

## 陳述書 ( 3 )

金川 貴博

私は、これまで、疎甲 1 9 号証の陳述書と疎甲 8 0 号証の陳述書 ( 2 ) で、ディフェンシン耐性菌の出現の可能性とそれが持つ大きな危険性について陳述しました。このたび、私の陳述に対して、債務者側から、いくつかの批判が出されましたので、この書面で、これらの批判に対してできるだけ分かりやすく答えるとともに、再度、これまで私が述べてきたことを整理して述べたいと思います。

### 目次

#### 1、私が指摘した問題

#### 2、その根拠について

- (1)、一般論として、植物ディフェンシン耐性菌が出現する可能性がある。
- (2)、一般論として、ディフェンシン耐性菌は危険なものであり得る。
- (3)、本実験に使用されているカラシナディフェンシン遺伝子導入イネの栽培によって、ディフェンシン耐性菌が出現する可能性が大いにある。
- (4)、出現したディフェンシン耐性菌は危険なものであり得る。

#### 3、最後に

#### 1、私が指摘した問題

私が 2 つの陳述書で指摘した問題は、次の 4 つです。

- (1)、一般論として、植物ディフェンシン耐性菌が出現する可能性がある。
- (2)、一般論として、ディフェンシン耐性菌は危険なものであり得る。
- (3)、本実験に使用されているカラシナディフェンシン遺伝子導入イネの栽培によって、ディフェンシン耐性菌が出現する可能性が大いにある。
- (4)、出現したディフェンシン耐性菌は危険なものであり得る。

#### 2、その根拠について

- (1)、一般論として、植物ディフェンシン耐性菌が出現する可能性がある。
  - a . 陳述書 ( 2 ) ( 疎甲 8 0 号証の第 1 の 1 ) で述べたように、植物ディフェンシンに対する耐性菌の出現を記述した論文が既に 2 つあります。

b . これに対し、債務者の職員である川田氏が疎乙 1 0 5 号証で、次のように反論をしています。「引用した原論文のディフェンシン抵抗性変異株は、・・・自然界では起こりえないような特殊な突然変異誘発処理あるいは抗生物質抵抗性を利用した 2 重選抜実験をして、人工的に作出した変異株である。つまり、自然界での一般的な薬剤耐性菌のように抗菌剤と頻繁に接触することにより淘汰圧によって生じた耐性菌ではないのである」( 3 ~ 7 行目 )

c . しかし、これは川田氏が、この原論文の内容を読み間違えた結果生じた誤認です。この誤認が、債務者側において、耐性菌出現の可能性を軽視することにつながり、本 GM イネの栽培にあたって耐性菌に対する安全対策を怠った要因になっていると推定されます。

そこで、少し詳しくこの原論文 ( 疎甲 8 3 号証 ) について解説します。この原論文には、突然変異誘発処理を利用した抵抗性変異株を使った実験の結果が示されているので、突然変異誘発処理をした実験だけしか行っていないように勘違いしやすいのですが、抵抗性変異株の作り方のところを注意深く読むと、177 ページ右の 2.2 の項目の 8 行目に「自然に起きる変異の割合を計算するために ( To calculate the rate of spontaneous mutagenesis ) エチルメタンスルホン酸を加えないで ( EMS was omitted ) 胞子を同様に処理した」と記述してあります。つまり、突然変異誘発剤を使っていない実験も行ったのです。そして、その結果として、「変異株の出現は、薬剤処理をしなかった場合と比較すると 8 倍も高い頻度で起こった ( 孢子 40 万個に 1 個と 340 万個に 1 個 )」( 179 ページ左の 3.1 の項目の 5 行目 )、つまり、自然に起きる変異は、孢子 340 万個に 1 個の割合だったという結論が得られています。

さらにまた、川田氏の論文 ( 疎甲 2 3 ) には、「変異株の解析による最近の報告では、酵母 ( *S. cerevisiae* ) における・・・」( 231 ページ右欄、下から 7 行目 ) という記載があって、もう 1 つ別の耐性菌が記述されています。ただし、川田氏が引用した原論文には、この耐性酵母の作成方法が記載されていません。この耐性酵母の作成方法は、学術誌 *Molecular Plant-Microbe Interactions* の 13 巻, 54-61 ページ ( 2000 年発行、疎甲 8 2 号証 ) に記載があります。これによれば、水 1 ml にブドウ糖 20mg などを溶かした液に、フジイロテンジクボタンが作るディフェンシンを 5 マイクロモル濃度になるように入れて、そこへ、酵母を 1ml あたり 100 万個から 200 万個になるように入れ、30 で 2 日間放置したら、ディフェンシン耐性の酵母が得られたことがわかります ( 60 ページ右の第 3 段落 )。この実験

