



Chinkichi Toyama Memorial Award
for Food and Environmental Sciences

遠山椿吉記念 第6回 食と環境の科学賞

授賞式・受賞記念講演会・レセプション
プログラム

平成31年2月5日(火)
於 ホテル メトロポリタンエドモント

一般財団法人 東京顕微鏡院
医療法人社団 ころとからだの元氣プラザ

遠山椿吉記念 第6回 食と環境の科学賞 授賞式 式次第

平成31年2月5日(火)
ホテルメトロポリタンエドモント



◎授賞式 (本館2階 波光)

午後5時30分

開 式 一般財団法人 東京顕微鏡院 副理事長、公益事業担当理事
医療法人社団こころとからだの元氣プラザ 理事 高橋 利之

選考委員長講評・ 国際医療福祉大学大学院 教授 渡邊 治雄
受賞者紹介 (国立感染症研究所 名誉所員〈前所長〉)

表 彰

選考委員紹介

祝 辞 一般財団法人 東京顕微鏡院
医療法人社団こころとからだの元氣プラザ 理事長 山田 匡通

来賓祝辞 東邦大学医学部微生物感染症学講座 教授
日本感染症学会 理事長／日本臨床微生物学会 理事長 館田 一博

内閣府食品安全委員会 委員長代理 山本 茂貴

受賞者挨拶 鈴木 聡
(愛媛大学沿岸環境科学研究センター 教授)
杉山 圭一
(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 室長)

閉 式

◎受賞記念講演会 (本館2階 波光)

午後6時20分

開 会 座長：一般財団法人 東京顕微鏡院 食と環境の科学センター
名誉所長 伊藤 武

講 演 鈴木 聡
杉山 圭一

閉 会

◎受賞記念レセプション (本館2階 薫風)

午後7時40分

開 会

挨 拶 一般財団法人 東京顕微鏡院 食と環境の科学センター
所長代理 宮田 昌弘

乾 杯 一般財団法人 東京顕微鏡院 理事 安田 和男

(懇 親)

閉 会 (午後8時40分)

ごあいさつ

みなさま、一般財団法人東京顕微鏡院および、当財団の保健医療部門をルーツとする医療法人社団こころとからだの元氣プラザ両法人を代表し、お祝いのご挨拶を申し上げます。

このたび、日本のみならず熱帯アジア、アフリカ等の環境を調査し、耐性遺伝子が水環境に普遍的に分布することを示し、ワンヘルスの観点からリスク低減策の提言や予防衛生の方向性を発信するなど、国際的な獣医・公衆衛生分野での多大な貢献が高く評価され、鈴木聡先生が『遠山椿吉記念 第6回 食と環境の科学賞』を受賞されました。また、50歳未満の研究者を対象とした遠山椿吉記念 山田和江賞には、杉山圭一先生が選ばれました。変異原性試験法として、エピジェネティック変異原同定法のプロトタイプを開発した点は、世界に先駆ける成果であり、動物実験代替法としても期待され、アカネ色素アリザリンのエピジェネティック変異原毒性を検知できたことは、実用化も期待される点が高く評価されました。お二人の先生方に、心より、お祝い申し上げます。

さて、伝染病が最大の脅威とされていた明治時代、遠山椿吉は公衆衛生の研究者として人が着目しなかった飲料水の水質に着目して行政にも強く関わり、初代東京市衛生試験所長として安全な水道水を市民に届け、多くの業績を残しました。「水道水質試験方法」の統一を主唱して「上水試験方法統一のための協議会」を開催したのが、今日の日本水道協会の始まりです。また、白米中心の食生活であった当時、毎年約1万人以上もの死者を出す「脚気」は社会的な疾患の一つでした。国内のほとんどの研究者が脚気の伝染病説を支持し、脚気菌探しに精力が注がれていたなか、遠山椿吉は広範な疫学調査や動物実験による栄養試験成績など、長年の研究からこの考えを勇気を持って否定し、脚気の原因を「米糠中の特主成分の欠乏」と提唱して米糠から治療薬「うりひん」を抽出し、その薬を治療へと応用しました。

このたびの「第6回 食と環境の科学賞」は、一世紀以上のときを経て、健康ないのちを目指して邁進する今日の研究の方々と、その優れた功績に光をあてたものと思います。

遠山椿吉賞は、当財団創業者で医学博士、遠山椿吉の公衆衛生向上と予防医療の分野における業績を記念し、その生誕150年、没後80年である平成20年度に創設した顕彰制度です。その生き方を尊重し、『公衆衛生向上をはかる創造性』、臨床現場での『予防医療の実践』、『これからの人の育成』につながることを、本賞における本質的なポイントと考えており、日本の公衆衛生において、人びとの危険を除き、いのちを守るために、先駆的かつグローバルな視点で優れた業績をあげた個人または研究グループを顕彰するものと位置づけています。

当財団並びに共通のルーツを持つ医療法人は、平成30年4月に創立127周年を迎え、今後とも医事衛生の進歩を図り、公衆衛生の向上に資するよう取り組んでまいる所存です。このたびの授賞にあたり、鈴木聡先生、杉山圭一先生のますますのご活躍と、わが国の公衆衛生、予防医療分野の発展と、皆様のご健康、お幸せを心より祈念し、結びの言葉とさせていただきます。

平成31年2月5日

一般財団法人東京顕微鏡院
医療法人社団こころとからだの元氣プラザ

理事長 山田 匡通

遠山椿吉記念 第6回 食と環境の科学賞



受賞者

鈴木 聡 (すずき さとる)

(愛媛大学沿岸環境科学研究センター 教授)

テーマ名

「水環境における薬剤耐性菌・
耐性遺伝子の公衆衛生学的研究」

■ 背景

薬剤耐性菌問題は、WHOの提唱するワンヘルスアプローチを基盤とし、世界が共同で取り組むべき学際的課題として進められている。本邦での耐性菌研究は、院内感染に端を発する臨床と獣医療での研究が多かったが、2017年度から環境省も耐性菌対策に参画した。欧米では自然環境まで目を向けた研究も行われているが、国内外ともに培養できる病原菌・腸内細菌の研究が主で自然環境常在菌を含めた研究はほとんどされていない。

臨床・農場で発生する耐性菌の自然環境での運命、耐性遺伝子の残存・伝播・拡散、自然環境中のリザーバ、および耐性遺伝子の臨床への侵入リスク評価などは、耐性菌対策において必須の情報である。受賞者は、日本のみならず熱帯アジア、アフリカ等の排水処理インフラの未発達な地域に早くから着目し、これらの環境での排水・河川水・沿岸海水等で、耐性菌と耐性遺伝子の国際的疫学研究を行ってきた。

■ 調査・研究のねらい

環境薬剤耐性菌のリスクを評価し、リスク低減策を提言することが目的である。耐性菌リスク研究の作業仮説の一つは、人獣臨床など高濃度の抗菌剤が使用される現場で耐性菌が発生し、それが下水を経て環境へ放出される。環境中で耐性菌・耐性遺伝子が残存して曝露起源となるリスク。二つ目の仮説は、環境細菌群集で遺伝子の組み替えが起こって新たな多剤耐性遺伝子が発生し、これが人間環境へ侵入するリスクである。現在、両方ともシナリオの基盤となる知見は乏しく、リスク評価と対策には、多くの環境データが必要である。

受賞者は、各国の研究者とのネットワークを利用し、国際的な調査を基に、普遍的な耐性菌リスクの低減政策アピールを行っている。

■ 調査・研究の成果

海外でもまだ論文の少なかった90年代から、水環境が巨大な耐性遺伝子リザーバであろうと考え、調査を進めて来た。その結果、日本の沿岸養殖場で新規のテトラサイクリンやマクロライド耐性遺伝子を発見、またヒト病原体と同じ耐性遺伝子がメコン川や外洋の細菌が保有することを報告した。これらの成果で、耐性遺伝子が水環境に普遍的に分布する

ことを示した。

その後、海洋細菌の99%以上を占める未培養菌(yet-to-be cultured bacteria)がリザーバであるという仮説を、フィリピン、南アフリカ等の環境調査で証明した。これらは世界でも先駆的研究であり、成果は世界的に注目されている。

また本研究では、水環境で病原細菌・腸内細菌・環境細菌が混在する時の耐性遺伝子伝播、残存実態を解明した。耐性菌問題では水環境を注視すべき、という警鐘を鳴らすことになった。

◇授賞対象業績の概要説明

特に独創性、将来性、有効性、経済性、貢献度等について

- 【独創性】** 本研究は、環境視点の公衆衛生に該当する分野であり、日本のパイオニア的研究である。培養法と非培養法を組み合わせ、下水・畜産排水から、河川・海にいたる環境の全細菌群集での耐性遺伝子を定量した成果は独創的であり、世界の公衆衛生へ一石を投じた。
- 【将来性】** 病原菌以外の未培養環境菌もリスク評価対象にした本研究は、今後の耐性菌対策に新しい視点を与えた。基礎研究と対策立案、両面で将来性がある。
- 【有効性】** 衛生政策への提言、ならびに遺伝子リスク低減のための下水処理技術開発へ有効である。獣医、水産、公衆衛生の基盤形成として各国が注目している研究である。
- 【経済性】** 政府は人・獣医療での抗菌薬使用量削減を打ち出しているが、本研究からは、さらに耐性菌・遺伝子の放出と侵入の制御法の提案が可能である。設備開発と医療費削減では経済効果が期待できる。
- 【貢献性】** 世界各国の環境耐性菌研究をリードする研究者集団があり、受賞者は日本から唯一選ばれて参加している。この集団からの提言総説では養殖リスク管理を責任執筆した。近年、種々の国際・国内講演に招聘され、国際的に獣医・公衆衛生分野で今後の予防衛生の方向性発信を実践している。2007年には先駆的成果が朝日新聞、日経新聞等でも全国的に報道され、またオピニオンリーダーとしてもコメント等(例:朝日新聞2015.9.17科学面)を通して啓蒙を実践している。また、農学部および農学研究科の大学院生へ環境微生物、公衆衛生の教育を実践し、国際的に多くの博士を輩出した(韓国、ベトナム、ポルトガル、フィンランド、マレーシア、スリランカ、バングラデシュ等)。卒業生は各国で耐性菌研究等で活躍しており、次世代の研究人材を国際的に輩出している。

略 歴：北海道大学水産学部卒業('80年)、北海道大学大学院水産学研究科修士課程修了('82年)、同大学大学院薬学研究科博士課程修了、薬学博士('85年)、カナダ、アルバータ大学医学部生化学科アルバータヘリテージ医学財団博士研究員('85年)、北海道大学水産学部助手('87年)、高知大学農学部助教授('92年)、2000年から現職(愛媛大学大学院農学研究科教授兼任)。

学会等：日本微生物生態学会、国際微生物生態学会(ISME)

受賞歴等：平成11年度日本魚病学会研究奨励賞('99年)、日本微生物生態学会2001年度論文賞('01年)

