

# 意見書

金川 貴博

私は、これまで、疎甲19号証の陳述書、疎甲80号証の陳述書(2)、疎甲91号証の陳述書(3)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、ディフェンシン耐性菌の問題に対して、債務者側から、いくつかの反論が出されましたが、あまりにも誤りがひどいので、その点を指摘したいと思います。

## 目次

- 1、ディフェンシン問題の本質について
- 2、ディフェンシン問題の各論
  - (1) ディフェンシンがイネ内部で大量に生産される
  - (2) イネ内部で生産された大量のディフェンシンがイネ外部に流出する
  - (3) イネ外部に流出したディフェンシンが水中や土壌に流出する
  - (4) ディフェンシンが様々な菌と接触する
  - (5) ディフェンシン耐性菌が出現する
  - (6) 本件圃場の外部にディフェンシン耐性菌が流出する
  - (7) ディフェンシン耐性菌が増殖する
  - (8) 増殖したディフェンシン耐性菌が周辺環境に影響を与える
  - (9) その他
- 3、過去に起きた抗生物質耐性菌出現の教訓

### 1、ディフェンシン問題の本質について

債務者は、準備書面(5)において、ディフェンシン問題について、「何らの具体的根拠もない、空想科学的な危惧に過ぎない」(6ページ)と述べています。

しかし、私がすでに再三述べておりますように、本野外実験というのは、ディフェンシン産生イネという、これまでにこの世に存在しなかった植物を野外に植える実験です。これについて、過去にそのまま参考になるような具体的な事例がないのは当然です。

そして、今回の裁判の目的もまた、この世に初めて誕生した植物の野外実験で生じる危険な事態を未然に防止しようということにあると思います。したがって、

今回の論点も、危険が生じるという予想が妥当であるかないかという点にあります。言い換えれば、もしもそうした危険な事態から被害が出たとしたら、それは、人類の絶滅にもつながりかねない一大事ですから、その危険性および被害の重大性に鑑み、今回の実験で万が一にもそのようなことが起こらないようにと、適切な処置を求めているのです。

## 2、ディフェンシン問題の各論

債務者は、準備書面の5ページにおいて、

「債権者の言い分を論理的に解釈すると、要するに

- (1) ディフェンシンがイネ内部で大量に生産される
- (2) イネ内部で生産された大量のディフェンシンがイネ外部に流出する
- (3) イネ外部に流出したディフェンシンが水中や土壌に流出する
- (4) ディフェンシンが様々な菌と接触する
- (5) ディフェンシン耐性菌が出現する
- (6) 本件圃場の外部にディフェンシン耐性菌が流出する
- (7) ディフェンシン耐性菌が増殖する
- (8) 増殖したディフェンシン耐性菌が周辺環境に影響を与える」

として、段階を追って検討していますので、この検討内容の是非について、1つずつ検証することにします。

### (1) ディフェンシンがイネ内部で大量に生産される

債務者は、本 GM イネがディフェンシンを大量に生産することを否定しています(8ページの4)。しかしこれは、債務者が、農林水産大臣および環境大臣にあてて提出した第一種使用規程承認申請書(甲21)の記載と矛盾します。申請書12ページの「(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違」において、「導入遺伝子を強力に発現させるために、イネ由来の新規プロモーターを連結している」と記載し、本イネがディフェンシンを大量に生産するように加工してあることを本 GM イネの特徴としています。また、導入遺伝子が実際に発現していることをノーザン解析で確認(申請書11ページ(4)二)しています。さらに、本 GM イネが病原菌抵抗性を示すということは、抵抗性を示すのに十分な量またはそれ以上のディフェンシンを生産していることを物語るものです。

つまり、本 GM イネは、ディフェンシンを大量に生産することで、多種類の病

原菌に抵抗性を示すことを「利点」とするイネであり、これまで、そのことを債務者自身が強調してきたのです。

## (2) イネ内部で生産された大量のディフェンシンがイネ外部に流出する

債務者はこの点を理論的にも実験的にも否定しています。

### 理論的検証

a. 債務者はディフェンシンの大きさを勘違いしています。ディフェンシンの大きさは、約2ナノメートルです。債務者は「当該通路の直径は20-40ナノメートルと極めて細く・・・分子量が約5,700のカラシナディフェンシンを含めた植物ディフェンシンは、水溶性であるとはいえ、大きすぎて細胞壁を貫通するこの通路を、物理的に通過することができないのである」(7ページ(7))と説明していますが、ディフェンシンは2ナノメートルほどの大きさですから、20-40ナノメートルの穴は楽に通過します。