では、突然変異誘発剤はまったく使用されていません。

e . くり返しますと、川田氏は、「自然界での一般的な薬剤耐性菌のように抗菌剤と頻繁に接触することによる淘汰圧によって生じた耐性菌ではないのである」(疎乙105号証)と書いていますが、これは、明らかに原論文の読み間違いで、上記のとおり、ディフェンシンとの頻繁な接触で自然に変異が起こって耐性菌が生じることがわかります。

また、川田氏は「自然界で耐性菌の出現の報告はない」(乙第105号証)と述べていますが、川田氏自身が疎甲23号証で「植物由来のディフェンシンは発見から日が浅く、まだまだ未知の領域が多い」と記述している状況において、今までに報告がないからといって、存在しないという結論を出すことはできません。

f . むしろ、これらの原論文(疎甲82および83号証)を読めば、微生物が生育できる条件下で、ディフェンシンと頻繁に接触することにより、実験室内で容易に耐性菌を作り出せることがわかりますから、自然界でも、ディフェンシンと頻繁に接触する状態をつくれれば、耐性菌が出現するものと推定できます。

g . 河田昌東氏の陳述書(疎甲81)の3頁に引用されている、ディフェンシンの包括的なレビューであるマイケル・R・イエマンとナンネット・Y・ヨウントの論文には、「抗菌ペプチドに対して耐性を持たない病原菌がいると期待するのは非現実的である」と指摘してあります。このように、耐性菌出現の可能性は十分にあります。

## (2)、一般論として、ディフェンシン耐性菌は危険なものであり得る。

a . ディフェンシン耐性菌は、動植物の防御機構の一端を打ち破るのですから、耐性菌が影響を及ぼすことは容易に想像できます。カラシナを例にとるなら、カラシナディフェンシン耐性菌が出現すると、カラシナは、この菌の攻撃に弱くなります。この耐性菌がカラシナの病原菌であれば、カラシナは大打撃を受けるでしょう。他の動植物では、ディフェンシンの構造が異なるとはいえ、ここで問題なのはディフェンシンの作用機構です。もしも、微生物の同一の部分に攻撃するようなディフェンシンなら、たとえ、ディフェンシンの構造が違っていても、その攻撃部分を変異させた菌には無効です。疎甲82号証の論文には、フジイロテンジクボタンのディフェンシンに耐性の酵母は、マロニエが作るディフェンシンにも、チョウマメが作るディフェンシンにも、同レベルの耐性を示したと記載されています。

こうして、特定の植物が大打撃をうけるということは、生態系に大きな影響が出て、私たちの生活にも影響するでしょう。また、耐性機構次第では、ヒトにも影響することが考えられます。

b. これに対し、乙第106号証で、研究者の高木氏は、「第2 ヒトディフェンシンとカラシナディフェンシンは違う」(2 ページ)として、この項目で、ディフェンシンの構造の違いを述べ、「構造も機能も全く異なる植物ディフェンシンの一つに過ぎないカラシナディフェンシン耐性の菌が仮にどこかに出現したとしても、それにより、ヒトが何らかの影響を受けることは到底考えられない」(3 ページ4 行目)と反論していますが、しかし、ここで問題となるのは、ディフェンシンの構造なのではなくて、ディフェンシンの作用機作です。ディフェンシンが微生物のどの部分を攻撃するのかということが重要なのです。微生物が変異して、攻撃部分の構造を変化させれば、ディフェンシンの構造がいかによっても、変異した微生物の攻撃を受けることになるからです。

c. このディフェンシンの作用機作について、高木氏は、乙第106号証5 ページの「作用機作について」の項目の2 行目に「甲第19号証では、・・・ディフェンシンの作用機作が全く不明であるといった主旨のことが論じられているが」と書いてありますが、私はそんなことは論じておりません。

「植物由来のディフェンシンは発見から日が浅く、まだまだ未知の領域が多い」という川田氏の見解(疎甲23号証)を引用しただけです(疎甲第19号証4 ページ8 行目)。実際のところ、高木氏自身のこの段落の記載を見てもわかるとおり、「明らかにされつつある」(6 ページ15 行目)「科学的に解明が進んでいる」(6 ページ26 行目)のであり、まだ、研究途上であって、不明点が多いのが現状です。このような現状では、ディフェンシン耐性菌が生態系やヒトの健康に及ぼす悪影響を否定することは不可能です。もっと、解明が進まない限り、「ディフェンシン耐性菌は危険なものであり得る」ということを否定することができません。したがって、現状では、かなり大きな影響があるだろうと考える方が論理的であると思います。

