

遺伝子組換え生物：  
バイオセイフティの指針

編集：ジョージ・T・ツォトス

本書で示された見解は各執筆者のものであり、必ずしも国連工業開発機関（UNIDO）事務局の見解を反映するものではない。国や地域に関して使用されている説明や分類、内容の順序は、国、領域、都市、地域の法的地位、あるいはその当局に関する、または国境または境界線の制限に関する、または経済体制や発展の程度に関する事務局のいかなる見解を示唆するものでもない。表の見出しとして「国または地域」が指示される場合、国、領域、都市または地域が含まれる。「先進」および「途上」などは、統計上の便宜によるもので、かならずしも発展のプロセスにある特定の国や地域の到達段階を評価する表現ではない。企業名および商品名は、UNIDO による保証を意味するものではない。

出版にあたり情報や提言が完全かつ正確になるようあらゆる努力を払ったが、内容の誤りや脱落、または本書の利用によって生じる損失、損害または事故については、出版社、UNIDO のいずれも責任を負わない。

遺伝子組換え生物

バイオセイフティの指針

作成：国連工業開発機関（UNIDO）事務局

協力：バイオセイフティに関する UNIDO・UNEP・WHO・FAO による非公式作業部会  
のための遺伝子工学・バイオテクノロジー国際センター（ICGEB）

編集：ジョージ・T・ツォトス

国連工業開発機関

遺伝子工学・バイオテクノロジー国際センター

CAB INTERNATIONAL

## 執筆者一覧

フィリップ・J・デール ( Philip J. Dale )

ジョン・イネスセンター・ケンブリッジ研究所 ( Colney Lane, Norwich NR4 7UJ, UK )

ジョン・グリンステッド ( John Grinsted )

ブリストル大学・医学部・病理微生物学科 ( University Walk, Bristol BS8 1TD, UK )

ジェフリー・ホール ( Geoffrey Hall )

国際菌類学研究所 ( Bakeham Lane, Egham, Surrey TW20 9TY, UK )

ジュリアン・キンダーラー ( Julian Kinderlerer )

シェフィールド大学・分子生物学バイオテクノロジー学部 ( PO Box 594, Sheffield S10 2UH, UK )

マリオン・レオポルド ( Marion Leopold )

ケベック大学モントリオール校 ( C.P. 8888, Succ. "A", Montreal, Quebec, Canada )

モリス・レヴィン ( Morris Levin )

メリーランド大学・メリーランドバイオテクノロジー研究所・バイオテクノロジー社会問題センター ( College Park, Maryland 20742, USA )

ドン・パウエル ( Don Powell )

バブラハム研究所・発生・シグナル部・細胞決定研究室 ( Babraham, Cambridge CB2 4AT, UK )

ジョージ・T・ツォトス ( George T. Tzotzos )

UNIDO・ICGEB ウィーン事務所 ( Vienna International Centre, P.O. Box 300, A-1400 Vienna, Austria )

レイモンド・A・ジリンスカス ( Raymond A. Zilinskas )

メリーランド大学・バイオテクノロジー研究所・バイオテクノロジー社会問題センター ( 4321 Hartwick Road, Suite 500, College Park, Maryland 20740, USA )

## 第 1 章

### 生物学的リスク評価 政策と実施に関する主な問題の概要

ジョージ・T・ツォトス

UNIDO・ICGEB ウィーン事務所（オーストリア・ウィーン・ウィーン国際センター）

バイオテクノロジーが疾病を軽減したり持続可能な形での発展に役立つという長年の期待は、遺伝子組換え生物の本質的な安全性への懸念によって色あせてきている。初期の組換え DNA 技術では、遺伝的相互作用が複雑であることに加えて実地での経験もほとんど蓄積されていなかったため、遺伝子組換え生物の取り扱いや環境への放出に慎重になるのは当然のことだった。いまでは組換え系の特性に関する豊富な知識や、バイオテクノロジーのさまざまな利用例から集められた膨大なデータがあるにもかかわらず、いまだにこうした懸念は収まっていない。途上国では、自国が新たに作られた組換え産物の試験場にされるのではないかと敏感になっており、警戒が時には恐怖心に変わっている。この種の問題は、途上国が遺伝子工学の利用によって得てしかるべき恩恵に往々にして暗い影を落としてきた。

このような憶測あるいは現実の懸念に呼応して、1985 年に国連工業開発機関 (UNIDO)、国連環境計画 (UNEP)、世界保健機構 (WHO) は、バイオセーフティに関する非公式の作業部会を結成した。1991 年には国連食糧農業機関 (FAO) が加わり、この作業部会は拡大した。本書はこの作業部会の委託を受けて作成されたもので、科学者や規制当局がバイオセーフティの基礎となる主な問題を概念化するのを支援するとともに、こうした人々が、バイオテクノロジーに対する規制政策にそれらの問題が与える影響について、理解を深めることを意図している。

先に述べた豊富な科学データや知識は、バイオセーフティに関する国際的な論争を解消するには至っていない。バイオテクノロジーに関する規制の整合化を図ろうとする試みも、ほとんど成功していない。これは、急速に発展する科学の最先端領域に、国際的な規制が追いついていないためである。また、次の点が各国間で明らかに違っているためでもある。

1. バイオテクノロジーに関する国民の認識
2. 産業政策
3. 規制能力

こうした相違が存在し続ける限り、単一の規制について国際的なコンセンサスに達するのは難しいかもしれない。

国民の認識を形成し、ひいてはバイオテクノロジーを受け入れるか否かを決定する要因については本書の第 2 章で扱うため、ここでこれ以上検討する必要はない。

## 産業政策

先進国の場合、世界市場のシェアを維持・拡大する上で、遺伝子技術の商業利用が戦略的な重要性を持っている。途上国の場合、まずそうはなっていないのは明白で、そうした国々では、バイオテクノロジーの商業利用を行う力がほとんどない一方で、伝統的な遺伝学的手法が国の富の創出に大きく貢献する可能性はやはりある。

バイオテクノロジーの最先進諸国では、民間投資が技術革新やタイムリーな製品開発と直接結びついており、早期に投資収益を上げるには商品化が不可欠である。とりわけ行政上の障害による遅れは、投資リスクを高め、製品開発を阻害する大きな要因であると考えられている。

規制は、企業にとっては製品開発戦略の構築における最大の検討事項に、国にとっては産業政策全体の一部になってきている。規制監視の緩和を押し進めることは、資本を大量に投入して達成した技術的優位を維持するための取り組みの一環としてとらえる必要がある。組換え製品の急速な増加によって生じている要請に対して、産業界が受け入れることのできる期間とコストで対応するのに、現行の規制制度ではかなり限界があるというのが規制緩和の根拠である。現行の規制制度の構造的欠陥は、法外な費用と時間を要する煩雑な官僚的手続きや過剰な試験手順として現れてきている (De Greef, 1991)。規制の理念が科学の進展によって根底から崩されていることや、遺伝子組換え生物、製品の取り扱いに関する経験が蓄積されたことは、規制を見直す十分な理由になると考えられている。

手続きの見直しを求める上で挙げられている主な論点は、「工学的な (engineered)」遺伝子組換えは、「伝統的な (conventional)」手法を用いる場合に比べてはるかに遺伝子の発現を予測することが可能であるのに加えて、導入遺伝子が持つリスクは、概念上、自然の生物や「伝統的な」技術を用いて改変された生物を使用するのに伴うリスクと、その本質は変わらないというものである (NAS, 1987)。このことは法律の理論的根拠そのものを無効にするが、この根拠として、多くの国は遺伝子組換え製品を作り出す手法をもとにしている、という主張がある。規制の重点は製品の安全性、品質、有効性に置かれるべきである (製品またはリスクに基づく規制)、というのがこの主張の結論である (Wyngaarden, 1990)。プロセスに基づく規制を続けることは、今日まで安全に利用されてきた技術を不当におとしめることになる。

現在の傾向では、技術に基づく規制から、製品あるいはリスクに基づく規制へと政策が一定の収斂をみせ、それにつれて審査の手続きが簡素化されるとみるのが妥当である。これは、食品の場合 (毒性、アレルギー性、栄養価の不足など) のように生物学的リスクのエンドポイントの性質を見極めることが比較的容易な場合のほうが簡単である。一例をあげると、食品の安全性については、規制当局による審査を簡素化しようとする直接的な試みとして、現在、実質的同等性の概念が議論されている。「安全性評価の必要性と程度は、

新たな食品と、従来の食品でそれに類似するものがあればそれとの比較に基づいて行われるべきである」というのがその概念である（Miller & Flamm, 1993）。バイオテクノロジーの他の利用分野では、簡素化に向けたさらなる試みとして、最終的には、規制当局の監視対象から遺伝子組換え生物、遺伝子操作による製品や手法に関するグループを除外することになるかもしれない。

ただし、環境への適用に関しては、潜在的な危険性を簡単には明らかにできないことが多く、導入遺伝子と生態系の相互作用も把握する必要があるため、遺伝子導入の最終製品だけに目を向けたのでは不十分である。自然に起きるものや「伝統的な」手法を使った場合に比べて格段に広範囲の遺伝形質を組み合わせることができる遺伝子組換え技術の威力は、環境の安全にかかわってくる（Tiedje et al., 1989）。したがって、遺伝子操作の手法は、規制当局による監視の発端として便利に使われる可能性があるものの、リスクのほうは、遺伝子組換え生物の特性だけが評価される可能性が残されている。製品に基づく規制よりも、一種の混合型アプローチのほうが、行政の簡素化という観点からみても望ましいという提案がなされている。製品に基づく規制は、根拠となる理論的な前提がしっかりしているにもかかわらず、明確なリスクレベルに基づいて生物を分類するのが難しいことから混乱が生じる可能性がある（Lesser & Maloney, 1993）。

## 規制能力

先進国のバイオテクノロジー規制は、予防的に行われてきた。つまり、バイオテクノロジー製品が市場に出るずっと以前から規制が定められていたのである。途上国の様相は、これとは著しい対照をみせている。一握りの国を除いて、遺伝子組換え技術による製品を対象とする法律は、現在までのところ制定されていない。こうした規制の欠如が技術移転進展の障害になっているわけではないが、多くの遺伝子組換え製品をすぐにも試験して商品化したいという要請が高まるにつれて、こうした状況は変わるはずである。

プロセスに基づく規制という時代遅れの概念から脱却すると同時に、官僚主義による新しい法律の立案・制定の遅れを排除する有効な方法として、現行法を改正して組換え技術の利用や組換え技術による製品を対象に含める提案がなされてきた。しかし、こうしたアプローチの妥当性に関しては、その実行可能性や、環境面での規制の場合には概念の健全性を根拠に、疑問が投げかけられている（本書第7章、128～130ページ参照）。

別のアプローチとして提案されているのが、規制の代わりにガイドラインを導入するというもので、これは規制には柔軟性がなく、科学の進歩や社会のコンセンサスの移り変わりについていけないためである。これに対してガイドラインは、こうした変化に対して適時かつ行政の介入を最小限に抑えた対応するのに必要な柔軟性を持っている（Persley et al., 1992）。これは理屈の上では正しいが、大部分の途上国には、過去にガイドラインや行動規範に自主的に適合した実績がないという事実を見落としている。そのため、規制

を実施するには、法律が唯一の方法かもしれない。解釈を許容する広範な規定と、定期的な見直しと改正を行うための条項を取り入れることによって、産業や社会の要請の変化に十分対応できる柔軟性を与えられると思われる。

どのようなアプローチでも、その妥当性を最終的に決めるのは、規制が遵守されているかを監視・把握できるかどうかである。言い換えれば、生物学的リスクを特定、評価、管理する能力である。大多数の途上国には、全般的にこの能力が欠けている。この理由は、別の場所で十分に分析されてきた (Cohen and Chambers, 1991)。生物学的リスクを評価する国の能力を強化する上での国際機関の果たす役割が、次の節の主題である。

## 国際支援の仕組み

バイオハザードの特定とその影響の評価は、遺伝子組換え生物そのものに固有の特性、導入遺伝子と受容環境の相互作用および標的生物・非標的生物への潜在的影響に重点が置かれている。数多くの生物学的手法が提案されており、それに対する評価や批判も出ている (Strauss, 1991)。これらはまた、本書の各章で扱う中心的なテーマでもあるが、いずれもリスク予測に対する批判的な論法を武器にしているといえればここでは十分だろう。一部の手法は、方法論的に精密であるにもかかわらず (環境汚染委員会、1991年、GENHAZ)、資源への負荷が大きすぎるとして却下されている。とはいうものの、遺伝子組換え生物の放出に関する安全性を確認する上で答えることが求められる疑問の大部分に対する優れた「道案内」として取り上げる価値はある。

リスク評価が「定性的あるいは批判的な」性格を持つのは、科学の広範な学問分野をカバーする専門知識を根拠としている。先進諸国の場合、規制の制定や実施は、国の制度としての委員会や専門家による小委員会によって行われている。こうしたモデルを途上国で再現するには、大多数の国々の力をはるかに超えた制度、人材、財源が必要になる。規制政策の立案や、さらには具体的な野外試験に際しても、国際的な開発機関の支援が求められている。

途上国における遺伝子組換え製品の環境への放出のリスクを評価するために国際的な専門委員会を設置することは、短期的には有益だが、長い目で見たときのそうした委員会の限界も知っておく必要がある。遺伝子組換え製品の実用化試験や商業利用が実施される場所とそれに伴う費用が幾何級数的に増加するという圧力の下で、国の制度に代わるものとして行う活動を維持するのが難しいということになるかもしれない。

国の制度としてのバイオセーフティ委員会の権限や運営の枠組みを定める際の支援は、バイオテクノロジーにおける国の能力を強化する上で長期的にプラスの効果を持つ可能性がある。バイオテクノロジーによる社会経済的なメリットに対する認識を向上させ、技術移転を可能にするために不可欠のステップの1つとして、このような委員会を政府に設置させる上で、国際機関は重要な役割を担っている。リスク評価手法の分野における科学者

や行政官への研修に対する国際支援は、コスト効率のもっとも高い方法である。バイオセーフティの基盤となる科学的概念の教育が不足していることが、一般国民のとんでもない誤解を招き、非生産的な行政措置につながっている。したがって、人材の育成は、バイオテクノロジーの推進にかかわる国際機関によって提供される支援政策の不可欠な一部でなければならない。

最後に、仮にヒトや動物の健康や環境に対する安全性を損なうことなく人材や財源に関する要請を減らせるとしても、リスクの内容に関する判断から定量的なリスク評価へと移行するための本格的な取り組みを行わなければならない。現在までのところ、これはほぼ不可能に近い課題である。その理由は、リスク評価の担当者が情報を引き出さなければならない科学的データベースは、膨大な専門領域（一例として、生物学的リスク評価に必要なデータのリストを以下に示す）を対象として含んでいると同時に、データが驚異的なペースで集積されているためである。

### 生物学的リスク評価に必要なデータ（一例）

1. 親生物（分類学、分子生物学、生理学、生殖に関するデータ）
2. 遺伝子組換え生物（分子生物学、生殖に関するデータ）
3. 遺伝子導入の方法
4. 導入の方法、量、頻度
5. 導入遺伝子の動態（運搬、複製、移行、定着）
6. 導入遺伝子産物および中間代謝産物の毒性
7. 毒性を示す量
8. 感受性の高い非標的生物
9. 非標的生物への影響
10. 区域の特性
11. 生態系への影響

既存の各種データベースはその設計が一様でなく、巡回・検索やデータの収集に混乱が生じている。さらに、実証済のモデルがほとんどなく、一方で出力したデータを他方で入力する必要が頻繁にあるという事実が、全データベースのそれぞれ異なる部分を統合したり定量化することをきわめて困難にしている。したがって、生物学的データの管理と、リスク評価においてデータを解釈したりモデル化できるツールを利用できるかどうか、手法の有効性と信頼性を左右することになる。

生物学的リスク評価の分野では、知識システムの技術は発展の初期段階ではあるが、規制手続きの円滑化や人的・金銭的資源の削減に利用することが可能である。最終的には、専門家委員会の意思決定を支援する有用なツールの1つになるはずである。

したがって、生物学的リスク評価のための統一的な情報支援環境への投資は、おおいに注目するに値する。そうした環境には透明性が求められ、高度な情報管理システムと、通信やデータベース検索の統一方式が必要になる。これらは、実現の程度の差はあるにせよ技術的に可能である一方で、あくまで国際協力の結果として、こうした提案を可能にするのは、課題の大きさと民間部門との連携の必要性である。

リスク評価の科学的本質や、リスク管理に関連してあまり明確になっていない問題を理解する上で、本書が役立つことを願っている。途上国の読者は、科学の発展や国際的な規制政策と足並みのそろった監視体制を整えるためのヒントが本書から得られるかもしれない。

## 参考文献

- Cohen, J.I. & Chambers, J.A. (1991) Biotechnology and biosafety: Perspective of an international donor agency. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M. & Strauss, H.S. (eds), pp. 378-392. McGraw-Hill Inc., New York.
- De Greef, W. (1991) Regulations and the future of agricultural biotechnology. *Agrofood Ind. hi-tech*, 2, No. 4, 3-7.
- Lesser, W. & Maloney, A.P. (1993) *Biosafety: A Report On Regulatory Approaches For The Deliberate Release Of Genetically Engineered Organisms Issues And Options For Developing Countries*, p.19. Cornell International Institute for Food, Agriculture and Development (CIIFAD), Ithaca, NY.
- Miller, H.I. & Flamm, E.L. (1993) Biotechnology and food regulation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4, 265-268.
- NAS (1987) *Introduction of Recombinant DNA-Engineered Organisms into the Environment: Key Issues*, p.5. National Academy Press, Washington, DC.
- OECD (1986) *Recombinant DNA Safety Considerations*, p.41. OECD, Paris.
- Persley, G.J., Giddings, L.V. & Juma, C. (1992) *Biosafety: The Safe Application of Biotechnology in Agriculture and the Environment*, p.10. International Service for National Agricultural Research, The Hague.
- Royal Commission Environmental Pollution (1991) 14<sup>th</sup> report: GENHAZ. HMSO, London.
- Strauss, H.S. (1991) Lessons from chemical risk assessment. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M. & Strauss, H.S. (eds), pp.297-318. McGraw-Hill Inc., New York.
- Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R.N. & Regal, P.J. (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms:

ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 70, 298-315.

Wyngaarden, J.B. (1990) The future role of biotechnology in society. In: *Advances in Biotechnology*, p.260. Swedish Council for Forestry and Agricultural Research, Stockholm.

## 第2章

# バイオテクノロジーに関する国民の認識

マリオン・レオポルド

ケベック大学モントリオール校（カナダ）

### はじめに

国民がバイオテクノロジーについてどのように考えているかは、この最先端の新たな技術分野での競争に参加したいと考えている国や企業にとって、決定的な意味をもっている。国民の認識が、バイオテクノロジー分野での発明のタイミングや方向性のほか、バイオテクノロジーやその製品、サービスの普及の速度に影響を与える場合もある。ある製品や利用法に対する国民の著しい拒否反応のせいで、それらをいつまでたっても市場に出せないことすらあり得る。

バイオテクノロジーに対する国民の認識は、重要な問題であるばかりでなく、複雑な問題でもある。各国に固有の GNP や所得配分、教育の水準、国の伝統や歴史、政府、産業、マスメディア、権利擁護団体の役割など、幅広い要因によって形成されるものである。国民の認識はまた、人や環境に対する安全性、倫理、法律上の問題、経済的・社会経済的な影響といった、さまざまな分野の問題も含んでいる。さらに、国民の考え方は、たとえば、画期的なバイオ医薬品が市場に出されたとしても、費用便益あるいはリスク便益が疑問視される場合など、予期しない出来事によって急速な変化をみせることもある。最後に、国民の認識がバイオテクノロジーの商業利用に与える影響は、たとえそれが科学的根拠の薄い、あるいは非科学的な考えであっても、影響が大きくなる可能性があるといったように、純粋に科学的な根拠をもとに判断することができない。

そのうえ、国民そのものが単一の主体ではないため、それ自体が均質な利益、考え方や価値観を代表しているわけではない。したがって、国民のさまざまな反応には、適切な重みづけがなされなければならない。

本章では、1970年代半ば以降形成されてきた国民の認識を検討し、バイオテクノロジーの商業利用の発展に対するその実際のおよび潜在的影響を評価する。その意味で、国民の認識の目に見える表明について、とりわけそれが展開してきた過程と規制のプロセスによって形成されてきた過程（バイオテクノロジーをめぐる国民議論の概要）と、調査を通じて明らかになったより広範な意見（バイオテクノロジーに対する国民の認識）について十分に考慮する。最後に、国民の認識の問題は、途上国、とりわけバイオテクノロジー分野に参入した、あるいは参入しようとしている国々との関わりで取り上げられる（発展途上国）。

以下では主にバイオセイフティと、紙幅は少なくなるがその社会経済的な影響を取り上

げる。本書の目的を考慮し、ヒトへの遺伝子治療の実施に関する倫理上の問題、動物への遺伝子導入、生命体に対する特許といった重要な問題は扱っていない。

## バイオテクノロジーをめぐる国民議論の概要

遺伝子工学の技術がまだ胎生期にあった 1970 年代初め、組換えDNA (rDNA) の研究にかかわる著名な科学者のグループから、一部のrDNA実験によって生じる潜在的なバイオハザードに対する懸念の声があがった。このグループは、1974年7月26日付『サイエンス』誌<sup>1</sup>の通信欄で、関連する実験の全世界での自主的凍結と、rDNA実験に関するバイオセーフティについて議論するための国際会議の開催を呼びかけた。この会議は、1975年にカリフォルニア州パシフィックグローブのアシロマ会議場で開かれ、会議の結果、rDNA研究に関する一連の基準案を示した原則声明を作成した<sup>2</sup>。会議後、直ちに組織された米国立衛生研究所 (NIH) の組換えDNA諮問委員会 (RAC)<sup>3</sup>は、先の声明を公のガイドラインにする作業に着手した<sup>4</sup>。多くの国が米国の例に続くことになった。

この一連の出来事は、いろいろな意味で異例だった。それは、ガイドライン策定への動きを含め、バイオセーフティに関する最初の議論が科学界自体の内部から起こったこと、最先端のバイオテクノロジーがまだ緒についたばかりの時期に公共政策の問題が導入され、それに基づいた行動が取られたこと、一連の出来事や科学者間での意見の食い違いに向けられた国内外のマスコミによるおびただしい、往々にして誇張された報道が、国民の目を早い時期に開かせる役割をしたこと、である。

rDNAの物理的・生物学的な封じ込めという厳密な規則に基づき、NIHのガイドラインの対象は連邦政府の資金を受けている研究所での実験に限られていた。しかし実際には、非政府機関と民間企業も、おそらくは自らの行う研究活動に最大限の信頼性を与えるために、このガイドラインに従うことになった。また、科学者や企業は、柔軟性のない法的な規制を回避することがもっとも自分たちの利益になるとも判断した。こうした姿勢が研究の世界にうまく働いたことも証明された。つまり、研究所での遺伝子工学実験の安全記録によって、そうした実験にかかわる懸念が誇張されてきたことが急速に明らかになり、封じ込め規制が徐々に緩和されたのである。EUでも、加盟各国でこの点での立場に相違があるものの、同様の傾向が現れた。

<sup>1</sup> Berg, P., Baltimore, D., Boyer, H. W., Cohen, S. N., Davis, R. W., Hogness, D. S., Nathans, D., Roblin, R., Watson, J. D., Weissman, S. & Zinder, N. D. (1974) Potential biohazards of recombinant DNA molecules. *Science*, 185, 303.

<sup>2</sup> アシロマ会議およびその後の出来事に関する記述は、バイオテクノロジーの歴史を扱った多くの文献で見ることができ、たとえば次のような文献である。(a) Gore, Jr., Sen. A. & Owens, S. (1985) *The Challenge of Biotechnology*. In: *Yale Law and Policy Review*. Vol. 3, No.2, Spring; (b) Krinsky, S. (1991) *Biotechnics and Society: The Rise of Industrial Genetics*. Praeger Publisher, New York; (c) Olson, S. (1986) *Biotechnology: An Industry Comes of Age*. National Academy Press, Washington, DC; (d) Watson, J. & Tooze, J. (1981) *The DNA Story*. W. H. Freeman & Co., San Francisco; (e) Yanchinski, S. (1989) *Biotechnology: A Brave New World?* Lutterworth, Cambridge.

<sup>3</sup> 組換えDNA諮問委員会 (RAC) は、最初に懸念を表明した科学者グループの要請によって 1974 年 10 月に設置された。

<sup>4</sup> *The Guidelines for Research Involving Recombinant DNA*. National Institutes of Health, June 1976.

1976年にNIHのガイドラインが発表されて間もなく、rDNA研究(さらにはNIHの監督方法)に対する国民の反発が明らかになる最初の事件がマサチューセッツ州ケンブリッジで起きた。ハーバード大学による遺伝子工学研究所の建設計画が、地元の住民団体から「自分たちの近所には絶対反対」という反発を受けたのである。これが国内外のマスメディアのほか、マサチューセッツ州選出のエドワード・ケネディ上院議員の目に留まり、同氏は直ちに、バイオテクノロジー研究を管轄する現行の規制の妥当性に関する上院小委員会の公聴会を設置した<sup>5</sup>。

その翌年には、地方の組織、とりわけ大学での研究が活発な地域で遺伝子工学に関する議論を始めるところが次々に現れ、いくつかの州や地域社会がケンブリッジ州の例にならってrDNA研究を規制する独自の法律を導入した。こうした動きや一般国民の懸念の表明と思われるものへの対応として、連邦議会では遺伝子工学の規制を目的とした法案が十数本提出された。十分な支持が得られなかったために、これらの法案のうち立法化されたものはひとつもなく、唯一の規制当局としてのNIHの立場は強化された。

1980年代半ばまでに、バイオテクノロジー発展の背景となる状況には、いくつかの重要な変化がみられた。バイオテクノロジーの主な推進力は、大学の研究室から企業部門に移っていた。当初は懐疑的だった大企業が、主にベンチャー企業との戦略的提携を通じて、この分野への参入を始めたのである<sup>6</sup>。政府は、バイオテクノロジーを国際競争で重大な役割を担う重要な技術とみなすようになっていた。やがて、バイオテクノロジーが農業やバイオレメディエーションといった、医薬以外の分野で利用されるようになるにつれて、公共政策や国民の認識にかかわる新たな問題が提起され、懸念は、作出された生物の環境への予想外の放出から、そうした生物の意図的な放出に伴う健康上・安全上のリスクへと移った。

バイオテクノロジーがいよいよハイリスク・ハイリターンの経済ゲームになってきたこと、また潜在的リスクとして新たな要素が組み入れられたことから、バイオセーフティや、より適切な規制の仕組みを見出す必要性についての国民の議論は、それまでとは違った切迫感を帯びるようになっていた。環境への放出にかかわるリスク評価の問題に関しては、科学界の内部で激しい論争が繰り広げられ、分子遺伝学者が生態学者と争い、二つの相争う科学パラダイムがぶつかり合った<sup>7</sup>。この議論は、新たな権利擁護グループをも引き入れ、なかでも目立ったのは環境保護論者や、EUの場合は議会の代表だった。産業団体、

<sup>5</sup> *Oversight Hearings on the Implementation of NIH Guidelines Governing Recombinant DNA Research: Joint Oversight Hearing of the Subcommittee on Health and Subcommittee on Administrative Practices, 94th Congress*. United States Congress. Senate. 22 September, 1976. 次の文献で取り上げられているとおりである。Plein, L. C. (1990) *Biotechnology: Issue development and evolution*. In: *Biotechnology: Assessing Social Impacts and Policy Implications*, Webber, D. J. (ed.). Greenwood Press, Connecticut.

<sup>6</sup> 企業の関心の高まりの背景には、いくつかの要因がある。科学分野における急速な進歩と成果の有望性、遺伝子組換え生物の特許出願の対象となつた1980年の米国連邦最高裁判所判決(Diamond v. Chakrabarty)、レーガン政権の特徴だった全般的な技術推進・規制緩和の環境などである。

<sup>7</sup> 科学上の論争については、Krimsky, S. (1991) *Biotechnics and Society: The Rise of Industrial Genetics*. Praeger Publisher, New Yorkを参照のこと。

各企業や関連の研究団体といったバイオテクノロジーの擁護者も、より積極的な姿勢を取りはじめた。

ほとんどの政策論争は規制分野に関するものに終始することになったが、この分野では実験段階から実用化段階へと焦点が移ったことによって、分野別の安全上・健康上の規則を追加する必要性が生じていた。米国の場合、食品医薬品局（FDA）、農務省（USDA）および環境保護庁（EPA）が、それぞれの管轄分野でこの役割を受け持つことになった。規制環境は、さまざまな理由できわめて複雑かつ混乱したものになった。1986年に出された「バイオテクノロジーの規制に関する調整された枠組み」<sup>8</sup>をはじめ、こうした欠点を克服しようとする試みは特段の成果をあげなかった。しかし、バイオテクノロジーに限定した法案が通らなかったことで、徐々に規制の調整が行われるという可能性は残された。EUでは、製品とプロセスの両方を対象とする、バイオテクノロジーに限定した厳しい指令が、新たな形式主義を生み出した。

企業の株主にとって、バイオセーフティに関する規制は痛し痒しの問題だった。一方では、政府による認可は製品（EUの場合はプロセスも）の「正当化」になくってはならない手段の1つだったが、それと同時に、ほとんどの利用分野で規制が大幅に遅れたことによって、競争市場への深刻な参入障壁が生じていた<sup>9</sup>。

バイオテクノロジーや具体的な利用に対して積極的に反対する人々は、今度は環境団体をはじめとして広範囲にわたる連携相手とともに活動を続けることになった。規制当局に対して圧力をかけ、個々の製品の市場でのタイムリーな発表や普及を妨害するための戦術の一部として、政府への陳情、議会公聴会での発言、訴訟、マスメディアを通じた広報活動や、野外試験の組織的なボイコット、サボタージュが行われた。

現在、重要なのは、遺伝子組換え食品をめぐる米国のバイオ産業とそれを非難する人々の対立である。この分野での技術開発を阻むことができなかった反対派は、今度は、この種の食品の表示をめぐる争っている。組織的な反対が世論に与える影響を警戒して、食品の規制を管轄するFDAは、現在、食品の製造に用いられるプロセスの特定の問題に関する自らの立場の見直しを行っている。

上に述べたような活動が示すとおり、バイオテクノロジーへの反対運動の大部分は、特定の利益団体を広範に結集する活動家によって行われてきた。これらの団体は、組織の仕組みやマスメディアを巧みに利用し、バイオテクノロジーのいくつかの利用分野での開発期間を引き延ばすのにかなりの成功を収めてきた。このことから、組織された権利擁護団体とそのときどきの同調者たちが世論一般を代表しているとみなすのは適切ではないとい

<sup>8</sup> 科学技術政策局（Office of Science and Technology Policy）、1986年6月、連邦公報（Federal Register）51号。

<sup>9</sup> 規制の形式主義による時間的遅れは、米国の場合、リスク評価に関連する障害、規制権限の重複、一部の政府機関がバイオテクノロジーの規制当局であると同時に推進役でもあったという事実、正式な規制当局や適切なインフラの欠如、バイオテクノロジー反対派による効果的なロビー活動など、複雑な要素が絡み合っ生じていた。Leopold, M. (1993) The commercialization of biotechnology, the shifting frontier. In: *Biotechnology R&D Trends. Science Policy for Development*, Tzotzos, G. T. (ed.), *Ann. New York Acad. Sci.*, 700, pp. 214-231. The New York Academy of Sciences, New Yorkを参照。

える。

## バイオテクノロジーに対する国民の認識

世論調査を慎重に思慮深く利用することは、( )国民の幅広い階層がバイオテクノロジーをどのように認識しているか、( )国民の認識を形成するのはどんな要因か、( )国民の認識はバイオテクノロジーを用いた各種の製品やサービスの市場参入や普及にどのような影響を及ぼしているか、を明らかにするのに役立てることができる。これまで行われてきたこうした調査の大部分は、製品の価格設定といった経済的要因を考慮していない。もし単にこれだけの理由なら、これらの調査でわかるのは、バイオテクノロジーの市場での成功に関する大雑把な推定でしかない。

ここで、最近行われた3つの関連調査での結果を示し、これを評価する<sup>10</sup>。一般的にみて、ユーロバロメーターによる調査については、その結果が米国での2つの調査の結果と酷似しているため、1つの例を除いて区別せずに解説している。しかし、EUでは加盟国間で国民の認識に大きな相違がある場合が多いことに注意する必要がある。国家間のばらつきについては本章の別の箇所であらう。

### 調査結果

国民はバイオテクノロジーをどのように認識しているか

1. 大多数の人々は、遺伝子工学のリスクが大幅に誇張されていることに同意している(調査A)。
2. 国民の大多数が厳しい規制の必要性を感じており、上記の結果は遺伝子工学への無条件の支持を意味するわけではない(調査A)。
3. ほとんどの場合、バイオテクノロジーについては、小規模の実験(隅々まで検査の行き届いたもの)に対する支持と、大規模な商業利用に対する不支持とで国民の認識が分かれている(調査A)。
4. 一般に、国民はバイオテクノロジーが食品の品質や栄養面に望ましい影響を及ぼす可

---

<sup>10</sup> (A) United States Congress, Office of Technology Assessment, *New Developments in Biotechnology-Background Paper: Public Perceptions of Biotechnology*, OTA-BP-45, United States Government Printing Office, Washington, DC., May 1987. (1986年10月から11月にかけて行われた、全国の無作為サンプルから抽出した米国の成人1,273名を対象とした調査) (B) Hoban, T. J. & Kendall, P. A. (1992) *Consumer Attitudes about the Use of Biotechnology in Agriculture and Food Production* (米国農務省普及局への報告書の概要), Raleigh, North Carolina. (1992年2月から3月にかけて行われた、全米の成人1,228名への電話(無作為ダイヤル方式)による調査) (C) Marlier, E. (1992) Eurobarometer 35.1: Opinions of Europeans on Biotechnology in 1991. In: *Biotechnology in Public: a Review of Recent Research*, Durant, J. (ed.). Science Museum for the European Federation of Biotechnology, London. (1991年3月から4月にかけて行われた、15歳以上の住民12,800名の代表サンプルを対象とした欧州共同体加盟12カ国の同時調査)。

能性があると考える傾向がある（調査 B）。

#### 認識を形成する要因

1. 教育水準や信仰は、ある少数派の否定的な認識を説明する重要な要因である（調査 A）。
2. バイオテクノロジーの大規模な商業利用を大多数が支持していないのは、主に環境団体の圧力によるものである。環境団体は、往々にして連邦政府機関よりも信頼されている（調査 A）。
3. 環境団体による主張にうまく対抗できれば、長期的にはこのような状況は変わるかもしれない（調査 A）。
4. 科学的な知識・教養は、環境団体によって引き起こされた不安を緩和する（調査 A）。
5. 現在利用できる国民の意識や態度に関する研究からは、効果的な教育プログラムを立案するのに十分な要素が得られない（調査 B）。
6. バイオテクノロジーに関する情報を貪欲に求めるようになってきた国民に対応しているのは、非公式な情報の普及手段（特にマスメディア）である（調査 B）。
7. 明確な基準の制定も求められている。たとえば、食品の表示情報は、バイオテクノロジー利用に対する国民の懸念に応える有力な手段になりうる。ただし、こうした手段の有用性は、教育や意識の水準に左右される（調査 B）。
8. 政府機関への信頼と、教育や意識の水準は、正の相関を示す（調査 B）。
9. 「サイエンス・フィクション的な」手法による巧みな弁舌や誇張が、不透明感を増長している（調査 B）。
10. 国民の意識を高める働きを持つものとして重要なのは、マスメディアの代表、教育や医療の専門家である（調査 B）。
11. 意思決定過程への参加意識を国民に持たせることが、国民の支持を得る上で重要な役割を果たす（調査 B）。
12. バイオテクノロジーに関する情報の出所の信頼性は、次のように評価されている。消費者団体 - 27%、環境団体 - 23%、学校、大学 - 17%、公的機関 - 7%、動物保護団体 - 5%、宗教団体 - 3%、政治団体 - 1%、労働組合 - 1%、企業 - 1%、わからない・無回答 - 15%（調査 C）。

#### 国民の認識がビジネスチャンスに与える影響

1. 大多数の人が、誇張されたリスクに起因する不安が、製品開発に深刻なダメージを与えていると考えている（調査 A）。
2. 事前の段階では、個人（そして公的機関）が不透明感を持つことはある程度避けられない。つまり、商品が市場に出るまで、消費者の反応を完全に把握することはできない（調

査 B)。

3. 食品の安全に関する意識の高まりと、国民による受容と技術の進歩の間の隔たりとが相まって、利用方法の開発や市場への参入の減速につながる可能性がある。(調査 B)。

4. 安全基準が許容水準をクリアしているとすれば、国民の受容により大きな影響を与えるのは、製品の品質よりも製品の価格である可能性が高い(調査 B)。

## 調査結果の評価

### 国民の認識における学習曲線

国民の認識は、各国に固有な 5 つの大きな要因の関数である。その要因とは、経済的豊かさ、教育、社会的・制度的な参加手段、文化的・宗教的な価値観および伝統、そして任意の変数(過去の特に衝撃的な出来事など)である。

世論の成熟度とそれを表現する手段が、長い間不変だったとは考えられない。世論は、一段と高度化した表現や参加の手段を通じて、いっそう役割を増すことが期待されるが、それには、社会の発展とともに、学習のプロセスもかかわっている。今日の最先進国においてさえ、果たして社会が歴史的にみてこうした学習プロセスの頂点に達しているか疑問に思うのは無理からぬことである。世論調査を使って到達した結論がどの程度断定的なものであるかは、こうした状況と相対的な関係にある。

### 権利擁護団体が対象とする集団

すでに述べたように、権利擁護団体は、それぞれの利用分野による特定の影響に応じて特定の対象に訴えかける。国民全体としてみる限り、教育の水準と国民の各階層に対する権利擁護団体の影響には関連があるものと仮定することができる。一方で、科学的な知識・教養がなかったり、教養が全くない階層は、対象にされるとは考えにくい。それとは正反対に、科学的な知識・教養があり、自分自身の意見を形成することのできる階層も、権利擁護団体の影響下に入る可能性は低く、権利擁護団体は宗教、道徳といった先入観に訴えるかもしれない。最後に、中間的な国民の階層があり、これは、どのような問題について議論が行われているかを理解できるだけの知識や教養を持っているものの、自身の判断を下せるほどではない階層である。国民全体としてみる限り、権利擁護団体の影響を受ける可能性がもっとも高い標的階層は、この階層である。

### 世論の「顕在化」を示す指標としての国民の選択

市場の合理的な選択をみれば、経済的豊かさに関する完全な情報とその最低水準がわか

る。市場の選択が不十分な場合、顕在化した世論を示すものとしての根拠は希薄になる。比較的選択が行われない分野では後者の状況が生じるため、国民は、リスクが大きくてもそれを受け入れる傾向がある。選択が不十分な場合、公的な介入の必要性が生じることにもなりうる。こうした状況は、途上国や先進国の最貧層で見られる。

## 相対的競争力

製品やプロセスの技術革新によって相応の製品がもたらされる場合、国民は競争力のある価格設定に反応することになる。

## 発展途上国

1. 途上国の場合、一定の環境が必要であり、それは制度、政治、社会、教育、文化によって可能になる。
2. 先進国との共通点と相違点は以下のとおりである。
  - (a) 比較的広範に渡る市場の失敗によって、国民の認識の「顕在化」を判断するのが難しくなっている。
  - (b) 途上国は学習曲線の初期段階にある。
  - (c) 国民の認識は先進国と同様の要因によって形成されているが、それらの相対的な重要性は国ごとに異なる。
  - (d) バイオテクノロジーに参入した、あるいは参入しようとしている途上国では、合理的な判断のできる国民の割合も高い可能性があるものの、ほとんどの先進国と同様、比較的低い割合にとどまっている。所得配分の問題は、こうしたことを背景にして考える必要があり、ブラジルやインドといった国にはバイオテクノロジー産業があるものの、貧困や文盲の比率が著しく高い。国民の多くの階層が文盲だったり教育がない場合、広範な世論は形成されない。
  - (e) 権利擁護団体が標的とする国民は、途上国では一般にかなり少ない。最後進国では存在しない場合もある（権利擁護団体が存在しない場合があるのと同様に）。
  - (f) 多くの場合、伝統的な価値観や宗教が国民の認識に与える影響は、先進国の場合よりも大きい可能性がある。
  - (g) 途上国において、現在、世論を主導しているのは非政府組織である。
  - (h) 国際機関、特に国連の専門機関も、その中立性のため、途上国における国民の意識を高める上で重要な役割を果たすことが期待される。

## 第3章

### 遺伝子組換え微生物 (GMM) のリスク評価と封じ込め利用

ジョン・グリンステッド

ブリストル大学 (英国)

#### はじめに

1970年代前半に遺伝子工学が現実的な問題として登場して以来、遺伝子工学は多くの国で政府あるいは政府に準ずる機関による規制の対象になってきた。こうした措置が取られている理由として、もともとこの技術には「自然の」生物がもたらすものとは質的に異なり、本質的により危険な潜在的リスクがあるという認識がある。

これまでに、こうした憶測を裏付ける実績はない。単離された組換え生物の性質に関しては、既知の構成要素によって定義されており、クローンを単離するためにまず構築されるライブラリーに関しても、予想外の危険が生じるという証拠はない。

しかし、多くの国では遺伝子改変を特に対象とした規制が行われており、遺伝子工学がかかわる実験は、ごく無害なものでも詳細な評価を行うことが法律で求められるというのが実状である。また、遺伝子組換え生物 (GMO) の総合的なリスク評価においては、遺伝子の改変は考慮すべき要因として加えるものの1つであるというのも事実である。本章では、微生物に通常付随する危険と、それらが実験室内でどのように扱われているかを述べる。その後、GMOに固有の危険、これらの危険をどういった方法で評価することができるか、そしてその結果行われる封じ込め措置との対応関係を検討する。本章のベースには、英国で行われている方法が用いられている。特に広くに参考にされているのは、『病原体の危険度による分類および封じ込めの種類 (*Categorization of Pathogens According to Hazard and Categories of Containment*)』第2版 (1990年) (HMSO ISBN 0 11885564 6) および遺伝子改変を伴う研究のための ACGM/HSE による手引書 (Notes of Guidance) である。これらの方法を裏付ける原則は普遍的であり、関連するリスクを効果的に評価することができるものである。

#### 微生物によるバイオハザードの分類

GMOの封じ込め利用におけるリスク評価に関して、重大になるのは一般に微生物によるバイオハザードであり、高等生物の封じ込め利用については問題がないはずである (顕花植物の場合には、花粉を封じ込めるための適切な予防措置を講じる必要がある)。微生物一般に関して、潜在的な危険性がもっとも大きいのは、病原性、つまり特定の宿主に感染し、その内部で病気を引き起こす力である。この他に考慮しなければならない要因として、

生育不能な生物やその構成要素、あるいは微生物の発現産物の持つ毒性、アレルギー性その他の生物学的影響がある。毒性の概念は致死性に限られるべきではなく、変異原性、発癌性、神経毒性、環境影響といったものも含まれるべきである。

感染とそれに続く発病は、微生物が、その増殖を防いだり抑える宿主の能力に対抗して宿主内で増殖する能力によって左右される。つまり、細菌の病原性の本質は、宿主内に侵入し、適当な生息場所を見つける能力である。侵入とは、単に宿主と感染因子の偶然の接触ではなく、当初の侵入部位と最終的な定着部位とでは微生物の周囲を取りまく環境が大きく変化する場合もある。したがって、病原体は、いくつかの異なる環境で生育したり耐性を発揮できる遺伝的な仕組みを持っているはずである。さらに、病原体のある特殊な病原性は、感染した微生物がその宿主内で一定の環境に遭遇するまで発現しないかもしれない。つまり、一般的に、病原性とは単なる性質ではなく、食菌作用に抵抗性を示す莢膜、細菌毒素、細菌の線毛のようなビルレンス（毒力）を決定する要因のほか、宿主内への侵入や定着に関連するより複雑な要因が関わっているのである。

微生物が持つ病原性はさまざまで、その病原性によって便宜的に分類されている。さらにこの分類は、適切な封じ込めレベルを決定する際に利用できる。たとえば英国では、微生物が1から4のレベルに分類されている。

1. ハザード・グループ 1 人に病気を引き起こす可能性がほとんどないと思われる微生物。
2. ハザード・グループ 2 人に病気を引き起こす可能性があり、実験従事者に対して危険な場合があるが、地域社会に拡散する可能性は低い微生物。実験室での曝露によって感染が起きることはほとんどなく、通常、有効な予防法や対処法が用意されている。
3. ハザード・グループ 3 人に重症の病気を引き起こす可能性があり、実験従事者に対して重篤な危険性を示す微生物。地域社会への拡散のリスクがあり得るが、通常、有効な予防法や対処法が用意されている。
4. ハザード・グループ 4 人に重症の病気を引き起こし、実験従事者に対して重篤な危険性を有する微生物。地域社会への拡散のリスクが高く、通常、有効な予防法や処置がない。

ハザード・グループ 2、3 および 4 の微生物が「病原体」である。これらのレベルに分類される微生物については、表 3.1 に示した。

この分類の目的は、封じ込めが実験従事者と社会全体の両方を保護するためのものでなければならないことに留意し、病原微生物に応じた適切な封じ込めを行うことにある。したがって、ハザード・グループのレベルが上がるのにしたがって、封じ込めのレベルが高くなる。ハザード・グループと封じ込めレベルを一致させる上で考慮されているのが、病

原性、伝播経路、疫学的因果関係、宿主の感受性である。封じ込めに失敗する可能性とその影響についても考慮が必要で、適切な場合には、事故の際に住民や環境の安全を確保するための緊急対策を用意する必要がある。

封じ込めの際に重要なのは、標準的な作業手順や手法を厳守することである。優良試験所規範（Good Laboratory Practice：GLP）があらゆるレベルの封じ込めの基準でなければならない。基準は次にあげる手順・方法からなる。

1. 職員の安全を目的とした内部の実施規範を定め、実施しなければならない。
2. 実験室の職員は、実験室内で実施される手順について指導を受けなければならない。
3. 実験室は洗浄が容易でなければならない。作業台の表面は、耐水性で、酸、アルカリ、溶剤および消毒剤に耐性がなければならない。
4. 実験室で強制換気が行われている場合は、室内の空気を抽出することによって内部への空気の流れを保たなければならない。また抽気ファンが故障の場合に、実験室に陽圧がかかるのを防ぐためのシステムにつながっていなければならない。また、換気システムには空気の逆流を防ぐ手段を備えてなければならない。
5. 実験室には手洗い専用の洗面台または流し台を備えなければならない。
6. 作業中は実験室のドアを閉じておかななければならない。
7. 実験室内では実験衣を着用し、実験区域外へ出るときにはこれを脱がなくてはならない。
8. 実験室内では、飲食、喫煙、食料の保存、化粧を行ってはならない。
9. 口によるピペット操作は行ってはならない。
10. 汚染が疑われるとき、生体試料を扱った後、および実験室を退出する前には、手を消毒または洗浄しなければならない。
11. エアロゾルの発生を最小限に抑えるために、あらゆる措置を講じなければならない。
12. 通常の消毒および流出時に直ちに使用できるように、効果的な消毒剤を準備しておかななければならない。
13. 使用後は作業台の表面を洗浄しなければならない。
14. 使用済のガラス器具などで消毒前のものは、安全な方法で保管しなければならない。ピペットを消毒剤に浸ける場合には、完全に浸さなければならない。
15. すべての廃棄物は、オートクレーブまたは焼却して廃棄前に無害化しなければならない。
16. オートクレーブまたは焼却に回す試料は、堅固で漏れのない容器に入れ、流出しないように運ばなければならない。

表 3.1 ハザード・グループによる微生物の分類（本リストは「危険および封じ込めの種類による病原体の分類」に基づく。本文参照）

ハザード・グループ 1 グループ 2、3、4 以外の微生物		
ハザード・グループ 2		
細菌		
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Clostridium</i> spp	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Acinetobacter woffii</i>	（ヒトに対する病原性があるとされている種）	<i>Moraxella</i> spp
<i>Actinobacillus</i> spp	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<i>Morganella morganii</i>
<i>Actinomadura</i> spp	<i>Corynebacterium</i> spp	<i>Mycobacterium bovis</i> （BCG 株）
<i>Anctinomyces bovis</i>	（ヒトに対する病原性があるとされている種）	<i>Mycobacterium chelonae</i>
<i>Anctinomyces israeli</i>	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Alcaligenes</i> spp	<i>Enterobacter</i> spp	<i>Mycobacterium microti</i>
<i>Arizona</i> spp	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Bacteroides</i> spp	（非病原性とされている種を除く）	<i>Neisseria</i> spp
<i>Bacterionemia matruchothii</i>	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	（ヒトに対する病原性があるとされている種）
<i>Bartonella bacilliformis</i>	<i>Francisella tularensis</i> (B 型)	<i>Nocardia asteroides</i>
<i>Bordetella parapertussis</i>	<i>Fusobacterium</i> spp	<i>Nocardia brasiliensis</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Pasteurella</i> spp
<i>Borrelia</i> spp	<i>Haemophilus</i> spp	<i>Peptostreptococcus</i> spp
<i>Campylobacter</i> spp	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
<i>Cardibacterium hominis</i>	<i>Kingella kingae</i>	<i>Proteus</i> spp
<i>Chlamydia</i> spp （鳥類株以外）	<i>Klebsiella</i> spp	<i>Providencia</i> spp
<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Legionella</i> spp	<i>Pseudomonas</i> spp
<i>Clostridium tetani</i>	<i>Leptospira</i> spp	（ヒトに対する病原性があるとされ、グループ 3 に属する種を除く）
<i>Salmonella</i> spp （ハザード・グループ 3 のものを除く）	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Streptobacillus moniliformis</i>	（エルトール型を含む）
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus</i> spp	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
	（ヒトに対して非病原性とされているものを除く）	<i>Vibrio</i> spp
<i>Shigella</i> spp	<i>Treponema pertenu</i>	（ヒトに対する病原性があるとされている種）
		<i>Yersinia enterocolitica</i>

(ハザード・グループ3のもの  
を除く)

*Veillonella* spp

*Yersinia*  
*pseudotuberculosis* subsp  
*pseudotuberculosis*

#### 菌類

*Absidia corymbifera*  
*Acremonium falciforme*  
*Acremonium kiliense*  
*Acremonium recifei*  
*Aspergillus flavus*  
*Aspergillus fumigatus*  
*Aspergillus nidulans*  
*Aspergillus niger*  
*Aspergillus terreus*  
*Asidiobolus haptosporus*  
*Candida glabrata*  
*Candida guilliermondii*  
*Candida drusei*  
*Candida parapsilosis*  
*Candida kefyr*  
*Candida tropicalis*  
*Cladosporium carrionii*

*Conidiobolus coronatus*  
*Cryptocossus neoformans*  
*Cunninghamella elegans*  
*Curvularia lunata*  
*Emmonsia parva*  
*Epidermophyton floccosum*  
*Ecophialia dermatidis*  
*Ecophialia jeanselmei*  
*Ecophialia richardsiae*  
*Ecophialia spinifera*  
*Ecophialia werneckii*  
*Fonsecaea compacta*  
*Fonsecaea pedrosoi*  
*Fusarium solani*  
*Fusarium ocysporum*  
*Geotrichum candidum*  
*Hendersonula toruloidea*  
*Leptosphaeria senegalensis*

*Madurella mycetomatis*  
*Madurella grisea*  
*Malassezia furfur*  
*Microsporium* spp  
*Neotestudina rosatii*  
*Phialophora verrucosa*  
*Piedraia hortae*  
*Pneumocystis carinii*  
*Pseudallescheria boydii*  
*Pyrenochaeta romeroi*  
*Rhizomucor pusillus*  
*Rhizopus microsporus*  
*Rhizopus oryzae*  
*Sporothrix schenckii*  
*Trichophyton* spp  
*Trichosporon beigelii*  
*Xylohypha bantiana*

#### 寄生虫 (感染期)

*Acanthamoeba* spp  
*Ancylostoma duodenale*  
*Asngiostrongylus* spp  
*Ascaris lumbricoides*  
*Babesia divergens*  
*Babesia microti*

*Entamoeba histolytica*  
*Fasciola gigantica*  
*Fasciola hepatica*  
*Fasciolopsis buski*  
*Giardia lamblia*  
*Hymenolepis nana* (ヒト由来)

*Schistosoma haematobium*  
*Schistosoma intercautum*  
*Schistosoma japonicum*  
*Schistosoma mansoni*  
*Strongyloides* spp  
*Taenia saginata*

*Balantidium coli*  
*Brugia* spp  
*Capillaria* spp  
*Clonorchis sinensis*  
*Cryptosporidium* spp  
*Dipetalonema perstans*  
*Dipetalonema streptocerca*  
*Diphyllobothrium latum*

*Hymenolepis diminuta*  
*Loa loa*  
*Mansonella ozzardi*  
*Necator americanus*  
*Onchocerca volvulus*  
*Opisthorchis* spp  
*Paragonimus westermanni*  
*Plasmodium* spp  
(ヒトおよび類人猿)

*Taenia solium*  
*Toxocara canis*  
*Teichinella* spp  
*Trichomonas vaginalis*  
*Trichostrongylus* spp  
*Trichuris trichiura*  
*Trypanosoma brucei* subsp  
*Wuchereria bancroftii*

*Dracunculus medinensis*

*Pneumocystis carinii*

#### ウイルス

アデノウイルス科  
(Adenoviridae)  
アレナウイルス科  
(Arenaviridae)

カリシウイルス科  
(Caliciviridae)  
コロナウイルス科  
(Coronaviridae)  
ヘルペスウイルス科  
(Herpesviridae)

*Herpes simplex*ウイルス 1  
型および2型  
*Herpesvirus*  
*varicella-zoster*  
ヒトB細胞リンパ球ウイルス

(ハザード・グループ3および4のもの以外)	サイトメガロウイルス	オルトミクソウイルス科
ブニヤウイルス科 (Bunyaviridae)	エプスタイン - バーウイルス	インフルエンザウイルス A型、B型、C型
ハザラウイルス		
パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae)	A型肝炎ウイルス	トガウイルス科 (Togaviridae)
麻疹ウイルス	(ヒトエンテロウイルス 72型)	アルファウイルス
ムンプス(おたふくかぜ) ウイルス	ポリオウイルス	フラウイルス
ニューカッスル病ウイルス	ライノウイルス	ルピウイルス(風疹)
パラインフルエンザウイルス 1型~4型	ポックスウイルス科 (Poxviridae)	未分類ウイルス
RSウイルス	牛痘ウイルス	非A非B型肝炎ウイルス
パポバウイルス科 (Papovaviridae)	伝染性軟属腫ウイルス	ノーウォーク様の小型球形ウイルス
BKウイルスおよびJCウイルス	オルフウイルス	
ヒトパピローマ(乳頭腫) ウイルス	ワクシニアウイルス	胃腸炎に関連する小型球形ウイルス
パルボウイルス科 (Parvoviridae)	レオウイルス科 (Reoviridae)	次に関連する非通常病原体 クロイツフェルト - ヤコブ病
ヒトパルボウイルス(B19)	ヒトロタウイルス	
ピコルナウイルス科 (Picornaviridae)	オルビウイルス	ゲルストマン - シュトロ イスラー - シャインカー症 候群
急性出血性結膜炎ウイルス	レオウイルス	
(急性出血性結膜炎)コク サッキーウイルス	ラブドウイルス科 (Rhabdoviridae)	クールー
エコーウイルス	水疱性口内炎ウイルス	

### ハザード・グループ3

#### 細菌

<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>Brucella</i> spp	<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i>
<i>Chlamydia psittaci</i> (鳥類株のみ)	<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG を除く)	<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Francisella tularensis</i> (A 型)	<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium szulgai</i>	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rickettsia-like	
<i>Mycobacterium xenopi</i>		
<i>Pseudomonas mallei</i>		

菌類

*Blastomyces dermatitidis*

*Histoplasma capsulatum*  
var *duboisii*

*Paracoccidioides*  
*brasillensis*

*Coccidioides immitis*

*Histoplasma capsulatum*  
var *farciminosum*

*Penicillium marneffeii*

*Histoplasma capsulatum*  
var *capsulatum*

寄生虫 (感染期)

*Echinococcus* spp

*Naegleria* spp

*Tpanosoma cruzi*

*Leishmania* spp (哺乳類)

*Toxoplasma gondii*

ウイルス

アレナウイルス科

リケッチア様微生物

ヘルペスウイルス科

(Arenaviridae)

リンパ球性脈絡髄膜炎ウ  
イルス

ハンタウイルス属  
ハンタンウイルス (韓国  
型出血熱)

(Herpesviridae)

ブニヤウイルス科

その他のハンタウイル  
ス属

ポックスウイルス科

(Bunyaviridae)

ブニヤンベラ supergroup

(Poxviridae)

サル痘ウイルス

オロプーシェウイルス

ヘパドナウイルス科  
(Hepadnaviridae)

レトロウイルス科  
(Retroviridae)

フレボウイルス属

B型肝炎ウイルス  
B型肝炎ウイルス (デルタ  
抗体陽性)

ヒト免疫不全ウイルス

リフトバレー熱

ヒト T 細胞白血病ウイル  
ス

ラドウイルス科

トガウイルス科

フラビウイルス属

(Rhabdoviridae)

(Togaviridae)

アルファウイルス属

東部ウマ脳炎  
ベネズエラウマ脳脊髄  
炎

日本脳炎  
Kumlinge  
跳躍病

狂犬病ウイルス

フラビウイルス属 (続き)

ポーワッサン

ロシオ

セントルイス脳炎

Western equine  
encephalomyelitis

マリーバレー脳炎

ダニ媒介脳炎

黄熱

ハザード・グループ 4

細菌・菌類・寄生虫

なし

ウイルス

アレナウイルス科

フィロウイルス科

トガウイルス科

(Arenaviridae)

(Filoviridae)

(Togaviridae)

フニンウイルス ラッサ熱ウイルス マチュポウイルス	エボラウイルス マールブルグウイルス ポックスウイルス科 (Poxviridae) 大痘瘡・小痘瘡ウイルス	フラビウイルス属 ダニ媒介ウイルス Absettarov  Hanzalova Hypr  キャサヌール森林病 オムスク出血熱 ロシア春夏脳炎
モペイアウイルス ブニヤウイルス科 (Bunyaviridae) ナイロウイルス属 クリミア・コンゴ出血熱		

封じ込めのうちこのレベルが妥当なのは、ハザード・グループ 1 の微生物（すなわち非病原体）を用いた実験である。より高い封じ込めレベルでの作業についての英国の基準の概要を表 3.2 に示した。レベル 2 およびレベル 3 は、すべての作業が微生物学実験用の安全キャビネットで行われる高い封じ込めレベルであり、エアロゾルによる危険性がある場合に特にあてはまる。

全体としての環境に配慮しなければならないことにも注意する必要がある。つまり、先に述べた配慮は特にヒトの健康への危険性についてのものだったが、ヒト以外の動物あるいは植物に対して病原性を持つ微生物が存在する。このため、こうした病原体の取り扱いが制限される場合があり、またいかなる場合でも、リスク評価では偶発的な放出によって生じうる影響を考慮し、適切な封じ込めを行わなければならない。

## GMM は他の微生物と異なる扱いをすべきか

遺伝子改変によって、宿主生物の宿主域や基質利用性に影響が及ぶ可能性、あるいは宿主が病原体になったり、生態学的相互作用を有する個体群とのバランスに変化が生じる可能性を十分に考慮しなければならない。ただし、考えられる危険性についてこうした考慮が求められるのは、微生物を新たに分離する場合である。GMM には、リスク評価のために別の基準を必要とするような固有の危険性があるだろうか？ たしかに組換え生物は、微生物が本来持っていない遺伝子を含み、そうした化合物を産生することが多いのは事実で、これらの要因を考慮する必要がある。しかし、これは新規に分離される自然の微生物に伴う危険性の評価とそれほど異なるものだろうか？ 数百万のさまざまなクローンからなることもある遺伝子ライブラリーの使用に伴って考えられる危険性の評価では、別の種類の判断がなされなければならない。ここでの評価は、病原体を含む可能性のある臨床材料によって生じる危険性についてなされる判断とは異なる。

性質が完全にわかっている組換え生物（大腸菌 K12 株のクローンなど）の場合、挿入された DNA 断片とその産物が示す以上の危険性が生じると考える理由はない。その場合のリスク評価は、挿入断片の発現の程度と、その発現産物による被害の可能性だけを考慮することになる。性質のわかっていない宿主（初代培養細胞株など）を使う場合には、未知

の物質や経路（レトロウイルスや癌遺伝子など）が活性化する可能性があるため、（非 GMM の場合に比較して）より注意しなければならない。組換えウイルスでは、感染を引き起こす拡散の可能性についてももちろん真剣に検討しなければならないが、これはどんなウイルスを扱う場合でもそうである。

不確定要因として大きいのは、ある程度性質が明らかにされる単離クローンに関してではなく、遺伝子ライブラリー（すなわち、クローンを最初に単離する最中）に関してである。この場合、影響が不明なまったく未知の配列の組み合わせが起こる可能性がある。これこそが、遺伝子改変に関する現行の規制を招いた当初の大きな懸念だったのである。この点については、さまざまな考え方がある。たとえば、宿主細菌の病原性の株が突然生じたり、真核細胞株に突然変異を生じる可能性があるという考えもあれば、この分野には 20 年におよぶ研究の実績があるという考え方もある。

先程述べたように、病原性とは単一の特性ではない。微生物が病気を引き起こすには、多くの遺伝子がそれ相応に相互作用する必要がある。つまり、病原体には、認識因子、付着能、毒素産生能、宿主の防御機構への抵抗性など発現に必要な性質が備わっていなければならない。病原となる可能性や過去にその実績のない微生物の単一遺伝子の改変や、病原性の一因とならない複数遺伝子の導入では、予期しない病原性を生じる可能性はないと思われる。さらに、病原性に関しては、懸念すべき要素を明らかにするのにかなりの経験と広範なデータを利用することができる。たとえば、宿主として好んで用いられるものの 1 つである大腸菌 K12 株 (*E. coli* K12) の場合、野生型大腸菌（表 3.1 のグループ 2 に属する病原体）が持つ性質のうち、細胞表面の K 抗原、リポ多糖（LPS）側鎖の一部、ヒトの腸上皮細胞への付着を可能にする付着因子（線毛）、補体による細胞溶解に対する抵抗性、食作用に対する抵抗性など、その多くが失われている。これら 5 つの性質のうち 4 つの遺伝情報は染色体上に広く分散しており、遺伝子組換え実験の過程でこれらの遺伝子が偶然に転移する可能性は事実上ないと判断するのが妥当である。さらに大腸菌 K12 株は、実験室の特殊な生育培地以外ではほとんど生残しない。環境中での生残力や宿主への感染能がなければ、不注意による導入の危険性はほとんど考えられず、大きなリスクはない。つまり、このように性質が十分にわかっており、性質の弱められた宿主細胞の場合、予想外の事態が起きるのは、おそらく、単にその生物についての知識が少なく、使用の経験がないためである可能性が高い。このことは、たとえば哺乳類の初代培養株を扱う場合を考えれば容易に想像できる。培養細胞それ自体が脅威を及ぼすということは想像できないが（適切に行われると仮定した場合）、ウイルスの活性化は、そうした細胞株を扱った一般的な経験ではそのようなことがあり得ないことを示しているものの、可能かもしれない。

