

令和2～3年度 食品健康影響評価技術研究 研究成果報告書（終了時）

研究課題名 (研究項目名)	家畜由来薬剤耐性菌の水圏・土壌環境を介した野菜汚染の定量評価及びヒトへの伝播に関する研究（課題番号：JPCAFSC20202002） （1 危害要因・ばく露実態の評価に必要な科学的知見の集積 (3) 薬剤耐性菌の特性解析に関する研究)
主任研究者	研究者名：臼井 優 所属機関：酪農学園大学

I 研究期間及び研究目的等

1 研究期間

令和2年度～令和3年度（2年間）

2 研究目的

市販野菜から薬剤耐性菌が検出される事例が報告されているが、その薬剤耐性菌の由来は明らかではない。農場の堆肥や排水は圃場で利用されるため、家畜由来耐性菌は、野菜から分離される薬剤耐性菌の由来の一つである可能性が考えられる。そこで、農場から野菜を介してヒトへ伝播するリスクを定量的に評価することを目的に試験を実施した。具体的には、①大学附属農場をモデルとして、家畜由来耐性菌が野菜へ伝播する程度を明らかにした。②家畜、水圏、野菜、ヒト臨床由来耐性菌のゲノム解析を行い、耐性菌/耐性遺伝子の循環について評価した。また、③薬剤耐性菌を含む土壌で野菜を栽培し、土壌から野菜へ耐性菌が移行する程度を検証した。以上の結果および公表データを集めて定量的リスク評価を試みた。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者（所属機関）
総括	研究総括	臼井優（酪農学園大学）
農場からの薬剤耐性菌の野菜への伝播する量の解明	日本の北部における農場試験	臼井優（酪農学園大学）
	日本の南部における農場試験	鈴木祥広（宮崎大学）
家畜、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析	家畜由来細菌の解析	嶋崎洋子（動薬検） 臼井優（酪農学園大学）
	排水由来細菌の解析	島本整（広島大学） 浅井鉄夫（岐阜大学） 臼井優（酪農学園大学）
	野菜由来細菌の解析	島本整（広島大学）
	ヒト由来細菌の解析	佐藤豊孝（北海道大学） 高橋聡（札幌医科大学）

土壌分布薬剤耐性菌の野菜への伝播に関する研究	土壌に薬剤耐性菌を添加し、野菜を栽培し、継続的に耐性菌量を測定	浅井鉄夫（岐阜大学）
包括的なゲノム解析	プラスミドの解析	鈴木仁人（感染研）
食品健康影響評価	定量的食品健康影響評価の実施	蒔田浩平（酪農学園大学）

4 倫理面への配慮について

本研究で人由来腸内細菌に関する情報を得るが、菌株の研究への使用は、札幌医科大学倫理委員会の承認を得ている。更に、疫学倫理に基づき個人が特定できる情報の連結は行わない。研究の結果が菌株に由来した個人の治療を含めた医療行為に影響を与えることはない。以上から、疫学倫理上問題はないと考えるが、酪農学園大学における人を対象とする医学研究系研究倫理委員会の審査を受けるとともに、共同研究機関である札幌医科大学が必要と判断した場合に札幌医科大学倫理委員会の審査も受け、審査結果を受けて適切に対処する。

本研究課題において、動物実験は実施されなかった。

Ⅱ 研究内容及び成果等

1 研究項目

(1) 研究総括（臼井優（酪農学園大学））

各研究課題の進捗状況を把握し、計画的に研究が進行するように研究の総括を行った。新型コロナウイルス蔓延の影響により、2年間の研究期間を通して、対面の会議を実施することはできなかった。採択決定後、令和2年4月にメール会議を分担研究者及び協力研究者が全員参加する中で行い、本事業の方向性を決定及び確認した。その後、8月、12月にウェブ会議を実施し、進捗状況等についての確認をおこなった。また、12月には、食品安全委員会によるヒアリングをオンラインで受けた。令和3年度は、5月、7月にウェブ会議を実施し、10月には菌株及びgDNAのやりとり等に関するメール会議、12月にウェブ会議を実施した。令和4年3月に最終報告書としてまとめるための会議をウェブにて実施した。最終会議を経て、分担研究者より、研究成果を共有統合し、最終報告書としての取りまとめを行った。

（２）農場からの薬剤耐性菌の野菜への伝播する量の解明

ア．日本の北部における牛農場での野菜への伝播量の解明（臼井優、福田昭（酪農学園大学））

a) 同一農場における家畜排泄物処理物の散布による土壌、作物への耐性菌/耐性遺伝子の伝播量の解明

研究内容・方法

大学附属の牛農場において、牛糞便、堆肥、バイオガスプラント処理水、土壌、家畜排泄物処理物散布土壌で栽培されたデントコーンから継続的にサンプリングを行い、アンピシリン（β-ラクタム系抗菌薬の一つ）耐性菌を含む菌数の定量及び分離を行った（表 1）。当農場においては、乳房炎の治療にセファロスポリン系抗菌薬を日常的に使用しており、β-ラクタム系抗菌薬に対する耐性菌が分離されることが予想されることから、試験農場として選定した。土壌、散布土壌、デントコーンのサンプリングは、サンプリングごとに、同じ地点 6 か所から行った。