**(3)、本実験に使用されているカラシナディフェンシン遺伝子導入イネの栽培によって、ディフェンシン耐性菌が出現する可能性が大いにある。**

a. 疎甲82号証や83号証の論文には、水にディフェンシンと微生物と微生物のエサになる物質とを混ぜて放置するだけで、数百万分個に一個の割合で、数日以

内に耐性菌が現れることが記載されています。

一般に、水田には微生物のエサになる物質が存在しており、水田の水や土壌中において微生物は活発に増殖しています。水田土壌 1 グラム中の細菌数は、数億個ないし数十億個に及びます。ただし、寒天などを用いて培養法で調べると、そのうちの 1 % 未満しか生育してこないのもので、過小評価をすることになりますが、それでも、1 グラムあたり、数百万個にはなります。耐性菌の出現には十分な量の微生物が水田には生育しています。

本 GM イネには、カラシナディフェンシン遺伝子とイネの緑葉組織特異的発現プロモーターとを結合して導入してあり、ディフェンシンを常時作り続けるように加工してあります。つまり、カラシナディフェンシン遺伝子の本来の発現調節を担う部分を切り離して、イネの緑葉組織特異的な発現調節を行う部分と人工的に結合することで、常時ディフェンシン遺伝子を発現するようにしてあります。これにより、このイネのカラシナディフェンシン生産は、病原菌の攻撃に応じた調節が効くしくみになっていないので、このイネが病原菌に強くなっているということは、常に病原菌を撃退できる量またはそれ以上の量のディフェンシンを生産していることを意味します。このように、本野外実験は、多量のディフェンシンを常時作り続けるイネを、水をはった水田で栽培するのです。その結果、イネの茎から漏出したディフェンシンが水に溶けて拡散し、多くの微生物と接触することになり、耐性菌出現の条件が完璧に整うことになります。このイネの茎の傍ではディフェンシン濃度が高く、離れればディフェンシン濃度が低いという状況が生まれますから、耐性菌の出現には好都合になります。つまり、ディフェンシン濃度の低い場所では生き残るものが多くいて、この中から濃度の高いところでも生き残るものが生じてきて、耐性菌の出現の確率を高めることになります。

さらに、この水田では、ディフェンシンが常にイネから供給されることから、ディフェンシンに耐性のない微生物の生育が阻害されるので、耐性菌は生存競争に有利であり、このことが、耐性菌の増殖を促進することになります。

以上のことから、今回の栽培実験では、水をはった水田そのものが、耐性菌を優制的に繁殖させるための巨大な培養装置になっております。その結果、今回の実験では、ディフェンシン耐性を持った様々な種類の微生物が水田の水や泥の中に増殖していると考えられます。

b . これに対し、疎乙第 1 0 6 号証で、研究者の高木氏は、次のように反論します。

「カラシナのディフェンシンは既に、歴史的に栽培されてきているカラシナが産生していることから、耐性菌が出現する可能性がある場合にはすでに出現しているはずであるし、可能性がない場合にはないことになる。すなわち、本組換えイネがある以前に、そのような可能性は歴史上既にあったはずであり、本組換えイネを栽培することによって耐性菌出現の可能性が特段に増大するとは考えられない」(4ページ第3段落)。

c. しかし、この反論は、高木氏が本 GM イネの性質を誤解していることを明確に示しています。その理由を、順を追って説明します。

カラシナの場合には、ディフェンシンが必要に応じて生産されるように、遺伝子レベルでの調節を受けていますが、これに対し、本 GM イネは、そのような調節を受けません。本 GM イネには、カラシナディフェンシン遺伝子とイネの緑葉組織特異的発現プロモーターとを結合して導入してあり、ディフェンシンを常時作り続けるように加工してあります。自然界では有り得ない組み合わせを人工的に行うことで、ディフェンシン遺伝子の本来の発現調節を無効にして、常時ディフェンシン遺伝子を発現するようにしてあります。その実証が、今回の北陸研究センターの第一種使用規程承認申請書(疎甲21号証)の11頁(4)二の「組換えイネAD97系統のT2世代を供試して、RNAを抽出し、DEF断片をプローブとしてノーザン解析を行った結果、供試した全ての組換え個体において、茎及び葉特異的にDEFに由来するRNAバンドが検出された」という記載であり、この記載はディフェンシン遺伝子が常に発現していることを示すもので、いもち病などの病原菌のあるなしにかかわらずディフェンシンを常時生産していることを物語っています。即ち、イネにとってディフェンシンが不必要な状況でも、ディフェンシンを常に生産することになります。しかも、このイネのカラシナディフェンシン生産は、病原菌の攻撃に応じた調節が効きませんから、イネが病原菌に強くなっているということは、病原菌を撃退できる量またはそれ以上のディフェンシンを常に生産していることを意味します。このように、過去にはあり得なかった人工的な遺伝子の組み合わせを行うことにより、常時多量のディフェンシンを生産するように加工したイネなのですから、過去の事実が推定の役に立たないのです。