多くの宿主細胞では、長期にわたって各種の微生物から遺伝子ライブラリーを安全に構築してきた実績がある。もちろん、このことが災害が起こらないということの証明にはならないが（仮説による事象はきわめて低い頻度でしか起こらない）、理屈の上での計算と相まって、クローンの初代分離は基本的に安全な方法であるという極端な楽観論につながっ

ているのはたしかである（もちろん、何らかの有害な性質を分離しようとする場合は別である）。

## GMM のリスク評価および封じ込めレベルの指定

たしかに GMM は病原体になりうるもので、もし放出が起きれば環境に影響が及ぶ可能性もある。GMM は、宿主生物、ベクター、挿入される DNA 断片の 3 つの要素で構成される（ウイルスがベクターの場合、組換えウイルス自体が GMM であり、「宿主」と「ベクター」は同じになる）。これらの要素は個別に評価することが可能で、その評価を合わせることによって、組換え生物全体のリスクの程度が測られ、適切な封じ込めレベルがわかる。宿主の性質が弱められていたり、ベクターが他の生物への移行能を持たないために組換え体の実験室外への拡散が抑えられている場合、「生物学的封じ込め」のレベルを規定するのは宿主とベクターの性質であることが多い。

宿主が微生物の場合、それ自体の病原性についてはすでに評価が行われているはずである。すなわち、表 3.1 に示したようなリストに掲載されている可能性があるということである。この評価をもとに、さらなる検討が行われることになる（一見して、GMM のリスクのレベルは宿主自体のリスクより小さいはずはない）。もちろん、遺伝子工学の実験では、少なくとも細菌を扱う場合、宿主は非病原性（表 3.1 のハザード・グループ 1）であるのが普通である。この他に、宿主の実験室外での生存能も考慮しなければならない要素である。これがあてはまるのは、封じ込め状態から偶発的な放出が起きた場合である。つまり、もし宿主が環境に定着することができた場合、組換え DNA も同じ状況になる（組換え DNA 分子の「垂直伝達」）。大腸菌 K12 株は環境中ではほとんど生残することができない。つまり「不能」である。大腸菌 K12 株には特別に不能化された株があり（MRC1 や 1776 など）、これらはきわめて特殊な生育培地でしか生存することができない。コウジカビ（*Aspergillus oryzae*）、枯草菌（*Bacillus subtilis*）、出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）も、特別の不能な菌だと考えることができる。真核細胞株の場合も、当然ながら実験室外では自律的に生存することができず、また、コロニーを形成できず、既知の外来性因子も含んでいない以上、これも特別の不能な株と考えることができる。ある細胞株がこれらの基準を満たすかどうかを判断する上で不可欠な要件は、実験室内で長期間にわたって安全かつ無事故で使用されてきたという実績を持っていることである。

ベクターの場合、それ自体が病原性である可能性と、他の生物への伝達性（DNA の「水平伝達」）の両面を考慮する必要がある。この水平伝達によって、組換え DNA が環境中のさまざまな生息場所へ近づくことのできる生物へ伝達することになるため、偶発的な放出の影響を検討する上では重要である。

**細菌に導入するベクター** 大部分の大腸菌に用いられるベクターは、病原体となる性質をコードする配列を含んでいない。ただし、通常は、抗生物質抵抗性などの選択マーカー遺伝子を含んでいる。こうした抵抗性については、現在行われている医療行為、特に、その存在が治療の妨げとなるような株に問題の遺伝子が移行する可能性がないかを踏まえた上で検討しなければならない。通常用いられる特定のマーカー（ペニシリン抵抗性、テトラサイクリン抵抗性、クロラムフェニコール抵抗性など）は環境中にすでに広く存在しており、放出が起きても問題にならない。ベクターの伝達性に関しては、大腸菌にもっとも広く用いられているベクターは非伝達性である。ここでは2つの要因を考慮しなければならない。すなわち、一部のプラスミドには、他の細菌に移行できる（つまり、Tra<sup>+</sup>である）機能をコードする配列があり、他に、Tra<sup>-</sup>だがTra<sup>+</sup>プラスミドによって可動化するものがあり、これをMob<sup>+</sup>という。つまり、プラスミドベクターには、Tra<sup>+</sup>（自己伝達性）、Tra<sup>-</sup>だがMob<sup>+</sup>（伝達能欠損）、Tra<sup>-</sup>かつMob<sup>-</sup>（非伝達性）がある可能性があり、これらのグループに属するベクターは、他の微生物への伝達能の低下がみられる。プラスミドベクターの宿主域も関係しており、たとえば、一部のプラスミドは、多くの属（RSF1010系、RP4系など）に移行し、定着することができる。こうしたプラスミドベクターの場合、他の組換えDNA生物に移行し、そこで定着する可能性が高いのは明らかである。他の細菌ベクターについても、同様な検討を行う必要がある。つまり、多くの属の生物が伝達能を有するプラスミドを含んでいる。表3.3に一般的に使われている主な細菌ベクターの伝達性を示した。

表3.2 英国における実験室での4段階の封じ込めレベルに必要な要件の概要

要件	封じ込めレベル			
	1a	2	3	4
実験施設が隔離されている	不要	不要	一部要	要
燻蒸消毒のために実験室が密閉できる	不要	不要	要	要
換気：				
内部循環/陰圧による換気	任意	任意	要	要
安全キャビネットによる換気	不要	任意	任意	不要
直接の強制換気	不要	不要	任意	要
専用ダクトを用いた強制換気	不要	不要	任意	要
エアロック	不要	不要	任意	要
エアシャワー付きエアロック	不要	不要	不要	要
手洗い器	要	要	要	要
廃水処理	不要	不要	不要	要
オートクレーブ（作業現場）	不要	不要	不要	不要
オートクレーブ（実験区域内）	不要	要	要	不要
オートクレーブ（研究所内）：				
独立式	不要	不要	任意	不要
両面式	不要	不要	不要	要
微生物用安全キャビネットまたは安全囲い	不要	任意	要	要
安全キャビネットまたは安全囲いの種類	-	クラス	クラス または	クラス

a. 封じ込めレベル 1 は「優良試験所規範」に相当（本文参照）。  
出所：ACGM/HSE 注 8 を改変。

**高等真核細胞に導入するベクター** 表 3.3 に示したベクターの一部は、大腸菌内で組換え体を作り、それを使って動植物の細胞株での一時的発現や安定的発現を研究しようと考えられたシャトルベクターである。これらのベクターの一部は、マウス乳癌ウイルスや SV40 など真核細胞のウイルス由来の DNA 配列を含んでいる。こうしたベクターの場合、感染性粒子が含まれていない限り、無害であると考えることができる（感染性ベクターについての議論は以下を参照のこと）。染色体に組み込まれるベクターも、非伝達性であると考えてよい。

**真核細胞に導入するウイルス由来ベクター** 真核細胞用ベクターの一部は、明らかな病原体（ウイルス）に由来しており、当然これらのベクターはその病原性の一部を保持している場合がある。こうしたベクターの一部は感染性はあるものの複製能が欠損しているため、DNA を目的の細胞に届けることはできるが、ウイルスとしてそこで増殖することはない（レトロウイルス由来のベクターはその一例である）。ここで検討しなければならないのは、どのような種類の細胞が感受性を示し（ヒトの細胞に感染するとすれば、実験従事者が危険にさらされる）相補や組換えによって宿主内に潜むウイルスの複製能の欠損が修正される可能性があるかどうかである。ベクターが高い複製能を持つウイルスである場合、挿入された DNA 断片がウイルスの病原性や屈性に影響を及ぼす可能性を検討しなければならない。

侵入性（access）とは、組換え DNA が環境（人体を含む）に入り込み、そこで定着する可能性を測るものである。これは宿主とベクターの性質によって決まる。たとえば、大腸菌 K12 株で使われる非伝達性ベクター（表 3.3 参照）は、感染性ウイルスが含まれていない限り、細胞株に用いられるベクターと同様、侵入性はきわめて低い。感染性の高い組換えウイルスの場合、感受性のある宿主への侵入性がきわめて高く、その結果、増殖性感染が起こって組換え分子が増加する可能性がある。

表 3.3 各種ベクターの移動性【脚注a】

非伝達性ベクター 大腸菌 ( <i>E. coli</i> )	pAT153, pACYC184, pBR327, pBR328, pUC系, pBluescript II, pMTL20, pBS, pGEM, pBEMEX, pUR222, pUCBM, pSP系, pEX系, pCAT系, pT3/T7, pEUK, pMAM, pMSG, pEMBL, pSELECT 非伝達性ベクターの基準は、限られた宿主域を持つファージベクター (Charon 3A, gt10, GEM, EMBL, gt11, ZAP など) によって満たされると考えられる。
枯草菌 ( <i>B. subtilis</i> )	非伝達性ベクターの基準は、Tra-の F プラスミドを含む宿主で使われる M13 ファージベクターによって満たされると考えられる。
伝達能欠損ベクター 大腸菌 ( <i>E. coli</i> )	pUB110, pC194, pS194, pSA2100, pE194, pT127, pUB112, pC221, pC223, pAB124, pBD系  pBR322, pBR325, pACYC177, pKK233-2, pKK338-1, pBTac1, pBTrp2, pKC30, pKT279, pFB系, pNO1523, pSVL, pKSV10, pGA482, pNOS, pHSV106

【脚注 a】定義については本文を参照。

出所：ACGM/HSE/DOE 注 7 に基づく。

**挿入される DNA 断片 (insert)** は、いうまでもなく、もっとも慎重な評価が求められる構成要素である (通常、宿主とベクターの性質はすでに充分わかっており、適切に評価されているはずである)。挿入断片に関して重要な点は、遺伝子発現の可能性と遺伝子産物によって生じる危険性である。これらを検討することによって、損傷性と発現性というさらに 2 つのリスク要因が生じる。

**損傷性 (damage)** は、DNA あるいはそれがコードする遺伝子産物の既知または疑われる生物活性、またこの活性を顕在化させるのに必要な産物のレベルや性質に関連する。発現タンパク質の活性やそれが有する可能性のある毒性、アレルギー性、病原性の諸影響といった要因が関係する。

タンパク質の生物活性は、それが発現する宿主細胞系に依存すると思われる。たとえば、大腸菌で高レベルで発現させたタンパク質の一部は、折り畳みが正しく行われず、生物学的に不活性な不溶性の封入体を形成する。この他、挿入断片の位置によって影響が大きく異なるのが癌遺伝子である。すなわち、細菌では、たとえ発現しても有害性はなく、DNA がその影響を発揮するためには哺乳類の細胞に侵入する必要がある。他の分子の生物活性が完全かどうかは、特定の宿主細胞 (一般に真核細胞) だけで起きる翻訳後修飾に左右される。さらに、融合産物としてタンパク質が合成されるかどうかを考慮すべきである。つまり、組換え体の性質を詳細に検討することによって、表面上の損傷要因を軽減することができる場合が多いということである。英国で示されている損傷性レベルに関するガイド

ライン例は、次のとおりである。

- (a) 重大な生物学的影響を持つと思われる毒性物質または病原性因子。
- (b) 標的組織に届いた場合に有害な影響を有する可能性のある生理活性物質、または活性化した場合に重大な生物学的影響を有する可能性のある毒性物質の不活性型。
- (c) 有害な影響を有する可能性がほとんどないか、体内での正常レベルに達しない(たとえば正常レベルの10%未満)生理活性物質。
- (d) タンパク質の性質が既知であるため、または自然界に高頻度で存在するため、生物学的影響がほとんど考えられない遺伝子配列。
- (e) 予測しうる生物学的影響がない(たとえばDNA配列の非翻訳領域など)。

**発現性 (expression)** とは、導入された DNA の、予想される、または既知の発現レベルを測るものである。プロモーターの同定を検討する必要がある。つまり、導入される DNA 断片自体にプロモーターが含まれている可能性があるが、通常、そのプロモーターは、高い発現が特に求められるベクターの一部である。もっとも活性の高いプロモーターによる発現では、挿入断片の指令を受けて、宿主細胞では可溶性タンパク質が10%以上合成される。有効なプロモーターの数が減少し、完全になくなるにつれて活性は低下する。当然ながら、挿入断片が発現しないDNAしか含まないこともありうる。

英国では、侵入性、発現性、損傷性に番号が振られており、この3つの数字の合計によって GMM に対する適切な封じ込めレベルが決定される(ウイルスベクターは病原体なので、この最後の番号付けはあてはまらない)。ここで、上記のガイドラインにしたがって評価を行った、各種 GMM の使用に指定される封じ込めレベルの例を示す。標準的な pBR322 由来ベクターを用いる大腸菌 K12 株での無害なタンパク質の過剰発現 封じ込めレベル 1、真核細胞系での無害なタンパク質の過剰発現(感染性のウイルスを含まないと考えられるもの) 封じ込めレベル 2、伝達能欠損ベクターを用いるインターロイキン-2 などの活性タンパク質の大腸菌 K12 株での過剰発現 封じ込めレベル 2、インターロイキン-2 遺伝子運び、ヒト細胞への感染能を持つ複製能欠損レトロウイルス粒子 封じ込めレベル 2、癌遺伝子運び、マウス細胞だけに感染する複製能欠損レトロウイルス粒子 封じ込めレベル 2、癌遺伝子運び、ヒト細胞に感染能を持つ複製能欠損レトロウイルス粒子 封じ込めレベル 3、である。

以上のような単離されたクローンの評価に加えて、遺伝子ライブラリーの評価を行う必要がある。ここで問題になるのが、未知の要因、とりわけ「損傷性」をどのように評価するかである。ライブラリーが真核細胞由来の場合、大部分の遺伝子は cDNA ライブラリーでのみ発現する可能性が高いため、ゲノムライブラリーの有害性は cDNA ライブラリーよりも低いと考えられる。しかし、染色体からのクローニングの場合でも、潜在ウイルスのような外来因子を抽出してしまう可能性はある。先に述べたように、こうした予期しない結果が起こりうることを裏付ける証拠は1つも無い。したがって、ライブラリーのもとに

なるものが無害で、性質がよく知られているものであれば、有害性が生じる可能性はきわめて低いと考えるのが妥当であり、封じ込めレベルは1が適当である。しかし、ライブラリーが病原体由来の場合には、全体としての封じ込めレベルはその病原体（表 3.1）に合わせるべきであり、同定されたクローンが病原体由来ライブラリーから単離されたものである場合には、損傷性について現実的な指定をすることが可能であり、低い封じ込めレベルが妥当な場合もある。

## 封じ込め下での作業（大規模）

GMM を工業規模で増殖させることが実験室での利用に比べて本質的に有害性が高いということはなく、増加する可能性が考えられるのは、主に作業規模とそれに伴う放出量、濃度、暴露時間である。この傾向を補うのが、実験室段階での微生物に関する懸念の大部分が既に解消されていることである。つまり、微生物の性質は厳密に明らかにされ、製造される菌株が病原性を持つ可能性は無視しうるほど小さい。ほとんどの場合、伝統的に安全とされている微生物の改変は、DNA 断片の導入による新たな産物の産生の促進であり、産生される物質自体に必要とされる以上に安全性の懸念が生じることはない。

「実験室規模」と「大規模」との境界は、10 リットルとされることが多い。これは明らかに恣意的なもので、英国における GMM を用いる作業の定義は、「遺伝子操作によって作成される細胞または生物の利用で、実験室規模の反応容器内、試験生産または量産の目的等で行われるもの」とされている。小規模生産での封じ込めの指定が大規模生産に全面的にあてはまるわけではないが、評価の出発点にはなる。つまり、実験室規模での試験の評価の基礎になる考え方は、必要となる管理手段の性質と程度を決定する際にあてはまる。作業の安全基準が小規模生産でのガイドラインを下回ってはならないが、専用の封じ込め基準を定めるにはさらなる専門知識が必要とされるかもしれない。しかし、厳格な封じ込めの適用が必要とされてきた発酵技術の分野には、もちろん膨大な既存の経験の蓄積がある。

下流プロセスにはいくつかの段階があり、その各々について評価が必要になる。たとえば、リスクを検討する際には常に、下流プロセスに達する前に微生物が発酵槽内で死滅するかどうかといった要因が考慮に入れられなければならない。微生物を大規模に処理する方法は、エアロゾルの発生や広範囲の汚染が生じる可能性を伴う。場合によっては、プロセスの他の側面や産物によって示されるリスクによって、物理的封じ込めのレベルが決定される場合もある。

GMM の大規模利用では、大部分の場合、最小限の封じ込めをすればよい本質的に低リスクの生物が使われることになる。最小限の封じ込めであるこのレベルは、優良大規模試験所規範（Good Large-Scale Practice: GLSP）として知られている。GLSP には、必要なプロセスに求められる以上の封じ込め手法は含まれない。次にあげる職業安全衛生の基本

原則は、GLSP やあらゆるレベルの封じ込めに適用されるべきである。

1. 職場および環境が曝される物理的、科学的または生物学的因子は、実現可能な最低レベルに抑えること。
2. 根本的な部分で工学的な管理手法を実施し、必要な場合には、適当な個人用の保護衣および保護具でこれを補うこと。
3. 管理のための手法や器具を適切に検査し、維持すること。
4. 必要な場合には、一次的な物理的封じ込めの外部で、生存可能な組換え生物が存在していないか検査すること。
5. 職員に対する訓練を行うこと。
6. 職員の安全を目的とした内部の実施規範を定め、実施すること。

GLSP を定める上で、もっとも考慮しなければならないことは、GMM が病原体でないこと、宿主生物内でも同様にバイオリクター内で安全であること、環境に悪影響を及ぼさないこと、である。GLSP を定める過程では、環境への配慮を行うべきである。発酵プロセスの各段階や下流プロセスの早い段階で微生物が偶発的に放出されるというのは、大規模での作業、特に GLSP に固有の側面である。こうした微生物は環境に影響を与える。環境に対するリスクを評価する際には、次の要因を考慮すべきである。

1. 放出が予想される量または生物体量。
2. 既知の、または予想される微生物の挙動（生残、増殖、伝播に影響する要因など）。
3. 微生物が伝播する可能性のある生態系の詳細、およびそうした生態系における植物、動物、微生物に対する影響など既知の、あるいは予想される影響（病原性、毒性、ビルレンス、アレルギー性、コロニー形成など）。
4. 微生物の検出、同定およびモニタリング、また新たな遺伝物質の他の生物への伝達を検出する技術が利用できること。

## まとめ

GMM には固有の性質があり、それを正しく評価することによって GMM の使用に伴うリスクの現実的な評価が可能になり、適切な封じ込めを規定することができることは明らかである。これまで述べてきた原則や例は、こうした評価のための基礎を提供するものである。

遺伝子工学を特に規制することが正当であることを裏付けるきわめて科学的な根拠はなく、その潜在リスクはリスク評価で検討しなければならない単なる要因の 1 つであることも、これまでの議論から明らかであろう。国民はそれほど楽観的ではなく、また、政治的

な理由で特別な規制が求められる可能性はあるものの、安全規則は実験従事者にも国民にも尊重されるものでなければならない。そのためには、規則が健全な根拠に基づいていることが求められる。遺伝子改変を伴う実験の大部分は明らかに無害で無視しうる程度のリスクしか示さないが、多くの国では、そうした実験のすべてが過度に厳格で介入的な規制の対象になっている。

## 第 4 章

# 遺伝子組換え作物の封じ込め利用と環境への放出における安全性

フィリップ・J・デール<sup>1</sup>、ジュリアン・キンダーレーラー<sup>2</sup>

## はじめに

実験室における DNA の操作法や作物への遺伝子導入法は、この 10 年間で大幅に進歩した。これによって、世界中の作物が新たな方法で改変される機会が生まれている。植物にさまざまな性質を付け加える上で、バイオテクノロジーが大きな影響を及ぼすことになるだろう。害虫や病害への抵抗性を高めた植物や、タンパク質や油分が改変された植物、栄養面が改善された植物を作ることが可能になる。最終的には、干ばつや高塩濃度、低温といった環境ストレスから作物を保護することも期待できる。バイオテクノロジーを利用すれば、作物の *in situ* で合成される医薬品その他の新たな化学物質を、環境上好ましい方法で得ることもできる。その結果、消費者にとっては植物由来製品の選択の幅が広がり、恩恵を受けると考えられる。しかし、関係のない生物に由来する遺伝子を導入したり、実験室で遺伝子を合成することさえできるということは、国民の一部に懸念を生じさせている。たとえば、殺虫性タンパク質の産生を担う *Bacillus thuringiensis* 遺伝子の植物への導入によって、耐虫性の株が生じる可能性がある (Williamson, 1993)。

先進諸国の場合、ほぼすべての国で、この新たな技術が法令や条約で規制されている。新種 (外来種) の導入に関しては、多くの国が何らかの規制を行っているものの、従来の手法<sup>3</sup>を使って植物を改変することについてはあまり規制されていない。振り返ってみると、さまざまな育種法によって作出された作物の導入を管理する手法については多くの知識や知見、経験があるため、作物はこれまで正式なリスク - 安全分析やリスク管理の対象になってこなかった (OECD, 1992)。伝統的な育種法では、望ましい性質を持つ植物間で受粉を行い、その後、新たな遺伝子の組み合わせを持つ後代を選択することによって作物を改良する。植物育種法による改良が可能なのは、有利な性質を調節する遺伝子が、その作物自体の種またはその作物と他花受精可能な種に存在する場合である。伝統的植物育種法の歴史を通じて、伝統的な品種改良によって利用できる遺伝子の選択の幅を広げるためにさまざまな手法が使われており、現在そのなかには胚培養、子房培養、プロトプラスト融合なども含まれている。新規の交配植物が得られた場合でも、染色体の対合、すなわち外来遺伝子を作物種に導入するのに必要な遺伝子の組換えが起こらない場合もある。

<sup>1</sup> ジョン・イネスセンター・ケンブリッジ研究所 (英国・ノリッジ)

<sup>2</sup> シェフィールド大学・分子生物学バイオテクノロジー学部 (英国・シェフィールド)

<sup>3</sup> 「伝統的育種法とは、同一の科に属する植物の間での正常な交配を可能にする 1 つまたは複数の手法 (物理的・科学的手法、生理学的プロセスの制御など) を利用して行う手法をいう」 EU によって承認された定義 (UK DOE/ACRE,

## 遺伝子組換え植物

DNA 分子を特定の部位で切断できる酵素（制限酵素）や、DNA 断片を再度つなぎ合わせることでできる酵素（リガーゼ）が発見されたのは、ほんの 20 年ほど前のことである。これらの酵素によって、組換え DNA の技術が発展し、遺伝子の新たな組み合わせや遺伝子調節配列を、実験室で作ることが可能になった。

1980 年代の初めには、実験室で改変した DNA 配列を植物のタバコに導入し、導入した遺伝子（導入遺伝子）が、花粉細胞と卵細胞を通じて単純なメンデルの法則にしたがって確実に受け継がれることが可能になった。遺伝子組換え植物とは、組換え DNA の技術を用いて操作された DNA 断片が導入され、その外来の DNA 断片が植物のゲノムに組み込まれているものをいう。

組換え DNA 技術の開発当初から、DNA 分子をそれぞれ特定の部位で切断できる各種の制限酵素が発見されてきた。DNA ハイブリダイゼーションの技術も開発、改良され、植物の特定の DNA 配列を見つけだすことや、挿入された遺伝子のコピー数や構造が完全かどうかを明らかにすることができるようになってきている。遺伝子マッピングの手法における最近の進歩によって、植物のゲノム全体のなかで導入遺伝子が染色体上のどの位置にあるかを見極めることも可能になっている。

## 遺伝子組換え植物の作出法

作物の改変を困難なものにしてきた主な障害の 1 つは、外来の DNA を植物細胞に導入するのが難しいことである。DNA を植物に導入する過程（形質転換という）が最初に成功したのはタバコで、他のナス科の植物（ジャガイモ、ペチュニア、タバコ属）では比較的簡単に成功している。他の作物種、なかでも穀物の場合は、そう簡単ではない。現在までに形質転換が行われている種を表 4.1 に示した。形質転換のためにさまざまな手法が試みられており、現在使われている手法で有効なものは 4 つのグループに分けられる（Potrykus, 1990, 1991）。

表 4.1 現在用いられている主な植物形質転換法および作物種での成功例

種（作物）	手法			
	アグロバクテリアウム法	単離プロトプラストへの DNA 導入	微粒子銃法	部分分解した未成熟胚への DNA 導入
<i>Antinidia deliciosa</i> キーウィーフルーツ	+			
<i>Avena sativa</i> エンバク			+	

1993)。歴史を通じて、こうした手法が植物の望ましいあるいは求められる性質の選択を可能にしてきた。

---

<i>Beta vulgaris</i>				
テンサイ	+			
<i>Barssica carinata</i>				
	+			
<i>Brassica juncea</i>				
	+			
<i>Brassica napus</i>				
ナタネ	+	+		
<i>Brassica oleracea</i> (各種)				
	+	+		
<i>Carica papaya</i>				
パパイヤ	+			+
<i>Cucumis melo</i>				
メロン	+			
<i>Cucumis sativis</i>				
キュウリ	+			
<i>Dactylis glomerata</i>				
カモガヤ			+	
<i>Dendranthema indicum</i>				
キク	+			
<i>Dianthus caryophyllus</i>				
カーネーション	+			
<i>Festuca arundinacea</i>				
トールフェスク			+	
<i>Fragaria ananassa</i>				
イチゴ	+	+		
<i>Glycine max</i>				
ダイズ	+	+		+
<i>Gossypium hirsutum</i>				
ワタ	+			+
<i>Helianthus annuus</i>				
ヒマワリ	+			
<i>Juglans regia</i>				
クルミ	+			
<i>Lactuca sativa</i>				
レタス			+	
<i>Linum usitatissimum</i>				
アマ	+			
<i>Lycopersicon esculentum</i>				
トマト	+			
<i>Medicago sativa</i>				
アルファルファ	+			
<i>Nicotiana tabacum</i>				
タバコ	+			
<i>Oryza sativa</i>				
イネ			+	+
<i>Picea glauca</i>				
カナダトウヒ				+
<i>Pisum sativum</i>				
エンドウ	+			
<i>Populus</i>				
ポプラ	+			+
<i>Prunus armeniaca</i>				
	+			

---

プラム				
<i>Prunus domestica</i>				
ペピーノ	+			
<i>Solanum muricatum</i>				
ジャガイモ	+			
<i>Triticum aestivum</i>				
コムギ			+	
<i>Vitis vinifera</i>	+			
ブドウ				
<i>Zea mays</i>				
トウモロコシ		+	+	+

〔脚注部分〕

Dale et al. (1993)も参照のこと。

### アグロバクテリウム法

アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) による形質転換法は、双子葉類の形質転換に広く用いられている。主な種として、*Agrobacterium tumefaciens* と *A. rhizogenes* の 2 つがあり、その野生型はそれぞれ根頭癌腫病、毛根病を引き起こす病原体である。双子葉類の多くは、アグロバクテリウム属の感染を受けやすいが (De Cleene & De Ley, 1976)、これはアグロバクテリウムの細胞が宿主植物に取り込まれることによって、その細胞内部で自律的に複製するプラスミドに由来する遺伝子が組み込まれるためである。導入された DNA は、感染した細胞内部の植物ホルモンのレベルを変化させて、細胞の無秩序な増殖やえい瘤を引き起こしたり (*A. tumefaciens*)、毛で覆われた根を大量に発生させたりする (*A. rhizogenes*) (Bevan, 1984)。

病気を引き起こす遺伝子は、自律複製する環状のプラスミド DNA の分子上にある T-DNA (転移 DNA) 両端の特殊な配列の間に挟まれて運ばれる。組換え DNA の手法によってこの病原性遺伝子を取り除くことが可能になり、アグロバクテリウムは病原性でなくなった。T-DNA 両端の間に外来遺伝子を挿入できる、新たなベクタープラスミドも作られている。目的遺伝子を運ぶアグロバクテリウムの細胞は、受容体である植物の培養細胞と一緒に培養され、そこから遺伝子組換え植物が再分化する。最終的に形質転換されるのは、処理を受けた植物細胞のごく一部であるため、通常、T-DNA のボーダー配列の間に選択マーカー遺伝子 (通常、特定の抗生物質への抵抗性を与えられたもの) を組み込む必要がある。遺伝子組換え植物を選択するには、遺伝子組換え植物だけが正常に発育できる植物体の再生用の培地に、対応する抗生物質を加える。

この技術を利用する上で大きな制約となるのは、穀物類をはじめとする多くの植物には傷害応答機構がなく、形質転換がきわめて難しいことである (Potrykus, 1991)。

### 植物プロトプラストへの DNA の導入

プロトプラストは、酵素処理によって植物細胞からその細胞壁を取り除いたものである。植物のさまざまな部分(通常は葉や胚軸)から作ることができ、原形質膜で囲まれている。この膜は非常に傷つきやすく、ポリエチレングリコールで処理したり、プロトプラストの懸濁液に電流を通すことによって、一部を変化させることができる。導入する DNA を、プロトプラスト懸濁液のまわりの培地に加え、化学的または電気的な処理を行えば、DNA を取り込ませることができる。プロトプラストのごく一部では、細胞のゲノムに外来 DNA が組み込まれる。

アグロバクテリウム法と同様、形質転換したプロトプラストやそこから発生した細胞コロニーを選択するために、抗生物質抵抗性の選択マーカー遺伝子を導入するのが普通である。続いて、遺伝子組換え植物全体を再分化させるために、植物組織培養法が用いられる。

#### パーティクルガン(微粒子銃)法

アグロバクテリウム法やプロトプラスト法は、操作が難しい種の形質転換には向かないことがわかる場合が多い。穀物類は一般にアグロバクテリウムの宿主にはならず、穀物類のプロトプラストから簡単かつ確実に植物を再分化させるのは難しく、遺伝子型に左右されることが多い。パーティクルガンによる方法は、こうした問題の一部を克服するための試みとして開発されたもので、DNA を金属の微粒子(通常は直径 1 $\mu$ m のタングステンまたは金)にコーティングし、それを再分化能を持つ植物細胞に打ち込むというものである。微粒子を打ち込む方法としては、0.22 インチの空包(火薬)、高圧ガス、放電による水滴の瞬間蒸発などいろいろある。DNA をコーティングした金属の微粒子は、植物細胞の中に入ってそこにとどまる。打ち込まれた細胞のごく一部では DNA がゲノムに取り込まれ、そこから遺伝子組換え植物が再分化する。他の方法と同様、選択マーカー遺伝子が導入されるのが普通である。

#### 多細胞組織における細胞の部分分解

穀物類の形質転換に現在有望と考えられる方法の 1 つが、未成熟胚を酵素で部分的に分解し、電流を照射する刺激によって DNA を導入する方法である(エレクトロポレーション法)。植物は、形質転換した胚細胞から再分化することになる。この方法が有利だと考えられるのは、再分化能が高い植物の未成熟胚を使う点である。この方法が確立されてイネ科の各種植物の形質転換に広く適用されるまでには、さらに経験が必要になるだろう。

#### 導入される遺伝子の数と位置

核のゲノムに組み込まれる導入遺伝子のコピー数は、それぞれの形質転換植物や使用される形質転換法によって異なる。アグロバクテリウム法で導入される T-DNA のコピー数は 1 つであるのが普通だが、複数が導入されることもある。複数の T-DNA の導入が生じることは実際にあり、時には 20 から 50 のコピーが存在したという報告もある。核のゲノムにおける T-DNA の導入位置は、ランダムだと考えられている。いくつかの研究では、制限酵素断片長多型(RFLP)法によって、T-DNA の位置のマッピングが行われているが、挿入が起こりやすい部位があるという証拠はまだ得られていない (Chyi et al., 1986; Ambros et al., 1986)。ほとんどの遺伝子は核染色体に組み込まれるが、細胞質ゲノムの色素体の形質転換も報告されている (O'Neill et al., 1993)。

### 導入遺伝子の構造と発現の安定性

挿入された DNA は構造が変わることがあり、導入 DNA が損傷していないかどうかを判断するために分子的解析を行うのが望ましいことが多い。導入遺伝子の発現は、それぞれの形質転換植物によって大幅に異なる可能性がある。導入遺伝子産物の発現レベルと導入遺伝子のコピー数が正の関連を示す場合もあるが、常にそうだというわけではなく、負の関連も報告されている (Hobbs et al., 1990; Jefferson et al., 1990; Blundy et al., 1991)。導入遺伝子の発現は、下方制御されたり停止する可能性があることが知られている。こうした遺伝子の抑制には、導入 DNA の特定部位でヌクレオチド残基のシトシンがメチル化することと関係することが多い (Selker, 1990; Sheid et al., 1991)。

遺伝子組換え植物の再生に用いられる組織培養法によって生じる問題もあり、変異が導入されることが知られている (体細胞変異)。これは、導入された遺伝子による直接の影響は受けないが、培養菌中で植物細胞を生育させるプロセスに由来する変異である。体細胞変異は、後成的にも遺伝的にも起こりうる。後成的である場合、変異は次の有性世代には受け継がれない。遺伝的変異は、遺伝子や染色体の突然変異に由来するものであり、次の世代に受け継がれる。導入遺伝子の発現の多様性や体細胞変異にかかわる実際的な問題を克服するには、さまざまな遺伝子組換え作物を作出し (往々にして 100 以上)、望ましい表現型を持つ遺伝子型を個々に選択する必要があるというのが現実である (Larkin & Scowcroft, 1981; Karp, 1991; Dale & McPartlan, 1992)。

遺伝子組換え植物における体細胞変異の影響は、非組換え植物での場合と比べて大きいとは考えられない。遺伝子組換えの植物品種を作出する際には、選択の過程でこの種の望ましくない変異を取り除く必要がある。導入遺伝子の発現が不安定だと、多くの場合、導入遺伝子発現の減少や、遺伝子組換え植物が組換え前の原植物に近くなるような表現型の変異という影響をもたらす。しかし、導入遺伝子の機能が、たとえば植物産物の望ましくない発現を抑制するものである場合、不安定性の結果、リスク評価の一環として検討する必要のある危険を示す場合もあるかもしれない (以下を参照)。

## 現行の規制の概観

経済協力開発機構（OECD）の推定（OECD, 1993）によると、1992年の時点で864の組換え植物が環境に放出されている。このうち316件が米国で、302件がカナダで、217件がEU諸国である。放出は、少なくとも22の国で行われている（Dale et al., 1993）。

遺伝子組換え植物の封じ込め利用とその後の環境への放出を管理する規制は、国によって大きく異なる。特に環境中への意図的な放出に関しては、任意の制度から法的な制度へと徐々に移行してきており、そうした動きは今後も続くと考えられる。可能な場合には、現行の法律が遺伝子改変植物の作出、維持および放出に適用されてきたが、それらは往々にして遺伝子組換え植物の放出による環境への影響を十分にカバーしていない。

たとえば英国では、封じ込めでの作業は1974年労働衛生安全法による規制の対象になっている（Royal Commission on Environmental Pollution, 1989）。物理的・生物学的な封じ込めによって環境にはほとんどリスクがないと考えられたため、危険に曝されるのは組換え生物を扱う作業員、あるいはその生物の封じ込めが行われている施設の職員だけであると想定されたのである。封じ込め状態での遺伝子組換え生物の作成および使用を対象とする英国の規制は、近年、欧州委員会指令に適合するための変更が行われている。「封じ込め」という用語は、感染因子が扱われたり保存されている実験室環境における感染因子の安全な管理法を規定するのに用いられている。封じ込めの目的は、実験従事者その他の人、および外部の環境が潜在的な危険因子に暴露するのを軽減あるいは除去することである（US HHS, 1993）。

1990年、EC委員会は、遺伝子組換え生物の封じ込め利用に関する指令（CEC, 1990a）および遺伝子組換え生物の環境中への意図的な放出に関する指令（CEC, 1990b）を出した。これらの指令は、EUの全加盟国を法的に拘束するものである。加盟各国には、この指令を実施するための国内法を制定する義務がある。1992年末の時点で、デンマーク、フランス、ドイツ、オランダ、英国では国内法が制定されていた。アイルランド、イタリアでは、規制を導入するための根拠法が制定されていた。ベルギー、ギリシャ、ルクセンブルク、ポルトガル、スペインは、必要な法律の導入を進めているところだった。

英国では1993年2月に、封じ込め利用（指令で義務づけられている微生物と、これとは別に植物など他の生物について）に関する規制と意図的な放出に関する規制が施行された。これらは、欧州委員会指令、1990年環境保護法、1974年労働衛生安全法の要件を満たすことを目的としている。

米国の場合、遺伝子組換え植物の利用の規制は、封じ込め利用か環境中での利用かを問わず、3つの機関が分担して担当している。環境保護庁（EPA）が環境問題を担当し、農務省（USDA）が作物の安全性や食品の健全性に関する問題を担当し、食品医薬品局（FDA）が食品と医薬品の有効性および安全性を確保する任務を負っている（Levin & Strauss,

1993)。これらの機関に対しては、環境、作物、ヒトに対して責任を負わせる法律がある。また、これらの機関はリスクと便益のバランスを達成する責任も負っている。遺伝子技術による製品に関する各法律は、1986年6月の連邦公報で発表された、調整された枠組みに体系的に示されている。バイオテクノロジーに関する米国の主な規制として、殺虫剤(組換え生物が殺虫剤として使われる場合にはそれも含む)を規制する連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法(FIFRA: 7 USC, sec 136-136y)、新規および既存の化学物質(微生物を含む)を規制する権限を持つ有害物質規制法(TSCA: 15 USC, secs 2601-2654)、微生物や動植物由来の食品、食品添加物、医薬品、化粧品および医療用具を規制する連邦食品医薬品化粧品法(FFDCA: 21 USC, secs 301-392)がある。さらに、連邦害虫法と植物検疫法(7 USC, sec 150aa-jj)が各種の遺伝子組換え植物や微生物を対象にしている。米国の場合、組換え生物の意図的な放出は、実験段階か「上市」段階かを問わず、多くの連邦法の対象になる可能性があり、2つ以上の機関の指導を受けなければならない場合がある。さらに、多くの州(特にウィスコンシン州、ミネソタ州、ノースカロライナ州)が、独自の法律を制定したり、現行の連邦法および州法に基づいて組換え生物の放出計画の審査を行っている(Royal Commission on Environmental Pollution, 1989; Levin & Strauss, 1993)。一般に植物が規制されるのは、植物の輸入、州を越えた移動または放出が行われる場合、そして供与体またはベクターが植物病原体の場合である。植物病原体については、バイオテクノロジー・生物製剤・環境保護局(BBEP)の長によってその指定が行われ、指定された場合には法令(7 CFR)に掲載される。植物が殺虫性を有する場合には、その植物もFIFRAによる規制の対象となる。植物は、申立てを受けたBBEP長官によって、セクション340.2のリストからはずされ、規制から除外される場合がある。また、誰でも、ある植物をリストに追加して、規制の対象とするように長官に申し立てることができる。農務省には、申立てに対して180日以内に対応する義務がある。

EUの場合、組換え植物の実験放出については、それぞれの国でリスク評価が行われたのちに許可が与えられる。リスク評価は、申請者によって提出されたデータに基づき、関係国の「管轄当局」<sup>4</sup>によって行われる。決定は、申請から90日以内に行われなければならない。米国の場合、放出による農業や環境への影響評価を行っている農務省が権限を有し、ここでも、評価は申請者が提出したデータに基づいて行われる。農務省は、120日以内にその判断を示さなければならない。申請された組換え植物が殺虫性を有する場合には、環境保護庁も審査を行う。

米国で現行法が運用されているということは、規制が「製品ごと」に行われているということである。EUの新たな法律では、規制制度は「プロセスごと」になっている。この制度で規制のきっかけとなるのは、遺伝子組換え植物が作られるプロセスである。これらは、これまでに制定された法律へのアプローチが異なることを示している。ただ実際には、

---

<sup>4</sup> 「管轄当局」とは、(各加盟国において)遺伝子組換え生物に関連する活動の規制を担当する役割を与えられた1つまたは複数の政府機関をいう。

両者の差は縮まっている。世界各国では、主に現行の法律のタイプに応じて、これらに近いモデルを採用している。たとえば南米諸国の場合、植物検疫制度や植物の導入に対する規制があると考えられる。こうした制度や規制は、遺伝子組換え生物に対応できるように変更する必要があると思われる（Inter-American Institute for Cooperation in Agriculture, 1991）。

遺伝子組換え植物は、今後数年のうちに作物品種として広く利用されることになるが、これは意図的にも非意図的にも移動が起こる可能性があることを意味している。したがって、基準や手続きの国際的な調和が不可欠である。OECD は、遺伝子組換え生物の封じ込め利用とその放出に関するガイドラインの作成に積極的に関わってきた。こうした取り組みの結果、報告書（OECD, 1986, 1990）や討議資料（OECD, 1992）が作成されている。OECD には法的な権限はないものの、国際的な議論を促し、加盟国が採用を受け入れられる手続きの制定を行ってきた。OECD による取り組みは、加盟国の政策に影響を与えて手法や基準の共通化を支援する上で、大きな成果をあげている。この取り組みは、先進諸国における規制の制定に大きな影響を与えている。

現在、途上諸国では、国連工業開発機関（UNIDO）や国連環境計画（UNEP）をはじめとする複数の機関を通じて、さまざまな国際的な取り組みが行われている。こうした取り組みの目的は、バイオセーフティに関する共通の基準づくりを促すことである。取り組みの一環として UNIDO は、UNIDO、UNEP、WHO、FAO の代表で構成されるバイオセーフティ共同作業部会を代表して「生物の環境放出に関する自主行動基準」を公表している（UNIDO, 1991）。さらに、UNIDO が推進している国際的なバイオセーフティ情報ネットワーク・アドバイザーサービス（Biosafety Information Network and Advisory Service: BINAS）は、まだ管轄当局が存在しない国が遺伝子組換え生物の放出を扱う権限を持つ国内当局を設置する際に、情報の入手方法や専門家による助言を提供する役割を持っている。

多くの国の場合、組換え生物の環境への導入が規制によって監視される根拠となるのは、製品の実際の性質ではなく、製品が作られたプロセスである。最終的なリスク評価は、もとの植物やベクターの性質を考慮した上で、組換え植物に対して行われるものの、規制の根拠となるのは、その植物が組換え技術を利用して作られているという事実である。一部の製品はその新規性ゆえに危険であり、その新規性は製品が作られたプロセスに起因するものだという議論がある（Williamson, 1993）。規制に根拠を与えるのは、環境（ヒトの健康や安全性も含めて）にダメージを与える可能性があるかどうかである。受け入れる環境にとって製品が新規であるということは、評価を必要とするリスクが存在するということである。遺伝子工学は、他の方法では不可能だったかもしれない改変を可能にするが、その植物を作るのに用いられた方法は必ずしも重要ではない。プロセスが規制の根拠となる場合、従来技術で作られた植物は、規制の対象にはならないかもしれないが、組換え技術を使って作った植物よりもはるかに環境に危険をもたらす可能性が残される。現在の遺

伝子技術は高い精度を持ち、結果が予測しやすいため、結果的にリスクは低下するかもしれない。この議論によれば、すべての導入種に対して規制を課す、特定の性質（殺虫性を持つ植物など）への規制、あるいは導入の完全な自由化、という選択がある。EU では、リスク評価や規制制度の根拠として、遺伝子改変のプロセスを選択している。米国は、規制対象となる既知の表現型を含む組換え体のみを規制する道を選んでいる。規制を行う際のもっとも重要な基準は環境の保護だが、多くの国では組換え技術による製品が国民に受け入れられるかが規制の大義名分だと考えられている。EU においても米国においても、組換え作物の導入を行う際には、国民に開かれた厳格なリスク評価によって組換え技術の利用に関する不安を解消することが、何にも増して役に立つ可能性がある。米州農業協力機構は、規制の根拠の1つを「バイオテクノロジーの安全性に関して一般国民が抱く当然の懸念に対処すること」であるとしている（1991）。

## リスク評価法の概要

リスク評価には、さまざまな方法がある。遺伝子組換え植物の封じ込め利用を扱うものは、実験の際の優れた基準、封じ込め施設の有効性と安全性、組換え生物によるヒトの健康への影響を重視している（OECD, 1986; Royal Commission on Environmental Pollution, 1989; CEC 1990a; Levin & Strauss, 1993）。多くのリスク評価法では、それを「侵入性（Access）」、「発現性（Expression）」、「損傷性（Damage）」の項目に基づいて行っている。「侵入性」は、改変された「微生物」<sup>5</sup>（またはその内部のDNA）が人体に侵入し、そこに定着する可能性を測る項目である。「発現性」は、挿入されるDNAの既知または予想される発現レベルを測る。「損傷性」は、組換え生物への暴露によってヒトに危害が及ぶ可能性を測る指標である（Advisory Committee on Genetic Manipulation, ACGM/HSE, 1986, 1993）。組換え生物の封じ込め利用による環境へのリスク評価は、最近までほとんどの国で必要なかった。欧州では、封じ込め措置（物理的、化学的または生物学的な封じ込めがありうる）によって、拡散を阻止したり、放出された生物が環境中で生存する可能性を最小限に抑えるようにしている場合でも、リスク評価を行うことが欧州委員会指令 90/219（CEC, 1990a）によって求められている。

組換え植物によって引き起こされる危険とは、どのようなものだろうか。望ましくない作物の属性としては、自家不稔性などの要因によって自家受粉系統が異系交配するようになる可能性なども考えられる。また、その植物が雑草化する可能性もありうる。組換え生物が有毒物質を産生したり、組換え植物に意図的に挿入された毒素の正常範囲が、供与体生物の正常範囲と異なる場合もありうる。環境中の他の生物に対する組換え生物の反応や、他の生物の組換え植物への反応が変化する場合もある（OECD, 1992）。これらのどの可能性によっても、組換え生物を扱う作業員やその消費者、あるいは環境へのリスクが生じう

---

<sup>5</sup> ここでいう「微生物」には、組織培養内のすべての細胞を含む。

る。組換え作物に殺虫性が導入される場合、実際の反応は生態系への影響も含め、予想よりもはるかに広範囲に及ぶかもしれない。さらに、組換え植物が、外観や環境ストレスへの感受性、あるいは最終製品としての性質において望ましくない変化を示すこともありうる。「多くの場合、こうした影響は規模に依存しており、規模の拡大(スケールアップ)の過程で顕在化する」(OECD, 1992)。

組換え植物の意図的な放出による環境へのリスクを「定量的に」評価する体系的な手法を確立することは、事実上不可能であるということがわかっている。たとえば、放出された植物が雑草化する可能性を評価するのは、「雑草性」という性質を定義するのが簡単ではないため、できるとは考えられない(Fitter et al., 1990; Williamson et al., 1990)。「自然の環境や生態系の相互作用が複雑であるということは、リスク評価が、ほとんどの場合、定量的な評価ではなく定性的な評価の問題であるということの意味している」(UK DOE, 1993)。したがって、遺伝子組換え植物の放出に関するリスク評価の手法には、遺伝子組換え植物とその元になった植物の遺伝子型を詳細に比較することが求められる。また、組換え生物とそれを導入しようとする特定の環境との相互作用に関する検討も必要になる。それぞれの国によって方法は異なるものの、リスク評価を行うために大部分の国が問う内容は同じで、組換え生物と環境についての詳細である。ほとんどの国で用いられている体系では、生物、放出区域、周辺環境について、きわめて多数の質問が掲げられている(表 4.2)。求められる情報は、基本的にはすべての国で共通している。これには、環境への導入に伴う有害性を明らかにするために、いくつもの段階が含まれている( UK DOE, 1993)。

**表 4.2 EUにおける遺伝子組換え植物の野外放出の申請に必要な情報の概要【脚注a】(リスク評価のための基本的なデータを提供するもの【脚注b】)**

1. 一般情報

遺伝子組換え植物の放出を希望する機関の名称および所在地(責任者の氏名および役職を含む)

2. DNA 供与体、受容植物種および遺伝子組換え植物に関する情報

2.1 導入遺伝子を供与する生物および受容植物種の性質(次にあげるものを含む)

- ・学名および分類学上の名称
- ・地理的分布
- ・他生物との遺伝子交換の可能性
- ・遺伝的安定性
- ・病原性
- ・毒性
- ・アレルギー性

2.2 受容植物種への導入遺伝子の組み込みに用いる遺伝子ベクターの性質(主に次にあげるもの)

- ・ベクターの性質および由来
- ・ベクター内に存在する DNA 配列の性質

2.3 遺伝子組換え植物の性質(次にあげるものを含む)

- ・導入 DNA の調製および挿入に用いた DNA 配列の詳細および手法
- ・導入される配列は、遺伝子組換え植物で意図された機能を発揮するのに必要とされる DNA にどの程度制限されるか
- ・遺伝子組換え植物の詳細

- 
- ・ 遺伝子組換え植物とそのもとなった植物との遺伝子型および表現型の違い
  - ・ 導入遺伝子の発現の安定性と程度
  - ・ 遺伝子組換え植物の産生する物質のアレルゲン性または毒性
3. 放出の条件および受容環境に関する情報
- 3.1 放出案の詳細（次にあげるものを含む）
- ・ 放出の目的
  - ・ 定植予定日
  - ・ 区画の規模
  - ・ 遺伝子組換え植物の数
  - ・ 栽培法
  - ・ 必要が生じた場合に遺伝子組換え植物を除去する方法
- 3.2 放出場所および周辺環境の詳細（次にあげるものを含む）
- ・ 地理的位置
  - ・ 人間との近接性
  - ・ 現地の動植物相
  - ・ 標的生態系および非標的生態系
4. 遺伝子組換え植物と環境の相互作用に関する情報
- 4.1 遺伝子組換え生物の性質のうち、定着、繁殖、伝播への影響が考えられるもの
- 4.2 遺伝子組換え植物と環境との相互作用の詳細（次にあげるものを含む）
- ・ 放出によって起こりうる環境への影響に関する先行研究から得られる関連情報
  - ・ 他の植物または微生物への遺伝子の移行の可能性
  - ・ 遺伝子組換え植物自体またはその珠芽の散布の可能性
  - ・ 遺伝子組換え植物の遺伝的安定性を検証するのに用いた手法
- 4.3 環境への潜在的影響の評価（次にあげるものを含む）
- ・ 植物個体群が過剰に増加する可能性
  - ・ 非標的生物への影響
5. モニタリング、管理および緊急時の対策に関する情報
- 5.1 モニタリング方法の詳細（次にあげるものを含む）
- ・ 遺伝子組換え植物の同定法
  - ・ 他の植物や生物への移行が起きた場合の導入遺伝子の同定法
- 5.2 区域の管理方法の詳細（次にあげるものを含む）
- ・ 遺伝子組換え植物の拡散を最小限に抑えるための方法
  - ・ 区域への侵入を防ぐための方法
- 5.3 植物素材の廃棄法の詳細
- 5.4 緊急時に遺伝子組換え植物素材を除去または破棄し、必要とされた場合に実験を中止するための計画
- 

【脚注 a】 欧州委員会指令 90/220 による。

【脚注 b】 ヒトの健康および環境へのリスク。

## 封じ込め

### 実験室における物理的封じ込め

一般に、組換え植物については、実験室での細胞培養から、生育室、温室、試験圃場での試験を経て、場合によっては商品としての放出という段階があると考えられる。リスク評価を行う際には、この「段階的方式」の各段階で得られるデータ、類似の組換え生物が放出された際の各段階のデータ、あるいは他国での組換え生物の利用や放出に関するデータが利用できなければならない。

植物細胞の培養は、組換え微生物の封じ込め利用に関する欧州委員会指令の適用対象になっている（CEC, 1990a）。しかし、それらはいったん移植されると微生物とは見なされなくなり、EU の加盟各国間で異なった規制が適用されている。実験室、組織培養室および生育室内における組換え植物の物理的封じ込めは、優良試験所規範によって維持されている。植物のモニタリングは、微生物と違って比較的容易である。注意が必要なのは、実験室環境で作られた花粉や種子が放出しないようにすることである。また、植物に正確なラベルをつけ、ラベルのつけ間違いや不注意によって別々の遺伝子組換え植物が混ざり合わないようするための注意も入念に行うべきである。優良試験所規範の一環として、DNA 配列、コンストラクト（DNA 構築物）遺伝子組換え植物（特に他の研究所から受け入れたもの）の質の管理を高水準に維持し、実験結果の再現性を検証することも不可欠である。

### 専用温室における物理的封じ込め

隔離温室における遺伝子組換え植物の栽培や取り扱いは、基本的には実験室での場合と同様であり、優良試験所規範のようなものが必要になる。温室は、異常な気象条件に耐え、室外からの昆虫の侵入や室外への花粉の拡散を防ぐように設計されていなければならない。通常、組織内のバイオセイフティ委員会の指示に基づいて、個々の遺伝子組換え植物にふさわしい封じ込め措置を決定する必要がある。たとえば、外来の病原体由来の配列を用いる形質転換に関する研究では、きわめて高いレベルの封じ込めのための施設や措置を必要とする可能性が高い。場合によっては、温室環境内の気流を制御したり、フィルタを通すことが必要になる。温室内から外に出る水の管理や消毒が適当な場合もある。温室内から出る土壌や植物素材のオートクレーブも必要になる。優良表示基準（good labelling practice）が重要である。ACGM の手引書 10 のなかでは、参考となる「優良規範」の評価が行われており、組換え植物や植物に有害な生物の取り扱いに関する手引きが示されている（ACGM/HSE, 1989）。

## 環境への放出

ひとたび遺伝子組換え植物が小規模な実験として、さらには商業生産されて放出される場合、いったん放出された遺伝子組換え植物や花粉、珠芽を確実に回収できる保証はなく、往々にして不可能あるいは現実的ではないため、包括的なリスク評価手順が必要となる。放出を担当する科学者や組織のバイオセーフティ委員会、国際的なバイオセーフティの関係者が、個々の遺伝子組換え植物の放出が認められるか、そして必要に応じてどのような制限を課すべきかを評価しなくてはならないのは、こうした事実を背景としている。

その目的を遺伝子組換え植物の放出試験による環境への影響の防止・制限とする「野外における封じ込め」の段階を達成するための措置はいろいろある。野外における封じ込めの手法には、他花受精可能な種からの隔離、開花の抑制、雄性不稔系統の使用、植物の完全な廃棄とその後のモニタリングなどがある。

## リスク評価に必要なデータ

リスク評価に必要な情報の一例を表 4.2 に示す。データの提示方法はそれぞれの当局によって異なるが、必要とされる情報は基本的に同じである。表 4.2 で示された項目については、多少説明が必要だろう。ここでは、組換え生物に伴う潜在的有害性、組換え生物が放出される環境、および生物と環境の相互作用の特定が行われる。有害性が特定されれば、その有害性の確率と、それがもたらす危害の大きさの両方を評価することが可能である。確率が高くても有害性が低ければ、環境へのリスクは依然として低い。

### 一般情報

放出の実施を担当する職員や機関が、計画された遺伝子組換え植物の放出を行い、野外での封じ込めや必要と考えられるモニタリングに責任を持つのに十分な高い専門知識と経験を有していることが重要だと考えられる。

### DNA 供与体、受容植物種および遺伝子組換え植物

供与体 最も重要なのが、供与体とその受容植物種についての情報を得ることである。受容植物種に関する情報によって、遺伝子組換え植物との比較のための基準が定まることになる。供与体に関する情報によって明らかになるのは、遺伝子組換え植物についてどのような情報が必要とされるかである。たとえば、供与体が植物病原体である場合、リスク評価では、組み込まれる病原体由来の DNA と遺伝子組換え植物に感染性を持つ病原体が、のちに組換えを起こす可能性が問題になる。挿入された配列がある種のウイルス病に抵抗

性を与える外被タンパク質をコードしている場合には、トランスキャプシデーション（キャプシド転換）の可能性も考慮する必要がある。改変された細胞が別のウイルスの感染を受けた場合、そのウイルスと供与体である元のウイルスの外被タンパク質とがトランスキャプシデーションを起こすことがあり、その結果、ウイルスの宿主域に影響が及ぶ可能性がある。

**形質転換ベクター** 導入遺伝子の組み込みによる形質転換に用いられる DNA ベクターに関する情報が必要である。形質転換細胞のスクリーニングを容易にするため、一般に、抗生物質抵抗性の遺伝子が用いられる。他の DNA 配列が、DNA ベクターの結合配列として働いたり、組換え DNA 法を用いることによって別の機能を示す可能性もある。ある種の形質転換法では、形質転換のプロセスを助けるためにキャリア DNA を用いる場合がある。したがって、評価の過程で影響を検討できるように、この DNA の性質を理解する必要がある。

**遺伝子組換え植物** 遺伝子組換え植物については、組み込まれる導入遺伝子に関する分子データ、発現の安定性、また、アレルゲン性や毒性、栽培環境での定着性や自然環境への侵入性に变化があるかどうか、詳細に説明することが重要である。ここで不可欠なのは、導入遺伝子による植物の表現型の変化を測定できるように、対応する非組換え植物の遺伝子型を対照として用いることである。

## 放出の条件および受容環境

放出の科学的・商業的な目的にはリスクの原因となるものがなくても、リスク評価を担当するバイオセーフティの専門家グループは、広い視点から放出を評価することが重要である。環境へのリスクを評価するには定性的な判断が必要であるため、リスク評価の考え方の基本は事例ごとの分析であり、しかも、妥当な場合には、経験の蓄積に基づいて、手続きは段階的に合理化、簡素化される（まとめの部分参照）。放出の目的、その規模と計画、用いられる栽培法に関する情報の提供は、個々の放出のリスクを評価する上でも、国内外の学習プロセスにとっても重要である。

放出区域の生態学的データも重要である。これには、放出区域の周辺で生育していると考えられる植物種に関する調査のほか、花粉の拡散の仕方や正常な受粉が行える距離に関する情報が含まれるべきである。

標的にしようとする生物の位置や種類も特定しなければならない。標的生物とは、導入遺伝子によって影響を与える生物のことである。殺虫性の Bt タンパク質を含む導入遺伝子の場合、標的生物はある種の害虫であろうし、ウイルスの外被タンパク質遺伝子の場合には、特定のウイルス病原体ということになる。非標的生物とは、組換え体の本来の標的ではない生物で、不注意によって影響が及ぶ生物も含まれる。導入遺伝子による影響が害虫とは考えられない昆虫にも及ぶ場合には、そのことを明記すべきである。遺伝子組換え植

物が宿主として適当かそうでないか、あるいは作物に寄生する可能性のある生物に有害かどうかとも検討材料となる。

#### 遺伝子組換え植物と環境との相互作用

遺伝子組換え植物が環境に及ぼす影響を判断するためには、遺伝子組換え植物に生じる変化で、野生環境への侵入性や栽培環境での定着性、また有性・無性での自己繁殖性を変化させる可能性のあるものを記載する必要がある。類似の遺伝子組換え植物を用いた先行研究に注目することも重要である。必要なのは、導入遺伝子が同種または近縁の植物種(野生種か栽培種かを問わず)や微生物に移行する可能性を判断し、移行がある場合には、遺伝子の移行によって起こりうる影響を見極めることである。

#### 監視、管理、廃棄物処理および緊急時の対策

植物がいったん封じ込めから放出されれば、開花や播種が認められている場合は特に、導入遺伝子を持つ植物や種子、花粉が放出環境の周辺に出ていく可能性がある。リスク評価の一環として重要なのは、放出後の導入遺伝子のモニタリングがどの程度可能なのかや、必要が生じた場合には植物素材を有効に廃棄できるのかを見極めることである。遺伝子組換え植物あるいは非標的種における導入遺伝子の存在を特定する有効な方法が必要になるかもしれない。これは、可視マーカー(β-グルクロニダーゼなど)や選択マーカー(抗生物質抵抗性)、分子的解析(PCR やサザンハイブリダイゼーションなど)によって可能になるだろう。

考えうる遺伝子交換を最小限に抑える方法はいくつかある(以下を参照)。放出試験の終了時、または必要に応じて試験の最中に植物素材を廃棄するための方法を記載することも適切と考えられる。

#### リスク評価の実施

組換え植物の最初の放出は、試験的なものになる。商業的な放出が行われるとしても、いったん試験放出の結果が分析されたのちである。大がかりなリスク評価の実施と検討を行う必要があるのは、この試験段階なのである。リスク評価の目的は、遺伝子組換え生物の封じ込めを行う試験手順や方法に変更がないかを明らかにして、環境やヒトの健康へのリスクを最小限に抑えることである。

先に概要を示したデータは、通常、遺伝子組換え植物の放出を希望する科学者らによって集められるものである。データ収集の際に、放出を行う科学者たちによってリスクの可能性に手加減が加えられるのは避けられないものの、リスク評価は、遺伝学、分子生物学、

環境科学、農学、植物病理学をはじめ、必要に応じて他の分野の専門知識を持つ人々からなる学際的なバイオセーフティ委員会によって進められなければならない。また、ヒトや環境へのリスクを最小限に抑えるために行われている配慮について国民の納得を確実に得るには、地元の行政や環境保護団体の代表者を加えることも有益な場合がある。

放出案の評価の第1段階は、研究所レベルでの評価、つまり組織内のバイオセーフティ委員会によって評価が行われるべきである。評価を現場で行うメリットは、バイオセーフティ委員会のメンバーは現場の知識を持っており、学問的な背景をよく理解しているのが普通だという点である。これは、放出に関する現場の責任を、その放出に直接的には関わっていない研究所の職員にも広げる方法にもなる。組織内のバイオセーフティ委員会には、放出後の区域のモニタリング、研究所職員への放出の実施やリスク評価の通知、説明責任の強化に関する責任もある。委員会は放出実施チームの活動を監督し、不測の事態が報告されることのないようにしなければならない。

こうしたリスク評価では、計画のあらゆる部分について詳細な検討が行われ、必要に応じてさらなる情報が要求されたり、場合によっては追加の予防措置が求められることもある。組織内のバイオセーフティ委員会が試験放出の条件に納得してこれを承認した場合でも、まだ次のレベルのリスク評価が残っている。

その一例として、国のバイオセーフティ委員会が考えられるが、これも学際的なものである。こうした組織も、同じように放出案を検討し、放出案を変更するよう追加の勧告を行ったり、要請を行うことができる。監視プロセスの一環として、放出実施チームのメンバーへの聞き取り調査も考えられる。最後に、国際的な、または地域的なバイオセーフティ委員会（EU が設置しているようなもの）が設置される場合もある。地域貿易協定が批准される際には、こうした手続きが妥当になるかもしれない。