大腸菌、大腸菌群の菌数の定量は、薬剤非添加と薬剤（100mg/L アンピシリン）添加をしたクロモアガーECC 培地を用いて計測し、発育が見られたコロニーを分離・保存し、その後の性状解析に用いた。更に、菌量測定を検出下限値を上げるため、コリラート 18（薬剤非添加と薬剤（100mg/L アンピシリン）添加）による菌数の定量も行い、大腸菌もしくは大腸菌群の増菌が認められたサンプルの培養液についてクロモアガーECC 培地に継代し、コリラート 18 からの菌の分離も行った。また、サンプル中に含まれる微量の大腸菌、大腸菌群の検出を試みるために、LB 液体培地を用いた増菌培養液を薬剤非添加と薬剤（100mg/L アンピシリン）添加のクロモアガーECC 培地に塗布し、菌分離を行った。分離された菌株は MALDI-TOF MASS を用いて菌種同定を行い、Enterobacteriales に分類される菌株について、薬剤感受性試験（アンピシリン、セファゾリン、セフトキシム）を行い、CLSI の Break Point を適用して耐性か否かの判断を行った。β-ラクタム系の抗菌薬に耐性を示した株に対し、薬剤耐性遺伝子（*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{CMY-2}）の保有を PCR で確認した（Dallene ら（2010）の報告）。*bla* 遺伝子保有 β-ラクタム系抗菌薬耐性株に対し、次世代シーケンス解析を行い（研究項目名：分離菌株に対する包括的なゲノム解析）、SNPs に基づく近縁性を解析した。さらに、サンプルから DNA 抽出を行い、サンプル中に含まれる耐性遺伝子（*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M}）、大腸菌遺伝子（*uidA*）の定量を qPCR により行った（Katada ら（2021）の報告）。

表 1. 対象としたサンプルとサンプル数

	堆肥、家畜排泄物 処理物散布前	堆肥、家畜排泄物 処理物散布後 (散布後 0, 7, 28, 60day)	栽培中 (散布後 100day)	収穫時 (散布後 160day)
牛糞便	6			
堆肥	6			
バイオガスプラント処理水	1			
土壌	6	各 6	6	6
デントコーン			12 (6sample の根 と葉)	12 (6sample の根 と可食部)

研究結果

各サンプルの採材日ごとの平均菌数を図 1 に示す。また、個別サンプルデータは別途エクセルファイル補助資料 1 に記載した。大腸菌・大腸菌群の菌数については、散布後に増加する傾向が認められ、時間とともに減少し、散布後 28-60 日で散布前と同程度の菌数を示した。デントコーンからは土壌以上に、高い大腸菌群の菌数が検出された。増菌処理を行うことで、堆肥、散布後 160 日のデントコーン可食部を除き、大腸菌が分離された。アンピシリン耐性大腸菌については、家畜排泄物処理物散布前の土壌からは検出されなかったが、散布直後から散布 7 日後まで検出された。

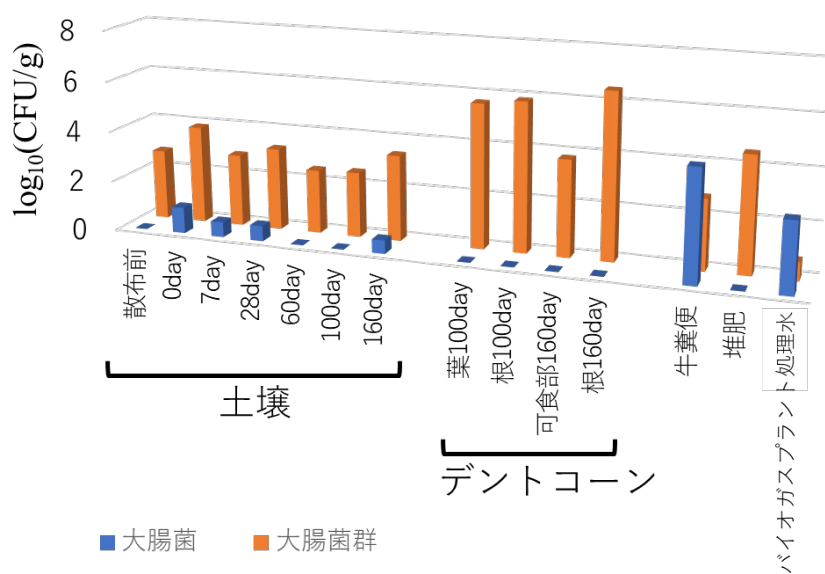
家畜排泄物処理物散布前の土壌における *bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M} 遺伝子量は検出限界以下であったが、散布後には検出されるようになり、散布 28 日以降は、検出限界付近を推移した（図 2）。*bla*_{SHV} 遺伝子は全てのサンプルにおいて検出限界以下であった。大腸菌遺伝子 (*uidA*) は、家畜排泄物処理物散布前の土壌においては検出限界以下であったが、散布 0 日後には検出され、その後、検出限界以下となった。*bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M} 遺伝子は牛糞便、堆肥、バイオガスプラント処理水から検出された。大腸菌遺伝子は牛糞便、バイオガスプラント処理水から検出された。薬剤耐性遺伝子及び大腸菌遺伝子は、デントコーンの可食部からは検出されなかった。個別サンプルデータは別途エクセルファイル補助資料 2 に記載した。

