

薬剤耐性遺伝子の環境動態 —臨床と海は遺伝子で繋がっている—

愛媛大学大学院理工学研究科工学系 住友電工 G SCR 寄附講座 特定教授／名誉教授

鈴木 聡 (1985 年博士課程修了・旧薬品有機化学講座)

1. はじめに

2013 年の G8 サミットの科学大臣声明で、ヒト・動物・環境の健康をひとつとして研究と対策を行う「ワンヘルス」のコンセプトが提言された。このコンセプトは、2015 年の G7 サミットでは首脳宣言に盛り込まれ、その中で最重要課題として、薬剤耐性・インフルエンザ・狂犬病が具体的に記述され、ワンヘルスは世界の潮流として動き出した。その後、COVID-19 のパンデミックが起こり、人類の感染症への備えが不十分であることが浮き彫りになり、ワンヘルスコンセプトの重要性が広く認識された。

さらに、ワンヘルスで扱う感染症だけではなく、SDGs の活動で代表されるような社会・政治・環境活動等を含めた「プラネタリーヘルス」の概念が 2015 年のランセット誌で提唱された。今や本惑星の保全ではこれが主流になっており、小生のような微生物生態学者は、地球環境の恒常性維持に必須の要素である環境微生物に注目している。

ご存知のように、ヒトの感染症の半数以上は人獣共通感染症であり、COVID-19、インフルエンザなどは身近である。これまで、ヒトと動物の病原体研究分野は相互乗り入れが進んできたが、環境に潜む病原体および環境に常在する微生物の健康リスクへの関与についての研究はまだ進んでいないのが現状である。

ワンヘルスのなかで、ポストコロナとして最も危惧されているのは薬剤耐性菌 (Antibiotic Resistant Bacteria, ARB) の問題である。病原細菌が多剤耐性の ARB になるとほとんどの抗菌薬が効かなくなるため、死亡率が高くなる。英国の医療最高責任者のサリー・デイビスさんは、「コロナは丘である。今後耐性菌の山が来るだろう」と警告している。国際的には多くの医療関係者や学者たちは ARB 問題に強い懸念を示しているが、こと日本においては、耐性菌問題が少ないこともあって、この問題を知る人は少ない。他国とはまったく異なった社会認識状況であり、まさに「鎖国状態」と言っている。

地震や感染症のリスクは必ず来るものだが、いつ来るかはわからない。いつ来ても対処できるように、

人獣臨床だけでなく、環境学者・行政も認識を新たにして対策を構築しておく必要がある。

本稿では、ワンヘルスコンセプトに環境視点から焦点を当て、その中で小生がここ 25 年間研究してきた薬剤耐性菌と耐性遺伝子の水環境を舞台としたダイナミズムについて紹介する。

2. 生化学から環境学へ

小生は博士課程で薬品有機化学講座(当時)に所属して実吉峯郎先生の指導をうけ、ヌクレオチドアナログによる DNA 複製阻害を基盤として、ヒトサイトメガロウイルス阻害剤開発の研究をしていた。カナダ、アルバータ大でのポストク時代は B 型肝炎を対象は変わったが、ヌクレオチドの抗ウイルス研究は続いた。その後、縁あって、出身学部である北大水産学部の助手になり、研究分野を海洋細菌の生態学に変更した。高校時代は海洋生態研究を熱望し、水産学部に進んだものの、生物系ではなく食品系へ移行したため、志半ばになっていた。教員になってやっと海の研究ができる立場になり、大学院以来学んできた生化学の視点から海洋細菌の生態研究を目指した。

助手から助教授時代は、海洋細菌が海水中のタンパク質を分解する際に使うプロテアーゼと、ポリアミンの生合成系を環境適応の観点から研究した。2000 年に愛媛大沿岸環境科学研究センターで生態系解析部門を主宰してからは、薬剤耐性菌の研究をメインテーマとした。まだ海洋の ARB など、世界中どこからも論文の出ていない時代であった。かつて上田亨先生に、「引用論文ゼロで Nature に出せたら、それこそがオリジナルだ」と言われたことがあり、身の程知らずの小生はそれを目指した。

愛媛大には化学汚染研究と沿岸海洋研究の伝統があり、世界的にもトップクラスだった。そこで、この両分野を活かし、微生物生態学を基盤とした新規プロジェクトを構築した。新設の研究センターは、助手から教授まで 13 名の専任教員全員が 30~40 代で、パワフルな研究集団だった。伝統分野のお陰で 21 世紀 COE, グローバル COE に連続して採