## どのようなリスクが特定されるだろうか？

リスク評価というのは精密科学ではない。リスクの程度に評価を与えるのは難しい。ある遺伝子組換え植物の放出に危険が伴わないことを証明するのは、絶対に不可能である。人間がかかわる活動には、たとえどのような防止措置が取られたとしても、必ずある程度のリスクが伴うものである。リスク評価の本質とは、導入遺伝子によって、非組換え作物と比較した場合のリスクがどのように変化するかを見極めることであり、したがって、基準として非組換え作物を使い、挿入される導入遺伝子の影響と比較するところからはじめなければならない。関連するデータが入手できないために、答えられない疑問もおそらく出てくるだろう。たとえば、植物遺伝子が微生物に移行することがありうるのかどうかはよくわかっておらず、また、従来からの育種作物から近縁の雑草種への「遺伝子拡散」（次節を参照）の性質や影響についてはわからないことが山ほどある。放出が認められるかどうかや、追加的にどのような情報や予防措置が必要になるかを決定するために、バイオセ

イフティ委員会は、わかっていることとわかっていないことの両方を考慮に入れなければならない。

詳細な科学データが得られない場合には、伝統的な植物育種法の経験を参考にしてリスク評価を進めることも重要である。植物の育種は何千年にもわたって行われてきており(最初は偶然の産物として、のちには意図的に)、組換えによる形質転換で導入しようとする遺伝子の多くは、伝統的な植物育種で扱われた遺伝子にきわめて似た種類にあてはまる。

### 遺伝子組換え植物の放出によって生じうるリスク

組換え生物の放出に伴う大きな懸念の1つは、挿入された遺伝情報が野生集団に移行するかもしれないという点である。遺伝子移入は、組換え生物から望ましくない形質が移行する仕組みの1つとして、多くの論文で懸念が示されている(Gregorius & Steiner, 1993)。種間の交雑は、交雑を防ぐバリアが存在するにも関わらず、一般によくみられる現象だが、ほとんどの雑種は稀少かつ不稔性である。「遺伝子拡散」は、きわめて限定的にしか起こらないと考えられているが(Levin, 1984)、これが誤った認識であるかもしれないという根拠もいくつかある(UK DOE, 1993)。理論上、組換え植物が、通常の栽培環境以外の場所で管理の難しい雑草になる可能性はある。環境中に導入された遺伝子組換え植物のリスク評価に関する検討が近年公表されている(Dietz, 1993)。

植物が半自然環境に移入したり、導入遺伝子が他の作物や野生近縁種に(おそらくは遺伝子移行によって)移行して、農地や草縁、水路、ゴミ捨て場で定着する場合など、導入遺伝子の拡散にはいくつかのルートがある。導入遺伝子の拡散は、単一遺伝子の形質を検出するのに使われるのと同様の方法で確認できる可能性が高い(UK DOE, 1993, p. 30)。

では、組換え生物の放出にかかわるリスクとは、どのようなものだろうか<sup>6</sup>。組換え生物を放出区域内に閉じ込めておくことはできるのか、そしてもし「拡散」が起きた場合、環境に問題は生じるのだろうか。そうした生物は、それまで放出されていた管理された「区域」の外で生存したり定着したりすることができるのだろうか。作物が定植された環境から移行する可能性や、野生の個体群として定着する力には差がある。もしこうしたことが起こった場合、問題は生じるだろうか。導入された遺伝子が、他の同種の植物や近縁の野生種に移行する可能性はあるだろうか。

リスク評価では、その出発点として宿主植物や親植物を取り上げなければならない。宿主植物は、通常の栽培環境の外で生存する能力を持っているだろうか。遺伝子移行が起こりうる外部環境あるいは栽培環境中に近縁種が存在するだろうか。遺伝子組換えは、それによって作出される遺伝子組換え植物の生存能を高めるという面と、遺伝子産物の環境中の安全性の両面から考える必要がある。

<sup>6</sup> ここでいう「リスク」とは、ヒトおよび環境(他の作物を含む)へのリスクをいう。

検討の必要がある分野のいくつかを以下にまとめる。

#### 選択マーカー遺伝子

ほとんどの遺伝子組換え植物は、形質転換の過程で使われる選択マーカー遺伝子を含んでいる。マーカー遺伝子には次のような特徴がある。

1. 形質転換が起こっていない植物が選択からもれることを最小限に抑え、厳密な選択を可能にしなければならない。
2. 選択の結果、形質転換が独立して大規模に起こらなければならない、再分化を大幅に妨げることがあってはならない。
3. マーカーは、多くの種において正常に機能しなければならない。
4. マーカーの存在を確認できる検査法がなければならない。

抗生物質抵抗性遺伝子は、上記の基準をすべて満たすため、マーカーとして使われている。もっとも広く用いられているのは *nptII* 遺伝子で、抗生物質カナマイシンへの抵抗性を与える遺伝子である。米国の場合、この抗生物質の臨床での使用は減ってきている。この抵抗性マーカーは抗生物質ネオマイシンへの抵抗性も与えるが、ネオマイシンは臨床薬、獣医薬として現在も一部の国で処方されている。この他に、アミノグリコシド系抗生物質もマーカーとして用いられる。複数の広範な研究によって、この遺伝子が遺伝子組換え植物から微生物に移行する可能性はごく小さく、仮に移行が起こったとしてもその影響はほとんどないだろうとされているものの (Calgene, 1990) この種の選択マーカー遺伝子が商品としての遺伝子組換え品種に存在していることが容認できるかどうかについては、議論が続いている。

抗生物質抵抗性マーカーに代わるものも使われている。これらの中には、除草剤抵抗性マーカーも含まれる (Yadav et al., 1986)。植物系では、抗生物質マーカー遺伝子に代わるものが数多く提案されている。Cre-lox 系では組換え植物の姉妹系統が2つ作られるが、一方には細菌由来の組換え酵素をコードする遺伝子が含まれ、もう一方には抗生物質抵抗性遺伝子が酵素の作用部位に挟まれて含まれる。これら2つの系統を交配すれば、マーカー遺伝子は切り取られるはずである (Dale & Ow, 1991)。この系は、ジャガイモなど栄養繁殖する作物に適用するのは難しいと考えられている。

遺伝子融合マーカーは、組換え生物の選択ではなく、挿入した遺伝子の内部でタンパク質が発現しているかどうかを確認するために用いられる。もっとも広く用いられているマーカーの1つとして、大腸菌由来の  $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子がある (Jefferson et al., 1986)。

## 除草剤耐性

さまざまな種類の除草剤耐性遺伝子が、各種の作物に導入されている。除草剤耐性は、この耐性のメカニズムが明らかにされて以来、遺伝子組換えの最初のテーマとされた形質の1つである。一般にこの耐性は、単一遺伝子に支配される形質である (Mazur & Falco, 1989)。

除草剤耐性の最大の魅力の1つは、環境中で速やかに分解される除草剤を選択できる手段を与えてくれることである。考慮すべき環境上のリスクは、除草剤耐性の遺伝子組換え作物が雑草化してコントロールが難しくなることがありうるかどうかである。この他、作物と雑草との交雑によって、除草剤耐性遺伝子が雑草の個体群の中で定着する可能性も考慮する必要がある要因である。雑種の繁殖力が強いと、雑草管理を同じ除草剤に頼っている農法や、近隣の作物がその除草剤を使っている場合にコントロールが難しくなる可能性がある。同種の作物で別の除草剤に耐性を持つように改変されている個体群が近隣にある場合、作物が複数の除草剤に耐性を持つようになって、栽培環境内や自然環境内でさらなる問題を生じさせることはないだろうか。

「野生の」環境の中で、管理されていない非栽培種に除草剤耐性が移行した場合、問題は生じないだろうか。こうした環境は、通常、除草剤処理の対象になっておらず、抵抗性を示す近縁の作物種が存在しても、さほど問題にはならないかもしれない。リスク評価では、こうした移行によって起こりうる影響を明らかにするようにしなければならない。

## 害虫・病害抵抗性

害虫や病害への抵抗性を付与する導入遺伝子は、作物に選択的優位性を与え、農地への定着性や野生環境への侵入性を高める。もしその導入遺伝子が近縁の野生植物種に移行すれば、同様の選択的優位性を与えることになる。さらに、抵抗性遺伝子が害虫や病原体に与える影響という側面も考慮する必要がある。導入遺伝子がきわめて高い防御性を示す場合、その害虫や病原体が急速に耐性を持つようになることが考えられる。これは伝統的な植物育種法においてはよく知られている現象であり、問題はリスクを評価することよりもしっかりした栽培戦略を立てることだと思われるが、形質転換によってさまざまな種類の作物に同じ抵抗性遺伝子が使われる可能性があるということは、この問題を深刻に受け止めなければならないことを示している。

害虫抵抗性を与える遺伝子を導入するこの技術のうち、もっとも重要な利用例の1つがBt毒の使用である。Bt毒の使用に伴って生じると考えられる問題は、標的害虫における抵抗性の進化である。こうした抵抗性は、突然変異によって膜受容体への毒素の親和性が低下することに起因する (Gill et al., 1992)。プロテイナーゼ阻害剤を含む遺伝子組換え作物も同様な問題を引き起こす可能性があり、その使用は、抵抗性害虫の発生を防ぐよう

に慎重に計画されなければならない。

特定のウイルスから守るためによく使われているのが、ウイルスの外被タンパク質遺伝子である。最近、この方法を使うと、トランスキャプシデーションによって植物ウイルスの宿主域が変わるのではないかという議論がある。Creamer & Falk (1990) は、ルテオウイルスの混合感染によるトランスキャプシデーションが野外で見出されたとしている。外被タンパク質遺伝子は変化しないため、トランスキャプシデーション自体によって新たなウイルスが作りだされるわけではないが、その特異性が一時的に変わる可能性がある。また、植物で発現するウイルス配列と感染しているウイルスの配列が組換えを起こすのではないかという懸念もある。こうした懸念は、受容環境内でトランスキャプシデーションを起こす可能性のある他のウイルスの存在に関わってくる。

### 環境ストレス抵抗性

干ばつ、塩類土壌、重金属、低温、高温といった環境ストレスへの抵抗性は、複雑な現象であるため、ストレス抵抗性を高める遺伝子の単離には時間がかかるだろう。ストレス（高温、低温、塩分、重金属）によって誘導される植物遺伝子が特定されており（Fraley, 1992）、数年のうちには耐性の向上した植物が利用できるようになる可能性がある。こうした変化によって、植物はそれまで生育することができなかった環境で生育できるようになり、選択的優位性が付与されて他花受粉による導入遺伝子の移行が起こる可能性があるため、この種の遺伝子組換え植物のリスクを評価するのは特に難しくなる。

外来種モデルは、ある植物が外国に導入され優占種になるというもので、遺伝子組換え植物の放出によってどのような結果が生じるかを示すのに使われることがある。1 つないし複数の遺伝子を植物に挿入してきわめて特異的に改変する場合の影響を評価するには、これは一般的なモデルとして適当ではないものの、これまでとは違った環境で生育できるように植物を改変する場合にはあてはまるかもしれない。こうした場合のリスク評価では、結果として、個々の放出環境のもとで導入遺伝子によって付与される競争優位の性格に関する情報がさらに必要になる場合がある。

### 毒性・アレルギー性

遺伝子産物は、植物あるいはその一部の内部で有毒になったり、環境中で食用作物や商品作物のアレルギー性を変化させる可能性がある（花粉など）。毒性は標的生物以外の微生物にあてはまる場合もあり、生態系に害が及ぶ場合もある。

### 遺伝子組換え作物の大規模利用による影響

遺伝子組換えによる作物品種の広範な利用を検討する際に必要となるリスク評価は、基本的には小規模な放出の場合と同様だが、重要な相違点もいくつかある。花がつくのを防いだり、放出区域（野外区画）の植物素材をすべて破棄するといった野外での封じ込め措置は、もはや不可能である。つまり、リスク評価では、遺伝子組換え作物と近隣の非組換え作物や雑草種との交雑の可能性を考慮に入れなければならない。遺伝子組換え植物は、さまざまな自然環境で定着する機会を持つことになり、花粉の周期的な移動によって野生の個体群に導入遺伝子が移行する可能性が生じる。組換え作物の数が他花受粉性の野生種を圧倒的に上回る生息地では、たとえ、導入遺伝子を持たないそれらの野生種と比較して選択的非優位性を与えてある場合でも、導入遺伝子が野生個体群に定着するようになる可能性がある。

遺伝子組換え植物が、故意にあるいは誤って、他花受粉性の雑草種の領域が異なる地域も含めて他の国に持ち込まれる機会も生じる。小規模の場合のリスク評価では、放出区域内での他花受粉性の種の分布を考慮する。大規模な放出では、評価体系において検討の対象とする環境の地理的な線引きをどう設定するかという問題が生じる。

小規模な放出では顕在化しない稀な事象が、大規模放出では顕著に現れる可能性もある。たとえば、小規模での導入遺伝子の不安定性は、作物品種の大規模な利用では許容されない場合もある。

栽培戦略に関する問題もある。たとえば、1つの作物種に複数の異なる除草剤抵抗性遺伝子を導入していく場合、どこまで慎重に行えばいいのだろうか。それによって、複数の除草剤に抵抗性を持つ雑草が出現することにならないだろうか。さらに、同じあるいは類似の害虫（または病害）抵抗性遺伝子が、多くの異なる作物に存在することによって、どのような影響が出るだろうか。伝統的な植物育種法での経験は、抵抗性害虫や抵抗性病原体の出現する可能性が高まることを示している。

この他、規模に依存する問題として、作物の毒性やアレルギー性に関係するものや、植物が腐敗する際に生じる導入遺伝子の分解産物の性質に関係するものがある。

## リスク管理のために取りうる方法

小規模放出でのリスク管理がうまくいくかどうかは、主に、野外での封じ込めや、放出中・放出後の区域のモニタリングを許容可能なレベルにまで高めることができるかどうかにかかっている。野外において封じ込めのレベルを高めるには、緩衝用作物やケージで囲んだり、花に袋かけを行えばよい。英国で初めて放出実験が許可された際には、実験区画内のすべての植物の花の部分を摘み取ることが求められた。導入された遺伝子が他の植物に移行する可能性は確実に低下したが、こうした措置が適用できるのは小規模での野外試験であろう。

遺伝子組換えの作物品種が広く放出された後に取りうる封じ込め手段は限られ、商用放

出前の遺伝子組換え品種のリスク評価では、このことを考慮に入れなければならない。

商用放出に先立つリスク評価は、徹底的かつ精査を受け入れものであり、同種または類似の遺伝子組換え植物を使って行われた小規模放出から得られるあらゆる事実を考慮することが重要である。前節で述べたように、大規模放出ならではの困難があるかもしれない。大規模放出に関する問題を緩和する措置として、いくつか考えられるものがある。

1. 現在では、植物の特定の組織で導入遺伝子を発現させる各種の植物プロモーターが利用できる。必要な場合には、ある特定のタンパク質の発現を植物のそうした部位に限定するのが望ましい場合もある。たとえば葉に害を与える害虫の場合、殺虫性タンパク質は葉のみで発現すれば充分である。また、今後の可能性として、植物のほとんどの部位での発現を促す構成的プロモーターを使う一方で、たとえば、アレルギー反応が起きる可能性のある花粉などのきわめて特異的な組織で導入遺伝子の作用を停止させるという戦略を使うことも考えられる。
2. 花粉による導入遺伝子の拡散を防ぐために、雄性不稔性の遺伝子組換え植物の利用が望ましいと考えられる場合がある。
3. 遺伝子組換え作物を他花受粉性の野生近縁種が自生していない区域で栽培することが可能または望ましい場合もありうる。
4. 遺伝子汚染を防ぐために、一定の種類 of 遺伝子組換え作物（特有の脂肪酸組成を持つ油料種子作物など）は、場合によっては非組換え作物から離れた区域で栽培することが望ましいかもしれない。
5. 結果が充分でないと考えられる場合には、品種を回収することも必要になるかもしれない。

## まとめ

遺伝子組換え植物の放出が初めて実施された当初から、その目的は、事例ごとの前進、実績の積み重ね、そしてその経験をもとに規制上の要件や監督を簡素化することにあった。EU や米国では、現在、合理化や一括処理が進んでいる。どちらの規制制度においても、特定の作物種や導入遺伝子について、放出試験で何度もテストされ、条件を満たす結果が得られていることが明らかにされている。こうした場合、規制当局による承認にかかる時間は大幅に短縮されている。今後数年間は、放出基準の統一化や規制当局による監督の簡素化に向けての動きが、活発な国際論争の 1 分野であり続けることは間違いない（UK DOE/ACRE, 1994a, b）。

リスク評価の過程を議論することのマイナス面の 1 つは、リスクを過剰に重視し、メリットをほとんど無視することである。広範な分類学上の境界線をまたいで遺伝子を移行させる技術は、遺伝子がどのように調節され、表現型にどう影響しているかを理解しようと

する研究において、きわめて強力な手段の1つである。これによって、伝統的な植物育種法によって成し遂げられた進歩がさらに押し進められ、途上国に関わりが深い作物をさまざまな新手法で改良するための貴重な機会が与えられる。

遺伝子組換え作物が世界で幅広く利用されることを期待する上で、身近な放出環境における環境への影響にとどまらない検討が必要になるが、それは、人類が共有する地球環境に対する責任を、われわれ全員が持っているからである。

## 参考文献

- ACGM/HSE (1986, 1993) Note 7: Guidelines for the risk assessment of operations involving the contained use of genetically modified microorganisms. Advisory Committee on Genetic Modification, Health & Safety Executive, London.
- ACGM/HSE (1989) Note 10: Guidelines for the risk assessment of operations involving the contained use of plants and plant pests. Advisory Committee on Genetic Modification, Health & Safety Executive, London.
- Ambros, P.F., Matzke, M.A. & Matzke, A.J.M. (1986) Detection of a 17kb unique sequence (T-DNA) in plant chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma*, 94, 11-18.
- Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8711-8721.
- Blundy, K.S., Blundy, M.A.C., Carter, D., Wilson, F., Park, W.D. & Burrell, M.M. (1991) The expression of class I patatin gene fusions in transgenic potato varies with both gene and cultivar. *Plant Mol. Biol.*, 16, 153-160.
- Calgene (1990) *Kan<sup>r</sup> Gene: Safety and Use in the Production of Genetically Engineered Plants, Request for Advisory Opinion*. Calgene Inc., California, USA.
- CEC (1990a) Council Directive of 23 April 1990 on the contained use of genetically modified microorganisms. Reference no. 90/219/EEC. *Off. J.* L117, Volume 33, 8 May 1990. Commission of the European Communities, Brussels.
- CEC (1990b) Council Directive of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. Reference no. 90/220/EEC. *Off. J.* L117, Volume 33, 8 May 1990. Commission of the European Communities, Brussels.
- Chyi Y.-S., Jorgenson, D., Goldstein, S., Tanksley, D. & Loaiza-Figueroa, F. (1986) Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol. Gen. Genet.*, 204, 64-69.

- Creamer, R. & Falk, B.W. (1990) Direct detection of transcapsidated barley yellow dwarf luteoviruses in doubly infected plants. *J.Gen. Virol.*, 71, 211-217.
- Dale, E.C. & Ow, D.W. (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10558-10562.
- Dale, P.J. & McPartlan, H.C. (1992) Field performance of transgenic potato plants compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theor. Appl. Genet.*, 84, 585-591.
- Dale, P.J., Irwin, J.A. & Scheffler, J.A. (1993) The experimental and commercial release of transgenic crop plants. *Plant Breed.*, 111, 1-22.
- De Cleene, M. & De Ley, J. (1976) The host range of crown gall. *Botan. Rev.*, 42, 386-466.
- Dietz, A. (1993) Risk assessment of genetically modified plants introduced into the environment. In: *Transgenic Organisms*, Wörmann, K. & Tomiu, J. (eds.), pp. 209-227. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Fitter, A., Perrins, J. & Williamson, M. (1990) Weed probability challenged. *Bio/Technology*, 8, 473.
- Fraley, R. (1992) Field testing genetically engineered plants. In: *Current Combinations in Molecular Biology: Improvement of Agriculturally Important Crops*, Fraley, T., Frey, N.M. & Schell, J. (eds.), pp.83-86. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Gill, S.S., Cowles, E.A. & Pietrantonio, P.V. (1992) The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.*, 37, 615-636.
- Gregorius, H.-R. & Steiner, W. (1993) Gene transfer in plants as a potential agent of introgression. In: *Transgenic Organisms*, Wörmann K. & Tomiu, J. (eds.), pp.83-107. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- Hobbs, S.L.A., Kpodar, P. & DeLong, C.M.O. (1990) The effect of DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol. Biol.*, 15, 851-864.
- House of Lords, Select Committee on Science & Technology: Regulation of the UK biotechnology industry and global competitiveness. Written evidence received up to 30 April 1993. Her Majesty's Stationery Office, London.
- Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture (1991) Guidelines for the release into the environment of genetically modified organisms. Interamerican Institute for Cooperative on Agriculture, San José, Costa Rica.
- Jefferson, R., Burgess, S.M. & Hirsh, D. (1986)  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8447-8451.

- Jefferson, R., Goldsborough, A. & Bevan, M. (1990) Transcriptional regulation of patatin-1 gene in potato. *Plant Mol. Biol.*, 14, 995-1006.
- Karp, A. (1991) On the current understanding of somaclonal variation. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, Miflin, B.J. (ed.), pp. 1-58. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Larkin, P.J. & Scowcroft W.R. (1981) Somaclonal variation – a novel source of variation from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60, 197-214.
- Levin, D.A. (1984) Immigration in plants: an exercise in the subjunctive. In: *Perspectives on Plant Population Ecology*, Dirzo, R. & Sarukhan, J. (eds.), pp.242-260. Sinauer Associates Inc., Massachusetts, USA.
- Levin M. & Strauss, H.S. (1993) Overview of risk assessment and regulation of environmental biotechnology. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M. & Strauss, H. (eds.), pp.1-17. McGraw-Hill Inc., New York.
- Mazur, B.J. & Falco, S.C. (1989) The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40, 441-470.
- OECD (1986) Recombinant DNA safety considerations. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD (1990) Good development practices for small scale field research with genetically modified plants and microorganisms: a discussion document. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (1992) Report of the OECD workshop on the monitoring of organisms introduced into the environment. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (1993) Field releases of transgenic plants, 1986-1992: an analysis. ISBN92-64-14046-8.p.40. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- O'Neill, C., Horvath, G.V., Horvath, E., Dix, P.J. & Medgyesy, P. (1993) Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG): treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *Plant. J.*, 3, 729-738.
- Potrykus, I. (1990) Gene transfer to plants: assessment and perspectives. *Physiol. Planta*, 79, 125-134.
- Potrykus, I. (1990) Gene transfer to plants: *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 42, 205-225.
- Royal Commission on Environmental Pollution (1989) 13<sup>th</sup> Report: The release of genetically engineered organisms to the environment. HMSO, London.
- Royal Commission on Environmental Pollution (1991) 14<sup>th</sup> Report: GENHAZ. HMSO,

London.

- Scheid, O.M., Paszkowski, J. & Potrykus, I. (1991) Reversible inactivation of a transgene in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 228, 104-112.
- Selker, E. (1990) Pre-meiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu. Rev. Genet.*, 24, 579-613.
- UK DOE (1993) Research Report No. 1: Genetically modified crops and their wild relatives – a UK perspective. Department of the Environment, London.
- UK DOE/ACRE (1993) Guidance Note 1: The regulation and control of the deliberate release of genetically modified organisms. Department of the Environment, London.
- UK DOE/ACRE (1994a) Guidance Note 2: Fast track procedures for certain GMO releases. Department of the Environment, London.
- UK DOE/ACRE (1994b) Guidance Note 3: Reduced information requirements for releases of plants under GMO regulations. Department of the Environment, London.
- UNIDO (1991) Voluntary Code of Conduct for the Release of Organisms into the Environment. July, 1991. United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
- US HHS (1993) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. US Department of Health and Human Services, Centres for Disease Control and Prevention & National Institutes of Health, HHS Publication No. (CDC) 93-8395.
- Williamson, M. (1993) Regulation of the UK Biotechnology Industry and Global Competitiveness. In: Written evidence submitted to the House of Lords Select Committee on Science and Technology, pp. 206-207. HMSO, London.
- Williamson, M., Perrins, J. & Fitter, A. (1990) Releasing genetically engineered plants. Present proposals and possible hazards. *Trends Ecol Evol.*, 5, 417-419.
- Yadav, N., McDevitt, R.E., Bernard, S. & Falco, S.C. (1986) Single amino-acid substitutions in the enzyme acetolactate synthase confer resistance to the herbicide sulfometuron methyl. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 4418-4422.

## 第 5 章 遺伝子組換え根粒菌・菌根菌の環境放出

ジェフリー・ホール

国際菌類学研究所（英国・サリー州エガム）

### はじめに

分子レベルでの強力な DNA 操作法の登場によって、自然の交雑では生じない遺伝子型を持つ微生物を、かつてない精度で作出することが可能になった。こうした新しい遺伝子の組み合わせをすることによって、既存プロセスの中での微生物の活性を高めたり、新たな機能を導入することができる。本章では、根粒菌と菌根菌の遺伝子操作、農業生態系におけるその利用、その結果生じる有害性やリスク、メリットに焦点を絞って論ずる。この新たに登場した技術に関して通常表明される国民の関心に応え、不安を和らげるための安全な作業手順の開発も含まれる。

### なぜ微生物を遺伝的に改変するのか

微生物は、農業分野でさまざまな有益な利用が行われてきており、何十年もの間、安全に利用され、人類に多大な恩恵をもたらしてきた。多くの場合、こうした利用は、古典的な手法(自然の突然変異や組換えなど)あるいは分子的手法(部位特異的な変異誘発、DNA クローニング、細胞融合など)を用いて遺伝的に改変された微生物を用いることによって、より効率的に行うことが可能である。分子的手法には、古典的な手法に対して優れている点が 2 つある。第 1 に、分子的手法の多くは精度が高く、十分に性質の明らかな改変体を作ることや、場合によっては、DNA のヌクレオチド配列の中の特定の塩基の変更を確かめることが可能である。求められる遺伝子型の構築やキャラクタリゼーション(性質決定)の精度が高いため、科学者たちは遺伝子組換え微生物(GEM)の安全性をよりの確に判断できる。第 2 に、分子的手法を使うことによって、古典的な手法では得ることのできない新たな組み合わせを作ることができ、科学者たちは遺伝子交換に対する自然のバリアを飛び越えることが可能になる。しかし、新たな組み合わせの生物学的な影響はわかっていないため、GEM を環境中に放出しようとする際には、事前に個々の遺伝子の組み合わせが持つリスクや GEM に関連する有害性を評価する必要がある。天然の微生物の農業目的での環境への導入には長い歴史があり、リスク評価のもとにできる膨大なデータが得られている。ある種の微生物については、それらの群集内や生態系内での役割が正確にはわかっていなくても、安全に利用できることが明らかだが、よく知られていない微生物が使われている場合、潜在リスクのすべてを評価するのは困難である。

## 農業における根粒菌と菌根菌の利用

### 窒素固定

リゾビウム (*Rhizobium*) 属やブラディリゾビウム (*Bradyrhizobium*) 属の細菌がマメ科の植物と共生関係を作り、その根に根粒を形成することは、古くから知られている。これらの細菌は大気中の窒素を植物が生育に利用できる形で固定し、植物の収量を増加させる。このため、窒素固定細菌の遺伝的な改良は、大きな関心を集めてきた (Schmidt & Robert, 1985)。実際に、米国では 1983 年から 1989 年の間に、*R. meliloti* に関する申請が規制当局に 20 件提出されており、この期間のすべての微生物放出に関する申請の 55% を占めている (Levin & Strauss, 1991)。

根粒菌は、土壤微生物叢の一部としてもともと存在しているもので、植物の根と共生する前は単独で生育している。しかし、これらの大部分は活動しておらず、貧栄養環境ではなんとか生き延びているに過ぎず、他の土壤微生物の捕食の対象になっている。根粒は、微生物の生育や生残を向上させる保護環境を提供し、植物の死後は、根粒が崩壊すると同時に根粒菌は土に戻る。

しかし、土壤によっては根粒菌の自然個体群が少なかったり、含まれている根粒菌が導入した作物に根粒をつくらない場合 (オーストラリアに導入されたマメ科の牧草など) がある。天然の根粒菌の数を増やしたり、土壤に直接添加して現在いる種の構成を変えることは現実的でなく、種まきの時期に、牧草 (アルファルファ、クローバー、ウマゴヤシなど) やマメ類 (インゲン、エンドウ、ダイズ) の種子に適当な根粒菌を含む接種材料を接種する。接種菌として用いる新たな根粒菌は、複雑で動的な土壤生態系の中でうまく機能して、競合に打ち勝つ必要があり、米国や東欧では、非土着のマメ科植物と非土着の根粒菌 (たとえばダイズとブラディリゾビウム属の一種など) の導入後に生産性が大幅に向上している。

マメ科植物の最適な生育に必要な窒素を供給する上でもっとも経済的な方法は、窒素固定性を向上させた根粒菌の株を選んで接種することである (Ham et al., 1971)。根粒菌の窒素固定効率は宿主植物によって大きく異なり (Batzli et al., 1992)。菌株を改良する際にはこの遺伝的多様性が利用されている。選択した根粒菌株を用いて共生を高める試みが数多くなされてきたが、適した接種菌を調製する際に主な問題となるのが、土壤中の土着株との競合である。土着の株と競合できるものを選択して、圃場のマメ科植物の根粒の大多数を占めるようにする必要がある。競合的根粒形成に影響を及ぼす根粒菌の遺伝子や表現型が特定されており、たとえばブラディリゾビウム属ダイズ根粒菌では血清型が競合性に関係している (Robert & Schmidt, 1985)。

## リン酸塩と微量栄養素の獲得

菌根共生は、担子菌類、接合菌類、子囊菌類に属する菌類と、すべての草本・木本植物の約 85%の根との間に形成され (Harley, 1989)、この中には温帯の国々や熱帯地方における経済的に重要な作物がほぼすべて含まれる。菌根菌は、リン酸塩や他の微量栄養素(主に銅、亜鉛、マンガン)の濃度と植物への輸送にかかわりを持ち、代わりに植物から炭水化物を得る。このため、低リン酸土壌や貧栄養土壌に生育する植物に見出されることが多い。つまり、菌根菌は、農業生態系、園芸生態系および自然生態系における植物の生育、生産性、定着を向上させる大きな可能性を秘めており、特に生産性が極端に低い土地では、土壌の安定や侵食防止の役割も担っている。しかし、植物の生育向上は、菌根を形成する種のすべてに見られるわけではない。土壌の肥沃度や pH、乾燥度に応じて生育を促進させる力は、それぞれの種によって大幅に異なる (Bethlenfalvay, 1992a)。高濃度の重金属やアルミニウム、塩類に適応する生態型も特定されている。

担子菌類と子囊菌類に属する菌類は、低・高木の根と 2 種類の菌根を形成するのが一般的である。第 1 のタイプは外生菌根といい、菌糸は根の表面および外皮層の細胞の間で成長し、周辺の土壌や落葉落枝層にたくさんの分枝を出して網目状に広がる。環境条件や物理的な条件が適当だと、菌糸は、地上 (キノコや毒キノコなど) や地下 (トリュフなど) に子実体 (有性胞子を生じる構造体) を形成する。これらの菌類では無性生殖による胞子の形成はほとんど起こらないが、菌糸、菌糸束、菌核などの栄養体を形成するものもある。外生菌根は温帯林や北方林に特徴的なもののひとつで、5,000 種以上が記録されている。外生菌根菌は宿主特異性があまり高くなく、また、菌根を形成する菌類における緑色植物の選択性もあまり高くない (Harley, 1989)。このため、各樹種が、いくつかの異なる菌根菌種の 1 つに感染するのが一般的である。

リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属の担子菌には、ランの実生根の皮層組織の内部に菌糸が侵入して共生する (内生菌根という) ものがあある。この共生では相手の菌が優勢になって実生根を破壊してしまうことがあるため、実生根にとっては危険な関係である。しかし、この共生は初期の生育や植物の定着に不可欠で、植物が成熟すると相手の菌は姿を消す。内生菌根はまた、多くの熱帯樹種と担子菌の間にも形成され、多くの樹種が最大で 30 種の菌根を持っている。

接合菌類の大部分は、草本・木本植物と共生を形成して菌糸がその根の皮層細胞の間で生育し、嚢状体と呼ばれる大きな袋状の器官や、根の細胞を貫通する樹枝状体と呼ばれる枝状の養分授受器官を形成する。この共生は「嚢状体 - 樹枝状体 (VA)」菌根 (VAM 菌) と呼ばれ、根への感染の種類としては、きわめて一般的で広範に生じる。VAM 菌は、有性生殖することはほとんどなく、厚壁胞子と呼ばれる休眠胞子だけが作られるのが普通である。また、根粒着生・窒素固定マメ科植物と共生を形成する種類としてもごく一般的な菌根菌である (Barea et al., 1992)。土壌は一般に数種類の VAM 菌を含んでおり、それら

の菌すべてがほとんどの作物の根にコロニーを形成することができるが、宿主や土壌に対する菌株依存性の反応があることから、栄養を最大限に獲得するためには植物と土壌の接点で菌類の連携が必要なことが示唆される (Bethlenfalvay, 1992b)。

セイヨウシヨウロ (*Tuber*) (Fontana, 1977; Mischiati & Fontana, 1993)、コツブタケ (*Pisolithus*)、キツネタケ (*Laccaria*)、ワカフサタケ (*Hebeloma*)、ヌメリイグチ (*Suillus*)、ニセシヨウロ (*Scleroderma*)、イボタケ (*Thelephora*)、ヒダハタケ (*Paxillus*) (Jeffries & Dodd, 1991) など、いくつかの属の内生菌根菌が実験室の人工培地上で培養されて接種菌の調製に役立っており、また遺伝子操作も可能だと思われる。

こうした多くのメリットがあり、評価や操作のためにさまざまな手法が利用できるにもかかわらず (Hayman, 1984)、いくつかの理由で VAM 菌が作物生産で広く利用されるには至っていない。

VAMの分離株は、さまざまな宿主反応を誘発することが考えられるため、現在存在する多くの個体群からもっとも適切な接種菌を選択するのは難しい (Bethlenfalvay, 1992a)。接種菌の調製が難しくコストが高いことや、利用技術がほとんど発展していないことが、この問題を悪化させている。VAM菌はすべて絶対共生菌であるため、純粋培養がきわめて難しい。宿主植物の根または生体の根組織を使った対峙培養 (通常は固形培地または液体培地上で行う) による菌株の作出が可能で、これから接種菌を調製することができる (Sylvia & Jarstfer, 1992)。菌根菌の多量の純粋培養はまだできないが、*Gigaspora margaritae* が 2% CO<sub>2</sub> とフラボノイドを含む培地中で生育している (Bécard et al., 1992)。こうした手法の開発や改良によって、純粋培養での収量の向上が期待される。

## 土壌再生

先進国では、農業研究の重点が作物生産第一主義から離れ、農業の実施による温帯生態系、熱帯生態系両方の環境への影響に注意が向けられている。世界の乾燥地帯、半乾燥地帯および亜湿潤地帯では、過放牧や森林伐採、無秩序な開墾が原因となって土壌浸食が起こり、多くの地域で砂漠化につながっている。水や栄養分 (窒素やリン) が豊富でないこうした生態系の植生回復は、マメ科の木本を用いて始めることが可能である。マメ科の植物は、ストレス条件下での植物の生育を助ける根粒菌や菌根菌と共生関係を作る。地中海沿岸の砂漠化した生態系では、特定の VAM 菌や根粒菌を接種した土着のマメ科植物を用いて、砂漠化した生態系を修復しようという試みによって、発芽実績や植物の定着の向上、生物体量の増加がみられた (Herrera et al., 1993)。こうした共生は、やせた土地 (Skujins & Allen, 1986; Allen, 1989; Morgan et al., 1990)、リン酸汚染された土壌 (Sylvia, 1990)、温帯生態系 (Perry et al., 1987) と熱帯生態系での森林再生にも活用されている。

## 遺伝子改変の手法

通常、遺伝子の改変では、コード遺伝子の不活性化型変異やこうした因子をコードする DNA 領域を削除することによってある形質を取り除く場合と、染色体や内在するプラスミドに遺伝子を挿入したり、ある形質をコードする新たなプラスミドを導入することによって新しい形質を付け加える場合がある。プラスミドは環状の二重鎖で、細菌に広く分布する DNA 分子を自律的に複製する。プラスミドは、細胞の成長や生存といった基本的な側面に不可欠な遺伝的性質（表現型）はコードしていないことが多いため、細胞にとっては無くても困らないものである。

リゾビウムの遺伝物質は、静止した 1 本の染色体と分子量が大きく（ $10^2 \sim 10^3$ キロ塩基対）接合によって交換可能な複数のプラスミドからなる。リゾビウムでは、ニトロゲナーゼの構造遺伝子、根粒形成遺伝子、宿主特異的な決定因子の構成要素が、共生（*sym*）プラスミドと呼ばれる 1 個の大型のプラスミド上にある。このほかに、根粒形成や窒素固定にかかわる遺伝子が、染色体や他のプラスミドで見出されている。遺伝子改変のほとんどは、こうしたプラスミド（ほとんどが *sym* プラスミド）に外来遺伝子を付け加えたり、もとの遺伝子を取り除いたりするものである。

外生菌根菌の改変は形質転換によって行われてきたが、このプロセスでは、菌糸体と溶菌酵素をソルビトールや塩化カリウムといった浸透圧安定剤の存在下で培養することによってプロトプラスト（細胞壁を除いた原形質体）が作られる。そして、外来遺伝子（そのままの遺伝子）を含むプラスミドが加えられ、ポリエチレングリコールと塩化カルシウムの存在下で菌のゲノムに組み込まれる。形質転換されたプロトプラストは選択培地に広げられ、形質転換体はそこで細胞壁を再生し、菌糸を伸ばす。これまでに、VAM 菌や内生菌根菌の遺伝子改変の試みは行われていない。

#### 遺伝子組換え根粒菌と菌根菌

遺伝子操作によって窒素固定能を向上させた根粒菌の導入は、将来の農業需要に応えるものとして重要になる。化学合成された窒素肥料の投入とそれへの依存が大幅に削減され、肥料生産に使われる化石燃料が保全される可能性がある。湖や川に流れ込む雨水の硝酸汚染が確実に削減されることによって、大きな環境上のメリットが得られる。競合的根粒形成に影響を及ぼす根粒菌の遺伝子や表現型が特定されており、たとえば、運動性と走化性、認識 - 付着のメカニズムにかかわる細胞表面の多糖類、バクテリオシンの産生、感染速度、他の菌株の根粒形成を妨げる遺伝子産物、基質反応性、土壌基質での生育速度などである。競争力の向上、宿主特異性の解明（*hsn* 遺伝子）、根粒形成（*nod* 遺伝子）、根粒占有率および窒素固定（*nif* 遺伝子）の向上のための改変も試みられてきた。リファンピシン抵抗性、Tn5 トランスポゾン、根粒形成性、窒素固定性、さらに pTA2 プラスミドを含むマーカー遺伝子も、放出前の追跡装置として挿入されている（Wellington et al., 1993）。リゾ

ビウムのプラスミドを、固定能を持たない種である *Agrobacterium tumefaciens* に接合によって移行させた結果、*A. tumefaciens* はマメ科植物の適切な宿主と共生を始める能力を獲得した (Martinez et al., 1987)。また、長期的な目標として、小麦や大麦のように根粒を形成せず、一般に、健全な発育のために大量の硝酸塩肥料を必要とする植物への感染能を持つ根粒菌を構築することがある。穀物生産におけるコスト削減の可能性はきわめて大きい。

菌類の遺伝子改変法は、近年大きく進歩したが、あらゆる種類の菌根菌で純粋培養が不可能なことが、この分野の進歩の妨げとなってきた。このため、菌根菌では内生菌根を形成する担子菌のキツネタケ (*Laccaria laccata*) の遺伝子改変実験が 1 件報告されているだけで、これは抗真菌剤のハイグロマイシン B への抵抗性を持たせるために形質転換されたものである (Barrett et al., 1990)。その形質転換体は、分類学的なつながりのない菌類の中で機能することのできる大腸菌 (*Escherichia coli*) やアスペルギルス・ニデュランス (*Aspergillus nidulans*) 由来の遺伝子を含んでいた。Barrett et al. (1989) では、10 種類の外生菌根菌の形質転換の条件が報告されており、Meinharat & Esser (1987) では、ベクターとして用いることができるアミガサタケ (*Morchella* spp.) のプラスミドの性質が明らかにされている。現在では、共生に有利に働く遺伝子が具体的に特定できれば、外生菌根菌の共生を高められる可能性が出てきている。

## 土着株と遺伝子組換え株の放出

細菌の大規模で意図的な放出は、マメ科植物の種子への根粒菌接種によって、ほぼ 1 世紀にわたって多くの気候帯や土壌型で行われてきた (Catroux & Armarger, 1992)。接種材料は、その土地の土壌や気候条件、また植物の遺伝子型に合わせて、リゾビウムの純粋培養体と、さまざま産地由来の菌株、つまり既知・未知の微生物の混合物からなる。米国や欧州では、ダイズ根粒菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) などの非在来種が導入されており、単一種を改良した株が、土着の個体群に導入されてきた。その結果、新たな表現型を持つ非土着の根粒菌が、世界中の土壌中で多数定着してきた。*Bradyrhizobium japonicum* や *Rhizobium meliloti* の標識株を用いた組換え根粒菌の土壌への放出が何例も行われている (Wellington et al., 1993)。

温帯土壌、熱帯土壌での外生菌根菌、内生菌根菌、VAM 菌の意図的な放出が多く行われてきたが、これは特に食用作物の生産向上や森林樹の定着、環境目的での土地再生のためである (Jeffries & Dodd, 1991; Bethlenfalvay, 1992a)。例として、シリアでのヒヨコマメへの接種 (Weber et al., 1991)、米国フロリダ州での *Vigna parkeri* への接種 (O'Donnell et al., 1992)、コロンビアでのキャッサバへの接種 (Sieverding & Toro, 1988; Dodd et al., 1990)、インドでのキマメへの接種 (Sivaprasad & Rai, 1991)、フィリピンでのマツ (*Pinus*) やユーカリ (*Eucalyptus*) への接種 (Jeffries & Dodd, 1991) などが

ある。場合によっては菌根菌と窒素固定細菌の二重接種が行われることもあり、カナダでの *Eleagnus* や *Sphenerida* への接種はその一例である (Visser et al., 1991)。一般に外生菌根菌の接種は、実験室での接種材料の調製に広いスペースと手間を必要とするため、この菌を含む少量の原土壌も一緒に加えられる。現在までのところ、遺伝子組換えの菌根菌の放出は行われていない。

## リスク評価

古典的な操作法や分子的な操作法によって作りだされた新しい遺伝子型を、封じ込めではない生態環境に放出することによってどのような生物学的影響が生じるかは、部分的にしかわかっていないため、それぞれの放出ごとにリスク評価を行う必要がある。リスク評価のための従来の枠組みは、次のことを目的とした分析の各段階を経て、秩序だてて進められる。

1. 第 1 に、新規の遺伝子の組み合わせによって生じる潜在的な有害性を特定すること。
2. 第 2 に、危険因子への曝露とその影響を評価することや、有害な影響とその実現の可能性の大きさを考慮してリスクレベルを決定することによって、有害性が現実の危害を生じる可能性 (すなわちリスク) を評価すること。
3. 第 3 に、適切な封じ込め手段および管理方法を選択して指定すること (リスク管理ともいう)。

GEM の放出のリスク評価の場合、1 つの事象によって起こりうる結果が非常に多く複雑なため、この方法を適用するのが難しいこともある。これまで科学者は、ごく数例の封じ込め放出実験に基づいた判断、類推、結果に頼ってきたが、現在は、それぞれの実験に伴うリスクを予測するために、もっと定量的なデータが利用できるようになっている。各遺伝子の由来や機能、用いられたクローニング法、そしてそれが放出される生態系は、一般に、その製品に特異的であるため、世界の規制当局の大多数は、事案ごとのリスク評価を採用している。いったん共通のテーマが生じれば、世界中で適用できる一般的な分析基準が採用されるかもしれない。リスク評価では、予想される有害性と見込まれるメリットのバランスを重視すべきである。

## 根粒菌および菌根菌に関する野外試験の申請・審査に必要なデータ

環境への潜在的な影響を評価する際には、特定の微生物とその機能、標的となる環境を熟知していることが重要である。リスク評価には、次の情報が含まなければならない。

1. 遺伝子改変の種類およびそれによって微生物（宿主域を含む）に与えられる性質
2. 導入される微生物から他の微生物叢への遺伝子伝達の可能性
3. 当該微生物およびその定着、生存の生物学的性質
4. 当該微生物の生態系内での機能的役割
5. 意図的な手段（利用法）によって当該微生物が区域内で移動したり、自然（気候の影響）や動物による物理的な媒介によって区画外に移動する可能性
6. 遺伝形質が、意図されたよりも長期にわたり、あるいは標的以外の環境や生物に広がる場合に、生態系の構造や機能に及ぶと考えられる影響
7. 利用にかかわる職員の健康を確保するための手段
8. ヒトの健康と安全を守るための封じ込め手段と管理方法
9. 計画外の放出が生じた場合の緊急時対策（中止手順を含む）
10. 放出を担当する職員の氏名および放出区域の場所と日付（区域の巡回回数を含む）
11. 実験を行う作業者の健康を監視するための計画（実験の作業記録、使用する微生物、発現する遺伝子産物を含む）

このリストは優先順位を示したものではなく、必要とされる情報の重要性は同等である。リスク評価は、実験（菌株の収集、廃棄物処理を含む）にかかわるすべての職員、管理部門の職員、研究者の代表で構成される遺伝子操作安全性委員会によって、組織内で行われるのがもっとも効果的である。必要に応じて国（政府）の管轄機関から、リスク評価に関する専門家のアドバイスが得られることも必要である。GEM にかかわる実験は、個別にリスク評価が行われるべきで、各実験のリスク評価は、実験終了後、10年間保管されなければならない。計画の大幅な変更によって評価の妥当性が無くなったと疑う理由がある場合には、評価の見直しを行うべきである。

## 土着および遺伝子組換え根粒菌・菌根菌の放出による有害性

### 土着根粒菌の土壌中への放出

リゾビウム属の菌株は、いったん土壌に導入されると安定性がきわめて高いため（Jansen van Rensburg & Strijdom, 1985; Brunel et al., 1988）外来種や選択した株を導入する前には十分な配慮がなされなければならない。リゾビウムのうち、根粒形成能は低い競争力が強く、土壌腐食性の菌株を導入すると、あとになって根粒形成能は向上しているが競争力の弱い株を導入できなくなる場合がある。また、根粒の占有率は高いが不安定だったり窒素固定能が低い株を土壌に導入すると、あとから除去するのが難しい場合がある（Weber et al., 1989）。米国の場合、中西部の8つの州では *Bradyrhizobium japonicum* の血清型 USDA 123 の競争力が高いために優位を占めているが、この型は窒素

固定効率が低く、窒素固定効率が高くて高い菌を排除している。その株がのちに植物に害を与えることや収量を低下させることがわかった場合、この問題は悪化する可能性がある。根粒菌とマメ科植物の有害な相互作用の例として、76 あるいは *Bradyrhizobium japonicum* の血清型の多くの株が誘発する大豆の白化 (Minamisawa, 1989)、リゾビウム IHP324 株によるキマメの葉巻病、*Rhizobium tropici* B 型株によって誘発されるインゲン (*Phaseolus vulgaris*) の白化 (O'Connell & Handelsman, 1993) などがある。同様に、南部の 7 つの州では血清型 USDA 76 が優勢だが、この株はリゾビトキシンの発生率が高い (Fuhrmann, 1990)。*Rhizobium tropici* の例は、接種研究で注意すべき点を示すものである一方、この菌は高温、酸性度、高アルミニウム濃度に耐性を持ち、熱帯土壌への接種に適した種の 1 つと考えられる (Graham et al., 1982)。

### GEM の土壌中への放出

GEM に含まれる外来 DNA の存在自体は有害性を持たないが、その表現形質の発現や遺伝物質の移行性への影響が有害性を生みだすかもしれないことに留意が必要である。このため、微生物の遺伝子組換え株の放出案は、科学界内部でも一般国民の間でも大きな懸念を生じさせてきた。GEM の生残、特にその定着や次作物への持ち越し、適用区域からの移行、遺伝子組換え DNA が土着微生物に伝播する可能性、微生物が媒介する生態系プロセスやひいてはより広い生態系の機能や安定性を崩壊させる可能性などへの懸念が大きい。絶滅の危機にある種への曝露や宿主域の変化、マーカーとして抗生物質抵抗性遺伝子を用いることについても考慮がなされている。異なる種の間での遺伝子伝達 (遺伝子の水平伝達) や生態系への影響を *in situ* (原位置) で調査するための手法や方法が最近開発されており、表明されている懸念の解消に役立っている。

### 細菌における遺伝子伝達

環境中での細菌間の遺伝子伝達は、3つのメカニズムのうちの一つ以上によって起きる。接合や形質導入は、伝達中に DNA が保護されるため、環境中で生じる可能性がかなり高い。形質転換では、環境から保護されていないむき出しの DNA の取り込みが行われ、環境中で生じる可能性は比較的低い。

#### 接合

供与側と受容側の細胞同士の接触を要する疑似有性的プロセス (遺伝子のランダムな組換えは起きない) であり、グラム陽性、グラム陰性両方の細菌で広く起こる。接合の過程で、グラム陰性菌では長く柔軟な線毛または短く固い線毛によって、グラム陽性菌では

DNA の通る孔を通じて、プラスミドが一方の細胞からもう一方の細胞へと移行する。プラスミドが、性線毛の形成など接合のために必要な機能のすべてをコードしている場合、接合性プラスミドという。接合性プラスミドが他の非接合性プラスミドと同一の供与細胞にある場合、非接合性のプラスミドの伝達を媒介することもあり、このプロセスを可動化（mobilization）という。接合性プラスミドを供与染色体に組み込むことによって、染色体遺伝子の伝達に影響が及ぶ場合がある。どの程度の微生物が遺伝子伝達にかかわるかは、宿主や受容体、関係するプラスミドおよび環境要因によって左右される。

これに関連するテーマが2つある。トランスポゾンの媒介による接合では、トランスポゾン（可動性の特殊な DNA 配列）が細菌ゲノムの中でその位置を変え、プラスミドと染色体の間を移動する。トランスポゾンは、プラスミドを持つ細胞と持たない細胞の間での接合伝達能があり、遠縁の微生物間の遺伝子伝達のもっとも重要な手段だと思われる。これらは抗生物質抵抗性遺伝子に含まれていることが多い。逆伝達（retrotransfer）では、受容体が供与細胞から受け取るのと同じ頻度で、供与細胞が受容体からマーカーを受け取り、逆方向の遺伝子交換を行う。

## 形質導入

細菌には、1つの細胞に感染してその中で増殖し、その細胞を破って別の細胞に感染するバクテリオファージ（またはファージ）と呼ばれるウイルスが寄生することがある。この種のファージの生活環を、溶菌サイクルという。これとは別に、細胞に感染するが、そのDNAが宿主のゲノムに組み込まれてそれとともに複製されてからゲノムから出て宿主細胞内で増殖し、最後には細胞を破ってより感染性の高いファージを放出するタイプのファージがある。このタイプの生活環は、溶原（またはテンプレート）サイクルと呼ばれる。バクテリオファージ粒子がベクターとなって起きる細胞間の遺伝情報の伝達は、形質導入と呼ばれ、2つの種類が認められる。普遍形質導入の場合、宿主細胞内の各遺伝要素がファージベクターによって導入される確率は等しい。供与染色体の断片が成熟ファージ粒子によって取り込まれる場合、これが起きる頻度は低い。染色体遺伝子とプラスミド遺伝子の両方が形質導入される。もう1種類が特殊形質導入で、この場合は特別な遺伝要素だけが伝達する。

## 形質転換

形質転換は、細菌に取り込まれた二重鎖 DNA が、細胞のゲノムに組み込まれて複製する過程である。細胞が外来の DNA を取り込むには、非コンピテントな状態からコンピテントな（形質転換受容性の）状態に移行しなければならない。菌液の中で、DNA は細胞からランダムな溶解や個体群の一部によるコントロールを受けて放出され、同一の種に取

り込まれることもあれば、異なる種に取り込まれることもある。環境中には、崩壊中の細菌細胞から出たり（非意図的または受動的放出）、生体細胞から放出される（意図的または能動的放出）自由な DNA が存在する（Stewart et al., 1983）。土壌中の自由な DNA による遺伝子の伝達は、機能を持つ染色体 DNA やプラスミド DNA の放出、放出された DNA の定着、受容体となる細胞がコンピテントになること、自由なあるいは粒子を伴った DNA の取り込み、そして DNA の伝達という多段階のプロセスを経て、新たに獲得された形質が発現すると考えられる。取り込みと発現ののち、外来 DNA は、接合やファージの攻撃による形質導入、自己溶菌による形質転換によって他の細菌に伝達する場合がある。

### 細菌内の遺伝子伝達に影響を与える要因と土壌中の根粒菌間で遺伝子伝達が起こっている証拠

土壌中の細菌の間で遺伝子の水平伝達が起きているのはたしかだが（Stotzky, 1989）、野外土壌の組成はきわめて変わりやすく、不規則な気候の変化にさらされているため、研究が困難である。このため、遺伝子の伝達（GEM の環境中への放出に制約を与えるものでもある）に環境因子が与える影響を研究するのに、主に土壌マイクロコズム（モデル生態系）などのモデル系を使った実験研究が行われてきた。GEM から土着の微生物への遺伝物質の伝達が、基質濃度や個体群密度の条件が現実的な自然環境のもとで（データが予測値として意味をもつためには不可欠である）研究されるようになったのは、ごく近年のことである。

当初、遺伝子組換え細菌の環境中への偶発的放出による危険性としては、細胞間の遺伝情報の伝達手段としての接合に注目が向けられたが、それは、プラスミドが同定されている細菌の多様性が、この現象が広く起こっていることを示していたためである。土壌環境は、微生物群集の密度と活性を維持しているため（多くは一時的なものであっても）、細胞同士の接触はいつでも起こりうるが、侵入排除、宿主と外来プラスミドの不和合性、供与 DNA の侵入を認識して妨げる制限修飾系などが、伝達を防ぐバリアとして働く可能性がある。接合には、供与体と受容体双方の代謝状態が高いことが必要で、土壌中では生育基質が乏しいために代謝状態が低いことが多いが、根圏や根の表面ではそれが高い場合がある。

初期の研究では、土壌中でのプラスミドの伝達頻度を明らかにするのにモデル系や無菌土壌が用いられた。これによって、一般的な土壌細菌の同一種の株の間や（Weinberg & Stotzky, 1972; Graham & Istock, 1978）、一般的な土壌細菌と *Rhizobium fredii* の間で（Richaume et al., 1989）プラスミドの交換が行われることがあることがわかった。粘土、有機質、土壌 pH、温度のすべてが伝達頻度に影響を与えていた（Richaume et al., 1989）。無殺菌の土壌での研究では、エンドウのプラスミドである pJB5JI と生育の速い根粒菌株の間の伝達や（Kinkle & Schmidt, 1991）*Bradyrhizobium japonicum* からブラディリゾ

ビウム属の複数の株への r68.45 プラスミドの伝達が認められた (Kinkle et al., 1993)。しかし、pJP4 プラスミドでは、ブラディリゾビウム属の 2 つの株にしか伝達せず、一定の特異性が見られた。接合による土壌中での遺伝子伝達は、生理学的バリア、環境バリアが数多くあるにもかかわらず、たしかに起こることが証明されている。

根粒内で DNA の伝達が起こっているかどうかは、明らかでない。無菌系では、エンドウ根粒内の根粒菌 (Johnston & Beringer, 1975) とアルファルファ根粒内の *Rhizobium meliloti* (Pretorius-Gruth et al., 1990) でプラスミドの伝達が見られた。無殺菌土壌では、Kinkle et al. (1993) によって大豆根粒内のブラディリゾビウム属根粒菌の接合伝達体 (transconjugant) が見出されたが、どちらの親株も存在しなかったことから、接合伝達体によって無性の根粒がコロニーを形成し、土壌中の根圏ないし根表面で接合が起こったと考えられる。有機体の添加や植物根の存在によって、プラスミドの伝達は促進された (Kinkle & Schmidt, 1991; Kinkle et al., 1993)。

形質導入は、環境面で重要な細菌やバクテリオファージの多くで起こり、一部の種では染色体 DNA やプラスミド DNA の伝達の主要なメカニズムであると考えられる (Novick et al., 1986)。形質導入による DNA の伝達は、土壌中のグラム陰性菌の間で起きるが (Germida & Khachatourians, 1988; Zeph et al., 1988) もっとも研究されている大腸菌の場合、遺伝子の伝達は低い頻度でしか起こらない。ただし、大部分のファージでは宿主域がきわめて狭く、遺伝子拡散のベクターとしてはたらく可能性は限られている (Reaney et al., 1983)。バクテリオファージは根粒菌の主なグループのすべてから単離されており (Staniewski, 1987) *in vitro* で遺伝子交換のベクターとしてはたらく可能性が示されている。普遍形質導入は *Rhizobium meliloti*、*R. leguminosarum*、*Bradyrhizobium japonicum* のいくつかのファージで起き、特殊形質導入は *R. meliloti* のファージで起きるが、すべて溶原 (テンプレート) サイクルで増殖する (Sik et al., 1980; Buchanan-Wollaston, 1979; Shah et al., 1981; Svab et al., 1987)。溶原サイクルでの増殖は根粒菌の一部や *Bradyrhizobium japonicum* でも見出されているため (Abebe et al., 1992)、形質導入によって異なる根粒菌の間で遺伝情報の伝達が起こっている可能性は大きい。

現在までのところ、土壌中での根粒菌間の形質転換は認められていないものの、それが起こる可能性は存在する。土壌マイクロコズム (純粋な砂または砂 - 粘土のモデル、または自然土壌) を使った研究では、土壌中で形質転換が起こりうることを示されている。*Pseudomonas stutzeri* や *Acinetobacter calcoaceticus* は、土壌抽出物中で高い頻度で形質転換を起こすと考えられ (Lorenz & Wackernagel, 1991; Lorenz et al., 1992)、*Bacillus subtilis* は、ミネラルに関与する DNA を取り込むことができる (Lorenz & Wackernagel, 1991)。土壌や表土は、DNA を粘土粒子と結合させたり、ヌクレアーゼによる分解から保護して DNA を保護し、それによって形質転換が自然に起こる微生物環境が形成されたり、DNA の取り込みの可能性が高まっていると考えられる (Greaves & Wilson, 1970)。細菌

種の多くは、土壤中で DNA を取り込むための自然の受容能を発達させており (Lorenz & Wackernagel, 1988)、プラスミド DNA は十分に長期間定着して、コンピテントな受容細胞によって取り込まれることができる (Romanowski et al., 1992)。土壤中には、DNA の絶え間ない生産と放出によって細胞外の遺伝子プールができており、細菌によるサンプリングが可能になっている。土壤中での細菌間の形質転換も起こりうるが (Stotzky, 1989)、データが不足しているため、細菌による遺伝子の取り込みや発現の可能性を予測するのは困難になっている。細胞密度が低いと、土壤中での形質転換の可能性はさらに低くなると考えられる。

土壤微生物群集のメンバーの間では、これら 3 つのプロセスのすべてが同時進行していると考えられる。土壤生態系の中で遠縁の微生物が遺伝子交換を行う可能性があるかどうかは、次のプロセスに依存する。つまり、挿入 (宿主細胞で起こりうる外来 DNA の制限または修飾)、宿主ゲノムへの取り込み、遺伝子の定着と発現、である。これは、同一種のクローン間のほうが、遠縁の微生物間でよりも頻繁に起こる可能性が高い。伝達の成功に影響を与える要因として、細胞密度、ファージの数、有効な DNA の濃度、ヌクレアーゼの活性、温度、密度、栄養状態、宿主の生理学的状態などがある。理屈の上では、遺伝学的な障壁を超えるように実験室で操作された微生物は、野外で他の微生物に遺伝子を伝達する可能性があるが、自然界での伝達は稀であり、文献的にもあまりみられない。

土壤微生物の多くは、人工培地上ではストレスや休眠のために培養することができなかつたり、まだ培養の実績がないという問題は、いまだに解決されていない。飢餓条件下では、細菌はごく小さな生きた細胞 (超微小細胞) を作るができるが、この細胞を標準培地での培養によって検証することはできない (Colwell et al., 1985; Roszak & Colwell, 1987)。実際、培養不可能な微生物群集の一部には、大きな遺伝的多様性が存在すると推定されている。こうした微生物群が、特定の組換え遺伝子が逃げ込む受け皿になり、特殊な遺伝子プローブを用いれば認識できるが、従来の培養法では認識できないものになる可能性がある。

### 土壤中での根粒菌の定着 生態学的検討

導入された生物が定着するか、改変の過程で組み込まれた遺伝物質が定着することで、遺伝子伝達の結果生じた新たな遺伝子の組み合わせが定着したとみなされる。土壤中には複雑な土着の微生物叢があるため、微生物が土着の微生物と競合してコロニーを形成するには、基質をいち早く利用したり、最大成長率を高めたり、抗生物質を産生するといった有利な形質が必要になると考えられる。自然の DNA の場合でも組換え DNA の場合でも、細菌群集において生存、定着、複製、繁殖するかどうかは、宿主とその遺伝子型 (競合性、基質利用性、環境域、宿主域)、新たな遺伝子と細胞の表現型に及ぼす影響、伝達の頻度、変異性、細胞の環境によって生じる選択圧など、多くの要因に左右される。新たな組み合

わせのうち定着する可能性があるのは、土着の遺伝子型に比べて適応度<sup>1</sup>が高いものだけである。一部には実験室内で高い適応度<sup>1</sup>を示すものもあるが（Hartl et al., 1983; Edlin et al., 1984）ほとんどのGEMは、付け加えられた機能の保持や発現にかかわる代謝的負荷のために不利な条件にある。しかし、たとえば環境毒素の存在下での生存性を向上させたり、基質を代謝する能力を向上させることによって適応度を変化させれば、改変によって定着能を向上させられる可能性がある。GEMの定着性や、ゲノムの安定性や発現に影響を及ぼす環境要因には、土壌型、栄養分や湿度、pH、温度、阻害性の化学物質、捕食・競合といった生物学的要因がある（Stotzky & Babich, 1984）。長く定着している微生物群集は、外来の微生物の侵入に抵抗するため（Liang et al., 1982）、植物の根圏のような環境で増殖が起こる可能性は低く、密度や多様性がより低い環境のほうが可能性が高い。

土壌中に存在するリゾビウム属の種はほとんど活動しておらず、貧栄養状態の不利な環境で単に生存しているだけと考えられている。これらの菌類が植物の根と相互作用すると、栄養が豊富で、鞭毛虫などの真核生物による捕食やウイルスや他の細菌による攻撃から保護される環境に入ることになる。このため、特定のニッチ（根粒）を占拠することによって、競争に直面しながらも生き延びる力が向上し、その結果、外来の根粒菌は、いったん土壌に導入されるときわめて安定であることが多い（Brunel et al., 1988）。土壌中に導入された根粒菌の生存を向上させる環境要因には、植物の根圏、粘土含有量、温度、接種数などがあり、生存を低下させる要因としては、捕食や水分の上昇がある（Wellington et al., 1993）。