遠山椿吉記念 第6回 食と環境の科学賞 山田和江賞



受賞者

杉山 圭一 (すぎやま けいいち)

(国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
変異遺伝部 室長)

テーマ名

「食品からのエピジェネティック変異原性の検出：
酵母凝集反応を指標とした新規毒性試験法の開発」

■ 背景

発がん性はヒト健康影響における最も重要な評価対象の一つである。遺伝毒性試験は、現在わが国を含むOECD加盟国において化学物質発がん性評価の短期スクリーニング試験として妥当性が認められ活用されている試験である。代表的な試験法として、細菌を用いる復帰突然変異試験(Ames試験)がある。一方で、発がんメカニズムとして、近年エピジェネティックな変異の関与も示唆されている。ジェネティック(遺伝的)な変化である突然変異と異なり、エピジェネティック変異は、クロマチンへの後天的修飾異常により遺伝子発現の変化を惹起する。非遺伝毒性発がん物質の分子機序の一つと考えられるエピジェネティック変異原の検出法は、その必要性は認知されるも実用レベルでは確立されていなかった。

■ 調査・研究のねらい

ユニバーサルでかつ汎用性の高いエピジェネティック変異原試験法を世界に先駆けて開発し、これまで検知不可能であった食品中の同変異原を可視化検出することを目的に研究を行った。

Ames試験陽性物質とげっ歯類発がん物質との相関性は60～70%の域を脱しないと予想されるが、独自開発した試験法を活用することで発がん性予測率の飛躍的向上を目指した。

■ 調査・研究の成果

遺伝毒性(変異原性)試験におけるAmes試験は微生物ベースの試験系であるが、頑健性・感度・および精度からゴールドスタンダードとされる。受賞者はエピジェネティック変異原性試験として同メカニズムが真核生物特有であることから、真核微生物の酵母細胞をプラットフォームにその開発に取り組んだ。DNA methyltransferase(DNMT)遺伝子は、エピジェネティック制御の一つDNAメチル化を触媒する酵素であるが、受賞者はヒトDNMT遺伝子形質転換酵母が凝集性を獲得することを報告し、また、同凝集性にはヒストン修飾を介したエピジェネティック制御下にある凝集遺伝子FLO1が関与していることも明らかにした。FLO1活性化を指標とした本エピジェネティック変異原検出系

は、現時点で短期間にかつDNAメチル化とヒストン脱アセチル化の両阻害剤に応答する点から、包括的にエピジェネティック変異原活性を検出できる可能性を有する唯一の系と換言できる。本法の応用例として、天然化学物質アリザリンをエピジェネティック変異原として同定した成果が挙げられる。アリザリンを含むアカネ色素は、げっ歯類を用いた発がん試験陽性結果により既存添加物リストから唯一削除された物質である。さらに検出系の次世代化として、定量性と頑健性を付与した*FLO1*プロモーターを用いたGFPレポーターアッセイ系の構築の成功にも至っている。

一連の研究で得られた成果の対外的な評価として、2016年に開催された欧州環境変異ゲノミクス学会における口頭発表への選抜、2017年の日本農芸化学会大会においてトピックス賞の受賞、さらには同年9月に開催された米国環境変異ゲノミクス学会でも、本研究内容について依頼に基づき口頭発表の機会を付与された点が挙げられる。つづく11月に開催された日本環境変異原学会年会第46回大会では、エピジェネティック変異原に関するシンポジウムを主催するとともにシンポジストとして講演も行っている。

◇授賞対象業績の概要説明

特に独創性、将来性、有効性、経済性、貢献度等について

エピジェネティック変異原性試験系は確立されていない現況下、既にプロトタイプを構築し、アカネ色素アリザリンを被検物質に同毒性を検知できている点は、オリジナリティーと有用性を直接示す実績と考える。

また、本法が動物実験の3Rの原則(代替・削減・苦痛の軽減)に直接貢献できる点は、毒性試験の社会実装にあたり大きな問題となる、動物愛護の問題を回避できることを意味し、特筆すべきアドバンテージである。食品中に含まれる化学物質の安全性向上にグローバルレベルで寄与することを目的に、開発した本試験系を経済協力開発機構(OECD)への非遺伝毒性発がん物質評価に活用するための活動も既に開始している。

略歴：鹿児島大学水産学部卒業('94年)、京都大学大学院農学研究科博士課程修了('00年)。三菱化学グループ株式会社ジェンコム(旧三菱化学生命科学研究所内)研究員('00年)、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部研究官('02年)、同主任研究官('05年)、2012年より現職(東京医科歯科大学医学部保健衛生学科非常勤講師兼職)。

委員等：内閣府食品安全委員会かび毒・自然毒等専門調査会専門委員、厚生労働省労働安全衛生法検討委員、(独)医薬品医療機器機構専門委員、内閣府食品安全委員会添加物専門調査会専門委員、内閣府食品安全委員会香料ワーキンググループ専門委員。

学会等：微生物変異原性試験研究会(幹事)、日本環境変異原学会(評議員)。

受賞歴等：日本エンドトキシン・自然免疫研究会「日本エンドトキシン研究会奨励賞」('10年)、日本農芸化学会「2017年度京都大会(第8回)トピックス賞」('17年)

■ 東京顕微鏡院および、こころとからだの元氣プラザの歴史と公益事業 ■

三つの世紀にわたる歩み

1891(明治24)年に創立された東京顕微鏡院の歴史は、公衆衛生の向上によって命を救いたいと願う、遠山椿吉の熱い『人間愛』から始まりました。創業以来、東京顕微鏡院は政府などからの助成を一切受けることなく、自主的な経済活動によって公衆衛生の向上や学会誌発行、予防医療・健康診断など先見的な事業を展開すると同時に、伝染病予防に対する普及啓発など様々な形で社会に貢献してきました。1927(昭和2)年、財団設立を果たした翌年椿吉は他界しますが、脚気の無料巡回診療、小笠原健康な村づくり事業、先駆的なシンポジウム・セミナーの開催など、時代に則した公益事業活動は続き、その「スピリット」は、東京顕微鏡院の保健医療部門を統合・拡充し2003(平成15)年に設立された医療法人社団こころとからだの元氣プラザにおいても、時代を超えて今に受け継がれています。私たちの百二十七年の歩みは、「すべての人々のいのちと環境のために」取り組んできた歴史であるといえます。

遠山椿吉の功績：遠山椿吉は、ロベルト・コッホ博士がツベルクリンを発表した翌1891(明治24)年、顕微鏡による肺病早期診断の必要性を痛感し、1台の顕微鏡から東京顕微鏡院を立ち上げました。椿吉は臨床検査、飲料水の検査、顕微鏡技術者養成、顕微鏡検定、学会誌発行など事業を展開するとともに、当時最大の脅威であった伝染病予防のため一般大衆への啓発活動に努めたのです。また、1903(明治36)年東京市衛生試験所初代所長を兼任し、細菌学者として行政に深くかかわり、東京にいち早く安全な水道水の供給を実現して、日本の公衆衛生の発展に寄与しました。当時、全国レベルの「水道水質試験方法」統一を主張していた遠山椿吉東京市衛生試験所所長が、翌1904(明治37)年「上水試験方法統一のための協議会」を開催したのが、現在の公益社団法人日本水道協会の始まりです。さらに、欧州先進国の予防医療の概念を紹介して1907(明治40)年には健康診査を提唱、実践し、研究者としては、当時毎年数千名を超える死者もあった脚気病原因の研究と治療薬開発を遂げました。36年間かけて事業基盤を築いた後、東京顕微鏡院を財団法人と成した翌年他界しますが、その創業の精神は今日に受け継がれています。



遠山 椿吉(とおやま ちんきち) 1857.10.1~1928.10.1 医学博士・細菌学者

遠山椿吉は、1857(安政4)年山形県に生まれ、東京大学において別課医学を修め、山形県医学校で教頭を務めた後、再び上京し、東京医科大学撰科で衛生学と細菌学を研究し、帝国医科大学国家医学科を卒業しました。1891(明治24)年東京顕微鏡院を設立し、二千余名に及ぶ医療技術者の養成、医学検査の実践普及、細菌学や脚気の研究、学会誌発行、健康診査、衛生思想普及活動などを推進。そのかわり、東京慈恵医院医学校講師、東京市衛生試験所所長などの職を兼ね、公衆衛生の発展に寄与しました。医事衛生分野における多数の著書がありますが、最晩年には、「さちのために」「人生の意義と道徳の淵源」など思想書を著し、華道や朝顔作りなど多彩な趣味を持ち、和歌に数多くの作を遺しています。

◆ 遠山椿吉賞について

本賞は、創業者遠山椿吉の公衆衛生向上と予防医療の分野における業績を記念し、一般財団法人東京顕微鏡院および医療法人社団こころとからだの元氣プラザが、日本の公衆衛生において、人びとの危険を除き、命を守るために、先駆的かつグローバルな視点で優れた業績をあげた個人または研究グループに対し、賞状、記念品および副賞として100万円を贈呈するものです。創業者生誕150年没後80年を記念して、平成20年度に創設されました。賞は、「遠山椿吉記念 食と環境の科学賞」と、「遠山椿吉記念 健康予防医療賞」の2部門あり、隔年で選考顕彰いたします。

◆ 遠山椿吉記念 山田和江賞について

50歳未満の応募者(年齢は応募時点)を対象として、平成26年に亡くなられた故山田和江名誉理事長・医師の50余年の功績を記念し平成27年度に創設されました。この賞は、優秀な研究成果をあげており、これからの可能性が期待できる個人または研究グループに対し、研究の更なる発展を奨励することを目的として、賞状、記念品および副賞として50万円を贈呈するものです。本賞は、「健康予防医療賞」「食と環境の科学賞」2部門において隔年で選考し、顕彰いたします。

◆ 遠山椿吉記念 食と環境の科学賞

公衆衛生の領域において、ひとびとの危険を除き、命を守るために、先駆的かつグローバルな視点で優秀な業績をあげた個人または研究グループを表彰します。平成30年度は、食品の安全、食品衛生、食品の機能、食品媒介の感染症・疾患、生活環境衛生を重点課題としました。

◎次回「遠山椿吉記念 第7回 食と環境の科学賞」の応募期間は、2020年4月1日より6月30日の予定です。奮ってご応募ください。

◆ 遠山椿吉記念 健康予防医療賞

予防医療の領域において、ひとびとの危険を除き、命を守るために、先駆的かつグローバルな視点で優秀な業績をあげた個人または研究グループを表彰します。前回平成29年度は、将来の予防医療のテーマに先見的に着手したものを重点課題としました。

