

**家畜由来薬剤耐性菌の  
水圏・土壌環境を介した  
野菜汚染及びヒトへの伝播に関する研究**

**酪農学園大学獣医学群**

**食品衛生学ユニット**

**臼井 優**

# 本日の話題

- **動物由来薬剤耐性菌の食品を介した伝播**
- **耐性菌が野菜へ伝播する量の解明**
- **土壌に分布する耐性菌が野菜へ伝播するかの解明**
- **動物-環境-野菜-ヒトでの耐性遺伝子伝播の可能性**

# 本日の話題

- **動物由来薬剤耐性菌の食品を介した伝播**
- 耐性菌が野菜へ伝播する量の解明
- 土壌に分布する耐性菌が野菜へ伝播するかの解明
- 動物-環境-野菜-ヒトでの耐性遺伝子伝播の可能性

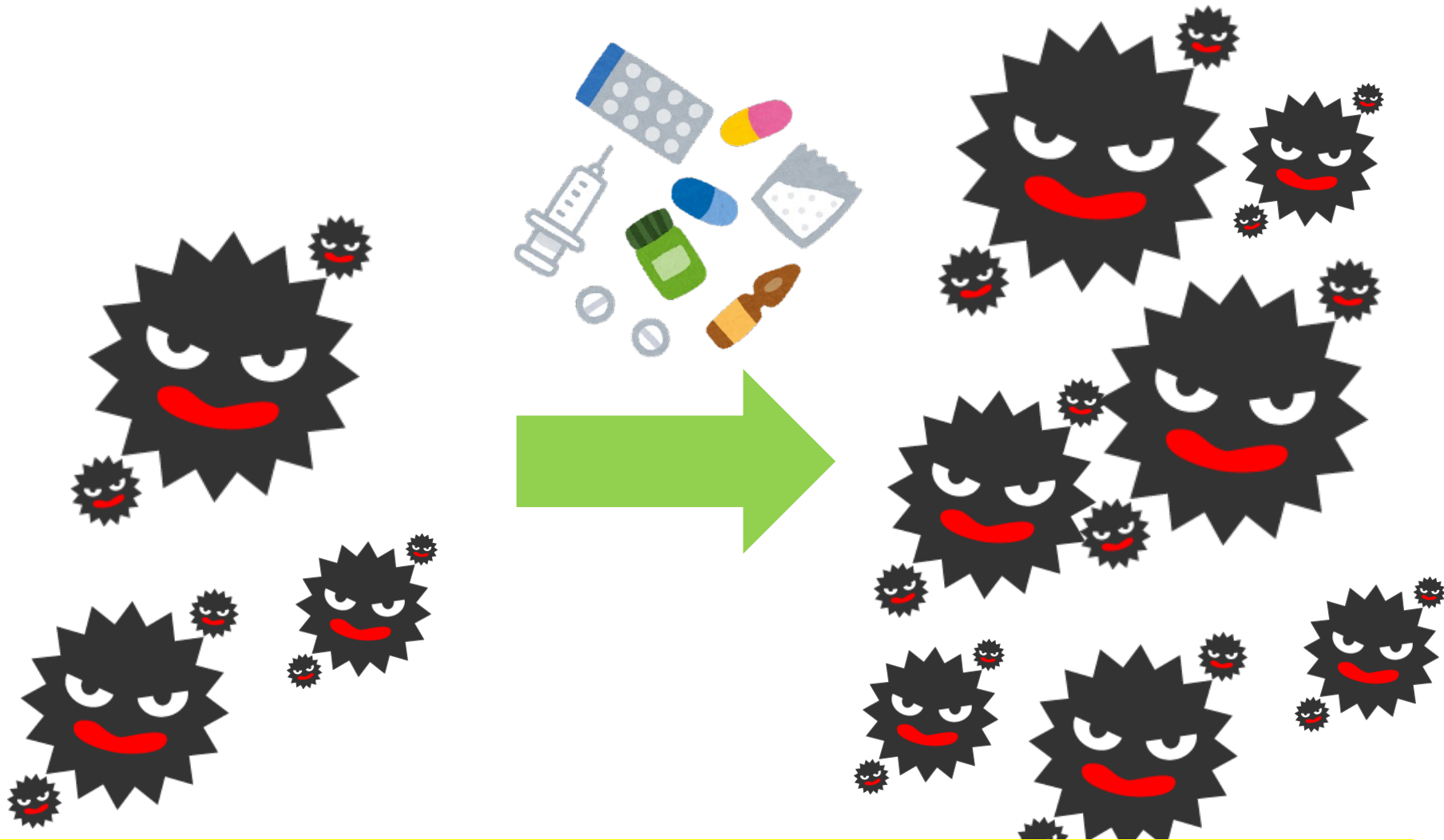
# 抗菌薬とは？



細菌を壊したり、増えることを防ぐ薬

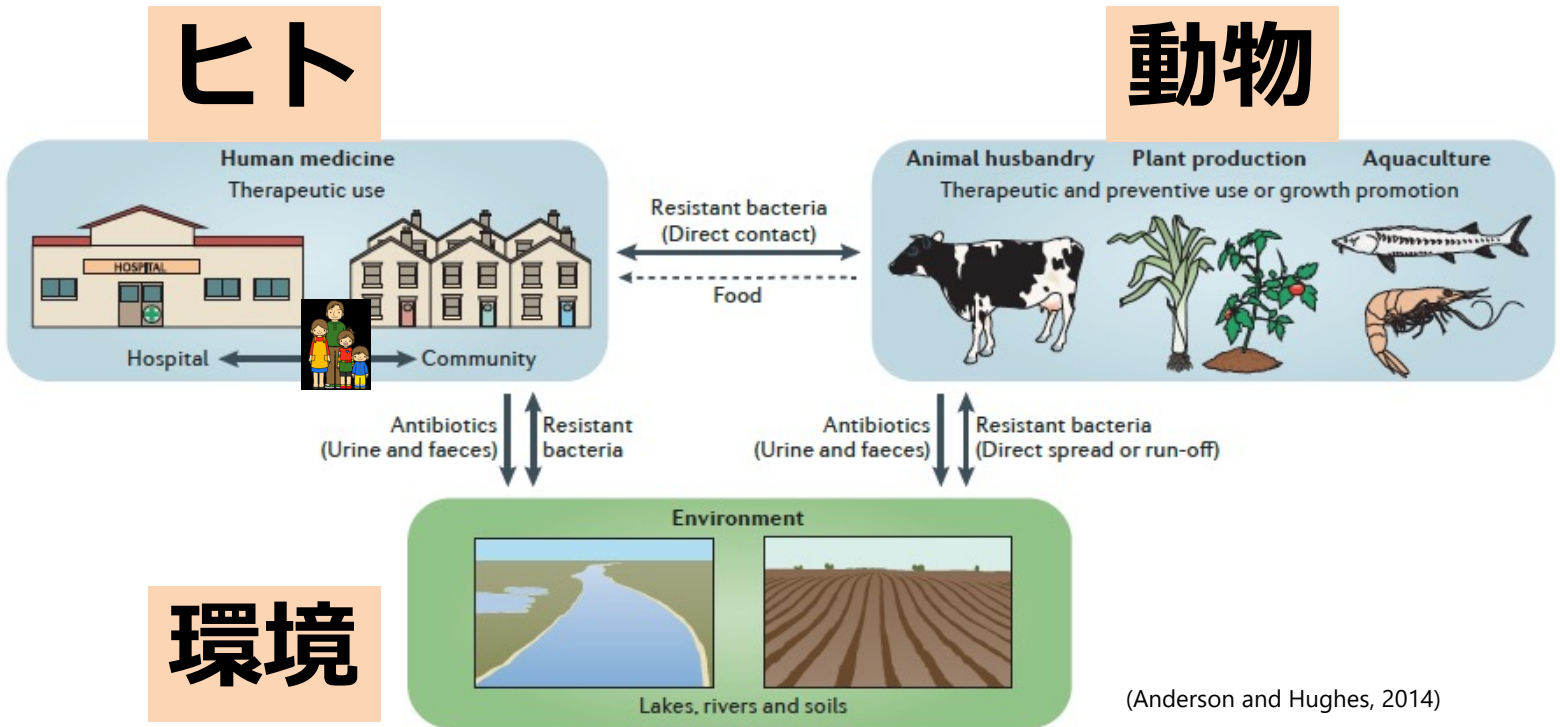
ただし、ウイルスには無効

# 耐性菌とは？



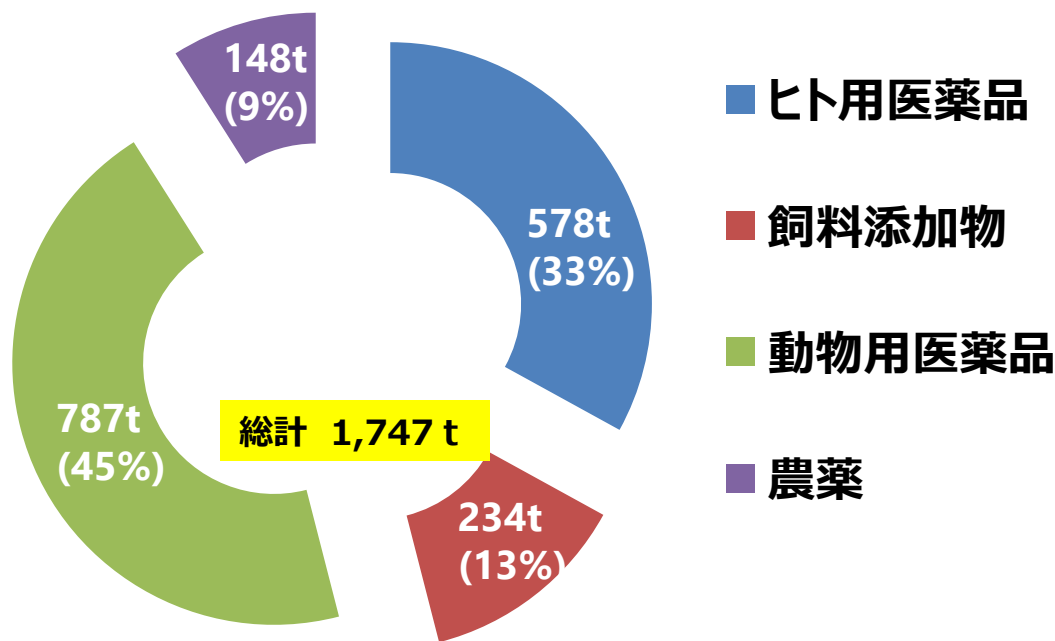
**抗菌薬があっても増殖をするようになった細菌**

# One Health



抗菌薬は、ヒトの医療だけでなく  
他のフィールドでも使用  
耐性菌がヒトへ伝播する可能性が懸念

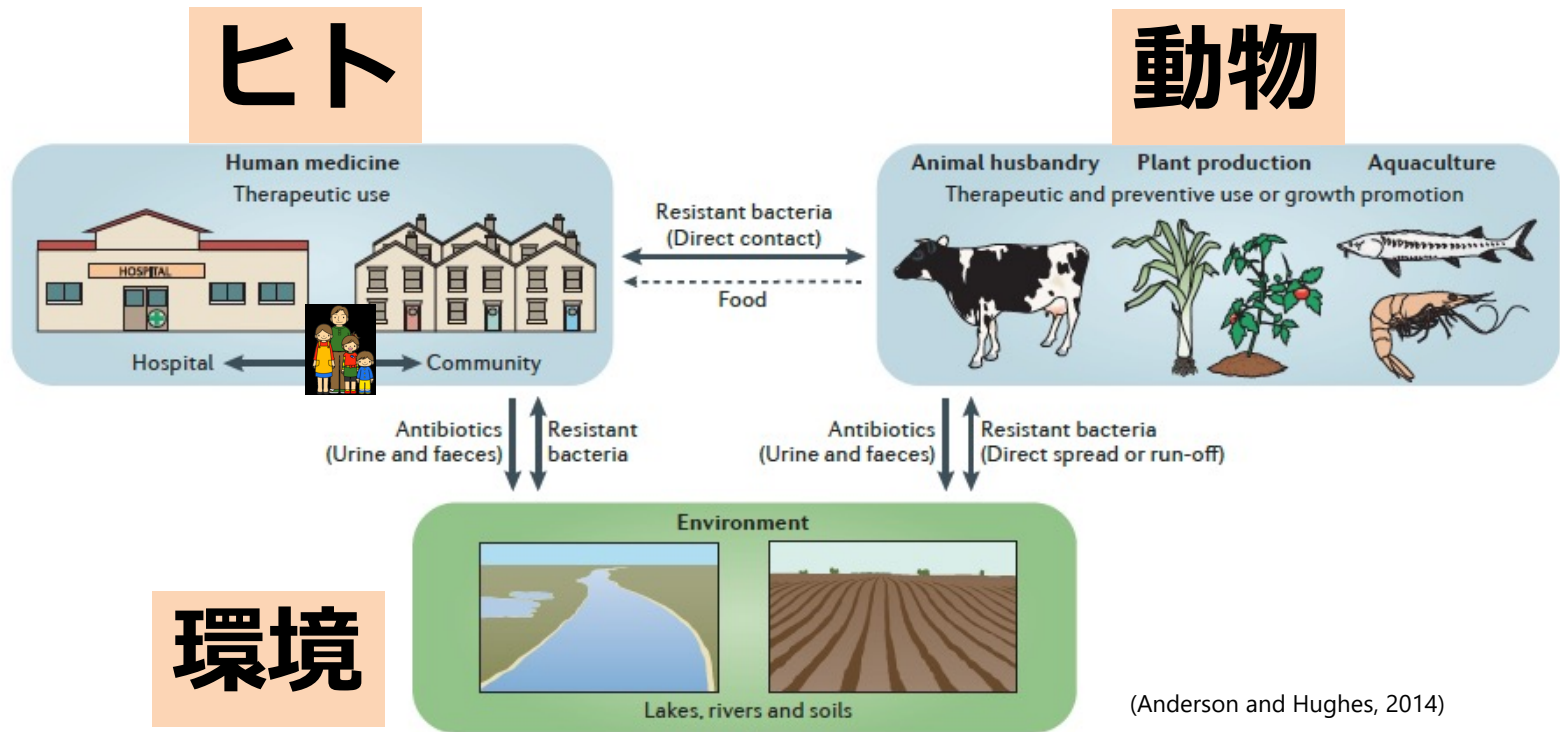
