

のうち、組換え体そのものを摂取することのない食品・食品添加物で生産物が既知のものと同ーまたは同一とみなし得るものに限っており、平成4年4月よりガイドラインとして適用されている。

実際に平成6年には、組換え微生物により生産された酵素キモシン(チーズの凝乳酵素)の安全性が食品衛生調査会で確認され、輸入・販売が開始された。しかし、この指針は組換え体を食する場合には適用できないことから、組換え体を食する場合の安全性指針として、平成8年2月に生活衛生局長通知により、組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性指針が改正された。この指針では、組換えDNAにより付加された目的とする性質のみではなく、組換えDNA技術により発生する可能性のあるそのほかの影響についても評価することになった。また、既存のものと同等とみなし得る生産物を、食品・食品添加物として利用する場合に適用し、組換え体そのものを食する生産物では、組換え体が種子植物の場合に適用することとなった。組換え体が既存のものと同等とみなし得るかどうかは、①遺伝子素材に関する資料、②広範囲なヒトの安全な食経験に関する資料、③食品の構成成分などに関する資料、④既存種と新品種の使用法の相違に関する資料により判定し、組換え体が既存のものと同等と見なし得ることが確認された場合に、必要な資料に基づき安全性評価を行うこととなった。平成8年に、7品種の遺伝子組換え食品の安全性確認がなされて以来、多くの遺伝子組換え食品および食品添加物の安全性確認が行われてきた。

さらに、安全性未確認のものが国内で流通しないよう安全性審査を行う制度を法的に確立しておく必要から、食品衛生法の規定に基づく食品、食品添加物の規格基準の改正が行われ、平成13年4月より「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性基準」が設定され、遺伝子組換え食品等の安全

性審査が法的に義務付けられることとなった。一方、国際的にも、WHOとFAOが事務局となっているコーデックス委員会においても、平成15年7月に遺伝子組換え食品の安全性評価のガイドライン(ftp://ftp.fao.org/codex/alinorm03/al03_34e.pdf)等が作成されるに至った。

平成15年7月、食品安全委員会の新設とともに、遺伝子組換え食品および食品添加物の安全性評価が、厚生労働省の意見の求めに応じて、食品安全委員会においてなされることになった。食品安全委員会において、遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性を評価するための基準が平成16年1月、遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準が平成16年3月に作成された(<http://www.fsc.go.jp/senmon/iden/index.html>)。基準作成に至る詳しい経緯については、他の総説を参考にされたい¹⁾。遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価の主要な点は、表1に示すとおりである。

- (1) 元の植物との比較：比較対象としての既存の宿主が存在すること、ならびに、組換え体と宿主等の相違点が明確であること。
- (2) 既存食品との比較：食品としての主要成分、微量成分、機能成分、有害成分等の成分比較を行うこと。
- (3) 使用遺伝子の情報：挿入DNA供与体の性質、挿入DNAまたは遺伝子の塩基配列、プロモーターやターミネーターの性質、発現ベクターの構築、導入方法などに関する事項。
- (4) 導入遺伝子産物の評価：遺伝子産物の発現量や発現部位、遺伝子産物のアレルギー誘発性、遺伝子産物の有害性の評価、遺伝子産物の代謝経路への影響などに関する事項。

これらの項目で、安全性が確認されないとき、急性毒性試験、亜急性毒性試験等の動物実験、変異原性試験等の結果が求められることとなる。詳し

表1 遺伝子組換え食品の安全性評価

・植物の比較 (生殖特性(交雑性, 雑草性), 形態・栽培特性)	→	元の植物との比較
・食品としての成分比較 (主要成分, 微量成分, 機能成分, 有害成分)	→	既存食品との比較
・導入遺伝子の情報 (由来生物, 塩基配列)	→	使用遺伝子の情報
・導入遺伝子産物(タンパク質)の評価 (機能, アレルギー性, 有害性の評価)	→	既知アレルゲン, 毒性 タンパク質との類似性

くは、他の総説を参照にされたい²⁾。

2 遺伝子組換え技術を使って開発された作物の安全性評価

組換え技術を使って開発された作物の安全性評価としては、上記食品の安全性評価と別に、農林水産省の定める環境に対する安全性評価がある。環境に対する安全性評価のあり方についても生物多様性条約のもとにカルタヘナ議定書が採択され、平成15年わが国でも国内法が制定され、平成16年2月より施行されている³⁾。

3 遺伝子組換え食品の作出に用いられているおもな遺伝子

遺伝子組換え農作物の作出に用いられた遺伝子は、これまでのところ比較の種類が限られている。これらの遺伝子は単独でも用いられるが、複数の遺伝子を同時に導入することも多く、近年、遺伝子組換え植物同士の掛け合わせによる複数の形質を有する交配種の作出がよく行われるようになってきた。

除草剤耐性農作物で、これまで安全性が確認されている除草剤としては今のところグルホシネート、グリホサートおよびプロモキシルの3農薬のみである。遺伝子としては植物体内でグルホシネートをアセチル化して失活させるアセチルトラ

ンスフェラーゼ遺伝子 *pat(bar)*、シキミ酸経路に属する芳香族アミノ酸生合成に関与し、グリホサートの標的酵素であるEPSPS(5-エノールピルビルシキミ酸3-リン酸(EPSP)合成酵素)機能をもつが、グリホサート耐性であるためグリホサートの阻害を受けない *cp4-epsps*(アグロバクテリウム由来)およびプロモキシルを分解する *bxn* 遺伝子等である。

害虫抵抗性農作物に導入されている遺伝子として、微生物農薬として用いられている *Bacillus thuringiensis*(バチラス菌)の産生するトキシシン遺伝子(*cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1F*, *cry2Ab*, *cry3A*, *cry3Bb*, *cry34Ab/cry35Ab*)が用いられている。*Cry1*および*Cry2*タンパク質は、鱗翅目(ちょう目)の昆虫(アワノメイガ、オオタバコガ等)に毒性があり、*Cry3*タンパク質は、甲虫目の害虫(コロラドハムシ、コーンルートワーム等の昆虫)に選択毒性がある。これらのトキシシンは通常、昆虫の消化酵素により部分分解を受け活性型となり、消化管上皮細胞の特異的受容体に結合する。その殺虫機序は陽イオン選択性小孔の形成による上皮細胞の破壊とされている。最近の動向としては、トウモロコシおよびワタにおいて、複数の形質をもつ掛け合わせ品種(スタック)の開発が進んでいることが特徴となっており、平成20年2月現在で、トウモロコシのスタック品種は18種、ワタのスタック

ク品種は、7種に及んでいる。

また最近、飼料用として、アミノ酸のリシン含量を高めたトウモロコシが開発されたが、この場合は、リシン合成酵素(cDHDPS)が導入され、合成されたリシンによるフィードバック阻害をうけにくくしたために、リシン含量が高められたものである。そのほか、アンチセンスDNAやウイルス遺伝子の発現を抑制するためのウイルスのコートタンパクの遺伝子も用いられている。

Ⅲ 遺伝子組換え食品の安全性確保に関する研究の概要

バイオテクノロジー応用食品の安全性に関し消費者の関心が高まり、その安全性確保が強く求められる一方、国際的な基準作りが進められている。特に、除草剤耐性、害虫抵抗性等の第一世代の遺伝子組換え作物の開発に加え、近年では、組換え微生物を利用した食品や組換え魚などの新たな遺伝子組換え食品や、食品の栄養成分を改変した遺伝子組換え食品の開発が進んでいる。わが国においては、前述のように平成13年4月から遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性審査を義務付け、遺伝子組換え食品の表示について義務付けし、輸入時にモニタリング検査等を行っている。国際的に

も、第1期コーデックス委員会バイオテクノロジー応用食品特別部会(TFFBT)において、種子植物、微生物のガイドラインの作成が2003(平成15)年6月終了し、2005(平成17)年9月より第2期TFFBTにおいて、「組換えDNA動物由来食品の安全性評価の実施に関するガイドライン」、「栄養または健康に資する組換えDNA植物由来食品の安全性評価」の策定作業が行われている⁴⁾。

このような状況のなか、栄養改変したいわゆる第二世代の組換え食品、種子植物以外の組換え食品の安全性評価の国内におけるガイドラインの作成が必要となっている。厚生労働科学研究事業では、平成18年度からは、平成17年度までの第一世代の組換え食品の安全性確保に関する研究に引き続いて、第二世代以降のモダンバイオテクノロジー応用食品に関する安全性に資するための研究を推進している⁵⁾。具体的には、①モダンバイオテクノロジー応用食品に関する開発・実用化の動向やその安全性に関する科学的知見の高度集積、②ポストゲノム手法導入のための研究、高精度なアレルギー性予測手法の導入等の安全性確保手法の高度化、③安全性確保に有用な検知技術の開発を行うことを目的としている。

図1に、研究の流れの概要を示す。まず、現在

—平成20年度版—

最新刊 全国食品衛生行政担当者名簿

【収録内容】
下記の所在地・代表者名・担当者名・電話番号・ファックス番号等を掲載。
(平成20年4月現在)

<p>■ 全国食品衛生行政機関</p> <ul style="list-style-type: none">・厚生労働省医薬食品局食品安全部・地方厚生局 ・検疫所 ・国立研究機関・都道府県食品衛生主管部課 ・保健所・衛生研究所 ・食肉衛生検査所・動物管理センター等	<p>■ 厚生労働省登録検査機関</p> <p>■ (社)日本食品衛生協会 ならびに各支部 他</p>
--	---