択され、広い研究スペースと多くのポストドクを得て国際共同研究が加速した。

当時、小生の研究は、学会へ行くと「耐性菌なんて、下水処理場で死ぬし、もし環境へ出ても増えないでしょう。なんで海なんかやるんですか？」とほぼ全員に言われ続けた。実は、この意見は思い込みなのだ。研究は常識に疑問を持つところから始まる。

3. 水圏環境と薬剤耐性遺伝子

薬剤感受性細菌が抗菌剤に暴露されると、その薬剤に対して耐性を示す細胞が生残する。ARBの発生にはおもに二つの機構がある。一つは、細胞が本来持っている遺伝子の変異または発現変化によって耐性を獲得する場合である。もう一つは、伝達性の薬剤耐性遺伝子(Antibiotic Resistance Genes, ARGs)を他の細胞から水平伝達で受け取る場合である。いずれの場合も、抗菌薬が選択圧になっている。

抗菌薬を使用する人獣の臨床環境では選択圧が高く、ARBが発生することは容易に想像できる。それらが排水に乗って外部へ出ても、日本では市中排水、病院排水ともに下水処理場へ集約されて処理される。だが、処理場の目的は粒子体の除去と溶存有機物の無機化であり、化学物質まで完全に分解することはできない。微生物も活性汚泥と塩素処理でかなり除去されるものの、これも完全ではない。したがって、人間環境からのARBおよびそれが保持するARGsは一定量河川へ放出されることになる。日本の河川での抗菌薬汚染をみると、主にヒト由来の薬剤である。畜産由来の薬剤は、土壌へ

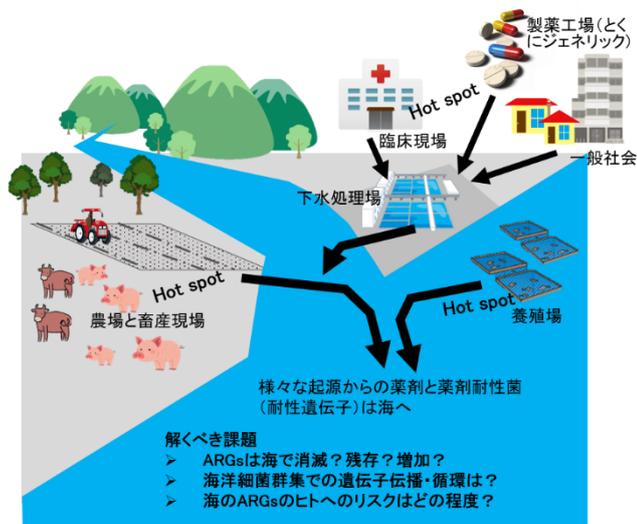


図1 問題となるホットスポットと抗菌薬・耐性菌・耐性遺伝子の動態

の吸着や地下水への移行が起こるため河川への流出は少ないと考えられる。一方、魚類養殖では抗生物質が餌に混合して投薬されるため、沿岸環境には残餌・糞から選択圧がかかる。

小生は、研究のフィールドを東南アジアの経済活動が盛んでかつインフラの未発達な国々の水圏に設定してきた。途上国では排水処理場インフラは先進国のように性能はよくなく、垂れ流しの場合も多い。近年では、インドなどのジェネリック医薬品工場の排水に薬品製造の中間産物やARBが高濃度で検出され、ホットスポットになっている。世界的に、畜産では人間の医療の2倍以上の抗菌薬が使われるため、環境でも選択圧は高い。ベトナムの農業では、家畜排泄物を稲や野菜の肥料とし、かつ池に流して富栄養化させてプランクトンをふやし、魚を養殖する。つまり畜産・水産・農業がリサイクルしている。SDGs農業としては理想的だが、抗菌薬を投与された家畜で発生したARB(ARGs)が多くの農水産物に汚染して人体へ侵入する。家畜が抗菌薬使用とARB発生のホットスポットになっている¹⁾。

図1には、初期に小生が立てたARB(ARGs)発生から河川・海までの動態仮説と解くべき課題を示す。まず、ホットスポットから出る排水にはARBが含まれ、下水処理場を経るが、処理後排水にも残存ARB(ARGs)は含まれ、河川から沿岸海洋へ放出されると考えた。課題としては、1)ARBとARGsは海でどのような運命を辿るのか？ 2)海洋でのARGsの伝播・循環はあるのか？ 3)海洋のARGsリスクはどの程度か？ これらの課題についての研究成果は最近世界的にも多く発表されるようになってきた。小生のグループでは環境中DNAと細胞DNAに担われるARGsのモニタリングと、細菌間伝播等の実験的解析を行ってきた。