タンパク質の大きさについては、別紙の「マッキー生化学」(第3版。化学同人刊)100ページの図に、カラシナディフェンシンと分子量がほぼ同じのインシュリン(図の左下)が記載されており、図の右下のスケールから推定して、2ナノメートルほどです。インシュリンの大きさについては、大阪大学タンパク質研究所が公開している蛋白質構造データベースには、分子量5,872のブタインシュリンが、縦1.8ナノメートル、横2.4ナノメートル、奥行3.7ナノメートルと記載されています。分子量がディフェンシンの10倍あるヘモグロビンS(分子量64,534、図の左の2つ目)でも、縦3.9ナノメートル、横4.6ナノメートル、奥行9.8ナノメートルという大きさですから、この大きさでも、20-40ナノメートルの穴は通過します。今回の黒田報告書(乙119)が引用した文献2からもわかるとおり、細胞壁には20-40ナノメートルほどの穴がたくさんあいているのですから、インシュリンとほぼ同じ大きさと推定されるディフェンシンは、細胞壁を楽に通過して外部へ漏出できます。

b. 債務者は、「ディフェンシンは、・・・塩基性の蛋白質であり、・・・マイナスに荷電した細胞壁と結合」し、解離しない(6ページ(2)(5))旨述べています。しかし、これは完全な間違いです。なぜなら、これは科学的に公知な事実ですが、水田の水には $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ など、マイナスの荷電を中和するイオンが十分に存在するので(注1参照)、これらのイオンで細胞壁の荷電が中和され、結合したディフェンシンが容易に解離し、溶出するからです。また、最近のように酸性雨が降る状況では、塩基性(アルカリ性)のディフェンシンは容易に雨に溶け

て流れ出ます。

c. また、黒田報告書(乙119)では、ディフェンシンと類似の蛋白質が細胞壁にトラップされる例として、チオニン産生イネの実験の文献1を紹介しています(1ページ)。しかしながら、この文献は、イネが生産したチオニンの総量を調べたのではなく、イネに残っているチオニンの所在を調べたに過ぎないものです。この実験は、チオニン産生イネの子葉鞘を砕いて分析した結果、細胞壁を含む不溶性部分にだけチオニンが検出され、その量が、試料全体の量と一致していたというものであって、すでに外部へ流れ出てしまったチオニンについては、分析できていません。この実験結果から、イネが生産したチオニンが外部へ漏出したことを否定することはできません。

#### 実験的検証

黒田報告書(乙119)には、ディフェンシン溶出実験の結果が添付されており、その実験結果からディフェンシンの溶出を否定しています。しかし、以下に指摘する通り、肝心の実験方法が不当です。

a. まず、実験1で、イネの茎葉を10の超純水に浸すという不可解な溶出方法が用いられています。この実験では、できるだけ、水田に近い条件にして、ディフェンシンが溶出するかどうかを調べるべきであるのに、なぜ溶出に超純水を使ったのでしょうか。水田の水または、それに近い水を使うとなると、 $\text{Ca}^{2+}$ などのイオンが多量に含まれているので、それではbで前述した通り、ディフェンシンが溶出してしまうから、超純水を使ったのではないかと疑われてもしかたがない実験です。

b. さらに、温度が10というのも不可解です。ディフェンシンが溶出しにくい条件をわざと選んだのではないかと疑われる実験です。

c. また、実験1において、ディフェンシンが検出されなかったことをもって、イネからのディフェンシンの溶出がないと述べていますが、このような実験を行う場合、もしも、イネからディフェンシンが溶出しているなら、この実験方法でディフェンシンが検出されるはずであるということを確認した実験(ポジティブコントロール実験)と一対になっていなければ、意味のある実験になりません。すなわち、この実験は、もしも、イネからディフェンシンが溶出したとしたら、ディフェンシンが検出されるはずであるのに、検出されなかったから溶出はないということをお願いするので、このためには、たとえば、1ページの実験1の実験区Aにおいて、ディフェンシンを加えたものを用意し、加えていないもの