・体裁 A5判 392ページ
・定価 2,625円(本体価格+税)
・送料 実費

社団法人 日本食品衛生協会 TEL 03-3403-2114 FAX 03-3403-2384

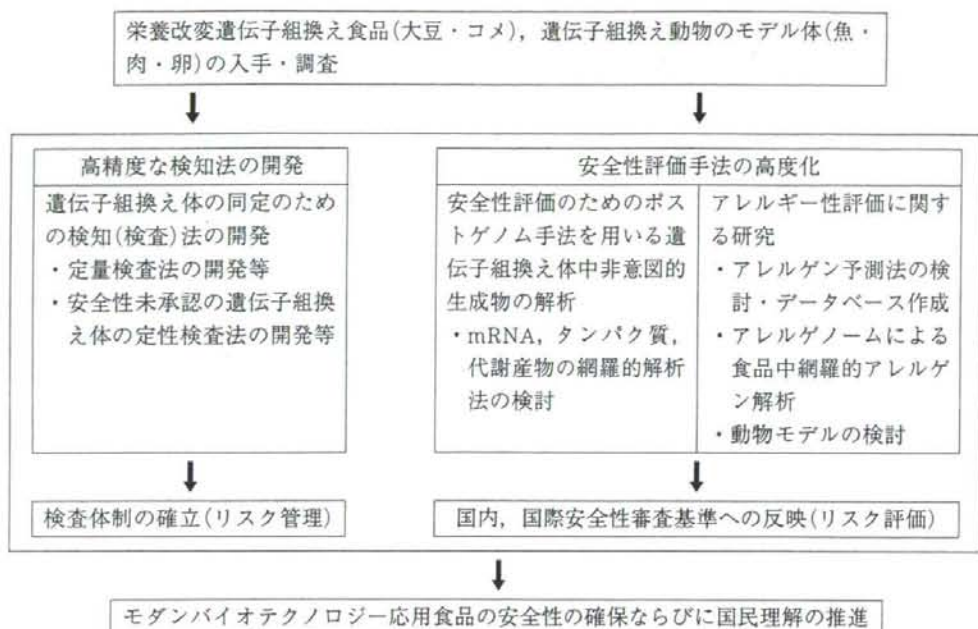


図1 平成18年度から行われているモダンバイオテクノロジー応用食品の安全確保に関する研究

開発中のモデル組換え体(大豆, コメ, 魚, ニワトリ等)を入手し, それらを用いて, 次の(a)~(c)の3つの研究に供している。すなわち,

(a) 遺伝子組換え体の同定のための高精度な検査(検知)法の開発

- (1) 未承認の遺伝子組換え体の定性試験法の開発
- (2) 承認済み組換え体の定量試験法の開発

(b) 遺伝子組換え体の安全性評価へのポストゲノム手法導入のための研究

遺伝子組換えによる非意図的影響をより広範に分析する方法として, 網羅的ポストゲノム手法であるトランスクリプトーム(転写産物解析), プロテオーム(翻訳タンパク質解析)およびメタボローム(代謝産物解析)手法を安全性評価に導入するための条件についての研究

(c) 遺伝子組換え体のアレルギー性評価に関する調査研究

- (1). アレルゲン予測法の検討, エピトープ情報を

加味したアレルゲンデータベース(ADFS)⁶⁾の充実

(2) アレルゲノーム解析手法による食品中アレルゲンの網羅的解析手法の安全性評価への導入のための研究

(3) 動物モデルの安全性評価への導入についての検討

である。

これらの研究成果をリスク管理(検査体制), リスク評価(国内, 国際安全性審査基準)に反映させるとともに, 消費者とのリスクコミュニケーションのあり方に関する研究も合わせて行い, モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保ならびに国民理解の推進のための研究を遂行している。

IV 遺伝子組換え食品の開発状況について

国際アグリバイオ事業団(ISAAA)の調査による

と⁷⁾、2007(平成19)年度のGM作物の全世界における作付け面積は約1億1,430万ヘクタール、これらの栽培を行っている農家は23カ国(先進国11, 開発途上国12)で1,200万人と推測されている。この耕地面積の伸び率はここ12年間毎年2桁台を示しており、2007年度は、全世界の耕地面積の約7%に達していることになる。作付けが一番進んでいる米国では約5,770万ヘクタールでGM作物の栽培が行われている。米国、南米、カナダを中心に作付け面積は増加している。

これらの現在外国で栽培が許可されている組換え作物は、耐病性、耐虫性、除草剤耐性など生産者にメリットの高いいわゆる第一世代の遺伝子組換え作物がほとんどであり、大豆、トウモロコシ、ワタ、ナタネ、アルファルファ等に限定されている。現在も同様の手法が、コメ、コムギ等に应用され、研究が進んでいる。これら、第一世代の組換え作物の後世代の安定性の確認等の地道な継続的な研究が必要であると思われる。

一方、消費者にメリットのある栄養成分を変えた第二世代の作物(高オレイン酸大豆、ビタミンA強化コメ等)の開発も急ピッチで進められている。これら第二世代に相当する組換え食品の開発は、日本国内においても急ピッチで進められている。

その他、第三世代に位置付けられる環境ストレス耐性を付与したものの、ワクチン等医薬品を作る植物の開発も進んでいる。遺伝子組換え食品の評価は、あくまで、比較対照との評価を基本とするものであり、comparatorの選び方が重要となる。現在、コーデックス委員会のバイオテクノロジー応用食品特別部会(TFFBT)では、栄養改変のガイドライン(2009年最終版作成予定)のなかで、comparatorの選び方、比較する栄養素、有害物質等の範囲などの議論がされてきた。

V おわりに

これらの状況を踏まえ、今後、比較対照にすべき具体的データベースの整備が必須となり、タンパク質、代謝物を含む低分子物質のデータベースの整備が進んでくるものと思われる。私どもの厚生労働省の研究班においてもこれらデータベース作りに寄与することを目指しており、最新の知見に基づく安全性審査が実施できるような研究体制や情報収集体制を目指してゆきたいと考える。また、消費者への新規食品に対する科学的にわかりやすい安全性に関するコミュニケーションにも心がけてゆきたいと考えている。

参 考 文 献

- 1) 澤田純一：遺伝子組換え食品の安全性評価基準等について(総論)、食品衛生研究, 54(10), 7-11(2004)
- 2) 手島玲子：農林水産技術研究ジャーナル, 30(9), 22-29(2007)
- 3) カルタヘナ議定書関連 http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/030301.htm
- 4) 厚生労働省食品安全部、コーデックス委員会バイオテクノロジー応用食品特別部会(TFFBT)第7回会議の結果概要について(<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/09/h0928-4.html>)
- 5) 平成19年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)「モダンバイオテクノロジー応用食品の安全性確保に関する研究」(主任研究者：西島正弘)
- 6) 中村亮介他：Bull.Natl.Inst.Health Sci., 123, 32-36(2005)
- 7) ISAAA Brief 37-2007: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2007 (<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/37/executivesummary/default.html>)

リスク・コミュニケーションとは

—その歴史と現代における課題

吉川肇子

重松美加

緒言

リスク・コミュニケーションという用語は、医療・健康対策の領域で最近脚光を浴びている。また、関係者が多岐にわたるにつれて、同じ用語に対して多様な解釈が見られるようになった。言葉の意味は時代背景の変化とともに変わるものではあるが、パンデミックや新興感染症などの健康危機管理の現場においては、「同じ言葉」を共有することが効果的対応に必要となる。本論文はこのような現状を踏まえ、リスク・コミュニケーションの概念について、主要著作を中心に改めて概観する。また、この用語が初めて使われるようにな

った時代背景の検討を通し、なぜ、今日特に注目を集めるようになったのかについて考察を試みる。

1. リスク・コミュニケーションの登場

リスク・コミュニケーション (risk communication) は、1980年代から欧米で使われるようになった歴史が浅い言葉である。

著作物や論文を精査した結果、論文のタイトルとしてリスク・コミュニケーションの語がはじめて出てきたのは1984年である。リスク・コミュニケーションの専門家であり、イギリスのBSE問題について詳細な事例分析を行ったパウエル¹⁾も、その著書の中

で、リスク・コミュニケーションという語がはじめて使われたのは1984年としている。この年には、リスク・コミュニケーションについての複数の論文が、異なる著者らにより出版されている²⁾。

リスク・コミュニケーションという熟語の形にこだわらなければ、リスクをコミュニケーションすること (communicating risk) とか、リスク情報 (risk information) などの表現は、これ以前にも同様の意味で使われていた。例えば、リスクについて多くの論文を書いているスロビツクラ³⁾が、1980年に「Informing people about risk」というタイトルの報告に書いているが、内容は、リスク・コミュニ

ケーションそのものである。一般に、論文として掲載されるには時間がかかるため、少なくとも1970年代後半には議論の主題として取り上げられるようになっていたと考えられる。さらに、リスク・コミュニケーション研究の黎明期の研究者の一人であるフィッツェホフ⁴⁾も、1995年に発表した彼の論文の中で、1975年頃からリスク・コミュニケーションについて検討され始めたことを示唆するように、20年あまりのその歴史を振り返っている。

リスク・コミュニケーションをテーマとした国際会議が初めて開かれたのは、1986年のアメリカ合衆国においてであった。一方、ヨーロッパでの初の国際会議は1988年に開催されている。また、リスク・コミュニケーションという名前を冠した研究プロジェクトに対し、1983年に初めて研究資金が提供されている。