ところで、高木氏はこのことを理解せず、何度も過去の例を引き合いに出して、反論することを再三試みていますが、本 GM イネを栽培することにより、ディフェンシンを常時多量に生産するという歴史上かつてなかった新たな状況を作り出

すわけで、過去の例が参考になりません。したがって、乙第106号証の3ページ10行目の「ところがパン酵母は・・・人類に悪影響を与えた事実はない」、さらに、その次の「本組換えイネが登場しなくても、・・・」の段落、4ページの第4の第2段落「カラシナディフェンシンはすでに、歴史的に・・・」その次の「本件の組換えイネ・・・」の段落、さらにその次の「同じく・・・」の段落、7ページの最初の「土壌微生物・・・」の段落、その次の「さらに、・・・」の段落は、いずれも不当な論述です。これは、高木氏が本 GM イネの上記の性質を理解していなかったがために生じた誤解に基づくもので、反論になっておらず、理解不足を露呈するだけの結果になっております。

#### (4)、出現したディフェンシン耐性菌は危険なものであり得る。

a . すでに、(2)で述べたとおりであり、生態系への危険性も、ヒトへの危険性も考えられます。しかも、本野外実験では、耐性菌出現に対して、何の安全策も講じておらず、非常に危険な実験が行われています。

b . これに対し、乙第106号証で、高木氏は次のように反論します。

「現在のところ、このようなディフェンシン耐性菌の出現による何らかの負の影響について報告は一切ないし、その危険性を指摘する科学的な議論も持ち上がっていない」(3頁下から12行目以下)。しかしながら、すでに(3)で指摘したとおり、これは高木氏が本 GM イネの性質を誤解したことによる反論で、過去の事例からの推論はできません。

c . また、乙第106号証の2ページ最終行の「ヒトは免疫系、インターフェロン系、蛋白系の防御系など多重の自己防衛系を有しており、ヒトの生態防御系の根幹を成すのは免疫システムである」という記載は、ディフェンシンの役割を不当に低く見積もるものです。

本 GM イネを開発した川田氏らの記載(疎甲23号証)では「哺乳類のディフェンシンについては、近年、・・・微生物の撲滅に直接関わっているという知見が増えてきた。」(230ページ左8行目)とあり、その重要性への認識が近年高まりつつあることがわかります。

d . さらに、乙第106号証の5ページ6行目「ディフェンシンに耐性菌ができて、・・・他の機構で対応可能である」とありますが、これは生物の持つ防御機構の一部が無効になることをあまりに軽視した見解であり、本 GM イネを作った川田氏らの「抗菌蛋白質は、病原菌などに対する防御機構の一つとして重要な役割

を担ってきたと考えられる」(疎甲23号証229ページ左9行目)の記述とも対立する見解であることを申し添えておきたいと思えます。

### 3、最後に

乙第106号証で、高木氏は、「なお、金川氏は、別添資料に示したとおり・・・」(7ページ)と書いて、私の陳述の信用性を疑っています。確かに、私はバイオ作物を専門としていませんが、私の陳述は、耐性微生物に関するもので、私は微生物の専門家としての知識から陳述をしております。特に専門とするのが、廃水処理技術(下水処理)であり、日本においては、全下水処理場が微生物法で下水を処理しており、工場廃水処理についても、ほとんどの工場が微生物法を採用していることから、廃水処理技術を主な対象にして、微生物の研究を行っております。廃水や廃棄物による土壌汚染や排ガスの問題にも、微生物の専門家の立場から、微生物を利用した処理の研究を行っており、処理に活躍する複合微生物系の研究が専門です。微生物の解析には、DNA分析を主に使うところから、微生物のみならず、ヒトや植物の遺伝子解析方法についても、論文を発表しています。バイオ作物については、この分野でもっとも権威のある論文誌である *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(米国化学会が発行)に「蛍光消光プローブPCR法による遺伝子組換えダイズの定量」と題する論文を、53巻7号2535-2540ページ(2005年)に発表しております。私はバイオ作物の研究者ではありませんが、このように、この分野でも一流誌に論文を書いていることを申し添えます。