(黒田報告書に示されているもの)と同様の処理(濾過や濃縮など)を行って、その結果として、ディフェンシンが検出されるという実験が必要です。

d. この点、黒田報告書では、参考1(2ページの最終段落)に、濾過してもディフェンシンが検出されることが記載されていますが、濃縮操作の影響がどうだったのかがまったく示されていません。実験1には、「濃縮なし」と記された実験の結果が示されていますが、これは、溶出した液を濾過してそのまま用いたのではなくて、わざわざこれを濃縮して、水分を飛ばしてから、水に溶きなおし、それを希釈するという面倒な操作をした試料を使っています。「濃縮なし」なら、濾過したものをそのまま用いればよいものを、なぜこんな不可解な実験するのか考えると、もしかしたら、濃縮操作でディフェンシンが消滅するのではないかという疑念が起ってきます。

e. 実験1の(2)の、いもち病菌を用いた実験でも、ポジティブコントロール実験が欠如しています。ここには、増殖抑制効果がなかったという実験だけしか示されていません。ここでも、浸出水にディフェンシンを加えて同様の実験を行えば、増殖抑制効果がでるという実験が必要です。

ただし、実験1では、浸出に超純水を用いていることがそもそもの問題点ですから、正しくコントロール実験が行われたとしても、その結果から、水田の水にディフェンシンが浸出してこないという証明にはなりません。

f. 実験2(圃場での組換えイネの株元の水を用いた実験)でも、全く同じことが当てはまります。ここでも、「濃縮なし」と記された実験は、わざわざ濃縮して水分を飛ばしてから、水を加えて溶きなおし、それを希釈するという面倒な操作をしたあとの実験です。

g. いずれの実験にしても、ポジティブコントロール実験を行うのが常識で、どの濃度が定量下限なのかも示しておく必要があったのに、それをしないでディフェンシンが検出されなかったという結果だけを示しても、途中の操作でディフェンシンが壊れたか吸着されたかで検出されなかったのではないかという疑念が生じるだけで、もとの試料中にディフェンシンが含まれていなかったことの証明にはなりません。逆に、なぜ、このような不可解な内容の実験を行う必要があったのかと考えると、常識的な実験の結果では、溶出していることが確認されたために、その事実を覆い隠す必要があって、わざわざこのような実験を行ったのではないのかという疑念を抱かざるをえなくなります。

**(3) イネ外部に流出したディフェンシンが水中や土壌に流出する**

**(4) ディフェンシンが様々な菌と接触する**

この2点については、債務者も争っておらず、論争の必要はありません。ディフェンシンがイネ外部へ流出すれば、それが水中や土壌に移行し、様々な菌と接触することになります。また、水中や土壌へ移行せずに、イネの外部に付着した状態のディフェンシンも、イネの葉や茎に付着した様々な菌と接触することになります。

**(5) ディフェンシン耐性菌が出現する**

これはすでに私の陳述書(甲19、80と91)で述べたとおりです。また、その後、木暮一啓教授が意見書(甲99)で述べられたとおりです。

これに対し、債務者は「高木正道教授論文(疎乙106)において十分論じられている」(8ページ5(1))と反論していますが、しかし、この高木氏の報告書が間違いであることは既に私の陳述書(3)(甲91)で論じたとおりであり、その後、原決定が間違っ高木氏の報告書を採用したことから、木暮意見書において原決定が間違いであることはさらに詳細に論じ尽くされています。

したがって、本来であれば、私の陳述書(3)や木暮意見書に対して、債務者は徹底した反論をされるのが筋道であると思われませんが、今回、どうしたわけか、こうした具体的な反論は何一つ出されませんでした。

**(6) 本件圃場の外部にディフェンシン耐性菌が流出する**

本野外実験では、耐性菌流出防止対策を何もしていないのですから、耐性菌が出現すれば外部に流出することは間違いのないことです。

**(7) ディフェンシン耐性菌が増殖する**

たとえば、水田において、カラシナディフェンシンに耐性を持つカラシナ病原菌が出現して、これが流出してカラシナに付着すれば、この菌がカラシナ内で増殖して、大きな被害をもたらすであろうと容易に想像されます。

ところが、黒田報告書は「組換えイネで仮にディフェンシン耐性のいもち病菌株が出現したとしても」(3ページ下から11行目)として、耐性菌の話を、いもち病菌に限定して考えており、その上で、危険性がないという判断に至っています。しかし、以下に述べる通り、ここに債務者のディフェンシン問題に対する大