# 抗菌薬の販売量(2011年)



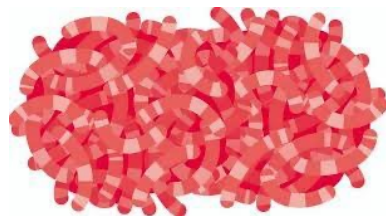
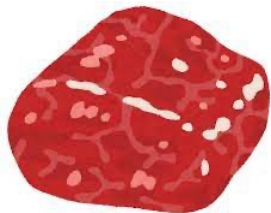
平成28年度感染症危機管理研修会資料を改変

ヒト医療上重要な抗菌薬の使用割合は少ないが  
動物への使用量がヒトよりも多い

# 動物由来細菌のヒトへの伝播

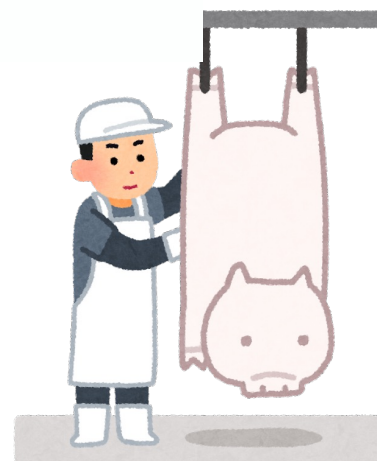
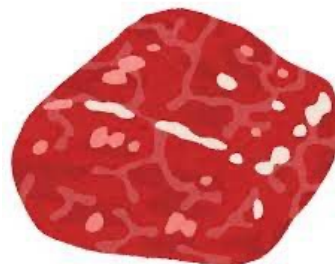
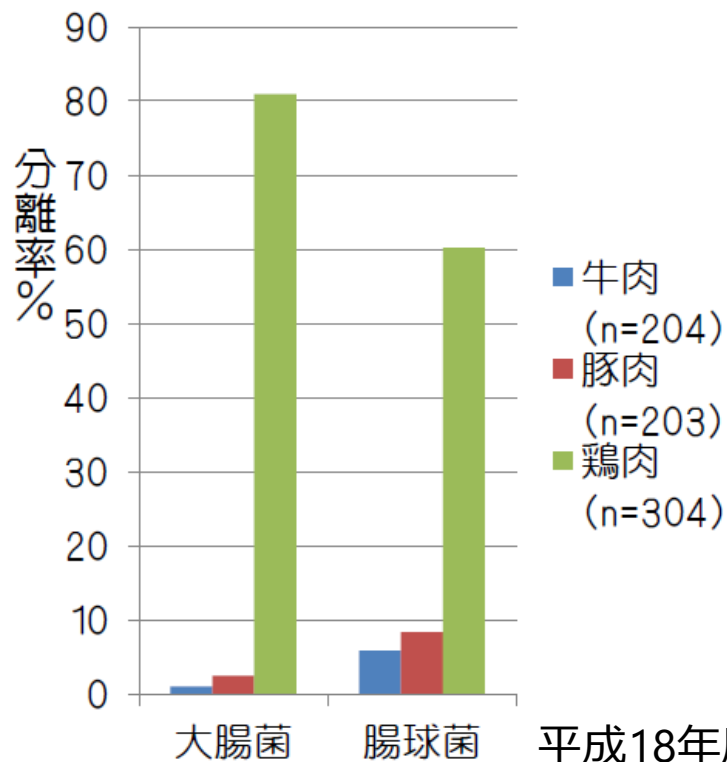


**食品を介した伝播が想定**





# 市販肉からの大腸菌、腸球菌分離率



\*イメージイラスト

## 鶏肉由来大腸菌の耐性率

テトラサイクリン, 49%

ストレプトマイシン, 47%

アンピシリン, 42.4%

ワンヘルス動向調査より

**肉の処理工程において、  
動物由来細菌が食肉を汚染  
することがある**

# 野菜・果物の細菌汚染状況

## 市販野菜（厚生労働省調査）

野菜の種類	2016-2018の試験数	大腸菌陽性率(%)
アルファルファ	18	50
カイワレ大根	92	9.8
カット野菜	229	8.7
キュウリ	129	7.6
みつば	52	38.5
もやし	63	39.7
レタス	109	9.2
漬物野菜	9	0