◎次回「遠山椿吉記念 第6回 健康予防医療賞」の応募期間は、2019年4月1日より6月30日の予定です。

*遠山椿吉賞に関する詳細は、当法人ホームページをご覧ください。 <https://www.kenko-kenbi.or.jp/>

〈問い合わせ先〉

〒102-8288 東京都千代田区九段南4-8-32

一般財団法人東京顕微鏡院 公益事業室 「遠山椿吉賞運営事務局」宛

Tel.03-5210-6651 Fax.03-5210-6671

授賞式

「遠山椿吉記念 第6回 食と環境の科学賞」の授賞式・記念講演会・レセプションは、2019（平成31）年2月5日（火）にホテルメトロポリタンエドモント（東京・飯田橋）にて開催されました。授賞式には、選考委員の先生方を始め、研究者、報道関係者ほか当法人関係者など、120名近い参列者が祝福に集まりました。



山田匡通理事長は、まず、受賞者のお二人を祝福し、遠山椿吉博士の先見性に触れ、本賞の重要性が高まっていくことへの期待を寄せました。

続いて鈴木氏のご研究について、耐性遺伝子が水環境に普遍的に分布することを示し、ワンヘルスの観点からリスク低減策の提言、予防衛生上の方向性を発信しており、国際的な獣医・公衆衛生分野で高く評価されるとして深い敬意と祝辞を述べました。

杉山氏のご研究については、エピジェネティック変異原同定法のプロトタイプを世界に先駆けて開発し、アカネ色素アリザリンを被検物質に同毒性を検知したことは大変大きな業績であり、動物実験代替法や実用化が期待される点は非常に評価されるとして、今後のさらなる成果を期待し祝福しました。

最後に、渡邊治雄選考委員長をはじめとする選考委員の厳正な審査についても、深い敬意を表しました。



山田匡通理事長より鈴木聡氏（左）に遠山椿吉賞を授与



杉山圭一氏（左）に山田和江賞を授与

鈴木 聡先生 受賞コメント

このような栄えある遠山椿吉賞をいただきまして、大変うれしく思っております。学問はわれわれの生活を豊かにし、役に立たない研究はないと思います。その中でも特に、私は実用的に人の役に立つ研究を心掛けてまいりました。B型肝炎の薬を開発し、そこからソリブジンができ、患者さんのお役に立てたと自負しております。また、アコヤガイの大量斃死の原因となるウイルスの分離同定をして病原性を発見したことで、養殖形態の改善に役に立てていると思います。

2000年に今の愛媛大学沿岸環境科学研究センターに赴任した際、人の健康と環境の微生物をリンクさせて仕事をしようと考え、この薬剤耐性菌、環境の薬剤耐性菌の研究を始めました。いろいろな人たちと世界中を調査し、データベースができあがり、今回はそれを評価していただきました。

この研究をさらに加速し、人の役に立つ成果を出してまいります。ありがとうございました。



*平成30年度「食と環境の科学賞」授賞式について、詳細は、当法人ホームページをご覧ください。

水環境における薬剤耐性菌・耐性遺伝子の公衆衛生学的研究

鈴木 聡

愛媛大学 沿岸環境科学研究センター 教授

1. はじめに：薬剤耐性菌は世界的“遺伝子汚染”の問題

今回受賞した「水環境における薬剤耐性菌・耐性遺伝子の公衆衛生学的研究」というテーマについては、2000年から愛媛大学をはじめ数多くの国内外の大学や研究機関が連携して進めてきたものです。本日は、われわれの研究成果の中から「水環境において薬剤耐性菌がどのようにできるのか？」ということを、サルファ剤耐性遺伝子に関する研究の一部を例にあげて紹介します。

2015年の段階で、世界で約70万人以上が薬剤耐性菌(以下AMR、Antimicrobial Resistance)を原因に死亡しているという統計があります。この状況を放置しておけば、35年後の2050年にはAMRが関与する死者数は1000万人を超えともいわれています。現在、死亡理由として最も多いのががん(約820万人)ですが、2050年にはAMRがこれを超えるという推計になっています。そこで、WHOでは「ワンヘルス」というコンセプトを掲げ、2015年のG7サミットの首脳宣言において「耐性菌対策の加速化」を謳っています。

ワンヘルスとは「人の健康は、動物の健康や環境と非常に強いつながりがある」という発想です。このコンセプトに対して、環境微生物にかかわる研究者は、図1のようなアプローチで取り組んでいます。最初に取り組まなければならないのは、抗菌剤と薬剤耐性菌(および薬剤耐性菌が持っている遺伝子)による環境汚染の分布実態を把握することです。これは「点」ではなく、「面」で広くモニタリングしなければなりません。汚染実態が把握できたら、

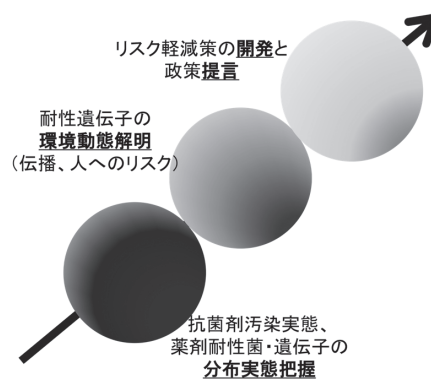


図1 環境耐性遺伝子研究の目的

次のステップとしては、耐性菌の遺伝子が、環境中でどのように移動するのか、それがヒトに対してどのようなリスクになり得るのを解明していきます。この2つに関する知見が整備できたら、さらなる展開として、リスク軽減策の開発と政策提言をしていくことが、われわれの最終目標となります。

2. 耐性菌の発生と動態

1) 耐性菌が出現するメカニズム

耐性菌の発生と動態を図2にイメージ図として示しました。微生物の群集の中では「変異」という現象が起きます。変異が起きると、群集の中で「薬剤耐性」(図2ではR(レジスタンス)で示している)という性質を持つ微生物が現れることがあります。さらに、ここに抗菌剤や抗生物質などが存在すると、これが選択圧として作用して、感受性菌は死に、耐性菌だけが生き残ります。こうして生き残った菌が増えていくと、レジスタンス(耐性のある)の群

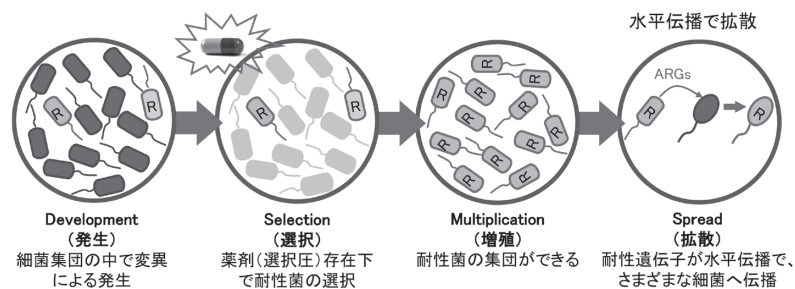


図2 耐性菌の発生と動態

集ができます。このレジスタンスという能力は、遺伝子が水平伝播することで広がります。

われわれが疑問に感じた点の一つに、「レジスタンスという能力を獲得する現象において、本当に選択圧は必要なのか？」という点がありました。たとえば院内感染の場合は、常に病院内は選択圧がかかっている条件下ですから、「選択圧は必要」という結論になるかもしれません。しかし、実際には、抗菌剤が非常に低濃度、あるいはほとんどないような外洋でも耐性遺伝子は見つかっています。臨床で見つかるのと同じ遺伝子が、外洋の海底から検出されることもあるのです。そうした環境での動態を調べていくうちに、「選択圧はなくてもよい」ということがわかってきました。

2) 水環境における薬剤濃度と耐性菌出現の関係性

水環境の抗菌剤の濃度と、それに対する微生物のレスポンスについて説明します。一般的に、高濃度の抗菌剤がある環境(たとえば人獣の医療現場や下水のような、mg/l レベルで薬剤が存在する場所)では、耐性菌ですら増殖が阻害されます。また、それよりは濃度が低いような場所(たとえば東南アジアの運河や市中の河川のような、μg/l レベルの薬剤が存在する場所)では、耐性菌は増殖可能ですが、感受性菌は阻害されます。さらに低濃度の場所(たとえば沿岸の養殖場のようなng/l レベルの場所)では、感受性菌すらも阻害されません。ところが、耐性遺伝子をモニタリングしてみると、こうした抗菌剤の濃度がきわめて低い場所でも耐性遺伝子は存在しています。

さらにいえば、歴史的に長きにわたって使用されてきた抗菌剤(たとえばサルファ剤やテトラサイ

クリンなど)に対する耐性遺伝子というのは、すでに世界中の環境にまん延していることもわかってきました。

3) 耐性菌が生まれる「ホットスポット」

では、薬剤耐性遺伝子(以下ARG、Antibiotic Resistance Genes)は、環境中のどのような場所で発生するのでしょうか。ARGの環境中における動態について説明します。われわれの環境の近くには、ARGに関して「ホットスポット」と呼ばれる場所があります。ホットスポットとは、人の医療現場や、人の医療より何倍もの抗菌剤を使用する畜産農場などです。そこで使用された抗菌剤が、土や地下水を通って河川や海に流れ出ます。最近、特に問題になっているのは薬剤工場(とくにジェネリック医薬品の工場)です。とりわけインドや中国など、下水処理のインフラが整っていない国の工場では、高濃度の薬剤が検出されています。ホットスポットは薬剤汚染とともにARG汚染の発生源ともなります。

また、われわれが生活する社会環境もモニタリングが必要です。たとえばOTC(オーバー・ザ・カウンター)で購入できる薬を手塗って、それを水道で洗い流した場合、その薬は下水から下水処理場へと流れていきます。しかしながら、そもそも下水処理場は抗菌剤を分解する目的で設置された施設ではありません。あくまでも「有機物を除く」「病原菌を減らす」というのが目的ですから、抗菌薬の70%も分解できればよい方で、残りは分解されずに川に、そして海へと流れていきます。加えて、養殖場も抗菌剤を使用しているため、ホットスポットになる可能性があります。

4) 研究者が解くべき課題

こうした状況に対し、われわれ研究者が解かなければならない課題として、第1に「ARGが環境で増減するのか、あるいは維持されるのか、変異は起こるのか、伝播はどのように起きるのか」、第2に「環境におけるARGの保有者は誰か」、第3に「環境のARGが、われわれにとって、どの程度リスクになるのか?」という点があります。これらが、われわれが挑戦する問題となります。

3. 水圏微生物の特性と重要性

1) 海洋環境の特徴

海洋環境の特徴として、まず「低温環境」「貧栄養環境」という点があげられます。世界の海の平均温度は4℃です。また、有機物栄養に関しては、沿岸であってもμg単位(多くてもmg単位)の有機炭素しか存在しません。土壌や腸内に比べれば、非常に貧栄養な環境といえます。また、環境中では微生物だけが生きているわけではなく、「捕食圧」という要因があります。微生物は原生生物に食べられ、原生生物は動物プランクトンに食べられます。いわゆる食物連鎖ですが、微生物にとって、海洋は原生生物の捕食圧がある環境といえます。そして、抗菌剤の濃度は非常に低い環境です。