自然選択は、孤立しているが遺伝的に進んだ群集に有利に働くため、既存の群衆内で新たな表現型（そして遺伝子型）が定着する可能性は高まる。しかし、単なる遺伝的な変化は、細菌が他の微生物群集のメンバーとの競争に直面した場合、これを弱らせることもある。こうした問題があるにもかかわらず、プラスミドやトランスポゾン、染色体の組換えによるDNAの導入あるいはDNAの削除は、土壌マイクロコズムの根粒菌の生存に対して一定した影響は無いことがわかっている（Wellington et al., 1993）。

## 根粒菌の伝播と拡散

根粒菌は、その利用の最中に、土壌からの浸出、表面の水や粒子中での流出、風による拡散、動物や人、機械による輸送によって、区画外に広がる可能性がある。実際には、大部分の土壌微生物は土壌粒子としっかり結合しているため、輸送はきわめて限定的であることが多い。昆虫による拡散を管理するのは、野外環境では難しいと考えられるが、野外試験の規模が小さいため、往々にして見過ごされている。しかし、蛍光性シュードモナス（*Pseudomonas*）属の野生型と組換え株は、栽培時の種子への接種後、葉の組織上や草食

---

<sup>1</sup> ここでの「適応度」とは、生態学的な意味で、「他の生物との競争の中で生残・定着する能力」をいう。

昆虫内で検出されており ( Klüpfel & Tonkyn, 1990 )、ベクターによる拡散が重要であることを示している。

### 菌根菌における遺伝子伝達と拡散

遺伝情報の拡散は、栄養生長、胞子の散布、菌系の接合を通じて起こりうる。外生菌根菌や VAM 菌の菌糸は、宿主植物に限定されず、周辺の土壌中に伸びて近傍の他の植物に感染することもある。このプロセスは、植物がそれぞれの根の間にある菌糸の網の目によってつながるまで数回、場合によっては繰り返し行われることがある。外生菌根菌によって形成される菌糸のネットワークを通じて、糖質が植物から植物に移動することがある ( Read et al., 1985 )。菌糸が成長する過程で新たな核が形成される場合、遺伝子は宿主植物によって覆われる部分全体、さらには周辺の土壌に広がることになる。

外生菌根を形成する多くの担子菌の菌糸は、吻合と呼ばれるプロセスによってたがいに融合し、複雑な網の目を形成する。土壌中では、和合性の菌糸が出会い、細胞壁が崩れて融合し、それぞれの原形質と細胞小器官が混ざりあって、一方の菌糸体からもう一方への遺伝子の伝達起きる。しかし、ある種のなかで吻合が起こるのは一部の菌糸体だけである。一部は不和合性の反応を示すため、こうした菌類では吻合の際のグループが形成されることになり、これが同定に役立つ場合がある ( 植物病原菌のリゾクトニア ( *Rhizoctonia* ) の場合など )。他の担子菌では吻合のグループがあまり知られておらず、遺伝子組換え菌根菌の放出が検討される前には、十分な研究を行う必要がある。

外生菌根菌は、地面の上に子実体を形成し、そこから空気の流れや昆虫への付着によって胞子が拡散する。子実体は、各種の動物 ( 哺乳動物、軟体動物および人間 ) に食べられる可能性もある。子囊菌の菌根の一部は地下に子実体を形成し ( トリュフ )、それを摂食する動物への誘因物質として作用する揮発性の化学物質を産生するが、この動物が菌類を掘り起こして摂食し、菌類の胞子が動物の糞中に拡散する。遺伝子は、子囊菌や担子菌の子実体がもともとあった場所から遠く離れたところに拡散する可能性があり、胞子が溶解や損傷したのち、形質導入によって動物の腸内細菌に組み込まれる可能性もある。

VAM 菌の場合、吻合や風によって拡散する有性胞子の形成は起こらず、土壌中や根組織中に厚膜胞子を形成するだけである。これらの厚膜胞子が地表にきた場合は風によって拡散する可能性があるが、頻繁に見つかっているのは拡散をもたらす齧歯類の腸内である ( Silver-Dowding, 1955 )。VAM 菌の菌糸も細菌や細菌様生物を含み ( Scannerini & Bonifante, 1991 )、その厚膜胞子には土壌中に生息するツボカビ綱菌類のいくつかの種が寄生するが ( Paulitz & Linderman, 1991 )、こうした微生物に遺伝子が伝達するかどうかはわかっていない。

### 菌根菌の土壌中での定着

菌根菌は、休眠孢子として、植物組織内の菌糸体として（特に樹木の場合）土壌中の菌糸として、そして菌核（菌糸の集合体で耐性がある）として長い期間定着することができる。これらは、土壌中で菌糸が成長したのち、接種区画から離れた場所で形成される可能性があり、遺伝子組換え菌根菌が広く拡散することになる。

### 遺伝子組換え根粒菌・菌根菌が生態系プロセスに与える影響

導入された組換え根粒菌が土壌中で大規模に増殖する力を持っていると、その場所の窒素循環を乱す可能性がある。根粒菌が窒素循環に及ぼす影響についてはデータがないものの、土壌涵流システムに導入された5例のGEMの効果を見ると、4例でアンモニア化成や硝化作用、脱窒素作用への影響や、これらのプロセスを担う微生物群の個体群動態への影響はみられなかった（Jones et al., 1991）。1例のGEM、つまりプラスミドを運ぶ *Enterobacter cloacae* の菌株だけは、対照の非改変の宿主と比較して硝化作用とNO<sub>3</sub>が若干低くなったが、生態学的に大きな影響を持つほどの大きな変化ではないと考えられる。

組換え根粒菌と標的外の宿主が共生することによって適応度<sup>1</sup>が向上し、土着の植物が追いやられることになる可能性もある。同様に、組換えによる遺伝子型が、ある外生菌根菌に競争優位を与えるとすれば、それと共生する植物が、他の菌根を形成する種や形成しない種に対する競争優位を獲得し、それらを排除することもありうる。その遺伝子型は、土壌中での拡散を受けて、自らの能力を向上させる別の菌根形成種に共生する能力を持つ可能性や、以前は菌根を形成しなかった植物の菌根形成を誘発する可能性もある。残念ながら、土着の菌根菌あるいは土着や組換えの根粒菌の放出後の研究は、大部分が植物群落の組成の変化を測定しておらず、宿主の活力への影響はわかっていない。この分野の研究には大きな関心が持たれるべきである。

### 潜在リスクを軽減する手段

リスクの軽減は、汚染除去手段、環境中での遺伝子調節、環境中での遺伝子伝達の防止、不能化による封じ込め、環境中での拡散のモニタリングなどによって実現することができる。導入計画には、試験区画周辺で放出微生物をモニタリングするための適切な方法を含まなければならない。モニタリングによって、その微生物の有効性、生残、伝播、遺伝的安定性に関するデータが得られ、不測の拡散や生物学的影響を発見することができる。

### 汚染除去

---

<sup>1</sup> ここでの「適応度」とは、生態学的な意味で、「他の生物との競争の中で生残・定着する能力」をいう。

第1次試験のために GEM が放出されている封じ込め環境の汚染除去は、高圧蒸気殺菌（オートクレーブ）や消毒剤の使用によって実現することができる。しかし、野外の区画は外来要因の多い環境であり、作物や共生生物に悪影響を及ぼす可能性があるため、こうした方法は、試験の終了時にも緊急時にも用いることができない。その代わりに、野外区画での汚染除去法は、野外区画に放出される植物病原体の管理を目的として開発された方法に基づいて行われてきた。これらの方法では主に、作物残渣の焼却、土壌の耕耘や除去、オートクレーブ処理、また殺生物剤の使用などが行われる（Smitley & McCarter, 1982; National Research Council, 1989）。いくつかの方法が提案されてきたが、試験が行われて十分に評価されているものはごくわずかしかない。従来の植物病害防除法では、放出された GEM が十分に管理できず、土着の微生物に悪影響を及ぼす場合もあるという結果が出ており（Donegan et al., 1992）、野外区画では、より効果的で選択的な防除法の開発が必要であることを示している。

## 遺伝子構築

細菌内では遺伝子の交換が現実起きるため、伝達の可能性を最小限に抑える遺伝子の組み合わせを用いることが望ましい。一般に、遺伝子は、標的微生物の染色体上に導入するか、非接合性かつ可動化されないプラスミド（固有または導入されたもの）上に導入すべきである。

## 環境による遺伝子調節

遺伝子は、環境中で意図される機能にもっとも適した誘導刺激に反応するプロモーターによって制御することができる。リゾビウムの場合、根の浸出液中に存在するフラボノイドなど、植物の二次代謝産物を加えることによって、遺伝子の発現を誘発することができる（Firmin et al., 1986）。このため、根粒菌は、マメ科植物の根があるところだけで遺伝子を発現する。

## 環境中での遺伝子伝達の防止

細菌の場合、自己伝達に必要な遺伝子の削除、自己伝達能がなく可動化されにくい小さなプラスミドをクローニングベクターに用いること、新たな遺伝物質を細菌の染色体に配置することによって、遺伝子の伝達を防止することができる。放出されるリゾビウムが土壌生態系内の土着の個体群との競争に打ち勝って望ましい機能を果たすには、短期間は生残していることが不可欠である。しかし、意図された実用期間を超えて定着する場合には、自殺遺伝子などによる封じ込めが必要な場合もある（Molin et al., 1987）。

自然条件における菌根菌の遺伝子伝達の防除法を考案するには事前に多くの調査が必要になる。VAM 菌間で遺伝子が伝達する可能性は低いものの、外生および内生の菌根を形成する種の間での伝達の可能性は大きいかもしれない。菌糸の吻合や、担子胞子や子嚢胞子の形成が起これないようにするために、遺伝子組換え菌根菌は不能化する必要がある。宿主特異性を持つように菌株を改変することによって、標的以外の植物宿主への伝播は起これなくなる。

### 放出後の GEM の生残によるリスクの軽減

リゾビウム属の在来や土着の菌株はすべて温帯土壌で生存することができるが、植物の生育を伸ばすために生存を確保することのほうが重要であるため、生残性を抑える試みはほとんど行われていない。放出される微生物が与えられた役割を実現するためには、一定期間生残することが不可欠であることがほとんどだが、意図的に放出した GEM が環境中に長期間生残するのは望ましくない。このため、偶発的な放出が起きた場合に、生残しないようにするための予防措置が開発計画に組み込まれていなければならない。

農業目的で放出される微生物を完全に物理的に封じ込めるというのは事実上不可能であり、生残性が低い、増殖能の低い、予測される環境の変化（季節による寒暖）への抵抗性が低い、あるいは目的である特定の機能を失いやすい菌株が選ばれている。追加的な栄養要求を組み込むことも可能である。低温感受性や高温感受性あるいは有害物質の蓄積に反応する致死遺伝子を、ゲノムや用いる細菌株による根粒の形成を抑える植物の遺伝子型に組み込むことが可能だが、これによって効果を発揮しないうちに菌株が死滅してしまうこともありうる。

一定の環境条件のもとで活性化し、細胞に死をもたらす致死遺伝子（自殺遺伝子）を組み込むことによって、細胞が複製できないようにすることが可能である。致死遺伝子の活性化の時期は研究者が決めることができ、*in vitro* の宿主細菌間ですばやく伝達させることができる。このほか、防衛遺伝子の発現のレベル、時期の変化や、これが発現しない場合に有効になる遺伝子を使うこともできる。例として、バクテリオシンや制限酵素エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子や、R1 プラスミドにあって細菌細胞を幅広く死に追いやる *hok*（宿主致死遺伝子）などプラスミドによってコードされる致死遺伝子がある（Molin et al., 1987）。自殺因子を持つこのほかのプラスミドとして、毒素分解活性が最大の時には有毒物質の存在下で生存できるが、活性がない場合は代謝的負荷を課し、その微生物を競争上不利にするものがある。致死遺伝子によって GEM を制御することのデメリットは、それによって組換え DNA が一時的に形質導入可能な状態になるかもしれないことである。しかし土壌中での分解速度は速く（Greaves & Wilson, 1970）、分解した DNA の残存期間は非常に短いため、野外条件でこうしたことが起きる可能性は低いと考えられる。

これまでの実績では、現在までに用いられたコンストラクトのすべてで、細菌個体群の死滅が不完全だった (Cuskey, 1992)。内部のプラスミドがなくなって (切り取られて) いたり、突然変異や組換えによるプラスミドが条件による表現型を与えなくなっているものが生残菌として単離されており、致死遺伝子の利用を無条件に推奨するには、事前にさらに研究が必要であることを示している。

菌根菌にも同様に自殺遺伝子を導入することが可能で、細菌など他の生物由来の遺伝子をクローニングすることができると考えられるが、いまのところ何もわかっていない。VAM 菌の場合は、厚膜胞子を形成しないように改変することができると思われる。

## 導入微生物の検出

導入された GEM のリスク管理に不可欠な要件の 1 つとして、圃場接種試験で放出された土壌細菌の検出と計数に大きな重点が置かれてきた。その結果、土壌中の細菌の消長を調査する方法の開発には多くの関心が集まってきた。従来の方法では、選択培養法や蛍光抗体法が主流だったが、これらの方法は、GEM の検出や計数には感度が充分でない。土壌中にきわめて低濃度で放出された微生物の検出法や、原位置 (in situ) での検出法に重点が置かれるようになっている。

細菌の検出や同定は、クローニングしたマーカー遺伝子を利用して行うことができる。こうした遺伝子は、正常な発現や安定的な遺伝を示し、菌株の生残性への影響や土壌生態系の他の生物への伝達能があってはならず、植物の生育に影響を及ぼしてはならない。抗生物質抵抗性や重金属耐性を持つ遺伝子、生物発光 (原核生物の *luxA*、*luxB* 遺伝子や真核生物の *luc* 遺伝子)、赤色素 (プロジギオシン)、カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ (*xyIE* 遺伝子)、ポリガラクトツロナーゼ (*pglA* 遺伝子) の産生に関与する遺伝子や、発色性の - ガラクトシダーゼの *lacZ* 遺伝子や *lacY* 遺伝子は、宿主、受容体、接合伝体内でクローニングすることができる。抗生物質抵抗性遺伝子は、宿主に大きな代謝的負荷を引き起こすことが多く (Lee and Edlin, 1985)、抗生物質抵抗性の微生物の増殖を招く可能性があるため、マーカーとして用いるのは避けるのが望ましい。しかし、複数の抗生物質に抵抗性を持つ細菌はもともとの環境に多く存在することから、警戒は行き過ぎである可能性も示唆される。

外生菌根菌の検出では、通常、実験室での単離と寒天培地上での培養ののち、子実体の形成や既知の試験菌株との反応が起きるかを調べる。VAM 菌は絶対共生菌であるため、検出法には感染した根の検査も含まれる。ほとんどの検査法では、トリパンブルー、クロラゾール E またはフクシンで根を透徹・染色するため、菌類の菌糸は死滅してしまうが (Phillips & Hayman, 1970)、樹枝状体の自己蛍光や細胞蛍光分析法 (Bianciotto & Bonfante, 1992)、菌類が持つアルカリフォスファターゼの組織化学染色法だと、in situ で検出できる可能性が高い (Tisserant et al., 1993)。外生菌根菌でも VAM 菌でも、検出

には特殊な遺伝子プローブの利用が大いに有用である。

土壤微生物のうち培養が可能なのはごく一部であるため、自然環境のもとで隠れている微生物の特定の遺伝子や定着している組換え遺伝子を検出するには、直接抽出したDNAの分析が有効である。通常、土壌からのDNAの抽出が必要になるが、他の技術はin situで用いることができる。現在利用できる技術の例として、形質転換試験、免疫学的手法、染色体やプラスミドに挿入された合成オリゴヌクレオチド配列と相同性を持つ特異的DNAプローブまたはRNAプローブの他 (Holben et al., 1988; Hahn et al., 1989)、蛍光標識 (Hahn et al., 1992) やPCR法 (Steffan & Atlas, 1988) もin situで用いることができるが (Tebbe & Vahjen, 1993)、阻害物質となるフミン酸を除去しなければならない。*Rhizobium meliloti*をmini-Tn5 をベクターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子で非放射性標識することによって、生育率や標識株と野生型株のなかでの生残に影響を与えずに、平板当たり  $10^5$ CFU以上の株がある中から*R. meliloti*を検出することができた。この方法は、細胞の生物体量の定量にも利用できる (Cebolla, et al., 1993)。Yang et al. (1991) は、インゲン根粒内のリゾビウムのRNAの位置を特定し、植物組織における位置の特定法を示した。

微生物群集や土壌型、水分はきわめて多様であり、微生物と宿主が生育期に活発な相互作用を行うことは、環境上のリスクを予測する際に野外データが重要であることを示している。こうした分子的手法は、圃場区画からの細菌の伝播をモニタリングするのにも使うことができる。微生物の伝播や拡散の予測には数理モデルも有効であり、消長・輸送 (fate and transport) モデル (Corapcioglu & Haridas, 1984; Strauss & Levin, 1991) やマルチメディア・モデル (MICROBE-SCREEN など) が、大気や地表水、土壌に放出された微生物の拡散や消長を評価するために開発されている。消長・輸送モデルと用量 - 反応モデルとの組み合わせ、あるいは宿主個体群の性質に重点を置いた感染モデル (epidemic model) も、GEM の放出による環境リスクの予備評価に有用である (Teng & Yuen, 1991)。鳥類、昆虫類、他の植物への伝播が調査されることはほとんどなく、さらなる研究が必要である。

## 野外試験

生態系への潜在的影響が大きい場合のリスク評価には小規模野外試験が有益だが、試験規模が小さいために包括的リスク評価 (鳥類、昆虫類、哺乳類への移行など) ができないという口実も使われてきた。野外放出によって、見逃されたり誤って分析された結果が明らかになる可能性もありうる。

## 今後の傾向

環境中での組換え微生物の消長や影響に関する知識が不足しているため、遺伝子工学の進歩によって得られる恩恵はなかなか表に現れてこない。これは、基本的な微生物生態学への研究資金提供が世界的に不足していることの直接的な結果である。しかし、現在では、分子生物学を基礎とする先端手法が、根粒菌間の種内および種間での遺伝子交換の推定や、土壌中のきわめて少数の微生物の検出、土壌中での微生物の伝播の追跡やモニタリング、その環境への影響の評価に利用されている。

リスク評価を必要とする根粒菌の放出に関しては、土着、組換えともに、現在は定量的なデータがある場合が多い。リゾビウム属では、野外試験の環境中で接合や形質転換あるいは形質導入による土着個体群への遺伝子伝達が見られたという報告は現在までのところない。したがって、伝播、遺伝子交換、栄養循環の破壊に関して以前から懸念されていたことの多くは沈静化している。膨大な数の商業目的によるマメ科植物用の接種材料がほぼ1世紀にわたって、環境に悪影響を及ぼすことなく土壌中に添加されてきたことから、これは意外なことではない。

あまり知られていないフランキア属 (*Frankia*) の細菌は、リゾビウムよりも広い宿主植物と共生することができ、ハンノキやソリチャ属 (*Ceanothus*) といったものも対象とするほど幅広いため、窒素固定のためのパートナーとして大きな関心を集めている。フランキアを、栽植密度を高めることが可能な針葉樹など、通常の宿主域以外の植物に感染するように改変するのは比較的容易だと思われる。

遺伝子工学は、窒素固定細菌を特定の作物に合わせて改良する際の精度を大幅に向上させ、これまでより慎重に性質決定したより安全な製品を生み出すことができる。GEM の放出を伴う利用の大部分では、GEM がその機能を終えた後に消失したり自然破壊する必要がある。これに対して、窒素固定研究の最終目標の1つは、土着の土壌細菌との激しい競争を克服して、土壌中の微生物群内に定着する窒素固定細菌を作出することである。規制の枠組みでは、定着がデメリットではなく必要条件であるとの考え方がなく、こうした捉え方への注目が必要である。

改変による菌根菌の改良の可能性ははかりしれず (Hirsch, 1984)、キャッサバ (Pistorius & Verschuur, 1989)、マツやユーカリノキ (Swart & Theron, 1990) などに及ぶ多様な作物に対応するものが提案されてきた。しかし、菌根菌に関する研究のほとんどは、栄養循環や作物改良に重点が置かれている。このため、菌根菌が野外の他の菌類と遺伝物質を交換する能力、他の菌類や他の土壌微生物との相互作用、土着および導入された菌根菌の伝播、そして環境中での生残や定着に関するデータが不足している。土壌中での検出法は、根粒菌と比べるとまだ開発の初期段階だが、DNAプローブなど菌根菌の検出に適していると考えられるものもある。GEM の放出によるリスクを評価する際にはこうしたデータが不可欠であるため、これまで遺伝子組換え菌根菌の放出は行われておらず、規制の枠組みがよく整った国では、相当な基礎研究が行われるまでは放出が行われる可能性は低い。細菌に用いられる方法は試行段階であり、その原理は菌根菌に応用できる。

これとは反対に、内生菌根菌は、特にランの種子への接種として実験室で利用される可能性が高い。寄生されることなく実生が定着できるように改変した菌を導入することは比較的容易である。菌から植物への遺伝子の伝達（起こるとすれば）はモニタリングすることができ、その植物の放出（販売または環境への再導入）前の菌の定着は試験することができる。

## 今後の放出と規制

環境への悪影響がないことを示すおびただしい数の過去の事例を無視した不合理な懸念は、無視すべきである。これまでの事例によって、先進国における現在のリスク評価法や規制の枠組みが間違っていないことが明らかになっており、国民の間にある懸念を緩和するのに大いに役立ってきた。しかし、GEM を安全に作出することができるという科学的な確証が強まっているにもかかわらず、国民の懸念は依然根強い。科学者と国民とでは危害についての認識に違いがあるため、リスク評価だけでは国民の受容の問題を解決することはできない。研究が幅広く受け入れられるためには、科学者たちはバイオテクノロジーが社会・経済システムに与える影響を考慮しなければならない。

## 規制と国民の懸念

リスク評価のためにどのような規制の枠組みを選択するかは、リスク評価のために必要なデータの種類、ひいては申請が認められるために必要なデータの種類の影響を及ぼす。ある技術の初期におけるリスク分析で重要なのは、前例としての価値、つまり今後のリスク分析がそれに基づいて行われるのが一般的であるという点である。1980年代初めに、カリフォルニア州で、遺伝子組換えによって氷核活性を低めた細菌（*Ina<sup>-</sup>*）の放出案に関するリスク評価を米国環境保護庁（USEPA）が初めて行って以来、多くの経験が得られている。現在、リスク評価が必要な導入案に対しては、定量的なデータ、スクリーニング基準、論理的な推論が適用できるようになっている。伝染の可能性は低いものの、仮にそれが起きれば、国民の信頼は低下し、疑念が大きくなるものとなる。そのため、可能性としてはきわめて稀なリスクに対処するための法的、財政的そして緊急時の対応策を盛り込むことが重要である。規制の枠組みは、その根拠をリスク評価に置くべきであり、国民の議論や試験地域の選定に関する情報を盛り込むべきだが、商業上の配慮からこれが妨げられる可能性もある。

## GEM 放出に関する国際的な規制

GEM 研究の規制のための政策は、北米（米国およびカナダ）、欧州（特に EU 諸国）、

オーストラリアで特によく整備されている。これは、これらの国々の歴史的な科学基盤や、こうした技術が比較的豊かな国で急速に発展したことによる。開発戦略では、限りある資源をもっとも合理的に利用するようにしなければならないと同時に、製品が安全に消費者に届くようにしなければならない。途上国でのバイオテクノロジー規制の整備にまつわる複雑な状況の背景にはいくつかの要因があり、バイオテクノロジーの研究や試験にかかわる機関が多岐にわたっていること(国際農業研究センターや、世界銀行、米国国際開発局、EU、国連食糧農業機関、国連工業開発機関などの資金提供機関など)、途上国の政府や研究機関、民間企業や各種の環境団体などが挙げられる。規制の枠組みや資金の不足、意思決定能力への信頼の欠如、国際機関との連携の不足、リスク評価のための資金や技術的な専門知識の不足、さらには規制によって科学的な発展が抑えられるのではないかという懸念が一体となって、信頼できる規制政策の立案の妨げとなっている(Cohen & Chambers, 1991)。規制のための社会資本がなかったり整備されていない場合や、資金的な制約のために行使されていない場合もある。国民との協議が実施できなかったり、データを収集したり環境への影響を評価するための手段がない場合もある。このため、国の規制体系が整わないままに承認が与えられている(Cohen & Chambers, 1991)。その結果、援助国は、受け入れ国が支援する遺伝子工学関連研究が、その国の健康や環境の保護のための基準を満たす条件の下で行われ、規制当局の認可を受けることを主張している。それぞれの生態系によって性質がまったく違い、未知の挙動があるため、受け入れ国での野外試験はおいそれと行うことはできない。しかし、バイオテクノロジーに進出している途上国は、導入時のコストを負担することなく、先進国の経験や専門知識から多大な恩恵を受けることができる。

## 参考文献

- Abebe, H.M., Sadowsky, M.J., Kinkle, B.K. & Schnidt, E.L. (1992) Lysogeny in *Bredyrhizobium japonicum* and its effect on soybean nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3360-3366.
- Allen, E.B. (1989) The restoration of disturbed arid landscapes with special reference to mycorrhizal fungi. *J. Arid Environ.*, 17, 279-286.
- Barea, J.M., Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C. (1992) Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in nitrogen-fixing systems. *Methods Microbiol.*, 24, 319-416.
- Barret, V., Lamke, P.A. & Dixon, R.K. (1989) Protoplast formation from selected species of ectomycorrhizal fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 381-387.
- Barret, V., Dixon, R.K. & Lamke, P.A. (1990) Genetic transformation of a mycorrhizal fungus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 313-316
- Batzli, J.McC., Graves, W.R. & van Berkum, P. (1992) Diversity among rhizobia

- effective with *Robinia pseudoacacia*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2137-2143.
- Bécard, G., Douds, D.D. & Pfeffer, P.E. (1992) Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in the presence of CO<sub>2</sub> and flavonols. *Appl Environ. Microbiol.*, 58, 821-825.
- Bethlenfalvy, G.J. (1992a) Mycorrhizae and crop productivity. In: *Mycorrhizae in Sustainable Agriculture*, Bethlenfalvy, G.J. & Lindeman, R.G. (eds.), pp. 1-27. American Society of Agronomy Special Publication No. 54. ASA Publications, Madison, USA.
- Bethlenfalvy, G.J. (1992b) Mycorrhizae in the agricultural plant-soil system *Symbiosis*, 14, 413-425.
- Bianciotto, V. & Bonfante, P. (1992) Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycol. Res.*, 96, 1071-1076.
- Brunel, B., Cleyet-Marel, J.C., Normand, P. & Bardin, R. (1988) Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2636-2642.
- Buchanan-Wollaston, V. (1979) Generalized transduction in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 112, 135-142.
- Catroux, G. & Armarger, N. (1992) Rhizobia as soil inoculants in agriculture. In: *Release of Genetically Engineered and Other Microorganisms*, Fry, J.C. & Day M.J. (eds.), pp. 1-13. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Cebolla A., Ruiz-Berraquero, F. & Palomares, A.J. (1993) Stable tagging of *Rhizobium meliloti* with the firefly luciferase gene for environmental monitoring. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2511-2519.
- Cohen, J.I. & Chambers, J.A. (1991) Biotechnology and biosafety: perspective of an international donor agency. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M. & Strauss, S. (eds.), pp. 378-392. McGraw-Hill Inc., New York.
- Colwell, R.R., Brayton, P.R., Grimes, D.J., Roszak, D.B., Huq, S.A. & Palmer, L.M. (1985) Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology*, 3, 817-820.
- Corapcioglu, M.Y. & Haridas, A. (1984) Microbial transport in soils and ground-water: a numerical model. *Adv. Water Res.*, 8, 188-200.
- Cuskey, S.M. (1992) Lethal genes in biological containment of released microorganisms. In: *Release of Genetically Engineered and Other Microorganisms*, Fry, J.C. & Day, M.J. (eds.), pp. 94-99. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Dodd, J.C., Arias, I., Koomen, I. & Hayman, D.S. (1990) The management of vesiculararbuscular mycorrhizal fungi in acid-infertile soils of a savanna ecosystem. II. The effects of pre-crops on the spore populations of native and introduced VAM-fungi. *Plant and Soil*, 122, 241-247.
- Donegan, K., Fieland, V., Fowles, N., Ganio, L. and Seidler, R. (1992) Efficacy of burning, tillage and biocides in controlling bacteria released at field sites and effects on indigenous bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 1207-1214.
- Edlin, G., Tait, R.C. & Rodriguez, R.L. (1984) A bacteriophage lambda cohesive ends (cos) DNA fragment enhances the fitness of plasmid-containing bacteria growing in energy-limited chemostats. *Bio/Technology*, 2, 251-254.
- Firmn, J.J., Wilson, K.E., Rossen, L. & Johnston, A.W.B. (1986) Flavonoid activation of nodulation genes in *Rhizobium* reversed by other compounds present in plants. *Nature*, 324, 90-92.
- Fontana, A. (1977) Mycelia of Tuberales in pure culture. *Proc. 2nd North Am. Conf. on Mycorrhizae*, p. 200.
- Fuhrmann, J. (1990) Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serology, morphology, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 224-229.
- Germida, J.J. & Khachatourians. G.G. (1988) Transduction of *Escherichia coli* in soil. *Can. J. Microbiol.*, 34, 190-193.
- Graham, J.B. & Istock, C.A. (1978) Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil. *Mol. Gen. Genet.*, 166, 287-290.
- Graham P.H., Viteri, F., Mackie, F., Vargas, A.T. & Palacios, A. (1982) Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.*, 5, 121-128.
- Greaves, M.P. & Wilson, M.J. (1970) The degradation of nucleic acids and montmorillonitenucleic-acid complexes in soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 2, 257-268.
- Hahn, D., Dorsch. M., Stackebrandt E. & Akkermans, A.D.L. (1989) Synthetic oligonucleotide probes for identification of *Frankia* strains. *Plant and Soil*, 118 210-219.
- Hahn, D., Amann, R.I., Ludwig. G., Akkermans, D.L. & Schleifer, K.-H. (1992) Detection of microorganisms in soil after in situ hybridization with rRNA targeted fluorescently labelled oligonucleotides. *J. Gen Microbiol.*, 138, 879-887.
- Ham, G.E., Fredrick, L.R. & Anderson, I.C, (1971) Serogroups of *Rhizobium*

*japotticum* in soybean nodules. *Agron. J.*, 63, 69-72.

- Harley, J.L. (1989) The significance of mycorrhiza. *Mycol. Res.*, 92, 129-139.
- Hartl, D.L., Dykhuizen, D.E., Miller, R.D., Green, L., & DeFramond, J. (1983) Transposable element IS50 improves growth rate of *E. coli* cells without transposition. *Cell*, 35, 503-510.
- Hayman, D.S. (1984) Methods for evaluating and manipulating vesicular-arbuscular mycorrhiza. In: *Microbiological Methods for Environmental Microbiology*, Grainger, J.M. & Lynch, J.M. (eds.), pp. 95-117. Academic Press Inc., London.
- Herrera, M.A., Salamanca, C.P. & Barea, J.M. (1993) Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified Mediterranean ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 129-133.
- Hirsch, P. (1984) Improved crop plant productivity through genetic manipulation of mycorrhizal fungi. *Chem. Ind.*, 23, 833-838.
- Holben, W.E., Jansson, J.K., Chelm, B.K. & Tiedje, J.M. (1988) DNA probe methods for the detection of specific microorganisms in the soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 703-711.
- Jansen van Rensburg, H. & Strijdom, B.W. (1985) Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 127-131.
- Jeffries, P. & Dodd, J.C. (1991) The use of mycorrhizal inoculants in forestry and agriculture. In: *Handbook of Applied Mycology*, Arora, D.K., Rai, B.R., Mukerji, K.G. & Knudsen, G.R. (eds.), pp. 155-185. Marcel Dekker Inc., New York.
- Johnston, A.W.B. & Beringer, J.E. (1975) Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers. *J. Gen. Microbiol.*, 87, 343-350.
- Jones, R.A., Broder, M.W. & Stotzky, G. (1991) Effects of genetically engineered microorganisms on nitrogen transformations and nitrogen-transforming microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3212-3219.
- Kinkle, B.K. & Schmidt, E.L. (1991). Transfer of the pea symbiotic plasmid pJB5JI in non-sterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3264-3269.
- Kinkle, B.K., Sadowsky, M.J., Schmidt, E.L. & Koskinen, W.C. (1993) Plasmids pJP4 and r68.45 can be transferred between populations of bradyrhizobia in nonsterile soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 1762-1766.
- Klüpfel, D.A. & Tonkyn, D.W. (1990) Release of soilborne genetically modified bacteria: biosafety implications from contained experiments. In: *Biological Monitoring of Genetically Engineered Plants and Microbes*, MacKenzie, D.R. & Henry, S.C. (eds.), pp. 55-65. Agricultural Research Institute, Bethesda, USA.

- Lee, S.W. & Edlin, G. (1985) Expression of tetracycline resistance in pBR322 derivatives reduces the reproductive fitness of plasmid-containing *Escherichia coli*. *Gene*, 39, 173-180.
- Levin, M. & Strauss, H.S. (1991) Introduction: overview of risk assessment and regulation of environmental biotechnology. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M. & Strauss, S. (eds.), pp. 1-17. McGraw-Hill Inc., New York.
- Liang, L.N., Sinclair, J.L., Mallory, L.M. & Alexander, M. (1982) Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 708-714.
- Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1988) Impact of mineral surfaces on gene transfer by transformation in natural bacterial environments. In: *Risk Assessment for Deliberate Releases*, Klingmüller, W. (ed.), pp. 110-119. Springer Verlag, Berlin.
- Lorenz, M.G. & Wackernagel, W. (1991) High frequency of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil extract supplemented with a carbon/energy and phosphorous source. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 1246-1251.
- Lorenz, M.G., Reipschiäger, K. & Wackernagel, W. (1992) Transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and ground-water. *Arch. Microbiol.*, 157, 355-36.
- Martinez, E., Pardo, M.A., Palacios, R. & Cevallos, M.A. (1987) Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harbouring *Rhizobium phaseoli* plasmids. *J. Bacteriol.*, 169, 2818-2834.
- Meinhardt, F. & Esser, K. (1987) The plasmids of morels, characterisation and prerequisites for vector development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 276-282.
- Minamisawa, K. (1989) Comparison of extracellular polysaccharide production, rhizobitoxine production and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Cell Physiol.*, 30, 877-884.
- Mischiati, P. & Fontana, A. (1993) In vitro culture of *Tuber magnatum* mycelium isolated from mycorrhizas. *Mycol. Res.*, 97, 40-44.
- Molin, S.P., Klemm, P., Poulsen, L.K., Biehl, H., Gerdes, K. & Andersson, P. (1987) Conditional suicide system for containment of bacteria and plasmids. *Bio/Technology*, 5, 1315-1318.
- Morgan, R.C.P., Rickson, R.J. & Wright, W. (1990) Regeneration of degraded soils. In: *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*, Albaladejo, J., Stocking, M.A. & Diaz, E. (eds.), pp. 68-85. Murcia,

- Spain: Consejo Superior de Investigaciones Cientificas.
- NRC (1989) *Field Testing Genetically Modified Organisms. Framework for Decisions*. National Academy Press, Washington, DC.
- Novick, R.P., Edelrnan, I. & Lofdahl, S. (1986) Small *Staphylococcus aureus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *J. Mol. Biol.*, 192, 209-220.
- O'Connell, K.P. & Handelsman, J. (1993) Foliar chlorosis in symbiotic host and non-host plants induced by *Rhizobium tropici* type B strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2184-2189.
- O'Donnell, J.J. Sylvia, D.M., Pitman, W.D. & Rechigl, J.E. (1992) Inoculation of *vigna parkeri* and mycorrhizal fungi in an acid Florida spodosol *Trop. Grassl.*, 26, 120-129.
- Paulitz T.C. & Linderman, R.C. (1991) Mycorrhizal interactions with soil organisms. In: *Handbook of Applied Mycology. Volume 1. Soil and Plants*. Arora, D.K., Rai, B., Mukerji, K.G. & Knudsen, G.R. (eds.), pp. 77-129. Marcel Dekker Inc., New York.
- Perry, D.A., Molina, R. & Amaranthus, M.P. (1987) Mycorrhizae, mycorrhizospheres and reforestation: current knowledge and research needs. *Can. J. For. Res.*, 17, 929-940.
- Phillips, J.M. & Hayman, D.S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Tran. Br. Mycol. Soc.*, 55, 158-161.
- Pistorius, R. & Verschuur, G. (1989) Biotachnological developments and cassava. *Biotechnol. Dev. Monit.*, 1, 11-13.
- Pretorius-Gruth, I.-M., Puhler, A. & Simon, R. (1990) Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2354-2359.
- Read, D.J., Francis, R. & Finlay, F.D. (1985) Mycorrhizal mycelia and nutrient cycling in plant communities. In: *Ecological Interactions in Soil*, Fitter A.H. (ed.), pp. 193-217. Blackwell Scientific, Oxford, UK.
- Reaney, D.C., Gowland, P.C. & Slater, J.H. (1983) Genetic interaction among microbial communities. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 34, 379-421.
- Richaume, A., Angle, J.S. & Sadowsky, M.J. (1989) Influence on *in situ* plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1730-1734.
- Robert, F.M. & Schmidt, E.L. (1985) Response of three indigenous serogroups of

- Rhizobium japonicum* to the rhizosphere of pre-emergent seedlings of soybean. *Soil Biol. Biochem.*, 17, 579-580.
- Romanowski, G., Lorenz, M.G., Sayler, G. & Wackemagel, W. (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3012-3019.
- Roszak, D.B. & Colwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, 53, 958-965.
- Scannerini, S. & Bonifante, P. (1991) Bacteria and bacteria-like objects in endomycorrhizal fungi (Glomaceae). In: *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation*, Margulis, L. & Fester, R. (eds.), pp. 273-278. MIT Press, Cambridge, MA, USA.
- Schmidt, E.L. & Robert, F.M. (1985) Recent advances in the ecology of *Rhizobium*. In: *Nitrogen Fixation Research Progress*, Evans, H.J., Bottomley, P.J. & Newton, W.E. (eds.) 279-385. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands.
- Shah, K., de Sousa, S. & Modi. V.V. (1981) Studies in transducing phage M-1 for *Rhizobium japonicum* D211. *Arch. Microbiol.*, 130, 262-266.
- Sieverding, E. & Toro, T.S. (1988) Influence of soil water regimes on VA mycorrhizae. V. Performance of different VAM fungal species with cassava. *J. Agron. Crop Sci.*, 161, 322-332.
- Sik, T., Horvath, J. & Chatterjee, S. (1980) Generalized transduction of *R. meliloti*. *Mol. Gen. Genet.*, 178, 511-516.
- Silver-Dowding, E. (1955) *Endogone* in Canadian rodents. *Mycologia*, 47, 51-57.
- Sivaprasad, P. & Rai, P.V. (1991) Synergistic association between *Glomus fasciculatum* and *Rhizobium* species and its effect on pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Indian J. Agric. Sci.*, 61, 97-101.
- Skujins, J. & Allen, M.F. (1986) Use of mycorrhizae for land rehabilitation. *MIRCEN J.*, 2, 161-176.
- Smitley, D.R. & McCarter, S.M. (1982) Spread of *Pseudomonas syringae* pv. tomato and role of epiphytic populations and environmental conditions in disease development. *Plant Dis.*, 66, 713-717.
- Staniewski, R. (1987) Morphology and general characteristics of phages active against *Rhizobium*. *J. Basic Microbiol.*, 3, 155-165.
- Steffan, R.J. & Atlas, R.M. (1988) DNA amplification to enhance the detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2185-2191.
- Stewart, G.J. Carlson, C.A. and Ingrabam, J.L. (1983) Evidence for an active role of

- donor , cells in natural transformation in *Pseudomonas stutzeri*. *J. Bacteriol.*, 156, 30-35.
- Stotzky, G. (1989) Gene transfer among bacteria in soil. In: *Gene Transfer in the Environment*, Levy, S.B. & Miller, R.V. (eds.), pp. 165-222. McGraw-Hill Inc., New York.
- Stotzky, G. & Babich, H. (1984) Fate of genetically engineered microbes in natural environments. *Recomb. DNA Tech. Bull.*, 7, 163-188.
- Strauss, H.E. & Levin, M.A. (1991) Use of fate and transport models in microbial risk assessment. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M.A. & Strauss, H.S. (eds.), pp. 240-271. McGraw-Hill Inc., New York.
- Svab, Z., Kondorosi, A. & Orosz, L. (1978) Specialized transduction of a cysteine marker by *Rhizobium leguminosarum* phage 16-3. *J. Gen. Microbiol.*, 106, 321-327.
- Swart, W.J. & Theron, J.M. (1990) Future needs of mycorrhizal research in South African forestry. *South Afr. For. J.*, 153, 31-35.
- Sylvia, D. (1990) Inoculation of native woody plants with vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for phosphate mine land reclamation. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 31, 253-261.
- Sylvia, D.M. & Jarstfer, A.G. (1992) Sheared-root inocula of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 229-232.
- Tebbe, C.C. & Vahjen, W. (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 2657-2665.
- Teng, P.S. & Yuen, J.E. (1991) Epidemic models: lessons from plant pathology. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M. & Strauss, S. (ed. ), pp. 272-296. McGraw-Hill Inc., New York.
- Tisserant, B., Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S. & Golotte, A. (1993) *In planta* histo-chemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycol. Res.*, 97, 245-250.
- Visser, S., Danielson, R.M. & Parkinson, D. (1991) Field performance of *Eleagnus communitata* and *Sphaerherida canadensis* (Eleagneaceae) inoculated with soil containing *Frankia* and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Can. J. Bot.*, 69, 1321-1328.
- Weber, D.F., Keyser, H.H. & Uratsu, S.L. (1989) Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* from United States soybean production areas. *Agron. J.*, 81, 786-789.

- Weber, E., George, E., Saxena, M.C. & Marschener, H. (1991) VA mycorrhiza increase phosphate uptake and vegetative growth, but not seed yield of chickpeas in northern Syria. *Mitt. Dtsch. Bodenkd. Ges.*, 66, 749-752.
- Weinberg, S.R. & Stotzky, G. (1972) Conjugation and genetic recombination of *Escherichia coli* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 4, 171-180.
- Wellington, E.M.H., Herron, P.R. & Cresswell, N. (1993) Gene transfer in terrestrial environments. In: *Monitoring Genetically Manipulated Microorganisms in the Environment*, Edwards, C. (ed.), pp. 156-158. John Wiley, Chichester, UK.
- Yang, W.-C., Horvath, B., Hontelez, J., van Kammen, A. & Bisseling, T. (1991) *In situ* localization of *Rhizobium* mRNAs in pea root nodules: *nif* A and *nif* H localization. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 4, 464-468.
- Zeph, L.R., Onaga, M.A., Stotzky, G. (1988) Transduction of *Escherichia coli* by bacteriophage P1 in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1731-1737.

## 第6章 微生物農薬—安全上の問題点

モリス・レヴィン

メリーランド大学・メリーランドバイオテクノロジー研究所・バイオテクノロジー社会問題センター（米国・メリーランド州カレッジ・パーク）

### はじめに

昆虫は、ヒトと同様、あらゆる種類の病原微生物に対する感受性を持っている。病原体による昆虫の防除は、農業研究の長年の目標の1つとされてきた。その結果、昆虫防除用の微生物剤が広く利用され、対象範囲や全体的な効果の面での有用性を広げるために遺伝子工学の手法が応用されている。

微生物農薬の商業的価値については、さまざまな推計が行われている。Measows(1990)の推計によると、年間1億米ドルの市場価値がある。Jutsum(1988)では、年間1億6,000万米ドルと推計している。両者とも、微生物農薬は、年間約200億米ドルに及ぶ農薬への総支出の1~2%というごく一部を占めるに過ぎないことを指摘している。

ほとんどの国では化学農薬の毒性に関する安全管理を義務づけており、農薬の流通と使用に関する国際行動規範がある(FAO, 1986)。この規範では、適用対象を化学農薬に限ってはいないものの、増殖、生残、感染性といった生物学的な検討事項については言及されていない。

微生物農薬が使われるのは、選択性や生分解性が高く、環境にやさしいためであり、使用の増加が予想されているのは、まさにこうした要因のためである。たとえば、*Bacillus thuringiensis* (BT菌)は、特定の害虫に活性を示す有毒物質を産生することから、有効な殺虫剤の1つになっている。現在、何らかの形で *B. thuringiensis* を含む製品は、購入・使用されている微生物農薬(「自然」と組換えの両方)の80~90%を占めている。これらの製品の成分は各種の培地に異なる濃度で懸濁した生菌または死菌で、接合によってBT菌のさまざまな毒素遺伝子を含むようになった在来株や、BT菌の毒素遺伝子を含むいろいろな種および属の細菌(死菌または生菌)が含まれている。

化学農薬の使用を減らそうという動きの高まりと、製造技術における研究の向上や進歩とが相まって、微生物農薬の市場シェアや種類が拡大することは必至である。市場シェアが上昇するにつれて、環境への放出の規模は拡大し、利用される微生物の種類も増加することになる。DNA技術の利用によって、効力が高く宿主域の広い新たな株が作られることが期待される。BT菌への別の毒素遺伝子の追加、ウイルスの殺虫剤としての利用、主な細菌への毒素遺伝子(サソリ、ダニ)の追加、微生物由来の毒素遺伝子の作物への直接的な導入に関する研究が報告されている。

微生物防除剤(「天然」のものや組換えのもの)の大規模な使用によって想定される環境への影響については、さまざまな考察が行われている(Brill, 1985; Chandler, 1985; Halvorson et al., 1985; Lenteren, 1986; Frommer et al., 1989; Tiedje et al., 1989; USEPA, 1989)。本章では、こうした微生物防除剤の野外試験や大規模使用にかかわる安全上の問題点を重点的に取り上げる。そのためには、天然農薬と組換え農薬の違いを検討し、リスク評価の要素を概観する必要がある。

## 天然微生物防除剤と組換え微生物防除剤

### 天然剤

天然の微生物防除剤(MPCA)は、長年にわたって使用されてきた。最初に大規模に使用された *Bacillus popilliae* (乳化病菌)は、1948年に米国政府に使用登録され、マメコガネを防除するのに使用された。*Bacillus thuringiensis* (berliner株)が登録されたのは1961年である。この菌は、カイコの病気の発生を受けて日本で単離された。1948年以来、米国では、細菌7種、ウイルス4種、菌類3種、原虫1種が登録されている。微生物の混合物(数種の *B. thuringiensis* の混合など)や、同じ微生物で懸濁培地・濃度の異なるものを含む殺虫剤は、数え切れないほど使用登録されている。研究者らは、長年にわたってこれらの製品の改良を続けてきた。たとえば、より効力の高い株や環境ストレスへの抵抗性が高い株が、実験室での単純な手順によって開発されている。

改良に際しては、実験室の人工的な環境(発酵槽などの封じ込め装置での工業用微生物の開発と同じプロセス)に曝露して突然変異させた新たな株を分離するために、徹底した努力が行われた(Meadows, 1990)。こうして自然に生みだされた株はMPCAの有用性を高め、また、これによって規制による監視が大幅に変更されることはなかった。この種の遺伝子改変は、自然の遺伝子組換えの形態を巧みに利用したものである。その形態とは、接合、形質導入、形質転換である(Tortora et al., 1989)。これらの現象のそれぞれが、詳細な研究の対象とされてきた。

形質転換は、微生物学者がまず明らかにしようとした自然界での遺伝的変異の形態で、1934年にはじめて報告された。形質転換では、細菌細胞の死に続いて溶解が起こり、DNAが放出されるが、このDNAは一定の条件の下で周囲の細菌に取り込まれて利用される(つまり、宿主のゲノムに組み込まれる)。これによって、実験室の管理された条件の下で微生物を操作することが可能になり、その結果、特定の役割により適した新しい株ができあがる(Watson et al., 1983; Stewart, 1992)。

形質導入は、細菌にウイルスが感染する結果生じる。感染後、ウイルスの遺伝子が発現し、ウイルスのDNAや外被タンパク質が作られる。次いで成熟したウイルス粒子が集合し、それらの粒子が細胞外に放出される。形質導入粒子は、ウイルスDNAではなく、間

違って宿主の DNA がパッケージングされることによって形成される (Miller, 1992)。

接合は、供与菌と受容菌との間の DNA の伝達で、細胞同士の接触を必要とし、デオキシリボヌクレアーゼ (出会った DNA を分解する酵素) の作用への抵抗性を示す。通常、このプロセスはプラスミドによって制御されるが、トランスポゾンによって制御される場合もある。接合がはじめて明らかにされたのは、1950 年代初めである (McIntire, 1992)。プラスミドは、除去 (curing) と呼ばれる手法によって細胞から取り除くことが可能で、それによってプラスミドに乗っている遺伝子は失われることになる。代替のプラスミドで置き換えることによって、殺虫作用など別の種類の遺伝的能力が生まれる。一部のプラスミドは簡単に交換が起きる (自己伝達能を持つ) が、遺伝子の伝達が起きるには自己伝達性のプラスミド (Tra+) の存在を必要とするものもある。

これら 3 つのプロセスとも自然界で生じており、そこでは近縁種間の遺伝子交換はよくある現象であることがわかっている。接合は水環境と土壌環境の両方で起き、交換された遺伝情報は発現することが、複数の研究者によって示されている (Stotzky & Babich, 1984; Miller, 1992; Saye & O'Morchoe, 1992; Walter & Seidler, 1992)。

## 遺伝子組換え剤

MPCA 改良の可能性は、分子生物学によって高まってきた。「遺伝的組換え」という用語は、別の意味を持つようになってきている。プラスミド、DNA 代謝に関与する酵素、遺伝子、遺伝子構造に関する詳細な知識によって、遺伝子を単離し、その遺伝子を、機能を持った状態で他の生物に移すことが可能になった (Tortora et al., 1989)。こうした移行は、外来の DNA が挿入されたプラスミドやウイルスなどのベクター (組換え DNA) を用いることによって実現する。ある特定の宿主に用いるプラスミドには、どのような由来の DNA でも挿入することができる。このプラスミドを宿主に移行させると、通常、DNA の発現が起きる。

これによって、多種多様な種、属、界の間で意のままに遺伝情報を移行させることが可能になる。アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属の Ti プラスミドは、組換え DNA を細菌から植物に移行させるのに用いられるプラスミドの一例である。この方法は、害虫抵抗性植物の作出を可能にする方法で、デールとキンダーラーによる執筆の第 4 章に詳しく述べられている。同様に、哺乳類タンパク質やホルモンを産生する細菌が、対応する哺乳類遺伝子を含むように改変されたプラスミドを用いて作製されている。

一般に、遺伝子組換え微生物のリスク評価に必要とされるデータには、遺伝物質が土着の微生物群集に広まる可能性を評価担当者が判断できるようなデータが含まれる。問題は、他の微生物への遺伝物質の伝達が起きる場合、それが発現して影響を拡大させたり、異なった発現の仕方をして (発現レベルが変化する可能性など) 新たな問題を引き起こすかもしれないということである。これは、非伝達性プラスミドの可動化や自己伝達によって起

こりうる。

微生物間での DNA の伝達を可能にする多種多様な仕組みから得られる実験データは、解釈するのが難しい。関連性のない無数の接合性プラスミド、クローニングベクター、形質導入ファージ、トランスポゾンのどれかが使われることになる。得られたデータには、実験方法や環境あるいは生物に固有の性質が反映されている可能性もある。研究者たちは、各実験施設のさまざまな環境条件のもとでも、あるプラスミド系、つまり「標準プラスミド」が採用されれば、こうした混乱の一部は解消できると考えた (Zylstra et al., 1992)。こうした目的のために、自己伝達性と非自己伝達性という 2 つの標準プラスミド系が作りだされた。これらはともに R388 プラスミドをもとにしているが、R388 はトリメトプリムとスルホンアミドへの抵抗性を持つため検出が容易である。標準プラスミドは、遺伝物質の環境中での生残や伝達を評価する上で有用である。

もし、大量の遺伝子が、自然選択の過程を経ずに新たな環境に導入されれば、進化の過程と速度に影響を及ぼすことになる。これは、その遺伝物質、環境、自然選択の過程との間に関係があるためである。もし、遺伝物質が充分大量に導入されれば、突然変異の可能性は高まり、ひいては、突然変異体がうまく生存していく可能性が高まることになる。さらに、土着の微生物との間で遺伝物質の交換が起きれば、その遺伝物質が複製され、突然変異を起こす可能性もある。Meadows (1990) では、組換え生物に固有のリスク要因は、遺伝物質の交換だけだとしている。他の要因はすべて、これまでに移植されてきた既存の性質にかかわるものである (交配の場合には遺伝子の位置は 1 つの種の内部で移動するだけだが、遺伝子工学では大きく離れた種や環境中に遺伝物質のコピーがもっと大規模に存在することになり、伝達や突然変異の可能性は高まる)。

ただし、遺伝子交換に限っていえば、ヌクレオチド配列を変えることによって、交換の過程では機能できないプラスミド (非病原化プラスミド) が作られている。こうしたプラスミドは、いったん宿主に挿入されると、宿主から他の微生物への遺伝物質の移行を阻止する。ただし、一定の条件のもとでは、ヘルパープラスミドが細胞に入り込み、非病原化プラスミドの可動化が起きることもある (Zylstra et al., 1992)。

こうした展開が、規制による監視の強化につながっている。

## 規制による管理が行われる根拠

生物農薬の使用に伴うリスクを判断する際には、その有害性と曝露レベルを明らかにする必要があることは広く認められている (NAS, 1983, 1987; NRC, 1989; OECD, 1986; United Kingdom, 1993)。リスク評価を実現するためには、これら 2 つの要素を評価し、その結果を考え合わせる必要がある (NAS, 1983)。このリスク評価に基づいて、規制当局は具体的な製剤の使用が可能かどうかの判断を下すことができる。「リスク管理」という用語は、関係する政府機関によって行われる規制措置を指す。管理は、個々のケースによっ

てさまざまである。具体的な法律や関連する規制によって、規制当局にはさまざまな選択肢が与えられている。このため、米国の場合、有害物質規制法（TSCA）に基づいて活動を行う規制当局は、申請者に対して、試験目的での一時的な使用や、特定の場所や目的に限った使用を認めており、使用の目的や場所が変わるごとに新たな申請が必要になる（Giamporcaro, 1993）。

有害性とは、その製剤自体が持つ性質（ビルレンス、有効性、宿主域）などを指す。曝露とは、安定性、環境要因への抵抗性、移動性といった製剤の性質のほか、もちろん野外でどのくらいの量が用いられるかをいう。ある製剤や活動のリスクを評価するために必要なデータには、これら2つの要因を構成する要素が反映される。

必要とされるデータには、裏付けとなる法律の目的や、その法律を立案した政府機関の特定の関心事項も反映される。米国の場合、連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法によって対象とする製剤の種類（農薬）と保護が必要になる対象（ヒトの健康および環境）が規定されている。たとえば熱帯の国など、場合によっては、生物多様性の保護に重点が置かれることもあるかもしれない。

## 生物防除剤の放出に関する潜在的リスク 一般的な問題

微生物は、発酵食品の製造、製パン、特殊化学品の製造など、さまざまな目的で人間に利用されている。こうした目的のための微生物の開発や使用は、一般に無害で、産業用として最適化されている（Brill, 1985）。この点で、MPCA は大きく異なる。こうした微生物には1つの役割、つまり、害虫の成長や繁殖を防いだり瞬間的に死に至らしめることによって、これを防除するという役割を持っている。また、これらの微生物には、自然界で生き延びられるように、選択や改変が施されている。このため、悪影響が生じる可能性が備わっているのである。さらに、化学剤は自然界で繁殖することはないという点で、MPCA とは異なる。そのため、化学剤のリスク評価では成長や定着の問題を考慮に入れる必要がない。微生物農薬を環境中で用いる場合のリスク評価のために、ガイドラインや手順が定められている（USEPA, 1989 など）のはこのためである。一般に、ガイドライン（表 6.1）には必要となるデータの種類が示されている。これらは「検討項目」と呼ばれている。生物製剤は、大規模かつ高濃度で拡散することが想定される。また、強風によって飛ばされたり、再増殖に伴う二次的伝播が起こりうるという意味で、環境への影響も考えられる。

「検討項目」表で定められた全部の項目が、すべての MPCA に該当するわけではない。ガイドラインは、起こりうる問題をすべて明らかにし、個々の事例にあてはまる項目のリストを示すことを意図して作成されている。表 6.1 に示された項目は、オーストラリア（1990）、カナダ（Agriculture Canada, 1993）、EU（CEC, 1990）、ニュージーランド（1992）、OECD（1990）、米国（USEPA, 1989; USDA, 1990）のガイドラインや要件（ガイドラインがない場合）に挙げられているものである。このように共通点が見られるのは、MPCA

の環境中への放出にかかわる有害性や曝露の要因を評価する際の科学的な根拠を反映している。どの国においても、評価項目のリストは、学界、政府、産業界の科学者からなる委員会によって作成された。これらの要因についてもっとも明快に解説しているのが、Tiedje et al. (1989) による特集論文である。この論文は、環境に影響が及ぶ可能性に関する諸要因について検討している。オーストラリアのガイドラインはこの論文の発表後すぐに公表され、論文とは無関係に定められたものだが、内容と構成が非常に似通っている。

表 6.1 検討項目【脚注a】の主な内容

<p>試験の概要</p> <p>目的</p> <p>実現可能性</p> <p>便益とリスク</p> <p>正当性</p> <p>微生物の遺伝的性質（親生物および受容体）</p> <p>同定</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・分類学上の名称</li> <li>・分類に用いた手法</li> </ul> <p>遺伝子型</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・遺伝物質の特性：染色体、トランスポゾン、プラスミド</li> </ul> <p>遺伝子伝達の可能性</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・形質導入能、形質転換能、接合能</li> <li>・自然界での遺伝物質交換の証拠</li> </ul> <p>表現型</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・選択の根拠</li> <li>・宿主内で予想される変化</li> <li>・培養条件、生活環、生息場所</li> <li>・病原性データ（型、ビルレンス）</li> <li>・抗生物質抵抗性およびその産生</li> <li>・生残および定着に関するデータ</li> <li>・管理の方法（天然剤、効果的な消毒剤）</li> </ul> <p>遺伝物質の導入</p> <p>改変方法</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・挿入する DNA の由来と機能</li> <li>・DNA の同定、単離、挿入に用いた方法</li> </ul> <p>ベクター</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・同定</li> <li>・遺伝子の挿入部位</li> <li>・宿主への導入方法</li> <li>・導入遺伝子の特性： <ul style="list-style-type: none"> <li>位置、量、安定性、残留するベクター-DNA</li> </ul> </li> <li>MPCA と親生物との比較</li> <li>・相対的な生残、定着、複製、伝播を示す実験データ</li> </ul>
---

環境上の検討項目（親生物および受容体）

微生物

- ・生息場所
- ・生残要因：  
マイクロコズムに関するデータ、生残および生育に適する環境条件または悪影響を及ぼす環境条件
- ・生残、複製、伝播、生物学的相互作用が起きる可能性を示すデータ
- ・見込まれる具体的な悪影響の特定

試験

- ・試験の条件
- ・場所
- ・試験区域の特性：  
伝播の可能性、存在する標的集団と非標的集団の内容
- ・封じ込め
- ・採用する方法：  
現地での封じ込め手段（物理的、生物学的）、運搬方法、職員の教育、安全のための手順

モニタリング

- ・採用する方法：  
手法の内容（感受性および信頼性の検討）  
MPCA および親生物の再分離、手法の感受性、信頼性に関するデータの検討

軽減措置

- ・終了手順
- ・廃棄手段
- ・消毒方法

【脚注 a】オーストラリア、カナダ、EU、ニュージーランド、OECD、米国（EPA、USDA）の文書で検討すべきとされているポイントの概要。

ほかに、環境的な要素の重要性の観点から、放出される微生物と環境が相互作用する可能性を検討している専門家がいる（Kalmakoff & Miles, 1980; Day & Fry, 1990; Fry & Day, 1990; Meadows, 1990）。Meadows は、既知の環境上の検討項目（温度、湿度、栄養条件など）を挙げ、微生物の定着や生残における要因としての重要性を検討している。Fry と Day は、一般的な問題と、*B. thuringiensis* を例にした実際のデータに基づく具体的な影響を幅広く検討している。両者は、この微生物が農薬として広範かつ大量に使用されているにもかかわらず、生態系や健康への悪影響を示す徴候はみられないことを指摘している。もっと最近では、*B. thuringiensis* が産生する毒素への抵抗性を獲得した害虫が報告されている（USDA, 1992）。これは生態系への悪影響ではないものの、この MPCA が効果的な殺虫剤としての機能を失う可能性をリスク評価の一環として考慮すべきであることが示唆される。

Tiedje の論文およびオーストラリアのガイドラインは、信頼性のあるリスク評価のために必要な情報の量を表す指針を示そうとした点で、優れた例である。どちらの場合も、4 つの属性が示されている。

1. 遺伝的改変
2. 野生型生物の表現型
3. 組換え生物の表現型
4. 関連する具体的な環境

それぞれの属性は、特定の性質を表す 7 つから 9 つの項目によって規定される。各属性の下の各項目について、必要な検討のレベルが特定される。このレベルは、生じた特定の変化、その属性に関してわかっている知識の度合い、その属性に固有の性質によって判断される。たとえば遺伝的改変の場合、挿入される DNA の性質と安定性、変化の性質（欠失、変異など）、DNA の機能と由来、ベクターとその由来に関するデータのほか、変異ゲノムに残存するベクター-RNA またはベクター-DNA に関するデータが必要とされている。いかなる場合でも、入手可能な情報（一般の学術文献または問題の微生物に関するデータを得るために特に行われた実験によるもの）が多いほど、リスク評価での検討は少なくて済む。たとえば、ベクターや T-DNA が病原体の場合、ベクターや DNA と宿主の病原性との関係に関するデータが別途必要になる。

表現型の項目で明らかにする性質は、培養化のレベル、制御のしやすさ、病害の状態、生残、野生型生物との遺伝子交換の範囲と発生の程度や感染力、基質利用の変化、病害や天敵への抵抗性の変化、抗生物質への感受性の変化、環境的な限界の変化、過去に放出した改変生物の表現型との類似性などである。したがって、環境的な限界が広がっている場合には、追加的な調査が求められる。遺伝子変異の結果、環境的限界に変化がないか、狭くなっている場合は、追加の調査の必要はなく、また、そうした結論が文献や実験データによって支持される場合には、この項目は無視することができる。

