, T., FUTO, S., ARAKAWA, F., WATAI, M. and MAITANI, T.: A specific qualitative detection method for peanut (*Arachis hypogaea*) in foods using polymerase chain reaction, *J. Food Biochem.*, **30**, 215~33 (2006)
- 28) SCARAVELLI, E., BROHEE, M., MARCHELLI, R. and HENGEL, A. J.: Development of three real-time PCR assays to detect peanut allergen residue in processed food products, *Euro. Food Res. Tech.*, **227**, 857~69 (2008)
- 29) TAGUCHI, H., WATANABE, S., HIRAO, T., AKIYAMA, H., SAKAI, S., WATANABE, T., MATSUDA, R., MAITANI, T. and URISU, A.: Specific detection of potentially allergenic kiwifruit in foods using polymerase chain reaction, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 1649~1655 (2007)
- 30) YANO, T., SAKAI, Y., UCHIDA, K., NAKAO, Y., ISHIHATA, K., NAKANO, S., YAMADA, T., SAKAI, S., AKIYAMA, H., MAITANI, T. and URISU, A.: Detection of walnut residues in processed foods by polymerase chain reaction, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71** 1793~1796 (2007)
- 31) BRZEZINSKI, J. L.: Detection of cashew nut DNA in spiked baked goods using a real-time polymerase chain reaction method, *J. AOAC Int.*, **89**, 1035~1038 (2006)
- 32) NAGASE, M., SUGINAKA, K., MAETA, K., AIMI, T. and MORINAGA, T.: Authentication of flying-fish-meal content of processed food using PCR-RFLP, *Fish Sci.*, **75**, 811~816 (2009)
- 33) QUINTEIRO, J., VIDAL, R., REY-MENDEZ, M., SOTELO, C. G., PEREZ-MARTIN, R. I., REHBEIN, H., HOLD, G. L., ROSA, C. and SANTOS, A. T.: Identification of hake species (*Merluccius genus*) using sequencing and PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA control region sequences, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5108~5114 (2001)
- 34) PEPE, T., TROTTA, M., DI MARCO, I., ANASTASIO, A., CORTESI, M. L. and BAUTISTA, J. M.: Fish species identification in Surimi-based products, *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 3681~3685 (2007)
- 35) HERMAN, L.: Determination of the animal origin of raw food by species-specific PCR, *J. Dairy Res.*, **68**, 429~436 (2001)
- 36) OBROVSKA, I., STEINHAUSEROVA, I. and KRKOSKA, L. Meat species identification by multiplex PCR assay, *Fleischwirtschaft*, **84**, 96~99 (2004)
- 37) GIRISH, P. S., VISWAS, K. N., ANAND, M., RAJKUMAR, N., SHIVAKUMAR, B. M., BHASKAR, S. and ANJANEYULU, A. S. R.: Sequence analysis of mitochondrial 12 S rRNA gene can identify meat species, *Meat Sci.*, **66**, 551~556 (2004)
- 38) 中村澄子・鈴木啓太郎・原口和朋・与座宏一・奥西智哉・大坪研一・松井崇晃・石崎和彦・吉井洋一：もち加工品におけるもち米の品種判別および異種穀類の混入検出技術の開発，*農化*，**78**，984~993 (2004)
- 39) 塩田寛子・佐藤かな子・長井二三子・大久保智子・瀬戸隆子・浜野朋子・上村 尚・加納いつ：RAPD法を用いたアロエの判別，*食衛誌*，**44**，203~207 (2003)