2) 海洋環境における微生物分布の特徴

そうした環境における常在細菌の分布は図3のようになります。半分以上はProteobacteriaで、それ以外には光合成をするCyanobacteria、Bacteroidetes(海洋の場合は非常に貧栄養の環境に適応したBacteroidetes)などが挙げられます。海洋の微生物叢の特徴として、グラム陽性菌はほとんど存在しません。また、Proteobacteriaの種類を詳細に

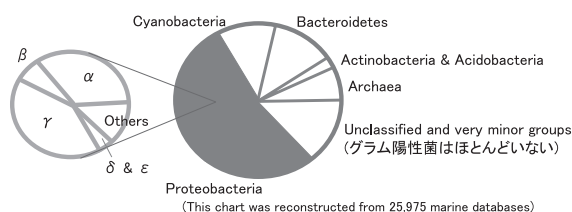


図3 海洋細菌の種類

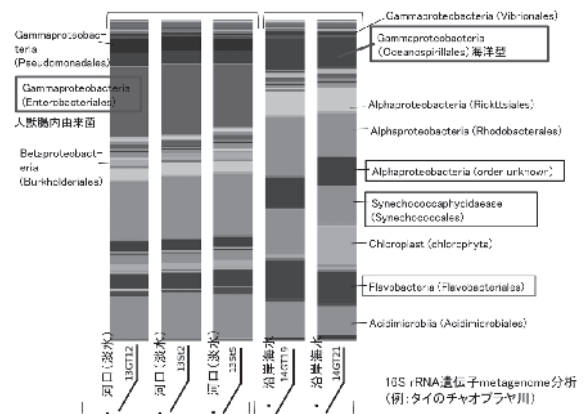


図4 河川と沿岸での典型的細菌叢

調べると、外洋ではαが多く、沿岸に近づくともγが多いという傾向があります。

また、こうした海洋環境の細菌は、そのうちの99.9%以上は未培養菌(生きていても培養ができない菌(yet-to-be cultured、non-culturable))という特徴があります。

すると、疑問として「培養できない細菌群集での耐性遺伝子の伝播は、どのようになっているのか?」という点が浮上します。しかし、培養できなければ、その微生物が薬剤耐性を持っているかは調べようがありません。そのため、この疑問に対する答えは、現時点では不明です。

図4は、タイのチャオプラヤ川の河口域で、環境中にどのような微生物がいるかを調査した一例です。左側の3本のグラフは淡水で採取した水、右の2本は河川が海に変わるところで採取した水です。特徴として、淡水では人獣由来のγ-Proteobacteriaが多いです。しかし、海水になった途端に、人獣由来のγ-Proteobacteriaは消え、海洋型のγ-Proteobacteriaが増えます。さらに加えて、貧栄養環境でも生育できるα-Proteobacteriaや、光合成をするCyanobacteriaが増えてきます。このように、川から海へ入った途端に菌叢が変化するのは、珍しいことではありません。

4. 環境で耐性遺伝子を保有するのは誰か?

1) 耐性遺伝子は環境中で循環する

こういった環境を踏まえた上で、われわれは図5

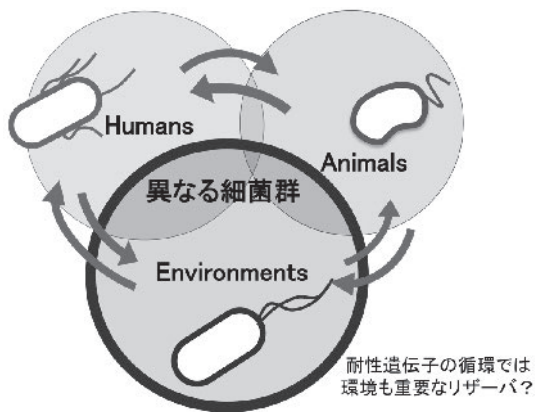


図5 耐性遺伝子は循環する

に示すように「耐性遺伝子は循環する」という仮説を立てました。

この仮説に対するわれわれの結論を一言で表現すると、「海洋環境は、単に人間環境に由来する耐性遺伝子のシンクの場合としてだけではなくて、変異・伝播・保存などのリンクの場合として機能している」ということです。われわれは、2003年からアジアを中心に耐性菌の調査を行っています。以下に、関連する研究の一部を紹介します。

ちなみに、耐性菌調査の対象ですが、欧州の獣医療で最も使用量が多いのはテトラサイクリンで用量全体の約4割、ついでペニシリンが約2割、サルファ剤が約1割を占めています(アジアではサルファ剤の割合がもっと多くなります)。そうした知見をもとに、われわれの調査では、環境に対する影響が大きい薬剤としてテトラサイクリンとサルファ剤を選びました。それ以外にも、われわれのチームではマクロライド耐性やフルオロキノロン耐性に関わる遺伝子についても研究しています。

2) ベトナムにおけるサルファ剤耐性遺伝子の実態調査

写真1はベトナムで実施した実態調査の例です。ベトナムでは、VAC(Vegetable-Aquaculture-Cage)と呼ばれるリサイクル農法が行われています。VACでは、養豚場や養鶏場から出た排泄物を、直接池に流します。そうすると池が富栄養化するので、プランクトンが大量発生し、たくさんの魚が飼えます。たくさんの魚を飼って富栄養化した水を水田や畑に流す



写真1 ベトナムのリサイクル農法

ことで、有機肥料ができます。非常に理想的なリサイクル農法です。しかし、ここで問題となるのは「人も動物も魚も稲も同じ水に触れている」という点です。

ベトナムの農家で聞き取り調査を行うと、「メーカーが薦める薬剤を、必要かどうかを理解しないまま、どんどん使っている」という実態が浮き彫りになります。また、飼料には多種類の、かつ高濃度の薬剤が含まれてます。そのため、写真にあるような餌を使えば、自動的にコリスチン、ネオマイシン、リンコマイシン、キタサマイシンなどの薬剤も使っていることになります。

東南アジアで最も多く使用されている薬剤はサルファメタジン(サルファ剤)です。そこでベトナムの水環境におけるサルファ剤耐性遺伝子の汚染実態を調べました。サルファ剤耐性遺伝子(*sul*)には*sul1*、*sul2*、*sul3*という3種類が知られています。ベトナムの養豚排水や養殖場、運河で最も多いのは*sul1*でした(表1)。一般的に「ヨーロッパでは*sul2*

	<i>sul1</i>		<i>sul2</i>		<i>sul3</i>	
	Closest species	no	Closest species	no	Closest species	no
養豚場排水	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	4	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	2	<i>Acinetobacter</i> sp. u2*	4
	<i>Acinetobacter</i> sp. u21	2	<i>Acinetobacter</i> sp. u21*	2	<i>Acinetobacter</i> sp. Hcp10	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-78-II*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-78-II*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. Hcp12	2
	<i>Acinetobacter</i> sp. MCB-113	1	<i>Acinetobacter</i> sp. MCB-113*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. P38	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. PDB	1	<i>Acinetobacter</i> sp. PDB	1	<i>Acinetobacter</i> sp. BAC1719*	1
エビ養殖場	<i>Acinetobacter</i> sp. S5C56	1	<i>Acinetobacter</i> sp. S5C56	1	<i>Acinetobacter</i> sp. S5C56	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	2	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. 21-11*	1
運河	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	2	<i>Acinetobacter</i> sp. u21*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. u21*	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. MCB-113*	2	<i>Acinetobacter</i> sp. MCB-113*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. MCB-113*	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1
	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1	<i>Acinetobacter</i> sp. PD12*	1

表1 サルファ剤耐性遺伝子3種(*sul1*、*sul2*、*sul3*)を持つ細菌(ベトナム試料)

が多い」といわれているので、アジアとヨーロッパで違いがあることがわかりました。また、ベトナムの養豚場の排水では、*sul1*と*sul2*の両方を持つ株が多いこともわかりました。一方、*sul3*はどの水圏でもほとんど出てきませんでした。

*sul*遺伝子はサルファ剤耐性菌のプラスミドに存在しますが、養豚場の排水の調査では、半分近い細菌が3～5種類の異なるプラスミドを持っていました。一方、養殖場や運河では1種類のプラスミドしか持たない細菌が主でした。環境によって、このような差異があることもわかり、「養豚場は耐性遺伝子のホットスポットであり、オリジンである」という知見が得られました。

養豚場排水、エビ養殖場、運河のいずれの場所でも、*sul*遺伝子(*sul1*、*sul2*、*sul3*)を最も多く持つ菌は*Acinetobacter*でした。つまり、水圏環境、あるいは排水では、*Acinetobacter*がメジャーな*sul*保有菌の一つであることがわかりました。

日本では、多剤耐性菌の院内感染による死亡事例は、毎年起こっています。2010年、帝京大学病院で多剤耐性*Acinetobacter*を原因として46人が院内感染、9人が死亡するという報道がありました。記憶に新しいところでは、昨年、鹿児島大学病院で多剤耐性*Acinetobacter*の院内感染があり、8人が死亡しました。*Acinetobacter*は厄介なことに、水圏にいる菌でありながら、乾燥に強いという特徴も有しています。そのため、いったん病院内に侵入すると、しばらくはそこに存在し続ける可能性があるため、病院では*Acinetobacter*の侵入に十分な警戒が必要となります。

3) フィリピンにおけるサルファ剤耐性遺伝子の調査

フィリピンの水圏でも*sul*遺伝子の保有者を調査しました(図6)。フィリピンにはマニラ東部にラグナ湖という非常に巨大な淡水湖があります(図6の湖内に記した台形はティラピアの養殖いけすを表す)。ラグナ湖の両岸には、人よりも高い密度で養鶏、養豚が行われています。この養鶏、養豚の排水は、すべてラグナ湖へと流れます。さらに、川の両側にあるマニラシティの排水は、すべてパッシング川へ流れ込み、マニラ湾へ出ていきます。そこで、

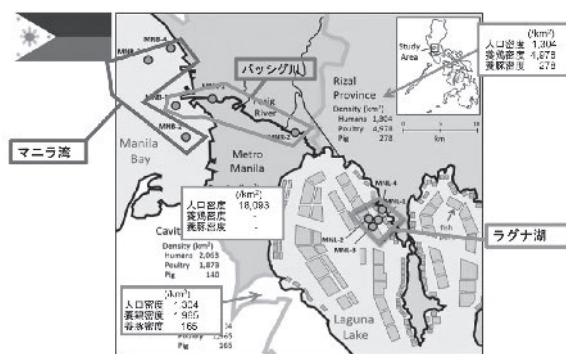


図6 フィリピンにおけるサルファ剤耐性遺伝子の調査

われわれはラグナ湖、パッシング川、マニラ湾でサンプリングを行いました。

先ほど述べたように、海洋細菌の99.9%以上は未培養菌であるため、遺伝子の水平伝播における役割は不明です。そこで、仮説として「未培養菌がARGリザーバになっているのではないか?」「未培養菌から他の菌へ遺伝子伝播が起こるのではないか?」と考えました。

