

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 大久保 寅彦

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 Studies on Microbial Diversity and Antimicrobial Resistance Genes in Sea Ice and Antarctic Ice Cores  
(海氷および南極アイスコアにおける微生物叢の解析と抗菌薬耐性遺伝子の検出に関する研究)

審査委員

主査教授 田村 豊（獣医衛生学）

副査教授 萩原 克郎（獣医ウイルス学）

副査教授 菊池 直哉（獣医細菌学）

副査准教授 能田 淳（環境衛生学）

## 【学位論文 要旨】

### 海氷および南極アイスコアにおける微生物叢の解析と 抗菌薬耐性遺伝子の検出に関する研究

酪農学園大学大学院 獣医学研究科  
食品衛生学 大久保寅彦

抗菌薬が人医療および獣医療において広く用いられるのに伴い、薬剤耐性菌の出現と増加が公衆衛生学上の問題として世界的に懸念されている。また、薬剤耐性菌がもつ耐性遺伝子は、その多くが非病原性の環境細菌に由来するとみられていることから、現在蔓延している耐性遺伝子は、環境細菌から病原性細菌へと伝達されてから拡散したものと考えられている。これに加えて、合成抗菌薬に対する耐性遺伝子を染色体上にもつ細菌が報告されている点や、永久凍土層や洞窟などの隔離条件下からも耐性菌と耐性遺伝子が検出されている点から、耐性菌と耐性遺伝子は人為的な抗菌薬の使用による選択圧の有無に関わらず、自然環境中に存在しているものと予見されている。

本研究では、上記の仮説を補完しうる知見を収集するため、絶対的抗菌薬非存在環境として南極のアイスコアを選択し、その中に含まれる耐性遺伝子の検出を目標とした。まず第1章では、氷サンプルの安全かつ十分なクリーニング方法を立ち上げるため、南氷洋およびオホーツク海で採材した海氷をサンプルとして、氷の洗浄および氷からのDNA抽出方法を検討した。また、海氷中の細菌叢を16S rDNAに基づく分類で特定し、その構成を両サンプル間で比較した。続いて第2章では、上記のクリーニング方法に基づいて実際の南極アイスコアを処理するとともに、含まれる微生物叢をメタゲノム解析によって網羅的に特定した。第3章では、海氷および南極アイスコア中から薬剤耐性遺伝子の検出を試み、検出した遺伝子について既知の遺伝子との比較を行なった。

第1章における検討の結果、氷サンプルの洗浄方法が開発された。また、海氷に含まれる細菌叢を南氷洋とオホーツク海とで比較したところ、門レベルあるいは綱レベルの広い分類ではおおむね似た傾向を示したが、科レベルや属レベルの詳細な

解析で明確に菌叢が異なることがわかった。また、オホーツク海の海氷はバクテロイデス門の細菌を多く含むことが特徴であった。海氷を対象とする研究は数が少なく、また本実験で用いた採材地域でのサンプリングは過去に行なわれていないため、本研究の結果は海氷や低温環境中での細菌叢の構成に関する新たな知見を加えるものとなった。

第2章では、1,670年前および2,860年前の南極アイスコアについて、細菌および真菌の構成をメタゲノム解析で特定した。グリーンランドなどのアイスコアを対象としたメタゲノム解析の既報と比べ、南極アイスコアのメタゲノム解析では遺伝子のヒット数が大幅に少ないことが特徴であったが、これは南極(ドームふじ基地)が周囲から隔絶された環境にあることが影響したものと考えられた。一方、2,860年前の氷については、*デイノコッカス-テルムス*門の細菌が極端に多く検出された。本菌は極限環境微生物として知られており、ドームふじ基地における南極アイスコア中の微粒子の起源であるオーストラリアの砂漠環境にも分布しうる細菌であることから、これは細菌の付着した微粒子が当該アイスコア中に多量に含まれていた結果であると考えられた。アイスコアを対象としたメタゲノム解析は本研究が初報告であることから、今回得られた南極アイスコア固有の特性が今後の他のアイスコア研究の参考となることが期待される。

第3章においては、南極アイスコアのうち1,400年前の氷(サンプル名DF-63.5)から、*sul2-strA-strB*の耐性遺伝子クラスターを検出することに成功した。この遺伝子群は現代でも非常に広範な種類の細菌が保有していることから、この遺伝子は古くから環境細菌が保有しており、その細菌が南極の氷にトラップされていたことが予想された。また、DF-63.5から得られた遺伝子の塩基配列が現代の当該遺伝子と相同的であったこと、およびこの遺伝子群を組み込んだ形質転換株(大腸菌)が抗菌薬耐性を発現したことから、今回得られた耐性遺伝子群は現代の相同遺伝子と極めて近縁であることが確認された。さらに、耐性遺伝子が単体ではなくクラスターとして検出されたことから、人為的な抗菌薬使用が無い環境においても、薬剤耐性遺伝子がまとまって細菌間を移動していることが考えられた。これらに加え、*sul2*遺伝子が合成抗菌薬であるサルファ剤に対する耐性遺伝子であることから、合成抗菌薬の発明以前にもその耐性遺伝子が存在しうることが改めて示された。

以上の成績から、抗菌薬の非存在下においても薬剤耐性遺伝子が存在することが証明された。これまでに永久凍土層や南極表層の雪などからの耐性菌および耐性遺伝子の検出報告はあるが、南極アイスコアという完全に外界から隔離された環境からの報告は今回が初めてである。抗菌薬耐性菌の出現と蔓延を予見するためには、それらの起源や環境中における動態を明らかにすることが必要であることから、本研究の結果は抗菌薬の選択圧非存在下における耐性遺伝子の存在を証明したものであり、新たな薬剤耐性菌対策の構築に有用な知見を提供した。