2. リスク・コミュニケーションとは何か

最初のリスク・コミュニケーション



ヨンの定義は、コペロラにより1986年に提唱された⁵⁾。ただし、この定義は、リスク・コミュニケーションで取り扱うリスクを健康リスクと環境リスクに限定している点と、コミュニケーションを情報の伝達交換 (conveying or transmitting) としている点とが、次に述べる米国研究評議会のものとは異なっている。

定義が確定したのは3年後の、1989年の米国研究評議会 (National Research Council)⁶⁾ においてであるとみてよいであろう。この定義は、翻訳すると以下のようになる。

「リスク・コミュニケーションとは、個人、集団、機関の間における情報や意見のやりとりの相互作用的過程である。それは、リスクの性質についてのメッセージとそれ以外の、厳密に言えばリスクについてとは限らないリスクメッセージや、その他リスク管理のための法律や制度に関する関心や、意見や、反応を表現するメッセージとの、多様な (multiple) メッセージを含む。」

原文が長いために、通常は最初の2行 (an interactive process of exchange of information and opinion among individuals, groups, and institutions) だけが引用されている。リスク・コミュニケーションとは、この定義に相互作用的過程 (interactive process) とあるように、単にリスクやそれに関係する意見交換や情報交換にとどまらず、利害関係者 (stakeholders) がお互いに働きかけあい、影響を及ぼしあいながら、建設的に継続されるやりとりであるということに注目しなければならない。

3. リスク・コミュニケーションは「考え方」である

リスク・コミュニケーションという新しい用語の台頭で、リスクについての新しい、あるいは特殊なコミュニケーション手法があると思われる。また、日本の場合は特に、近年の企業不祥事や行政の不手際の発覚によって、危機管理のあり方の一つとして注目されたため、緊急時の記者会見の聞き方やマスコミの対応というよう

な、きわめて戦術的な部分だけをもつて、リスク・コミュニケーションだとされることもある。しかし、これらはすべてその一面だけを取り上げた誤解である。

コミュニケーション技術としては、従来からの社会心理学のコミュニケーション研究の成果を活かすことができる。また、リクテンバークら⁷⁾が言うように、「メディアは、リスクと科学技術についての情報源の多くを構成しており、現代社会におけるリスク・コミュニケーションの多くはマス・コミュニケーションである」という事実を認識すれば、リスク・コミュニケーションの技術は、すでにマス・コミュニケーション研究者によって半世紀以上にわたって研究されてきたといえる。

しかし今、あえてこの新しい用語を必要としているのは、感染症や健康に関するリスクの取り扱いが変化してきているからである。つまり、リスクに関する情報を専門家や関係者のみが独占して意思決定をするのではなく、社会全体で情報共有した上で、非専門家も

含めて意思決定を行っていくべきだという新しい「考え方」の浸透を目指しているのである。だからこそ、リスク・コミュニケーションは、リスクについての単なる情報伝達技法でもなければ、一般の人々を納得させるための技術でもないし、また上手な記者会見の聞き方というような技術の羅列に終始するものではないことを、再度ここで強調しておきたい。

4. リスク・コミュニケーションを求める社会的背景

リスク・コミュニケーションという新しい用語を必要とした時代とはどのような時代だったのであろうか。1970年代後半からの主な事件・事故を図1にまとめた。1970年代は公害問題が顕在化し、1979年にはアメリカでスリーマイル島の原子力発電所の事故が起こっている。原子力の分野は、リスク・コミュニケーションに最も早く注目した分野であるが、その理由として、住民との合意形成の困難さが意識されていたことと、この事故の影響があると



図1 リスク・コミュニケーションに影響を与えた出来事



思われる。一般に、災害についての人々のリスク認知(Risk Perception)は低いとされている。しかし、スリーマイル島の事故の際には、人々のリスク認知が高く、避難しすぎたために交通渋滞が起こったことから、これ以降、リスク認知研究の分野では、科学技術の事故と自然災害とは区別して議論されるようになった⁸⁾。

1984年のポパール(インド)の農薬工場の事故では、自宅から外に出たために、有毒ガスを吸って亡くなる住民が多かった。この後、化学工業界では、たとえ安全管理に配慮したとしても工場による健康被害の発生のリスクはゼロでないこと、緊急時の対応を地域住民に事前に知らせておくことの重要性が認識されるようになった。また、shelter-in-place(事故時には窓を閉めて自宅にとどまり、情報を聞く)キャンペーンや、地域協議会(community advisory panel)というようなリスク・コミュニケーションの試みが積極的に行われるようになった。



1986年のスペースシャトルチャレンジャー事故は、事前に技術者から事故発生の可能性が指摘されていたにもかかわらず、NASA(米国防空宇宙局)がその警告を無視して打ち上げを強行したことが原因とされている。緊急時に専門家が愚かな意思決定をするのは従来から「集団浅慮」(groupthink)の問題として知られてきた⁹⁾が、この事故も集団浅慮の典型的な例とされる。

1989年のバルディーズ号の原油流出事故は、海洋で発生した環境破壊事故の中でも最も大きなものとされる。エクソン社の初期対応のまずさや、除去対策を巡る議論の対立、環境NGO活動の高まりなど、この後のいくつもの新しい動きのきっかけを生んでいる。1992年、オランダのスキポール空港における墜落事故では、空港近くのアパートに旅客機が墜落し、住民を含む47名の死者を出した。この事故を受けて、オランダ政府は、年間の個人リスクを計算し、その結果年間の死亡リスクが 10^{-5} 以上の地域の住民を移転さ

せるという政策をとっている。

1996年3月20日に英国政府が公式にBSEのリスクを認めて以来、その社会的影響は大きく、ヨーロッパ諸国では行政機関においてリスク・コミュニケーション専門の部署が置かれるようになってきている。1986年にこの問題が最初に指摘されてからの10年のリスク・コミュニケーションの失敗は、典型的な「科学に固執したための失敗」¹⁾とされる。

この後、定量的なリスク・アセスメント(Risk Assessment)に頼って意思決定するのでは、情報収集に時間がかかり、手遅れになる場合があることが意識されるようになった。

このことは、リスク概念そのものの見直しをも迫っている¹⁰⁾。すなわち、リスク・アセスメントにおいては損害や健康被害などの望ましくない事象と、その発生確率(あるいは曝露頻度)が科学的に明らかにならなければ、リスクとして定義できないことになるのである¹¹⁾。この両者が確定するには多くの情報が必要であり、通常、

時間がかかる¹²⁾。この事実を考慮して、発生確率が未定の場合でも、あるいは因果関係やその影響の大きさが不明の場合であっても、リスクの存在が指摘されれば慎重に政策を検討しておこうという考え方が一定の支持を得つつある。

コッホによるコレラ菌の発見の30年前の1854年の出来事である、ロンドンでコレラが発生した際のスノウ(Snow)医師の対応¹³⁾が、欧州環境機構の報告書¹⁴⁾の冒頭に引用されていることは、この動きを示唆する代表的例である。予防的対応(Precautionary approach)の重要性が意識されるようになってきたと考えられる。

2001年のいわゆる9・11テロは、それまでリスク・コミュニケーションの一部と見なされるようになってきたクライシス・コミュニケーションが、再び意識されるようになったきっかけといえる。

5. 健康・医学分野における特殊性

コミュニケーションとはどのようにあるべきか、どのような技術

があり、どのような目的で使われるのかといった学問的、理論的背景は、一般的なコミュニケーション学にはあるが、そのサブセットである健康・医学の分野のリスク・コミュニケーション学、特に短期間で非常に速く状況が変化する感染症については、確立されなまま実用に供されている。定義の項に示したように、相互作用的過程であることから、誰が、何を目標として、どのように、などの「5W1H」は、それぞれの事例や感染拡大の状況ごとに、社会との関わり方で複雑に変化するためなのである¹⁵⁾。

世界保健機関・太平洋事務局の専門家トレーニングなどに携わっているレナード博士とサンドマン博士によると¹⁵⁾、科学者は火星人と金星人というぐらいに他の人たちとは異なっているそうである。また、ごくわずかの例外を除いて科学者というものは互いのコミュニケーション以外ではほとんど役に立たないほど、notoriously poor communicators、だと書かれている。その理由がいくつかが指摘され



ている。まず、権威ある研究者はメディアへの暴露を避けるもので、世俗的書き物の著述やテレビ出演は科学的研究の独自性や斬新さを傷つけるものであると考えてきたという。また、多くの科学者が自分とは人の交流が苦手であり、気分には左右されることがなく、より付き合ひやすい「研究」を、人生の早い段階で付き合う相手として選択したという考え方もある。事実や数字を説明すればよいのだから、コミュニケーションは科学者に必要ないと発言する者や、コミュニケーションを一つの確立した学問領域として認めない者に、この傾向は特に見受けられ、コミュニケーションは「誰でもできるもの」と考えるのも、その特徴であると言っている。このような専門家の思い込みは、リスク・コミュニケーション研究の初期から指摘されてきたが、未だに克服できない問題である⁴⁾。

ハード・サイエンスと分類されるウイルス学などは、特別な訓練や知識なしに、だれでもできると考える者はいないが、日常生活に溶け込んでいるコミュニケーションのようなソフト・サイエンスは、往々にして軽んじられる傾向にある。また、多くの科学者が感情的なことを否定し、理性を必要以上に重んじていると評されることもある。この場合、「科学者でない人の知識普及」というのは、科学的、直接的な情報やデータの伝達のことだと考える傾向がみられる。彼らは、人がどのようにして新しいことや、悲観的事実を学ぶかという、両親や教師が当然知っていることを理解していないことになる。