実験では海水や河川、運河、下水処理場処理水などから採取した水について、まずオーソドックスに菌数を測定しました。菌数測定の方法は3通りで、①総菌数(DAPI染色して顕微鏡下でカウントする)、②生菌数(寒天培地に生えてくるコロニーをカウントする)、③耐性菌数(寒天培地に薬剤を添加し、耐性菌のみをカウントする)です。その後、プレートの全コロニーを釣菌し、プールしたDNAを取ります(これを「Culturable菌DNA」と称する)。また、サンプルである水をろ過し、0.2μmのフィルタの上で捕集された菌のすべてのDNAを取ります(これを「Natural assemblage DNA」と称する)。この両方のサンプル中で、耐性遺伝子のコピー数を測定しました。

結果は図7に示すとおり、*sul1*～*3*ともNatural assemblage DNAは湖と河川ではあまり検出されませんが、海(枠で囲った部分)では*sul1*、*sul2*、*sul3*の全種類が検出されました。また、Culturable菌DNAについては湖から海に至るサンプルで*sul1*と*sul2*が検出されましたが、*sul3*はほとんど検出されませんでした。この結果から、海洋では未培養菌が*sul1*、*sul2*および*sul3*を持っている(リザーバの可能性もある)ことがわかりました。

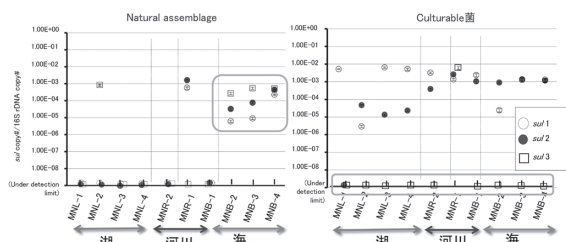


図7 フィリピンの水圏における *sul* 遺伝子コピー数

さらに、海洋の Natural assemblage の菌叢と、Culturable 菌の菌叢を調べたところ、培養できる γ -Proteobacteria が *sul1* と *sul2* を保有していることがわかりました。こうした研究の結果から、さらに推測を進めていくと、海洋環境中の未培養群集は、*sul3* 以外にもさまざまな耐性遺伝子を保有していることが考えられます。

例えば、2017年、スウェーデンの研究者が、インドの河川のクロロフレキシという菌群から *sul4* という新しい *sul* を見つけました。そこで、われわれも、この *sul4* について、すでに分離保管していた α -Proteobacteria で調べてみたところ、非常にたくさん検出されました。われわれが保有する株は、愛媛県の周囲で採取した株が多いのですが、その中にも実は *sul4* がある（われわれはこれまで *sul4* を見逃していた）ということがわかりました。海洋

中にはこういった新しい遺伝子も存在するのです。

5. 耐性遺伝子が残存するメカニズム

1) 環境に放出された耐性遺伝子の挙動

次に、こうした耐性遺伝子が残存するメカニズムについても検討しました。常識的に考えれば、食物連鎖の中で、細菌が原生生物に捕食されたら、細菌が持つDNAも分解・消化されると考えられます。しかし、実際に海洋では、溶存態(細菌細胞より小さい画分)の中にもプラスミドは存在しています。では、環境に放出されたプラスミドに存在する耐性遺伝子の運命はどうなるのでしょうか？

そこで、海洋細菌である *Photobacterium damselae* が保有する pAQU1 という多剤耐性プラスミドを使って実験を行いました。このプラスミドは、7つの耐性遺伝子を持っています。また、伝達に必要な *tra* 遺伝子シリーズを持っています。さらに、プラスミドを正確に分配するための分配遺伝子 (*parA*, *parB*) を持っています。つまり、pAQU1 は非常にコピー数が少ないプラスミドですが、2分裂したときに必ず1個1個を娘細胞にわたしていくことができます。このような伝達遺伝子 (*tra*) と分配遺伝子 (*par*) を備えたプラスミドを用いて、選択圧・捕食圧の存在下における耐性遺伝子の残存について解明を試みました。

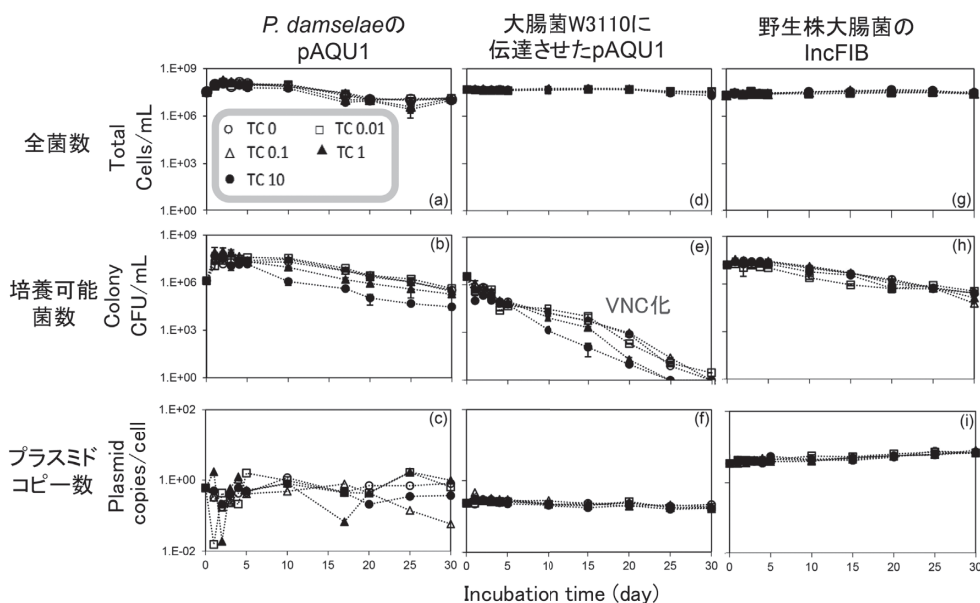


図8 薬剤選択圧のある/ない場合の群集中のプラスミド数

2) 薬剤選択圧の影響

薬剤の選択圧の有無によって、プラスミドが群集からなくなるのか検討した結果を図8に示しました。上段は全菌数です。テトラサイクリンをさまざまな濃度で添加しましたが、いずれの濃度でも、1カ月間にわたり菌数は減りませんでした。中段は培養可能な菌で、減少が認められます。下段はプラスミドのコピー数で、1個の細胞に1個のプラスミドが存在するという状態が持続しています。

この現象は、*P. damsela*だけでなく、pAQU1を伝達させた大腸菌でも同様でした。これがpAQU1独特の現象である可能性もあるので、似たようなプラスミド(牛糞から採取した野生型の大腸菌の持つIncFIB)で、同様の実験を行いました。その結果、全菌数は1カ月にわたり変化しない、培養菌数は減少する、プラスミドは細胞中で持続する、という同様の結果になりました。

これらの結果から、一般的に「プラスミドを保有することは、細菌にとって重荷になる」といわれているのですが、少ないコピー数で、かつ分配遺伝子(*parA*、*parB*)が存在すると、薬剤が存在しない環境下でも細菌はプラスミドを持ち続けることがわかりました。

3) 原生生物による捕食圧の影響

原生生物による捕食圧がある(原生動物が細菌を捕食する)という条件下において、細菌数と溶存態画分中のテトラサイクリン耐性遺伝子である *tet* (M) コピー数変化

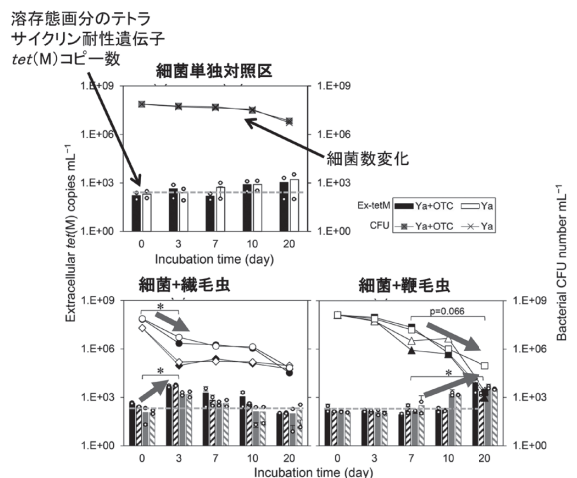


図9 原生生物捕食圧下での細菌数と溶存態画分中の *tet* (M) コピー数変化

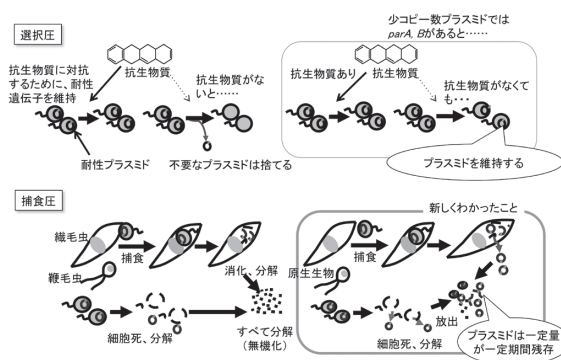


図10 薬剤による選択圧、原生生物による捕食圧がある/ない場合の耐性遺伝子残存

(M) のコピー数の変化を調べました(溶存態画分 = 0.2 μm を通過する画分)。

結果は図9に示すとおり、細菌だけでは、20日間にわたり *tet* (M) のコピー数の増減はありませんでした。そこで、細菌と繊毛虫を共存させたところ、繊毛虫が細菌を食べて、細菌数は減りましたが、それと同時に耐性遺伝子が外へ出てきました。

細菌と鞭毛虫を共存させた場合も、同様の結果でした。鞭毛虫は繊毛虫に比べると小さく、捕食するスピードも遅いので、菌数はゆっくり減少しますが、それと同調して耐性遺伝子も外へ出てきました。

4) 選択圧・捕食圧が耐性遺伝子に及ぼす影響

以上をまとめると、図10のようになります。薬剤による選択圧については、薬剤が存在しない状態でも、プラスミドを捨てずに群集中に持ち合わせるというメカニズムがあると考えられました。また、原生生物による捕食圧については、これまでは「菌が食べられたら、すべて消化される」というのが常識でしたが、われわれの検証実験では、一定量のプラスミドはある程度残存するという現象を確認しました。つまり、プラスミド(あるいは耐性遺伝子)が、環境中では比較的安定的に残存するメカニズムがあるということです。

6. 今後の研究課題

1) 環境中の耐性遺伝子に暴露するリスク

われわれが今回明らかにしたことは2つあります。第1に「水圏の未培養菌が耐性遺伝子を保有し

ている」、第2に「水圏環境では耐性遺伝子は普遍的に存在している」という点です。

いろいろな現場で耐性菌、耐性遺伝子のホットスポット化が問題になっています。ホットスポットから流出した耐性菌・耐性遺伝子が、環境で常在菌と出会います。われわれは、そうした混合の場において、水棲細菌や海洋細菌と、病原細菌や腸内細菌などの間で遺伝子伝播が起こるとことも明らかにしています。さらに、ある種の金属あるいは有機物を微量添加することで、伝播が促進されることも明らかにしています。