4. 水圏環境での耐性遺伝子の潜伏と伝播

細菌にとって、ARGsは普段は不要な遺伝子で、プラスミドなどを保持し続けることは余計なエネルギーを必要とするため負担になる。だが、選択圧があると細菌は薬剤存在下で生存するためにARGsを持ち続ける。組み替え実験で使うpUC系等の多コピープラスミドは実際の環境では例外的で、環境細菌では細胞あたりのコピー数が1~2個と少ないプラスミドが多く、それらは選択圧がなくても確実に娘細胞へ分配される仕組みを持っている(toxin-

antitoxin system, parAB system など)。つまり、環境中では一旦できた伝達性 ARGs は環境細菌群集に残存して拡散することになる。

河川の終着点は海であり、河川で運ばれた陸起源の ARB は海に流入すると、海水の塩分や原生生物の捕食によって多くは消滅する。しかし、病原細菌や腸内細菌の保有する ARGs は海洋細菌に受け継がれ、残存する場合があることが分かった²⁾。ARB 自体は海で消滅しても、ARGs は海の微生物群集に残存することがある。つまり、「虎 (ARB) は死しても革 (ARGs) を残す」というわけである。

病原細菌と異なり、海洋細菌の 99.9% 以上は培養できないので、海洋細菌における ARGs の研究では、非培養法が必要になる。近年研究例が増えている耐性遺伝子の網羅的解析 (Resistome, レジストーム) は一つの方法であり、海洋からも多様な ARGs が見つかったが、まだ ARGs と保有細菌種の対応ができない。また、網羅的とは言っても、解析対象になる遺伝子の範囲はデータベース (DB) に依存する。DB 上の ARGs 情報のほとんどは培養菌から得られたものであるため、結局は培養依存解析ということである。今後、レジストームの先を行くアプローチが必要である。

ARB と ARGs の起源は上述のような人獣医療現場だけではない。自然環境には様々な ARGs が分布する。環境では人間生活圏起源の ARGs と自然環境起源の ARGs が共存し、これらがプラスミドや、ゲノム上遺伝子を細胞間接合で受容菌のゲノムへ挿入する Integrative Conjugative Elements (ICEs) などの、細胞間で遺伝子を伝達させる因子 (Mobile Genetic Elements, MGEs) を乗り換えながら環境に潜伏・拡散していると考えられる。

近年、進化的に古い細菌群である *Chloroflexi* から新規のサルファ剤耐性遺伝子 *sul4* が見つかった³⁾。最近の小生らの研究で、この遺伝子は海洋細菌も保有していることが分かった (未発表)。*sul4* の配列を DB で検索すると、類似配列を持つのは全て水圏細菌である。臨床菌からの報告はない。*Chloroflexi* の *sul4* は MGEs を伴っているため伝達性と考えられるが、海洋細菌の *sul4* では MGEs を伴っていないことから、伝達性はないと考えられる。*Sul* 遺伝子群の機能としては、葉酸合成系でジヒドロプロテロイン酸合成酵素 (DHPS) として働く。*sul3* という遺伝子も臨床報告は少なく、一方で、海の非培

養菌は保有することが分かった⁴⁾。海洋の *sul3*, *sul4* などは太古から海洋細菌がもつ DHPS かも知れない。人獣臨床菌では *sul1*, *sul2* が主要なサルファ剤耐性遺伝子として古くから知られているが、海では異なる *sul* 遺伝子が優占する実態が分かってきた。

水圏環境では、培養法で *Aeromonas* や *Acinetobacter* などの淡水常在菌で耐性菌が多く検出される。これらの菌群では、テトラサイクリン (TC) 系やサルファ剤系耐性のみならず、基質拡張型ベータラクタマーゼ (ESBLs) やキノロン系耐性遺伝子も保有する。上述のように、様々な耐性遺伝子は、人獣医療現場に由来するものが多いとされるが、キノロン耐性遺伝子では水圏細菌が起源と示唆される遺伝子もある⁵⁾。耐性遺伝子のルーツとしても水圏環境は無視できない。