同時に彼らは、自らが感情の動物であることを否定し、相手を見下し、その結果データや情報は意図したように伝わらず、期せずして人々に対して苛立ち、感情的になった結果、相手を非難する状況に陥ることになる。テレビなどのメディアにおいて、専門家が他の出演者に悪態をついたり、怒り出したりする現象がこれであろう。

サンドマン博士らはさらに科学者の欠点を、自分を恃むあまり受け手の不信や疑いを受け入れる度量を失ったり、相手の安心を求め、欲求の強さに巻き込まれて不意な保証をしたり、普通の人の能力を信じていなかったり、コミュニケーションと無関係の姿勢をとるなど、数えると枚挙にいとまがないと述べている。すでに証明された事実と、自分にとっての事実を厳然と分離する理性を、感情の高まりで、自ら失っていることに気がつかないのであろう。

しかし、リスク・コミュニケーションの専門家は、科学者がコミュニケーションとして不適格であると言っているわけではない。科学者がコミュニケーションとなるならば、まずは先に挙げたような事柄を認識し、それをコントロールする術を学ぶことが先決だと言っている。それに加え、自分の専門領域を踏み越え、「一般大衆」と同じレベルにすぎない他分野での情熱な発言を避けることが重要であるとも言っている。

また、専門家といえども、リスク認知に違いがあることも知られている。化学物質のリスク認知について調査したマーツら¹⁶⁾は、毒性学会会員のリスク認知が、企業に所属する会員の方が大学に所属する会員よりも低いことから、リスク認知には性別、民族、社会的地位、年齢、職業集団、職業的志向を反映したさまざまな形の「文化的な差」があると述べている。たとえ科学的なリスク・アセスメントでは合意できたとしても、それをどのようにに認知するかについては個人や社会の価値観が入る余地がある。

同時に、自分がどのような人々に向かって話しているかを自覚する必要がある。コミュニケーションは相手に伝わって、それに対してレスポンスがあつてこそコミュニケーションと呼ばれる。この意味でコミュニケーションとは、定義の項で述べたように相互作用的なものである。以上のような内容に、科学者として反論したい感情に駆られたとしたら、おそらくは核心をついているためであると考える。

医学や保健領域の予防啓発の活動は、健康増進や検診の受診など



□□文 献□□

- 1) Powell D, et al : Mad cows and mother's milk : The perils of poor risk communication, McGill-Queen's University Press, Quebec, 1997, p308. 2) Rohmann B, et al : Risk-Communication : An interdisciplinary bibliography, KFA Jülich GmbH, Jülich, Germany, 1990, p142. 3) Slovic, et al : In Morris LA, et al, eds, Product labeling and health risks, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1980 p165. 4) Fischhoff B : Risk Anal 15 : 137, 1995. 5) Covello, et al : Technol Forecast Soc Change T 23 : 285, 1986. 6) National Research Council : Improving risk communication, National Academy Press, Washington DC, 1989, p332. 7) Lichtenberg J, et al : In Kasperson RE, et al, eds, Communicating risks to the public, Kluwer Academic Press, Dordrecht, Netherlands, 1991, p157. 8) Covello VT, et al : In Jungermann H, et al, eds, Risk Communication, KFA Jülich GmbH, Jülich, Germany, 1988, p131. 9) Janis LL : Victims of groupthink : A psychological study of foreign policy decisions and fiascoes, Houghton Mifflin, Boston, 1972, p277. 10) 山本 明, 他 : 日本リスク研究学会誌 15 : 45, 2004. 11) 日本リスク研究学会 : 増補改訂版 リスク学事典, 阪急コミュニケーションズ, 2006, p423. 12) Berry D : Risk, communication, and health psychology, Open University Press, Maidenhead, UK, 2004. 13) Johnson S : The ghost map : The Story of London's Most Terrifying Epidemic—and How It Changed Science, Cities, and the Modern World, Riverhead Books, NY, 2006, p320 (矢野真千子訳 : 感染地図—歴史を変えた未知の病原体, 河出書房新社, 2007, p299). 14) European Environment Agency : Late lessons from early warnings : the precautionary principle 1896-2000, 2001. 15) Lanard, J, et al : Scientists and the Public : Barriers to Cross-Species Risk Communication (<http://www.psandman.com/col/species.htm>), 2004. 16) Mertz CK, et al : Risk Anal 18 : 391, 1998.

の一端として進められてきた。実はこれらには目標数値があり、取り組む方も、受け手もそれぞれの目標数値に向けて努力ができる。感染症ではどうか？ 蔓延状態にあるものについては、その発生率を下げるという目標があるかもしれない。しかし、集団発生やパンドミックはいつ起こるかも、どこで、誰に起こるかもわからない。その規模（特に目に見える規模）がどの程度かも不明である。発生率は集団や時間当たりで求めることができるが、個人にとっては感染するか、しないかの binary (二

者択一) にすぎない。その上、自分の行動だけで決まるものでもなく、周囲も同じように行動して、真剣に、自分のこととして受け止めてもらうには、かなり条件が悪い対象と考えられる。そのため、感染症でリスク・コミュニケーションを受け持つには、薬をも頼りたい気持ちの時のクライシス・コミュニケーションや緊急時のコミュニケーションに比べ、より以上の連帯感やクライシス時とは異なる種類の信頼を獲得する能力がコミュニケーションに求められている。

結 語

情報を開示し、すべて共有して、人間の理性と合理的判断をたのみ、危機対応への協力を求めるのは理想的ではある。しかし、平生からのリスク・コミュニケーションが、技巧に走ることなく進められるという土壌が準備されていないと、現実的な問題は解決されない。筆者らは本篇を書きつつ、感染症や健康危機管理の分野を対象としたリスク・コミュニケーション学の確立と、他分野で培われた方法の正確な普及が急務であることを改

めて認識した。リスク・コミュニケーション学の研究者として、同分野がこれまで30年以上にわたって培った成果を、この新しい分野で活用できる形で紹介を続けていきたいと考える。

(1) 慶応大学商学部准教授、² 国立感染症研究所感染症情報センター主任研究官

Real-Time PCR Array as a Universal Platform for the Detection of Genetically Modified Crops and Its Application in Identifying Unapproved Genetically Modified Crops in Japan

JUNICHI MANO,[†] NATSUKI SHIGEMITSU,[†] SATOSHI FUTO,[‡] HIROSHI AKIYAMA,[§]
REIKO TESHIMA,[§] AKIHIRO HINO,^{†,‡} SATOSHI FURUI,[†] AND KAZUMI KITTA^{*,†}

National Food Research Institute, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan; FASMAC Co. Ltd., 5-1-13 Midorigaoka, Atsugi, Kanagawa 243-0041, Japan; and National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

We developed a novel type of real-time polymerase chain reaction (PCR) array with TaqMan chemistry as a platform for the comprehensive and semiquantitative detection of genetically modified (GM) crops. Thirty primer-probe sets for the specific detection of GM lines, recombinant DNA (r-DNA) segments, endogenous reference genes, and donor organisms were synthesized, and a 96-well PCR plate was prepared with a different primer-probe in each well as the real-time PCR array. The specificity and sensitivity of the array were evaluated. A comparative analysis with the data and publicly available information on GM crops approved in Japan allowed us to assume the possibility of unapproved GM crop contamination. Furthermore, we designed a Microsoft Excel spreadsheet application, Unapproved GMO Checker version 2.01, which helps process all the data of real-time PCR arrays for the easy assumption of unapproved GM crop contamination. The spreadsheet is available free of charge at <http://cse.naro.affrc.go.jp/jmano/index.html>.

KEYWORDS: Genetically modified (GM); real-time PCR array; TaqMan assay

INTRODUCTION

Today many types of genetically modified organisms (GMOs), including microorganisms, animals, and plants, are already in practical use, and the number of commercially available genetically modified (GM) crops is increasing rapidly (1). In Japan, a total of 69 lines of GM crops have been approved for open-field cultivation or provision as food, feed, or ornamental plants as living modified organisms (LMOs) under Law Concerning the Conservation and Sustainable Use of Biological Diversity through Regulations on the Use of Living Modified Organisms (Cartagena Protocol domestic law) that came into effect on January 31, 2008. Additionally, a total of 88 GM crop lines have been approved for food under Food Sanitation Law as of February 12, 2008. Under these circumstances, it is desirable to develop GM crop testing methods that are capable of collecting a lot of information at once. Simultaneous detection methods, such as multiplex polymerase chain reaction (PCR)

methods (2–5), DNA chip analysis (6–14), and membrane hybridization methods (15), have been developed and reported for some GM crops. Although multiplex PCR is one of the most efficient and easiest techniques for multiplex detection, the multiplex reaction is difficult to be applied in practical testing, and false-positive amplifications tends to occur more often than in the simplex reaction (6, 14, 16). In addition, the interaction between individual reactions in the multiplex system causes unstable testing results in cases in which there is a big gap between the copy numbers of the target DNAs (17, 18). In the development of an analytical method for regulatory use with GMOs, a validation study among participating laboratories is required to evaluate the performance. Validation studies, however, tend to be time- and cost-consuming. The addition of a single individual reaction into a validated multiplex reaction system may require substantial effort to reevaluate the whole system. This makes it difficult to supply suitable GM testing methods to testing laboratories in a flexible and impromptu manner so that they will be ready to deal with the increasing number of approved GM crops. Given this situation, a universal detection system that permits the simultaneous implementation of many individual validated methods would be an efficient and useful tool for GM analysis. The costs of DNA analysis depend largely on the high price of PCR instruments and reagents. The frequent use of an instrument may pay off. Additionally, the large-scale synthesis of oligonucleotides for primers or probes

* Corresponding author. Tel.: +81-29-838-7369. Fax: +81-29-838-7369. E-mail: kaz@affrc.go.jp.