また、海洋中で菌体の外に出た耐性遺伝子が、環境中に残存することも明らかにしました。つまり、われわれがマリンスポーツを楽しんだり、あるいは水産物など食品を摂取する際、われわれは海洋細菌が持つ耐性遺伝子に曝露される機会があるということです。いったん人体に入ってしまうと、その人を介して臨床の現場(病院など)へ伝播する可能性があります。つまり、図5に示したように環境や人の間で耐性遺伝子が循環する可能性が懸念されるのです。

2) 今後に向けた提言

では、そうしたリスクがあるとして、どのようなリスク低減策を提言できるでしょうか。

第1に、過剰投与を防止する法令を設けることが、ホットスポットを減らすことにつながります。これは、すでに日本ではアクションプランとして明記されており、効果も高いと考えられます。

第2に、工学的な下水処理技術の向上です。先ほど述べたように、そもそも下水処理は耐性遺伝子を減らすことを目的としていません。技術的な工夫によって、耐性菌あるいは耐性遺伝子の放出を減らすことを可能にしたいと考えています。

そして第3に、大学などの研究者や臨床医などの関係者を中心に、遺伝子の侵入を減らすための衛

生教育や啓発活動を展開する取り組みが必要であると考えます。たとえば「手洗い」は非常に簡単な取り組みですが、とても重要なことでもあります。私自身、看護学校でも教育にたずさわっていますが、最初に教えるのは「手洗いの習慣づけ」です。手洗いで菌がゼロになるわけではありませんが、「減らす」ということが非常に重要です。一つのステップで、すべてのリスクをゼロにできるわけではありません。複数の「減らすステップ」を組み合わせ、全体として減らすということがとても重要です。

我々は、10年以上も前の2007年には、メディアを通じて、耐性菌が川や海にも一般的に存在することを広報しました。あるいは、南極のペンギンの腸内から採取した菌で、海洋性の細菌(低温細菌)が臨床の検体とまったく同じ遺伝子を持つことを報道しました。これからも、教科書や書籍、報道などの媒体を通して、幅広い層に向けて教育や周知していければ、と考えています。教育は非常に重要な位置づけにあると思います。

7. 最後に

最後になりますが、私の「座右の銘」はパスツールの「幸運は準備している人にだけ訪れる」という言葉です。常に準備を怠らず、情報に対するセンサーを高くすることで、情報などが舞い込んできたときに、見逃さずに捉えることができます。チャンスを逃すことがないように、常に準備を心がけています。

また、東京顕微鏡院のモットーは「すべての人びとのいのちと環境のために」です。このフレーズは、まさに環境衛生あるいは公衆衛生にたずさわる者の「使命」であると思います。今後は、このフレーズも私の「座右の銘」に加えて、日々の研究に努めていきたいと思っています。

杉山 圭一先生 受賞コメント

この度は、山田和江賞に選考いただき、誠に光栄に存じます。

国民の健康・福祉において、食の安全というのは非常に重要な課題です。エピジェネティックなレギュレーションは、食の安全上不可欠な、発がん性に関係する機序ですが、このエピジェネティックな変異原の検出系を開発できる可能性を世界に先駆けて示したことを最大の評価点としていただいたと理解しております。

また、プロトタイプを検出系構築と有用性の証明ができたことを誇りに思います。

今後も食品、環境中の化学物質の毒性評価を続け、皆さまにお届けできる研究とできるように、当賞を励みに精進してまいります。

この度の受賞につきましては、研究に携わったすべての方々、ご指導、ご鞭撻いただいた諸先生方、そして研究に専念できる環境を与えてくれた家族に心より感謝いたします。



* 詳細は、当法人ホームページをご覧ください。

食品からのエピジェネティック変異原性の検出： 酵母凝集反応を指標とした新規毒性試験法の開発

杉山 圭一

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 室長

1. はじめに：エピジェネティック変異原研究の意義

DNAは変異原にさらされると、点突然変異などを誘発しがんの直接的な原因になります。平成27年の厚生労働省の資料によると、わが国の死因の4分の1以上をがんが占めています。

現在、化学物質による発がん性のスクリーニングにおいて、国際的にゴールドスタンダードとして位置づけられているのは、細菌を用いたAmes試験です。ただし、このAmes試験と、げっ歯類を用いた発がん試験との一致率については、残念ながら100%とはいきません。たとえば、平成28年に国立医薬品食品衛生研究所の森田健先生が発表した論文では60%強という一致率でした。

そこで、われわれは「ジェネティックなDNAの塩基配列の変化ではなく、エピ(後成)ジェネティックな変化を誘発する変異原を検出できる方法があれば、化学物質の発がん性をより精緻に予測できるのではないか?」「その予測ができれば、将来的には発がん率の低減にもつなげられるのではないか?」と考えました。

「エピジェネティクス」については、「クロマチン構造を媒体とした情報」という定義がされています。真核生物ではDNAはヒストンに巻き取られたヌクレオソーム構造をとっています。そのヌクレオソーム構造が連続したものがクロマチン構造です(図1)。エピジェネティクスとは、ゲノムの配列変化なしに(後成的に)異なる性質の細胞が発生し、維持されるメカニズムを指します。

クロマチン構造は、エピジェネティックな機構を

介して転写を制御します。このエピジェネティックな制御機構には、大きく①DNAのメチル化、②ヒストン修飾、③それらの構造変化をともなったクロマチン構造変化、という3種類があります。たとえば、われわれが受精卵から最終的に成体に至る過程において、受精卵は内胚葉、中胚葉、外胚葉に分化し、それがさまざまな臓器へと分化していきます。このメカニズムの分子基盤を担う最も重要なものが、エピジェネティック制御というわけです。

受精卵は、エピジェネティックな変化が緻密に制御されることで正常に発生します。しかし、ある種の化学物質が、こうした正常な発生を乱す場合があります。こうしたエピジェネティックな変化を乱す要因を、われわれは「エピジェネティック変異原」と呼んでいます。エピジェネティック変異原にさらされた場合、がんや精神疾患の原因になり得ることが、最新の研究から明らかにされつつあります(図1)。

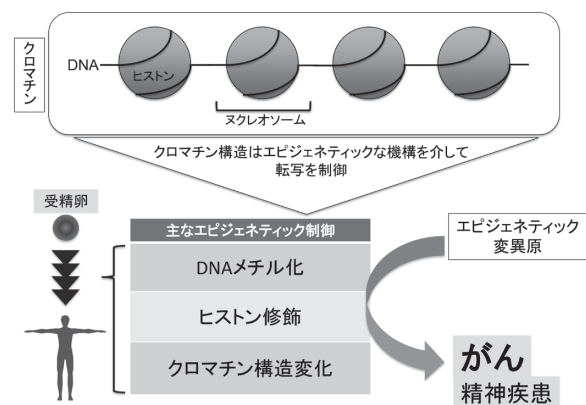


図1 クロマチン構造とエピジェネティック変異原

2. DNMT酵母の創成

1) エピジェネティック変異原の検出系に求められる要件

エピジェネティック変異原の検出システムを開発する際に考えた戦略について説明します。「エピジェネティックな変化」は真核生物特有のものです。したがって、プラットフォームとする生物は真核生物である必要があると考えました。また、目指しているのは「エピジェネティック変異原を簡便に探索できる技術」ですから、真核生物の中でも取り扱いが容易な「出芽酵母」を外すわけにはいきません。

表1は、エピジェネティック変異原の検出系として、出芽酵母と動物細胞を比較したイメージです。時間ならびに培養にかかるコストは、出芽酵母の方が優れていると考えられます。時間(エピジェネティックな変異を検出するまでに予測される時間)は、動物細胞は少なく見積もっても約1カ月はかかると考えられますが、出芽酵母であれば世代時間(ダブリングタイム)が最速で2時間程度なので、おそらく3日未満で済むと考えられます。

また、表1では、ヒトへの外挿性に関して、出芽酵母は「△」をつけています。これは、現時点では出芽酵母におけるDNAのメチル化については不明とされているからです。少し詳しく説明します。動物細胞の核内にある塩基対のシトシンについては、DNAメチル化酵素の働きによって5'位の位置にメチル基が付加されるという酵素反応が存在します。一方、出芽酵母では、このDNAメチル化を触媒する酵素遺伝子が、現時点では同定されてい

	出芽酵母	動物細胞
費用	○	△
時間	○(3日未満)	△(約1ヶ月)
ハイスループット	○	△
ヒトへの外挿性	△	○



表1 酵母と動物細胞のエピジェネティック変異原検出系の比較(イメージ)

せん。そのため、これまで出芽酵母は「DNAメチル化を含むエピジェネティックな制御の解析に用いるには適さない生物」と考えられていました。

しかし、われわれは、これを逆手に取って、「ヒトのDNAメチル化酵素遺伝子(DNMT)を出芽酵母に形質転換することによって、エピジェネティックな検出系ができるのではないか?」と考えました。動物細胞におけるDNAメチル化機構は、図2に示す3つのステップで進行すると考えられています。まず2本鎖の両鎖CG配列に、新規にメチル基を導入する酵素(DNMT3AまたはDNMT3B)が作用します。細胞は分裂時に、DNAを複製します。この複製は半保存的複製でヘミメチル化状態が生じますが、最後のステップとして、両鎖にメチル基が付加された状態にすべくDNMT1が非メチル化CG配列にメチル基を導入します。この3ステップによって、娘細胞で安定にDNAのメチル化が維持されることになります。

2) DNAメチル化酵素(DNMT)と出芽酵母

そこで、実験室酵母にDNMT1とDNMT3A、またはDNMT1とDNMT3Bのいずれかの組み合わせで両遺伝子を形質転換した酵母を使って、何らかの表現型が得られないか検討を行いました。その結果、幸いなことに形質転換した酵母細胞において凝集(Flocculation)反応が明確に確認できることが明らかとなりました(培養液を5分間静置すると、試験管内で細胞集塊が沈降する)。