きな誤りがあります。

ここで重要なことは、ディフェンシン耐性菌の種類です。水田において出現が懸念される耐性病原菌は、いもち病菌などのイネの病原菌だけではないからです。水田にはヒトの病原菌も存在します。たとえば、水田で怪我をして破傷風になるヒトがいるように、ヒトの病原菌は、土中にも存在すれば、空気中にも存在します。したがって、家に帰ってきたら手を洗いましょう、食事前にも手を洗いましょうということになるのです。水田には多種多様の微生物が生存しており、そこには、ヒトの病原菌もおれば、イネの病原菌、カラシナの病原菌も存在します。それらがディフェンシン耐性を持つ可能性が出てきます。黒田報告書には、「宿主域」という言葉がでてきますが、これは病原菌が**感染する相手方**を示すものであって、病原菌の**生存する場**が宿主内に限られるということではありません。現に、いもち菌は、実験室の寒天培地で増殖します。ただ、競争相手が多い環境の中でどれくらい優勢になりえるかについては、それぞれの微生物の性質や、その環境条件によりけりですが、病原菌が宿主外では生存しないということではありません。水田には様々な微生物が生息しており、水田で発生するおそれのあるディフェンシン耐性菌は、ヒトの病原菌、イネの病原菌、カラシナの病原菌など、様々な種類のものがあります。

これまで、耐性菌について行ってきた議論は、水田には様々な微生物が生存するから、ヒトの病原菌をはじめとして、様々な種類の微生物がディフェンシン耐性を獲得することになるということを議論してきたつもりでしたが、今回の黒田報告書で明らかになったことは、債務者はディフェンシン耐性のいもち病菌しか頭になかったということです。このために、耐性菌の問題を非常に軽く見てしまったと思われる。私は、この間くり返し、いもち病菌やその他のイネ病原菌がディフェンシン耐性を持つことを問題にしているのではなくて、さまざまな微生物がディフェンシンと触れることで、ヒト病原菌を含めさまざまな種類の菌が耐性をもつことを指摘し、その危険性を指摘してきました。木暮意見書でも、同様の指摘が行われています。

しかし、債務者は、いもち病菌しか念頭になかったために、ディフェンシン問題に対する債権者の主張についても、準備書面5ページにおいて、

「(9) 増殖したディフェンシン耐性菌が周辺環境に影響を与えるばかりか植物にまで影響を与える。

(10) 増殖したディフェンシン耐性菌が周辺環境に影響を与えるばかりか動物

にまで影響を与える。

・・・」

などと、迂遠な論理をつらねた間違った解釈してしまいました。債権者の主張はそうではなくて、多種多様の微生物が生存する水田において、ディフェンシン耐性を持つ様々な種類の微生物が誕生して、それが動植物に影響する危険性があると言っているのです。

その一例として、水田に生息していたカラシナ病原菌がカラシナディフェンシンに耐性を持ち、これが圃場外へ出てカラシナに付着すれば、この菌がカラシナ内で増殖して、大きな被害をもたらすであろうことは容易に想像されます。

水田にはヒトの病原菌もいますから、これがカラシナディフェンシンと接触することで、カラシナディフェンシンに対する耐性を持った場合に、これがヒトに影響を及ぼすのかどうかは、カラシナディフェンシンの作用機構に依存します。もしも作用機構が同じなら、カラシナディフェンシンに対する耐性は、ヒトディフェンシンに対する耐性にもなるのです。このことを最初の陳述書（甲19）以来、繰り返し述べてきたのですが、債務者には最後まで理解していただけなかったようです。

#### （8）増殖したディフェンシン耐性菌が周辺環境に影響を与える

債務者は、植物には「多様な、高度の生体防御機構が存在し働いている」（9ページ7(1)）から、ディフェンシン耐性菌が大きな脅威にならないと主張しています。

しかし、これは明らかに間違った見解です。ディフェンシンは、病原菌に対する第1弾目の防御機構として重要な役割を果たしており、これを突破する耐性菌は大きな感染力を獲得することになって、大きな脅威になります。債務者である北陸研究センターの川田元滋氏も「高等動物は病原菌などに対する非常に高度な防御機構として免疫系などを備えているが、昆虫や植物、とりわけその性質上移動の困難な植物については、外敵からの攻撃に対する抗菌蛋白質の重要性は大きいと考えられる」（甲23の論文229ページの右の第2段落）と述べています。ディフェンシンの重要性を示す実験として、マウスにサルモネラ菌を与えた実験（文献1）があります。6匹ずつのマウスに289,000個のサルモネラ菌を与えた実験では、普通のマウスでは10日目で1匹死んだのに対し、ディフェンシン欠損マウスは8日目までに4匹が死にました。実験に用いたマウスの半分が死ぬサ