TC は細菌のリボソーム阻害を起こす薬剤だが、リボソームを保護することで TC 耐性化を起こすタイプの耐性遺伝子 (*tet*) では、起源を調べたところ、生命の起源が形成されたすぐ後に、リボソーム保護型の *tet* が TC の存在とは無関係に、細胞生存に必須の転写促進遺伝子 EF-Tu や EF-G から分かれて進化したことが明らかになった⁶⁾。つまり、生命誕生と進化の場である海洋は、耐性遺伝子誕生の場でもあると考えられる。*sul* や *tet* 以外の未知の耐性遺伝子が潜んでいる可能性もある。

遺伝子水平伝播については、*tet* のひとつである *tet* (M) では、海洋細菌から大腸菌への接合伝達を実験的に証明された⁷⁾。海洋細菌が飢餓条件にある時は伝達しないが、有機物が負荷されると接合伝達が復活する。海は通常有機物濃度は低い貧栄養環境なので、遺伝子の接合伝達率は低いと思われるが、排水の流入、養殖場での給餌、高頻度の船舶往来などのある沿岸環境では ARGs 伝達は起こりやすくなると考えられる。有機物以外では、ある種の金属・消毒剤が存在すると接合伝達が促進されることも明らかになった⁸⁾。

海洋の ARGs は濃度としては低いですが、全体水量が膨大であることから、海が ARGs の巨大なリザーブであることは疑いがない。もし、有機物や化学物質の汚染によって、様々な菌種への伝達が促進されると、海に潜伏する ARGs のヒト関連細菌への侵入リスクも無視できない。ARGs ソースとしての海洋環境にも注視が必要であろう。

サルファ剤や古い TC 系薬剤などは、現在は先進国ではあまりヒトへは使用しないが、途上国ではまだ多く医療に使われており、さらに家畜では膨大な量が使われている。近年では TC に代わってグリシルサイクリン系がヒトへ使われている。歴史的に *sul*, *tet* の研究は古くからあり情報量が多いため、ARGs の面的拡散に時間軸を加えて定量化するには適切な研究対象である。今後、新規の抗生物質やそれらに対する ARB(ARGs)が発生した時のために、拡散予想数理モデルとリスク評価モデルを現在構築中である。

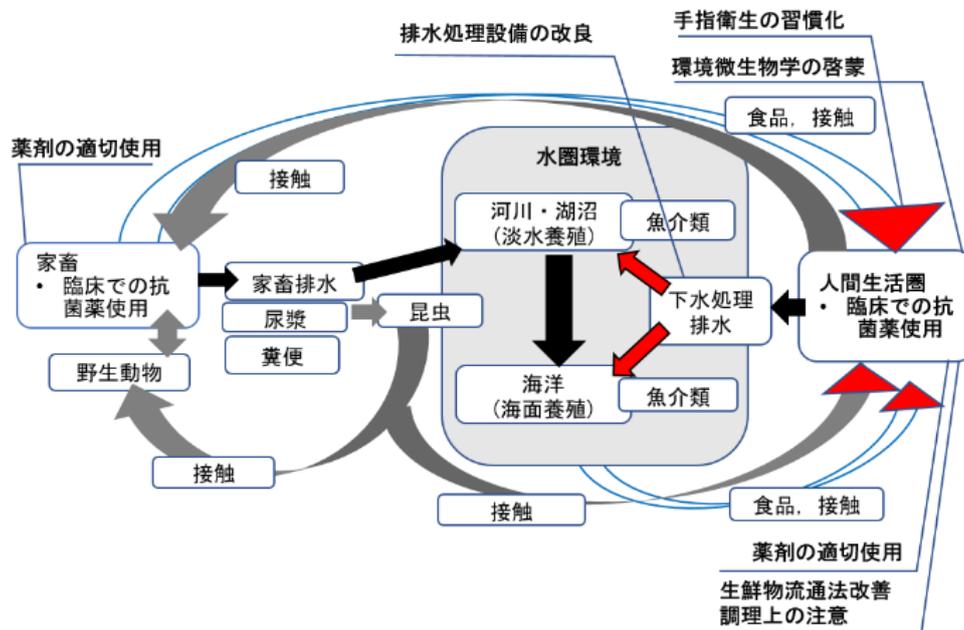
5. 海から考えるワンヘルス

環境の ARGs 研究では、排水処理場、畜産、淡水養殖などの分野で論文が多くなってきた。ただし、畜産・養殖現場では病原菌対象の研究がほとんどで、つまりは培養可能な菌が対象である。排水処理場の研究では水中の全ての DNA をシーケンス解析するメタゲノムアプローチが多い。一方で、海洋ではメタゲノム研究もいくつかあるが、他のフィールドに比べると研究例は圧倒的に少ない。海洋では、どんな菌種がどんな ARGs を保有しているかすらまだほとんど明らかにされていないので、今後の新しいア