表 6.2 は MPCA に必要とされるデータを示したもので、すべての場合に必要となるデータがどれで、特定の状況に必要とされるデータがどれかがわかる。すなわち、製品の詳細な分析や、MPCA の毒性に関する数項目のデータ、非標的生物に対して予想される、または既知の影響は、すべての場合に要求されるデータである一方、前段階のデータによって裏付けられる場合には、徹底的な毒性試験や有害性に関するデータが求められることもある。表 6.2 に挙げた要件は、USEPA の文書の M 項から引用したものである( USEPA, 1989 )。ただし、USDA ( 1990 )、オーストラリア ( 1990 )、OECD ( 1990 )、EU ( CEC, 1990 )、ニュージーランド ( 1992 ) およびカナダ ( Agriculture Canada, 1993 ) が定めている要件も同様のものである。1973 年、世界保健機構は、害虫防除用の MPCA の有効性と安全性を評価するための暫定的な枠組みを提案した ( WHO, 1973; Kalmakoff & Miles, 1980 も参照 )。USEPA の段階的システムと同様、5 段階の方式が提案された。第 1 段階に必要なデータとして提案されたのは、微生物に関するデータ ( 同定、性質、非標的・標的生物への影響 ) および脊椎動物での感染性試験である。この第 1 次データを検討した結果、必要とされる場合には、野外試験のデータや、感染性や宿主域に関する詳細なデータが要求さ

れることになる。USEPA の方式では、「場合によって必要な」項目が求められるのは、必須項目によって重大な悪影響の可能性が示唆される場合である。指摘しておかなければならないのは、必須項目がすべての場合に義務づけられた項目ではないということである。USEPA の農薬局では、リスク評価に関連がないことを明らかにできる場合には、特定のデータ要件を免除する手続きがある。申請者は、十分な正当性を示すことができる場合、免除を求めることができる。たとえば、有効成分として *B. thuringiensis* を含む製品は、長年にわたって安全に使用されてきた実績を根拠として、毒性の要件を免除されることもありうる。

表 6.2 に示された範囲の必要データによって、規制当局は「発生の可能性」とそれによって生じうる影響を知ることができる。これらのデータは、当該微生物、試験区域の環境との相互作用の可能性、長期的な影響、遺伝子交換、封じ込めやモニタリングの問題に関するあらゆる面での情報を提供してくれる。こうした要素に関するデータは、リスク評価の手続きが普及している国のほとんどで要求されている。国によっては、社会的、文化的、経済的影響に関するデータを要求・取得しているところもある。これらの要素をリスク評価に必要なデータとして含めることの妥当性に関しては、意見が一致していない。しかし、社会的、文化的、経済的問題が、個々の製品に関する規制当局の最終的な決定に関与することは疑いないものの、これは、製品とその使用の申請が行われる国によって左右される問題である。あるところで認められるものが、ほかでは認められないこともありうる。却下の根拠は、「自然科学」に基づくデータ(気候の違い、新たな環境に内在する種の多様性)による場合もあれば、経済的、社会的問題、つまりその製品が地域の農業の一定の領域を脅かしたり、きわめて重要な天然資源で、たとえ影響の及ぶ可能性が低くても許容できないようなものに脅威を与える可能性があることによる場合もある。

表 6.2 MPCPAの登録に必要な要件の概要【脚注a】

製品の分析	毒性	非標的生物への有害性
必須データ： 製品の同定 製造方法	急性毒性 過敏症の事例	影響の対象： 陸生および水生の野生非標的 植物および昆虫
性質（物理的および化学的） 非活性成分 サンプルの提出 場合によって必要なデータ：	組織培養試験の結果 （ウイルス製剤の場合）  急性毒性 生殖毒性 発癌性	長期の病原性試験 魚類の生活環調査 模擬的または実際の野外試験

【脚注 a】このほか、必須データが潜在的な問題を示す場合は、「環境での発現に関するデータ」が求められることもある。これらのデータには、使用が予定される環境での MPCPA の生残能および複製能が記載される。USEPA の要件に基づく（USEPA, 1989）。

検討手順はデータの取得方法を示し、それによってデータの質と信頼性が保証されることになる。ここでは、製品、その毒性、非標的生物への有害性、環境上の問題（in situでの発現）製品の性能に関する必須データを得るための特定の試験法や手法が示されている。試験手順（サンプル数、複製、試験条件、期間など）に関する詳細な情報が定められている。検討手順は当初、さまざまな手法や基準を用いて得られたデータが、信頼性のあるリスク評価を可能にするほど信用できるものではなく、比較もできなかったという理由で定められた。手順は規制当局によって定められ、試験を経て公表や勧告が行われる。表 6.3 と表 6.4 は、有害性（表 6.3）および曝露（表 6.4）を判断する際に利用できる手順を示したものである。これらの手順は、USEPA の文書の M 項に挙げられ、詳細に解説されている（USEPA, 1989）。

**表 6.3 有害性評価のためのデータ項目**

1. 試験の原則

予期される用量での複数回の試験  
陽性の結果が得られた場合、最大危険用量を用いる

2. 単一種での試験

鳥類への単回経口投与毒性  
鳥類への混餌投与毒性  
淡水魚への急性毒性試験  
淡水魚への無脊椎動物試験  
非標的植物  
非標的昆虫  
ミツバチ  
河口の非標的種

**表 6.4 曝露評価のためのデータ項目**

必要なデータの項目：

遺伝子の生物学的動態

- ・ MPCA の生息場所
- ・ 生残・複製にかかわる要因
- ・ 遺伝子流動
- ・ 遺伝子構築、伝達、発現の可能性
- ・ 発現レベル

遺伝子の化学的動態

- ・ 土壌中での遺伝子または遺伝子産物の動態
- ・ 水中での遺伝子または遺伝子産物の動態

1991 年、王立環境汚染委員会は、組換え生物による影響と規制の枠組み、および管理と軽減の手法に関する報告書を公表した。この報告書では、リスク評価のために GENHAZ

というコンピューターシステム計画を提案しているが、このシステムは、評価を実施する当局に対して、申請された試験、使用、生物の潜在的な影響に関する必要なデータに関する体系的なリストを与えるものである。また、個々の事例での曝露や有害性を評価するために、具体的なデータを検討し確認する際の形式も定めていた。このシステムは全体として、現在他の国で使われている手順に比べて、より多くのデータの入力が必要だった。このプロジェクトは、1993年に同委員会によって中止が決定された。

## 封じ込めと軽減

微生物の封じ込めには、物理的封じ込めと生物学的封じ込めという2種類が提案されてきた。物理的封じ込めとは、組換え生物の拡散の可能性をなくすために、構造体（温室）や網掛け（組換え昆虫の場合）を用いること意味する。生物学的封じ込めの実現には、2種類の方法が考えられる。使用や試験を微生物の生存や拡散に不利な場所で行うこと（生残するためには絶えず変異していかななくてはならないような気候の試験区画で試験を行うなど—十分な水分が供給されれば砂漠の気候が適しているかもしれない）または、限られた区域の外では生残できないように微生物を改変することが考えられる。後者については、自殺遺伝子を組み込んだり、微生物の栄養利用の能力を改変することによって実現できる。たとえば、大腸菌 K12 株は、通常的环境条件には存在しない特殊な栄養を必要とする。

化学薬品の使用、熱処理などによる消毒は封じ込めとはいえないが、区域から微生物を取り除いて影響を最小限に抑えるという意味で、かなりの軽減になる。

封じ込めとは、伝播を予防して最小限に抑えることをいう。伝播は最小限に抑えることが可能で、影響を管理することが可能である。検疫基準がうまく適用されており、さまざまな地域での生物の試験を可能にしている。当該微生物とその複製様式、環境ストレスへの応答、そして特に宿主域について理解することが必要である。場所を慎重に選択することによって、微生物を特定の区域に効果的に封じ込めることができる。病原体が生残し定着するためには、特定の宿主が必要である。超低温への耐性がない微生物は、冬の寒さが厳しい地域で試験するのが適している。ごく一部の集団が生残するかもしれないが、その程度は低く、重大な悪影響は排除できる。

人類史上唯一、天然痘だけは根絶されたが（Fenner et al., 1988）これは莫大な費用と長年にわたる協力によって成し遂げられたものである。しかし、特殊な手法を用いることによって、微生物群集のレベルをコントロールすることができる。こうしたコントロールによって生じる影響には、短期、中期、長期のものがありうる（表 6.5）。どの手法を選択するかは、個々の状況、実現可能性、かかる費用によって左右される。動植物に感染した微生物の場合、感染した素材を焼却したり深く埋めることが必要な場合もある。

表 6.5 望ましくない微生物の防除

中期【脚注 a】	短期【脚注 b】	長期【脚注 c】
燻蒸消毒	燻蒸消毒	燻蒸消毒
灌水	灌水	灌水
化学薬品	化学薬品	土壌浸食の防止
	土壌浸食の防止	土壌改良
	土壌改良	

【脚注 a】効果が表れるのに数時間から数日

【脚注 b】効果が表れるのに 3 年以下

【脚注 c】効果が表れるのに 3 年以上

出所：Vidaver and Stotzky (1992) を改変して引用。

野外区画の除染に化学薬品が使われることもあるが(表 6.6)、標的となる集団を完全に除去することにはならない。総個体数は、おそらくは検出不能なレベルにまで減少するだろうが、確実に全滅するわけではない。区画の辺縁部、また土壌の耕耘によって近隣の区画から移動してきた土着の微生物集団が再び優勢になれば、標的となる微生物の再増殖は抑えられる。化学物質はすべて毒性を有するため、適用の際には注意が必要である。

表 6.6 管理のための一般的な化学物質

一般名	化学名	用量 (リットル/ヘクタール)	植物毒性 【脚注 a】	LD <sub>50</sub> 【脚注 b】
臭化メチル	プロモメタン	450-900c	毒性	1
二臭化エチレン (EDB)	1,2-ジプロモメタン	19-94	毒性	150
塩素化炭化水素	1,2-ジクロロプロパン、 1,3-ジクロロプロパン等	100-500	毒性	140
イソチオシアン 酸メチル	同左	600-1200	毒性	280-650
ジプロモクロロ プロパン (DBCP)	1,2-ジプロモ-3-クロロプロ パン	19-38	毒性	172
クロロピクリン	トリクロロニトロメタン	300-500	毒性	1

【脚注 a】作物に関するもの

【脚注 b】哺乳動物

【注】キログラム/ヘクタール

出所：Vidaver and Stotzky (1992) を改変して引用。

生物学的管理が提案されており、現在進められている研究では、封じ込めと管理の可能性が示されている (Cuskey, 1992)。環境によって制御される致死遺伝子を含むプラスミドを用いることによって、主な環境刺激が変化した場合に改変微生物を絶滅させる仕組みが得られる。用いられている致死遺伝子には、細胞の DNA を攻撃するものと、細胞壁を攻撃する (すなわち細胞を溶解させる) もの 2 つのタイプがある。制御が行えるのは、環境中の特定の化合物によって活性化されるリプレッサー遺伝子の存在があるためである。

別の方法として、そのときどきでランダムな一方向にはたらく fimA など両方向性のプロモーター遺伝子で致死遺伝子を制御する方法もある。このような致死遺伝子とプロモーター遺伝子の組み合わせを含む MPCA は、最終的には全滅する。この手法を用いれば、リスク評価を行う当局に対して安全性を保証できる。ただし、この手法は野外での試験が行われていない。致死遺伝子や制御遺伝子に突然変異が起きる可能性がある。溶菌酵素や DNA 分解酵素が他の微生物に影響を及ぼすという問題もある。

## まとめ

微生物農薬の使用に伴うリスクの評価にかかわる問題は、多くの規制当局や、規制当局や学術機関によって召集された委員会によって検討されてきた。一般に、その提言の内容は、組織の由来や構成に関わりなく似通っている。こうした類似性は、リスク評価のもとになる科学的基盤を物語っている。必要なデータを判断するために批判的思考法を採用することや、個体群理論や生態学的原理を基盤として用いることで、政策決定に必要な基本的情報に関しては合意が形成されている。

重要な要素や測定の必要性は、明確に定められている。しかし、必要なデータを得るためのより適切な手法を定めるために、さらなる研究が必要であることを指摘する意見もある (McCormick, 1986; Levin et al., 1987)。McCormick は、野外試験法の感度をもっと向上させる必要性を指摘している。Levin らは、感度と信頼性の高い手法を定めるために USEPA で行われている研究について解説している。

リスク評価の目的のために集められた知見 (データ) は、それを認識する規制の枠組みに基づいて解釈した上で利用される。1 つの製品が、あらゆる状況や場所で受け入れられるとは限らない。前述のとおり、決定には、個々の製品、地域、あるいは経済状況にかかわる要因が影響する可能性がある。

プロセスと製品のどちらに重点が置かれるべきかについては、多くの議論が行われてきた。一般に、プロセスについて何らかの知識なしに、製品の評価をすることはできない。このため、プロセスに関する情報は、あらゆる規制の枠組みにおいて要求されている。しかしこれは、ある製品がバイオテクノロジー研究の成果であるというだけで有害性を持ち、リスク評価が必要だという意味で求められているわけではない。そうではなく、これまで示してきたように、規制当局の関心はあらゆる環境への放出に向けられ、あらゆる製品に対してリスクに基づいた同様の判断が行われている。

## 参考文献

- Agriculture Canada (1993) Regulation of Agricultural Products. Plant Industry Directorate, Ottawa.
- Australia (1990) Australian Guidelines for Large Scale Work with Genetically Manipulated Organisms. Australian Government Public Service, Canberra.
- Brill, W. (1985) Safety concerns and genetic engineering in agriculture. *Science*, 227, 381-384.
- CEC (1990) Council Directive of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. Reference no. 90/220/EEC. *Official Journal L117* Volume 33, 8 May 1990. Commission of the European Communities, Brussels.
- Chandler, J.L.R. (1985) New mechanistic models for risk assessment *Fundam. Appl. Toxicol.*, 5, 634-652.
- Cuskey, S.M. (1992) Biological containment of genetically engineered organisms. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Scidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 911-918. McGraw-Hill Inc., New York.
- Day, M.J. & Fry, J.C. (1990) Microbial ecology, genetics and risk assessment In: *Release of Genetically Engineered and Other Microorganisms*, Fry, J.C. & Day, N.J. (eds.), pp. 160-166. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- FAO (1986) International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. FAO, Rome.
- Fenner, F., D.A. Henderson, N.J. Arita, L., Jezek, Z. & Laduyi, I.D. (1988) *Smallpox and its Eradication*. WHO, Geneva.
- FIFRA (1984) 40CFR 158 and 162. Washington, DC.
- Frommer, W., Ager, B., Archer, L., Brunius, G., Collins, C.H., Donikian, R., Frontali, C., Hamp, S., Houwink, E.H., Kuenzi, M.T., Kramer, P., Lagast, H., Lund, S., Mahler, J.L., Normand-Pleisler F., Sargeant, K., Tuijnenburg, G., Vranich S.P. & Werner, R.G. (1989) *Safe biotechnology. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30(6), 541-552.
- Fry, J.C. & Day, M.J. (1990) Release of genetically engineered and other microorganisms. In: *Release of Genetically Engineered and Other Microorganisms*, Fry, J.C. & Day, N.J. (eds.), pp. 120-136. Cambridge Press, Cambridge, UK.
- Giamporcaro, D. (1993) Law and policy on the frontier: the regulation of bioremediation of hazardous waste. In: *Biotreatment of Industrial Waste*, Levin,

- M.A. & Gealt, M. (eds.), pp. 137-167. McGraw-Hill Inc., New York.
- Halvorson, H., Pramer, D. & Rogul, M.R. (1985) *Engineered Organisms in the Environment*. ASM, Washington, DC.
- Jutsum, A.R. (1988) Commercial application of biological control: status and prospects. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, B318, 357-373.
- Kalmakoff, J. & Miles, J.A.R. (1980) Ecological approaches to the use of microbial pathogens in insect control. *Bioscience*, 30(5), 344-347.
- Lenteren J.C. (1986) Evaluation, mass production, quality control and release of entomopathogenous agents. In: *Biological Plant and Health Protection*, Franz, J.M. (ed.) pp. 378-403. Gustav Fischer Verlag (VCH Pubs.), New York.
- Levin, S.A. (1988) Safety standards for the environmental release of genetically engineered organisms. *Trends Biotechnol.*, 6(4), 547-549.
- Levin, M.A., Bourquin, A.P., Barkay, T. & Fowle, J. (1987) EPA developing methods to assess environmental release. *Bio/Technology*, 5, 33-37.
- McComick, D. (1986) Detection technology. *Bio/Technology*, 4, 419- 421.
- McIntire, S. (1992) Analysis of conjugation in bacteria. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, M. (eds.), pp. 199-228. McGraw-Hill Inc., New York
- Meadows, M. (1990) Environmental release of *Bacillus thuringiensis*. In: *Release of Genetically Engineered and other Microorganisms*, Fry, J.C. & Day, N.J. (eds.), pp. 120-136. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- Miller, R.V. (1992) Methods for evaluating transduction. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 229-251. McGraw-Hill Inc., New York.
- NAS (1983) *Risk Assessment*. National Academy Press, Washington, DC.
- NAS (1987) *Introduction of Recombinant DNA-Engineered Organisms into the Environment: Key Issues*. National Academy Press, Washington, DC.
- New Zealand (1992) Checklist for Researchers Submitting a Proposal to Field Test a Genetically Modified Organism (GMO). GMO Interim Assessment Group, Ministry for the Environment Wellington.
- NRC (1989) *Field Testing Genetically Engineered Organisms: Framework for Decisions*. National Academy Press, Washington, DC.
- OECD (1986) Recombinant DNA Safety Considerations. OECD, Paris.
- OECD (1990) Good Developmental Principles: Guidance for the Design of Small Scale Field Trials with Genetically Modified Plants and Microorganisms. DSTI/STP/BS (90)1. OECD, Paris.

- Royal Commission on Environmental Pollution (1991) 14th Report: GENHAZ. HMSO, London.
- Saye, D. & O'Morchoe, S.B. (1992) Evaluating the potential for genetic exchange in natural environments. In: *Microbial Ecology Principles, Methods and Applications*. Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 283-311. McGraw-Hill Inc., New York.
- Stewart G.J. (1992) Natural transformation and its potential for gene transfer in the environment. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 253-282. McGraw-Hill Inc., New York.
- Stotzky, G. & Babich, H. (1984) Fate of genetically engineered microbes in natural environments *RDNA Tech. Bull.*, 7(4). 163-189.
- Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R. N. & Regal, P.J. (1989) The planned introduction of genetically engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 70(2), 298-315.
- Tortora, G.J., Funke, B.R & Case, C.L. (1989) *Microbiology*, pp. 201-228. Cummings, New York.
- United Kingdom (1993) *A Guide to the Genetically Modified Organisms (Contained Use) Regulations 1992*. HMSO, London (ISBN 0 11 882049 4).
- USDA (1990) Guidelines for Research with Genetically Engineered Microorganisms Outside Contained Facilities. USDA, Washington, DC.
- USDA (1992) Scientific evaluation of the potential resistance to the *Bacillus thuringiensis* delta endotoxins. USDA, Washington, DC.
- USEPA (1989) Subdivision M of the pesticide testing guidelines. NTIS PB89-211676.
- Vidaver, A. & Stotzky, G. (1992) Overview: confinement, decontamination and mitigation. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 781-797. McGraw-Hill Inc., New York.
- Walter, M.V. & Seidler, R.J. (1992) Measurement of conjugal gene transfer in terrestrial ecosystems. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 311-326. McGraw-Hill Inc., New York.
- Watson, J.D., Tooze, J. & Kurtz D.T. (1983) *Recombinant DNA: A Short Course*. W.H. Freeman, New York.
- WHO (1973) The uses of viruses for the control of insect pests and disease vectors. WHO Tech. Report Ser. No. 531. WHO, Geneva.
- Zylstra, G.J., Cuskey, S.M. & Olson, R.H. (1992) Construction of plasmids for use in survival and gene transfer research. In: *Microbial Ecology, Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 311-326. McGraw-Hill Inc., New York.

*Applications.* Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, N. (eds.), pp. 363-371. McGraw-Hill Inc., New York.

## 第7章

# トランスジェニック動物と組換えタンパク質の封じ込め利用と放出における安全性

ドン・パウエル

バブラハム研究所・発生シグナル部・細胞決定研究室（英国・ケンブリッジ州・バブラハム）

### はじめに

ある意味でいえば、さまざまな種類の家畜を育種することなど遺伝子操作には数千年の歴史がある。普通のオオカミ種をもとにペキニーズからグレートデーンに至る多種多様な犬種を得るのにかかった時間は、ほんの二、三百年である。こうした育種の取り組みでは、「科学的に」考案されたかどうかは別にして、「望ましい」形質を示す動物は繁殖が続けられ、「望ましくない」形質の動物ははずされる。伝統的育種法による実験は、すべてこの種の遺伝的改良を基礎としており、染色体の組換えとその染色体が偶然に組み合わせられて望ましい形質になることに頼っており、時間と費用のかかる仕事である。動物育種学における最新技術は劇的に様変わりしている。つまり、核移植法、クローニング法、雌雄鑑別法、トランスジェニック生物学は、動物の表現型に劇的な変化を生じさせることができる。こうした変化によって、新たな恩恵がもたらされるかもしれないが、それによってどのような問題が生じるだろうか。本章では、トランスジェニック（遺伝子導入）動物と組換えタンパク質の性質を、これらの技術が環境に及ぼす影響という枠組みのなかで検討する。ここでは、現行の規制、とりわけ米国と英国の規制についても概観するが、両者は同じ問題に対して異なる対応を取っている。注目に値するのは、米国農務省（USDA）がこれまでに300件以上のトランスジェニック植物の放出を承認している一方で、トランスジェニック動物（コイ）の封じ込め放出で完全に実施されたものはわずか1件だという点である。このことは、動物に導入される形質がきわめて複雑であるために、科学界で数々の疑問が提起され、しばしば国民の懸念の種になっているという事実によって説明できる。

### 定義範囲

以下の検討項目は自明のものとして議論を進める。遺伝子組換え生物（GMO）やトランスジェニック動物、あるいは組換えタンパク質の定義は何だろうか。トランスジェニック動物の概念は単純で、一言でいえば、そのゲノムに、両親のどちらにもないDNA配列（導入遺伝子）を持つ動物のことである。各種の研究実験では、このDNAが、成長ホルモンや $\beta$ -抗トリプシンなどの機能性タンパク質の合成を指令する場合、 $\beta$ -ガラクトシダーゼな

どのマーカータンパク質の合成を指令する場合、単にゲノム中のDNAマーカーの1つとして単独で機能する場合がある。このいずれもが遺伝子導入の例だが、動物の生理機能の改変が意図されているのは最初の例だけである。本章で取り上げるのは、この分野である。トランスジェニック動物を作出する経路はいくつかあり（後述の「組換えゲノムの生成」を参照）そのそれぞれが生物にさまざまな性質を与える。

組換えタンパク質は、in vitro で操作されたDNA (rDNA) に由来し、「自然の」遺伝子配列を組み合わせたたり、遺伝子配列を切り取ったり、あるいは合成したDNA配列を加えたりして作られる。狭義の組換えタンパク質は、自然界に存在するものとは異なる配列を含むものをいう。広義かつ通常用いられている意味での組換えタンパク質は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、酵母、動物培養細胞あるいはトランスジェニック動物を問わず、外来遺伝子（導入遺伝子）から合成されたタンパク質をいう。次の節では、この定義が安全性を懸念する人々にとって災いしていることについて論じる。

### 組換えの遺伝子やタンパク質は特別か

組換え遺伝子やゲノムが特別なのは、その生成方法のためである。それらの基盤となる技術には、ほんの15年ほどの歴史しかない。だから安全性に問題がある、といえるだろうか。製品の安全性というのは、それが生物学的製品か化学的製品か物理学的製品かにかかわらず、その挙動、つまり性質によって決まるものであって、製造法によって決まるものではない (Miller, 1991)。自動車の安全性は、その安全性試験での挙動によって規定されるもので、それが手作りされたか生産ラインで作られたかによって規定されるものではない。その意味からすると、GMOは、その生成方法を理由に特別な区分を形成するものではなく、また、この生成方法に付随する特別なリスクの区分がないことについても広く受け入れられている。もし、組換え産物（遺伝子やタンパク質）の挙動あるいは性質が自然の産物と異なるなら、重要なのは、その新たな挙動の意味合いを評価することである。

たとえば、導入遺伝子は内在の遺伝子と比較して安定性が低いかもしれない。これは、評価の対象にしなければならない性質の1例である。しかし、環境中での挙動を左右するのは、その新規の遺伝子型が持つ生物学的な性質である。このことは、新規の「自然の」ゲノムにも、組換えゲノムと同じくらいあてはまることである。オーストラリアでの、まったく新規であると同時にまったく「自然の」ゲノムを持つウサギの放出は、生態系に広範な影響を及ぼし、トランスジェニック動物のきわめて慎重に計画された放出ではまず考えられない規模での損害を引き起こしている。

同様に、組換えタンパク質も、その生成方法からして、必ずしも特別なリスク区分を示すものではない。自然界にはみられない性質を持つタンパク質を作るために遺伝子操作が用いられる場合、そのタンパク質に伴う有害性を判断するには、主として新たな食品、医薬品、工業製品の評価に用いられるのと同じガイドラインに従うことになる。つまり、組

換えゲノムの環境への影響は、自然ではあるが外来のゲノムによる影響と本質的には変わらないのである。

## 組換えゲノムの生成

### トランスジェニック動物

トランスジェニック動物の作出の歴史は、10年余りである (Brinster et al., 1981)。この間に、動物に DNA を組み込むための方法がいくつか開発された (図 7.1、表 7.1)。

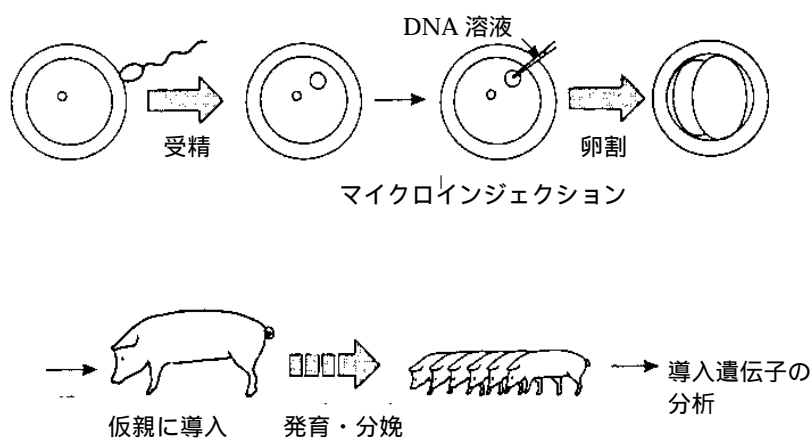
マイクロインジェクション (微量注入) 法 DNA を受精卵の前核 (通常は大きい方の雄性前核) に注入するもので、トランスジェニックマウスの大多数の系統や家畜種のトランスジェニック系統のほぼすべてが、この方法によって生み出されている。マイクロインジェクション法は、トランスジェニックの魚類や家禽類の作出にも用いられている (Chen & Powers, 1990; Love et al., 1994)。こうしたケースでは、核が不鮮明だったり、まったく検出できないために、DNA は細胞質内に導入されることが多い。この方法はおおむね信頼できるが、組み込まれる部位がランダムで、組み込まれる DNA のコピー数を予測することができず (ただし、低濃度の DNA を使って、ゼロから 2 ないし 3 コピーの範囲を目指すことはできる)、一定の割合の動物がモザイク (すべての細胞に導入遺伝子が含まれない) になる。しかし、コピーを 1 つだけ含む個体を選択すること、発現が適切なレベルかを判断すること、また同型接合の導入遺伝子が宿主ゲノム中で安定であることを立証することは、トランスジェニック系統を確立することを意図した育種計画によって可能になる。こうした要素がいったん決定されれば、その導入遺伝子は、宿主に内在する「正常な」遺伝子としてふるまうことになる。

胚性幹細胞 (ES 細胞) 胚性幹細胞 (ES 細胞) とは、初期胚由来の細胞で、培養中で成長させてから受容体の胚に戻すことができ、そこから分化した細胞が、発生する生物の全組織のもとになる (Evans & Kaufman, 1981)。培養期間中に外来 DNA を簡単な方法で細胞に導入することができ、導入遺伝子の発現や安定性を検証することが可能である。ES 細胞の大きな利点は、宿主ゲノムにきわめて微細な改変をも導入することができる点である (Thomas & Capecchi, 1990)。コンストラクトは、宿主遺伝子と相同でありながら、その遺伝子配列が途切れていたり、改変された部分を含むように構築することができる。まれに、*in vitro* での DNA のトランスフェクションによって、導入遺伝子と内在遺伝子の相同性に基づく内在遺伝子への導入が起こることがある。この方法では、それらの遺伝子配列を、1 塩基対の変更から、タンパク質コード領域の大部分を欠失させることまで、どんな微妙なレベルでも変えることができる (Bradley, 1993)。現時点では、この高度な手

法は哺乳類種、主に齧歯類だけに適用されている。このきわめて貴重な技術を農業上の重要種に利用するため、在来種から信頼性の高い ES 細胞培養系を得ることに世界中で多くの努力と多額の費用がつき込まれている (Notarianni et al., 1990)。

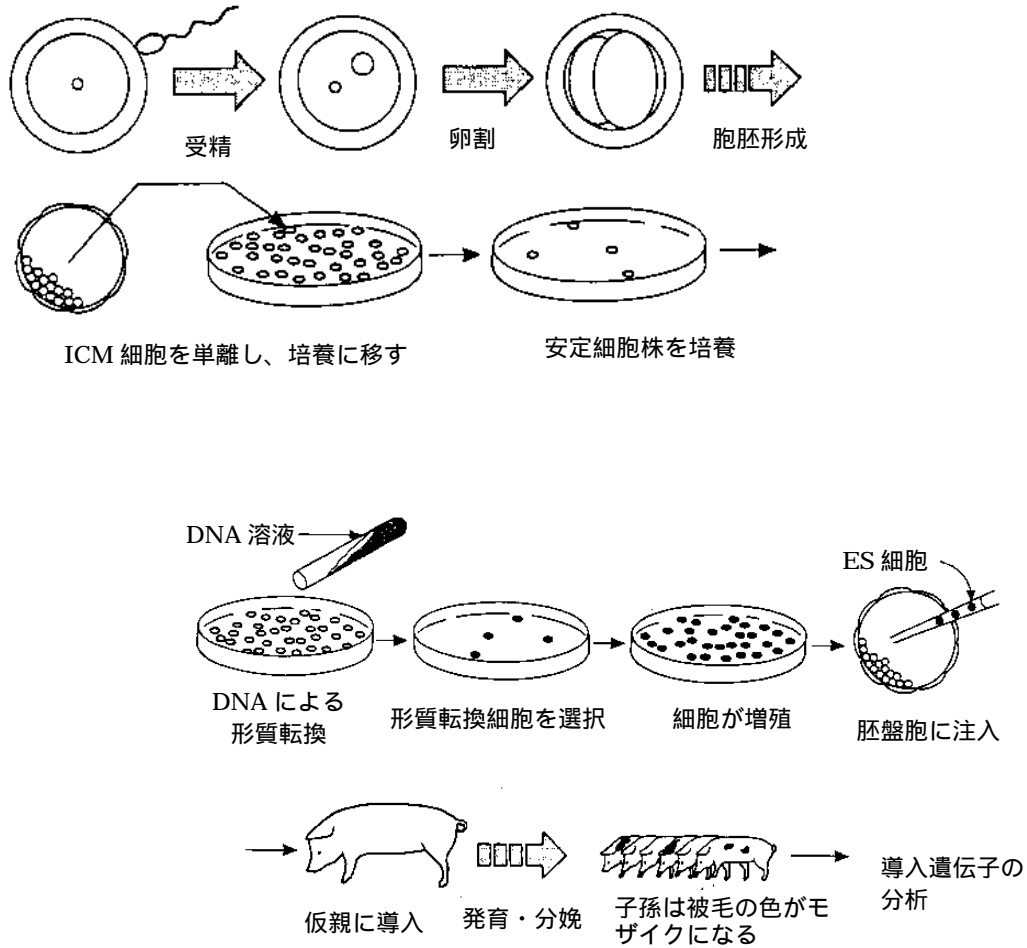
図 7.1 トランスジェニック動物作出の 4 つの主な方法

(a) マイクロインジェクション法



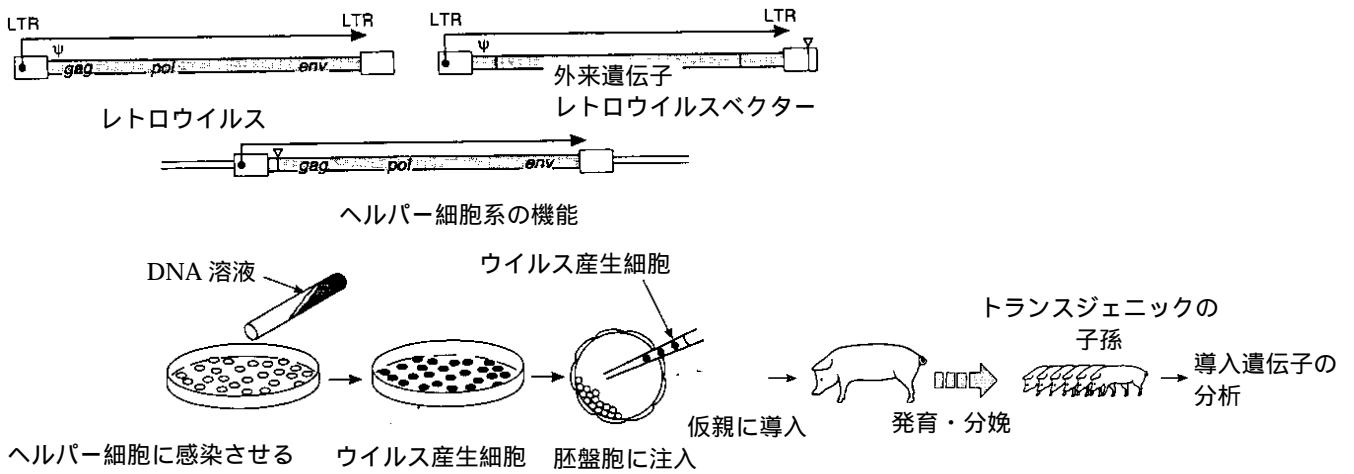
(a) DNAを胚に導入するもっとも一般的な方法は、マイクロインジェクション(顕微注入)である。受精後すぐに、微小ガラス管を大きい方の雄性前核に挿入し、 $10^{-12}$ mlを注入する。DNAを注入された胚は仮親に移し、産み月まで育てる。この操作を行った胚の8つにつき1つが生き残り、そのうち、5分の1が導入された遺伝子のコピーが含まれる。

(b) ES 細胞



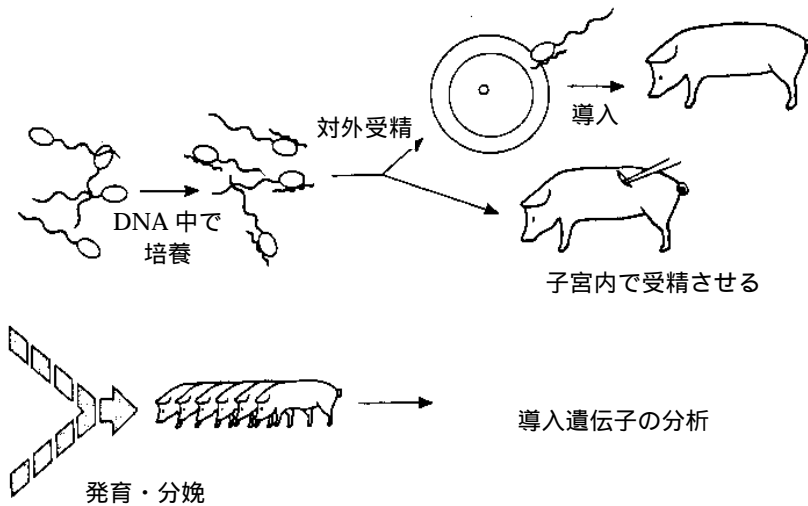
(b)ごく最近の手法では、シャーレの中で胚盤胞の内部細胞に由来する初期胚細胞を培養樹立する。DNAは、in vitro でこの胚性幹細胞 (ES 細胞) 上に導入すればよく、導入遺伝子を含み適切に形質転換した細胞を選択し、分離して増殖させる。選択した細胞のいくつかを、分化して最終的に生まれる動物のあらゆる組織になる能力を持つ胚盤胞に注入する。供与側と受容側の胚盤胞が由来する動物の被毛の色が異なっている場合、トランスジェニック細胞を含むモザイク個体は、供与細胞の被毛の色が一部に現れることによって同定することができる。この操作の成功率は高く、通常、マウスの 2 匹に 1 匹には一定のトランスジェニック細胞が含まれる。

(c) レトロウイルスベクター



(c) 無力化したウイルスベクターを用いる方法もある。ウイルス DNA を宿主染色体に導入するのに必要な配列 (配列という) だけを含むベクターが、遺伝子工学によって作りだされている。これら欠損ウイルスベクターは、約 7,000 塩基対の外来 DNA を運ぶことができる。ヘルパー細胞はウイルスの機能を持つが、配列は含んでいない。この培養細胞を用いて、外来 DNA (ウイルスベクター) をウイルス粒子にパッケージングし、これらの欠損ウイルス粒子を初期胚の細胞に注入すると、導入遺伝子を宿主染色体に高い効率で組み込むことができる。

(d) 精子ベクターによる導入



(d) 精子ベクターによる導入では、特殊培地中で DNA を精子と混ぜる。DNA は精子に付着する (一部が入り込むこともある)。処理された精子を用いて、in vitro で受精させるか、子宮内に外科的に移植して受精させる。

レトロウイルスベクター レトロウイルスベクターは、1980年代初期に開発されて以来、大きな期待を持たれている (Miller et al., 1983)。レトロウイルスは、複製の過程で自身の DNA コピーを作る RNA ウイルスで、この DNA コピーが宿主細胞のゲノムに組み込まれる。組換え DNA の手法を用いることによって、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子を、宿主ゲノムへの DNA の組み込みに必要な配列だけを残して取り除くことができる。こうすることによって、外来 DNA がウイルス配列に組み込まれ、削除されたウイルスの機能を提供する「ヘルパー」細胞系を使って受容体の細胞に移行させることができる。発現の安定性の問題やウイルスベクターの安全性への懸念から、こうした実験は動物バイオテクノロジーの分野に限って行われてきた。しかし、レトロウイルスベクターは、トランスジェニックの家禽類の作出に使われたり (Salter & Crittendon, 1989; Chen et al., 1990) (このときはじめてレトロウイルスが見出された) また、ヒトへの遺伝子治療の手法としては現在のところ唯一の方法でもあるため (Anderson, 1992; Fox, 1993) 家畜種への利用が再び盛んになる可能性もある。

精子ベクターによる DNA 形質転換 精子ベクターによる DNA 形質転換は、もっとも広く適用できる可能性を持つ一方で、これまでの実績ではきわめて信頼性に欠ける技術である (Brinster et al., 1989; Gandolfi et al., 1989; Lavitrano et al., 1989)。これは非常に単純な手法なので (基本的には、DNA に精子を混ぜ、in vitro で受精させる) 世界中の実験室で行うことが可能である。しかし、信頼性が低いことと、導入遺伝子の安定性が疑問視されることが相まって、この技術は研究段階にとどまっている。

エレクトロポレーション法などの他の手法も試みられており、「伝統的な」手法では実現できなかった一部の分野で利用法が見出されている (Xie et al., 1993)。

### 組換えタンパク質

医学や獣医学の分野では、多くの治療用タンパク質が使われている。これらの大部分は、動物やヒトの組織に由来するものである。ブタやヒトの下垂体から抽出したごく低濃度の成長ホルモンなどを精製することが可能になっており、また、ヒトの血液の第 因子も許容できるレベルにまで精製されている。最近の懸念は、こうしたヒトや動物の組織が遅発性ウイルスやレトロウイルスに汚染される可能性に集中している。折りよく、こうした懸念は組換え DNA 技術の発展と同時期に生じてきており、さまざまな合成法が利用できるようになった (Goeddel, 1990)。現在使用されている主な方法と開発中の技術のいくつかを表 7.2 に挙げる。

表 7.1 動物種における遺伝子導入の手段

方法	概要	長所	短所	参考文献
1. マイクロインジェクション	DNA を前核（哺乳類）または核領域（魚類、鳥類）に微量注入する。	確立された手法である。モザイクが発生する頻度が低い発現が十分に確認されている通常、安定に導入できる。	機器が複雑で高価。	Brinster et al., 1981; Pursel et al., 1989; Archibald et al., 1990; Ebert et al., 1991; Wright et al., 1991; Clark et al., 1992; Love et al., 1994
2. ES <sup>【脚注a】</sup> 細胞	in vitro で樹立した DNA コンストラクトを胚細胞にトランスフェクトし、選別後、胚に導入する。	確立された手法である（齧歯類において。家畜ではまだ実験段階）導入の信頼性、安定性がある。発現が十分に確認されている微妙な改変や遺伝子を欠損させることが可能。	非常に複雑細胞の培養条件が難しい。第 1 世代のトランスジェニック動物がすべてキメラであるコストがきわめて高い。	Evans & Kaufman, 1981; Notarianni et al., 1990; Thomas & Capecchi, 1990; Bradley, 1993
3. ウイルスベクター	ヘルパー細胞株を用いて、改変したベクターをウイルスにパッケージングする。できた欠損ウイルス粒子を宿主の胚細胞に感染させる。	確立された手法である。核への注入や ES 細胞による方法が不可能な場合には、この方法が主になる。	発現が不安定になることがある。内在性ウイルスとの組換えが起こる心配がある。ヘルパーウイルスが混入する心配がある。	Huszar et al., 1985; Yu et al., 1986; Sltter & Crittendon, 1989; Chen et al., 1990
4. 精子ベクターによる導入	DNA を付着させる精子と混ぜる。DNA は、in vitro での受精（IVF）中に卵に移行させる。	きわめて簡便で、特殊な機器や培養を必要としない。	検証されていない。導入が不安定？発現が不安定？	Brinster et al., 1989; Gandolfi et al., 1989; Lacitrano et al., 1989
5. エレクトロポレーション	DNA 溶液中の細胞が瞬間的な高圧の電気パルスによって送り込まれる間に、DNA が細胞中に入り込む。	各種の細胞に利用できる可能性がある。培養細胞には信頼性が高い。	未発表の成功報告がいくつかあるものの、ほとんどの動物細胞では検証されていない。	Chen & Powers, 1990; Xie et al., 1993

【脚注 a】 ES 細胞：胚性幹細胞。詳しい説明は用語集を参照のこと。

表 7.2 組換えタンパク質の生成

宿主生物	長所	短所	例	参考文献
大腸菌	性質がよく知られており、操作が容易 発現系が確立 培養が簡単	通常、タンパク質は細胞中に残る タンパク質が凝集したり分解する場合がある 改質がわずかである	インスリン インターフェロン 成長ホルモン	Goedde et al., 1979a, b; Strueli et al., 1982
酵母	使用の歴史が長い 培養が簡単 発現系が確立	タンパク質の改質が正確でない場合がある タンパク質が凝集する場合がある	肝炎抗原	Valenzuela et al., 1982
培養細胞	改変タンパク質の移行 発現系が確立している	培養細胞の汚染のリスクがある 培養細胞が高価	エリスロポエチン 組織プラスミノゲン活性化因子	Kaufman et al., 1985; Goto et al., 1988
動物	「繁殖」が簡単（自己繁殖する） 改変が正確 一部は発現系が確立している	操作が困難 実績が少ない	$\alpha_1$ -抗トリプシン 組織プラスミノゲン活性化因子	Archibald et al., 1990; Ebert et al., 1991; Wright et al., 1991; Swanson et al., 1992; Carver et al., 1993

大腸菌 大腸菌 (*Escherichia coli*) は、組換えタンパク質を効率的に生産するために 15 年以上前に使われ (ジェネンテック社がヒトインスリンを合成したのは 1978 年)、現在でも一般的な手法として用いられている。各種の発現ベクターがあり、簡便な精製法が多く開発されてきた。グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) 融合ベクターはその一例で、GST 部分が還元型グルタチオンを含むカラムに吸着するため、融合タンパク質は容易に単離できる。こうしたベクターには、GST と異種タンパク質との間にプロテアーゼ認識部位 (通常、トロンピンまたは第 a 因子) が含まれている。GST 部分は、タンパク分解による切断によって、精製した融合タンパク質から取り除くことができる。

この方法のもっとも一般的な問題は、産物の溶解性が低いことや翻訳後修飾が不適切な点である。発現産物が不溶性の合成物として沈着することは、きわめてよく起こる現象である。不適切な修飾は、進化の名残りである。細菌の細胞と真核生物の細胞とでは、糖鎖付加、硫酸化、タンパク分解による切断が異なることが多い。多重修飾のポリペプチドを作るためには、真核細胞系を選ぶのが最適である場合が多い。

酵母系 酵母系の長所は、酵母の培養が長年にわたって発酵法として一般的であり、技術

が十分に確立している点である。多くの酵母ベクターの系が構築されており、そのほとんどが、発現を効果的にするために酵母の制御配列をもとにしている。硫酸化、糖鎖付加ともに効率的に行うことができるが (Moir & Dumais, 1987) 酵母での糖鎖付加は、高等真核細胞ほど正確でない場合もある。

**培養細胞** 培養細胞は、おそらくもっとも多種の発現系で宿主として用いられてきたと考えられる。DNA は、エレクトロポレーション法、化学的形質転換法、マイクロインジェクション (微量注入) 法、ウイルスベクター法などを用いて導入することができ、哺乳類動物の細胞は、異種タンパク質の生成や治療用モノクローナル抗体の研究に幅広く利用されている。

昆虫細胞で主なベクター系として用いられるバキュウロウイルスは、昆虫の幼虫体内での通常の生活環の中でタンパク質ポリヘドリンを大量に産生する。多くの研究グループが、異種タンパク質の発現を促進するためにポリヘドリン遺伝子由来の制御配列を用いている (Luckow & Summers, 1988)。バキュウロウイルスのゲノムは大きく操作が困難なため、タンパク質の生成効率を最大化するために、さまざまなベクター系が開発されてきた (Davies, 1994)。

**動物** 動物は「バイオリアクター」として使われてきた。乳腺や造血系で過剰に合成されるタンパク質は、組換えタンパク質の生成に回すことができる。こうした実験については、以下の「トランスジェニック動物の利用」で述べる。

## 組換えゲノムの利用

### トランスジェニック動物

動物が家畜化されて以来、伝統的育種法が目指してきたのは、動物の性質を改変して人間にとってより「望ましい」ものにすることだった。その第 1 段階として行われたのは「野生の」行動様式をなくすことであり、最近の例では、動物 1 頭あたりの乳汁の生産は 1945 年から 1983 年の間に 2.5 倍に増加した (Seidel, 1986)。形質転換でも、同様の変化を生みだそうとする場合があり、表現型に微妙な変化あるいは劇的な変化をもたらす手法がある。

1. 形質転換では、ある動物が持つ既存の形質の「改良」を促す場合がある。こうした場合、すでにある有用系統の望ましい形質を固定することを意図した現行の育種法を迂回したり改良するために、形質転換が用いられる。このため、トランスジェニック法は、家畜種の成長を促進するのに用いられることもある (Pursel et al., 1989)。

2. 形質転換では、ある種にまったく新たな性質を導入する場合もある。この方法では、トランスジェニック動物が異種タンパク質を産生する場合もあれば（たとえば、有蹄類の乳汁中の医薬品タンパク質など（Archibald et al., 1990; Ebert et al., 1991; Wright et al., 1991））、新たな病害抵抗性を与えたり（Salter & Crittendon, 1989; Erickson & Izant, 1992）新たな組織適合性抗原や抗体を産生するように免疫系を改変したり（Brüggemann et al., 1991）あるいは新たな消化能を与えて消化の悪い飼料の熱利用を向上させたりする（Hazlewood & Teather, 1988）。

トランスジェニック動物のいくつかの例を表 7.3 に挙げる。

表 7.3 主なトランスジェニック動物

種	導入遺伝子	望ましい・期待される表現型	注釈	参考文献
マウス	MT/hGH	成長促進	遺伝子導入による表現型が示された最初の劇的な例 繁殖力は低下	Palmiter et al., 1983
マウス	MT/GHRH	成長促進	繁殖力が向上 より生理的？	Hammer et al., 1985a
ブタ	MT/GH	成長促進	成長率が向上 成長ホルモンタンパク質の注射時と同様の重症症状がみられる	Hammer et al., 1985b; Vize et al., 1988; Pursel et al., 1990
ヒツジ	BLG/ $\alpha_1$ -AT	乳汁中での医薬品生産	35 ~ 60 g/l のタンパク質	Wright et al., 1991; Clark et al., 1992; Carver et al., 1993
ヤギ	WAP/LAtPA	乳汁中での医薬品生産	3 mg/l のタンパク質 8,000 倍に精製	Ebert et al., 1991
ニワトリ	RSV-MT/bGH	成長促進	100 $\mu$ g/l のタンパク質	Chen et al., 1990
ニワトリ		ウイルス抵抗性	レトロウイルスベクターによるイネ縞葉枯病ウイルス（RSV）抵抗性	Salter & Crittendon, 1989
魚類（コイ）		成長促進	トランスジェニックの魚の約 20% で有効	Zhang et al., 1990

略語の解説：

ALV： - トリ白血病ウイルス、bGH：ウシ成長ホルモン、BLG：  $\beta$ -ラクトグロブリン、env：エンベロップ上の糖タンパク質をコードする遺伝子、GHRH：成長ホルモン放出ホルモン、hGH：ヒト成長ホルモン、LAtPA：持続型組織プラスミノゲン活性化因子、MT：メタロチオネイン、RSV：ラウス肉腫ウイルス、rtGH：ニジマス成長ホルモン、WAP：乳清酸性タンパク質、  $\alpha_1$ -AT：  $\alpha_1$ -抗トリプシン

## 組換えタンパク質

組換えタンパク質は、現在使われている「天然」タンパク質と同じくらい幅広く利用されている（表 7.4）。醸造やチーズ製造から医薬品の製造に至るまで、どのような工業プロセスでも、組換えタンパク質あるいはそうしたタンパク質を産生する微生物を利用することによって改良できる可能性がある（Enari, 1991; Gill & Zaworski, 1991）。実際に英国では、チーズ製造に遺伝子組換えのレンニンが使われたり、パンの製造やビールの試験生産に組換え酵母が使われている。米国食品医薬品局（FDA）は、1991年の時点で、十数件の治療薬とワクチンを承認し、rDNA由来の治療薬やワクチンの臨床試験を800以上認可していた（Miller, 1991）。1992年半ばまでには、こうした医薬品40数種類の使用が複数の国で承認された（Bienz-Tadmor, 1993）。このように、組換えタンパク質は、工業面や臨床面で十分に生活に根づいている。

表 7.4 主な組換えタンパク質

有用タンパク質	疾病 / 病原体	産生系 / ベクター系	参考文献
インスリン (削除)	糖尿病 コレラ	プラスミド / 大腸菌 <i>Vibrio cholerae</i> の欠失 変異体	Goeddel et al., 1979a Levine et al., 1988
O 抗原 ( <i>Vibrio cholerae</i> )	コレラ	<i>Salmonella typhi</i>	Tacket et al., 1990
HIV 抗原	エイズ	ワクシニアウイルス	Moss, 1991
HIV 抗原	エイズ	BCG ワクチン	Stover et al., 1991
神経毒	植物病虫害	バキュロウイルス	Tomalski & Miller, 1992

組換えタンパク質をワクチンや生物農薬として利用することによって、多くの新たな機会が生まれる。組換えワクチンに対する生物の反応の研究によって、細胞性免疫系や体液性免疫系の相対的な寄与についての理解が深まると同時に、組換え抗原を免疫系に提示する最適の方法が明らかになっている。ワクチンの生産には、病原体から病原性を与える遺伝子を削除する方法と、病原体の主要抗原をコードする遺伝子を非病原性ベクター（ワクシニアウイルスやアデノウイルスなど）に挿入する方法の大きく2つがある（Moss, 1991; Jacobs, 1993）。

弱毒化した生ワクチンは、人や動物での予防法として一般的に使用されており、こうした利用は、GMOの最も大規模な導入で非常に大きな成功を収めた例とみなすことができる（Miller, 1991）。欧州では、キツネの個体群に狂犬病が持ち込まれることがよくある。弱毒ワクチンを用いた予防活動では、齧歯類（また、米国の場合、主な媒介動物であるアライグマ）では使用されたワクチンの病原性が残っており、病原性が復帰する可能性があることが明らかになった。大規模環境試験では、組換えワクシニア - 狂犬病表面糖タンパク質ワクチンが、ベルギー南部の2,200km<sup>2</sup>の区域のキツネ個体群における狂犬病の根絶に高い効果を示したことがわかった（Brochier et al., 1991）。この試験のあと、世界保健機

構（WHO）によって、経口狂犬病ワクチンの研究・試験が勧告された（WHO, 1989）。

有害節足動物による作物の食害は、世界中で大幅な生産の減少をもたらしている。こうした有害種のウイルス病原体を予防する可能性として、バキュロウイルスに重点が置かれているが、これはバキュロウイルスが安定的、効果的で、種特異的なためである。しかし、通常のウイルス感染の場合、ウイルスが複製している数日間は、宿主は生きたまま餌を食べ続けることができる。上述したと同様のウイルスベクターは、宿主をより迅速に無力化あるいは死滅させる遺伝子が発現するように改変することが可能である（Tomalski & Miller, 1992）。このほかに、宿主が感染後に摂餌を続けることを可能にするウイルス遺伝子を取り除くという方法もある（O' Reilly & Miller, 1991）。こうした高度な方法によって、安全で効果的に有害生物を防除する可能性が大きくなってきた。

## 現行の規制

### 規制の経緯

規制は、遺伝子組換えが行われている国の数と同じだけ存在する。1991年、国連工業開発機関（UNIDO）は、組換えDNAに関するガイドラインの国際的な統一化を図ることを目的とした取り組みの一環として、「生物の環境放出に関する自主行動基準」（UNIDO, 1991）を公表した。英国では、2つのEU指令（CEC, 1990a, b）および11の手引書（Note of Guidance）が付随する遺伝子改変規制（Genetic Manipulation Regulations : ACGM/HSE, 1989）に加えて、GMOの作出と放出に関する議会制定法が9つある。オーストラリアでは、23の厳しい規制が課されている。多くの国が、現行の法律（動物衛生、環境、食品、化学物質に対する規制など）を使ってGMOの利用のさまざまな側面に対処しようとしており、これらを補うために追加の規制を制定してきた。こうした選択は、いろいろな意味で合理的である。先にも説明したように、組換え製品は、ほとんどの場合、従来技術を使った他の新製品によって生じるのと異なるリスクを示すことはない。この考え方を受け入れるなら、問題となっている安全面、つまり、生物の放出、個人の安全、食品や医薬品の安全性は、現行の法律の対象になるということである。要件として重要なのは、それぞれの国がこの問題に取り組み、評価の体系を確立することである。

規制は、プロセスと製品という大きく2つの陣営に分かれてきた。多くの国では、実験室レベルでの遺伝子操作（すなわち、GMOを作出するプロセス）を規制する方法を選択し、次いで、この規制を大規模利用や放出に拡大してきた。英国はおおむねこうした経緯を経ており、個々のGMOに対する評価（下記を参照）が適用されている。これに対して米国では、相当の議論を経て、いまだに異論は多いものの、生物の性質（製造方法への重点は低い）とその予定放出区域を審査することによってリスクに対処するという、リスクに基づく環境試験の監視方法を確立してきた（Medley, 1992; Miller et al., 1990; Miller,

1991)。

## GMO の作出における安全性

法律がもっとも慎重に検討されなければならない分野は GMO の作出と評価だが、それは、GMO が新規で性質が不明なのがこの段階だからである。英国の場合、規制と付属の手引書が最初に立案されたのは、1970 年代から 1980 年代初めにかけてである。実験規模での作業の危険性に対する認識が高まり、もともとあったガイドラインの多くが修正された (ACGM/HSE, 1989)。とはいえ、こうした規制でも、外来 DNA の発現によるリスクがある場合には、その分類を上レベルに上げるようになっている。同様に、タンパク質産物が毒性を有する場合には、いっそう高レベルの分類が求められる場合がある。その場合、安全基準の評価を適切に行い、場合によって緩和するためには、操作される DNA 配列に関する基本的な理解が欠かせないことは明らかである。そのタンパク質の「侵入性」(すなわち、GMO やその DNA が人体に入り込んで生存する可能性)を示す要素の任意の尺度を用いれば、タンパク質の「発現性」(ベクターの部位がタンパク質のクローンを作るように意図されているかによって規定される)とそのタンパク質による「損傷性」(作業者の健康に対するリスクの指標)が組み合わさって相対リスクの評価が得られ、これによって、実験は 4 つの階級のうちの 1 つに分類することができる。この分類は、非組換えの病原体を用いる作業を基にしたものである。

英国で採択された手引書 (ACGM/HSE, 1989) のうち 2 つ (1 と 5) は、発癌性の核酸配列と真核細胞のウイルスベクターを規制するものである。ヒトへの感染の可能性があるため、こうした系の使用に関する規制は厳しくなっている。しかし、GMO を扱う実験を原因とするヒトへの感染は明らかになっていないことに注意すべきである。

## 封じ込め利用と放出

### 安全性委員会および評価委員会

放出を実施しようとする者は、可能な限り、放出計画の立案時に最大限の配慮をするべきである。そのためには、放出を行う種がトランスジェニックかそうでないかにかかわらず、懸念を引き起こすのに十分な新規性を持つ放出について審査するために、幅広い関心を持つ専門機関が必要になる。そうした機関の役割は、放出問題に関する専門知識を発揮することである。英国の場合、そのような委員会には、放出を計画する人々が多く参加するのはもちろん、研究機関を管理する立場の人間も参加するが、これは安全性への責任がこうした人々にあるからである (Royal Commission on Environmental Pollution, 1991)。さらに、こうした機関には、次のような分野の専門家が参加することも重要になるだろう。

- 1 . 遺伝学
- 2 . 生態学
- 3 . 安全性
- 4 . 分子生物学
- 5 . 植物学
- 6 . 昆虫学
- 7 . 環境衛生

米国の場合、こうした委員会には倫理学者（哲学や宗教の学問的背景を持つ人）が参加するのが一般的である。

委員会の役割は、放出区域の安全が確保されているかを調査すること、既成概念にとらわれずさまざまな角度からリスクを予測するために自分たちのスキルを活用すること、そしてそのリスクの重大性とそれによって生じる結果を評価するように努めることである。初期の段階では、放出案について国民が知らされていることが重要である。放出案を検討する際の開放性は、認められる有害性とそれが起きる可能性の評価法に関する情報を国民に提供し、あらゆる妥当な予防策が取られていることを国民に納得させるのに重要な要素である。

### 組換えゲノムの封じ込め利用

多くのトランスジェニックの動物種では、研究段階での封じ込めは、家畜学優良規範の一環としてすでに実践されている。通常、研究用動物に野生近縁種が近づかないようにするために、特別の配慮がなされる。同様に、特にこの段階ではそれぞれの動物がきわめて「貴重」であるため、環境中への逸脱が起こらないようにするための配慮も行われる。また、研究区域に一般的な害虫が接近するのを防ぐために、従来の害虫防除法も用いられるべきである。こうした制限は、すべてのトランスジェニック動物種に適用される。封じ込めが容易でない生物、たとえば昆虫類や魚類などは、特に注意して維持すべきである。オーバーンにあるアラバマ農業試験場（米国アラバマ州オーバーン）でのトランスジェニックのコイの研究についての評価によると、封じ込め施設への組換え魚の放出では重大な影響はないことがわかった（USDA, 1990）。67 ページに及ぶその評価報告によると、試験場では5つの封じ込め法を検討し、コイの放出につながる洪水などの側面を考慮に入れた。トランスジェニックのナマズの封じ込め放出に関する同様の案も、同等またはより厳しい評価の対象になった（Fox, 1992）。

### 組換えゲノムの放出

## トランスジェニック動物の潜在的有害性

新規の遺伝子型の環境への放出には、数百年の歴史がある。生物的防除の分野では、農学上の重要作物に害を及ぼす生物を根絶する試みの一環として、数百に及ぶ生物が各地で新たに放出されてきた (DeBach & Rosen, 1991)。放出の最初の成功例の1つが、ワタフキカイガラムシの防除を目的として1888年から89年にかけてカリフォルニアで行われた、ベダリアテントウの放出である。テントウムシに関する長い研究の末、ようやくオーストラリア産の適当な種が選択されるに至った。もっと最近の例では、コナカイガラムシ防除のための大規模な試みがアフリカで行われている。この例での捕食動物は、南アフリカ原産の生物である *Epidinocasis Lopezi* である。

こうした放出の歴史では、多くの成功が収められてきた。失敗もあったが、そのほとんどは、捕食者と被捕食者、あるいは宿主と寄生生物の関係についての理解が不十分な場合だった。こうした試み（過去数百年にわたって行われてきたものの多く）から得られた大きな教訓は、放出が行われる場所の生態系について十分に理解することが不可欠だということである。最も重要なのが、宿主集団（植物や動物）の生態系と、その有害生物との関係である。封じ込め施設内で新しい防除剤の有効性を評価することも非常に重要である。リスクを最小限に抑えるためには、こうした段階を経ることが不可欠であることはもはや明らかである。

成功した導入（さらには失敗に終わったもの）をみると、生態系に関する背景知識が必要であることが強調されている。まったく新規の（外来）遺伝子型の環境への導入は、ほとんどの場合、トランスジェニック生物の導入よりもはるかに極端な影響をもたらす。トランスジェニック動物の放出によって生じる有害性に関するデータは、いくつかの分類に基づいて求めることができる（表7.5）。トランスジェニック生物の性質の多くは、実験室や研究区域での評価を通じて、同種の非トランスジェニック個体と比較することができ、封じ込め状況での摂食行動、性行動、攻撃行動、移動を評価することが可能である。こうした有害性のいくつかは、一部の試験には関連性が低いことは明らかだが、ほとんどの国の規制で検討することが求められている。

表 7.5 遺伝子組換え生物 (GMO) の放出による潜在的危険性【脚注 a】

1. 生物について	宿主の性質 遺伝的改変の安定性および性質 実験室での生物の試験と検証
2. 環境について	区域の規模および場所 (所有および安全性を含む) ヒトなど他の生物との近接性 放出区域の生態系および予想される影響 標的生物相 (捕食生物など) の放出、非組換え生物に関する既知の影響、組換え生物に関する既知の影響 区域への放出数、放出の頻度、放出の期間 生物の行動様式による改変の自然生息地における影響 モニタリング 動物の追跡方法とその期間
3. 定着および伝播	人為的ストレスに対する感受性 定着能および遺伝物質の伝達能に影響を及ぼすように意図された改変の詳細な内容 導入 DNA が他の生物へ伝達する可能性および伝達をモニタリングするための方法
4. 安全性	必要以上の生物の除去 区域での作業者の安全性および作業者への教育 トランスジェニック生物による予期しない影響が生じた際の緊急時対策 物理的封じ込めおよび封じ込めが破られた場合 (養魚池の氾濫など) の緊急時対策 実験の終了および改変生物の廃棄の手順

【脚注 a】 GENHAZ の提言に基づく (ACGM/HSE, 1989)