ここで出芽酵母が凝集するメカニズムについて簡単に説明します。本来、野生の出芽酵母は凝集

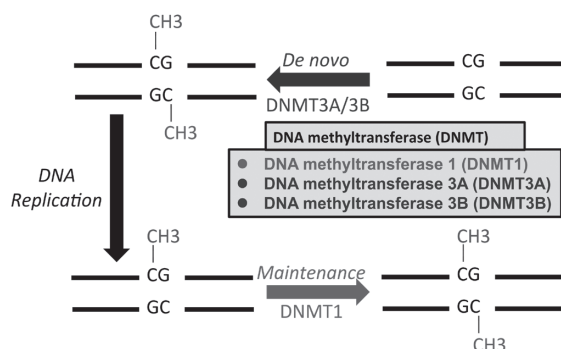


図2 動物細胞におけるDNAメチル化機構

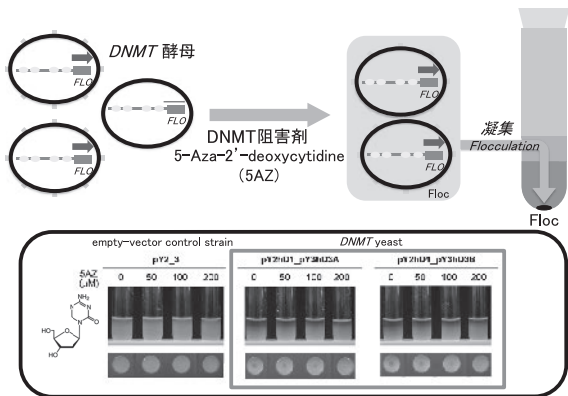


図3 DNMT酵母の凝集反応に及ぼすDNMT阻害剤の影響

能を有しています。凝集した細胞集団は、凝集塊 (Floc) を形成し、液体培養時に沈降します。凝集は、細胞表層に発現するFLOタンパク質が自細胞以外の細胞表層のマノースなどを認識・結合することで生じます。

そこで、非常にシンプルな考え方ですが、DNMT遺伝子を導入した実験室酵母YPH250株 (以下、DNMT酵母) において凝集レベルの上昇が確認されたことから、同酵母の凝集反応に及ぼすDNMT阻害剤の影響を確認しました。その結果、予想どおりDNMT1とDNMT3A、DNMT1とDNMT3Bを導入したDNMT酵母の凝集性は、5AZ (DNMT阻害剤; 5-アザ-2'-デオキシシチジン) の濃度依存的に抑制されるという結果が得られました (図3)。

出芽酵母の凝集性とDNAメチル化について簡単にまとめます。DNMT1とDNMT3Bの両遺伝子を導入したDNMT酵母は凝集性を示し、なおかつFLO1遺伝子の転写が促進されました。そのメカニズムについて、われわれは図4のように考えています。FLO1遺伝子のプロモーター領域は、通常の酵母においても (低レベルではありますが) メチル化されています。そこに外来のDNMT遺伝子を導入すると、よりハイパーな状態のメチル化が行われます。逆にDNMT阻害剤を添加すると、メチル化は消失します。FLO1遺伝子の発現は、同遺伝子プロモーター領域におけるDNAメチル化と正の相関性があると考えられます。これらのことから、出芽酵母におけるDNAメチル化は、細胞内で生理的な機能を有すると結論づけました。

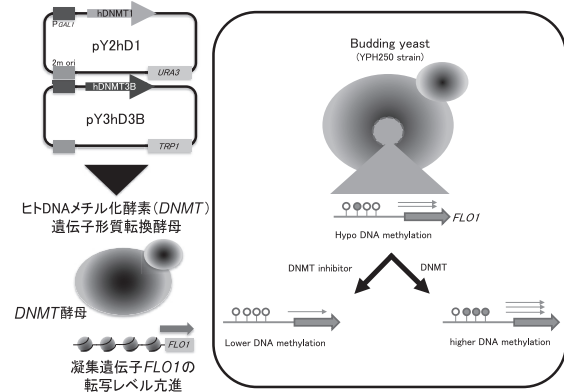


図4 出芽酵母の凝集性とDNAメチル化のメカニズム

3) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) がDNMT酵母の凝集性に及ぼす影響

先ほどエピジェネティックな変化では、DNAのメチル化とヒストン修飾が主要な役割を担っていると説明しました。ヒストン修飾についても凝集反応を指標に検出できれば、エピジェネティックな変化を検出するユニバーサル系になり得ると考えられます。そこで、まずはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤であるトリコスタチンAがDNMT酵母凝集性に及ぼす影響について検討しました。

出芽酵母では、HDAC遺伝子であるRPD3およびHDA1の二重欠損株が凝集性を示すことがすでに報告されています。そこで、この報告を参考に、トリコスタチンAの添加によって、DNMT酵母の凝集性に促進効果を与えるかどうか調べました。結果は図5

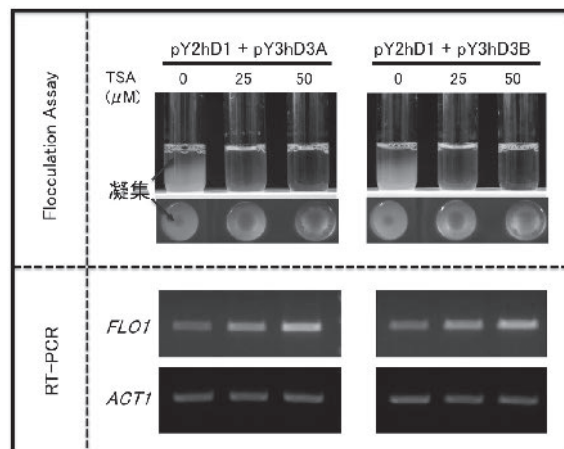


図5 ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 (Trichostatin A) がDNMT酵母凝集性に及ぼす影響

に示すように、凝集性も、RT-PCRにより解析した *FLO1* の転写活性化のレベルも、トリコスタチン A の濃度依存的に促進されることがわかりました。

4) ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) が核染色像に及ぼす影響

DNA は、核内でクロマチン構造を取っていますが、エピジェネティックな分子基盤の一つとして、コアヒストンの N 末端領域においてアセチル基が導入されると、ヌクレオソームが弛緩された状態となり、遺伝子の転写が促進されることが知られています (図 6 の上段参照)。

そこで、実際に HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A 存在下で培養した場合にヌクレオソームが弛緩した状態になるか、酵母の核を蛍光色素の DAPI で染色致しました。結果は図 6 の下段のように、ベクターコントロール株と DNMT 酵母の両株において拡散した核染色が観察されることが明らかとなりました。

5) 小括

以上の結果から、酵母の凝集関連遺伝子 *FLO1* はエピジェネティックな制御下にあり、なおかつそのエピジェネティック制御は可塑性を持つことがわかりました。*FLO1* 遺伝子の転写の促進により、DNMT 酵母の凝集性は強く誘発されます。この現象は DNMT 阻害剤によって抑制され、逆に HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A によっては促進されることがわかりました (図 7)。

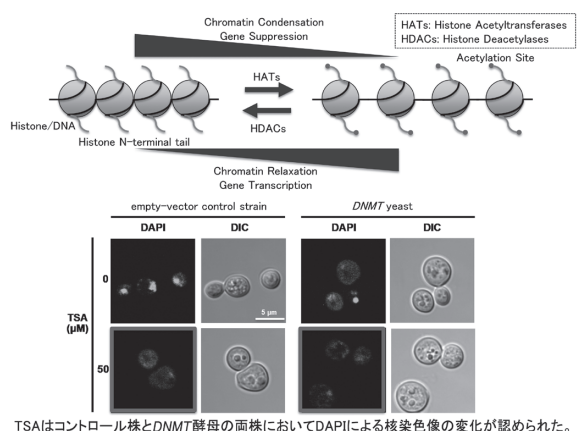


図 6 ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 (トリコスタチン A) が核染色像に及ぼす影響

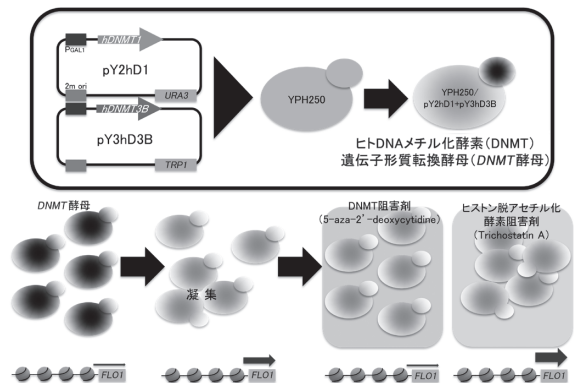


図 7 酵母の凝集関連遺伝子 *FLO1* はエピジェネティックな制御下にある

3. 酵母凝集反応によるエピジェネティック変異原の可視化

以上の結果から、エピジェネティックな変化を検出するプロトタイプが DNMT 酵母で顕在化した凝集反応を利用することで構築できる可能性が見えてきました (図 8)。そこで、実際に本凝集性を指標に、環境中や食品中からエピジェネティックな変異原を検出できるか検討しました。以下に、その一例を紹介しします。

1) アリザリンおよびアントラセンが凝集性に及ぼす影響

先ほど述べたように、この凝集反応は DNA のメチル化、ヒストン修飾に対して可逆的に応答しま

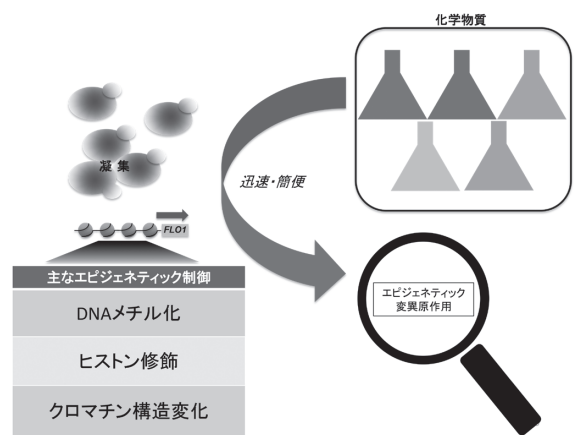


図 8 酵母凝集反応を利用してエピジェネティック変異原を簡便・迅速に可視化する系のイメージ

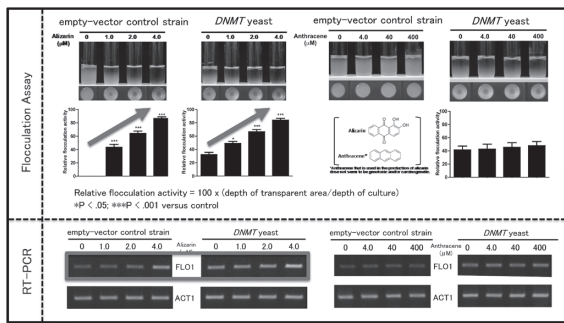


図9 アリザリンおよびアントラセンが凝集性に及ぼす影響

す。ここでは、環境中から迅速・簡便にエピジェネティック変異原が検出できるかどうか、アリザリンを用いて検証を行いました。アリザリンはアカネ色素に含まれている化学物質で、アカネ色素はこれまで赤ウインナーなどで色素として使用されていました。しかし、げっ歯類を用いた発がん試験の結果などを根拠として、平成16年に既存添加物の名簿から削除されています。