## 論文審査の要旨および結果

### 1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

#### <論文の概要について>

##### 研究の背景と目的

抗菌薬が医療および獣医療において広く用いられるのに伴い、薬剤耐性菌の出現と蔓延がヒトの健康に大きく影響し、今や耐性菌は人類に対する最大の脅威と認識されている。現在、WHO等の国際機関をはじめ世界各国で有効な耐性菌対策の策定を模索しているが、未だ決定的な対策は見出されていない。その主な理由は耐性菌あるいは耐性遺伝子のヒトに至る伝播経路が完全に解明されていないことにある。

最近、種々の耐性遺伝子が非病原性の環境細菌から検出されるとの報告がなされており、医療で蔓延している耐性遺伝子は環境細菌から病原性細菌へと伝達されて拡散したものと考えられるようになった。加えて合成抗菌薬に対する耐性遺伝子を染色体に保有する細菌が検出されたり、永久凍土や洞窟からも耐性菌や耐性遺伝子が検出されていることから、抗菌薬の使用による選択圧の有無に係らず自然環境に存在しているものと想定されている。

そこで本研究では、上記の仮説を実証するために、絶対的抗菌薬非暴露環境として南極のアイスコアを選択し、その中に含まれる耐性遺伝子を検出することにより、環境からヒトに至る経路を明らかにすることを目的とした。

##### 研究の成果

本研究では、確実に南極のアイスコアから耐性遺伝子を検出するため、まず第1章ではアイスコアの採取時に起こりうる人為的な汚染から氷サンプルの安全かつ十分なクリーニング方法を確立するため、南氷洋およびオホーツク海で採材した海水をサンプルとして、氷の洗浄法とDNA抽出方法を検討した。また、海水中の細菌叢を16S rDNAに基づく系統分類法で特定し、その構成菌種を比較した。その結果、氷サンプルの洗浄法が新たに開発され、本法を応用して海水サンプルを比較したところ、科や属レベルの詳細な解析で明確に細菌叢が異なることが分かった。また、オホーツク海のサンプルにはバクテロイデス門の細菌を多く含むことが特徴的であった。

次いで第2章では、先のクリーニング法を応用して南極アイスコアを処理し、含まれる微生物叢をメタゲノム解析によって網羅的に特定した。使用した約1,667年前および約2,863年前の南極アイスコアは、グリーンランドなどのアイスコアのメタゲノム解析

成績に比べ、遺伝子のヒット数が大幅に少ないことが特徴的であった。これは南極が周囲から隔離された環境であることが影響したものと考えられた。一方、約 2,863 年前の氷は、*Deinococcus-Thermus* 門の細菌が多く検出された。本菌は極限環境微生物として知られており、南極アイスコア中の微粒子の起源であるオーストラリアの砂漠環境に分布した細菌が付着した微粒子が、南極のアイスコアに含まれた結果と考えられた。

最後に第 3 章では、南極アイスコアの内、約 1,405 年前の氷から、医療や獣医療でしばしば検出される *sul2-strA-strB* の耐性遺伝子クラスターを検出することに成功した。この耐性遺伝子は古くから環境細菌が保有しており、その細菌が南極の氷にトラップされていたことが予想された。また、今回得られた耐性遺伝子の塩基配列が現在の当該遺伝子と相同的であったこと、およびこの遺伝子群を組み込んだ形質転換株が抗菌薬耐性を発現したことから、今回得られた遺伝子群は現在の相同遺伝子と極めて近縁であることが確認された。さらに耐性遺伝子がクラスターとして検出されたことから、人為的な抗菌薬使用の無い環境においても、耐性遺伝子がまとまって細菌間を移動していることが考えられた。さらに *sul2* 遺伝子が合成抗菌薬であるサルファ剤に対する耐性遺伝子であることから、合成抗菌薬の使用以前にすでに耐性遺伝子が存在することを示した。

#### <研究の評価>

本研究は、抗菌薬の曝露が全く考えられない古代の南極アイスコアを用いて、現代の医療や獣医療で蔓延する耐性遺伝子を検出したものである。この結論を導くために氷サンプルのクリーニング法を開発し、得られたサンプルを用いて構成菌種をメタゲノム解析により極めてユニークな細菌叢で構成されることを明らかにした。これらの結論は用意周到に準備された実験を積み重ねることによって導き出されたものであった。本研究は、医療で脅威となっている耐性菌対策として医療や獣医療での抗菌薬の規制措置では不十分であり、環境を介した系を含めた生態系全体を俯瞰した対策の必要性を示した点で高い評価を与えることができる。また、これまで耐性遺伝子の由来として、抗生物質については抗生物質産生菌の染色体上の自らを防御するための遺伝子とされてきたが、人類が創造した合成抗菌薬については不明な点が多かった。今回の成績から合成抗菌薬も抗生物質と同様に、その開発以前から存在することを示した点は、科学上極めて重要な知見を提供した。

以上のことから、本研究は医学や獣医学のみならず科学の発展に寄与する内容を有するものであり、よって申請者である大久保寅彦氏は、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員4名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2015年 2月17日

### 審査員

主査	教授	田村	豊
副査	教授	萩原	克郎
副査	教授	菊池	直哉
副査	准教授	能田	淳