[†] National Food Research Institute.

[‡] FASMAC Co. Ltd.

[§] National Institute of Health Sciences.

[‡] Current affiliation: Food Safety Commission Secretariat, 2-13-10 Prudential Tower 6th Floor, Nagata-cho, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8989, Japan.

may provide superior cost performance to small-scale synthesis. Thus, a universal detection platform with which many analyses can be performed in a single system is also attractive from an economic point of view. Real-time PCR with TaqMan chemistry has been used in various kinds of quantitative detection methods for GM crops (19, 20). Furthermore, the validation studies on the detection methods have been reported on the Web site, "Community Reference Laboratory for GM Food and Feed" (<http://gmo-crl.jrc.it/default.htm>) under the European Commission. TaqMan PCR provides higher specificity than conventional PCR due to the chemistry with TaqMan probes. Additionally, TaqMan assay development with the Applied Biosystems system does not necessarily require strict optimization of reaction conditions such as thermal cycling or the composition of the reaction buffer (21). These characteristics are advantageous for a universal detection platform. The ideal system would be easily updatable and customizable as the situation demands, particularly for the addition of new approved GM lines.

In Japan, Food Sanitation Law and Law Concerning Safety Assurance and Quality Improvement of Feeds require safety assessments of GM crop lines for food and feed, respectively. Cartagena Protocol domestic law requires the assessment of adverse effects on biological diversity. Additionally, these laws impose a policy of strict restriction of unapproved GM crops. Nevertheless, the incidents of contamination by unapproved GM lines have occurred sporadically and have caused considerable concern worldwide. However, no perfect detection system for all unapproved GM crops has yet been developed because there are no biological or chemical characteristics specific to such crops.

In this study, we proposed real-time PCR array with TaqMan chemistry, i.e., 96-well PCR plate prepared with a different primer-probe in each well, as a universal platform of GM detection and evaluated the specificity and sensitivity of the developed system. We also explored the possibility of adopting this real-time PCR array for the control of unapproved GM crops. Additionally, in order to facilitate the assumption of GM crop contamination, we designed a Microsoft Excel spreadsheet application, Unapproved GMO Checker version 2.01, and made it available on the Internet.

MATERIALS AND METHODS

Cereal Materials and DNA Extracts for Analytical Samples.

We used the following as representative GM maize lines: Bt11, Event176 (E176), GA21, MON810 (M810), MON863 (M863), NK603, T25, TC1507, MIR604, DAS-59122 (D59122), and MON88017 (M88017). Representative GM soy lines were the following: 40-3-2 (Roundup Ready Soybean, RRS), A2704-12 (A2704), and A5547-127 (A5547). We used RT73 as a representative GM canola line and LLRICE62 as a representative GM rice line. F1 generation seeds of Bt11 and E176, and ground F1 generation seeds of GA21, were kindly provided by Syngenta Seeds AG (Basel, Switzerland); F1 generation seeds of M810, M863, and NK603 were kindly provided by Monsanto Company (St. Louis, MO, U.S.A.); and F1 generation seeds of TC1507 were kindly provided by Dow AgroSciences LLC (Indianapolis, IN, U.S.A.). Two certified reference materials (CRMs) in powder form were purchased from the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM; Retieseweg, Belgium): MIR604 (cat. no. ERM-BF-423d; certified value, 98.5 g/kg; uncertainty (coverage factor $k = 2$), -2.6 and $+2.9$ g/kg) and D59122 (ERM-BF-424d; 98.7 g/kg; -5.8 and $+5.9$ g/kg). Several CRMs were purchased from the American Oil Chemists' Society (AOCS; Urbana, IL, U.S.A.): nonmodified canola seeds

(cat. no. AOCS 0304-A; certified value, below 0.5% of Roundup Ready canola), RT73 seeds (AOCS 0304-B; above 991.9 g/kg of Roundup canola), ground seeds of M88017 (AOCS 0406-D; above 990.5 g/kg), DNA extract of LLRICE62 (AOCS 0306-I; above 999.9 ng/ μ L of GM DNA), DNA extract of A2704 (AOCS 0707-B; above 999.9 ng/ μ L of GM DNA), and DNA extract of A5547 (AOCS 0707-C; above 999.9 ng/ μ L of GM DNA). Plant leaves infected by cauliflower mosaic virus (CaMV) (MAFF Nos. 104018, 104019, and 104021) were obtained as genetic resources from Genebank of the National Institute of Agrobiological Sciences (Tsukuba, Japan). F1 generation seeds of T25 and progeny seeds of RRS were imported directly from the U.S.A. Dry seeds of maize (Quality Technology International, Inc., Elgin, IL, U.S.A.) and dry soybeans harvested in Ohio in 1998 were also imported directly and used as non-GM maize and non-GM soy, respectively. Seeds of the conventional rice variety Kinuhikari (*Oryza sativa*), the conventional wheat variety Haruyutaka (*Triticum aestivum*), and the conventional barley variety Harrington (*Hordeum vulgare*) were obtained in Japan. Non-GM CRMs of cotton (ERM-BF422a; below 0.5 g/kg for GM cotton 281-24-236 and 3006-210-23), sugar beet (ERM-BF419a; 0 g/kg for GM sugar beet H7-1), and potato (ERM-BF421a; 0% for GM potato EH92-527-1) were purchased from IRMM.

Preparation of Test Samples and DNA Extraction. All dry seeds except canola seeds were ground with a P-14 speed rotor mill (Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Germany); canola seeds and plant leaves infected by CaMV were frozen in liquid nitrogen and then ground with an SK mill (Tokken, Inc., Chiba, Japan). The ground materials were stored at -20 °C until DNA extraction. For maize, soy, wheat, barley, rice, cotton, and sugar beet, DNA extraction was performed using a DNeasy Plant Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) as described in our previous report (19). For ground samples of canola seeds and potatoes, DNA extraction was performed using a GM quicker 2 (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) following the manufacturer's instructions. For ground samples of plant leaves, DNA extraction was performed using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. To evaluate the sensitivity, mixed samples of GM and non-GM ground materials at different mass fractions were prepared and used as described below. The DNA concentrations of solutions were determined by measuring ultraviolet (UV) absorbance with a spectrophotometer (NanoDrop ND-1000; NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, U.S.A.), and quality was evaluated by the absorbance ratios at 260/280 nm and 260/230 nm. The absorbance ratio at 260/230 nm was above 1.7 and at 260/280 nm was between 1.7 and 2.0 for most DNA extracts. DNA concentration was calculated with 1 optical density unit at 260 nm equal to 50 ng/ μ L. All extracted DNAs were diluted to 20 ng/ μ L with sterile distilled water.

Primers and TaqMan Probes. The primers and probes used in the present study and the references 19 and 22–29 are listed in Table 1. The oligonucleotide DNA for PCR primers and TaqMan probes was synthesized by FASMAC Co. Ltd. (Kanagawa, Japan) and Applied Biosystems (Foster City, CA, U.S.A.). The probes were labeled with 6-carboxyfluorescein (FAM) and 6-carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) at the 5' and 3' ends, respectively, except that the CaMV-MGB probe was labeled with FAM at the 5' end and with nonfluorescent quencher linked with minor groove binder at the 3' end. For GM-line-specific detection, 11 GM maize lines (Bt11, E176, GA21, M810, M863, NK603, T25, TC1507, MIR604, D59122, and M88017) and 3 GM soy lines (RRS, A2704, and A5547) were selected as targets. primer-probe set information