## 収穫直後の野菜（農林水産省調査:2007.2008）

野菜の種類	検体数	大腸菌陽性率(%)
レタス	420	3.3
キャベツ	425	0.2
トマト	499	0.6
キュウリ	682	4

国内の野菜も低率ではあるが腸管由来細菌に汚染

# 野菜の細菌汚染菌量

- レタス、キュウリなどは一般生菌数、大腸菌群数が多い

1gあたり、1万程度の大腸菌群数

\* 必ずしも食中毒を起こすわけではない

\* 食中毒を起こすのは、食中毒菌が付着した場合

# 市販野菜の薬剤耐性菌汚染状況

- 東京都の市販野菜調査

8.3%(29/350)の生野菜、5.4%(12/223)の漬物からセファロスポリン系耐性大腸菌群が分離

(加藤ら, 2016)

- 広島での調査

カルバペネマーゼ産生 *Klebsiella*, *Acinetobacter* 属菌がパセリ、ベビーリーフから分離

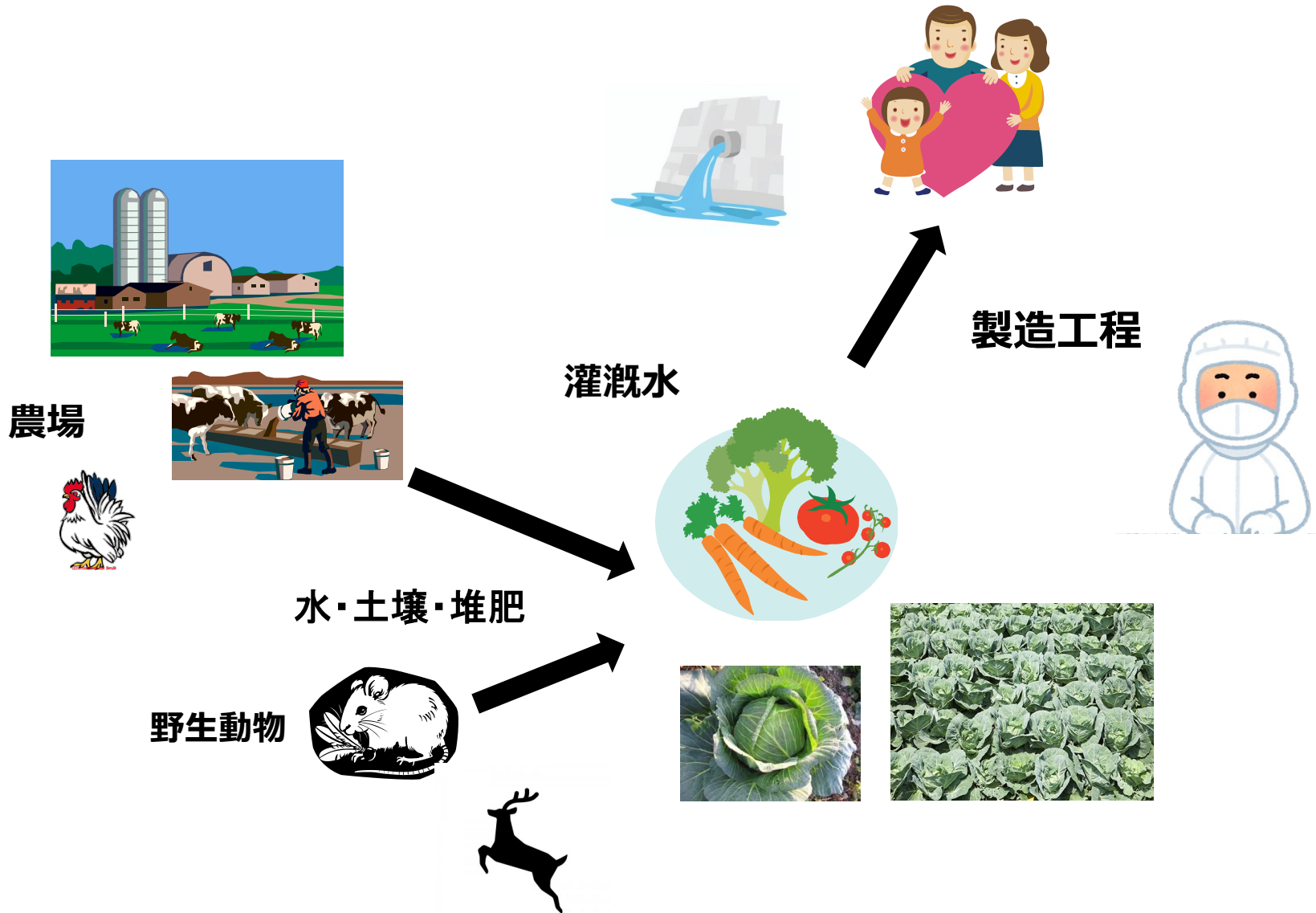
(Shimamoto et al., 2021)