サルモネラ菌の数は、普通のマウスでは 114,000 個なのに対し、ディフェンシン欠損マウスでは 14,100 個でした。つまり、ディフェンシン欠損マウスは、約十分の一の数のサルモネラ菌で死んでしまったのです。このサルモネラ菌がディフェンシン耐性菌であった場合、普通のマウスであっても、ディフェンシン欠損マウスと同様に、十分の一の菌で死んでしまうと考えられます。この実験結果は、ディフェンシン耐性菌の危険性を物語るものです。

病原菌への防御機構が発達していると言われている動物でもこのとおりの結果ですから、ディフェンシン耐性菌が植物へ与える影響はもっと大きいと考えられます。

### (9) その他

債務者が述べている(9)以下は、(7)で前述のとおり債務者の勘違いによる論理です。水田で発生するディフェンシン耐性菌は、イネ病原菌に限ったものではなく、ヒト病原菌を含め多様な種類のものが出現する可能性があり、それが、動植物に被害をもたらすおそれがあります。また、耐性菌の耐性遺伝子が他の菌へ移動して、それが被害をもたらすことも考えられます。

## 3、過去に起きた抗生物質耐性菌出現の教訓

債務者は、耐性菌についての過去の事例として、抗生物質耐性菌の歴史を学ぶことが必要です。とくに、バンコマイシン耐性の MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) が出現してしまった歴史が参考になります(文献2)。バンコマイシンは、その作用機構からして、耐性菌ができないと言われてきました。しかし、耐性菌がでてしまったのです。それも、病院でのバンコマイシンの使用で出てきたのではなく、アボパルシンという別の抗生物質を、家畜への飼料添加物として使ったのが原因になりました(この点に関しては農業関係者には異論をとる人もいますが、説得力がある異論とは思えません)。この時に検出されたのはバンコマイシン耐性腸球菌(VRE)で、病原性が低い菌でしたが、この耐性遺伝子が病原性の高い MRSA へ移動するのではないかと恐れられていました。このために、VRE の発生頻度を抑えるべく、家畜へのアボパルシンの使用が、欧州でも、米国でも、日本でも禁止(1997年)され、おかげで VRE が減ったことが確認されましたが、それでも、ついに、2002年にバンコマイシン耐性 MRSA が出現してしまいました。このように、バンコマイシンに類似した別の抗生物質を家畜に使用

したことから、バンコマイシンに耐性をもつヒト病原菌が出て、その耐性が病原性の高い菌へ移動してしまったのです。

この教訓に学べば、本 GM イネについても、ただちに栽培を中止し、イネ、土壌、土壌付着物などディフェンシン耐性菌が付着している可能性のあるものの滅菌をただちに行うべきです。

以 上

文献 1 : Wilson, C. L. et al.: Regulation of intestinal  $\alpha$ -difensin activation by the metalloprotein matrilysin in innate host defensin. *Science*, **286**, 113-117 (1999)

文献 2 : 平松啓一 : 高度バンコマイシン耐性 MRSA の出現。

<http://www.staphylococcus.org/jp/srl.html>

注 1 債務者である北陸研究センターの鳥山和伸氏の著作には、「日本の灌漑水の平均水質は表 6 のようであり、1 作期間の灌漑用水は 10000t/ha 程度とされるので、Ca、Mg、K、SiO<sub>2</sub>の供給量は、各々 ha 当たり 88kg、19kg、12kg、190kg と推定され」(フジ・テクノシステム刊、「土の環境圏」417 ページ)と記載されており、平均水質を示した表 6 (418 ページ)では、Ca, 8.8 mg/l; Mg, 1.9 mg/l; Na, 6.7 mg/l; K, 1.2 mg/l; Si, 19.0 mg/l と記載されています。