Table 1. Primer and Probe Sequences

For GM Line-Specific Detection									
crop name	target name	type of detection	evaluation	primer or probe name	sequence (5'-3')	length (base)	amplicon size (bp)	ref	
maize	Bt11	construct-specific	A	Bt11 3'-5'	AAAGACCACACAGCAGCGCC	20	127	19	
				Bt11 3'-3'	CAATGGTTCGACCAAGTACT	23			
				Bt11-2-Taq	CGACATGACACAAACCCAAACATCA	27			
maize	E176	construct-specific	A	E176 2'-5'	TGTCACACAGCAACCAACAG	20	100	19	
				E176 2'-3'	ACTCCACTTTGTGCAAGACAGATCT	25			
				E176-Taq	CCGACGTGACCGACTACCACTCGA	25			
maize	GA21	construct-specific	A	GA21 3'-5'	GAAGCCTGSCAACGTCA	18	133	19	
				GA21 3'-3'	ATCGGTTGGMAAGGACTT	20			
				GA21-2-Taq	AGGATCCGGTGCATGGCCG	20			
maize	M810	construct-specific	A	M810 2'-5'	GATGCCCTCCCTAGTGTGGA	22	113	19	
				M810 2'-3'	GGATGCATCGTGTGATGTTTG	21			
				M810-Taq	AGATACCAAGCGCCATGGACACAA	26			
maize	M863	event-specific	A	M863 1'-5'	TGACCTACTTGTTCGGATGG	21	111	this study	
				M863 1'-3'	GCATTTGTAGTGTCCACCTTC	21			
				MON863-Taq	CACCCAAAGTGTACAAAGCTTCOGA	27			
maize	NK603	event-specific	A	NK603 1'-5'	GGCCAGCAAGCTTGTAGC	19	113	this study	
				NK603 1'-3'	ATCCGACTCTCTTCAAGCAT	24			
				revPM1	ATGACCTCGAGTAAGCTGTTAAGCGCGC	29			
maize	T25	event-specific	A	PM1	TCATTTGCCGTTTGGTCTCTGGA	23	155	22	
				revPM1	TACGACATGATACCTCTCCAC	22			
				FBP3	TCATTGAGTGGTTCGGCATTGTGG	25			
maize	TC1507	construct-specific	A	TC1507 1'-5'	TGAGTTGATTCAGTACTGCGCA	23	111	this study	
				TC1507 1'-3'	ATGTTAGTGCACAGCAACCG	23			
				TC1507-Taq	ACTCGAGTAAGATCCGTGACCTGCGAG	28			
maize	MIR604	event-specific	B	MIR604 primer F	GGCACAACGTTCCTTAATCT	18	76	23	
				MIR604 primer R	AGCGGGAAACGACAACTGATCATG	26			
				MIR604 probe	GGGATAGCAAGTAAAGCGCTC	26			
maize	D59122	event-specific	B	DAS59122-7-td1f	CCTTAATTCCTCCCTCATGTCAG	24	86	24	
				DAS59122-7-rd1r	TTTAAACTGAAAGGGGGAACGACAA	26			
				DAS59122-7-rd1s probe	ATCGTGTGACACGCTAGCA	20			
maize	M88017	event-specific	B	M88017 1'-5'	CATATTGACCATCATCTACTTGT	25	150	this study	
				M88017 1'-3'	TGCCGGAGTATGACGCTGACGATATTCA	30			
				M88017-1-Taq	CCTTTAGGATTTACGATCATGTTG	24			
soy	RRS	construct-specific	A	RRS 01-5'	GACTTGTGCGCGGGAAATG	18	121	19	
				RRS-Taq	CGCAACCGCCGCAATCC	19			
				KVM175	GCAAAAAGCGGTTAGCTCT	21			
soy	A2704	event-specific	B	SMC001	ATTCAGGCTGCGCACTGTT	21	64	25	
				TM031	CGGCTCCGATGGCCCTCC	21			
				A5547 1'-5'	CATCGCTATTGTGGGCATT	20			
soy	A5547	event-specific	B	A5547 1'-3'	GAATATGCAAGTGCCTGCCATAAC	23	114	this study	
				A5547-1-Taq	CGCAATGTGTCATACCGTCCATCGTGTGAG	28			

For r-DNA Segment-Specific Detection									
crop name	target name	type of detection	evaluation	primer or probe name	sequence (5'-3')	length (base)	amplicon size (bp)	ref	
consensus	P3S5	1'-3'	A	P3S5 1'-5'	ATTGATGTGATCTCCACTGACGT	26	101	19	
				P3S5 1'-3'	CCTCTCCAAATGAAATGAACCTCTCT	25			
				NOS ter 2'-5'	CCCACTATCTTCGGAGACCCCTTCCT	27			
consensus	TNOS	1'-3'	A	NOS ter 2'-3'	GTCTGCGATGATATCATATAAATTCGTG	29	151	19	
				NOS-Taq	CGCTATATTTGTTTTCTATCGGGT	25			
				AGATGGGTTTTTATGATAGAGTCCCGCAA	30				
consensus	PFMV	1'-5'	A	PFMV 1'-5'	ATCAACAGGTACGAGCCATATC	23	120	this study	
				PFMV 1'-3'	TGAGGCTTTGGACTGAGAATTC	22			
				PFMV-1-Taq	CCAAGAGAACTCCCATCCCTCAAGGTTT	30			
consensus	AINT	2'-5'	B	AINT 2'-5'	TCGTCAGGCTTAGATGTGTGAG	23	112	this study	

Table 1. Continued

For r-DNA Segment-Specific Detection (Cont.)							
crop name	target name	evaluation	primer or probe name	sequence (5'-3')	length (base)	amplicon size (bp)	ref
consensus	NPTII	A	ANT 2-3'	CTGCATTTTGCACAAATCATGAA	23		
			ANT 1-5'	TTTTGGGTAGAAATTTGAATCCCTCAGC	28		
			NP 1-3'	GACAGGTGGTCTTGACAMAAG	20	155	this study
consensus	PAT	A	NP1-1-Taq	GAACAGATGATTTGCCAGCC	27	19	this study
			pat 1-3'	CCCTGGCTGACACGCCGGA	27	161	
			pat 1-3'	AAGATGGATTTGATCTAGAGAGGT	27		
consensus	BAR	A	PAT-1-Taq	ATGCCTATGTGACACGTAAACAGTACT	22		
			bar 2-5'	TGCTTACGCTGGGCCCTGGAAG	20	186	this study
			bar 2-3'	AAACCCAGCTATGCCAGTTC	21		
consensus	GOX	B	BAR-1-Taq	CATGCTGGGGCGCGCGCTCAAGCAOGG	30	103	this study
			gox 2-5'	TGCAGAAACTTGAAGAGG	21		
			gox 2-3'	CGAAACAACCAAGCATGATG	21		
consensus	EPSPS1	A	GOX-1-Taq	TCCAAATGGCTTTCGACCCAAATGG	26	118	this study
			eposp 1-5'	GCCTCGTGTGGAAACCCCT	24		
			eposp 3-3'	TTGCTATCGGAGAGTTGATCTTC	24		
consensus	EPSPS2	B	EPSPS1-Taq	TGGACGATGCCACGATGATGSC	22		
			EPSPS2 1-5'	GTCTCGTTCCTGMAAACCCCTGT	22	118	this study
			EPSPS2 1-3'	TTAGTGTGGAGATTCGATCTTAG	23		
	EPSPS2-1-Taq		TGATCGCTACTAGTTCGCCAGAGTTTCAATGG	30			
For Endogenous Reference Gene-Specific Detection							
crop name	target name	evaluation	primer or probe name	sequence (5'-3')	length	amplicon (bp)	ref
maize	SSIIb	A	SSIIb 3-5'	CCAATCGTTTGACATCTGCTCC	22	114	26
			SSIIb 3-3'	GATCAGCTTTGGGTCGGGA	19	21	
soy	Le1	A	SSIIb-Taq	AGCAAGTCCAGAGGGCTGCAA	19	116	19
			Le1n02-5'	GCCTCTACTCCACCCCCCA	20		
			Le1n02-3'	GCCATCTGCAAGGCTTTT	26		
rice	SPS	A	Le1-Taq	AGCTTGGGCTTCTTCACTTCAC	18	81	27
			SPSF	TTGGCCCTGAACGGATAT	20		
			SPSP	CGTTGATCTTTTGGGGATG	20		
canola	HMG	A	SPSF	GACGGCAGGACGGCTGGGA	19	99	28
			hmg-F	GGTGTCTCTCTAAGGCGAAG	20		
			hmg-R	CTTCTCGGGGCTGCTCCAC	20		
consensus	18S/rRNA	A	hmg-P	CGGAGCCACTCGTGGCCGCAACTT	24	24	
			18S/rRNA 2-5'	TGTTGGCTTCGGAGTCGGAGTA	23	111	this study
			18S/rRNA 2-3'	GTTCGCAAGTTTGTGCTTTCA	24		
	18S/rRNA-2-Taq		TCGGGGGCGATTCTGATTTTCATAGTCAGA	28			
For Donor Organism-Specific Detection							
crop name	target name	evaluation	primer or probe name	sequence (5'-3')	length	amplicon (bp)	ref
CaMV	CaMV	A	CaMVF	GGCCATTACGCCAACGAAAT	19	89	29
			CaMVR	ATGGGCTGGAGACCCCAATTTT	21	21	
			CaMV-MGB	TTCTCCGAGCTTTGTC	16	16	

for the specific detection of M863, NK603, and TC1507 were obtained through personal communication with Kodama et al. We designed primer-probe sets for the detection of M88017 and A5547 by referring to the nucleotide sequence information from international patents WO/2005/059103 and WO/2006/108675, respectively. For recombinant DNA (r-DNA) segment-specific detection, we selected 10 target segments commonly introduced into some GM crops approved in Japan: the 35S promoter region derived from CaMV (P35S), the terminator region of the nopaline synthase gene derived from *Rhizobium radiobacter* (TNOS), the 35S promoter region of *Figwort mosaic virus* (PFMV), the intron region of the rice Actin 1 gene (AINT), a region of the neomycin phosphotransferase II gene (NPTII), a region of the phosphinothricin-*N*-acetyltransferase gene derived from *Streptomyces hygroscopicus* (PAT), a region of the phosphinothricin-*N*-acetyltransferase gene derived from *Streptomyces viridochromogenes* (BAR), a region of the glyphosate oxidoreductase gene derived from *Ochromobacterium anthropi* strain LBAA (GOX), a region of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene introduced into NK603, M88017, and RRS (EPSPS1), and a region of the gene introduced into RT73 (EPSPS2). With respect to the detection of PFMV and AINT, the primer and probe sets were designed by referring to the nucleotide sequence information from GenBank (Accession Nos. NC003554 and X63830, respectively). For NPTII, PAT, BAR, and GOX detection, the previously reported primers (30) were adopted and probes were designed between the primers by referring to the nucleotide sequence information from GenBank (Accession Nos. U00004, DQ156557, X05822, and AR016595, respectively). The primers for EPSPS1 have been previously reported (30), and the probe was designed by referring to nucleotide sequences (U.S. Patent 5633435 SEQ ID No. 2 and GenBank Accession No. AB209952). The primers and probe for EPSPS2 were designed by referring to a nucleotide sequence (U.S. Patent 5633435 SEQ ID No. 9). For endogenous reference gene-specific detection, the following target regions of genes were selected: a region of the starch synthase IIb gene of *Zea mays* (SSIb), a region of the lectin 1 gene of *Glycine max* (Le1), a region of the high-mobility-group protein I/Y gene of rapeseed (HMG), a region of the sucrose phosphate synthase gene of *Oryza sativa* (SPS), and a region of the 18S rRNA gene common in crop plants (18SrRNA). The 18SrRNA gene sequences of some kinds of crops such as *Zea mays* (GenBank Accession No. AF168884), *Hordeum vulgare* (GenBank Accession No. AY552749), *Gossypium hirsutum* (GenBank Accession No. L24145), *Solanum tuberosum* (GenBank Accession No. X67238), *Oryza sativa* (GenBank Accession No. AF069218), *Glycine max* (GenBank Accession No. X02623), *Nicotiana tabacum* (GenBank Accession No. AJ236016), and *Triticum aestivum* (GenBank Accession No. AJ272181) were aligned, and the DNA region that matched completely in these crops was selected for the design of the primer-probe set. For donor organism-specific detection, CaMV was selected as a target.

