

平成18年5月7日

新潟地方裁判所高田支部 御中

## ディフェンシンの組換えイネからの流出可能性に関する

## 追加実験の概要（追加資料）

茨城県つくば市観音台2-1-18

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構

作物研究所 所長

黒 田 秧



平成17年(ワ)第87号、平成18年(ワ)16号遺伝子組換えイネ野外実験栽培差止め等事件において組換えイネからのディフェンシンの流出可能性が議論されているようです。

この点に関しては、すでに乙19号証の「ディフェンシンによる耐性菌出現問題等に関する報告書」(平成17年9月24日付)の「黒田報告書の第1項に関する実験の概要」(以下、この実験を「本実験」といいます)にお示したとおり、かような流出の可能性が科学的に観察において考えられないと結論づけられる旨述べました。

他方、本実験については、原告側より、(1)超純水使用が自然条件と異なる、(2)10℃での浸せき実験は異常、(3)濃縮の過程でディフェンシンが流亡する可能性がある、などとの指摘を受けている旨仄聞しました。

そこで、後記のとおり、北陸研究センターでは、実験1:10℃及び25℃の水田水を用いた追加実験(10℃での結果は25℃でも変わらないこと)、実験2:濃縮過程においてディフェンシンが流亡しないことを確認する実験を行いました。その結果、本実験の内容と結論が科学的に妥当であり、的確であることを再度確認しました。

以上につき、本書によりご報告させていただきます。

### 実験1.

組換えイネの茎葉を10℃及び25℃の水田水に2日間(48時間)浸せきしても、茎葉中のディフェンシンが水中に溶出しないことを証明する実験(検証実験)

### 材料と方法

供試した茎葉:隔離温室で養成した登熟期の組換えイネ(AD77)から採取した茎葉

水田水:試験水田に引き入れている河川から採取した水

浸せき処理:細断及び無細断の茎葉(各区1g)を48時間浸せき処理

浸せき温度:10℃及び25℃

実験区 (図 1)

- # 1 : 組換えイネの茎葉を水田水(40ml)に浸せき処理
- # 2 : 組換えイネの茎葉を約 5 センチに細断し、水田水(40ml)に浸せき処理
- # 3 : 水田水(40ml) ; 茎葉浸せきなし
- # 4 : 組換えイネの茎葉を超純水(40ml)に浸せき処理
- # 5 : 組換えイネの茎葉を約 5 センチに細断し、超純水(40ml)に浸せき処理
- # 6 : 超純水(40ml) ; 茎葉浸せきなし



図 1. 組換えイネ茎葉の浸せき処理

- 1) 水田水は、1,000 × g、15 分間の遠心分離を行って上清を採取した後、0.45 μm のポアサイズのフィルターで濾過した。
- 2) # 1 ~ # 6 の 6 試験区の処理水を、それぞれ 0.45 μm のポアサイズのフィルターで濾過した。なお、このフィルター使用の場合、精製したディフェンシンの水溶液が容易に通過することをあらかじめ電気泳動法で確認済である。
- 3) 1.5 ml の濾液を遠心乾燥機で濃縮乾固させ、このペレットを 1.5 μl の超純水で溶解した(1,000 倍濃縮液)。このうちの 1 μl を SDS-PAGE 電気泳動法により分画し、抗ディフェンシン抗体による抗原抗体反応を調べた。なお、陽性コントロールには精製したディフェンシンを 25ng/μl 供試した。

結果

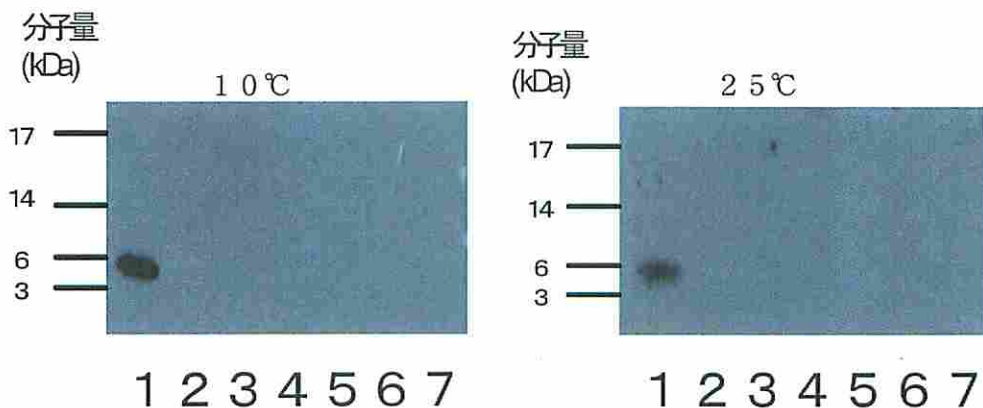


図 2. 組換えイネ茎葉の浸せき処理水に含まれるディフェンシンの検出 (抗原抗体反応を利用した高感度検出)

- レーン 1 陽性コントロール (ディフェンシン 25ng)
- レーン 2 #1 の浸せき処理水 1ml相当分
- レーン 3 #2 の浸せき処理水 1ml相当分
- レーン 4 陰性コントロール #3(水田水) 1ml相当分
- レーン 5 #4 の浸せき処理水 1ml相当分
- レーン 6 #5 の浸せき処理水 1ml相当分
- レーン 7 陰性コントロール #6 (超純水) 1ml相当分