#### 組換えタンパク質の潜在的危険性

組換えタンパク質に付随する有害性は、ほとんどの場合、そのもとになる産物に付随する危険性と同種のものである。ヒトの場合、アレルギー反応や、現在使われているインスリンなどの治療薬の使用によって生じるような副作用といったリスクがある。こうしたリスクは、組換え遺伝子技術を使うことによって増大する。

食品の安全性については、現在いくつかの機関が取り組んでいる (WHO, 1991; OECD, 1992)。最近の懸念は、乳汁の生産を上げるためにウシ成長ホルモン (ウシソマトトロピン、bST) を使用することや、魚の「毒性」遺伝子が活性化する可能性など、多種多様な分野にわたっている。ウシソマトトロピンを注射することによって、乳牛の乳汁生産を 10 ~ 15% 増加させることができる。ヒトの健康への懸念は、使用される bST による影響がないかどうかに絞られる。実際のところ、成長ホルモンは、摂取すると不活性化され、この点に関する懸念は充分解消していると思われる (Juskervich & Guyer, 1990)。

魚の場合は、問題がより複雑である。導入遺伝子の組み込みや発現の影響で魚の毒素遺伝子が活性化する可能性はないだろうか。こうした心配がされるのは、魚が毒素遺伝子を含んでいるのではないかという疑いがあるためだが、現状では、そうした証拠はない

(Berkowitz & Sørensen, 1994)。たしかに、一般的な食用魚種から毒素が検出されたこととはなく、有毒魚(フグなど)においてさえ、毒素を産生するのは共生細菌だと考えられる。

新規の方法では、望ましくない結果や副作用が生じる可能性があることを考慮することが重要だが、現在行われていることに照らしてリスクのレベルを検討するという合理的な方法によって、こうした可能性に対処することも重要である。

## 安全性とリスクの評価 トランスジェニック動物

### トランスジェニック動物

英国では、現在、放出の準備手続きは GENHAZ システムの対象になっている (Royal Commission on Environmental Pollution, 1991)。これは、化学工業の評価システムをもとにしたもので、評価者に対して、たとえどんなに起こりそうになくとも、放出による潜在的影響を検討させ、さらに重要な点として、可能な限り正確に結果を予測させることを意図している(表 7.6)。本章の執筆時点で、このプロセスは見直しの最中であり、英国のバイオテクノロジー規制は、「用心が度を超しており、時代遅れで、非科学的であり、学術研究者にも企業にも不必要な重荷を課している」として、上院の科学技術特別委員会の批判を受けているところである (UK House of Lords's Science and Technology Select Committee, 1993)。新たな案では、「経験」と「精通性(ファミリアリティ)」に重点を置いた簡素化された手法と、潜在的有害性のある利用や非常に新規な利用に限って厳密な検討を行うことが提案されている。ただ、国内での実績のない新規ゲノムの放出に適用できる原則を調べることは有益である。理解と精通の度合いが上がるにつれて、こうした厳格な手法は必要でなくなるだろう。基本的な要素は、こうした疑問点を生成するのに役立つ一連のキーワードや参照語(guide word)である。そうした参照語の1つが「WHERE ELSE(どこか別の場所で)」というものだが、これは解説が必要かもしれない。DNAが本来の導入部位以外の場所で検出された場合、何が起きるだろうか。目的部位以外の組織で発現が起きた場合、何が起きるだろうか。意図した放出区域以外の場所でその生物が見つかった場合、何が起きるだろうか。広範な知見を背景として、こうしたキーワードと参照語の組み合わせを検討することによって、起こりうる(と同時に起こり得ない)結果の大部分は明確になるはずである。

GMOの放出による影響は、その生物が速やかに回収できない場合に、より深刻になることは明らかである。トランスジェニックの魚は、その典型的な例である。魚類の系統には、成長ホルモン(GH)遺伝子や寒冷耐性遺伝子が導入されてきた。そのどちらも実験段階では成功していると考えられる。つまり、GH遺伝子を含んだトランスジェニックの魚は、非トランスジェニックの近縁種よりも大きくなり、同様に、耐冷遺伝子を用いるこ

とによって、寒冷耐性に優れた魚が得られている。

表 7.6 GENHAZ の概要

---

遺伝子組換え系の構成要素

コンストラクト rDNA の構成要素  
受容体 宿主生物  
産物 GMO

放出の段階

受容体の“作出”または“選択”、コンストラクトの作成、産物の作出

産物の環境中への“放出”

“定着”：産物が放出環境中で定着する（あるいは定着に失敗する）期間

“個体群”：最初の定着期間に続く、成長、伝播、生殖のパターン；産物と放出環境との相互作用

“遺伝的伝達”：DNA の意図しない伝達

“モニタリング”：放出の監視

“終了および処分”：試験の完了または事前の打ち切りが必要になる場合の計画

GENHAZ の手続き

“逸脱”を生成するための参照語の適用

それぞれの“逸脱”による“結果”の生成

それぞれの“結果”の検討

“行動”によってそれを避ける必要があるかどうかの判断

現実的な理由があるかどうかの判断

どのような“行動”を取るべきかの決定

参照語（Guide word）

NO または NOT 計画の完全な打ち消し（遺伝子がベクターに導入できない場合など）

MORE 量的な増加（遺伝子の発現レベルが予想より高い場合など）；持続期間または頻度といった時間に適用される場合もありうる

LESS 量的な減少（意図したトランスジェニック動物の繁殖不能性が不完全な場合など）；持続期間または頻度といった時間に適用される場合もありうる

AS WELL AS 質的な増加：意図した目標以上のことが生じる（遺伝子産物の標的外の昆虫が死滅する場合など）

PART OF 質的な減少：意図した目標以下のことが生じる（受容体に挿入された遺伝子の1つが発現しない場合など）

OTHER THAN 意図した目標と大きく異なることが生じる（間違ったコンストラクトが挿入される場合など）

WHERE ELSE 意図された事象が計画以外の場所で生じる（遺伝物質またはその発現産物が計画以外の場所で生じる場合など）

WHEN ELSE 予期したとは異なる時期に何らかの影響が現れる（それが改変の目的ではないにもかかわらず、組換え動物が非組換え体よりも早くまたは遅く性的成熟に達する場合など）

---

GENHAZ<sup>65</sup>に含まれる提言に基づく

直感的に考えて、こうした個体群のどちらも自然生態系に脅威を与える、つまり、その大型の魚は摂食行動がより積極的で、水が冷たい場所では耐冷性の魚が自然種に取って代わることが想像できる。トランスジェニックのコイの封じ込め放出では、これに反する事実がいくつか出ている（USDA, 1990; Fox, 1992）。

1. 魚が逃げ出すことはまず起こり得ない事象で、1回の逸脱で、環境中で新規の遺伝子型が定着するのに必要な多数の魚が含まれる可能性はない。
2. 成長試験に選択されたカガミゴイは、自然の在来種よりも耐寒性が低く、選択的に不利な立場にある。
3. 逸脱する少数の魚が、環境に定着（固定）する可能性は低く、生息区域の面で孤立するだろうし、繁殖相手は近縁の非トランスジェニック種ではないと考えられる。
4. 導入遺伝子は、正の選択圧が働かない限り、自然の個体群中で定着する可能性は低い。
5. 仮に導入遺伝子がある場の環境に定着したとしても、自然のコイに影響を及ぼす生物学的なコントロール（病害、捕食生物、餌不足）の範囲内にとどまる。

つまり、周到に計画された放出においては、生態系バランスに影響する人為的な要因だけでなく、（おそらくはもっと重要な）自然の生物学的バリアをも明らかにすることが可能である。通常、GMOは弱いため、自然の近縁種の在来系統について、つまりどのような種類のバリアが働くかは、必要ならばある程度詳細に調査することが可能である。

リスク評価においては、研究機関とは独立の管轄当局によって審査が行われるべきである。通常、国の審査機関が設立されるが、現在はもちろん、今後も重要性が高まるのは、そうした国の機関がお互いに連絡を取り合うことである（以下を参照）。国の諸機関が連絡を取り合うことによって、過去の実績をもとに審査を簡素化する際の情報の共有が可能になる。放出の審査のために設置される委員会のメンバーが持つ多くの専門知識をそれぞれの機関が所有することになり、さらには、国内の法規制を審査する担当者の参加が得られることになる。

## 安全性およびリスクの評価 組換えタンパク質

世界中の多くの国は、新規の食品、医薬品、バイオ工業製品を評価するためのガイドラインを設けている。これらの評価手順では、新たな治療薬の評価に何年もかかる場合があるが、遺伝子操作によって作成されたタンパク質の評価を行うための手法の大部分あるいはすべてはこの手順に示されている。実際、組換えタンパク質は、従来手法で生産された新製品よりも、もともとなる製品との類似性のほうが高いことが多い。ところが現在EUでは、遺伝子操作によって得られた食品に対して新たなレベルの監視をしようという提案がなされている。これに対して、米国FDAやOECDは、新たな食品はその性質の新規性を基準に評価すべきであるとの判断を示してきた。これが実行されるにつれて、製品の性質や個々の製品における影響から考えると、より妥当なのはこちらのアプローチであると思われる。

最近、米国では、新規の医薬品を評価するための新たなガイドラインが導入されている。エイズ団体からの経験や知識に基づく率直な批評に促された面もあって、FDA は、試験・承認の迅速化を通じて新規医薬品の発売を促進しようとしている。この例は、慎重かつ極度に綿密な承認を意図した規制体系は、死に直面している個人にとって苛酷な場合があることを、先進諸国に気づかせるのに役立った。通常、規制やリスク評価は費用と便益の均衡政策であり、個人が負う費用が時には絶対であることを認識する必要がある。

## 放出後の影響

放出を管理することによって、数回の繁殖シーズンを通じて GMO の性質を判断する時間が与えられる（図 7.2）。実験室での試験によって、GMO の挙動に生じうる変化の多くが明らかになるが、挙動を十分に評価することができるのは、より自然に近い環境においてである。必要が認められる場合には、封じ込め放出を行うことによって、自然種との競合状態での挙動を調査することができる。こうした考え方の多くは、通常の優良農業規範の一部のはずである。在来の動物や魚類の新しい系統は、通常、既存の生物に代わって大規模に使用される前に試験が行われる。たとえばトランスジェニック以外の手段によって牛の乳汁生産を増加させようとする場合、表現型の安定性を判断し、生物への有害な影響を見出すために、そうした評価を数世代にわたって行うことになる。あらゆる伝統育種法では、満足のいく育種系統が確立されるまでに、こうした手順が不可欠である。同じように、十分に新規であったり、性質がその親動物と十分に区別できる GMO の管理された放出によって、こうした相違による影響を調査する機会が与えられる。

つまり、伝統育種法での常識は、主な動物の異種交配によって生みだされる系統と同じように、GMO の常識にもあてはまる。水産養殖の場合、新規の食用種の導入には、遺伝子改変魚の系統を使用するのと同様の注意と配慮が必要である。

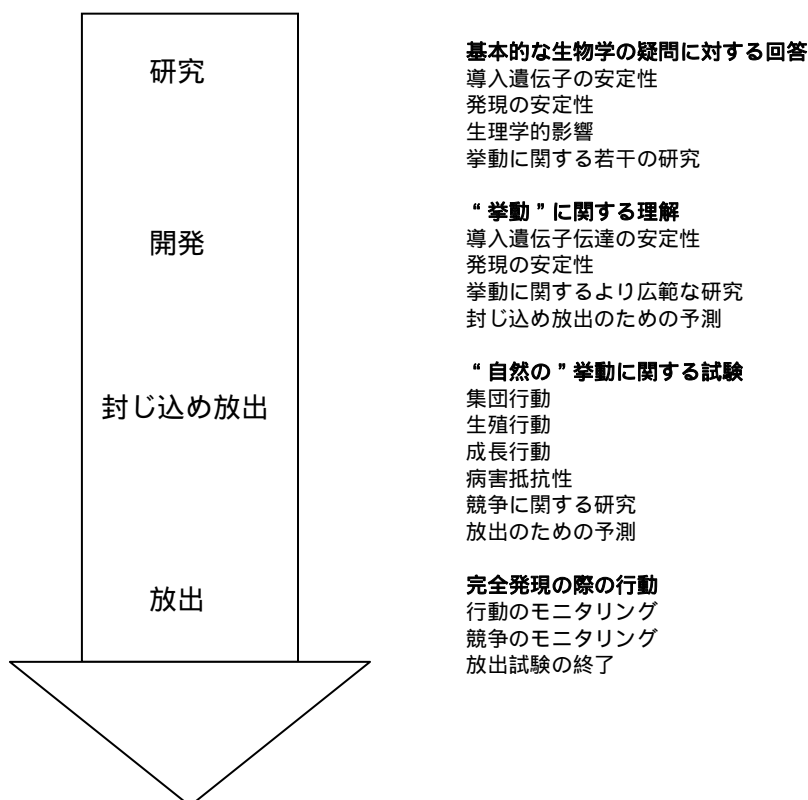
## まとめ

### 生物学、常識と放出

トランスジェニック動物や組換えタンパク質の章を執筆する上で困難なことの 1 つは、組換えゲノムという分野が、きわめて広範な技術、計画、期待、そして有害性を包含する領域であることが極めて明らかな点である（同様に、読者にとっても明らかだと思う）。伝統育種法や品種改良法がお互いに共通点があるのと比べると、これらの手法には相互の共通点が少ないことが多い。こうした手法で改変された生物に付随するリスクを検討する場合、生物学的な原理や指導原理によれば、有害性を主に決定するのは動物やタンパク質の性質であって、その動物やタンパク質を得た手段ではないはずである。この議論を受

入れることは、現行の法律を使って組換え DNA の放出の規制が行えることを意味することになるだろう。遺伝子操作の産物は、ほとんどの場合、伝統的方法で作られた新規の食品やタンパク質、作物と比較することができるが、「伝統的な」製品についてよりも GMO で起こっている遺伝的变化のほうが、はるかによくわかっている点だけは異なる。大部分の国には、有害性、病原性や外来性の生物、承認されていない医薬品や化学物質、さらにそれらの試験に対して適用される法律がある。おそらくそうした法律によって、十分な規制監視ができると考えられる。外来の（非改変の）生物の管理がどのくらい難しいかは、過小評価すべきでない問題である。米国には毎年、さまざまな非意図的な導入によって有害と考えられる生物が 11 種前後入り込んでおり、そのうち 7 種は害をもたらしている可能性が高い( DeBach & Rosen, 1991 )。人為的な側面もある。1986 年に USDA は、持ち込まれようとした約 50,000 の外来生物の侵入を港の税関で阻止した。農業や工業で「伝統的に」行われている手法が、同じ問題に対するバイオテクノロジー手法に比べて精巧さに欠け、より有害性を持つかもしれないことを思い起こすことが重要である。

**図 7.2 新規ゲノムおよびタンパク質の評価段階**



左側の矢印で示したように、評価は継続的なプロセスである。GMO に関して大きな不確定要素が存在するのは、研究・開発の段階、特に遺伝子改変の安定性と表現型の安定性の関係である。GMO の性質が十分に明らかにされて放出が検討できるようになるまでには、これらの疑問（主に GMO に固有なもの）への回答がなされているべきである。封じ込め放出と完全放出の段階で残っている疑問は、あらゆる新規の遺伝子型に付随する疑問である。GMO の場合、こうした評価において精通性（ファミリアリティー）が大きな役割を果たす可能性がある。

遺伝子操作に関する国民の認識は、これとは対照的であるに違いない。遺伝子操作によって作り出された変化は、伝統的手法によって生みだされる変化よりも精緻で、予測可能性が高く、より性質が明らかなが多いということ、国民、つまり消費者が認識することが重要である。しかし、倫理的な理由を背景に、すべての動物、あるいは特定の動物の使用に反対するグループが多くあることを念頭に置く必要がある。こうした人々の一部にとって、ある種の遺伝子操作は、断じて受け入れがたいものであるかもしれない。英国の敬虔な宗教団体の多くは、ブタの配列をもとにした DNA を含む食品は、たとえその DNA が試験管内で合成されたものであっても、受け入れないだろう。しかし、伝統的手法と組換えの手法の性質についてや、外来 DNA（実際には、ほとんどが大腸菌内で作られる）の存在について教育を行うことは、組換え DNA が宿主生物の性質を根本的に変えるものではないことを、人々に改めて確認させるのに役立つ可能性がある。

しかし、最近、規制に関する議論は高まってきている。米国では、およそ 1,000 件の遺伝子改変植物の放出または移動で得られた経験から、規制による「・・・監視は、従来の植物に対してこれまで適用されてきた監視と同等の、潜在リスクがあるという科学的徴候に見合ったものにすべきである」という提案が行われるようになってきた（Hunter et al., 1992）。しかし、FDA が主導する政策はいまだ立案中であり、ジェレミー・リフケンが主導する圧力団体のピュアフード運動や、最近では、憂慮する科学者同盟が、国民の議論を再燃させ、それをトランスジェニック製品反対へと向けようとしている（Hoyle, 1992, 1994）。欧州の規制に対する批判が起きたのは 1989 年で（Millier, 1991）それ以来、厳格な規制の必要性とその投資に及ぼす影響に関する議論が盛んに行われている（Young & Miller, 1989; Hodgson, 1992; Kathuri et al., 1992）。現在は、多くの放出が、もともと提案された規制よりはプロセスに基づく度合いの少ない新たな規制のもとで行われることになるとみられる。ただし、こうした案を部分的にでも承認しているのは、12 の EU 加盟国のうち 6 カ国だけである。

投資機会に関する企業の見方にとって、規制による決定はきわめて重要な要因であることを認識する必要がある。ドイツのバイエルとデンマークのノボ インダストリーの両社は、厳しい規制への対応の一環として、国外に大規模な研究開発施設を設立した。つまり、規制の問題には 2 つの側面がある。規制がきわめて厳格だと、投資は抑えられる可能性がある。反対に、バイオテクノロジー企業は、規制の枠組みが設けられていない国にも投資を控える。必要なのは、各国が、国内のニーズに対処すると同時に、一般的な政治的、社会的問題である国際的な視野に立った枠組みを設けることである。また、最近、議論されているのは、途上国にとってのバイオテクノロジーには社会、経済、技術のさまざまな意味合いがあるという点である（DaSilva et al., 1992）。

## 法律の立案

こうした社会・経済上の制約を念頭に置いた上で、法律の立案方法や、新たな法律に何が必要かを自らに問いかけてみるのが有用かもしれない(表 7.7)。その出発点は、現行の法律を検討して、GMO の放出に関する大部分、できればすべての側面をカバーすることができるかどうかを判断することである。すべての国は、GMO の作出に関する安全性やリスクの評価は、法律を必要とする特殊な区分を形成すると考えている。これは、多くのクローニング実験で、作りだされた産物の正確な性質を予測することができないという考えに基づいている。トランスジェニック動物やタンパク質の放出や使用に関しては、多くの国が現行の(おそらくは改正された)法律を運用している。そうした法律として、英国では環境保護法や食品環境保護法などがあり、米国の場合、バイオテクノロジーによる製品を規制するのに現行法(動物検疫法など)で充分であることが、バイオテクノロジーの規制に関する調整された枠組みによって規定されている。

適切な現行法がない場合、本書での議論や、「生物の環境への放出に関する自主行動規範(Voluntary Code of Conduct for the Release of Organisms into the Environment (UNIDO, 1991))による指針が、一般的な原則としての枠組みを提供する。

## 国際的な情報源

複数の国際機関が国際間のバイオセーフティの整合化や統一化を図ろうとしているが、それはこの問題が国境を越えた懸念にならざるを得ないからである。UNIDO は、「生物の環境への放出に関する自主行動規範」(UNIDO, 1991)をまとめるための委員会の召集を主導し、遺伝子工学・バイオテクノロジー国際センター(ICGEB)の傘下に、先進国と途上国の間の技術移転を支援することを目的とした研究施設をトリエステとニューデリーに設置した。ICGEB は独立の政府間機関で、その加盟国によって「所有」され、柔軟な対応によって加盟諸国のニーズの変化にもすばやく対応する。また同センターは、世界中のデータベースの多くにアクセスすることのできる ICGEB ネットというコンピュータネットワークを維持している(Simon & Pongor, 1992)。さらに、UNIDO はバイオセーフティ情報ネットワーク・アドバイザーサービス(BINAS)を設置しており、この機関は多くの国での国内拠点指定している。これら BINAS の国内拠点は、バイオセーフティを管轄する当局に対して専門知識や情報の支援を提供することになっている。このように、効率的な情報ネットワークが、バイオセーフティ規制の制定や運営にかかわる中核レベルで設置されるように計画されている。こうしたルートを通じて、情報と専門知識が、公式に、そしてさらに重要なのは非公式にも、交換されることになる。放出を計画している規制当局や国がリスト化されることによって、情報の普及、手続きの合理化、作業の重複の排除への動きが加速する。存在しなかったり重要でない憶測上のリスクに対する不必要な

法律上の負担を取り除いて規制をスリム化するためには、健全な生物学的原理に基づいた安全に対する姿勢を維持すること、世界中に現在ある情報や今後数年のうちに得られる情報を利用することにバイオセイフティ規制の重点が置かれなければならない。

表 7.7 放出に関する法律のためのチェックリスト

<ol style="list-style-type: none"><li>1. 次を対象としたものとして、現在どのような規制が行われているか<ul style="list-style-type: none"><li>・新規の外来生物</li><li>・食品用として作出された新たな動物系統</li><li>・新規の食品または医薬品</li></ul></li><li>2. 次の保護を意図した法律としてどのようなものがあるか<ul style="list-style-type: none"><li>・消費者</li><li>・作業員</li><li>・GMO</li><li>・GMO と相互作用する種</li><li>・環境</li></ul></li><li>3. 遺伝子操作による製品にどのような新規性があるか<ul style="list-style-type: none"><li>・生育および生殖に関する規制</li><li>・病害抵抗性</li><li>・能力の向上（ストレス耐性、飼料効率など）</li><li>・新規タンパク質の生産</li></ul></li><li>4. そうした製品はどのようなリスクを含んでいるか<ul style="list-style-type: none"><li>・あらゆる育種法に共通のゲノムのリスク（行動が攻撃的になる、生態系での範囲が拡大するなど）</li><li>・rDNA の性質に由来する特別なリスク（安定性、遺伝子伝達、新規の産物、新規の発現パターンなど）</li></ul></li><li>5. 組換えゲノムを対象とした新たな法律では以下のことを行う<ul style="list-style-type: none"><li>・GMO に限らず、新規な、あるいはファミリーのない生物の放出すべてを対象とする</li><li>・放出案の提出者とは独立の中立の専門家機関を設置する</li><li>・国際的な実績（データベース、過去の放出）と専門知識を利用する</li><li>・可能な限り実績に基づいた簡素化・一般化を行うために、法律に柔軟性を持たせる</li><li>・国民（消費者）を議論に参加させる</li><li>・商業上の秘密保持に配慮しつつ、評価は常に公開する</li><li>・モニタリングと終了の手順を定める</li></ul></li></ol>
---

## 謝辞

必ずしも筆者と見解が一致するものではないが、本章の作成を助けてくれた多くの人々に感謝したい。特に、きわめて有益な情報を寛大にも提供してくれた米国食品医薬品局の Henry I. Miller、農業害虫衛生検査局（Agriculture, Pest and Health Inspectorate Service）の Tony Medley に感謝する。Gilbert Howe、Morris Levin、Phil Dale、George Tzotzos、1992 年 12 月にトリエステの ICGEB で行われた UNIDO 講座の講義、そして激励してくださった Brian Heap 教授にも感謝する。また、原稿のタイプを担当してくれた Dianne Styles と Linda Notton にもお世話になった。

## 参考文献

- ACGM/HSE (1989) Genetic Manipulations and Supplementary Notes of Guidance (1-11). Health and Safety Executive, London.
- Anderson, W.F. (1992) Human gene therapy. *Science*, 256, 808-813.
- Archibald, A.L., McCleneghan, M., Hornsey, V., Simons, J.P. & Clark, A.J. (1990) High level expression of biologically active human  $\alpha_1$ -antitrypsin in the milk of transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 5178-5182.
- Berkowitz, D.B. & Sørensen, I.K. (1994) Transgenic fish - safe to eat? *Bio/Technology*, 12, 247-252.
- Bienz-Tadmor, B. (1993) Biopharmaceuticals go to market: patterns of worldwide development *Bio/Technology*, 11, 168-172.
- Bradley, A. (1993) Site-directed mutagenesis in the mouse. *Recent Prog. Horm. Res.*, 48, 237-251.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senear, A.Y., Warren, R. & Palmiter, R.D. (1981) Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27, 223-231.
- Brinster, R.L., Sandgren, E.P., Behringer, R.M. & Palmiter, R.D. (1989) No simple solution for making transgenic mice. *Cell*, 59, 239-241.
- Brochier, B., Kieny, M.P., Costy, F., Coppens, P., Bauduin, B., Lecoq, J.P., Languet, B., Chappuis, G., Desmettre, P., Afiademanyo, K., Libois, R. & Pastoret P.-P. (1991) Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature*, 354, 520-522.
- Bruggemann, M., Spicer, C., Buluwela, L., Rosewall, I., Barton, S., Surani, M.A. & Rabbits, T.H. (1991) Human antibody production in transgenic mice: expression from 100 kb of the human IgH locus. *Eur. J. Immunol.* 21, 1323-1326.
- Carver, A.S., Dalrymple, M.A., Wright, G., Cottom, D.S., Reeves, D. B., Gibson, Y.H., Keenan, J.L., Barrass, J.D., Scott, A.R., Colman, A. & Garner, I. (1993) Transgenic livestock as bioreactors: stable expression of human  $\alpha_1$ -antitrypsin by a flock of sheep. *Bio/Technology*, 11, 1263-1270.
- CEC (1990a) Council Directive of 23 April 1990 on the contained use of genetically modified microorganisms. Reference no. 90/219/EEC. *Official Journal L117*, Volume 33, 8 May 1990. Commission of the European Communities, Brussels.
- CEC (1990b) Council Directive of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. Reference no. 90/220/EEC. *Official Journal L117*, Volume 33, 8 May 1990. Commission of the European

Communities, Brussels.

- Chen, H.Y., Garber, E.A., Mills, E., Smith, J., Kopchick, J.J., DiLella, A.G. & Smith, R.G. (1990) Vectors, promoters and expression of genes in chick embryos. *J. Reprod. Fertil.*, (suppl.) 41, 173-182.
- Chen, T.T. & Powers, D.A. (1990) Transgenic fish. *Trends Biotechnol.*, 8, 209-215.
- Clark, A.J., Cowper, A., Wallace, R., Wright, G. & Simons, J.P. (1992) Rescuing transgene expression by co-integration. *Bio/Technology*, 10, 1450-1454.
- DaSilva, E.J., Ratledge, C. & Sasson, A. (1992) (eds.) *Biotechnology: Economic and Social Aspects. Issues for Developing Countries*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Davies, A.H. (1994) Current methods for manipulating baculoviruses. *Bio/Technology*, 12, 47-50.
- DeBach, P. & Rosen, D. (1991) *Biological Control by Natural Enemies*, (2nd edn.). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Ebert, K.M., Selgrath, J.P., DiTullo, P., Denman, J., Smith, T.A., Memon, M.A., Schindler, J.E., Monasterski, G.M., Vitale, J.A. & Gordon, K. (1991) Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk *Bio/Technology*, 9, 835-838.
- Enari, T.-M. (1991) Genetic modification of food and beverage yeast. *Ann. N. Y Acad. Sci.*, 646, 181-192.
- Erickson, R.P. & Izant, J.G. (eds.) (1992) *Gene Regulation: Biology of Anti-sense RNA and DNA*. Raven Press, New York.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.
- Fox, J.L. (1992) USDA snarls at transgenic catfish. *Bio/Technology*, 10, 292.
- Fox, J.L. (1993) NIH/RAC okays gene therapy. *Bio/Technology*, 11, 1227.
- Gandolfi, F., Lavitrano, M., Camaioni, A., Spadafora, C., Siracusa, G. & Lauria, A. (1989) The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J. Reprod. Fertil., Abstr. Ser.* 4, 10.
- Gill, G.S. & Zaworski, P.G. (1991) Use of yeasts in production and discovery of pharmaceuticals. *Ann. N. Y Acad. Sci.*, 646, 173-180.
- Goeddel, D.V. (1990) *Gene Expression Technology*. Goeddel, D.V. (ed.) *Methods Enzymol.*, vol. 185. Academic Press, San Diego, CA.
- Goeddel, D.V., Heyneker, H.L., Hozumi, T., Arentzen, R., Itakura, K., Yasura, D.G., Ross, M.J., Miozzari, G., Crea, R. & Seeburg, P.H. (1979a) Direct expression in *Escherichia coli* of a DNA sequence coding for human growth hormone. *Nature*,

281, 544-548.

- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K & Riggs, A.D. (1979b) Expression in *Escherichia coli* of chemically-synthesized genes for human insulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 106-110.
- Goto, M., Akai, K., Murakami, A., Hashimoto, C., Tsuda, E., Ueda, M., Kawanishi, G., Takahashi, N., Ishimoto, A., Chiba, H. & Sasaki, R. (1988) Production of a recombinant erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned protein. *Bio/Technology*, 6, 67-71.
- Hammer, R.E., Brinster, R.L., Rosenfield, M.G., Evans, R.M. & Mayo, K.E. (1985a) Ex-pression of human growth hormone releasing factor in transgenic mice results in increased somatic growth. *Nature*, 315, 413 - 416.
- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E. Jr, Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1985b) Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection: *Nature*, 315, 680-683.
- Hazlewood, G.H. & Teather, R.M. (1988) the genetics of rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*, Hobson, P.N. (ed.), pp. 323-341 . Elsevier Applied Science, Cambridge, UK.
- Hodgson, J. (1992) Europe, Maastricht and biotechnology. *Bio/Technology*, 10, 1421-1426.
- Hoyle, R. (1992) FDA's slippery food policy. *Bio/Technology*, 10, 935-939.
- Hoyle, R. (1994) A quixotic assault on transgenic plants. *Bio/Technology*, 12, 236-239,
- Hunter, S.L., Arntzen, C., Beachey, R., Breuning, G., Qualset, C. & Vidaver, A. (1992) Re-vising oversight of genetically modified plants. *Bio/Technology* 10, 967-971 .
- Huszar, D., Balling, R., Kothary, R., Magli, M.C., Hozumi, N., Rossant, J. & Bernstein, A. (1985) Insertion of a bacterial gene into the mouse germline using an infectious retroviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 8587-8591.
- Jacobs, S.C. (1993) A novel recombinant adenovirus vector expressing a flavivirus non-structural protein protects against lethal flavivirus challenge. *Clin. Sci.*, 85, 117-122.
- Juskervich, J.C. & Guyer, C.G. (1990) Bovine growth hormone: human food safety evaluation. *Science*, 249, 875-884.
- Kathuri, C., Polastro, E.T. & Mellor, N. (1992) Biotechnology in an uncommon market. *Bio/Technology*, 10, 1545-1547.
- Kaufman, R.J., Walsey, L.C., Spiliotes, A.J., Gossels, S.D., Latt, S.A., Larsen, G.R. & Kay, R.M. (1985) Co-amplification and co-expression of human tissue-type

- plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 1750-1759.
- Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V.M., Dolci, S., Farace, M.G. & Spadafora, C. (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: genetic transformation of mice. *Cell*, 57, 717-723.
- Levine, M.M., Herrington, D., Losonsky, G., Tall, B., Kaper, J.B., Ketley, J., Tacket C.O. & Cryz, S. (1988) Safety, immunogenicity and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines CVD-103 and CVD-103-HGR. *Lancet*, ii 467-470.
- Love, J., Gribbin, C., Mather, C. & Sang, H. (1994) Transgenic birds by DNA microinjection. *Bio/Technology*, 12, 60-63.
- Luckow, V.A. & Summers, M.D. (1988) Trends in the development of baculovirus expression systems. *Bio/Technology*, 6, 47-51.
- McDley, T.L. (1992) Status of regulatory approval of biotechnology-derived plants and animals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 151-155.
- Miller, A.D., Jolly, J.D., Friedman, T. & Verma, I.M. (1983) A transmissible retrovirus expressing human hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT): Gene transfer into cells derived from humans deficient in HPRT. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 4709 - 4713.
- Miller, H.I. (1991) Regulation. In: *The Genetic Revolution*, Davis, B.D. (ed.), pp. 196-211, The Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD.
- Miller, H.I., Burris, R.H., Vidaver, A.K. & Wivel N.A. (1990) Risk-based oversight of experiments in the environment. *Science*, 250, 490 - 491.
- Moir, D.T. & Dumais, D.R. (1987) Glycosylation and secretion of human  $\alpha_1$ -antitrypsin by yeast. *Gene*, 56, 209-217.
- Moss, B. (1991) Vaccinia virus - a tool for research and vaccine development *Science*, 252, 1662-1667.
- Notarianni, E., Laurie, S., Moor, R.M. & Evans, M.J. (1990) Maintenance and differentiation in culture of pluripotential embryonic cell lines from pig blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* (suppl.) 41, 51-56
- OECD (1992) *Safety of Foods Derived by Modern Biotechnology: Concepts and Principles*, OECD, Paris.
- O'Reilly D.R. & Miller, L.K. (1991) Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Bio/Technology*, 9, 1086 - 1089.
- Palmer, R.D., Norstedt, G., Gelinas, R.E., Hammer, R.E. & Brinster, R.L. (1983) Metallothionein-human GH fusion genes stimulate growth of mice. *Science*, 222, 809 - 814,

- Pursel, V.G., Hammer, R.E., Bolt, R.E., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1990) Integration, expression and germline transmission of growth-regulated genes in pigs. *J. Reprod. Fertil.*, (suppl.) 41, 77-87.
- Pursel, V.G., Pinkert, C.A., Miller, K.F., Bolt D.J., Campbell, R.G., Brinster, R.D., Palmiter, R.L. & Hammer, R.E. (1989) Genetic engineering of livestock. *Science*, 244, 1282-1288 .
- Royal Commission on Environmental Pollution (1991) 14th report: GENHAZ. HMSO, London.
- Salter, D.W. & Crittendon, L.B. (1989) Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into the germline of the chicken. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 457-467.
- Seidel, G.E. Jr. (1986) Characteristics of future agricultural animals. In: *Genetic Engineering of Animals*, Evans, I.W. & Hollander, A. (eds.), pp. 299-310. Plenum Press, New York.
- Simon, G. & Pongor, S. (1992) ICGEBNet: the UNIDO computer resource for molecular biology. *Bioinformatics*, 1, 12-19.
- Stover, C.K., de la Cruz, V.F., Fuerst T.R., Burlein, J.E., Benson, L.A., Benriett, L.T., Bansal, G.P., Young, J.F., Lee, M.H., Hatfull, G.F., Snapper, S.B., Barletta, R.G., Jacobs, J.R.Jr & Bloom, B.R. (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 351, 456-460.
- Strueli, M., Hall, A., Boll, W., Stewart W.E.II, Nagata, S. & Weissman, C. (1982) Target cell specificity of two species of human interferon—a produced in *Escherichia coli* and of hybrid molecules derived from them. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 2848-2842.
- Swanson, M.E., Martin, M.J., O'Connell, J.K., Hoover, K., Lago, W., Huntress, V., Parsons, C.T., Pinckert, C.J., Pidler, S. & Logan, J.D. (1992) Production of functional human haemoglobin in transgenic swine. *Bio/Technology*, 10, 557-559.
- Tacket, C.O., Forrest, B., Morona, R., Attridge, S.R., LaBrooy, J., Tall, B.D., Reymann, M., Rowley, D. & Levine, M.M. (1990) Safety, immunogenicity and efficacy against cholera challenge in humans of a typhoid-cholera hybrid vaccine derived from *Salmonella typhi* TY21a. *Infect. Immun.*, 58, 1620-1627.
- Thomas, K.R. & Capecchi, M.R. (1990) Targeted disruption of the murine *int-1* protooncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development. *Nature*, 346, 847-850.
- Tomalski, M.D. & Miller, L.K. (1992) Expression of a paralytic neurotoxin gene to

- improve insect baculoviruses as biopesticides. *Bio/Technology*, 10, 454-549.
- UK House of Lords' Science and Technology Select Committee (1993) Regulation of the United Kingdom Biotechnology Industry and Global Competitiveness. HMSO, London.
- UNIDO (1991) Voluntary Code of Conduct for the Release of Organisms into the Environment. UNIDO, Vienna.
- USDA (1990) Availability of an environmental assessment and finding of no significant impact relative to USDA funding of research on transgenic carp. *Federal Register* 55, 48661-48662.
- Valenzuela, P., Medina A., Rutter, W.J., Ammerer, G. & Hall, B.D. (1982) Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface-antigen particles in yeast. *Nature*, 298, 347-350.
- Vize, P.D., Michalska A.E., Ashman, R., Lyody, B., Stone, B.A., Quinn, P., Wells, J.R.F. & Seamark, R.F. (1988) Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J. Cell. Sci.*, 90, 285-300
- WHO (1989) Report of WHO Consultants on Requirements and Criteria for Field Trials on Oral Rabies Vaccination for Dogs and Wild Carnivores. WHO/Rab. Res./89.32.
- WHO (1991) Strategies for Assessing the Safety of Foods Produced by Biotechnology. FAO/WHO, Geneva.
- Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, Garner, I. & Colman, A. (1991) High level expression of active human  $\alpha_1$ -antitrypsin in the milk. *Bio/Technology*, 9, 830-834.
- Xie, Y.F., Liu, D., Zou, J., Li, G.H. & Zhu, Z. Y. (1993) Gene-transfer via electroporation in fish. *Aquaculture*, 111, 207-213
- Young, F.E. & Miller, H.I. (1989) "Deliberate releases" in Europe: over-regulation may be the biggest threat of all. *Gene*, 75, 1-2.
- Yu, S.-F., von Rüden, T., Kantoff, P.W., Garber, C., Seiberg, M., Rütger, U., Anderson, W.F., Wagner, E.F. & Gilboa, E. (1986) Self-inactivating retroviral vectors designed for the transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 83, 3194-3198.
- Zhang, P., Hayat, M., Joyce, C., Gonzalez-Villagenor, L.T., Lin, C.M., Durham R.A., Chen, T.T. & Powers, D.A. (1990) Gene transfer, expression and inheritance of pRSV-rainbow trout GH cDNA in the common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Mol. Reprod. Dev.*, 25, 3-13.

## 第 8 章 水産バイオテクノロジーの安全性

レイモンド・A・ジリンスカス

メリーランド大学バイオテクノロジー研究所バイオテクノロジー社会問題センター（米国メリーランド州カレッジ・パーク）

### はじめに

バイオテクノロジーが開発され、進歩するにつれて、遺伝子工学の手法を使って生み出される生物・無生物の産物の数や種類は増加の一途をたどることになる。こうした産物のほとんどは陸上で試験、使用されることになるが、なかには水中環境で利用されるものもある。必然的に、2つの疑問が生じてくる。遺伝的に改変された水生生物は、リスク評価や規制を行う当局にとって特別な、あるいは固有の問題を引き起こすだろうか。バイオテクノロジーによって作られた無生物の産物を海中で使用した場合、特別なリスクはあるだろうか。こうした疑問に回答することが重要なのは、国民の健康や環境衛生を保全するためだけでなく、リスクがある場合には、適切な管理の手続きや規制を定め、実施しなければならないからである。

本章の目的は、これらの疑問に答えること、つまり、遺伝的に改変した（以下、トランスジェニックという）水生の動植物や無生物のバイオテクノロジー産物が、ヒトや環境に特別なリスクをもたらすかどうかを判断しようということである。この判断を行うためには、4つの問題を検討しなければならない。第1に、トランスジェニック水生微生物や、トランスジェニック生物に由来する無生物産物の用途として、どのようなものが考えられるか。第2に、トランスジェニック水生動植物の放出に関する基準、ガイドラインあるいは手続きがあるか、あるとすれば、その内容と範囲はどのようになっているか。第3に、トランスジェニック水生動植物の使用や放出を管理することを目的とした封じ込めその他の軽減措置がとられているか、とられているとすれば、それはどの程度有効か。第4に、トランスジェニック水生微生物や遺伝子組換え産物の使用や放出に関するリスク評価体系が確立しているか、確立しているとすれば、それはどの程度有効か。

そこで、以下の4つの節ではそれぞれの問題を順に扱う。まとめの節では、それまでの節で得られた知見をまとめ、バイオテクノロジーが水中環境に適用された場合に、研究者、リスク評価担当者、規制当局を悩ませる安全上の問題を引き起こすか、あるいは引き起こす可能性が高いかどうかを判断する。

### トランスジェニック水生微生物およびトランスジェニック生物由来の無生物産物の利用可能性

水産バイオテクノロジーは、「モノやサービスの提供を目的として、材料を水生生物学的因子によって加工するのに、科学・工学の原理を応用すること」と定義することができ、バイオテクノロジー一般のなかでも急速に発展・成長している分野の1つである (Zilinskas et al., 1995)。世界銀行による研究でも述べられているように、この分野は沿岸や島嶼の途上国にとって特に有望な利用分野である (Zilinskas & Lundin, 1993)。遺伝子改変水生動植物の最大の利用分野は、少なくとも短・中期的には、水産養殖になるだろう。トランスジェニック生物由来の無生物産物は、動物衛生、バイオレメディエーション、防汚への利用など、水中環境でさまざまな用途があると考えられる。

### トランスジェニック水生微生物の用途

トランスジェニック水生微生物の研究、開発および利用の可能性については、多くの論文が著されている (Renn, 1986; Colwell, 1987; Chen & Powers, 1990; Powers et al., 1991; Chen et al., 1992; Devlin & Donaldson, 1992; Hallerman & Kapuscinski, 1992; Donaldson & Devlin, 1993)。これら一連の論文の内容を分析すると、トランスジェニック水生微生物の開発は、6つの性質を向上させるために行われることがわかる。

1. **代謝** 代謝経路に対する遺伝的制御機構を改変して、成熟の促進、より大型の成体の獲得、生殖率の向上、体組織における脂肪量の減少、栄養利用の効率化を行うことができる。たとえば、すでにこの分野の研究の成果として、マスの成長ホルモン遺伝子を含むトランスジェニックのコイやナマズが開発されており、これらのトランスジェニック生物は、野生近縁種よりも早く、大きく成長する (Chen & Powers, 1990)。
2. **生理機能** 生物の生理学的性質を改変することによって、水温の高低、塩分濃度の高低、金属濃度や汚染の高さ、溶存酸素濃度の低さへの耐性を向上させることができる。関連研究の一例として、カナダでは、10℃以下の低水温で生育できるようになる北極カレイ由来の不凍化タンパク質をコードする遺伝子を含むトランスジェニックサケを開発する試みが行われている (Shears et al., 1991)。
3. **生化学** 水生植物種を改変して、医薬品や特殊化学品として有用な物質を過剰産生させることができる。例として、野生種よりもカラゲナンを大量に産生するトランスジェニックの大型藻類の開発 (Robinson, 1985) や、養殖の大型藻類によるβ-カロテンその他の特殊化学品の産生を増加させる (Brown et al., 1989) プロジェクトがいくつか進行中である。
4. **定着** 大部分の軟体動物種の稚貝は、定着して、表面で生育するようになる前に特殊な化学的信号を必要とする (Morse, 1991)。水産養殖における有用種の稚貝を養殖業者の望みの場所と時期に定着するように改変することができれば、水産養殖の作業効率は大幅

に向上する。

5. **病害抵抗** 生物の免疫防御機構を改変して、産生するサイトカインの量を増やしたり種類を変えること、一般的な病原性の細菌やウイルス、菌類に対して産生される抗体の濃度を高めること、免疫強化剤を産生させることによって、生物の感染症への抵抗性を高めることを目的とした研究が考えられる。水生脊椎動物や水生無脊椎動物の免疫機構についてはほとんどわかっていないため、現在のところ、こうした研究目標は理論上でのことである。

6. **行動生物学** 水産養殖によって成長した種には、その卵や稚魚を食べるという有害な形質を持つものがあるため、たとえば、養殖動物で分泌されるホルモンの量や種類を遺伝的に改変して行動様式を変えることを目的とした研究が考えられる。この分野での利用が想定できるようになるには、それ以前に基礎研究によって魚類や貝類の行動の生物学的根拠を明らかにする必要がある。

## 遺伝子工学による産物の水中環境での用途

遺伝子組換え生物に由来する無生物産物は、陸上環境では人や動物の健康の向上、有毒な汚染物質の除去、農業の拡大などさまざまな目的に利用されている。水産バイオテクノロジーは、「陸上の」バイオテクノロジーに比べて少なくとも10年は遅れているため、この分野の研究を基にした利用は、短期的にはわずか3例しか見込むことができない。それは、水産動物衛生、バイオレメディエーション、バイオフィルムやバイオ接着である。

### 動物衛生

バイオテクノロジーによって、水生生物がよく罹る細菌性、ウイルス性の疾患に対する特殊なワクチンを作ることができる (Meyer, 1991)。ワクチンは、現在、アジアや南アメリカでたびたび水産資源を死滅させ、巨額の被害をもたらしている病気から魚や小エビなどの水産養殖生物を保護する (Arthur & Sheriff, 1991)。たとえば、伝染性造血器壊死症 (IHN) からサケを守るワクチンを開発しようという研究はかなり進んでいる。実験段階では、3種類のワクチンの試作品が開発され、試験されている (Powers, 1990)。この3種類はすべて、注射によって魚を IHN ウイルスから保護するものである。ただし、最初のタイプ (従来型の死菌ワクチン) は、水中で投与すると効果がないことが判明した。2番目のタイプは弱毒化した生ワクチンで、水中で接種しても有効だったが、安全性に関する疑問が解消されていない。3番目のタイプは組換えワクチンの一種で、有効性、安全性、価格の面でもっとも有望である。これは、米国のオレゴン州立大学の科学者グループの研究から生まれたもので、このグループは、魚の抗体産生を誘導するタンパク質をコードする複数の遺伝子を同定して性質を調べ、クローニングを行った。タンパク質のなかには、

高いレベルで発現しているものがある (Engleking & Leong, 1991)。現在、この候補ワクチンは、生産が拡大され、野外試験のための承認を米国農務省 (USDA) に申請中である。

ワクチン以外にも、保護機能を持つ物質はあるかもしれない。たとえば、甲殻類の *Ecteinascidia turbinata* からの抽出物の 1 つは、ウナギをエロモナス (*Aeromonas*) 属の細菌の感染から守り、また一般に、ワタリガニ、ザリガニ、クルマエビの免疫学的防御機構を高める (Colwell, 1986)。より実際的な例として、ノルウェーのフィリップス石油は、酵母から得られるグルカンでマクロガード (Macrogard) という同社の製品が、ワクチンの有効性を高め、養殖魚に病害抵抗性を持たせるのに役立つと主張している (Hoffman, 1990)。

## バイオレメディエーション

バイオレメディエーションとは、微生物やその産物を利用して、土壌中または水中の汚染物質や廃棄物を、無害あるいは毒性の少ない最終産物に分解することである。バイオレメディエーションは環境への有害性が比較的低いため、汚染区域を浄化するために物理的または化学的な強力な処理方法に頼る従来の手法に比べて大きなメリットを持つ。その技術が完成されるにつれて、バイオレメディエーションは汚染された港や水路その他の構造物の浄化のほか、入り江やマングローブなどの敏感な沿岸生態系の汚染除去に好んで用いられる手法になる可能性がある (Holloway, 1991)。

本章では微生物を扱わないため、微生物によるバイオレメディエーションに関心のある読者は、バイオ処理に関する第 9 章 (モリス・レヴィン著) のほか、米国技術評価局が公表した海洋油流出のバイオレメディエーションに関する報告書 (OTA, 1991) を参照してほしい。ただし、バイオレメディエーションの手法で用いられる可能性のある無生物の微生物産物には 2 種類ある。それは、分散剤と界面活性剤である。分散剤には、流出した油を小さな油の粒子に分解する作用があり、そうした油の粒子は水面から水柱や海底に簡単に移すことができる。分散した油はかたまりの油よりも微生物の攻撃を受けやすいため、分散剤は微生物によるバイオレメディエーションを促進するのである。界面活性剤は、油と水の境界の界面張力を低下させ、油を水中で乳化させることができる。細菌が産生する界面活性剤は、一般に毒性がなく生分解性である。一例として、プリンス・ウィリアム湾での実験では、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の産生する生物界面活性剤 (バイオサーファクタント) によって、海岸の砂や岩からの油の除去率が向上したことがわかった (Harvey et al., 1990)。海洋微生物の *Acinetobacter calcoaceticus* からは、エマルサン (Emulsan) という別のバイオサーファクタントが単離されている。これは、タンカーをはじめ船の油貯蔵タンクの洗浄に幅広く利用されている。エマルサンは、油田での油回収の向上や汚染防止への利用もテストされている (Weiner, 1985)。

## バイオフィルムまたはバイオ接着

天然の水に何かを沈めると、かならず水中微生物が棲みつき、そこに付着するための付着性の物質を分泌し、膜を形成する。まもなく、微生物がコロニーを形成した表面に海生植物や無脊椎動物が引き寄せられ、これらもまた、こびりついたようになって棲みつく。この付着物に絡まった生物は酸を産生し、この酸が栈橋や油井やぐらなどの構造物を腐食させる。また、こびりついた付着物によって船の船体の抵抗が増加し、操業コストを 20 から 40% 増加させている (Costerton & Lappin-Scott, 1989)。現在は、重金属を含む塗料を使って露出した表面をコーティングし、微生物を追い払って定着を防いでいる。しかし、こうした塗料は作業者にとって有毒であり、海水を汚染する。

水産バイオテクノロジー研究では、この定着や付着の過程を分子レベルで明らかにしようとしており、その知見は、海洋生物が船舶や海中の構造物に定着するのを防ぐクリーンな手法を開発するのに利用することができる。たとえば、研究によって、コロニーを形成する生物を寄せつけなかったり、定着を妨げる無毒のフィルムの開発につながる可能性もある。反対に、こびりつきを形成する生物が表面に付着するために分泌し、使っている粘着性物質は、水中やその他の湿った場所で固まる強力な接着剤として利用することが可能なため、産業的にも興味深い (Strausberg & Link, 1990)。実際、イガイ類や二枚貝の粘着性物質の産生をコードする遺伝子がクローニングされ、産業用微生物で発現させることが行われている。すでに、こうした海洋性の粘着性物質は、水中の構造物を接着したり、ガラスカラム内の培地に固定化微生物を固定するのに使われている。また、海洋性の粘着性物質は、整形外科手術における骨の接着や歯科技術における歯の移植など、人への利用も試験されている (Strausberg & Link, 1990)。

## 水生環境におけるトランスジェニック水生動植物や無生物産物の使用または放出に関する基準、ガイドライン、手続き

現在までのところ、トランスジェニックの水生動植物の水生環境での使用や放出に関する基準、ガイドライン、手続きが存在しないのは間違いないといえる。これは、水産バイオテクノロジーが開発の初期段階にあり、実用段階に達している製品がわずかしかないためだと思われる。つまり、将来のいつかわからない時期に起きるかもしれない行為や、さらには、いまのところ内容がはっきりしない行為のリスクを評価しようという理由はほとんど見いだせなかったのである。しかし、先に述べたように、遺伝子改変生物由来の産物はまもなく実用化されて湖や海洋に影響を及ぼす可能性があり、科学者たちが開放系の水生環境でのトランスジェニック魚の試験の許可を求めるようになるため、今後 2、3 年のうちにこの状況は変わるのは間違いないだろう。こうした将来の 1 つの徴候として、すでに 2 種のトランスジェニック魚の試験が、閉鎖系の野外池で行われている。これらの試験

が成功すれば、開発者が次に行おうとするのは、より現実的な、開放系の水生環境での試験だと思われる。

水産バイオテクノロジーや水生環境に関連するバイオテクノロジー開発に限定した基準やガイドライン、手続きとして参考にできるものがないため、バイオテクノロジー一般の歴史と実績を検討することによって、こうした活動によって生じているバイオセーフティの問題を明らかにし、それらを軽減するためにとられた規制措置を検討する必要がある。

最先端のバイオテクノロジー研究によって、無生物の産物とトランスジェニック生物という2つのタイプの産物が生みだされる可能性がある。これら2つの分野のそれぞれが、規制当局に重要な問題をもたらす。すなわち、遺伝子改変生物によって産生される無生物産物は、従来の手法で得られた産物を上回るリスクをヒトをはじめとする動物や植物にもたらすだろうか。トランスジェニック動植物を水生環境へ意図的に放出することによって、既存の生命体あるいは環境そのものに危害を生じるだろうか。

最初の遺伝子改変産物が評価のために提示された1981年以降、遺伝子工学による無生物産物に関して国内の規制当局や国際機関が得た大きな教訓が2つある。第1に、産物を得たプロセスには、従来プロセスによって生じる問題を上回る問題はない。すなわち、ある特定の工業発酵プロセスに用いられるのが、遺伝子改変微生物か伝統的な育種・選択を通じて生みだされた微生物かはほとんど問題ではなく、どちらの事例に対しても同様の優良製造・安全規範があてはまる。第2に、遺伝子改変産物の試験は、従来手法による産物の試験と異なっている必要はなく、安全性と有効性に関する同じ基準をどちらにも等しく適用する。そのため、遺伝子工学によって得られた無生物産物に対する規制を政府が制定または採用している国なら世界中どこでも、規制の状況は同じということである。見たところ、無生物のバイオテクノロジー産物に対象を特化した規制を実施している国はなさそうである。さらに、EUの諸機関、経済協力開発機構(OECD)、世界保健機構(WHO)といった国際機関によって定められたバイオセーフティに関する規制や制度、ガイドラインでは、先端バイオテクノロジーによる無生物産物を、従来の研究開発によって得られる産物を扱うのと同じ方法で扱っている(OECD, 1986)。この点を示すため、OECDでは、こうした基準に基づいたバイオテクノロジー・ガイドラインを加盟国向けに作成している(OECD, 1986, 1992)。同様に、国連食糧農業機関(FAO)、国連環境計画(UNEP)、国連工業開発機関(UNIDO)およびWHOが共同で設置した機関間作業部会は、途上国が国内法のモデルとして利用することを想定した一連のガイドラインを作成した(UNIDO, 1992)。ただし、繰り返しになるが、水産バイオテクノロジーあるいは無生物産物の水生環境での利用に伴うリスクを特に対象とするガイドラインはない。

第2の問題は、生きたトランスジェニック生物の意図的放出に関するもので、現在、科学界や国民から大きな注目を集めている。意図的放出には、導入された生物が環境やそこに生息する動植物などに直接に害を及ぼす可能性と、導入生物のゲノムに由来する1つないし複数の遺伝子が伝播し、標的外の生物のゲノムに組み込まれる可能性という2つの主

なりリスクがある。こうした懸念とリスク評価の制度については P.149～157 で解説、検討する。

## 水生環境へのトランスジェニック生物の放出の防止または管理

トランスジェニック動植物の水生環境への放出を防止または管理するために、封じ込めその他の軽減措置を定めている政府や国際機関はないようである。そういう状況であれば、トランスジェニック水生動植物に関する今後の制度について、教訓を引き出せるような類似の状況がないかを検討することが有用である。

外来の海洋動物の拡散、つまり、水生動植物が通常の生息場所から別の環境へ持ち込まれている状況を管理した世界各地での経験をみると、今後、別のタイプの外来生物、すなわちトランスジェニックの水生動植物の導入に関連して問題が生じうると考えられる。つまり、過去に水生生物が新たな区域に導入された際の事例から情報を得ることができ、この情報をもとに、今後行われるトランスジェニック水生生物の野外試験に伴うリスクを明らかにし、そのリスクが現実のものとなる可能性を評価し、リスクを軽減したり除去するための手法を考案することが可能なのである。したがって、過去に起きた自然の、または人為的な拡散を検討してそこから何を知ることができるかを検討し、導入による損害を防いだり管理するために行われた国内および国際的な試みを評価しなければならない。

## 水生種の拡散

種の拡散が自然に起きる際のもっとも一般的なメカニズムは、分布域の拡大である (Mann & Rosenfield, 1992)。この現象を明らかにすることを目的とした科学研究はほとんど行われていないため、これについてはよくわかっていない。つまり、別の区域への導入が検討されている水生生物の分布域が拡大する可能性については、予測することができない。水生種の新たな区域への意図的な導入案に伴うリスクを評価しようとする審査当局にとって、分布域拡大に関する科学的データが不足していることが問題なのは明らかである。問題の生物が国外からきたものでも遺伝子工学的に作られたものでも、分布域の拡大に関する不確定性は同じように存在するため、両者の違いはほとんどないと思われる。

水生種の人為的な拡散とは、種がそれまでまったく存在していなかった生息場所に、人の活動によって意図的あるいは偶発的に導入されることである。人の活動による外来種の偶発的な導入が始まったのは、おそらく人類が航海を始めた時からで、生物は船のバラストの中や (Aquatic Nuisance Species Task Force, 1992; Carlton, 1992a) 木製の船体にこびりついたり入り込んだりして (Peterson, 1992) ある場所から別の場所へと運ばれたのである。大洋と大洋あるいは湖と湖をつなぐ運河によって船の航行域が拡がり、それと同時に生物にとっての新たな移動経路が開かれた。貿易業者らは、甲殻類、魚類、軟体類

を漁場から遠く離れた市場へと送ってきた。それと一緒に、こうした魚介類に感染する病原体も運ばれてきた( Carlton, 1989 )。自分の水槽で観賞魚などの生物を飼育している人々は、地元の水路にそれらを放流して処分している( Andrews, 1992 )。海を越えた貿易が始まって以来、世界中で数千に及ぶ水生種が、数え切れないほどの方法で、偶発的に移動させられており、またその結果、たしかな割合はわからないものの、かなりの割合が新たな生息地でコロニーを形成するのに成功していることは、容易に想像できる。

偶発的な導入や移動の原因を作っていることに加えて、貿易業者はあらかじめ何らかの意図を持って水生植物を原産地である区域で捕獲し、別の区域に移動させてもいる。外来水生種の意図的な導入が行われるのは、陸上での動植物の意図的な導入と同様、ほとんどの場合、水産養殖や漁業を発展させるためだが、場合によっては、環境に影響を及ぼす目的のこともある( Welcomme, 1986; Stickney, 1992 )。1950年代と1960年代には、第三世界の各地で水産養殖の向上や確立のために魚類や甲殻類の大規模な導入が行われたが、アフリカ産テラピアのアジアや南米への導入、インド産の大型コイの東南アジアや南米への導入、ブラックタイガー( *Penaeus monodon* )やコウライエビ( *P. orientalis* )の多くのアジア諸国および一部の南米諸国への導入などがその例である。環境上の目的での意図的導入の例としては、マラリアが風土病である地域に蚊の幼虫を好んで食べる魚類種のカダヤシ( *Gambusia affinis* )やグッピー( *Lebistes reticulatus* )が導入された例や、水生植物の過剰繁殖を抑えるのに使われるソウギョ( *Ctenopharyngodon idelle* )が、熱帯や亜熱帯の各地の運河をはじめとする数百の水路に導入された例がある。

1970年代の終わりから1980年代の始めにかけては、シマスズキ( *Morone saxatilis* )の米国西海岸地域への導入、マガキ( *Crassostrea gigas* )の米国やカナダの西海岸地域およびフランスへの導入、サケ類( *Oncorhynchus* 属)の大西洋海域への導入、カラフトマス( *O. gorbuscha* )の旧ソビエト連邦の北極海沿岸海域への導入、パナマ産エビ類( *P. stylirostris* )のハワイへの導入、ワカメ( *Undaria pinnatifida* )のフランスへの導入などがある( Sindermann, 1986; Welcomme, 1986 )。もっと最近では、1989年に大型藻類の *Euchema spinosum* がフィリピンからジンバブエに運ばれ、現在ジンバブエではこれが養殖、収穫、乾燥されて欧州に輸出され、欧州で食品添加物用の多糖類が抽出されている( Zilinskas & Lundin, 1993 )。

こうした導入の多くは地元の住民に恩恵を与え、受け入れ国の経済を向上させてきた。しかし、陸上に導入される種と同様、導入された水生種の一部は、ほとんど目に見えないものから深刻なものまでさまざまな程度のダメージをもたらしている。たとえば、カダヤシは蚊の幼虫を好んで餌にする一方で、他の魚の卵や養魚も食い尽くしてしまう。ソウギョは、他の魚種に病害をもたらす糸虫を媒介する。海草のタマハハキモク( *Sargassum muticum* )は、マガキと一緒に不注意によって導入され、ついには英仏海峡に面した英国とフランスの海岸に沿って密生して、輸送活動やレジャー活動の妨げになりはじめた。大規模に導入されているエビの *P. vannamei* は、伝染性皮下造血器壊死症ウイルスと呼ばれ

る病原体を保持しており、このウイルスが太平洋沿岸各国の養殖施設に広がって、エビ資源を死滅させている。

拡散による損害の原因と影響については、多くの文献で取り上げられている。水産養殖一般に関する問題を検討、分析したもの (Carlton, 1992b; Courtenay & Williams, 1992; Davidson et al., 1992) もあれば、水生植物 (Neushul et al., 1992)、軟体類 (Farley, 1992)、甲殻類 (Kern & Rosenfield, 1992; Lightner et al., 1992)、魚類 (Ganzhorn et al., 1992; Thorgaard & Allen, 1992) などのより専門的な分野の問題を論じたものもある。過去の人為的な拡散による影響を分析すると、導入が偶然によるものか意図的な導入の際の不注意によるものかを問わず、6つの教訓が得られる (Zilinskas et al., 1995)。

1. 導入された動物は、競争や捕食によって現地の動物相を破壊することがある。最悪の場合、導入された外来種が、1つ以上の野生種を全滅させる可能性もある。
2. 導入種は、導入された生息地の一部にダメージを与えたり破壊することがあり、それによって自然のバランスが崩れ、現地の環境の劣化や破壊につながる可能性がある。
3. 場合によっては、新たな場所に導入された種が遺伝的劣化を受ける可能性がある。つまり、新たな場所に生息している野生種と導入された種が交雑すると、持っている望ましい遺伝的性質の一部が失われたり劣化したりすることがある。
4. その反対に、外来種が導入された場所に生息している野生種が、遺伝的劣化を受ける場合もある。たとえば、導入種が在来の野生種と交雑すると、野生種が定着のために進化させてきた適応力が、雑種の後代では弱まったり、失われたりすることもありうる。さらにひどい場合には、外来種が野生種を追い払ったり取って代わったりして、重要な遺伝子が失われる可能性もある。
5. 導入種は、それ自体が招くリスクに加えて、感受性のある在来種に感染力のある外来の病原体を運んだり含んでいる場合がある。新たに導入された病原体は、宿主生物によって生じるダメージとは量的にも質的にも異なるダメージを引き起こす可能性がある。
6. いったん導入種がある場所でコロニー形成に成功すれば、それが固有種になって排除することが不可能になる場合もある。