\*セファロスポリン系抗菌薬、カルバペネム系抗菌薬は、ヒトの医療上、特に重要な抗菌薬



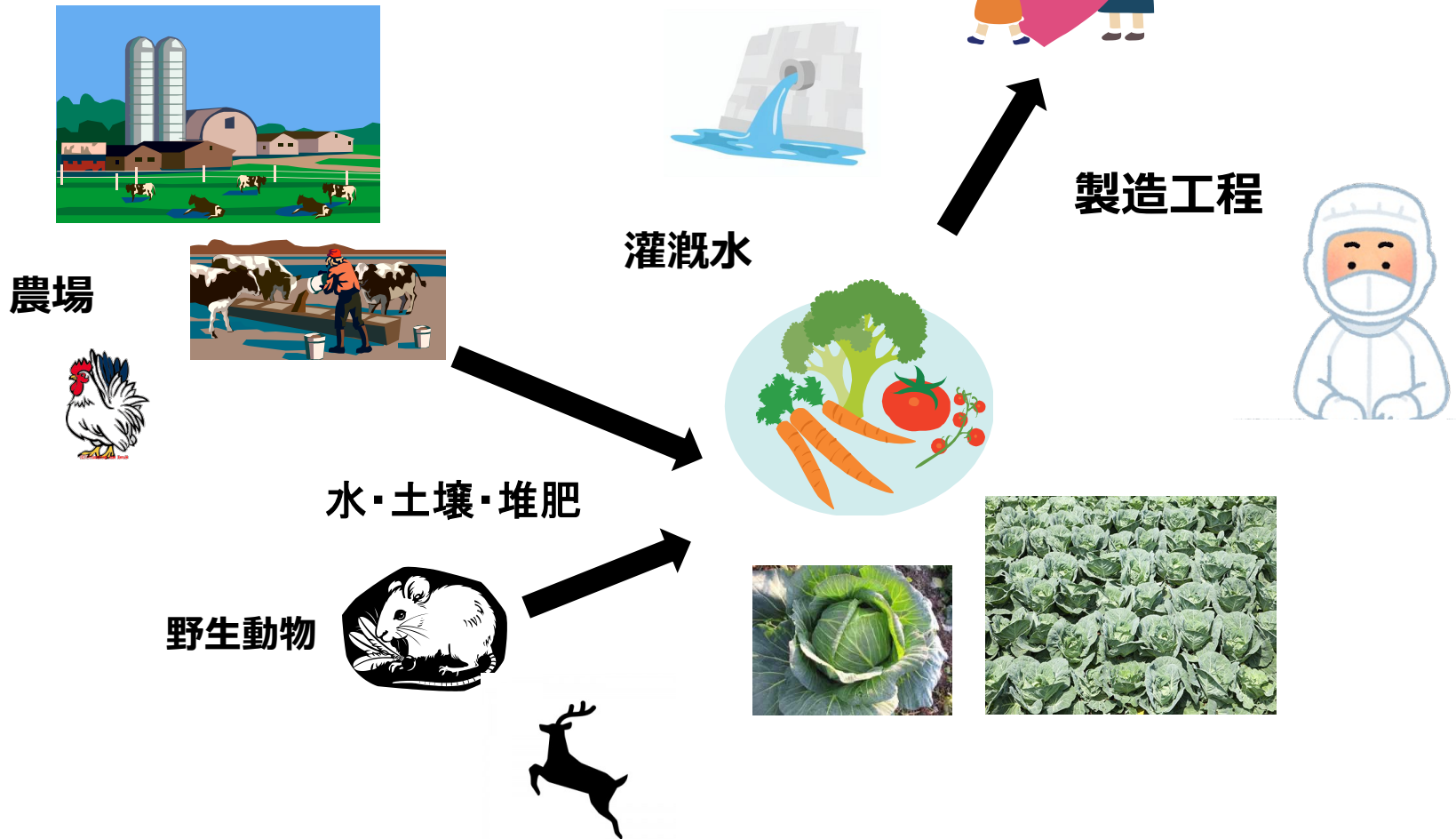
市販野菜も、低率であるが薬剤耐性菌に汚染

# 野菜を汚染するのは??



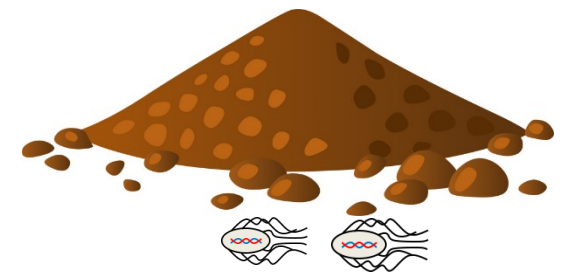
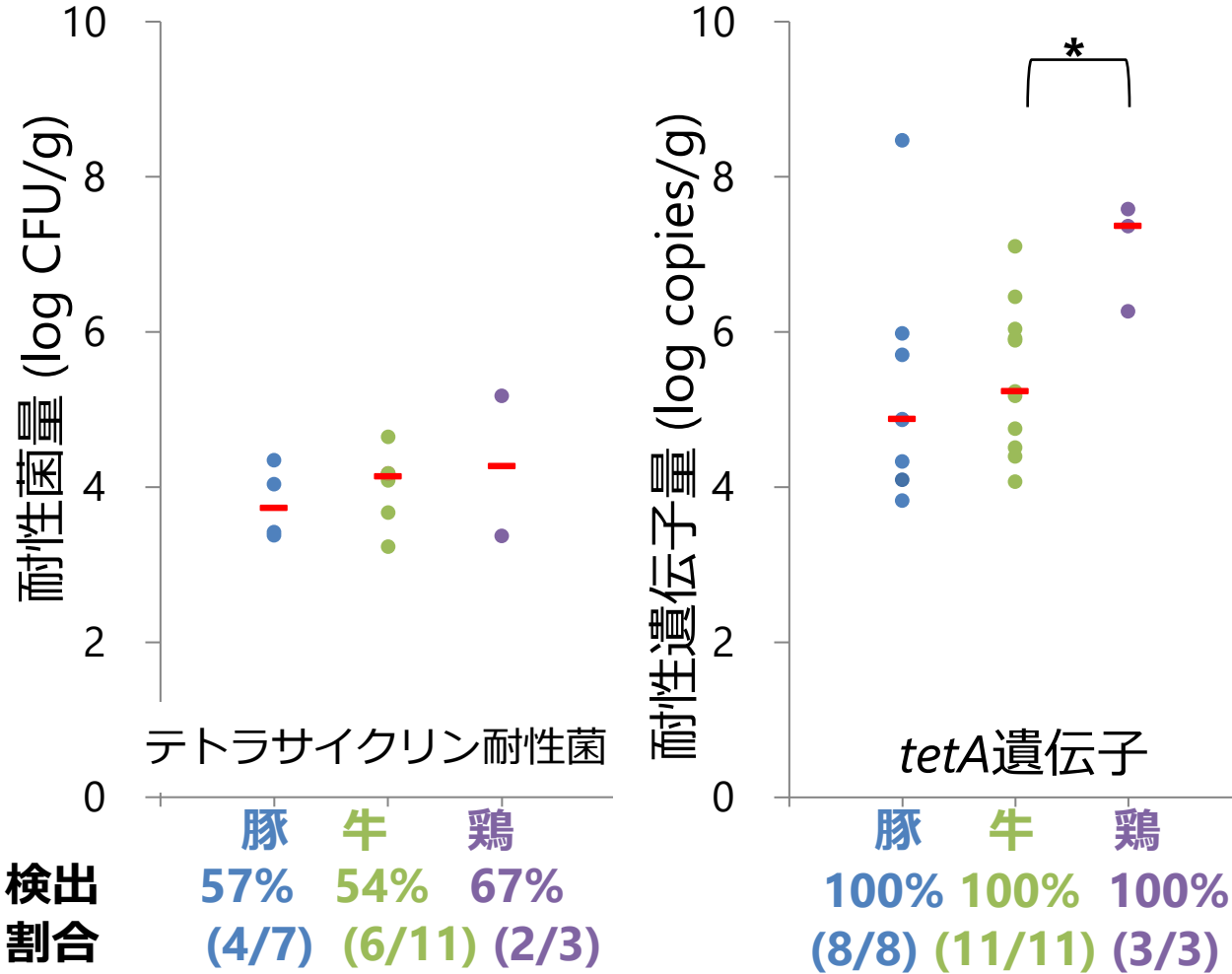
# 野菜を汚染するのは??

国内の野生動物の薬剤耐性率は低い  
動物での抗菌薬使用量が多い  
堆肥に注目



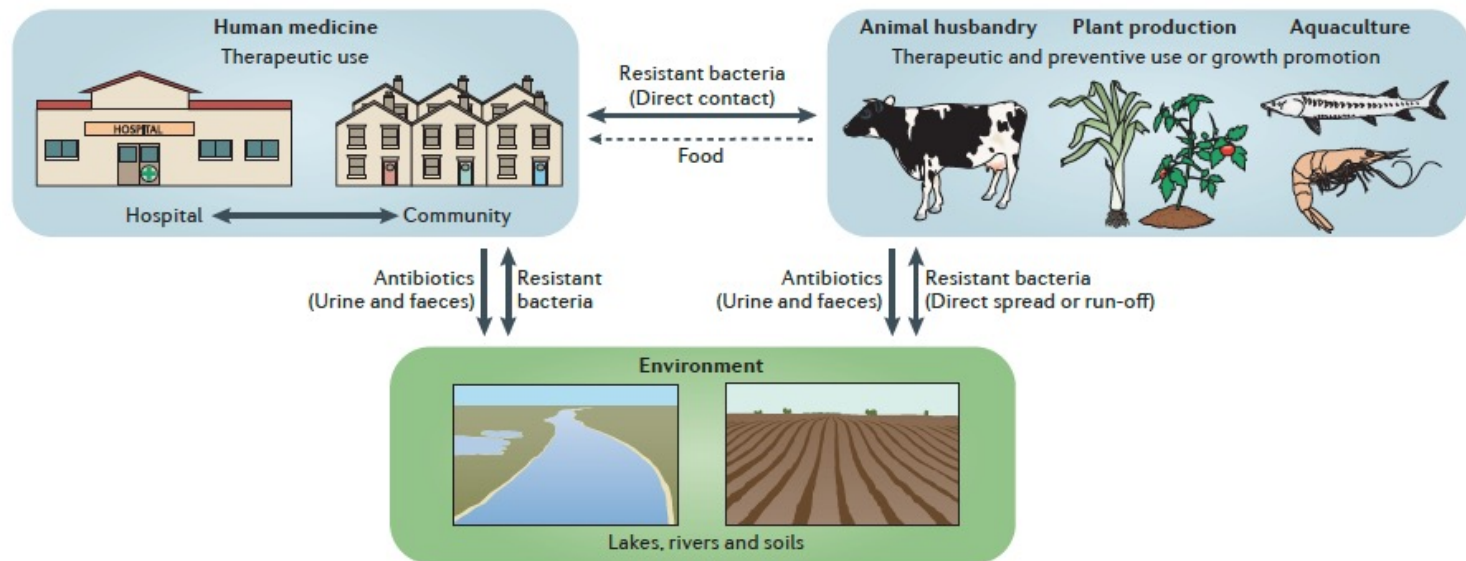
# 堆肥からの耐性菌/耐性遺伝子の検出

## 国内の農場堆肥の現状 (野外農場からサンプリング)



Yoshizawa, Usui et al., 2020.

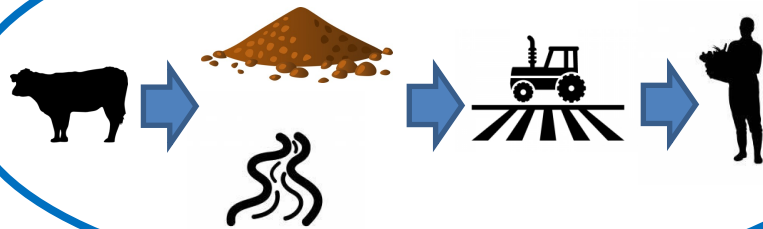
**堆肥中に、耐性菌/耐性遺伝子が存在**



- **家畜由来薬剤耐性菌を含む堆肥は圃場へ散布**
- **野菜は生で喫食することも多く、ヒトへの耐性菌伝播のリスクが高い**



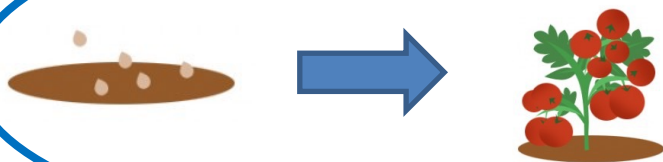
a. 農場において家畜由来薬剤耐性菌が野菜へ伝播する量の解明



それぞれのステージで耐性菌量を測定  
1つの農場内で実施  
(薬剤耐性菌量のトレースが可能!)

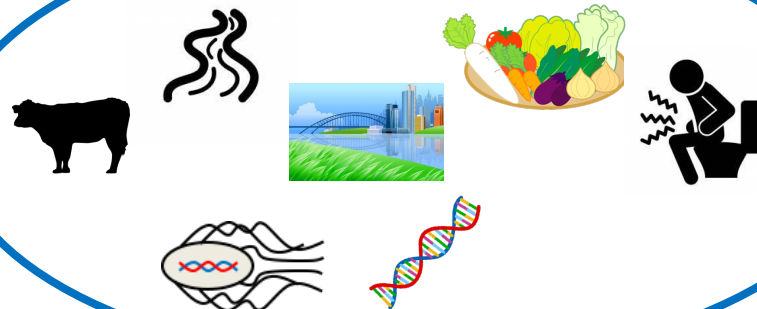


b. 土壌に分布する薬剤耐性菌が野菜へ伝播する量および機序の解明



土壌および栽培する野菜から耐性菌量を定量  
(土壌から野菜へどの程度耐性菌が移行するかを明らかにする)

c. 動物、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析



耐性菌、耐性遺伝子を比較解析  
(薬剤耐性遺伝子の性質からヒトや野菜が保有する耐性遺伝子の由来を明らかに!)