Preparation of Real-Time PCR Array, Reaction Conditions, and Data Analysis. For the preparation of the real-time PCR array, 2 μ L of a primer and probe mixture containing 2.5 μ M primers and 1 μ M probe was added into each well of a 96-well plate and sealed with MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems). For a negative control test with no primers or probes, sterile distilled water was used in place of the primer and probe mixture. Array plates containing primer and probe mixtures were preserved under -20 °C until just before use. For the assay of sample DNA with the real-time PCR array, the diluted DNA samples described above, TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) and sterile distilled water were mixed and added into each well at a volume of 8 μ L. Finally, 10 μ L of

the reaction mixture in each well contained 20 ng of genomic DNA, 5 pmol of 5' primer, 5 pmol of 3' primer, 2 pmol of a probe, and 5 μ L of TaqMan Universal PCR Master Mix. The plates containing reaction mixtures were sealed with MicroAmp Optical Adhesive Film, thermal cycled with the ABI PRISM 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems), and then data analysis was carried out using Sequence Detection Software version 1.4 (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions were as follows: 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, 45 cycles of 15 s at 95 °C, and 1 min at 60 °C under 9600 emulsion mode. Data analysis was performed using the "Amplification Plot" feature of the analysis software, and the detail settings were set at the "Delta Rn vs. Cycle" view with Manual Ct mode (Threshold, 0.256) and Manual baseline mode (start of baseline, 3; end of baseline, 10). Amplification lines crossed with the threshold line were determined as positive.

Evaluation of Specificity. To evaluate the specificity, DNA extraction was performed twice from each ground sample, and each DNA sample was analyzed three times. For A2704, A5547, and LLRICE62, two parallel dilutions of CRM samples were performed and the resultant samples were analyzed three times each. Specificity was confirmed when the six sets of PCR data corresponded to the relevant information. The A- and B-groups of the primer-probe sets listed in Table 1 were evaluated separately.

Evaluation of Sensitivity. To evaluate the sensitivity, simulated test samples containing GM crops at several concentrations were prepared. Ground GM crop samples were mixed in ground non-GM crop samples at different mass fractions, and the following samples were prepared: 0.1% Bt11, 0.1% E176, 0.1% M863, 0.1% each of 8-line mixtures of GM maize (Bt11, E176, GA21, M810, M863, NK603, T25, and TC1507), 0.25% Bt11, 0.25% E176, 0.25% the 8-line mixture of GM maize, and 0.25% RT73. The ground RRS sample was mixed with the ground non-GM soy sample at a mass fraction of 0.1%. For MIR604, D59122, and M88017, two parallel DNA extractions and dilutions were performed and the samples were mixed with non-GM maize DNA samples (20 ng/ μ L) at a concentration of 0.25%. For A2704 and A5547, two parallel dilutions of CRMs were performed and the resultant samples were then mixed with non-GM soy DNA samples (20 ng/ μ L) at a concentration of 0.25%. For LLRICE62, two parallel dilutions of CRMs were performed and the resultant samples were mixed with non-GM rice DNA samples (20 ng/ μ L) at a concentration of 0.25%. Two DNA solutions for every simulated sample were analyzed five times each. The A- and B-groups of the primer-probe sets listed in Table 1 were evaluated separately. To evaluate the sensitivity of CaMV detection, DNA extracts were prepared from ground plant leaves infected with the virus (MAFF No. 104019), and they were then analyzed in order to calculate the copy numbers of P35S derived from CaMV by quantitative analysis of the P35S region using the standard method for the detection of GM crops in Japan, as detailed in "The Genetically Modified Food Test and Analysis Manual for Individual Products" by the Food and Agricultural Materials Inspection Center (31, 32). Diluted samples containing the CaMV genome at concentrations of 10^4 , 10^3 , 10^2 , and 10 copies were prepared and assayed with real-time PCR array. Two dilution samples for each concentration were prepared, and each was analyzed five times.

Evaluation of Linearity of Amplification in Semiquantitative Analyses. We evaluated linearity with respect to cycle threshold (Ct) values and the copy number of target DNAs. Detections for Bt11, E176, GA21, M810, P35S, TNOS, and SSIb were selected as a representative detection system in the

Figure 1. Spreadsheet application, Unapproved GMO Checker version 2.01.

real-time PCR array. Five concentrations (8, 50, 600, 8000, and 100 000 copies per reaction) of control plasmids (19) containing the nucleotide sequences of the above-mentioned seven targets were purchased from Nippon Gene.

Development of the Spreadsheet Application, Unapproved GMO Checker. We used Microsoft Excel 2007 to construct a spreadsheet application, Unapproved GMO Checker version 2.01. The worksheet is shown in Figure 1. As an input form for an experimental result, the crop name of the analytical sample was designed to be selectable from "Maize," "Soy", or "Rice", and checkboxes were prepared to input the qualitative results of the real-time PCR array. The "Check" button is linked with a macro that integrates experimental results in the input form and estimates the possibility of unapproved GM crop contamination. We created three columns, "Validity of the experimental result," "Comment about approved GMO", and "Comment about unapproved GMO," for the output of verification results and a checkbox for the output of r-DNA segments in the unapproved GMO. The logics in the macro were designed so that the validity of experimental results would be confirmed first. For this purpose, the checker examines the correspondence of all of the relationships between the selected crop name and the results of endogenous reference gene-specific detection, as

well as those between the selected crop name and the results of GM line-specific detection. Additionally, it checks whether all the expected r-DNA segments elicited from the results of GM line-specific detection were detected. If all of these conditions are satisfied, the message "Reasonable" appears as the output in the first column, "Validity of the experimental result," and the macro continues to the next step in the process. If the conditions are not satisfied, the message "Unreasonable" appears as the output in the first column, "Verification was impossible" appears below "Comment about approved GMO" and "Comment about unapproved GMO", and the macro would be finished. Next, contamination of an approved GMO would be examined based on the results of GM line-specific detection. If approved GM crops are detected, the message "Approved GMO was detected" appears under "Comment about approved GMO"; if not, "Approved GMO was not detected" appears. Finally, unapproved GM contamination would be examined. For this purpose, the expected r-DNA segments deduced based on the results of GM line-specific detection would be compared with the results of r-DNA segment-specific detection. If r-DNA segments other than the expected r-DNA segments are detected, contamination by unapproved GM crops would be suspected, the message "Possible contamination by an unapproved GMO"

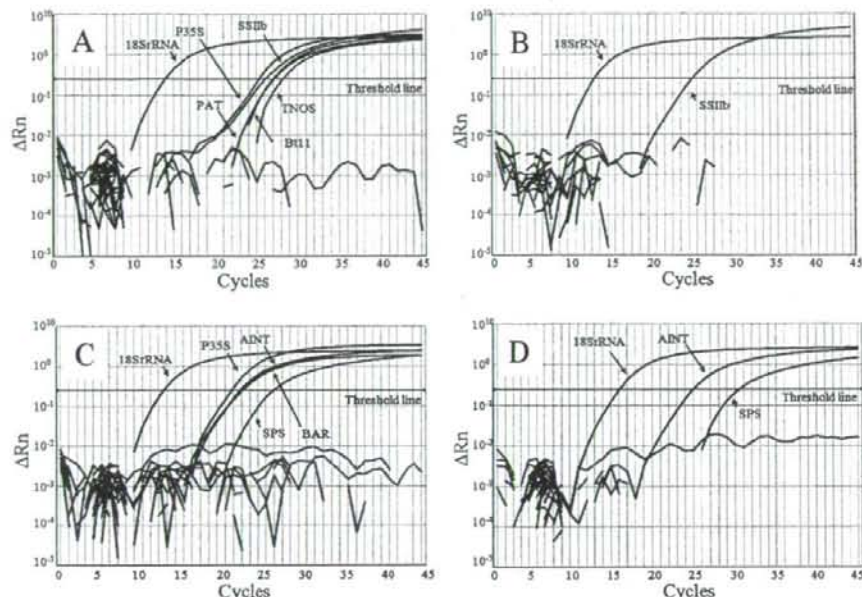


Figure 2. Representative amplification curves in real-time PCR array results. The horizontal axis indicates the cycle numbers of PCR, and the vertical axis indicates the ΔRn values, which are the relative values automatically calculated by the analysis software based on signal intensities of FAM dye dependent on the target amplification and ROX passive reference dye. The DNA samples derived from Bt11 (A), non-GM maize (B), LLRICE62 (C), and non-GM rice (D) were assayed for 31 targets as described in the Materials and Methods section. The arrows with target names indicate corresponding amplification curves that were determined to be positive.

would appear under "Comment about unapproved GMO", and the segments expected to be contained in the unapproved GM crop would be shown in the checkbox below "Recombinant segments in the unapproved GMO".