水生種の導入の歴史から一般的な教訓が得られるとすれば、それは、北米へのカワホトトギスガイの導入のように、偶発的な導入のほうが、意図的な導入よりも大きなダメージを引き起こしていると思われる一方で、アフリカの湖の窮状が示すとおり、意図的な導入もまた、国内や地域の生息地に甚大な損害を与えている、ということだろう (Baskin, 1992)。さらに、われわれの予測能力は、導入を検討している種が在来種や環境にほんとうに直接的・間接的にダメージを与えるかどうかを前もって判断したり、導入によって生じる損害費用が、最終的な便益を上回るかどうかを事前に判断できるほど高度ではない。

## 外来水生生物の拡散の管理

世界各地で水生生物の拡散が起きているため、多くの政府が管理のための措置を採用・実施している。政府間組織や非政府組織によって定められたガイドラインが、国内法のベースとなっている場合もある。水生生物の拡散を管理しようという国内および国際的な措置を概観することは有用である。

### 導入を管理するための国内措置

オーストラリア (McKay, 1984)、カナダ (Crossman, 1984)、メキシコ (Contreras-B & Escalante-C, 1984)、ニュージーランド (McDowall, 1984)、オセアニア (Maciolek, 1984)、プエルトリコ (Erdman, 1984)、米国 (Zilinskas et al., 1995) での外来魚の導入に関する情報を検討すると、その影響や導入による損害への政府の対応について、一般的な結論が3つ得られる。

第1に、あらゆる国や地域が、外来水生生物の意図的あるいは偶発的な導入によって、なんらかのマイナスの影響を被っていることは明らかである。しかし、メキシコなど調査が行われた国の一部では、導入の詳細な記録が残されておらず、またほとんどの国はそうした記録が全くなかったり、ごく基本的なデータしか記録されていないため、世界全体での導入の影響の全容を見極めることができない。

第2に、導入による1つないし複数の損害という明白な事実直面した場合、各国政府は、導入によってそれ以上損害を受けないようにするための規則や法律を制定するという対応をとるのが普通である。こうした法律や規制は、2つのタイプに分かれる傾向にある。まず、意図的な導入に重点を置いた法律が制定され、しばらくして偶発的な導入を防ぐための追加の法律が制定される。

第3に、意図的な導入の規制や管理を目的とした国内法は、導入案を却下する際の基準をいくつかあげている。却下を判断する基準として国内法に一般的にみられるものには、次のようなものがある。

1. 検討中の生物が、たとえば、繁殖の速さや栄養摂取の方法、あるいは導入場所で定着や拡散する並はずれた能力を持っていることなどによって、環境に被害を与えうることが証明されているかどうか。
2. その生物が並はずれて食欲旺盛あるいは攻撃的かどうか。その生物が、たとえば、傷を負わせるような鋭い歯、有毒な棘、発電器官などによって、人や他の動物に危害を加える可能性がないかどうか。
3. その生物が、在来の個体群に悪影響を与える可能性のある病原体や寄生体を保持したり伝播したりする力がないかどうか。

偶発的な導入を防ぐための政府の取り組みは、いっそう困難なものである。通常、偶発的な導入によって破局的な結果が生じることがきっかけとなって、法律によって再発を防ごうとする試みが行われる。たとえば米国では、カワホトトギスガイの偶発的な導入による被害が連邦議会を促して、1990年有害な外来水生生物の予防防除法とも呼ばれる連邦公法101-646を成立させた(Zilinskas et al., 1995)。この法律が成立したそもそものきっかけは、五大湖におけるカワホトトギスガイの大繁殖に対する議会の懸念だったが、法律には偶発的な導入一般に対処するための措置の枠組みが規定されている。この法律には5つの目的がある。(1) バラスト水の管理などを通じて、米国の水域への外来種の導入および拡散を予防すること。(2) 有害水生種、とりわけカワホトトギスガイに関する連邦政府支援の研究や予防措置の整合化を図ること。(3) バラスト水以外のルートによる外来種の非意図的な導入を防止・管理するための規制措置を設けること。(4) 外来種が定着した場合の影響を最小限に抑えること。(5) 各州によるカワホトトギスガイの管理を支援するために国の計画を定めること(Kern & Rosenfield, 1992)。このほかの国々でも、偶発的な導入を防止するために同様の法律を制定していると考えられる。

## 国際的措置

国際的なレベルでは、拡散に対処するためのいくつかの規範や規則が公表されている(Carlton, 1992c; Jacob, 1994)。重要な出来事として、1973年(その後1979年に改正)に国際海洋探査委員会(ICES)によって立案された規範である、「海洋種の導入および移動によって生じる悪影響のリスクを軽減するための改正行動規範」の採択がある。このほか、米国水産学会(1973年)、国連海洋法会議(1982年)、欧州評議会(1984年)、FAO・欧州内水面漁業諮問委員会(1984年)、国際自然保護連合(1987年)が、この問題に関する行動規範、基本声明、協定を公表している。こうした規範や声明の最も重要な目的は、将来の偶発的な導入を防ぎ、意図的な導入による悪影響の防止に向けて国際的な共同行動を取ることである。ただし、ここにあげた規範のうち、国家を法的に拘束するものは1つもない。

## 水生環境でのトランスジェニック動植物の使用または放出に関するリスク評価の方法

トランスジェニック動物や植物の水生環境での使用案または放出案に特有のリスクを判断するためのリスク評価の枠組みは、現在までのところ整備されていない。そうした状況なので、次の2つの節では海洋バイオテクノロジーを構成する2つの分野(一般的なバイオテクノロジーおよび海洋生物学)で用いられているリスク評価方式を検討し、さらに3つ目の節では、トランスジェニックの水生生物を対象に含めるために、それらをどのよう

に組み合わせることができるかを示す。

## バイオテクノロジーの利用の際に用いられるリスク評価の枠組み

米国学術研究会議（NRC）は、遺伝子組換えの微生物や植物の陸上環境での野外試験に関する問題を詳細に検討し、放出案に伴うリスクを評価する際には3つの基準が不可欠であると結論づけている（NRC, 1989）。

1. その生物の性質および生物が導入されようとしている環境について十分な知識があるか。
2. その生物を有効に封じ込めまたは管理することはできるか。
3. 導入される生物やそれが保持する遺伝形質が、意図したよりも長く定着したり、標的外の生物に伝播した場合、環境にどのような影響が考えられるか。

OECD は、すでに 1983 年にはバイオテクノロジーの安全性の問題を検討し始めており（Teso, 1992）、1992 年に遺伝子改変生物の野外試験に関するガイドラインを公表している（OECD, 1992）。その枠組みは、実質的には NRC のものと同じで、リスク評価に不可欠な 3 つの基準が含まれている。しかし、水生生物の野外試験の安全性を評価する上で、OECD が立案した植物の野外試験の評価に関する独自の手法を見ても有益である。これらの手法は陸上環境に関するものだが、今後、水生環境での野外試験のための枠組みが策定される際には、同じような手法が考案される可能性が高い。この独自の手法では、生物の生物学的性質や試験が行われようとしている区域を参考にする（OECD, 1992）。

### 生物の生物学的性質

ある植物種の野外試験に伴うリスクを評価する場合、その種の次のような性質が考慮されなければならない。

1. その植物の繁殖性と生物学的性質（開花、受粉の必要条件、種子の性質、試験区域と類似する環境で繁殖を管理した実績など）
2. 新たに獲得した有毒な性質の作用、持続性、劣化の形態
3. 植物に DNA を導入するのに用いた生物学的ベクターの性質
4. 他の種や生態系との相互作用の可能性

### 試験区域

安全性の評価に際しては、野外試験が予定される区域の次のような性質を考慮する必要がある。

1. 野外試験の安全な実施にかかわる、区域の生態学上、環境上の重大な問題点（水流のパターン、地下水面、風のパターンその他、試験区域に固有な気象学的、地球物理学的現象など）
2. 試験区域の規模（場合によっては安全地帯も含む）
3. 被験生物の影響を受ける可能性のある近隣または遠隔の生物相があるかどうかを考慮した試験区域の地理的位置

遺伝子組換え生物の野外試験を安全に実施するための具体的な方法は、まだ確定していない状態にある。この分野における米国での経験をみると、遺伝子組換え生物の野外試験実施案は、米国農務省、具体的には同省の動植物検疫局（APHIS）によって事例ごとに扱われている。

農務省によって実施案が検討される際にまず行われるのが、綿密な環境影響説明書の作成である。この説明書は、放出によって生じる直接・間接の影響を考慮して、健康面および安全面の懸念に対応するものである。ここでは、放出によって、環境やその生物相のいかなる側面にも重大な変更や危害が及ばないと考えられると結論するに足るたしかな証拠を示さなければならない。プロジェクトが環境に対して無視しうる程度の影響しかもたらさないと農務省によって評価された場合、その結果は、最終決定が行われる前に広く公表されて、国民やその代表が環境影響説明書を詳細に検討し、意見を述べる機会を与えられるようにする。農務省はこれらの意見を聞くほか、他の利害関係者が作成した説明書を考慮した上で、最終決定を行う。農務省と米国環境保護庁は、遺伝子組換え生物の野外試験の最終承認をこれまでに 900 件以上与えており、その大部分が植物に関するものである。現在までのところ悪影響はみられず、米国の枠組みは、少なくとも短期的には機能していると考えられる（Miller et al., 1991）。

NRC や OECD の基準をみると、トランスジェニックの陸生動物の野外試験に関してはほとんど触れられていない。これは、通常、これらの封じ込めは容易で、たとえ逃げ出したり偶発的に放出された場合でも、試験中のトランスジェニック動物が簡単に拡散したり、危害を及ぼす可能性が低いからである。しかし、今後見込まれる水生動物の野外試験に関しては、そのようなのんきなことはいってられない。水生生物を扱う場合、2 つの理由によって懸念が生じる。第 1 に、大部分の水生生物が、数千から数百万の受精卵や卵を周囲の水に放出するという重要な繁殖特性を持っていることである。第 2 に、水はきわめて優れた担体の 1 つであり、生体やタンパク質性の遺伝物質にやさしい。また、ほとんどの水は一カ所にとどまっているわけではなく、河川は湖や海に流れ込み、海水は渦や海流や風によって動き回る。つまり、陸生動物を封じ込めるのに使われるバリアが、水生動物の

封じ込めには使えなかったり、同じよう再現できないため、代わりに新たな封じ込め系を考案し、導入しなければならない。

数種の水生生物の形質転換が行われてきたが、そのうち野外試験が行われているのはトランスジェニックコイとナマズの2種だけである。この試験の技術的な側面は、次のとおりである。

試験中のコイは、普通のコイ (*Cyprinus carpio*) のサイズを小さくした変種でミラーカープ (mirror carp) と呼ばれ、マスの成長ホルモン遺伝子をコードする遺伝子と、いわゆるラウス肉腫ウイルスのプロモーター (遺伝マーカー) の2種類の外来遺伝物質を導入することによって遺伝的に改変されている。トランスジェニックコイは、海洋バイオテクノロジーセンター (メリーランド州)、スタンフォード大学 (カリフォルニア州)、オーバーン大学 (アラバマ州) の科学者らのグループによって開発された (Chen & Powers, 1990; Chen et al., 1992)。1990年、このグループは米国農務省に計画案を提出し、9匹のトランスジェニックコイが産卵した50,000匹の稚魚を10の野外池で生育させることを許可するよう求めた。グループの計画は、3カ月後には稚魚の数を1つの池あたり300匹に減らし、これらを同定のために標識してさらに15カ月間調査するというものだった。その後、魚は性的成熟に達する前に処分されることになっていた。魚を飼育する池は、フェンス、網およびフィルターで十分に保護され、池と既存の水路の間に直接の連絡はないとされた。さらに、ハリケーンなどの自然事象によって試験区域の完全な状態が脅かされる場合には、試験中の魚は有毒化学物質によって速やかに処分することになっていた。

プロジェクト案に関する環境評価が実施されたのち (USDA, 1990)、その結果が一連の公聴会で示され、さらに、一般の利害関係者や市民団体からの意見や批判を受け付けたのち、農務省は、「重大な影響は見いだせない」という決定、すなわち、「トランスジェニックコイの実験による環境への重大なリスクはない (出所不明, 1990)」という判断を示した。1991年春のはじめに、農務省はこの実験を進めることを承認した。トランスジェニックコイの試験が実際に始まったのは、1991年6月である。数カ月後、新たに開発されたトランスジェニックナマズについて同様の野外試験計画が提出されたが、このナマズにはニジマス由来の成長ホルモン遺伝子が導入されていた (出所不明, 1991)。この案は、1992年初頭に農務省によって承認された (出所不明, 1992)。

本章の目的に照らして、トランスジェニックコイおよびナマズの試験条件とNRCによって定められた (そして事実上OECDにも認められた) 3つの基準とを比較することは有益である。まず、科学的な面からいうと、コイとナマズはこれまでに広範な研究がなされており、性質が十分にわかっている。どちらの魚も、マスの成長ホルモン遺伝子の挿入によって、成長に関係するものを除いて、身体的な性質は変わらない。異種遺伝子によってこれらの魚の行動パターンが変わるかどうかは、もちろん、試験を通じて答えが出る疑問の1つである。試験は人為的に作られた閉鎖系で行われるため、トランスジェニック魚が

導入される環境についてはわかっている。これらの理由から、第1の基準はおおむね満たされる。2番目に、犯罪行為によって故意に魚が放出されない限り、トランスジェニックのコイとナマズの試験が行われる環境では、拡散の可能性は排除することができる。したがって、第2の基準は確実に満たされる。つまり、被験生物は有効に封じ込められ、管理される。試験環境での定着や伝播はないため、第3の基準は適用されない。

トランスジェニックのコイやナマズの野外試験は、閉鎖環境で管理されているため、水生環境での実際の野外試験よりも閉鎖系での試験に近い。しかしながら、科学者たちは新たな試験領域（水生環境）に足を踏み入れたところであり、試験の対象そのものが独特であるため、これまで慎重な手法が取られてきた。これらの試験が成功し、現時点で別の方法を考える理由がなければ、今後の野外試験の要件は緩和することが可能である。陸生環境での野外試験が展開する過程では、こうした緩和措置が進んだが、おそらく水生環境においても同じことが起きると思われる。

### 水生種の導入案に関するリスク評価の枠組み

ICESの規範の実施状況が一律でないため、カール・シンダーマン博士は、今後の導入案を扱うためのいくつかの戦略を立案した（Sindermann, 1986, 1992）。この戦略の冒頭では、自然の水生動植物の導入の管理に関する国際的な管理手法が不十分である点を取り上げている。この問題では、国連の諸機関や非政府組織が主導して、外来種の導入によって在来種や地域の環境に及ぶ可能性のあるダメージについて、国民や政策担当者、国の規制当局の担当者への教育を行うべきである。導入に伴う問題、あるいは導入によって生じる問題について、いったん国内当局が敏感になれば、確固とした規制の枠組みを整備して、無許可の導入を防止し、導入が許可された場合の実施条件を示すことが、最も国の利益になることをいちばん認識するのは当局のはずである。

本章に最もかわりのある戦略として、生物の移動を管理するための地域的な取り組みが強調されており、この取り組みでは関係各国が統一性と連続性を徹底させる。ある政府がどのような手法を採用するにしても、その手法はICESの規範で定めた一般的な運用原則にしたがって実施されるべきである。これらの原則は、導入によるリスクは決してゼロではないという前提に基づいている。そうであれば、国による規制制度は、導入によって生じるリスクが最小限に抑えられるように立案されるべきである。リスクの削減には、特に、導入が計画されている生物の自然の生息地での研究を徹底的に行うこと、新たな種を導入する代わりに在来種を開発できないか評価すること、導入に際しては移動性の種より非移動性の種を優先させること、導入種の継続的なモニタリングのための仕組みを確立することなどがある。特に重要なのは、導入の前に、競争や捕食などの生態学的考察、ハイブリダイゼーションや遺伝子頻度の変更の可能性などの遺伝的考察、導入種と在来種の相互作用などの行動学的考察、新たな伝染病が導入種と一緒に持ち込まれる可能性などの病

理学的考察の検討を通じて、導入案の科学的意味合いが分析されることである (Sindermann, 1986, 1992)。

外来魚の導入案の評価を進める際の指針として、シンダーマンによって提案されたものより詳細かつ包括的な方法が Kohler & Stanley (1984) によって考案されている。この2人のアプローチは5つの検討段階に分かれており、段階が上がるごとにより多くのデータが要求される (図 8.1 参照)。評価プロセスは、具体的な導入案を検討するために設置される「外来魚実験計画委員会 (Exotic Fish Protocol Committee)」によって行われる。

検討の第1段階は、導入案の実行可能性を判断することである。導入種は、在来種によっては満たされないなんらかのニーズに応えるものになるか。導入種は将来のニーズに充分に応えることができるか。導入種の一部を除去することによってそれが脅かされるか。試験区域からの拡散の可能性はあるか。これらの基準の1つでも満たすことができない場合には、導入案は承認されるべきではないと思われる。

検討の第2段階は、万一、導入生物が拡散した場合、新たな生息場所に適応する (すなわち、自立した個体群を形成する) 能力を検討する。導入が計画されている生物の適応性が高い場合、その種の導入は見合わせたほうがよいかもかもしれない。

検討の第3段階では、費用便益分析が行われる。導入が計画されている生物が、環境に受け入れがたいダメージをもたらしたり、人への有害性を示す場合、その生物は導入されるべきではない。

検討の第4段階では、学術文献や FAO の「生物種便覧 (Species Synopsis)」で使われている形式に沿ったデータベースの調査が行われる。さらに、調査では、過去に行われた似通ったタイプの導入による環境への影響について、あらゆる情報を得るべきである。

検討の第5段階では、外来魚実験計画委員会が、たとえば残っている疑問を解決したり潜在的な問題を明らかにするために、さらなる調査の実施を要請することができる。どのような調査が必要とされるかや、追加の調査の結果によって、第5段階の評価プロセスを繰り返さなければならない場合もある。

## 遺伝子組換え魚の野外試験に関する今後のリスク評価の枠組みを構成する要素

トランスジェニックの水生動植物が実験室で作られた場合、次に、アラバマ州でのトランスジェニックコイやナマズの試験で使われたような野外の封じ込め施設で試験を開始することになる。試験の結果から、トランスジェニック種の成長パターン、行動など多くのデータが得られると思われるが、これは閉鎖系で行われる試験なので、今後行う野外の水生環境での試験の叩き台程度に考えるべきである。それでも、試験を安全に進めることが可能になるのはたしかで、研究者は試験手順に慣れる機会を得て、規制当局は水生生物に関するリスクを評価し、その評価に基づいて試験のためのガイドラインや規則を定めることができる。しかし、こうした試験は手間と費用がかかるため、安易に実施されるこ

とはほとんどない。また、世界に数多くある研究施設のなかで、こうした試験を行うことのできる施設の数はかなり少ないことも認識すべきである。

いまのところ、開放系の水生環境での遺伝子組換え生物の試験を計画している機関はない。ここで、試験をする側と規制当局は、たとえ野外施設とはいえ閉鎖系の試験では経験しなかった特殊な問題に直面することになる。大気圏中での野外試験と同様( Stetzenbach et al., 1992 )、開放系の水生環境で行われる試験では、被験生物の生物学的隔離が保証されない可能性がある。生物学的隔離が保証されない大きな理由は2つある。第1は海洋生物の生殖特性によるもので、これは往々にして、水生環境に放出される卵や稚魚の数が多きことと関係しており、また第2に、水空間が連続していること、水とそこに漂う粒子が絶えず動いていること、そして遺伝子分散について未知の生物学的様式が存在するかもしれないという、水生環境の3つの特徴のためである( Zilinskas & Lundin, 1993 )。さらに、外来生物の過去の導入から得られた大きな教訓として、試験中の水生種の一部が拡散した場合、それらが定着する可能性も、自然のメカニズムを通じて分散する可能性も、事前に判断することはできない、つまり、拡散による影響が予測不能だということである。こうした困難と不確実性を考えると、今後行われる水生生物の野外試験の評価プロセスは、細心の配慮をもって立案されなければならない。

こうした評価プロセスは、Kohler や Stanley の考案したものや、先に説明したものを採用することになるかもしれない。つまり、研究機関のバイオセイフティ委員会によって案件ごとに設置される試験委員会が定める指針とともに、5段階の手順にしたがうことになる。

すなわち、検討の第1段階では、科学的にみた試験の実行可能性、科学あるいは産業(またはその両方)にとって見込まれるトランスジェニック種の価値、被験対象が試験区域から拡散する可能性を含め、導入案の実行可能性を判断する。

検討の第2段階では、トランスジェニック生物が拡散した場合に、その生物が新たな生息場所に適応する能力を検討する。トランスジェニック生物の適応性が高いと考えられる場合には、まず不妊化してからでなければ野外試験を行うべきではない(以下を参照)。

検討の第3段階では、試験にかかわるリスクを評価する。このリスク評価は、試験が計画されているトランスジェニック生物が、環境に受け入れがたいダメージをもたらしたり、人への有害性を示す可能性がないかどうかを明らかにしようとするものである。準拠するリスク評価の枠組みとして、NRC や OECD が陸生環境での試験のために考案したものを採用することが十分可能であることは、先にも解説、検討したとおりである。

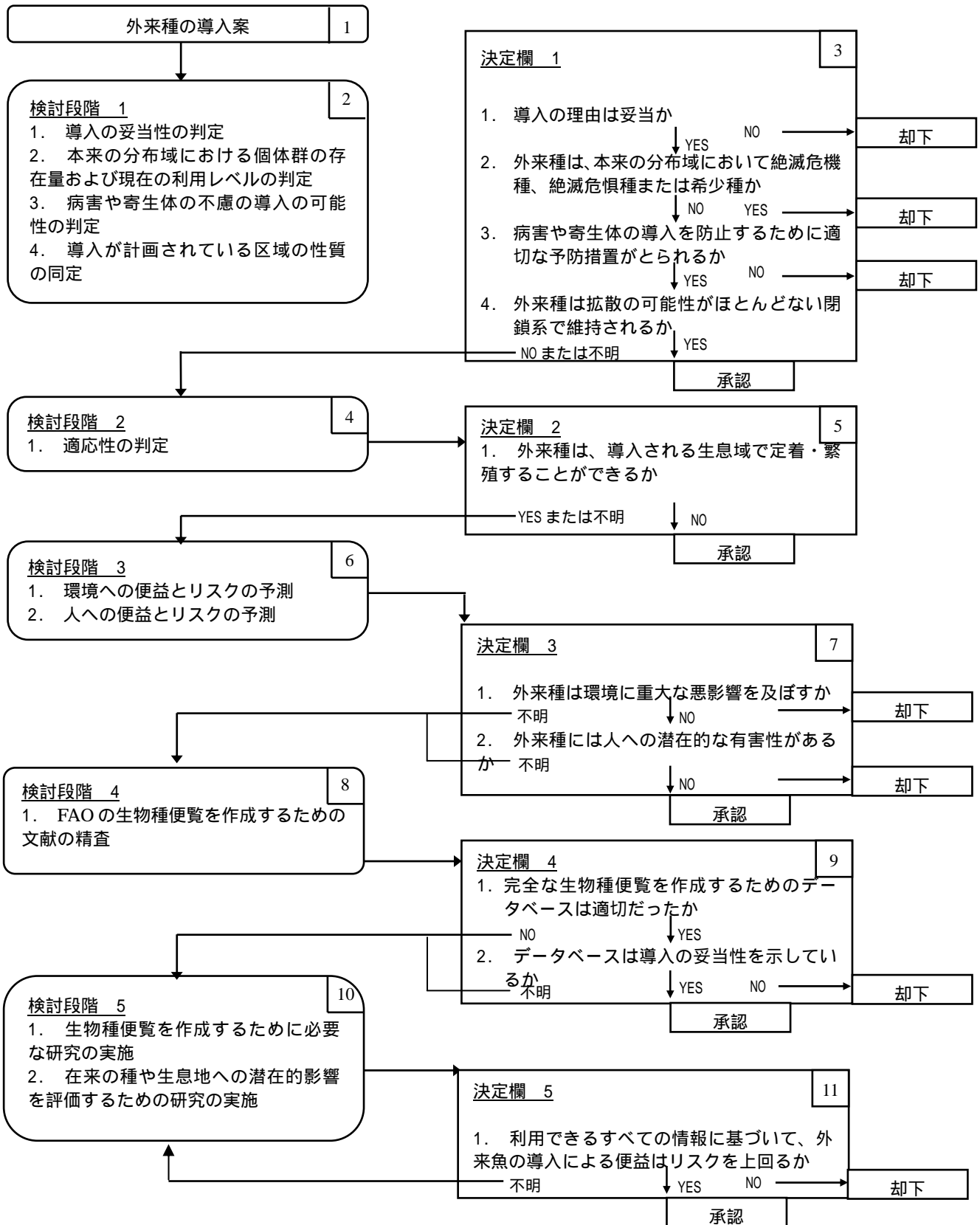
(NRC や OECD のリスク評価体系では考慮されていない要因の1つに、水生動物の繁殖能がある。先にも述べたように、水生生物が大量の卵を放出することや、流水の性質によって卵が広い区域に拡散されることから、陸上でみられるのとは違った状況が生まれる。そこで、トランスジェニックの魚介類の野外試験に関連するリスクを低減できる最良の方法は、養殖しようとする被験対象をすべて不妊化することだと考えられる。たとえば魚の

場合、2つの方法によって不妊化することができる。第1は、ある種のホルモンを魚の胚に投与することによる不妊化。この方法では100%不妊化することができず、またホルモンが食用魚に残留する可能性があるため、研究者の支持を得られていない。第2は、魚の卵を処理してその後代が三倍体(それぞれの魚が持つ染色体が2セットではなく3セット)になるようにすること。三倍体には生殖能がない。さらなる安全のためには、三倍体の誘導は、後代がすべて雌になるような追加の処理と組み合わせて行うことができる。三倍体の雌は、100%生殖能がない。しかし、生殖能のない系統は、試験区域とは別の安全な封じ込め施設で維持する必要がある〔Kapusinski, 1990〕。

検討の第4段階では、似通ったタイプの過去の導入による環境への影響についてあらゆる情報を得るために、学術文献やFAOの「生物種便覧」で使われている形式に沿ったデータベースの調査が行われる。トランスジェニック生物そのものに関しては得られる情報はわずかだったりなかったりする場合でも、遺伝子(およびそのオペロン)が1つ追加されたり変更されているだけなので、このトランスジェニック生物が遺伝的にはその野生近縁種と同じであることを思い出すべきである。つまり、試験区域へのトランスジェニックコイの導入などによる影響は、過去にその野生近縁種を新たな区域に導入した際の影響と同じである可能性がきわめて高いはずである。

検討の第5段階では、たとえば区域の性質や被験対象の繁殖能を明らかにするために、試験委員会が追加の調査の実施を要請することになると思われる。試験区域を含む生態地域を明確にし、その生態地域のなかの小区域を明らかにし、比較のために用いる基準区域を示すなどのために、さらなるデータが必要になることが想定される。この調査の結果によっては、第5段階の評価プロセスが繰り返される場合もある。

図 8.1 外来種導入案の評価のための検討・決定モデル



## まとめ

水産バイオテクノロジー、あるいはより具体的に遺伝子工学によって得られた無生物の産物や水生生物は、リスク評価担当者や規制当局にとって特別な、あるいは固有の問題を生じさせるだろうか。これまでの節で示した解説や議論、分析から、答えはノーでもありイエスでもあると思われる。

自然の無生物産物は、陸生生物に由来するものか水生生物に由来するものかを問わず、同じ方法で性質が明らかになる。たとえば、カルバミン酸塩、ラクトン、テルペンは、その構造は大幅に異なるが、これらが単離された元が海綿動物か陸生植物かに関係なく、ある共通の一般的な性質を持つ。極限環境から採集され、スクリーニング、研究される生物が増えるにつれて、抗菌、抗ウイルス、抗腫瘍などの性質を示す優れた化合物が見つかるのは確実である。しかし、一般のバイオテクノロジーでの経験に照らした場合、ある水生の自然産物の構造がどんなに特殊でも、新たなリスク評価枠組みや規制制度を必要とするような新規な状況や著しい有害性を生み出すことはない。たとえば、ある特殊な海洋毒素が発見された場合、その生理作用が既知の毒素のものと顕著に異なる可能性は低く、その毒性が既知の毒素のものより大幅に強い可能性も低い。したがって、定められた手続きにしたがって試験を行えば、その新たな化合物の化学構造は解明され、作用機序が説明され、最終的にはその有効性と安全性が評価されることになる。

自然の無生物産物と同様、遺伝子改変微生物に使われたり、水産バイオテクノロジーの手法によって開発される細胞培養系は、特別な管理措置や規制を必要とするような例外的な状況を生み出すことはない。たとえば、ウイルス性の魚の病害に対する組換えワクチンの開発は、他の動物用ワクチンを開発するのに使われるのと同様の手法が使われるはずであり、魚用ワクチンの野外試験は、確立されている動物用ワクチンの試験手順にしたがって行われるはずで、開発・試験プロセス全体は、現行の国の規制当局によって適切に監視されることになる。したがって、伝統的あるいは先端バイオテクノロジーによって得られた製品を試験するための現行の手順を、水産バイオテクノロジー製品の試験に用いることは妥当である。このため、水生環境で利用される無生物のバイオテクノロジー産物が、リスク評価担当者や規制当局にとって特別な、あるいは固有の問題を生じさせることはない。

もし誰かが、池や湖、川あるいは河口の汽水域に設置したケージや囲いの中でトランスジェニック魚を集めて養殖し、その優れた性質から利益を得ようとすれば、トランスジェニック魚の一部が拡散する可能性は高まると考えられる。そうした拡散による影響は予測できないが、既存の野生生物に及ぼすダメージは、目には見えなかったりごくわずかなものから、深刻なものにわたる可能性がある。過去に陸上で行った生物の野外試験での経験からすると、被験対象のゲノムに挿入する異種遺伝子を1つにして、遺伝的改変が最小限に抑えられている限りは、悪影響が生じる可能性は低い。

現在、予想される水生トランスジェニック生物の野外試験の状況は、10年前に陸生植物

の野外試験が行われようとしていた時の状況と似ている。しかし、考え方によっては、こうした最初の頃とは違い、科学者たちは過去の野外試験の経験を利用し、今後行われる水生環境での野外試験に役立つ教訓を得ることができる。さらに、より優れたリスク評価の手法も開発されており、遺伝物質の検出や追跡のための高度な技術も利用できる。つまり、現在の科学者は、以前に比べていくつかの点で状況が整っているのである。第1に、陸生環境で価値の立証されたリスク評価法を採用することができる。取りうる方法については、本章の前の部分で示した。第2に、試験に先立って、新たに改正されたリスク評価法を使って環境影響に関する包括的な説明書を作成することができる。第3に、こうしたリスク評価枠組みは、安全な試験手順を立案したり、試験やその長期の影響をモニタリングするのに効果的な仕組みを設けるのに適していることがわかるはずである。

水生トランスジェニック生物の野外試験の実施を検討する上で、現在の科学者たちは状況が整っていると述べたが、トランスジェニックの水生動植物や微生物の野外試験によって生じうる影響を評価し、決定することは依然としてきわめて難しい。さらに、現在のリスク評価枠組みは、水生環境への言及が不十分だったり、不適切だったりすることは、前述したとおりである。外来の水生動植物の意図的あるいは偶発的な導入にかかわるリスク評価に使われている枠組みは、長い実績はあるものの、いまだに発展中で未完成である。こうした短所を考慮すると、現行の規制や法律は、トランスジェニック水生動植物の野外試験を管理するには適していないといえることができる。結論として、現在の規制状況は、トランスジェニックの水生生物を開放系環境で試験するのには不利であると言わざるを得ない。こうした野外試験は多くの不確定要素を伴うため、生物海洋学や微生物生態学、環境毒性学の研究によって生物や遺伝子の水生環境への拡散の仕組みが明らかになり、水生トランスジェニック生物の野外試験のための充分なリスク評価法が開発されるまでは、規制当局はそうした決定を見送るべきである。

## 注

1. 本章で使われている拡散に関する用語は、国際海洋探査委員会 (ICES) によって考案された定義にしたがっている (Mann & Rosenfield, 1992)。したがって、導入種とは、現在の分布域“以外の”環境に意図的あるいは偶発的に運ばれて放出された種をいう。移動種とは、現在の分布域の“内部に”意図的あるいは偶発的に運ばれて放出された種をいう。種は、自然の作用を通じて、あるいは人間の活動の過程で導入されたり移動したりする可能性がある。

## 参考文献

- Andrews, C. (1992) The ornamental fish trade and fish conservation. *INFOFISH Int.*, No. 2, 25-29.
- Anonymous (1990) Transgenic fish experiment gets green light. *Biotechnol. Notes*, 3(10), 1-2.
- Anonymous (1991) Transgenic catfish may be next in line. *Biotechnol. Notes*, 4(10), 2-3.
- Anonymous (1992) ABRAC panel gives nod to catfish study. *Biotechnol. Notes*, 5(4), 1.
- Aquatic Nuisance Species Task Force (1992) *Proposed Aquatic Nuisance Species Program*. United States National Fish and Wild Life Service, Alexandria, VA, USA.
- Authur, R. & Sheriff, M. (1991) Towards international fish disease control in Southeast Asia. *INFOFISH Int.* No. 3, 45-48.
- Baskin, Y. (1992) Africa's troubled waters. *BioScience*, 42(7), 476-481.
- Brown, L.M., Dunahay, T.G. & Jarvis, E.E. (1989) Applications of genetics to microalgae productions. In: *Developments in Industrial Biotechnology, Volume 31*, Pierce, G.E. (ed.), pp. 271-274. Elsevier, New York.
- Carlton, J.T. (1989) Man's role in changing the face of the ocean: Biological invasion and implications for conservation of near-shore environments. *Conserv. Biol.*, 3(3), 265-273.
- Carlton, J.T. (1992a) Marine species introductions by ship's ballast water: An overview. In: *Introductions and Transfers of Marine Species: Achieving a Balance Between Economic Development and Resource Protection*, DeVoe, M.R. (ed.), pp. 23-26. South Carolina Sea Grant Consortium, Milton Head Island, SC, USA.
- Carlton, J.T. (1992b) Dispersal of living organisms into aquatic ecosystems as mediated by aquaculture and fisheries activities. In: *Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, R. (eds.), pp. 13-48. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Carlton, J.T. (1992c) An international perspective on species introductions: the ICES protocol. In: *Introductions and Transfers of Marine Species: Achieving a Balance Between Development and Resource Protection*, DeVoe, M.R. (ed.), pp. 31-34. South Carolina Sea Grant Consortium, Hilton Head Island, SC, USA.
- Chen, T.T. & Powers, D.A. (1990) Transgenic fish. *Trends Biotechnol.*, 8(8), 209-215.
- Chen, T.T., Lint C.M., Gonzalez-Villasenör, L.1., Dunham, R., Powers, D.A. & Zhu, Z. (1992) Fish genetic engineering: A novel approach in aquaculture. In: *Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, R. (eds.), pp.

- 265-280. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Colwell, R.R. (1986) *Marine Biotechnology and the Developing Countries*. UNIDO report IS. 593, January 7. United Nations Industrial Development Organization, Vienna.
- Colwell, R.R. (1987) Genetically engineered organisms in the ocean environment – risks and benefits. In: *Microbes in the Sea*, Sleight, M.A. (ed.), pp. 182-189. John Wiley & Sons, New York.
- Contreras-B., S. & Escalante-C., M.A. (1984) Distribution and Known Impacts of Exotic Fishes in Mexico. In: *Distribution, Biology, and Management of Exotic Fishes*, Courtenay Jr, W.R. & Stauffer Jr, J.A. (eds.), pp.102-130. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD, USA.
- Costerton, W. & Lappin-Scott, H.M. (1989) Behaviour of bacteria in biofilms. *ASM News*, 55, 650-654.
- Courtenay Jr, W.R. & Williams, J.D. (1992) Dispersal of exotic species from aquaculture sources, with emphasis on freshwater fishes. In: *Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, R. (eds.), pp. 49-82. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Crossman, E.J. (1984) Introduction of exotic fishes into Canada. In: *Distribution, Biology and Management of Exotic Fishes*, Courtenay Jr, W.R. & Stauffer Jr, J.A. (eds.), pp. 78-101. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD, USA.
- Davidson, J.R., Brook, J.A. & Young, L.G.L. (1992) Introduction of exotic species for aquaculture purposes. In: *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, R. (eds.), pp. 83-102. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Devlin, R.H. & Donaldson, E.M. (1992) Containment of genetically altered fish with emphasis on salmonids. In: *Transgenic Fish*, Hew, C.L. & Fletcher, G.L. (eds.), pp. 229-265. World Scientific, NJ, USA.
- Donaldson, E.M. & Devlin, R.H. (1993) Aquaculture biotechnology in Canada including the development of transgenic salmon. In: *The Proceedings of the Symposium on Aquatic Biotechnology and Food Safety*, pp. 47-56. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Engleking, H.M. & Leong, J.C. (1991) Sub-unit vaccine trials using glycoprotein and nucleoprotein constructs of the rhabdovirus, Infectious Haematopoietic Necrosis virus. In: *Proc. 14th Ann. AFS/FHS Meeting; 32nd Western Fish Disease Conference*. July 31 – August 3, Newport. p. 45. Oregon State University/Hatfield Marine Science Centre, USA.

- Erdman, D.S. (1984) Exotic fishes in Puerto Rico. In: *Distribution, Biology, and Management of Exotic Fishes*, Courtenay Jr, W.A. & Stauffer Jr, J.A. (eds.), pp. 162-176. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD, USA.
- Farley, C.A. (1992) Mass mortalities and infectious lethal diseases in bivalve Mollusca and associations with geographic transfers of populations. In: *Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, A. (eds.), pp. 139-154. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Ganzhorn, J., Rohovec, J.S. & Fryer, J.L. (1992) Dissemination of microbial pathogens through introductions and transfers of fish. In: *Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, R. (eds.), pp. 175-194. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Hallerman, E.M. & Kapuscinski, A.R. (1992) Ecological and regulatory uncertainties associated with transgenic fish. In: *Transgenic Fish*, Hew, C.L. & Fletcher, G.L. (eds.), pp. 209-228. World Scientific, New Jersey, USA.
- Harvey, S., Elashvili, I., Valdes, J.J., Karnely, D. & Chakrabarty, A.M. (1990) Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. *Bio/Technology*, 8, 228-230.
- Hoffman, J. (1990) Provesta forms marine biology company. *Chem. Mark. Report.*, 238(22), 27.
- Holloway, M. (1991) Soiled shores. *Sci. Am.*, 265, 102-116.
- Jacob, M.T. (1994) Marine aquaculture growth faces regulatory and environmental obstacles. *Genet. Engineering News*, 14(1), 32-34.
- Kapuscinski, A.R. (1990) Integration of transgenic fish into aquaculture. *Food Rev. Int.*, 6(3), 373-388.
- Kern, F.G. & Rosenfield, A. (1992) Shellfish health and protection. In: *Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, A. (eds.), pp. 313-324. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Kohler, C.C. & Stanley, J.G. (1984) A suggested protocol for evaluating proposed exotic fish introductions in the United States of America. In: *Distribution, Biology, and Management of Exotic Fishes*, Courtenay Jr, W.A. & Stauffer Jr, J.R. (eds.), pp. 387-406. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD, USA.
- Lightner, D.V., Redman, R.M., Bell, T.A. & Thurman, R.B. (1992) Geographic dispersion of the viruses IHHN, MBV and HPV as a consequence of transfers and introductions of Penaeid shrimp to new regions for aquaculture purposes. In: *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, A. (eds.), pp. 155-174. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.

- Maciolek, J.A. (1984) Exotic fishes in Hawaii and other islands of Oceania. In: *Distribution, Biology, and Management of Exotic Fishes*, Courtenay Jr, W.R. & Stauffer Jr, J.R. (eds.), pp. 131-161. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD, USA.
- Mann, D.W. (1990) Seaweeds and biotechnology – inseparable companions. *Hydrobiologia*, 204/205, 7-13.
- Mann, R. & Rosenfield, A. (eds.) (1992) *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*, Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- McDowall, R.M. (1984) Exotic fishes: The New Zealand experience. In: *Distribution, Biology and Management of Exotic Fishes*, Courtenay Jr, W.A. & Stauffer Jr, J.R. (eds.), pp. 200-214. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD, USA.
- McKay, R.J. (1984) Introduction of exotic fishes in Australia. In: *Distribution, Biology, and Management of Exotic Fishes*, Courtenay Jr, W.R. & Stauffer Jr, J.R. (eds.), pp. 177-199. The Johns Hopkins Press, Baltimore, MD, USA.
- Meyer, F.P. (1991) Aquaculture disease and health management. *J. Anim. Sci.*, 69, 4201-4208.
- Miller, H.I., Burris, R.H. & Vidaver, A.K. (1991) Regulation of biotechnology (letter). *Science*, 252, 1599-1600.
- Morse, A.N.C. (1991) How do planktonic larvae know where to settle? *Am. Sci.*, 79, 154-167.
- Neushul, M., Amsler, C.D., Reed, D.C. & Lewis, R.J. (1992) Introduction of marine plants for aquaculture purposes. In: *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, R. (eds.), pp. 103-138. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- NRC (1989) *Field Testing Genetically Modified Organisms: Framework for Decisions*. National Academy Press, Washington, DC.
- OECD (1986) *Recombinant DNA Safety Considerations*. Directorate for Science, Technology and Industry, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD (1992) *Safety Considerations for Biotechnology-1992*. Directorate for Science, Technology and Industry, Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OTA (1991) *Bioremediation for Marine Oil Spills*. United States Congress, Office of Technology Assessment, Washington, DC.
- Peterson, M.N.A. (ed.) (1992) *Diversity of Ocean Life: An Evaluative Review*, Centre for Strategic and International Studies, Washington, DC.

- Powers, D.A. (1990) Marine and freshwater biotechnology: a new frontier. In: *Biotechnology: Perspectives, Policies and Issues*, Vasil, I. (ed.), pp. 41-70. University of Florida Press, Gainesville, FL, USA.
- Powers, D.A., Chen, T.T. & Dunham, R.A. (1991) Gene-spliced fish experiments, *Science*, 254, 779.
- Renn, D.W. (1986) Marine algae biotechnology: Possibilities and realities. In: Workshop on Marine Algae Biotechnology: Summary Record, Board on Science and Technology for International Development (ed.), pp. 53-67. National Academy Press, Washington, DC.
- Robinson, P.K. (1985) Phycotechnology. *Ind. Biotechnol.*, 42(5), 73-78.
- Shears, M.A., Fletcher, G.L., Hew, C.L., Gauthier, S. & Davies, P.L. (1991) Transfer, expression and stable inheritance of antifreeze protein genes in Atlantic salmon (*Salmosalar*). *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, 1(1), 58-63.
- Sindermann, C.J. (1986) Strategies for reducing risks from introduction of aquatic organisms: A marine perspective. *Fisheries*, 11(2), 10-15.
- Sindermann, C.J. (1992) Role of the International Council for the Exploration of the Sea (ICES) concerning introductions of marine organisms. In: *Dispersal of Living Organisms into Aquatic Ecosystems*, Rosenfield, A. & Mann, R. (eds.), pp. 367-376. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- Stetzenbach, L.D., Hern, S.C. & Seidler, R.J. (1992) Field sampling design and experimental methods for the detection of airborne microorganisms. In: *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.J. & Rogul, M. (eds.), pp. 543-555. McGraw-Hill Inc., New York.
- Stickney, R.R. (1992) The importance of introduced marine species to the development of the marine aquaculture industry in the United States of America and Puerto Rico. In: *Introductions and Transfers of Marine Species: Achieving a Balance Between Economic Development and Resource Protection*, DeVoe, M.R. (ed.), pp. 17-22. South Carolina Sea Grant Consortium, Milton Head Island, SC, USA.
- Strausberg, R.L. & Link, R.P. (1990) Protein-based medical adhesives. *Trends Biotechnol.*, 8(2), 53-57.
- Teso, B. (1992) International harmonization of safety principles for biotechnology. In: *Proceedings of the 2nd International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*, May 11 – 14, 1992, Goslar, Germany. Casper, R. & Landsmann, J. (eds.), pp. 7-15. Biologische Bundesanstalt für Landund Forstwirtschaft, Braunschweig, Germany.
- Thorgaard, G.H. & Allen, S.K. (1992) Environmental impacts of inbred, hybrid and

- polyploid aquatic species. In: *Dispersal of Living Organisms Into Aquatic Ecosystems*, Resenfield, A. & Mann, A. (eds.), pp. 281-290. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.
- UNIDO (1992) Voluntary code of conduct: Release of organisms into the environment. *Biotechnol. Eur.*, 9(4), 218-221.
- USDA (1990) *Environmental Assessment of Research on Transgenic Carp in Confined Outdoor Ponds*. Office of Agricultural Biotechnology, Office of the Secretary, United States Department of Agriculture, Washington, DC.
- Weiner, J. (1985) Marine biotech in the Negev desert. *Bio/Technology*, 3-39.
- Welcomme, R.L.I. (1986) International measures for the control of introductions of aquatic organisms. *Fisheries*, 11(2), 4-9.
- Zilinskas, R.A. & Lundin, C.G. (1993) *Marine Biotechnology for the Developing for the Countries*. World Bank, Washington, DC.
- Zilinskas, R.A., & Colwell, R.R., Lipton, D.W. & Hill, R.T. (1995) *The Global Challenge of Marine Biotechnology: A Status Report of Marine Biotechnology in the United States of America, Japan & Other Countries*. Maryland Sea Grant College, College Park, MD, USA.

## 第9章

### 生物学的処理の実施における安全性の検討

モリス・レヴィン

メリーランド大学メリーランドバイオテクノロジー研究所、バイオテクノロジー社会問題センター（米国メリーランド州カレッジパーク）

#### はじめに

環境や健康に関する統計指標をみると、環境や私たち自身に対する汚染の影響がどんどん大きくなっていることがわかる。こうした影響は、世界各地の森林の樹木や清浄な水や空気、その他の生態系バランスを示す指標へのマイナスの影響、さらには、それによる人の健康への影響として表れている。こうした問題の一部は、私たちが日常生活で使う製品の製造と関係がある。自動車、石油製品、工業用化学品、農薬、プラスチック、紙などのメーカーが生み出す廃棄物は、これまでも現在も、世界各地の廃棄場に捨てられている。汚染の影響の多くは、工場施設や都市の住民（自動車、暖房）、農業地域（農薬、肥料）からの排出の結果である。こうした汚染による影響は、よく知られたもの（地球温暖化、オゾン層の減少）からあまり知られていないもの（地下水の減少や劣化）までさまざまなものがある（Council on Environmental Quality, 1979）。廃棄物の多くは、直接的に人に対して有毒であったり、環境に有害である。

大部分の廃棄物は、埋立地に廃棄されたり、コンテナに保管されたり、単に地面に捨てられたりする。このような行為が何十年にもわたって続けられた結果、中身のわからない廃棄物を含む埋立地が多数存在する。米国には、約 14,000 カ所の工業用地があり、年間でおよそ 2 億 6,500 万トンの有害廃棄物が発生している。表 9.1 は、米国の主な廃棄場でみられる一般的な廃棄物の種類を挙げたものである。廃棄物の量や種類が大きく異なるのと同様、その毒性も大きく異なる。1982 年以来、6,000 カ所を超える廃棄場で浄化が行われてきた。オランダの場合、土壌再生事業にかかる費用は、EU の推定で 2000 年までに 100 億ドルに達し、さらに 10 年後には 300 億ドルを超えると言われている（Porta, 1991）。

こうした問題に対しては、決まった対処法があるわけではない。廃棄場の浄化方法を選択し、まずどの廃棄場をどのような方法で浄化すべきかを決定しなければならない。物理的手法（焼却、固定化など）、化学的手法（中和など）あるいは生物学的的手法（自然または組換えの微生物を用いる）が考えられるが、とりわけ、費用、安全性、処理の完了までに必要な期間などに関して、それぞれに長所と短所がある。

微生物を使った廃棄物の分解は、特に目新しいことではない。微生物を利用した下水汚物の処理は数世紀にわたって行われており、このプロセスは現在も改良が続いている（Mckinney, 1962; Nicholas, 1987; Sterritt & Lester, 1988）。バイオテクノロジーの出現

によって、生物学的な手法が見直されて改良され、また、遺伝子工学の手法によって、微生物に改変を加えて有害物質をより迅速に分解できるようにすることができる。

表 9.1 スーパーファンド法による NPL【脚注 a】区域における廃棄物の種類の実例

物質	量 (ガロン)
銅を含むカキ殻	6000
油・水	58150
塗料	2457904
パークロロエチレン	800
塗料 / ホルムアルデヒド	4250
塗料用シンナー / 塗料除去剤	90025
塗料・プラスチック汚泥	251885
ポリ塩化ビフェニル	14000
塗料汚泥・塗料用エポキシ樹脂	9740 (立方ヤード)
農薬で汚染された繊維	500 (ポンド)
パークロロエチレン・油・アルコール	18400
農薬	7582
フェノール樹脂	89360
フェノール類 (ギ酸・メチレン)	900
リン酸溶液	2940
リン	350 (ポンド)
シアン化カリウム・カリウム錠剤	168 (ポンド)
殺鼠剤 (ヒ素)	2 (箱)

【脚注 a】米国環境保護庁 (USEPA) のスーパーファンド基金によって浄化が行われる USEPA 全国浄化優先順位表 (National Priority List) 区域。

出所: Superfund Innovative Technology Program, USEPA; EPA/540/5-91/004 (1991)。

忘れてはならないのは、開発した技術が実験室で証明できるだけでは不十分だということである。技術的に可能な対処法を利用するには、規制の問題、安全性の問題、産業や市場の問題、そして社会や政治の問題のどれもが大きなかかわりを持っている。

本章では、有害廃棄物を分解する微生物の開発と利用について述べ、一般的な廃棄物を分解するための方法を概観する。商業規模での利用に伴って生じうる健康上、環境上の問題を明らかにし、軽減や防止のための方法を検討する。

## 生物分解

生物分解とは、有機物が微生物によって無機化されるプロセスをいう。この環境プロセスは、何世紀も前から知られていた。有機質は、微生物の働きによって有機物から無機物へと分解される (Marx, 1989)。好氣的または嫌氣的代謝を通じて、有機化合物が二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) と水 (H<sub>2</sub>O) に還元されるのである。嫌氣的代謝では、メタン (CH<sub>4</sub>) が生成される。炭素循環では、光合成生物によって大気中の二酸化炭素が有機化合物に取り込まれる。硫黄循環では、微生物によって不活性硫黄や有機硫黄を含む化合物が作られる。

どちらの場合も、微生物の活動によって、毎年何トンもの物質が変化している。たとえば、このサイクルを回している硫黄は、年間 6,000 トンと推計されている。

微生物と植物と哺乳動物とが共存してきた数千年の間に、動植物がさまざまな種類の有機物を作り出す能力と、微生物が有機物を分解する（腐敗させる）能力は、並行して進化してきた。とはいっても、最初の合成有機塩素化合物である塩化エチルが調製されたのは 1940 年であり、有機塩素化合物が商業レベルで大規模に合成できるようになったのは、ほんのここ数十年のことである。生体異物である化学物質は続々と生み出され、これに容易かつ迅速に対応できる微生物系を開発することは、このような短期間には不可能だった（Hutzinger & Verkamp, 1981; Rochkind et al., 1986）。化学物質（生体異物）の多くは、微生物の攻撃に対する抵抗性や微生物への毒性を持ち、微生物を活用しようとする人類の試みを妨げている。とはいっても、生体異物をさまざまな程度や速さで分解する力のある微生物（表 9.2）が、各種の化学物質（生体異物）で汚染された場所から分離されている。これらの環境分離株が各種の塩素化芳香族化合物を分解する能力には、大きなばらつきがある。なかには複数の化合物を、さまざまな速度で分解できるものもある。Abramowicz (1989) は、ポリ塩化ビフェニル (PCB) 化合物で汚染された土壌において、同様の結果を示している。さまざまな PCB 化合物に対する分解能を持つ分離株は、26 種見つかっている。Abramowicz は、それらの遺伝的能力を組み合わせ、単独でより有用な微生物を作ること提案している。

表 9.2 主な炭化水素類が唯一の炭素源・エネルギー源として存在する場合の各株の栄養的多機能性

	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	6Dp <sup>a</sup>	DI <sup>a</sup>	PB <sup>a</sup>
トルエン	+	+	+++	-	+
2-クロロトルエン	++	++	+++	++	+
3-クロロトルエン	+++	+++	++++	+++	+++
3,4-ジクロロトルエン	+++	+++	++++	+++	+++
2,6-ジクロロトルエン	++	++	+++	++	+
キシレン	+	+	++	+	+
安息香酸塩	++++	++++	++++	++++	++++
3-クロロ安息香酸	-	-	++	-	-
4-クロロ安息香酸	+	+	+++	+	+
2,4-ジクロロ安息香酸	++	+	+++	++	+
3,4-ジクロロ安息香酸	++++	++++	++++	+++	++++
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸	++	+++	++++	++	++
2,4-ジクロロフェノール	+	+	++	+	-
2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸	++	++	++++	+++	+++

【脚注 a】属・種不明の環境分離株

出所：Pierce (1982) を改変して引用。

化合物のなかには、微生物の複合体によって無機化されるものもある。この事実をもとに、自然環境から分離された株で、複数の標的化合物に対する分解能を持つものの複合体

(共同体)が利用されている。共同体中の微生物が同定されている場合もあるが、多くの場合は、使われている微生物共同体には、同定されていない微生物が未知数含まれている。微生物共同体の関与には、廃棄物の混合物に含まれる特定の構成要素に対する作用に、特定の微生物が必要になるという意味での関与と、特定の化合物に対してある微生物の複合体が必要だという意味での関与がありうる(表 9.3)。微生物のなかには、特定の組み合わせの一員としてでない働かないものがある。このプロセス(共代謝)では、分解される化合物がエネルギー源や炭素源の役割を果たしている(Atlas & Bartha, 1987)。Pfaender & Alexander (1972)と Sakazawa ら(1981)の研究には、共代謝が関与する場合、関与する生物の属は特定されることがほとんどだが、該当する生物の種名はわからないことが多いという事実が示されている。微生物共同体が関与する場合、代謝の最終産物は同定されるが、微生物は特定されないことが多い(Nielson et al., 1987; Fliermans et al., 1988)。人類が作れるものは何でも、自然が分解できることが示されてきた (Sterritt & Lester, 1988)。

表 9.3 微生物共同体による分解

分解作用	微生物	参考文献
DDT【脚注 a】の分解：アルスロバクター ( <i>Arthrobacter</i> ) 属による p-クロロフェニル酢酸の産生と利用(共代謝)	<i>Hydrogenomas</i> 属および <i>Arthrobacter</i> 属	Pfaender & Akexander, 1972
ポリビニルアルコールの分解： <i>Pseudomonas putida</i> による分解が共代謝の促進因子となった(共代謝)	<i>Pseudomonas putida</i> 等の <i>Pseudomonas</i> 属	Sakazawa et al., 1981
キーボン【脚注 b】の分解(共代謝)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Orndorff & Colwell, 1980
シルベックス【脚注 c】の分解：シルベックス使用下で 2 種類の微生物の組み合わせが生育した；分離した場合には成長がみられなかった(共代謝)	<i>Pseudomonas</i> 属および <i>Achromobacter</i> 属	Ou & Sikka, 1977
微生物共同体(ただし純粋培養ではない)によって、トリクロロエチレンが分解された	HClとCO <sub>2</sub> を産生する好氣的分解	Fliermans et al., 1988
休止細胞による生体異物である化学物質(環境中で存在する濃度)の「共代謝」が示された	安定した共同体による木材パルプ廃棄物の嫌氣的分解	Nielson et al., 1987

【脚注 a】pp'-ジクロロジフェニルトリクロロエタンを主成分とする複雑な混合化学物質：きわめて毒性の高い合成殺虫剤の 1 つ

【脚注 b】キーボン：デカクロロ-オクタヒドロ-1,3,4-メテノ-2H-シクロプタペンタレン-2-オン(殺虫剤)

【脚注 c】シルベックス：2-(2,4,5-トリクロロフェノキシ)プロピオン酸(除草剤)

出所：Johnston & Robinson (1983) を改変して引用。

微生物は環境条件に敏感である。一般に、中程度の酸性またはアルカリ性で、正常体温付近の温度が最適である。しかし、微生物のなかには極端な温度で活動的なものがあり(低温細菌や高温細菌) こうした性質が特殊な廃棄物の処理に利用されている。低温細菌の処

理能力は、中温細菌の 60~70%と推定されている (Bioremediation Report, 1991)。注意しなければならないのは、微生物の代謝は環境条件の変化に敏感であること、中間代謝産物の蓄積が起きることがあること、そして、そうした産物のなかにはもとの物質より毒性が強いものがあるかもしれないということである。テトラクロロエチレン (動物に対する発がん物質として知られる) の嫌氣的分解では、分解の過程で塩化ビニル (人に対する発がん物質として知られる) の蓄積を引き起こすことがある (Barrio-Lage et al., 1986)。McCallら (1981) は、2,4,5-トリクロロフェノキシ酢酸の分解過程で、CO<sub>2</sub>のほかに、土壤中に 2,4,5-トリクロロフェノールおよび 2,4,5-トリクロロアニソールの蓄積がみられたと報告している。

天然微生物が持つ分解能を高めることを目的とした研究が多くの実験室で行われている一方、分解の対象と速度を向上させた改変微生物を作りだそうとしている研究者もいる (Rojo et al., 1988)。Rojo は、3 つの別々の土壌細菌の 5 種類の異化経路にかかわる酵素を単一の菌株に組み込んだことを示している。廃棄場に放出されたのちに、生残して増殖することのできる株も注目されている (Neidle et al., 1987; Dwyer et al., 1988)。環境要因に手を加えて自然の微生物叢が持つ主な分解能を向上させるために、微生物叢の in situ での代謝速度や遺伝的構成を制御する環境要因をより深く理解しようとしている研究者もいる (Olson & Goldstein, 1988)。米国の全米科学財団は、環境バイオテクノロジーの実地利用の実現可能性を検討するため、研究会を実施した (Sayler et al., 1988)。これまで、組換え微生物の大規模野外利用は行われていないものの、突然変異株の試験は行われており、ほかにも組換え株の試験が計画されている (Bioremediation Report, 1991)。

微生物が持つ分解能を商業規模でもっと十分に活用しようとする試みには、いくつかの形態がある。最も古く、直接的なのは、処理プロセスを改良して污水处理を向上させるものである (Hall & Melcer, 1983)。Mizrahi (1989) は、嫌気性消化の技術である堆肥生成装置 (biogas digester) での各種処理法とその改良、そして污水处理場での作業効率の向上につながる管理の側面について概観している。あらゆる污水处理法には、3 つの要素が含まれる。環境の物理的操作、微生物への栄養源の化学的添加、微生物集団の増強 (天然の微生物を加える、微生物を改変して優れた性能特性を持たせる、適当な栄養素を添加して土着の微生物の繁殖を促す) である。生物処理の発展は、汚水の分解速度を上げたり、生成される廃水が人の健康や環境に与える害を抑える手法の開発とともに始まった。初期の污水处理では、汚水を地面の広い区域に撒いていた (100 人あたり約 0.4 ヘクタールの広さが必要だった)。1889 年に米国マサチューセッツ州のローレンス試験場 (Lawrence Experimental Station) で行われた研究の結果、濾過フィルターとして砂利が使われるようになった。この研究の後、英国マンチェスター州デイビーヒューム (Davyhulme) で、汚水の嫌気性消化法、次いで、好気性消化法が開発された。好気性消化法は、消化する混合物に空気を加えるだけで、嫌気性消化法の接種剤と一緒に用いた場合、消化の期間は 5 週間から 24 時間に短縮された (Sterritt & Lester, 1988)。これは、自然な形で適応させ

た微生物を使って廃棄物の分解を高めた最も初期の例だと思われる。

微生物と標的となる汚染物質が接触できるようにしたり、接触を高めるためにさまざまな方法が開発されてきた。表 9.4 は、最も一般的な方法のいくつかと、それぞれに関する安全性の問題を示したものである。表からわかるとおり、環境への微生物の放出が最小限に抑えられるのは固定化微生物や固定生物膜反応槽を利用する場合で、環境や健康への悪影響の可能性も最小限に抑えられる。さらに、どのタイプの反応槽も、プロセスに使われる微生物を確実に封じ込めるために、廃水を消毒するための適当なシステムと組み合わせることができる。地下土壌の再生やランドファームングに関係する土壌処理システムや利用法は、微生物の大規模な拡散につながる。このような場合、微生物を確実に無害化することに重点を置くべきである。

表 9.4 生物処理プロセスの種類

種類	原理	主な利用法
連続回分式反応槽	懸濁液中での微生物による消化	反応条件の制御；環境中に微生物が放出される
水処理システム	貫流システムで固定化微生物または固定化酵素を用いる	可溶性の有機物が必要。微生物の放出はない
土壌処理システム	吸収された汚染物質を可溶化するための洗浄	効果を最大限にするために事前の処理が必要
固定生物膜反応槽	微生物または酵素をカラム中のプラスチックの媒体に固定して、表面積および栄養交換を最大化する	有機物濃度が低い場合でも処理することが可能
土壌スラリー (タンクまたは酸化池)	反応槽内で土壌と水を激しく攪拌する	温度管理が不要
ランドファームング(畑耕耘)	in situ で土壌に栄養源を添加し、耕起する	微生物と処理物質を封じ込めるためのライニングが必要
地下土壌の再生	土壌に水、栄養源、酸素(電子受容体)をポンプで注入する	土着の微生物集団全体の生育が促進される。油およびガソリンの流出；地下水の有機物汚染

一般に、あらゆる場所にとって理想的な単独の方法はなく、分解を最適化するためにはいくつかの方法を組み合わせることが不可欠であることが、経験上明らかである。また、汚染区域によっては、何らかの物理的あるいは化学的な前処理や後処理が必要になる場合もある。

米国では、100 を超える企業が、廃棄場の浄化のための生物分解技術を大規模化する手法の採用に積極的に取り組んでいる。またほとんどの企業は、組換え微生物を使わずに生物処理プロセスを改良しようという研究にも携わっている。ダウ・ケミカル社やゼネラル・エレクトリック社といった大企業では、廃棄物の生物処理法の開発、実施に力を入れている。多くの企業が参加して協会を設立し、商業規模での生物処理の成功事例集を作成した (Applied Biotreatment Association, 1989)。微生物を用いた浄化は、エクソンバルディーズ号による流出事故後のアラスカの海岸線 (Crawford, 1990) のほか、米国の別の場所

や欧州でも成功している ( Stone, 1984; Bluestone, 1986; Savage, 1987; Keeler, 1991 )。微生物は、処理場から出る悪臭の予防にも使われている ( Grubbs & Molnaa, 1987 )。現在までのところ、接種材料として使われているのは非組換え株だけである。エクソンバルディーズ号の流出事故など、多くの場合の処理では、土着微生物の生育を促すために栄養塩の撒布が行われる。組換え微生物を使えば、より広い範囲の化合物をより短時間で分解できる可能性がある。しかし、組換え微生物は環境中での定着があまりよくない場合があり ( Lenski, 1991 )、目的が達成されるまで長く生残しない可能性がある。さらに、国民の抵抗があって、政府も組換え微生物の環境への利用には消極的である。このような問題と、標的化合物の大部分を無機化する力を持つ天然の微生物 ( 単独あるいは微生物叢 ) が利用できることを考え合わせると、産業界が天然微生物の利用に重点を置いている根拠は明らかである。