分離菌株に対する  
包括的なゲノム解析(NGS)

家畜由来薬剤耐性菌の野菜への伝播  
に関する定量的リスク評価

**家畜由来薬剤耐性菌が、水圏・土壌から野菜等を介してヒトへ伝播しているか、伝播経路も含めてそのリスクについて検証**

# 本日の話題

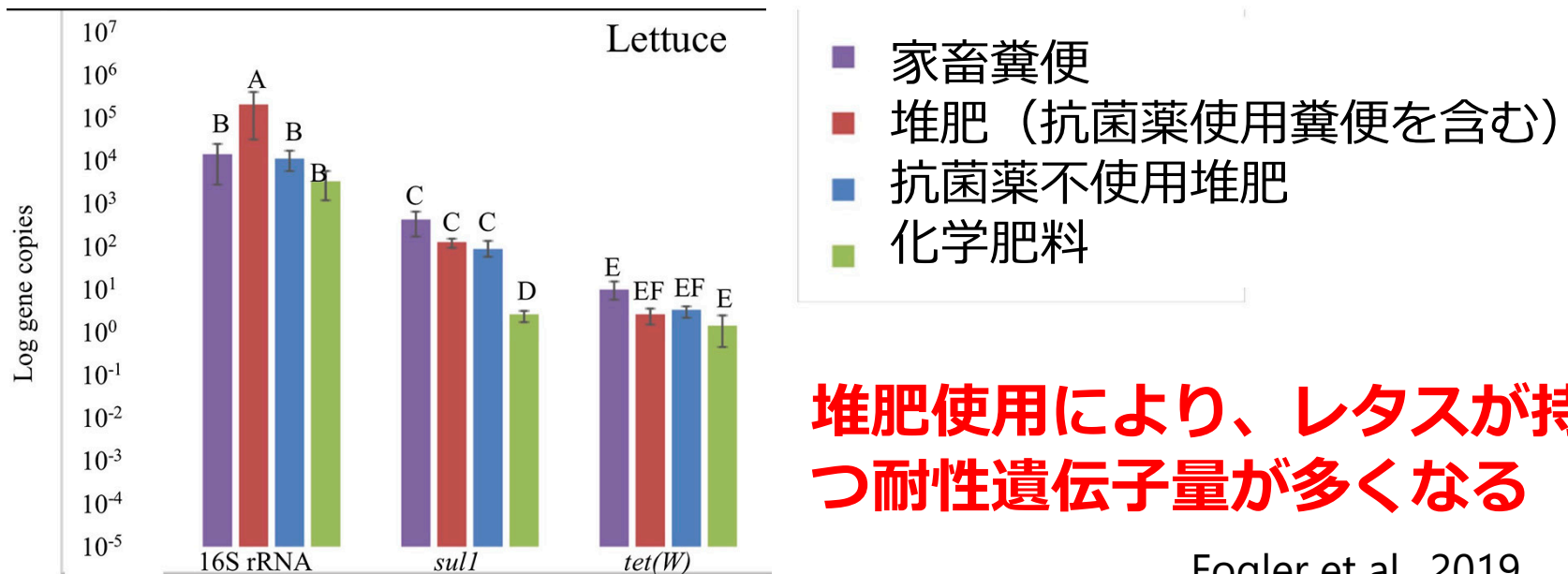
- 動物由来薬剤耐性菌の食品を介した伝播
- **耐性菌が野菜へ伝播する量の解明**
- 土壌に分布する耐性菌が野菜へ伝播するかの解明
- 動物-環境-野菜-ヒトでの耐性遺伝子伝播の可能性

# 堆肥の薬剤耐性への影響

- 農林水産省の調査より

堆肥使用ときゅうりからの大腸菌検出に関連

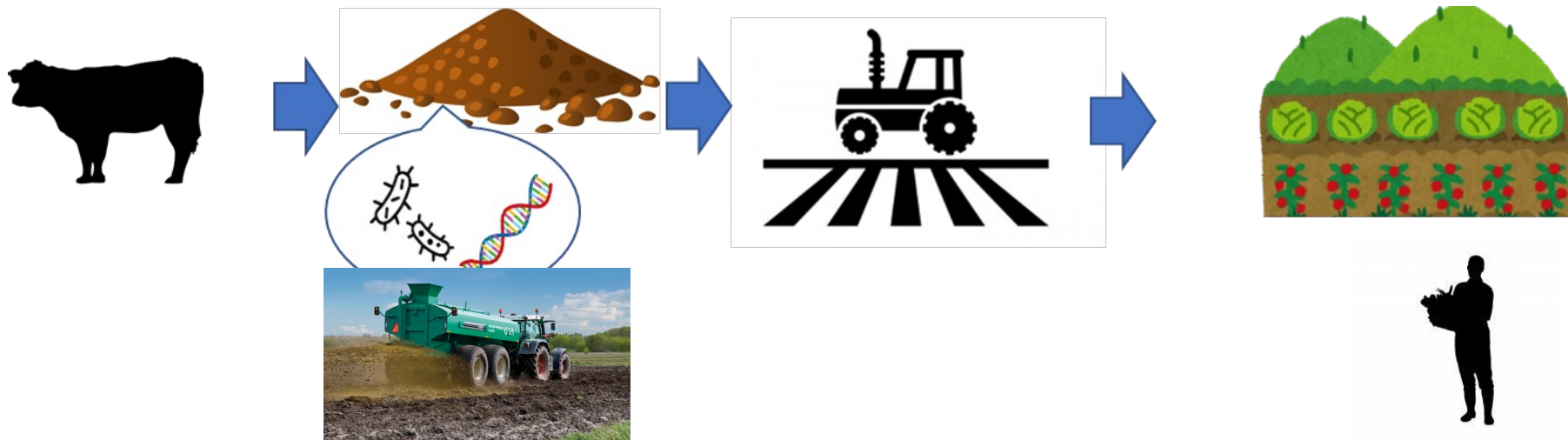
- レタスが保有する耐性遺伝子量



堆肥使用により、レタスが持つ耐性遺伝子量が多くなる

Fogler et al., 2019

# 農場からの薬剤耐性菌が野菜へ伝播する量の解明

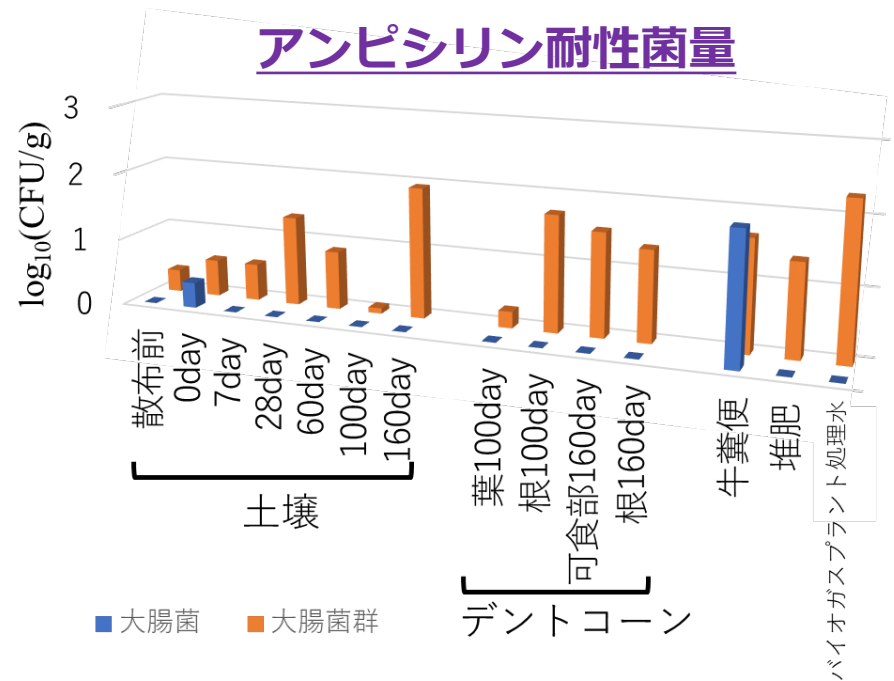
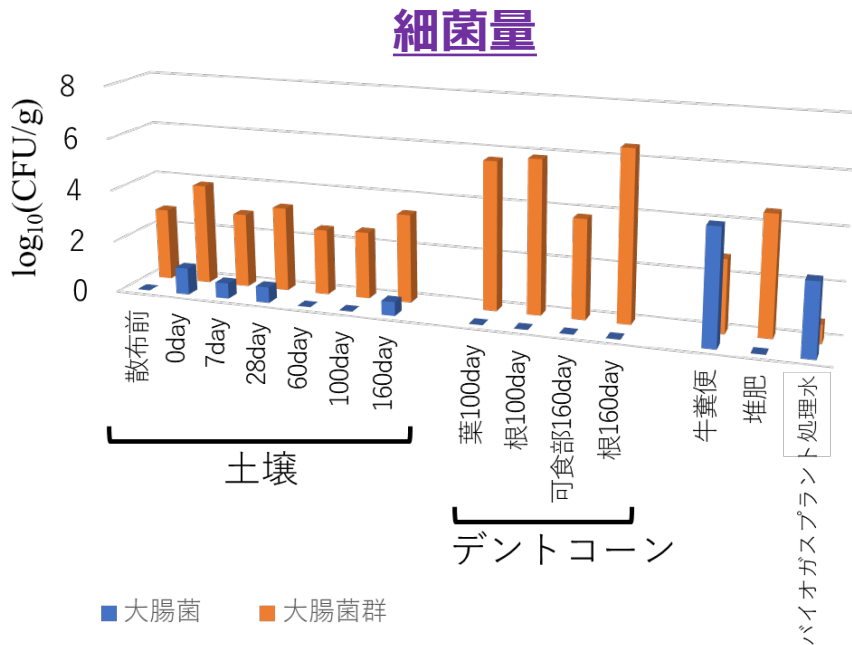