RESULTS AND DISCUSSION

Design of the Real-Time PCR Array. The real-time PCR array was designed for the comprehensive detection of GM crops. In the present investigation, a total of 30 primer-probe sets were prepared for GM line-specific detection including event-specific and construct-specific detections as previously reported by Holst-Jensen et al. (20), r-DNA segment-specific detection, endogenous reference gene-specific detection as a positive control test, and donor organism detection as a negative control test. GM line-specific primer-probe sets were designed for the detection of representative GM maize and soy lines, aiming for the efficient detection of approved GM maize and soy lines. Meanwhile, all 69 lines of LMOs approved for open-field cultivation or provision as food, feed, or ornamental plants under Cartagena Protocol domestic law in Japan were expected to contain at least one target of the r-DNA segment detections based on the published information. The r-DNAs common in many GM crop lines were confirmed to be amplified, and r-DNA segment-specific detection was found to be effective for the detection of an extremely broad range of GM crop lines. The present system is expected to be a useful tool for screening GM crops regardless of GM lines and would be helpful to strictly distinguish GM and non-GM seeds for the practical coexistence of GM crop farming and conventional farming.

The reaction conditions were designed by referring to Japanese standard methods and the validated European methods according to the Web site of "Community Reference Laboratory for GM Food and Feed" (<http://gmo-crl.jrc.it/statusofdoxx.htm>).

For cost reduction, the volume of the reaction mixtures was set at 10 μ L, which is the smallest volume recommended by the manufacturer of the real-time PCR apparatus. The total experimental work for one assay including the preparation of the PCR mixtures, thermal cycling, and data analysis took only 3 h. Representative assay results of the real-time PCR array with 31 targets containing 30 designed reactions and a negative control reaction with no primer-probe set are shown in Figure 2. The following detections were clearly determined to be positive: 18SrRNA, SSIIB, Bt11, P35S, TNOS, and PAT for Bt11 maize; 18SrRNA and SSIIB for non-GM maize; 18SrRNA, SPS, P35S, AINT, and BAR for LLRICE62; 18SrRNA, AINT, and SPS for non-GM rice. These results are consistent with the publicly available information regarding GM-crops. The present real-time PCR array successfully distinguished GM and non-GM crops and provided information regarding the GM lines and the r-DNA segments by a simple assay.

Evaluation of Specificity. To evaluate the specificity, the samples were prepared and six assays were performed. None of the qualitative results presented in Table 2 showed any discrepancy with the expected results based on the published information about recombinant DNA from the Agbios website (<http://www.agbios.com/main.php>). In addition to the results shown in Table 2, non-GM wheat, barley, cotton, sugar beet, and potato samples were assayed, and only 18SrRNA was positive as predicted. Throughout the specificity evaluation, no nonspecific amplification attributed to the inappropriate design of primers or probes was observed, and the detection system was found to be applicable to a broad range of crops including maize, soy, rice, canola, wheat, barley, cotton, sugar beet, and potato. With respect to CaMV detection, the DNA samples extracted from three types of CaMV-infected plant leaves were assayed and specific amplification was identified. In addition

Table 2. Results of Specificity Evaluation

type of detection	target name	sample name																						
		B11	E176	GA21	M810	M863	NK603	T25	TC1507	MIR604	D59122	M88017	non-GM maize	RRS	A2704	A5547	non-GM soy	LLRICE 62	non-GM rice	RT73	non-GM canola			
GM line-specific detection	B11	+																						
	E176		+																					
	GA21			+																				
	M810				+																			
	M863					+																		
	NK603						+																	
	T25							+																
	TC1507								+															
	MIR604									+														
	D59122										+													
	M88017											+												
	RRS												+											
	A2704													+										
A5547														+										
P355															+									
TNOS																+								
PFMV																	+							
AINT																		+						
NPTII																			+					
PAT																				+				
BAR																					+			
GOX																						+		
EPSPS1																							+	
EPSPS2																								+
SSIIb																								+
Le1																								+
SPS																								+
HMG																								+
16SRNA																								+
CaMV																								+
NTC																								-

Table 3. Results of Sensitivity Evaluation^a

type of detection	target name	sample name												
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K		
GM line-specific detection	Bt11	0	0	10	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	
	E176	0	0	0	10	10*	0	0	0	0	0	0	0	
	GA21	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	
	M810	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	
	M863	10*	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	
	NK603	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	
	T25	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	
	TC1507	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	
	MIR604	0	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	0	0	
	D59122	0	0	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	0	
	M88017	0	0	0	0	0	0	0	10*	0	0	0	0	
	RRS	0	10*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	A2704	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10*	0	0	
	A5547	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10*	0	0	
	r-DNA segment-specific detection	P35S	10*	10	10	10	10	0	10	10	10	10	0	0
		TNOS	10*	10	10	0	10	10	0	10	0	0	0	0
PFMV		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10*	
AINT		10*	0	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	
NPTII		10*	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	
PAT		0	0	10*	0	10	0	10	0	10	0	0	0	
BAR		0	0	0	10*	10	0	0	0	0	10	0	0	
GOX		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10*	
EPSPS1		0	10*	0	0	10	0	0	10	0	0	0	0	
EPSPS2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10*	
endogenous reference gene-specific detection	SSIIb	10	0	10	10	10	10	10	10	0	0	0	0	
	Le1	0	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	
	SPS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	
	HMG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
donor organism-specific detection	18SrRNA	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	
	CaMV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	negative control	NTC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

^a Sample A, 0.1% M863; B, 0.1% RRS; C, 0.25% Bt11; D, 0.25% E176; E, 0.25% the 8 lines of GM maize; F, 0.25% MIR604; G, 0.25% D59122; H, 0.25% M88017; I, 0.25% A2704 and A5547; J, 0.25% LLRICE62; K, 0.25% RT73. The value of each element indicates the number of positive detections in a total of 10 assays. Asterisks indicate data used for the evaluation of the sensitivity of individual detections.

to the CaMV detection, the P35S, HMG, and 18SrRNA detections were also positive for all infected leaf samples. The detection of P35S was attributed to the genome of infected CaMV, and the detection of HMG and 18SrRNA was caused by plant leaves of *Brassica napus* or a closely related species.

Evaluation of Sensitivity. The preparations of simulated samples and their 10 assays were performed as indicated in Table 3. False-negative results were observed in the assay with several simulated samples containing GM crops at a concentration of 0.1%, specifically, 0.1% Bt11, 0.1% E176, and 0.1% the 8 lines of GM maize, but not in the assay with the 0.25% GM samples. The false negative results were considered to have been caused by small copy numbers of target DNAs. We observed high sensitivity of individual reactions for GM line-specific and r-DNA-specific detections under low concentrations of target DNA (Table 3, asterisks). Because maize and canola seeds are reproduced through cross-pollination while soy and rice generally self-pollinate, some maize and canola seeds have a commonly heterozygous genome. Therefore, to evaluate the sensitivity for these crops, it is thought to be better to use heterozygous samples. Since the zygosity of the M88017 and RT73 CRMs purchased from AOCS have not been defined, we have to note that the copy number of target DNAs in a 0.25% M88017 or 0.25% RT73 sample corresponds to that of a sample made from absolutely heterozygous seeds with a concentration between 0.25% and 0.5%. Concerning CaMV detection, no false-negative results were obtained in the 10 assays with diluted DNA samples at a concentration of 100 copies/ μ L of CaMV DNA. Meanwhile, amplification failed 6 times in the 10 assays with the diluted samples at a concentration of 10 copies/ μ L of

CaMV DNA. These results suggest that the minimum concentration of CaMV DNA for a reliable result is 100 copies/ μ L. We speculate that 0.5% of GM contamination in conventional maize, soy, canola, or rice would allow us to obtain accurate results in all wells of the real-time PCR array. The present results demonstrate that the sensitivity of our proposed method is sufficient for the inspection of unintended mixing of approved GM crops under Japanese regulations with a threshold of 5%.

Evaluation of Linearity of Amplification in Reactions. We evaluated the linearity of amplification in several representative detections using the control plasmids for the Japanese standard GM analytical method (32). The plasmids were tested six times, and the Ct values derived from amplification data were plotted against the log value of the copy number of control plasmids. The linear-regression curves from the means of the Ct values and that of the standard deviation in six assays were obtained (Figure 3). We found a relatively large dispersion of Ct values with a small copy number of plasmids. However, all R^2 coefficient values were above 0.99, and linearity of amplification for the seven detections was ascertained. In addition, because the shapes of the amplification curves in the reactions other than these seven reactions indicated in Figure 3 were also similar and alteration of Ct values dependent on GM crop contents was observed (data not shown), all of the reactions were also expected to demonstrate similar linearity of amplification. Furthermore, TaqMan PCR is generally used for quantitative assays. Therefore, the present system shows potential for semiquantitative use, and further investigation is recommended.