アリザリンについては、その後の研究から発がん性を促進するとの報告があることから、われわれは、この促進作用がエピジェネティックな制御の攪乱に起因している可能性を考えました。実際にアリザリンが凝集性に影響を及ぼすか検討した結果を図9の左半分で示しました。コントロール株、DNMT酵母ともに、アリザリンに対して濃度依存的に凝集性が增强されることが確認されました。さらに、RT-PCRの結果から、*FLO1* 遺伝子の転写が促進されることも確認できました。

図9の右半分はアントラセンを用いた場合の結果です。アントラセンは、ベンゼン環が3つ並んだ構造の化合物で、アリザリンを化学合成するための初発物質です。遺伝毒性、発がん性は基本的にないと考えられています。アントラセンによる凝集性、*FLO1* 転写への影響は検討した濃度では確認されません。

2) アリザリンが*FLO1*-GFP活性に及ぼす影響

次に、アリザリンが*FLO1* プロモーター制御下のGFP活性(*FLO1*-GFP活性)に及ぼす影響についてベクターコントロール株で検証しました。アントラセン、アリザリンおよびプルプリン(アリザリンの

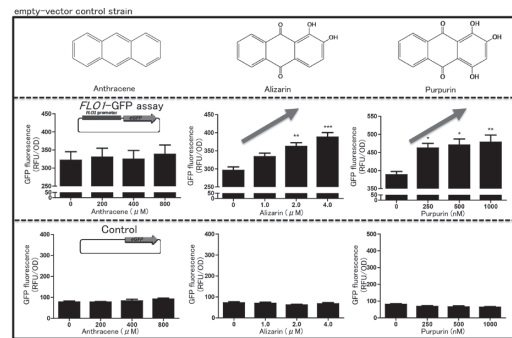


図10 アントラセン、アリザリンおよびプルプリンが*FLO1*-GFP活性におよぼす影響

構造類縁体、5'位の位置にヒドロキシル基が追加された西洋アカネに含まれる化合物)を用いて、*FLO1*-GFP活性に及ぼす影響を確認したところ、予想どおりアントラセンは影響がありませんでしたが、アリザリンとプルプリンは濃度依存的な増強が明確に確認できました。一方、*FLO1* プロモーターがない場合、3剤ともGFP活性に対しては影響を及ぼさないことも確認しています(図10)。

3) アリザリンが核染色像に及ぼす影響

アリザリンの作用機序についても検討を進めました。先ほど述べたように、アリザリンはDNMT酵母だけではなく、ベクターコントロール株でも同様の効果が確認されていることから、アリザリンによるエピジェネティック制御の攪乱作用はヒストンを作作用点とする可能性が高いと予想されました。

そこで、ヒストンを構成するコアヒストンの一つであるHistone H3の量をウェスタンブロット法で確認しました。その結果、驚いたことにアリザリンはHistone H3の総量を明確に減少させることが明らかとなりました(図11の上段を参照)。一方、アントラセンでは、同様の効果は確認できませんでした。この結果は、DNAとヒストンがうまく会合できていない、すなわちヌクレオソーム構造が破綻している(おそらくクロマチン構造が弛緩している)ということを示唆していると考えました。そこで、トリコスタチンAと同様に酵母の核をDAPI染色し、その核内の状況を確認したところ、アリザリン処理をした場合はベクターコントロール株とDNMT酵母の両方で拡散した核のDAPI染色像が頻見されること

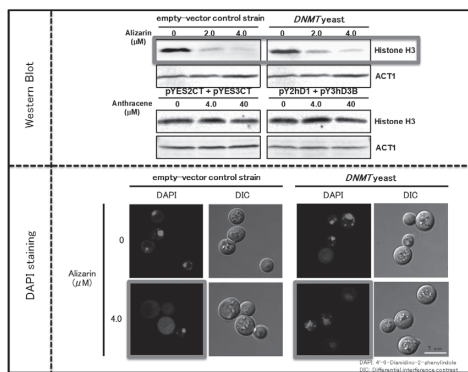


図11 アリザリンが核染色像に及ぼす影響

が明らかとなりました(図11の下段を参照)。

4) 小括

以上の結果をまとめると、①凝集反応とFLO1発現レベルは、発がんプロモーション活性が疑われるアリザリンの濃度依存的に上昇する、②FLO1-GFP活性もアリザリン濃度依存的に上昇する、③アリザリン処理により、Histone H3の減少とDAPI染色による拡散した核染色像が確認される、などの結果が得られました。これらの結果から、酵母凝集性を指標として、アリザリンがエピジェネティック変異原である可能性を指摘できたと考えています。

4. エピジェネティック変異原検出系の将来展望

最後に、われわれが構築したエピジェネティック変異原の検出系のプロトタイプを、今後どのように活用できるか、その可能性について考えていきます。

明治時代の物理学者である寺田寅彦先生は「ものを怖がらな過ぎたり、怖がり過ぎたりするのはやさしいが、正当に怖がることはなかなかむずかしい」という言葉を遺しています。私は、化学物質の安全性を研究している中で、常々「正当に怖がることはなかなかむずかしい」と感じています。今回、われわれが構築したエピジェネティック変異原検出系のプロトタイプが「化学物質を正当に怖がることはなかなかむずかしい」という現状を克服する一助になればと考えています。

1) FLO assayが持つ可能性：化学物質による発がん予測効率の向上

先ほど述べたように、凝集性を用いることで、短時間でエピジェネティック変異原が検出できる可能性があります。凝集試験は約40時間、FLO1のレポーター遺伝子アッセイは約24時間で検出できる結果を得ています。将来的に、仮に動物細胞でエピジェネティック変異原検出系を構築できたとしても、検出に要する時間に関しては動物細胞が示すパフォーマンスを下回ることはないと予測しています。そこで、このたびの受賞を契機に、われわれはこのアッセイ系を“yeast Flocculation Assay(FLO assay)”と命名して、今後も引き続き酵母凝集反応とエピジェネティック変異原の研究を続けていきたいと考えています。

このFLO assayが、化学物質による発がんの予測効率について革新的な向上に寄与できればと考えています。表2は、化学物質を遺伝毒性試験とFLO assayという2つの指標で分類した場合、6種類に分類できることを示しています(表2ではカテゴリーA～Fと表現しています)。現状では、遺伝毒性試験の専門家であっても、遺伝毒性の有無を明確に評価するのがむずかしい化学物質も少なからず存在します。現在、われわれは、そのような化学物質をFLO assayに供することで、発がん性がより精緻な推測ができないか試行しています。発がん性試験には約2年間かかるため、全種類の化学物質を発がん性試験で評価することはできません。そこで、遺伝毒性試験結果が不明瞭な化学物質については、FLO assayの実施によって発がん予測効率と精度を担保できることを期待して、引き続き本研究を継続していくことを考えています。

最近われわれは、かび毒のオクラトキシンAとデオキシニバレノールを用いて、FLO assayの妥当性を検証する研究を行いました。オクラトキシンAとデオキシニバレノールは、いずれも遺伝毒性試験では「±」という結果です。その一方で、国際がん研究機関による発がん性分類では、オクラトキシンAは2B(ヒトに対して発がん性がある可能性がある)、デオキシニバレノールは3(ヒトに対する発がん性について分類できない)と分類されており、オクラト

カテゴリー	A	B	C	D	E	F
遺伝毒性試験	-	-	+	+	±	±
FLO assay	-	+	-	+	-	+
発がん性	-	±	+	++	-	+

表2 化学物質の発がん予測効率の革新的向上

キシシンAはヒトに対する発がんの可能性が指摘されています。デオキシニバレノールはFLO assayにおいては影響を及ぼさないとの結果でしたが、一方オクラトキシシンAは凝集性を抑制する、すなわち「+」(凝集性を抑制)であることが明らかとなりました。この結果は、FLO assayによる発がん性予測の精緻化の可能性を現状否定するものではありません。今後も化学物質の発がん性予測の向上を目指し、研究を続けていきたいと考えています。

2) FLO assay の応用

化学物質によっては、生体内に取り込まれ肝臓で代謝活性化を受けて構造変換された後に変異原活性を示す場合も少なからずあります。

現状では、まだエピジェネティック変異原の検出系は(妥当性があるものとして)確立されていませんが、われわれは一歩先を見据えて「おそらくエピジェネティック変異原についても、代謝活性化を受けて同変異原として作用するケースが存在するだろう」という仮説のもと、FLO assayのエピジェネティック変異原検出能の精緻化をテーマとした研究を進めているところです(図12)。現在、代謝活性化によってエピジェネティック変異原活性を示す環境化学物質の存在を想定し、その証明にチャレンジしています。

前出の表2のカテゴリーB(遺伝毒性が「-」、FLO assayが「+」)に該当する化学物質は、変異原

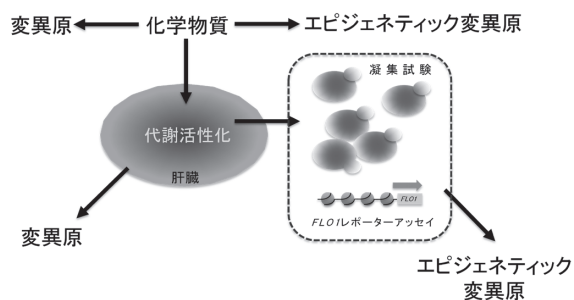


図12 代謝活性化とエピジェネティック変異原

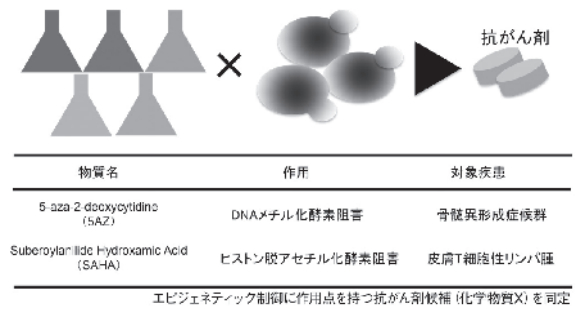


図13 FLO assayの応用例：抗がん剤のスクリーニング

性を憂慮する必要がないと判断可能であることから、そのエピジェネティックな生理作用によってはヒトにとって有益なエピジェネティック活性物質のスクリーニングに使える可能性があります。前出の5-アザ-2'-デオキシシチジン(5AZ)は骨髄異形成症候群の、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるスベロイルアニリドヒドロキサム酸(SAHA)は皮膚T細胞性リンパ腫の治療薬として、すでに利用されているという実例があります。このように、エピジェネティックな変異原は、われわれにとって利用価値の高い薬理作用をもたらす可能性があります。今後も、抗がん剤など薬剤のスクリーニング系としての活用シーンの存在も否定せずに研究を進めていきたいと考えています(図13)。

5. おわりに

本ご紹介した研究は、国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 変異遺伝部 部長の本間正充先生をはじめ、変異遺伝部の皆様、そして日本環境変異原学会の関係者様など、多くの方々のご指導とご支援のもとで行ってまいりました。関係各位の皆様最後に改めて感謝を申し上げます。