牛、堆肥、排水、畜産廃棄物散布土壌、散布土壌で栽培された野菜からサンプリング

耐性菌量、耐性遺伝子量、分離細菌の詳細な性状解析を実施

動物由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子が、土壌/作物まで伝播している量を解明

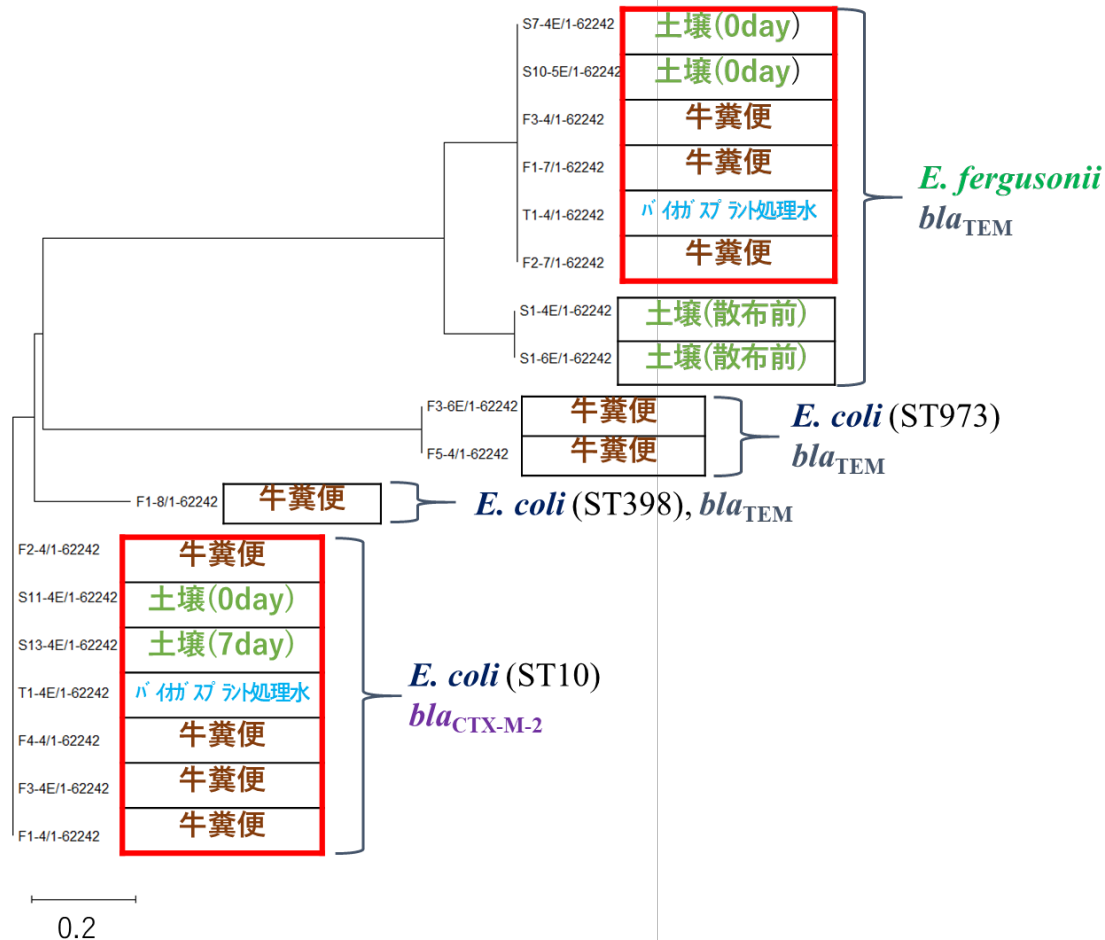
# 定量結果



**散布直後の土壌で、大腸菌群の菌数が増える**  
**ただし、しっかり堆肥化されていれば大腸菌の伝播はほとんどない**

**散布後、菌数は徐々に減少**  
**デントコーンにも大腸菌群が存在**

# bla遺伝子保有アンピシリン耐性株(NGS解析)



**家畜由来糞便から土壌への耐性遺伝子の伝播が示唆**  
(ただし、時間と共に減少し、1週間程度で消失。  
また、作物から同一の耐性株は、検出されていない)

# 本日の話題

- 動物由来薬剤耐性菌の食品を介した伝播
- 耐性菌が野菜へ伝播する量の解明
- **土壌に分布する耐性菌が野菜へ伝播するかの解明**
- 動物-環境-野菜-ヒトでの耐性遺伝子伝播の可能性

# 土壌に分布する薬剤耐性菌が 野菜へ伝播する？

Environment International 130 (2019) 104912



Contents lists available at ScienceDirect

Environment International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envint](http://www.elsevier.com/locate/envint)



Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes



Yu-Jing Zhang<sup>a</sup>, Hang-Wei Hu<sup>a,\*</sup>, Qing-Lin Chen<sup>a</sup>, Brajesh K. Singh<sup>b,c</sup>, Hui Yan<sup>d</sup>, Deli Chen<sup>a</sup>, Ji-Zheng He<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Faculty of Veterinary and Agricultural Science, The University of Melbourne, Parkville, VIC 3010, Australia

<sup>b</sup> Hawkesbury Institute for the Environment, Western Sydney University, Penrith, NSW 2751, Australia

<sup>c</sup> Global Centre for Land-Based Innovation, Western Sydney University, Penrith, NSW 2751, Australia

<sup>d</sup> College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China



土壌の耐性菌/耐性遺伝子が野菜の外部および内部から野菜を汚染する可能性



# 土壤に分布する薬剤耐性菌が、野菜へ伝播する量およびその機序の解明

葉物（小松菜）、レタス、ミニトマトをモデル



家畜由来第3世代セファロスポリン耐性菌（大腸菌、*Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*）菌液を土壤添加



・添加1、2、3、6、10日後に葉または実をサンプルとして収穫し、菌量を測定

## 小松菜の結果



菌種 (株名)	接種菌量	1日後	2日後	3日後	6日後	10日後
<i>E. cloacae</i> (TMICEX6)	$5.2 \times 10^{10}$	-	2200個	200個	400個	-
<i>K. pneumoniae</i> (TMICEX23)	$7.8 \times 10^{10}$	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (TMICEX24)	$6.8 \times 10^{10}$	-	2000個	-	-	-
培養土中の菌量 ( <i>E. coli</i> TMICEX24)	$6.8 \times 10^{10}$	$2.1 \times 10^8$	$1.2 \times 10^8$	$4.5 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$	$2.2 \times 10^6$

高濃度の薬剤耐性菌を土壤に添加した場合、一部の葉物野菜から細菌が検出

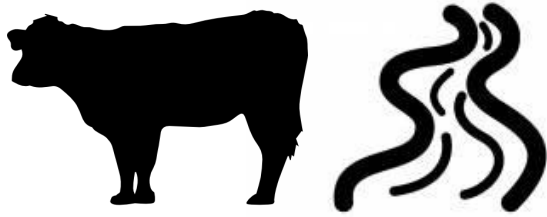
ミニトマトからは検出されず

\*継時的に減少、菌種や野菜の種類による違いがある

# 本日の話題

- 動物由来薬剤耐性菌の食品を介した伝播
- 耐性菌が野菜へ伝播する量の解明
- 土壌に分布する耐性菌が野菜へ伝播するかの解明
- **動物-環境-野菜-ヒトでの耐性遺伝子伝播の可能性**

# 動物、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析



薬剤耐性遺伝子の性質からヒトや野菜が保有する耐性遺伝子の由来を明らかにする。

\*アンピシリン耐性菌に着目

# 野菜からの分離結果


- 市販200サンプルの野菜
- 1142株を分離
- 大腸菌は、5サンプルから11株分離（**大腸菌分離率は2.5%**）
- 大腸菌以外から $bla_{\text{CTX-M}}$ 遺伝子が検出
- **日本の市販野菜の大腸菌汚染率は低い**

# アンピシリン耐性菌収集結果

(一部抜粋)

合計739株のアンピシリン耐性菌

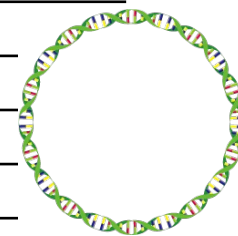
## bla遺伝子型別

由来	株数	TEM	SHV	CTX-M1	CTX-M9
 牛糞便、畜産廃棄物、 土壌（附属農場）	18	11	ND	ND	7
牛糞便、畜産廃棄物、 土壌（別海）	15	10	ND	5	ND
健康牛直腸便	86	72	1	1	1
病畜（牛）	45	40	1	2	5
健康豚直腸便	116	112	0	0	3
養豚場排水	25	25	ND	ND	ND
食鳥処理場排水	6	6	ND	ND	ND
と畜場排水	6	6	ND	ND	ND
酪農場排水	14	11	ND	3	ND
下水処理施設	55	22	4	19	19
市販野菜*	148	19	5	76	76
ヒトの臨床例	205	121	1	10	48