図2に示すように、10℃および25℃で茎葉（細断及び無細断）を浸せきした全ての実験区において、抗ディフェンシン抗体を用いた抗原抗体反応は陰性を示し、ディフェンシンは検出されなかった。ただし、レーン1の陽性コントロール（精製したディフェンシンを25ng 供試区）のみが陽性を示し、ディフェンシンのシグナルに相当する蛋白質が検出された。

## 考察

本実験において、組換えイネの茎葉を超純水に浸せきした場合と同様に、水田水に浸せきした場合においても処理水中のディフェンシンは、抗原抗体反応を利用した高感度検出法を用いても検出されなかった。また、浸せき温度は10℃でも25℃でもディフェンシンの処理水への溶出が認められなかった。これらの結果から、浸せき処理水の1,000倍濃縮液に含まれるディフェンシン量が、陽性コントロールに供試した25ng/μl(約5μM)以下であることから、浸せき処理水を濃縮しない原液のディフェンシン濃度は25pg/μl(約5nM)以下である。精製したディフェンシンを5分の1量の5ng/μlを電気泳動に供試した場合でも明瞭に検出可能であることから、浸せき処理水中にディフェンシンがわずかに溶出すると仮定しても、5pg/μl(約1nM)以下と推定されるため、実態的には皆無と結論される。

以上の結果より、乙19号証の「ディフェンシンによる耐性菌出現問題等に関する報告書」(平成17年9月24日付)に添付した、「黒田報告書の第1項に関する実験の概要」で示した実験1の結論は、超純水の代わりに水田水を用いても、また10℃の低温ではなく25℃で茎葉を浸せきした検証実験においても結論の妥当性が支持され、茎葉中のディフェンシンが水中に溶出しないことが科学的に証明された。

## 実験2.

ディフェンシンが溶解、濃縮の実験操作過程で損失（流亡）しないことを確認するための実験（検証実験）

## 方法

- 1) 精製したディフェンシン(25ng)を5mlの超純水及び水田水で溶解した。
- 2) これらの水溶液を遠心乾燥機で濃縮乾固させた後、再び5μlの超純水及び水田水で溶解し、SDS-PAGE サンプルバッファーを混合してSDS-PAGE 電気泳動に供試した。
- 3) 比較対照として、ディフェンシン(25ng/μl) 溶液をSDS-PAGE 電気泳動に供試した。

4) 電気泳動を行ったゲル中のディフェンシンを PVDF 膜に転写し、抗ディフェンシン抗体を用いた抗原抗体反応法を用いて、各サンプルに含まれるディフェンシン量を比較検討した。

## 結果

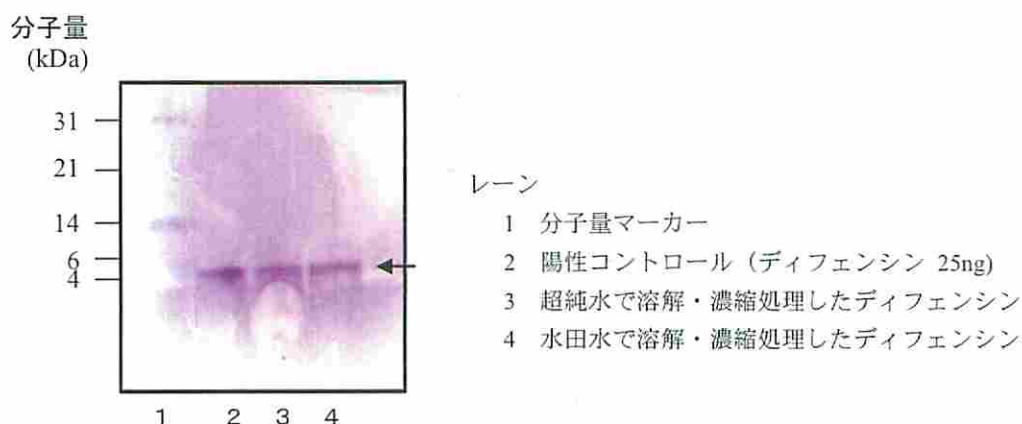


図3. 溶解・濃縮処理操作によるディフェンシンの損失（流亡）の評価

図3 に示すように、レーン 2、3 および 4 には、いずれもシグナル（矢印）が検出され、シグナル強度に差が認められなかった。これらの結果から、超純水及び水田水で溶解し濃縮したディフェンシンは、実験操作過程で損失、流亡しないことが確認された。

## 考察

乙19号証の「ディフェンシンによる耐性菌出現問題等に関する報告書」（平成17年9月24日付）に添付した、「黒田報告書の第1項に関する実験の概要」ので示した実験1では、ディフェンシンを超純水に溶解した水溶液を直接、陽性コントロールに供試して比較した実験結果を示した。一方、本実験のように、ディフェンシンを超純水及び水田水に溶解し、さらに濃縮乾固し再度溶解しても、ディフェンシンは両水溶液区とも実験操作過程で損失、流亡しないことが確認された。これらの結果より、「黒田報告書の第1項に関する実験の概要」に示した実験方法は科学的に妥当であり、一連の実験結果から得られた結論は客観的で信頼性が極めて高く、証拠として十分である。