## 現地での生物分解の手法

生物分解の利用には、水文学的、物理学的な現地の徹底した分析や、実験室や野外での研究によって、どのような戦略が適切で、事前または事後に物理的、化学的な処理を行う必要があるかどうかを判断することが不可欠であることが、現在では一般に認められている。現地の物理学的側面は、撒布や培養される微生物の代謝への影響を考慮して判断されなければならない。土着の微生物叢の分解能や栄養要求を調べる必要がある。最終的に、その分解プロセスが実験室でうまく実証されなければならない、また大規模で有効であることも示されなければならない ( Wick & Pierce, 1990 )。この場合、その処理が原位置 ( in situ ) で行われる、つまり、処理される物質はその場から移動されず、自然条件下で現地の水分や栄養源、微生物叢を変えることによって処理されるのか、あるいは、処理する物質を反応槽に移して、管理された条件のもとで微生物に曝露させるかのどちらかになる。処理が in situ で行われる場合には、プロジェクトの開始前に、モニタリングの対象とする化合物やサンプリングの時間と場所、モニタリングの継続期間など、モニタリングの手法を確立する必要がある。コストや規制の問題も、この段階で考慮に入れなければならない。

## 現地調査

プロジェクトの成功には、その廃棄場の十分な理解につながる徹底的な調査が不可欠である。これには、廃棄物と現地の両方の性質を調べることが含まれる。どの微生物を選ぶかや、物理的あるいは化学的処理が必要かどうかは、廃棄物の種類によって決まる。栄養源や水分を与えるタイミングや必要性は、現場の土壌の種類と水文学的性質によって左右される。現地の評価に 1 年から 2 年が必要になる可能性もある。キーストーン環境資源 ( Keystone Environmental Resources ) 社では、汚染区域の地下および隣接する土壌を 2

年間かけて調査した (Campbell et al., 1989)。この間に、現地の水文学的性質、土壌型、地下の状態、気候の特性といった物理学的側面が明らかにされ、それと同時に微生物叢の性質や汚染物質が微生物叢に与える影響を明らかにするための実験研究が行われた。

実現可能性試験の結果、適当な栄養源と水分が与えられれば、現地に存在する微生物が汚染物質を分解できることが明らかになった。キーストーン社のプロジェクトでは、栄養源 (窒素、リン、無機物) のほか、代替りの電子受容体として窒素の添加が行われた。一般に、およそ 1,000 ガロン (約 3,800 リットル) の炭化水素物質を分解するのに、10,000 ポンド (約 4,500 キログラム) の酸素と 875 ポンド (約 390 キログラム) のアンモニア窒素が必要になる。このプロセスでは、およそ 7,000 ポンド (約 3,150 キログラム) の細菌が生みだされる。

処理が成功しているかどうかを監視するのと、利用できる栄養のレベルを監視するためのサンプリング方法が開発された。この方法では、無機化の指標として塩化物がモニタリングされ、汚染の直接的な測定は、井戸の上層部の 3 カ所、下層部の 3 カ所で行われた。12 週間の処理後、汚染物質の約 90% が除去された。別の実地利用では、四塩化炭素、クロロベンゼン、エチルベンゼン、トルエン、1,1,1-トリクロロエチレン、キシレンの 98 から 99% の削減に成功した。

処理に関与する微生物の同定は、種のレベルまでは行われぬのが普通である。分解プロセスには、ノカルジア (*Nocardia*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、アシネトバクター (*Acinetobacter*) 属、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属の株など、微生物の共同体が関わっていることが多い。生物分解は、多くの場合、グループまたは共同体としての微生物の代謝作用の結果である。ある企業の報告では、あるガソリン流出の分解には 32 種類もの微生物が関与したという (Bluestone, 1986)。一般に、化合物が複雑なほど、微生物共同体も複雑になる (Bluestone, 1986; Olson & Goldstein, 1988)。ある場所の微生物集団全体の遺伝的能力と生物分解での形質発現の関係をより深く理解しようとする研究 (Olson & Goldstein, 1988) が進行中である。その目的は、微生物を全般的に生育させるのに十分な栄養源を与えるのではなく、特定の化合物の分解に寄与する特定の遺伝子を *in situ* で同定し、増強することである。そのためには、環境条件下で遺伝子の発現や複製を制御する要因についてもっと理解する必要があるが、それによって、より低コストで迅速な廃棄物の分解が可能になり、環境への悪影響の可能性も低くなる。より厄介な廃棄物には、組換え微生物を開発するか、ある種の反応槽が必要になる。

現在までのところ、規制の問題があるため、環境中への放出に関して組換え微生物が *in situ* で使われたことはない。バイオリクターでは、組換え微生物が使われている。バイオリクターでは微生物を封じ込めることができるため、これを利用することで環境上の問題の一部は回避することができる。さらに、生物分解プロセスの物理的な条件を制御することもできる。温度、微生物との接触時間、栄養レベル、分解する物質の濃度を最適化することができる。Irvine et al. (1982) と Wick & Pierce (1990) は、浸出水処理のた

めの連続回分式反応槽（SBR）の使用について解説している。Irvine らのグループの研究では、汚染された工業用地からの浸出水を取り上げている。最初に、浸出水は、廃水処理場からの「無殺菌未処理廃棄物送出装置（non-sterile raw waste feed）」につながった貯蔵タンクに最大で 19 日間貯蔵されてから、粒状活性炭（GAC）カラムで濾過された。組換え微生物は、この SBR に加えられた。

最後に、中和反応とともに、土着の微生物集団から単離した純培養株を加えて微生物集団を強化した（Wick & Pierce, 1990）。SBR 環境で使われたのは、*Pseudomonas putida* という特殊な株で、もとの株にはみられない分解能を持ち、これが単離、培養されて SBR 内の既存の微生物群に加えられた。SBR は閉鎖系として運転された。すべての揮発性有機物は GAC で濾過され、SBR を通じて再利用された。

表 9.5 は、プロセスの有効性を評価し、規制に適合していることを証明するのに必要な要素である。集中的なモニタリングでは、場所と時期を慎重に選択し、サンプル物質についても同様に注意深く扱う必要がある。規制に準拠した化合物の濃度を評価するのに使われる分析法は、規制当局に受け入れられるものである必要があるとともに、質を保証するための適切な手順が必要である。生物処理のプロジェクトでは、これが不可欠であるとともにコストのかかる部分の 1 つである。

表 9.5 モニタリングを行う要素と化合物

規制に適合するためのもの【脚注 a】	プロセス監視のためのもの
pH	pH
ベンゼン	安息香酸塩
ヘキサクロロシクロブタジエン	生物学的酸素要求量（BOD）
ヘキサクロロシクロペンタジエン	クロレンド酸
モノクロロベンゼン	o-, m-, p-クロロ安息香酸
モノクロロベンゾトリフルオリド	酸素消費速度
モノクロロトルエン	フェノール
フェノール	浮遊物質
テトラクロロベンゼン	全有機ハロゲン化合物
テトラクロロエチレン	
全有機炭素（TOC）	
トリクロロベンゼン	
トリクロロエチレン	
2,3,5-トリクロロフェノール	

【脚注 a】 USEPA によって定められた規制適合レベル

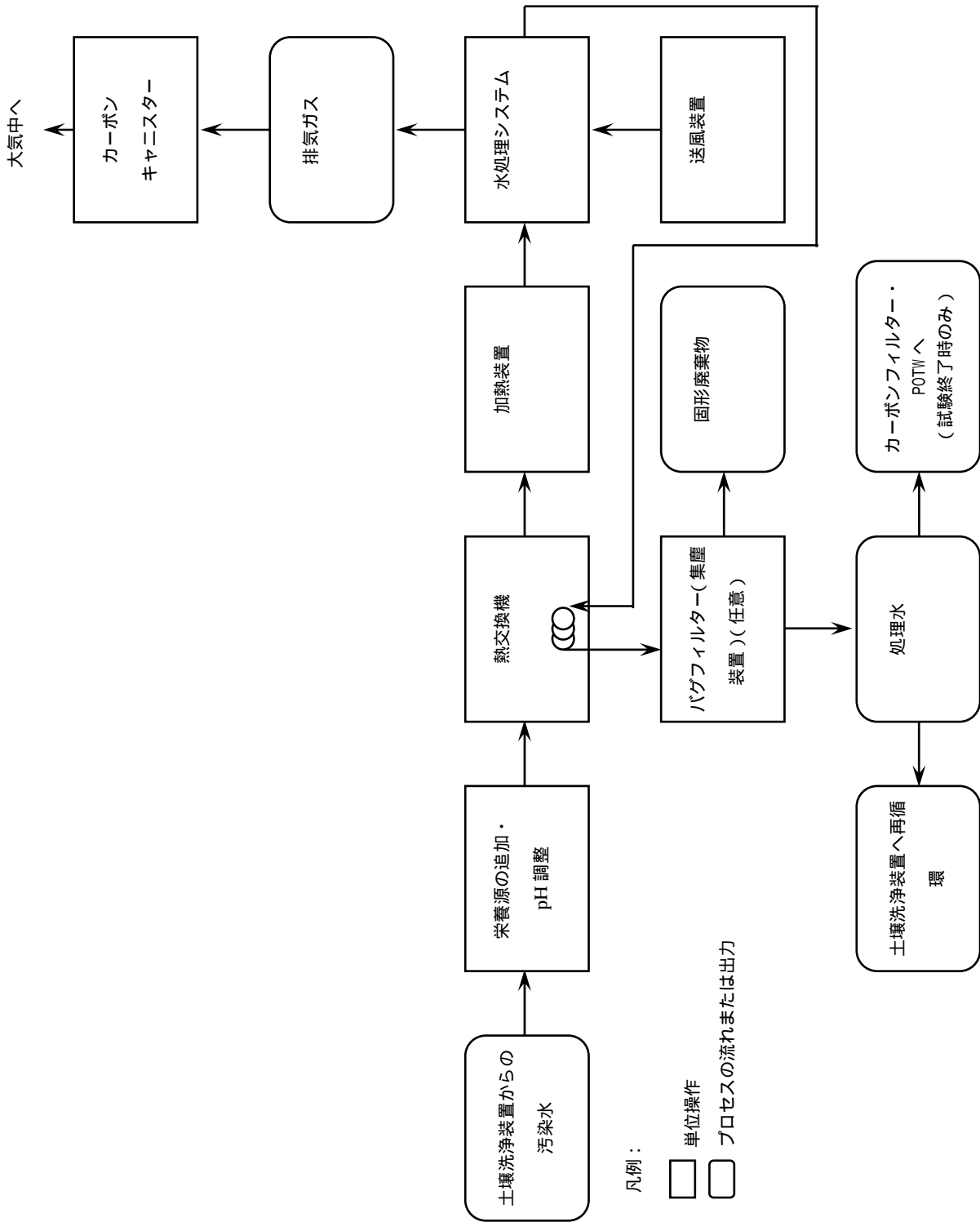
出所：Levin & Gealt（1993）を改変して引用。

SBR は 24 時間サイクルで運転された。年間の処理量は、1 万立方メートルを超えた。監視対象の化合物の削減幅には、大幅な差が出た。クロロ安息香酸（オルトおよびメタ）は、当初レベルの 763mg/l と 219mg/l から検出されなくなった（測定の感度は 3.5mg/l）。全有機ハロゲン化合物は、1,062mg/l から 319mg/l（70%）に削減された。SBR プロセスが最も効果を示したのは全有機炭素とフェノールで、それぞれ当初の 10,575mg/l と

1,553mg/l から 99% 以上の削減が達成された。SBR で処理した浸出水は、排出基準を満たすためにはさらに GAC での処理を必要とした。しかし、必要となる活性炭の量は、生物処理のおかげで劇的に削減された。毎日行われていた炭素フィルターの交換は、年に 3 回程度になった。コストの削減幅は、処理水 1 立方メートルあたり、約 30 米ドルと見積もられた。

別のタイプの回分式反応槽では、担体に付着させた微生物や酵素を用いる。この方法では、反応槽が、処理される液体が通過する充填カラムとして機能する。図 9.1 はこうしたシステムを示したもので、これはバイオトロール (Biotrol) 社が開発し、米国環境保護庁のスーパーファンド・革新技术評価制度 (Superfund Innovative Technology Program) で使われた事例である (USEPA SITE, 1988; Ellis & Stinson, 1991)。この装置は好気的にも嫌気的にも運転することができ、温度、滞留時間、廃液の条件 (pH、栄養調節) の制御と流入出のモニタリングが可能である。微生物集団は、幅広い種類の汚染物質を分解処理できるように改変されることもある。バイオトロール社は、付着した物質を分離して液相に移し、バイオリアクタ内で処理できるようにする土壌浄化法も開発している。

図 9.1 水処理システム (ATS) の工程図 (Ellis & Stinson, 1991)



汚染された土壌や水の生物処理については、2、3の基本的な手法のさまざまなバリエーションが開発、報告されている。それらに利用される装置や菌株、栄養素の配合には、特許を取得しているものもある。表 9.4 は、封じ込め、管理された条件および in situ での廃水や土壌の処理に商業利用されている基本的な方法を示している。これらは、2つの基本的なタイプに分けることができる。液体と微生物のある種の相互作用が関与するバイオリアクターと、汚染物質がまだ粒子に吸着している間に土壌処理を行うものである。一般に、バイオリアクターでは、土壌の洗浄が行われ、ここで、溶液、なかでも特許の特殊な洗浄液で処理することによって標的化合物を脱着させる。この液体は、消化槽（SBR）、つまり微生物をなんらかの担体に付着させ、液体がそこを通過する水処理システムまたは固定生物膜反応槽で微生物に曝露することによって処理される。土壌スラリー方式とランドファームングでは、in situ で土壌、栄養源、水分をさまざまな割合で混合し、微生物と標的化合物の接触を最大化させる。

微生物と処理する物質の接触を最大化する方法としては、物質を可溶化したり、付着面となる各種の物理的媒体を使って曝露面積を増加させることなどがある。「固定化」系での酵素の利用も提案されている。汚染された液体は、生物分解のプロセスの1段階を触媒する固定化酵素が含まれたカラムに送出される。この方法によるコストと効果はまだ定まっていない。

キーストーン社のプロジェクトで使われたような土壌システムでは、栄養源や水分を添加するほか、微生物と分解しようとする物質を接触させるために常に土を耕す必要がある。反応速度や得られる最終産物を最大化するために、環境要素（pH、温度）が操作される。既存の微生物集団は、実験室で培養した微生物（現場から採取したものか、特殊な分解能を持つ株として選択されたもの）を加えることによって強化される。

処理の速度は、物質の種類、現地の物理学的性質、最終的な汚染物質濃度がどの程度になればよいかという目標、そしてどのくらいの規模で処理をするかによって非常に大きく左右される。処理速度については、1週間あたり浸出水6万ガロン（228,000リットル）から1カ月あたり土壌1.7トンまで、さまざまな報告がある。あるバイオリアクターは、製鉄所でのコークス生産で残渣として出るシアン化合物の処理に使われ、毎日700～1,000ポンド（315～450キログラム）処理している（McCormick, 1985）。

生物処理に関する有害物質規制研究所（Hazardous Materials Control Research Institute）のシンポジウムの議事録（1989）や、USEPAのSITE報告書（1988）には、具体的な技術の詳細な説明が含まれている。これらの技術のほとんどで、汚染物質の大幅な除去が示されている。一般に、監視対象の化合物の80～98%が除去されている。一部には、完全に除去できないケースもあるが、処理が必要な物質の量は大幅に削減され、コストと時間が大幅に節約される。

## コスト

コストに関する数字は、さまざまな文献に見られる (Rishel et al., 1984; McCormick, 1985; Bluestone, 1986; Savage, 1987; Wick & Pierce, 1990)。しかし、汚染除去のコストは、実際にかかる費用を直接評価する以外にも考慮しなければならないものがあるため、各種の方法を比較するのは難しい。それぞれの方法に長所と短所があり、コストも大きく異なる。大きな要因となるのは、物質の種類と場所の性質である。表 9.6 は、大規模プロジェクトでの立方ヤード当たりのコストと所要期間、および主な問題のいくつかを比較したものである。当座のコストだけを考えた場合、最も低コストなのは生物分解である。生物分解は、最も少ないエネルギーで、廃棄物を無機化して無害な物質にすることができる。しかし、生物処理には時間がかかり、必ずしも国や地方の規制で義務づけられているレベルまで浄化できるとは限らない。このため、追加の処理とコストが必要になる場合がある。しかし、生物処理によって廃棄物量が大幅に削減されるのはたしかで、事後の処理にかかるコストは削減される。

表 9.6 処理法の比較

処理方法	立方ヤード当たりのコスト(米ドル)	期間(月)	主な問題
焼却	250-800	6-9	排出、エネルギー消費が大きい
固定化	90-125	6-9	腐敗、浸出
埋立て	150-250	6-9	浸出、長期的な汚染
生物処理	40-100	18-60	代謝による副産物、時間的要因、微生物の放出

出所：Levin & Gealt (1993) を改変して引用。

## 健康や環境への有害性

理想的な条件のもとでは、生物分解をしようとすればかならず、標的化合物は無機化されるはずである。好氣的プロセスでは二酸化炭素と水が得られ、嫌氣的プロセスではメタンと無機イオンが得られる。先に示したように、生物分解は目新しいプロセスではない。しかし、プロセスを向上させるために組換え微生物を用いたり、廃棄物処理に生物学的手法が広く用いられることによって、これまでは考慮されなかったリスク評価の問題がいくつか生じ、既存の問題も強調されるようになった。

組換えや天然の微生物の環境への適用に伴うリスクの評価は、過去 10 年間に活発な研究の対象とされてきた。リスク評価では、当該の有害性を同定、定量化することと、そのデータを曝露要因と考え合わせることが必要であることについては一般に合意が得られている。さまざまな研究者や機関が、組換えや天然の微生物の環境への適用に伴うリスクの評価に関する手法や手順を提案している (OTA, 1985; Tiedje et al., 1989; NRC, 1989; Levin & Strauss, 1991; Ginzburg, 1991)。リスク評価に関する問題点についての議論も

行われてきた (Sharples, 1987; Davis, 1987)。微生物をモニタリングし、制御するための手法が開発され、全般的な評価や (OECD, 1986; Levin et al., 1987, 1992; Biotechnology Action Programme, 1990) 個別の評価 (Katz & Marquis, 1991; Sharples, 1991; Vidaver & Stotzky, 1992; Vandenberg, 1992; Lindow et al., 1992) が行われている。

バイオテクノロジーが関与する廃棄物の分解手法によって、エネルギー利用の面でより低コストで、標的物質のより完璧な無機化ができるというのが一般的な見方である。しかし、廃棄物処理のために微生物の環境への適用を検討する際には、3種類の問題があると考えられている。

1. 微生物 (組換え株または天然株) を使用することに伴う一般的な問題
2. 微生物が廃棄物を分解するプロセスに伴う問題
3. 微生物による分解の速度を高めるために封じ込めを解除する技術に伴う特殊な問題

組換えまたは外来の (土着でない) 微生物の環境への適用に伴うリスクを評価する必要性があることについても、一般に合意されている。

## 廃棄物の分解に微生物を用いることに伴う一般的な問題

化学製品の環境への適用は広く受け入れられており、安全性を確保するための手法が数十年にわたって開発され、検証されてきた。微生物の環境への適用に関する多くの懸念も同様で、健康や安全性の問題に対処するための試みは、まず、環境中での化学物質の使用に伴うリスクを評価するために開発された方法に基づいて行われてきた。Milewski (1985) は、組換え微生物の野外試験に伴う問題を明らかにし、野外適用の計画を評価する際の検討ポイントを挙げている。

1. 一般的な問題 親微生物、宿主微生物、伝達される遺伝物質の同定のほか、組換え微生物の構造、伝達の手段、導入される遺伝物質の安定性と発現を示すデータ。
2. 環境上の問題 改変の対象となる微生物の生息場所、一般的な分布、生残性、生殖性、拡散性などに関するデータ、宿主域、他の生物との相互作用、生物循環のプロセスに及ぶと考えられる影響、自然環境に存在する他の生物との遺伝情報交換の可能性を示す生物学的相互作用に関する検討。
3. 野外試験に関するデータ 試験案の説明 (目的、重要性、正当性) および組換え微生物の生残、複製、伝播に関する実験データの説明。微生物の数、場所、影響が考えられる具体的な標的生物、封じ込めと試験のモニタリング方法など、野外試験の条件についての説明。

これらのポイントは、数年にわたって繰り返し強調されてきており（USGAO, 1988; Sharples, 1991）、5つの主要な疑問に答えるものである。

1. その微生物は生残するか
2. その微生物は増殖するか
3. その微生物は他の区域に拡散するか
4. その微生物は有害か
5. その微生物は他の標的外生物に遺伝子を伝達するか

全米科学アカデミー（NAS, 1987）は、「組換え生物の環境への導入に関するリスクは、その生物とそれが導入される環境の性質に基づいて評価されるべきである」としてこの問題をまとめている。その後、汚染の除去や軽減の問題が生じてきている（Vandenbergh, 1992）。

初期には農業への適用に重点が置かれることがほとんどだったが、これらの安全性に関する一般的な問題は、廃棄物処理を目的とする微生物（組換えまたは天然）の導入にも同じようにあてはまる。リスクとは有害性と曝露との関数であるため、上の疑問に答えることによって、ある特定の環境である微生物を用いることにかかわるリスクを評価するための根拠が与えられる。

## 微生物による廃棄物分解に伴う諸問題

### 健康上の問題

生物処理に伴うリスクを評価する場合、健康に関して2種類の問題がかかわってくる。それは、（ ）作業者に影響が及ぶ可能性、および（ ）公衆衛生に対する影響が及ぶ可能性、である。これらは、原因（不完全な無機化や微生物の増殖）の点ではつながりがあるが、予防や回避の手段は異なる。影響が心配されるのは、処理プロセスの結果生じた化合物、あるいは処理区域の環境特性を意図的に変えるために使用、増強された微生物への曝露があったときである。

物理的な処理法では、物質が1つの媒体から別の媒体（たとえば水から土壌、または水から大気など）に移行する結果になる。微生物による生物分解では、理論上は、完全な無機化が行われることになる。しかし、分解が完全に行われず、微生物代謝による中間産物が蓄積する（すなわち生物分解ではなく生体内変換が起きる）可能性もある。こうした生体内変換による産物の毒性は、当初の物質と比べて低い場合もあれば、高い場合もあれば、同じ場合もある。これらの移行性は、もとの物質よりも低い場合、高い場合、同じ場合がある。さらに、これらの産物の残留性が、もとの物質よりも低い場合、高い場合、同じ場

合もある。移行性や残留性の差は、曝露レベルの変化につながり、それによって悪影響が生じる可能性がある。毒性の低い物質でも高濃度で長時間曝露すると、毒性の予期しない発現を招くこともありうる。先に示したように、ポリ塩化ビニルの部分分解は、人に対する発がん物質として知られる塩化ビニルの蓄積を招く。ほかにも、亜硝酸塩や窒素酸化物の存在下でのアミンの N-ニトロソアミンへの変換 (Ayanba & Alexander, 1974; Greene et al., 1981) や、PCB 類の部分的な生物分解によって生じるクロロ安息香酸の蓄積 (Sayler et al., 1988) などの例がある。

部分分解 (生体内変換) が起きる場合、さらなるリスク評価の問題が生じる。蓄積した代謝産物の毒性、移行性、残留性を見極める必要がある。これらの要素が、環境、非標的動物やヒトへの悪影響の可能性を左右することになる。生成する化合物の種類と量は、部分分解の程度と経路によって決まる。特定の化合物が生物組織に与える有害な影響を判断するためには、いろいろな試験法が利用できる (Loomis, 1978; Paustenbach, 1989)。

しかし、具体的な代謝産物やその濃度については、予測できない場合もある。環境要素 (pH、温度、水分) や土着の微生物の存在によって、分解の程度は大きく影響を受ける可能性がある。個々の化合物についての試験では、化学物質が混ざり合うことによる相乗効果に関するデータは得られないが、複雑に組み合わせられた化学物質の毒性を測定するための試験法はある (Irvin & Akgerman, 1987; Irvin, 1989)。

廃棄物の分解に利用するために培養 (あるいは組換え) された特殊な微生物は、ヒトをはじめとする標的外の動物や昆虫に対して害を及ぼすことはないと思定することができる。しかし、先に示したように、生物処理では、目的の微生物の代謝活動を助けるために栄養分が添加される。閉鎖系の場合には、これによって問題が生じることはないが、非閉鎖系の場合、普段存在している他の微生物の増殖が起きる可能性があり、その中にはヒトをはじめ他の非標的動物あるいは昆虫に病害性を持つものも含まれる。作業員や住民がこうした微生物に曝露すれば、有害な影響を招くことになる。

不完全な無機化による健康上の問題は、汚染された水や大気を通じた住民の曝露によって生じる。もし地下水の汚染がありうることが示されれば、処理区域からの流出を監視するための試験井を使うことによって、水の安全性を確保することができる。廃水も、同様の方法で監視できる。強調すべきは、代謝による中間産物の有害性が知られており、分解が不完全である可能性が高い場合のみ監視が必要であるという点である。一般に塵粒によって微生物が拡散する空気による汚染は、後述する方法 (非閉鎖系での諸問題) によって対処することができる。

## 環境上の問題

環境に適用された組換え生物の拡散によって環境への悪影響が生じる可能性については、これまでにさまざまな国民の懸念や憶測がある。標的外生物、生物学的循環、ヒトの健康

に影響が及ぶ可能性が議論されてきた。現在までに、700件近く行われている組換え微生物または組換え植物の野外試験では、そのような問題があったという事例はない。ある事例 (Short et al., 1991) では、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸ナトリウムを分解させるために改変したシュードモナス (*Pseudomonas*) 属の菌株の有効性を評価している研究者らが、2,4-ジクロロフェノール (有毒な中間代謝産物) の土壤中の蓄積を見出している。2,4-ジクロロフェノールの蓄積によって、土壤中の菌類の90%が失われた。

悪影響の可能性があるということは、環境への適用を安全性の面から再検討しなければならないということである。Cavaliere (1991) は、組換え微生物の利用による環境への影響を予測するために、マイクロコズムを利用することを提案している。マイクロコズムを用いることによって、非組換え体と比較した組換え微生物の定着性や生残性、特有の影響についてのデータを得ることができる。マイクロコズムから得られるデータは野外条件下での結果を完全には表さないかもしれないが、野外試験を進めるかどうか、あるいはどのように進めるかを判断するための根拠にはなる。同様に、マイクロコズムでのデータに基づいて、プロセスの修正、安全のための予防措置の整備、封じ込めや軽減のための規定の立案、効果的なモニタリング手順の考案を行うことができる。

## 非閉鎖系での諸問題

処理しようとする物質の性質がさまざまであることや処理区域の物理学的特性に加え、気候条件や規制の問題があるために、生物処理の方法にはきわめて多くの種類がある。当然ながら、バイオレメディエーションのシステム制御レベルが高いほど、よい結果が出る可能性が高まり、悪影響の可能性は減少する。最も制御が効くのが回分式反応槽で、次が各種の貯蔵タンクあるいは半閉鎖型のバイオリクターである。最後が自然または改変された生態系で、最も制御が効きにくい。回分式反応槽は閉鎖系であるため、微生物は封じ込め状態にあり、勝手に環境に入り込むことはないと考えることができる。同時に、完全な無機化が実現されるように物理的、化学的条件をコントロールすることができる。貯蔵タンクと半閉鎖型の反応槽では、制御に限界がある。これらには、小規模なものから大規模なもの、開放 (柵で囲んで侵入を防ぐ) あるいは潟湖型に周囲を囲んだものや、汚染された土壌の小山を覆う温室型の構造物など、さまざまなタイプがある。

こうした半閉鎖系は、追加の微生物を導入して増強する場合や、土着微生物の生育を促すために栄養源を添加する処理に使われる。栄養源と微生物は同時に加えられることが非常に多い。大部分の微生物は、自然環境下では同定が不可能である。また、土壌サンプル中の微生物のうち5%は実験室条件では培養できないが、これは一般に、適切な培地がないためであり、生きていたが培養できない状態にあると考えられる。性質が明らかになっていない野外環境に栄養源を添加すると、細菌や菌類、原生動物が増殖する。これらの多くはウイルスを持っている。こうした微生物の一部は、栄養源の添加や生育条件の変化を

受けて、ヒトや動植物に対する病原体になる可能性がある。

これらの微生物は、感染症やアレルギー反応を引き起こしたり（特に現場の作業員に対して）毒素を産生する場合がある。感染症を引き起こす一般的な土壌細菌の典型的な例は破傷風菌（*Clostridium tetani*）だと思われるが、この細菌は刺し傷を通じて感染する。このほかに、枯草菌（*Bacillus subtilis*）などの細菌が作業員にアレルギー反応を引き起こすことが知られている。Emmons(1962)によると、「全身性真菌症を引き起こす菌類は、土壌中には一般的に見られ、数の多少はあるが、常在している」。さらに、菌類への曝露によってアレルギー反応が引き起こされたり、菌類のなかには毒素を産生するものもある。

微生物の拡散を最小限に抑える手段の1つとして、閉鎖系（潟湖や反応槽を帆布やプラスチックで覆う）を利用することが奨励される。区域の囲い込みは、一般住民に対しては曝露を最小限に抑えることになるが、閉鎖系の内部では、塵粒や噴霧を通じて作業員が高濃度の微生物に曝露される可能性がある。現場の処理土壌の表面を湿らせることによって、空気中の粉塵の量は減少する。場合によっては、防護用のマスクを使用することが望ましい。

## 封じ込めと軽減

望ましくない微生物が根絶されることはまずないが、許容レベル（すなわち、経済や健康への影響として許容できないレベル以下）にまで減少させることは可能である。微生物を完全に封じ込めることは不可能で、経験からすると、有益な微生物の場合も有害な微生物の場合も、必ずしも必要というわけではない（Vidaver & Stotzky, 1992）。Vidaver と Stotzky は、封じ込め（containment）に代わって、より現実的な「限局（confinement）」という用語を使うことを提案している。限局の意味は、微生物が利用地点から拡散しないことではなく、微生物が効果的に管理され、有害な影響が最小限に抑えられていることをいう。大部分の微生物は、個々の栄養・水分の要求や、環境条件（生態学的地位）への感受性によって、生物学的に限局されている。

追加的な戦略として、はたらきを弱めた微生物の利用や本来の宿主以外への伝達性や生残性を抑えた安全なクローニングベクターの構築と利用、また、温度などの環境要因に感受性の高いレプリコンを用いることなどがある（Cuskey, 1992）。はたらきを弱めた微生物の利用は、環境への適用においては現実的ではない。しかし、放出された細菌を制御するための条件致死システムがいくつか考案され、試験されている。これには、温度感受性系（低温ではDNAの修復が起こらない）その微生物が生息する環境には通常存在しない無害な化学物質が存在する場合にのみ活性化される誘導性の代謝経路を持つ条件致死性の遺伝子配列、そして、細胞の生存に不可欠な主要な代謝機構を阻害する「自殺」遺伝子を含むものなどがある。遺伝子の制御は、該当の廃棄物が存在することによって（誘導）あるいは存在しないことによって（抑制解除）行われる。廃棄物の濃度が基準値以下に下が

ると、この遺伝子が活性化される。あるいは、遺伝子は常に活性化していて、二番手の遺伝子が保護装置の役割を果たすという方法もある。この二番手の遺伝子の活性は、処理される廃棄物の濃度によって制御される。

微生物による環境汚染の除去(あるいは軽減)が研究されてきており、Vidaver & Stotzky (1992)でも検討されている。状況がそれぞれ異なっており、汚染除去の手法も異なるために、事例ごとの対処が不可欠になる。微生物の種類、物理的な環境、改変の性質、そして季節のいずれもが考慮されなければならない。汚染除去の手順を考える際には、野生型であっても改変されたものであっても、その微生物に関するデータがきわめて重要である。表 9.7 は、土壌や動植物が有害な微生物で汚染された場合の汚染除去法と、効果が出るまでに必要な時間を示したものである。動植物について示したのは、野外適用の間に汚染される可能性があるためである。したがって、動物(処理区域に迷い込んだ動物)の汚染が発生した場合には、微生物の拡散を最小限に抑えるために、焼却、検疫あるいは屠殺が行われることもある。その他にも微生物の拡散源として、鳥類や齧歯類、流出水も考慮しなければならない。処理区域で生育している植物は、微生物に汚染される可能性がある。微生物が有害であると考えられる場合には、その植物は速やかに廃棄(焼却、耕起)するか検疫(将来の使用が検討されている場合)を行わなければならない。長期的な除去法を示したのは、そのプロジェクトが長期間にわたり、問題が再発する場合に使用するためである。物理的な防護の問題は、特に動物の場合、あまり強調する必要はない。堅固で高さのある柵によって、ほとんどの望ましくない動物の侵入を防ぎ、不法侵入が起きないようにすることができる。

表 9.7 自由生活性微生物および関係する動植物による望ましくない影響を予防または除去するための期間と方法

微生物と関係する 動植物	即時	短期【脚注 a】	長期【脚注 c】
自由生活	燻蒸 灌水 化学物質【脚注 d】	燻蒸 灌水 化学物質 土壌侵食の防止 土壌改良	燻蒸 灌水 土壌侵食の防止 土壌改良
植物	焼却(根絶) 検疫 耕起 化学物質 灌漑・灌水 媒介昆虫の防除 機械・設備類の衛生管理 排水の管理 ソラリゼーション	検疫 化学物質 輪作 転作 灌漑・灌水 加熱処理 土壌のソラリゼーション 土壌侵食の防止	輪作 耕作 土壌改良 雑草防除 土壌侵食の防止
動物	焼却 検疫	検疫 抗生物質、薬剤	抗生物質、薬剤 鳥類、齧歯類、昆虫の

屠殺 鳥類、齧歯類、昆虫の防 除 排水の管理（昆虫） 物理的防護	鳥類、齧歯類、昆虫の 防除 物理的防護	防除 物理的防護
--	---------------------------	-------------

【脚注 a】効果が表れるまで数時間から数日

【脚注 b】効果が表れるまで最長 3 年

【脚注 c】3 年以上

【脚注 d】標的微生物に対する化学物質の選択や利用可能性が、実行可能性と方法を左右する  
出所：Vidaver & Stotzky (1992) を改変して引用。

処理区域の細菌のレベルを低下させるための土壌殺菌の詳細を表 9.8 に示した。米国で一般的に使用されている土壌燻蒸剤を具体的に列挙してある。表からわかるように、ほとんどの薬剤は生物全般に対する有効性を持っている。すべてが動植物に対して有害で、使用には注意が必要である。燻蒸剤の使用によって、土壌中に存在する微生物の生息密度は大幅に低下する。しかし、殺菌が完全でない場合や、時間が経つにつれて、微生物叢の生き残りが増殖し、密度が上昇する。燻蒸後に微生物集団のどの部分がどの程度生き残ったかによって、新たにできる集団は、種類や個々の種の相対的な個体数の面で以前と同様の場合もあれば、以前とはまったく異なる集団になることもある。可能性の 1 つとして、導入した微生物が優勢になることもありうる。そのため、処理区域には、周辺の汚染されていない土壌を接種することが推奨される。これによって、本来の土着微生物叢に置き換わり、導入した微生物が優勢になる可能性は大幅に低くなる。

表 9.8 土壌燻蒸剤

一般名	化学名(商 品名の一 部)	組成	特異性	用量(ヘ クター ル当た り量)	毒性(対植物)	哺乳類 LD <sub>50</sub> 【脚注 a】 (mg/kg)	適用上の注意
臭化メチル	ブロモメ タン (Dowfun e MC-2)	98% + 2%ク ロロピ クリン	一般殺生 物剤	450 ~ 900 キ ログラ ム	有毒	1	耐ガス性密閉 シートが必要
クロロピクリ ン	トリクロ ロニトロ メタン (Picfume 、 Larvacide )	100%	一般殺生 物剤	300 ~ 500 リ ットル	有毒	1	耐ガス性密閉 シートを用い ると最も効果 的
塩素化炭化水 素類(1,3,D) (DD)	1,2-ジクロ ロプロパ ン、1,3-ジ クロロプロ ロパンな どの塩素 化炭化水 素類	1,3D 単独ま たは他 の塩素 化炭化 水素類 と混合	殺線虫剤	100 ~ 500 リ ットル	有毒	140	シートによる 土壌の密閉が 必要

二臭化エチレン (EDB)	(Telone、Vidden D) 1,2-ジブromoエタン (Dowfume W-84、Nematox 100)	60 ~ 80%液	殺線虫剤	19 ~ 94 リットル	有毒	150	シートによる 土壌の密閉が 必要
メチルイソチオシアニド	メチルイソチオシアニドは、単独添加または一部の不安定な化合物の分解促進剤として使われる	30 ~ 40%液 または 水和剤	一般殺生物剤	600 ~ 1,200 リットル または 300 ~ 400 キログラム	有毒	280-650	注入または回 転耕耘機使用
ジブロモクロプロパン 【脚注 b】 (DBCP)	1,2-ジブromo-3-クロプロパン (Fumazone、Nemagon など)	液体	殺線虫剤	19 ~ 38 リットル	一部の植物に 有毒	172	注入またはド レンチ
次亜塩素酸塩	塩素	100ppm 水溶液	殺微生物剤	不定： pHおよび 温度に 依存	有毒	0.03-02 <sup>c</sup>	液体で適用

【脚注a】LD<sub>50</sub>とは、被験群（通常はラット）の50%が死亡する用量をいう。

【脚注b】有毒性のため、現在では使用されていない。本表に掲載したのは比較のためだけである。

【脚注a】感受性の魚種への連続曝露の感度範囲：Le<sub>50</sub>（毒物に曝露した魚の50%が死亡する濃度）

出所：Vidaver & Stotzky (1992) を改変して引用。

Lamprey et al., (1992) では、バチルス (*Bacillus*) 属（一般に屈折性が高い）の小規模または大規模野外試験に特化した汚染除去法を検討している。Lampreyらは、対象区域が十分に小さい場合には、土壌の最上層（植物やそれに付随する動物相を含む）を採取して消毒すればよいことを示している。蒸気（121 で 15 分間）または<sup>60</sup>Co線源を用いる照射法（3,000krad/hで 3 時間または 3krad/hで 96 時間）の使用が提案されている。区域が広く、土壌採取が現実的でない場合には、蒸気を直接当てるのが推奨されている。この方法を行うには、蒸気管（各 80cm）を埋設し、ボイラー（10<sup>6</sup>kcal/時）から蒸気を供給する。もっと広く使われているシステムは、「水蒸気蒸留法」である。処理する区域にポリ塩化ビニルのシートをかぶせて重しをし、シートの内側に蒸気を送り込むのである。温度は 54 ~ 100 の範囲で行われている。この方法は、発芽した胞子を破壊するために間隔をおいて行うことができる。こうした手法は、どんな微生物にも利用が可能である。

## 参考文献

- Abramowicz, D.A. (1989) Biodegradation of PCB contaminated soil using recombinant DNA bacteria. *Proc. A & WMA/EPA Symp.*, pp. 301-312. Cincinnati, OH, February, 1989.
- Applied Biotreatment Association (1989) *Compendium of Biotreatment Applications*. ABTA, Washington, DC.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. (1987) *Microbial Ecology*. Benjamin Cummings Co., Menlo Park, CA.
- Ayanba, A. & Alexander, M. (1974) Transformations of methylamines and formation of a hazardous product, dimethylnitrosamine, in samples of treated sewage and lake water. *J. Environ. Qual.*, 3, 83-89.
- Barrio-Lage, G., Parsons, F.Z., Nassar, R.S. & Lorenzo, P.A. (1986) Sequential de-halogenation of chlorinated ethenes. *Environ. Sci. Technol.*, 20, 96-99.
- Bioremediation Report (1991) Waste stream technology not slowed by winter. COGNIS, CA. December, 1991, 1-2.
- Biotechnology Action Programme, Part 1 (1990) Economidis, I. (ed.), Commission of the European Community, Brussels.
- Bluestone, M. (1986) Microbes to the rescue. *Chem. Week*, October 29, 34-40.
- Campbell, J.R., Fu, J.K. & O'Toole, R. (1989) Biodegradation of PCP contaminated soils using *in situ* subsurface reclamation. *Proc. 2nd Natl. Conference on Biotreatment*, pp. 17-29. Hazardous Materials Control Research Institute, Washington, DC.
- Cavaliere, L.F. (1991) Scaling up field testing of modified microorganisms. *BioScience*, 41, 568-574.
- Council on Environmental Quality (1979) Global 2000 Report. Washington, DC.
- Crawford, M. (1990) Bacteria effective in Alaska cleanup. *Science*, 247, 1537.
- Cuskey, S.M. (1992) Biological containment of engineered microorganisms. In: *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.A. & Rogul, M. (eds.), pp. 911-918. McGraw-Hill Inc., New York.
- Davis, B. (1987) Bacterial domestication: underlying assumptions. *Science*, 235, 1329-1335.
- Dwyer, D.F., Rojo, F., Timmis, K.N., Sussman, M., Collins, C.H., Skinner, F.A. & Stewart-Tull, D.E. (1988) Fate and behaviour in an activated sludge of a genetically-engineered microorganisms designed to degrade substituted aromatic compounds. In: *The Release of Genetically Engineered Microorganisms*, Sussman,

- M., Collins, C.H., Skinner, F.A. & Stewart-Tull, D.E. (eds.), pp. 77-88. Academic Press, London.
- Ellis, W.D. & M.K. Stinson (1991) Site demonstration of a soil washing system by Biotrol, Inc. at a wood preserving site in Brighton, MN. In: *Remedial Action, Treatment, and Disposal of Hazardous Wastes; Proc. 17th Ann. RREL Hazardous Waste Res. Symp.* April 1991, EPA/600/9-91/002.
- Emmons, C.W. (1962) Natural occurrence of opportunistic fungi. *Lab. Invest.* II, 1026-1039.
- Fliermans, C.B., Phelps, T.J., Ringelberg, D., Mikell, A.T. & White, D.C. (1988) Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 1709-1714.
- Ginzburg, L.R. (1991) *Assessing Ecological Risks of Biotechnology*. Butterworth, Boston.
- Greene, S., Alexander, M. & Legget, D. (1981) Formation of *N*-nitrosodimethylamine during treatment of municipal waste water by simulated land application. *J. Environ. Qual.*, 10, 416-421.
- Grubbs, R.B. & Molnaa, B.A. (1987) Enhanced anaerobic digestion and odour control through bioaugmentation. *Proc. Natl. Conference on Municipal STP Sludge Management*, pp. 2-7. HMCRI, Silver Spring, MD.
- Hall, E.R. & Melcer, H. (1983) Biotechnology developments for the treatment of toxic and inhibitory wastewaters. *Biotechnol. Adv.*, 1, 59-71.
- Hazardous Materials Control Research Institute (1989) *Proc. 2nd Natl. Conference on Biotreatment*. HMCRI, Washington, DC.
- Hutzinger, O. & Verkamp, W. (1981) Xenobiotic chemicals with pollution potential. In: *Microbial Degradation of Xenobiotic and Recalcitrant Compounds*, Leisinger, T., Cook, A.M., Hutter, R. & Neusch, J. (eds.), pp. 3-46. Academic Press, London.
- Irvin, T.R. (1989) Application of cell culture systems to monitor chemical toxicity during biodegradation. 7th Ann. Hazardous Materials Management Conference, May, 1989, Atlantic City, NJ.
- Irvin, T.R. & Akgerman, A. (1987) Post-implantation rodent embryo culture systems to identify prenatal toxic components of complex environmental chemical mixtures. In: *Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Mixtures*, Sandhu, V.S., DeMarini, D., Mass, M., Moore, M. & Mumford, J. (eds.), pp. 367-372. Plenum, New York.
- Irvine, R.L., Sojka, S.A. & Colaruotolo, J.F. (1982) Treating a landfill by pure strain inoculations of SBRs. In: *Impact of Applied Genetics in Pollution Control*, Kulpa,

- C.F., Irvine, R.L., & Sojka, S.A. (eds.), pp. 96-108. University of Notre Dame, Lafayette, Indiana.
- Johnston, J.B. & Robinson, S.G. (1983) *Genetic Engineering and the Development of New Pollution Control Technologies*, p. 61. University of Illinois Press, ULU 830102.
- Katz, L.S. & Marquis, J.K. (1991) Toxicology of genetically-engineered microorganisms. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M.A. & Strauss, H. (eds.), pp. 51-63. McGraw-Hill Inc., New York.
- Keeler, R. (1991) Bioremediation: Healing the environment naturally. *R&D Magazine*, July 1991, 34-40.
- Lamprey, J., Hendrick, C.A., Tomes, N.J., Brown, S. & Dean, D.H. (1992) Decontamination and mitigation: *Bacillus*. In: *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.A. & Rogul, M. (eds.), pp. 827-841. McGraw-Hill Inc., New York.
- Lenski, R.E. (1991) Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. In: *Assessing Ecological Risks of Biotechnology*, Ginzburg, M. (ed.), pp. 173-190. Butterworth, Boston.
- Levin, M.A. & Gealt, M. (1993) *Biotreatment of Industrial and Hazardous Waste*, p 4. McGraw-Hill Inc., New York.
- Levin, M.A. & Strauss, H. (eds.) (1991) *Risk Assessment in Genetic Engineering*. McGraw-Hill Inc., New York.
- Levin, M.A., Seidler R., Bourquin, A., Fowle, J. III & Barkay, T. (1987) EPA developing methods to assess environmental release. *Bio/Technol*, 5, 38-45.
- Levin, M.A., Seidler, R.A. & Rogul, M. (eds.) (1992) *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*. McGraw-Hill Inc., New York.
- Lindow, S.E., Lindemann, J. & Haefele, D. (1992) Containment, decontamination and mitigation of *Pseudomonas* species in environmental settings. In: *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.A. & Rogul, M. (eds.), pp. 891-909. McGraw-Hill Inc., New York.
- Loomis, T.A. (1978) *Essentials of Toxicology*. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Marx, J.L. (1989) *A Revolution in Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- McCall, P., Vrona, S. & Kelly, S. (1981) Fate of uniformly carbon-14 ring labelled 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *J. Agric. Food Chem.*, 29, 100-107.
- McCormick, D. (1985) One bug's meat. *Bio/Technol*, 3, 429-435.

- Mckinney, R. (1962) *Microbiology for Sanitary Engineers*. McGraw-Hill Inc., New York.
- Milewski, E. (1985) Field testing of microorganisms modified by recombinant DNA techniques: Applications issues and development of points to consider. *Doc. Recomb. DNA Tech. Bull.*, 8(3), 102-108.
- Mizrahi, A. (1989) Biological waste treatment. *Adv. Biotechnol. Process.*, 1-310.
- National Academy of Sciences (NAS) (1987) *Introduction of Recombinant DNA-Engineered Organisms into the Environment: Key Issues*. National Academy Press, Washington, DC.
- Neidle, E.L., Shapiro, M.K. & Ornston, L.N. (1987) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. *J. Bacteriol.*, 169, 5496-5503.
- Nicholas, R. (1987) Biotechnology in hazardous waste disposal: An unfulfilled promise. *ASM News*, 3, 138-142.
- Nicholas, R. & Giampocoro, D.E. (1989) Nature's prescription. *Hazmat World*, June, 1989, 30-36.
- Nielson, A.H., Allard, A.S., Lindgren, C. & Remberger, M. (1987) Transformations of chloroguaiacols, chloroveratroles, and chlorocatechols by stable consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 2511-2519.
- NRC (1989) *Field Testing Genetically Modified Organisms. Framework for Decisions*. National Academy Press, Washington, DC.
- OECD (1986) *Recombinant DNA Safety Considerations*. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Olson, B.H. and Goldstein, R.A. (1988) Applying genetics to environmental management. *Environ. Sci. Technol.*, 22, 370-376.
- Omenn, G. (ed.) (1987) *Environmental Biotechnology*. Plenum, New York.
- Omenn, G. & Hollaender, A. (1984) (eds.) *Genetic Control of Environmental Pollutants*. Plenum, New York.
- Orndorff, S.A. & Colwell, R.R. (1980) Microbial transformation of Kepone. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 398-406.
- OTA (1985) *New Developments in Biotechnology: 3. Field Testing Engineered Organisms.*, Office of Technology Assessment of the US Congress, Washington, DC.
- Ou, L.T. & Sikka, H.C. (1977) Extensive degradation of Silvex by synergistic action of aquatic microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 1336-1339.
- Paustenbach, D.J. (1989) *The Risk Assessment of Environmental and Human Health Hazards: A Textbook of Case Studies*. Wiley, New York.

- Pfaender, F.K. & Alexander, M. (1972) Extensive microbial degradation of DDT *in vitro* and DDT metabolism by natural communities. *J. Agric. Food Chem.*, 20, 842-846.
- Pierce, G.E. (1982) Diversity of microbial degradation and its implications in genetic engineering. In: *Impact of Applied Genetics in Pollution Control*, Kulpa C.F., Irvine, R.L. & Sojka, S.A. (eds.), pp. 20-25. University of Notre Dame, Lafayette, IN.
- Porta, A. (1991) A review of European bioreclamation practice. *Biotreatment News*, 1, no. 9, 6-8.
- Rishel, H.L., Boston, T.M. & Schmidt, C.J. (1984) *Costs of Remedial Response Actions at Uncontrolled Hazardous Waste Sites*. Noyes Publ., Park Ridge, NJ.
- Rochkind, M.L., Blackburn, J.W. & Sayler, G.S. (1986) *Microbial Decomposition of Chlorinated Aromatic Compounds*. EPA/600/2-86/090.
- Rojo, F., Ramos, J.L., Pieper, D., Engesser, K.H., Knackmuss, H.J., Timmis, K.N., Hollenberg, C.P. & Sahm-Heds, J.S. (1988) Laboratory evaluation of novel catabolic pathways. *Bio/Technology*, 6, 65-74.
- Sakazawa, C., Shimo, M., Taniguchi, Y. & Kato, N. (1981) Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 261-267.
- Savage, P. (1987) Bacteria pass a Houston cleanup test. *Chem. Week*, Nov. 11, 55-56.
- Sayler G.S., Blackburn, J.W. & Donaldson, T.L. (1988) *Environmental Biotechnology of Hazardous Wastes*. National Science Foundation Project Report, no. CES 8714691.
- Sayler, G.S., Kong, H. & Shields, M.S. (1984) Plasmid-mediated biodegradative fate of mono-halogenated biphenyls in facultatively anaerobic sediments. In: *Genetic Control of Environmental Pollutants*, Omenn, G.S. & Hollaender, A. (eds.), pp. 377-415. Plenum, New York.
- Sharples, F.E. (1987) Regulation of products from biotechnology. *Science*, 235, 1329-1332.
- Sharples, F. (1991) Ecological aspects of hazard identification for environmental uses of genetically-engineered organisms. In: *Risk Assessment in Genetic Engineering*, Levin, M.A. & Strauss, H. (eds.), pp. 18-31. McGraw-Hill Inc., New York.
- Short, K.A., Doyle, J.D., King, R.J., Seidler, R.J., Stotzky, G. & Olsen, R.H. (1991) Effects of 2,4-dichlorophenol, a metabolite of a genetically-engineered bacterium and 2-4-dichlorophenoxyacetate on some microorganism mediated ecological processes in the soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 412-418.
- Sterritt R.M. & Lester, J.N. (1988) *Microbiology for Environmental and Public Health Engineers*. E. & F.N. Spon Ltd., New York.

- Stone, M. (1984) Superbugs devour poisonous wastes. *Eur. Chem. News Chemscope*, November, 1984.
- Tiedje, J.M., Colwell, R.K., Grossman, Y.L., Hodson, R.E., Lenski, R.E., Mack, R.N. & Regal, P.J. (1989) The planned introduction of genetically-engineered organisms: Ecological considerations and recommendations. *Ecology*, 70(2), 298-315.
- USEPA Superfund Innovative Technology Profile (SITE) (1988) EPA/540/5-88/003. USEPA, Washington, DC.
- USGAO (1988) *Biotechnology: Managing the Risks of Field Testing Genetically-Engineered Organisms*. GAO/RCED-88-27 USGAO, Washington, DC.
- Vandenbergh, P.A. (1992) Degradative bacteria. In: *Microbial Ecology: Principles, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.A. & Rogul, M. (eds.), pp. 799-804. McGraw-Hill Inc., New York.
- Vidaver, A. & Stotzky, G. (1992) Overview: containment, decontamination and mitigation. In: *Microbial Ecology: Principle, Methods and Applications*, Levin, M.A., Seidler, R.A. & Rogul, M. (eds.), pp. 781-797. McGraw-Hill Inc., New York.
- Wick, C.B. and Pierce, G.E. (1990) An integrated approach to development and implementation of biodegradation systems for treatment of hazardous organic wastes. *Dev. Ind. Microbiol.*, 31, 81-93.

## 用語解説

**cDNA**：真核生物の mRNA に相補的な DNA コピーで、逆転写酵素（レトロウイルス中に存在する DNA ポリメラーゼの一種で、RNA を鋳型として DNA を合成する機能を持つ）を用いて作られる。mRNA のコピーであるため、cDNA には、対応する真核生物のゲノム DNA に通常あるイントロン配列がない。

**胚性幹細胞 (ES 細胞)**：哺乳類の初期胚に由来する未分化の細胞で、in vitro での培養後、受容体となる発育中の胚組織の一部になることができる。遺伝子導入に利用される。

**遺伝子流動 (拡散)**：集団間や同一集団内の異なる部分間での遺伝子の移動。

**遺伝子ライブラリー (ジーンバンク)**：クローニングによって得られたきわめて多数の組換え体で、DNA がクローニングされた特定の生物の全ゲノムの DNA 配列が完全に（またはほぼ完全に）網羅されている（ゲノムライブラリーともいう）。これに対して cDNA ライブラリーは cDNA を用いて構築される。

**遺伝子工学 (遺伝子操作)**：広義には、組換え DNA (rDNA) 技術を用いて DNA 分子の配列を改変すること。関連のない 2 つの DNA 分子を組み合わせ、新たな性質を持つ分子を作り出すことが可能である。英国の場合、遺伝子操作は法律によって「何らかの手段で細胞外で作られた核酸分子を、ウイルス、細菌プラスミドなどのベクター系を使って宿主生物に人為的に導入し、繰り返し複製させることによって、遺伝物質の新規の組み合わせを形成すること」と定義されている<sup>1</sup>。

**ゲノム**：ある生物が持つ DNA の完全な 1 セットで、その生物の全 DNA 配列からなる。

**遺伝子型**：ある生物の遺伝子構成で、その生物の DNA 配列によって規定される。遺伝子型は、生物の表現型の多くの側面を決定する。遺伝子型は、古典的育種法によっても遺伝子操作によっても改変することが可能である。

**GMO**：遺伝子組換え生物 (genetically modified organism)。最新の分子生物学の多種多様な技術によって改変された生物で、バクテリオファージを用いて形質転換した腸内細菌の大腸菌 (Escherichia coli) の細胞から、微粒子銃を用いて改変された植物、ES 細胞の導入によって改変された動物など多岐にわたる。

**ホモ（同型）接合の：**ある遺伝子の2つのコピー（1対の染色体上にあるもの）が同一である状態。また、染色体対が相同である状態ということもできる。2つのコピーが異なる場合、これをヘテロ（異形）接合であるという。

**遺伝子移入：**雑種個体が一方の親との戻し交雑を繰り返すことによって起きる種間の遺伝子の移入。

**マイクロインジェクション（微量注入）法：**細胞の核へのDNA（まれにRNA）の導入。動物の形質転換では、受精直後の卵の前核の1つに約3pl（ $3 \times 10^{-9}$ ml）のDNAを含む溶液を微量注入する。

**分子クローニング（遺伝子クローニング）：**すべてがその組換えDNA分子を含む遺伝的に同一な生物の系統を増殖させることによって、組換えDNA分子およびその合成を指令する遺伝子産物を増幅すること。

**モザイク：**2つ以上の遺伝子型を異にした細胞を含む個体。胚へのES細胞の導入や、ごく初期の胚の細胞の一部だけに導入遺伝子を組み込んだ場合に、こうした個体が得られる。

**PCR：**ポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction）。両端の鎖でハイブリッド形成することができ、標的とするDNAの目的の領域に隣接する2つのオリゴヌクレオチドプライマーを使い、酵素によって特定のDNA配列をin vitroで合成する方法。鋳型の変性、プライマーの加熱徐冷（アニーリング）、加熱徐冷したプライマーのDNAポリメラーゼによる伸長というサイクルを繰り返すことによって、末端がプライマーの5'末端の特定の断片が指数関数的に増幅される<sup>2</sup>。

**表現型：**ある生物が発現する性質で、その生物の遺伝子型と環境との相互関係によって決定される。そのため、成長ホルモンを発現し、より速く成長するはずの生物でも、十分な食物が供給されなければ、そうはならない。

**組換えDNA（rDNA）：**遺伝子操作技術を用いてベクター分子に外来DNAを挿入することによって得られる合成DNA分子。

**制限酵素：**ある種の細菌が持つ酵素で、DNAを特定の部位、または、DNA中の特定の塩基配列（通常、4~6塩基対の長さ）が特徴の制限酵素認識部位で切断することができる。

**RFLP：**制限酵素断片長多型（restriction fragment length polymorphism）。制限酵素認

識部位の多型性のことで、DNA を特定の制限酵素で切断すると、長さの異なる DNA 断片を生じ、それによって個体を識別することができる。DNA 断片は、放射性同位元素で標識したプローブで検出することができ、育種や遺伝子マッピングのマーカーとして使うことができる。

**体細胞変異**：培養組織から再生した植物に一般的にみられる変異性。

**サザンブロット法**：もともとサザン (Southern) <sup>3</sup>が考案した方法で、ゲル電気泳動法で分離したDNA制限酵素断片は、ゲルからニトロセルロースやナイロンの膜上に移される。その後、DNA断片を放射性同位元素で標識した相補的なDNA配列 (プローブ) を使ってスクリーニングすれば、DNA断片上の配列が検出できる。

**T-DNA**：アグロバクテリウム属の自律複製するプラスミド上に特殊な配列として生じる形質転換 DNA で、病原性遺伝子に挟まれている。

**トランスフェクション(トランスフォーメーション)**：外来 DNA を導入することによってある細胞の遺伝的構造を改変するプロセス。通常、トランスフォーメーション(形質転換)は、細菌細胞への導入をいう場合に用いられ、トランスフェクションは動物細胞への導入の場合に用いられる。in vitro の実験では、単純な手法によって tDNA をこれらの培養細胞に導入する。

**導入遺伝子**：受容体のゲノムに導入される DNA。通常、DNA が宿主ゲノムに安定的に組み込まれる場合に用いる。トランスジェニック生物は組換え DNA 技術によって操作された DNA 断片が挿入された生物で、外来の DNA 断片がその生物のゲノムに組み込まれている。

**ワクチン**：古典的には、毒性を弱めた病原体で、もとの病原体による感染に対する免疫を与えるもの。組換えワクチンは、免疫を誘導する重要なタンパク質成分を非病原性ベクター (通常は、天然痘ワクチンとして用いられるワクシニアウイルス) 中に産生させるのが一般的である。

**ベクター**：自己複製する運び屋 DNA (RNA の場合もある) 分子で、外来 DNA を挿入して増殖・複製させる。

## 注

1. Old, R. W. & Primrose, S. B. (1985) *Principles of Gene Manipulation*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
2. Erlich, H. A. (ed.) (1989) *PCR Technology*. Stockton Press, New York.
3. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.

## 略語

- ABTA 応用生物処理学会 (Applied Biotreatment Association) (米国)
- ACGM 遺伝子改変に関する諮問委員会 (Advisory Committee on Genetic Manipulation) (英国)
- ACRE 環境放出に関する諮問委員会 (Advisory Committee on Releases to the Environment) (英国)
- AFS 米国水産学会 (American Fisheries Society)
- APHIS 動植物衛生検査局 (Animal and Plant Health Inspection Service)
- ASM 米国微生物学会 (American Society for Microbiology)
- BBEP バイオテクノロジー・生物製剤・環境保護部 (Biotechnology, Biologics and Environmental Protection) (米国)
- BINAS バイオセイフティ情報ネットワーク・アドバイザリーサービス (Biosafety Information Network and Advisory Service) (UNIDO)
- CEC EC委員会 (Commission of the European Communities)
- DOE 環境省 (Department of the Environment) (英国)
- EC 欧州共同体 (European Community)
- EPA 環境保護庁 (Environmental Protection Agency) (米国)
- FAO 国連食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- FDA 食品医薬品局 (Food and Drug Administration) (米国)
- FFDCA 連邦食品医薬品化粧品法 (Federal Food, Drug and Cosmetic Act) (米国)
- FHS 水産衛生部 (Fisheries Health Section) (米国)
- FIFRA 連邦殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法 (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act) (米国)
- GEM 遺伝子組換え微生物 (Genetically engineered microorganism)
- GENHAZ 環境汚染委員会第14報告書 (英国)
- GLSP 大規模優良試験所規範 (Good Large-Scale Practice)
- GMM 遺伝子組換え微生物 (genetically modified microorganism)
- GMO 遺伝子組換え生物 (genetically modified organism)
- GNP 国民総生産 (gross national product)
- HMCRI 有害物質規制研究所 (Hazardous Materials Control Research Institute) (米国)
- HSE 健康安全局 (Health and Safety Executive) (英国)
- ICES 国際海洋探査委員会 (International Council for Exploration of the Sea)
- ICGEB 遺伝子工学・バイオテクノロジー国際センター (International Centre for

Genetic Engineering and Biotechnology )

ISNAR 農業研究国際サービス ( International Service for National Agricultural Research ( オランダ・ハーグ )

LPS リポ多糖 ( lipopolysaccharide )

MPCA 微生物防除剤 ( microbial pest control agent )

NAS 全米科学アカデミー ( National Academy of Science )( 米国 )

NIH 国立衛生研究所 ( National Institutes of Health )( 米国 )

NRC 米国学術研究会議 ( National Research Council )

OECD 経済協力開発機構 ( Organisation for Economic Co-operation and Development )

RAC 組換え DNA 諮問委員会 ( Recombinant DNA Advisory Committee )( NIH )

RREL リスク軽減環境研究所 ( Risk Reduction Environmental Laboratory )( 米国 )

SBR 連続回分式反応槽 ( sequencing batch reactor )

STP 汚水処理場 ( sewage treatment plant )

TSCA 有害物質規制法 ( Toxic Substances Control Act )( 米国 )

UN 国際連合 ( United Nations )

UNEP 国連環境計画 ( United Nations Environment Programme )

UNIDO 国連工業開発機関 ( United Nations Industrial Development Organization )

US HHS 米国保健社会福祉省 ( US Department of Health and Human Services )

USDA 米国農務省 ( United States Department of Agriculture )

USEPA 米国環境保護庁 ( United States Environmental Protection Agency )

USGAO 米国会計検査院 ( United States General Accounting Office )

WHO 世界保健機構 ( World Health Organization )