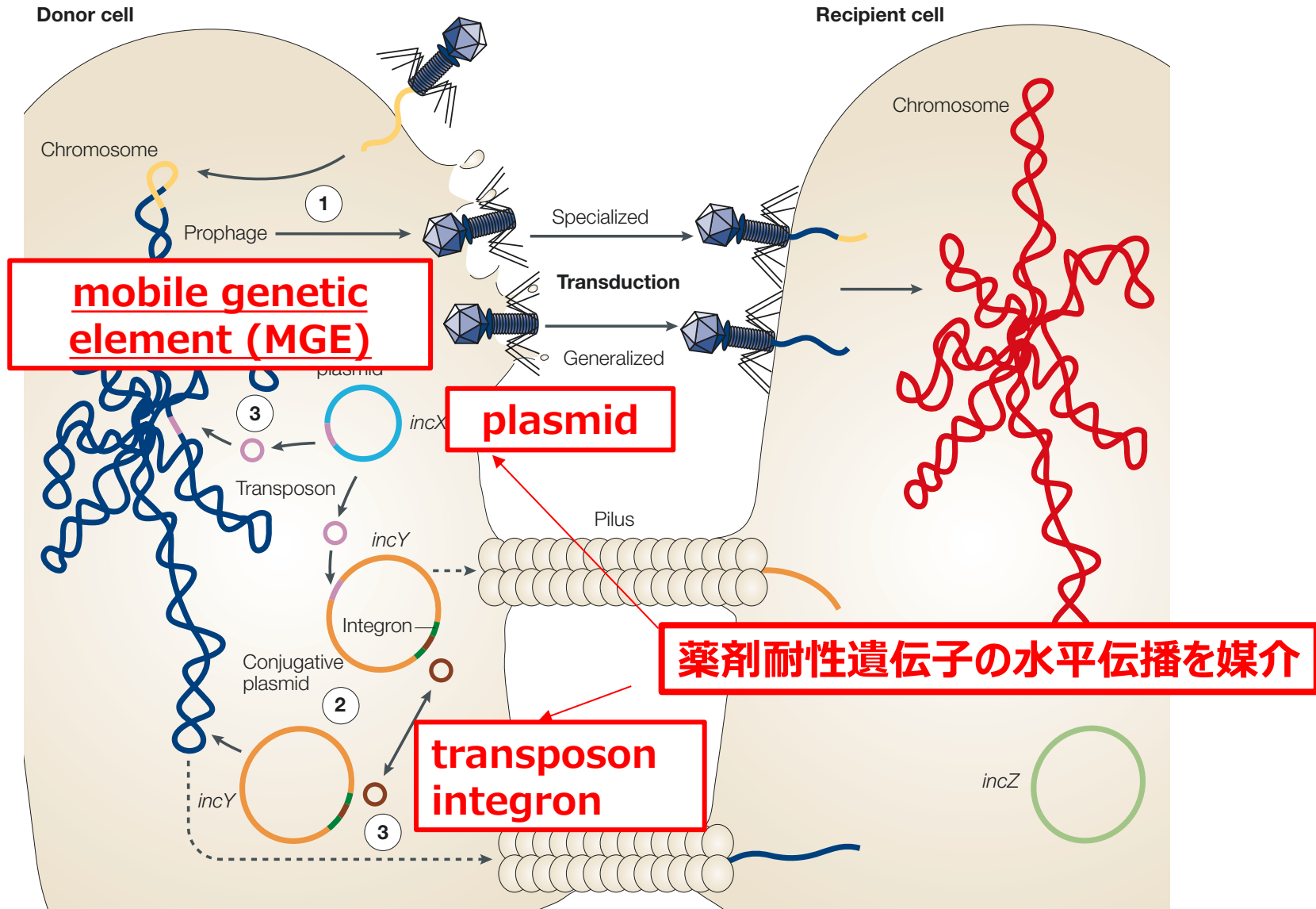
Phylogenetic groupは多様

TEM陽性株について、全ゲノム解析(TEM保有プラスミドにフォーカス)

**ヒトや野菜が保有する耐性遺伝子周辺構造の由来を明らかに！**



# 細菌における薬剤耐性遺伝子の水平伝播



# ドラフトゲノム配列で $bla_{TEM-1}$ を含む contig (332個) を解析



MGEが検出できた  
contig: 211個/332個  
(MobileElementFinder : identity  $\geq 90\%$ , coverage  $\geq 60\%$ )

e.g. **IS26 : 47個**

**IS30 : 5個**

**IS5075: 23個**

**Tn2: 118個**

**Tn10: 5個**

**Tn1000: 6個**

**Tn1721: 6個**

**Tn4656: 7個**

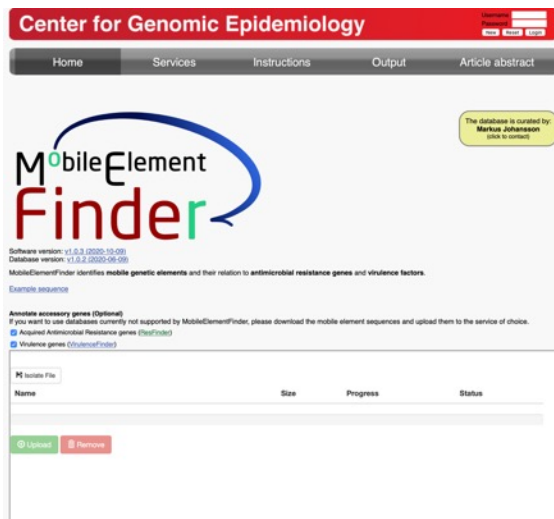
**Tn1000: 6個**

**ISEc37: 5個**

**ISKpn19 : 4個**

**ISVsa3: 5個**

**ISVsa5: 7個**



-> **IS26陽性株の詳細な解析**



# IS26 & *bla*<sub>TEM-1</sub> 両陽性大腸菌株の遺伝型 (47株)

Source



Source	Isolate	Species	HLST	Group	contig	ABC	MGE	Plasmid replicon	Length
NVAL	DB36	ecoli	744	A	DB36_contig00063	aadA5, aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, catA1, dfrA17, mph(A), qacE, sul1, sul2	IS26, IS26, IS26, IS6100, Tn6205	IncQ1	24,950
NVAL	P114	ecoli	10	A	P114_contig00194	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA8, sul2	IS26, Tn6205	None	8,484
NVAL	P4	ecoli	10	A	P4_contig00143	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA14, sul2	IS26, IS5075, Tn6205	None	11,144
NVAL	PS4	ecoli	1244	A	PS4_contig00105	blaTEM-1B, flrR	IS26, IS903	None	9,155
GU	PFABPC11	ecoli	542	A	PFABPC11_contig00048	blaTEM-1B, sul3	IS26, IS26, Tn2	None	17,310
RGU	163	ecoli	937	B1	163_contig00037	blaTEM-1D	IS26	None	41,843
NVAL	836	ecoli	642	B1	836_contig00182	blaTEM-1B	IS26	None	1,935
NVAL	849	ecoli	164	B1	849_contig00079	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1A, flrR, sul2, tet(A)	IS26, ISVna3, Tn1000, Tn6205	None	17,857
NVAL	863	ecoli	164	B1	863_contig00072	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1A, sul2, tet(A)	IS26, Tn1000, Tn6205	None	15,818
NVAL	866	ecoli	164	B1	866_contig00080	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1A, flrR, sul2, tet(A)	IS26, ISVna3, Tn1000, Tn6205	None	17,938
NVAL	B7	ecoli	58	B1	B7_contig00188	blaTEM-1B	IS26, Tn2	None	6,396
NVAL	881	ecoli	1704	B1	881_contig00112	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1A, sul2, tet(A)	IS26, Tn1000, Tn6205	None	13,541
HU	CE-1-2	ecoli	4623	B1	CE-1-2_contig00047	blaAP-2, blaTEM-1B, qnrS1, tet(A)	IS26, IS30, ISKpn19	None	30,345
NVAL	DB26	ecoli	56	B1	DB26_contig00101	blaTEM-1B, dfrA17	IS26, Tn2	None	13,946
NVAL	DB37	ecoli	101	B1	DB37_contig00033	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, sul2, tet(A)	IS26, IS26, IS5075, Tn6205	IncFIA, IncFIC(FII)	43,168
NVAL	DB38	ecoli	224	B1	DB38_contig00114	aac(3)-IId, blaTEM-1B	IS26	None	3,297
NVAL	DB42	ecoli	58	B1	DB42_contig00064	blaTEM-1B	IS26, Tn4656	None	22,477
NVAL	DB43	ecoli	2329	B1	DB43_contig00070	blaTEM-1B	IS26, Tn2	IncFIB(AP001918)	16,105
GU	GABPCS	ecoli	795	B1	GABPCS_contig00025	blaTEM-1B, sul2	IS26, IS679, ISVna5	IncFII	58,643
HU	MA-1-1b	ecoli	7937	B1	MA-1-1b_contig00054	aac(3)-IId, aadA2, blaTEM-1B, catA1, dfrA12, mph(A), qacE, sul1	IS26, IS6100, ISCFr1	IncFII(aMAA1167-NDM-5)	32,844
NVAL	P104	ecoli	101	B1	P104_contig00053	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, sul2, tet(A)	IS26, IS5075, Tn2, Tn6205	IncFIC(FII)	28,353
NVAL	P20	ecoli	58	B1	P20_contig00030	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, sul2	IS26, IS5075, Tn2, Tn6205	IncFIC(FII)	32,967
NVAL	P64	ecoli	1727	B1	P64_contig00034	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA14, sul2, tet(A)	IS26, IS26, IS5075, Tn2, Tn6205	IncFIC(FII)	35,289
NVAL	P80	ecoli	641	B1	P80_contig00077	aadA1, blaTEM-1B, dfrA1, sul3	IS26	None	20,425
SMU	ABPCE11_2	ecoli	131	B2	ABPCE11_2_contig00126	blaTEM-1B	IS26, Tn2	None	11,963
SMU	ABPCE112	ecoli	131	B2	ABPCE112_contig00056	blaTEM-1B	IS26	IncFIB(AP001918)	9,976
SMU	ABPCE129	ecoli	131	B2	ABPCE129_contig00160	blaTEM-1B	IS26, IS629	None	6,658
SMU	ABPCE141	ecoli	131	B2	ABPCE141_contig00040	blaTEM-1B	IS26	None	17,126
SMU	ABPCE170	ecoli	1193	B2	ABPCE170_contig00057	blaTEM-1B	IS26	None	6,921
SMU	ABPCE24	ecoli	569	B2	ABPCE24_contig00065	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, sul2	IS26, IS5075, Tn2, Tn6205	IncFIC(FII)	28,484
SMU	ABPCE5	ecoli	131	B2	ABPCE5_contig00093	blaTEM-1B	IS26, IS629	None	16,396
SMU	ABPCE51	ecoli	131	B2	ABPCE51_contig00078	aac(3)-IId, blaTEM-1B	IS26, ISCFr1	IncFII(pCoo)	16,601
SMU	ABPCE81	ecoli	131	B2	ABPCE81_contig00131	blaTEM-1B	IS26	None	10,948
SMU	ABPCE9	ecoli	73	B2	ABPCE9_contig00063	aac(3)-IId, blaCTX-M-3, blaTEM-1B	IS26, ISCFr1	None	9,752
SMU	ABPCE91	ecoli	12	B2	ABPCE91_contig00047	ant(3*)-Ia, blaTEM-1B, qacE, sul1	IS26, ISKpn26, Tn2, Tn21	None	32,490
SMU	ABPCE97	ecoli	N/A	B2	ABPCE97_contig00168	blaTEM-1B	IS26	None	3,746
SMU	ABPCE98	ecoli	131	B2	ABPCE98_contig00232	blaTEM-1B	IS26	None	2,630
SMU	ABPCE1_1	ecoli	69	D	ABPCE1_1_contig00158	blaTEM-1B	IS26	None	8,319
RGU	F3-6E	ecoli	973	D	F3-6E_contig00272	blaTEM-1B	IS26	None	2,597
RGU	F5-4	ecoli	973	D	F5-4_contig00262	blaTEM-1B	IS26	None	2,368
RGU	165	ecoli	182	E	165_contig00028	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA7, qacE, sul1, sul2	IS26, IS26, Tn6205	IncQ1	46,619
RGU	166	ecoli	182	E	166_contig00018	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA7, qacE, sul1, sul2, tet(A)	IS26, IS26, IS26, Tn6205	IncQ1	71,698
SMU	ABPCE194	ecoli	648	F	ABPCE194_contig00016	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA14, sul2	IS26, IS26, IS30, IS5075, ISec37, Tn2, Tn6205	IncFIC(FII)	99,270
SMU	ABPCE195	ecoli	648	F	ABPCE195_contig00018	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA14, sul2	IS26, IS26, IS30, IS5075, ISec37, Tn2, Tn6205	IncFIA, IncFIC(FII)	97,908
SMU	ABPCE198	ecoli	648	F	ABPCE198_contig00017	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, sul2	IS26, IS30, IS5075, ISec37, Tn2, Tn6205	IncFIA, IncFIC(FII)	93,948
RGU	175	ecoli	N/A	G	175_contig00014	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA5, sul2, tet(A)	IS26, IS26, Tn1721, Tn6205	IncQ1	23,742
RGU	S10-5E	fergusonii	7852	fergusonii	S10-5E_contig00137	aph(3*)-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-1B, dfrA14, sul2	IS26, IS5075, Tn6205	None	11,277