プローチと知見を待ちたい。

最後に、水圏環境と人・動物の繋がりを考慮し、ARGs リスクとその軽減対策を考えたい。図 2 には一例を示す。第三世代セファロスポリン耐性大腸菌量の測定から、海水浴よりサーフィンが耐性菌暴露リスクは大きいというユニークな論文がある⁹⁾。海洋細菌が人の腸管へ入る確率は極めて低いかもしれないが、一旦侵入して、腸内細菌との間で遺伝子伝達が起これば、その後は想像に固くないであろう。自然水圏からの暴露リスクを減らすための対策としては、やはり放出低減が一番すべきことであろう。小生を含む国際研究グループでは、耐性遺伝子の放出リスク低減策を提言している¹⁰⁾。ハード面では下水処理効率の向上が重要だが、とくに注目すべきは病院排水と薬品工場排水の処理であろう。また、適切な標的耐性遺伝子のモニタリング、リスクコミュニケーションと啓蒙など、ソフト面で可能な対策も多い。欧州は 10 年以上前から耐性菌問題の世界横断、分野横断の“ワンヘルスコンセプト”での研究と対策法検討をしてきたが、我が国も遅ればせながら自然環境を視野に入れた対策にも力を入れるべきであろう^{11, 12)}。

研究に際しては、人や動物の細菌と、水圏とくに



¹⁰⁾ Pruden A et al. (2013) Environ. Health Perspect., doi:10.1289/ehp.1206446.

¹¹⁾ 鈴木 聡 (2020)水環境学会誌, 43(A), (3), 95-98

¹²⁾ 鈴木 聡 (2021)疫病と海(秋道・角南編著), 西日本出版社, 111-124.

図2 人・動物・環境間での薬剤耐性遺伝子のリンクシナリオと、リスク低減に関わる項目の例

海洋の細菌は性質がまったく異なるため、医学微生物学を応用して研究することが困難である。一方で、ARGs は人・動物・環境で共通し、異なる細菌群に潜伏する実態がわかってきた。今後、人・動物・環境の 3 つのセクター間でワンヘルスの成果を得るためには、研究者が相互に乗り入れて、ボーダレス研究者になる必要がある。小生も ARGs 研究を含め、多くの環境微生物研究ではメタゲノムと培養法両方でアプローチしてきた。また、衛生工学、畜産、環境化学、医学などを専門とする共同研究者と学際的なチームを構築してきた。引用文献ゼロで Nature に出すことは叶わなかったが、多方面の方々と進めてきた研究では成果があり、なによりとても楽しかった。北大の学生時代に、水産・薬学・医学・獣医学部の人たちといっしょに研究をした経験が役立っており、お世話になった方々に感謝したい。

終わりに、今回「芳香」に執筆を進めてくださった松田彰先生には、学生時代からのご指導も含めてお礼申し上げます。

文献

- 1) Suzuki S, Hoa PTP (2012) *Front. Microbiol.* 3, article 67. doi: 10.3389/fmicb.2012.00067
- 2) Bien TLT. et al. (2015) *Microbes Environ.* 30, 339-343. doi:10.1264/jsme2.ME15122
- 3) Razavi M. et al. (2017) *Microbiome* 5, 160. doi: 10.1186/s40168-017-0379-y
- 4) Suzuki S. et al. (2013) *Front. Microbiol.* 4, article 102. doi: 10.3389/fmicb.2013.00102
- 5) Takasu H. et al. (2011) *Microbes Environ.* 26, 135-143. doi:10.1264/jsme2.ME10204
- 6) Kobayashi T. et al. (2007) *J. Mol. Evol.* 65, 228-235. DOI 10.1007/s00239-007-9006-z
- 7) Kohyama Y, Suzuki S. (2019) *Microbes Environ.* 34, 388-392. doi:10.1264/jsme2.ME19099
- 8) Suzuki S. et al. (2012) *FEMS Microbiol. Lett.* 336, 52-56. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02653.x
- 9) Leonard AFC et al. (2018) *Environ. Int.* 114, 326-333. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.11.003>
- 10) Pruden A. et al. (2013) *Environ. Health Perspect.* 121, 878-885. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.1206446>.
- 11) 鈴木 聡 (2020) 水環境学会誌 43(A) (3) 95-98
- 12) 鈴木 聡 (2021) 疫病と海 (秋道・角南 編著) 西日本出版社 111-124

同窓会 HP:2022 年 10 月 28 日公開