Phylogenetic group

A

B1

B2

D

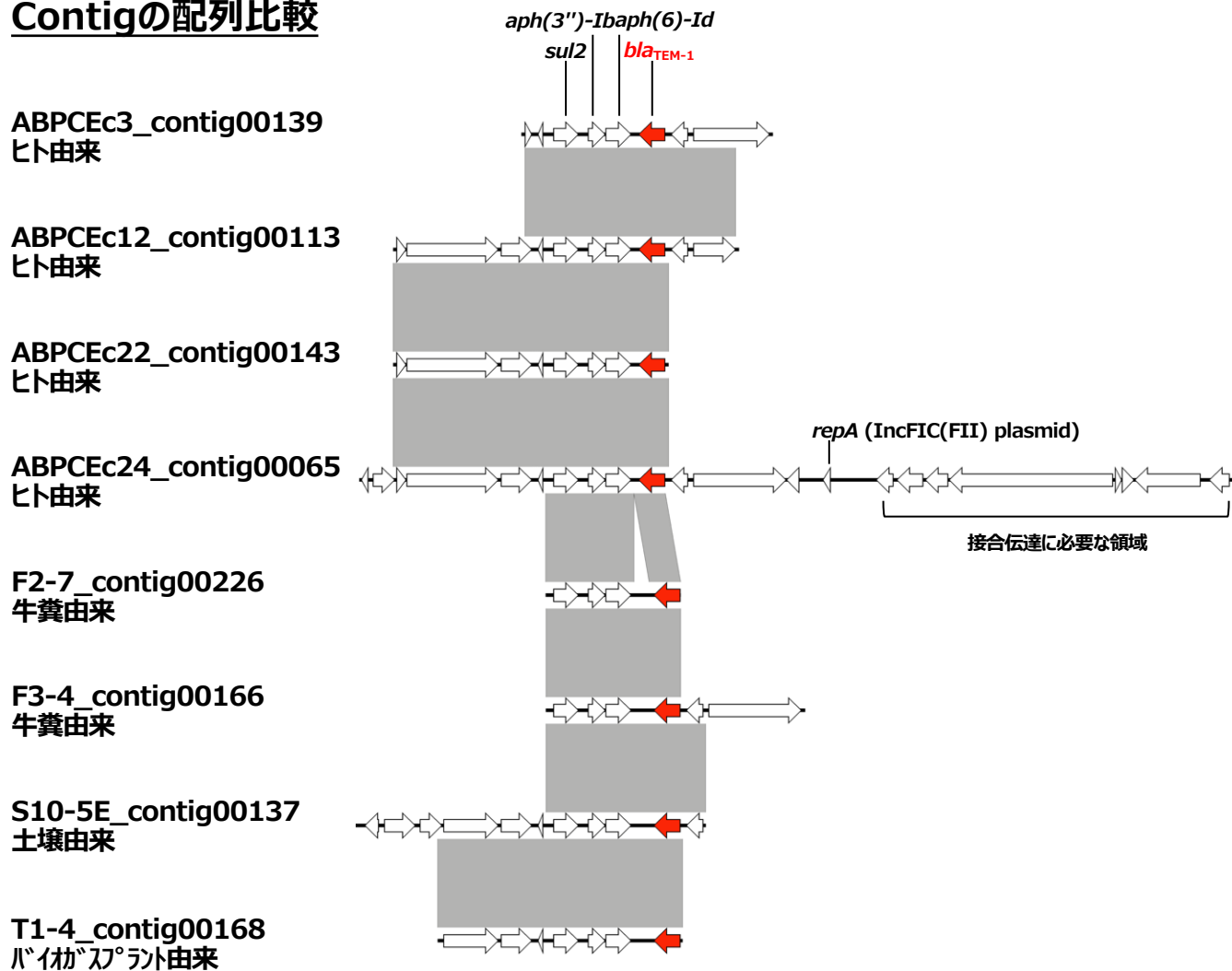
E

F

*E. fergusonii*

*bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子とその周辺構造 (IS26) が、由来を超えて家畜、水圏、野菜、ヒト臨床由来の薬剤耐性菌に存在

## Contigの配列比較



***bla*<sub>TEM-1</sub> 遺伝子とその周辺構造 (IS26) が、由来を超えて家畜、水圏、野菜、ヒト臨床由来の薬剤耐性菌に存在**

# まとめ

a. 牛農場において家畜から土壌を介して野菜へ伝播する薬剤耐性菌の量を明らかにする。

家畜排泄物を介して薬剤耐性菌及び耐性遺伝子が作物まで伝播することは極めて程度が低い

b. 土壌に分布する薬剤耐性菌が、そこで栽培される野菜へ伝播する量を明らかにする。

土壌に高濃度の薬剤耐性菌を接種し、かつ土壌が直接野菜へ付着するという特殊な実験条件下では、薬剤耐性菌が伝播する可能性

c. 動物、環境、野菜、ヒトの臨床例で分離される薬剤耐性菌のゲノムの類似性について明らかにする。

*bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子とその周辺構造 (IS26) を保有する株が由来を超えて、家畜、水圏、野菜、ヒト臨床由来の薬剤耐性菌に存在

\*疫学的な関連性についてのさらなる研究が必要

✓ 耐性菌・耐性遺伝子は、土壌、野菜へ伝播することがある



堆肥化によって耐性菌は減少、土壌への散布でさらに減少

⇒ リスクをさらに低減するための堆肥処理法の開発が進められている

# 耐性菌対策として求められること

## 1、適切な畜産廃棄物の処理 有効な処理法の開発



農場



水・土壌・堆肥

野生動物



灌漑水



製造工程

## 3、適切な洗浄 有効な洗浄法の開発



## 2、野生動物の接触防止

# Acknowledgments

- 酪農学園大学食品衛生学ユニット
- 岐阜大学 連合獣医学研究科
- 宮崎大学 土木環境工学プログラム
- 農林水産省動物医薬品検査所
- 広島大学 食品衛生学研究室
- 札幌医科大学 感染制御・臨床検査医学講座
- 北海道大学 獣医衛生研究室
- 国立感染症研究所 薬剤耐性菌研究センター
- 酪農学園大学獣医疫学ユニット

研究をサポートしてくださっている多くの皆様

[usuima@rakuno.ac.jp](mailto:usuima@rakuno.ac.jp)