牛糞便、排水、土壌（散布前、散布後 0 日、7 日）から β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す *Escherichia* 属菌が分離され、全ての株 (18 株 (*E. coli* (10 株), *E. fergusonii* (8 株))) から、耐性遺伝子 (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{TEM}) が検出された（表 2）。また、次世代シーケンスを用いた SNPs 解析により、*bla*_{TEM} 保有 *E. fergusonii* 及び *bla*_{CTX-M-2} 保有 *E. coli* において、家畜、バイオガスプラント処理水、散布土壌とステージを超えて遺伝学的に近縁な株が確認された（図 3）。次世代シーケンス解析に用いた *bla* 遺伝子保有 β -ラクタム系抗菌薬耐性の薬剤感受性、*bla* 遺伝子保有状況、ST 型を別途エクセルファイル補助資料 3 に記載した。

以上の結果より、家畜排泄物処理物の散布により、家畜由来細菌 (耐性菌を含む) / 耐性遺伝子が土壌に伝播し、時間とともに減少するが、1 週間程度は残存することが明らかとなった。本試験では、牛糞便に含まれる大腸菌は堆肥化により検出されなくなった一方で、バイオガスプラント処理水、散布後土壌からは牛糞便由来 *bla* 遺伝子保有アンピシリン耐性 *Escherichia* 属菌と遺伝学的に近縁な菌株が検出された。これらのことから、バイオガスプラント処理水を通じて、土壌に牛糞便由来耐性菌が伝播したことが示唆された。

以上の結果より、家畜由来耐性菌/耐性遺伝子は、家畜排泄物処理物の散布後に土壌に伝播するものの、その頻度や量は少なく、また、作物（可食部）からは検出されなかったことから、土壌を介して作物へ伝播する可能性は大きくないと考えられた。また、可食部からは、薬剤耐性遺伝子及び大腸菌遺伝子は検出されなかったことから、喫食による耐性菌/耐性遺伝子の伝播の可能性は低いと考えられる。

(1-1) 無添加クロモアガーECC 培地



(1-2) アンピシリン(100mg/L)添加クロモアガーECC 培地

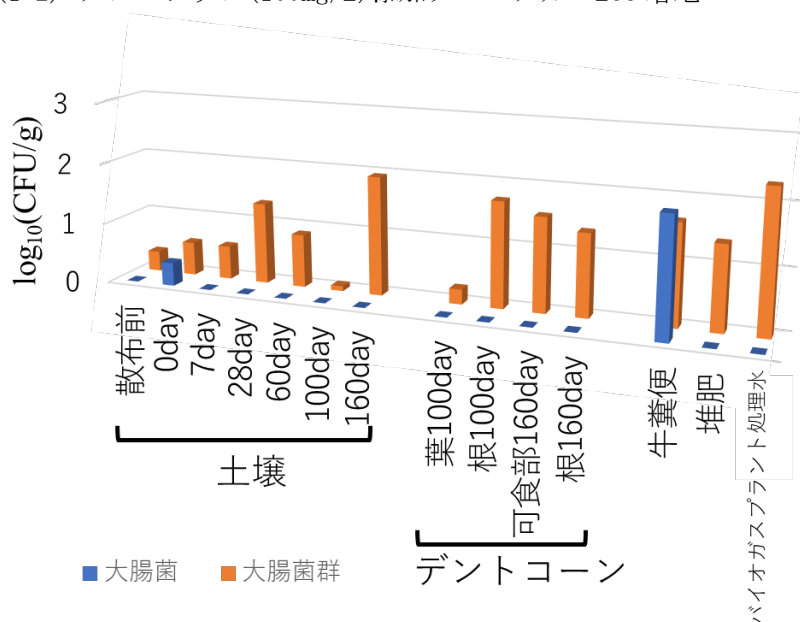


図1. クロモアガーECC 培地を用いた継時的な菌数（大腸菌、大腸菌群）の変動
Day は、散布後の日数を示す。

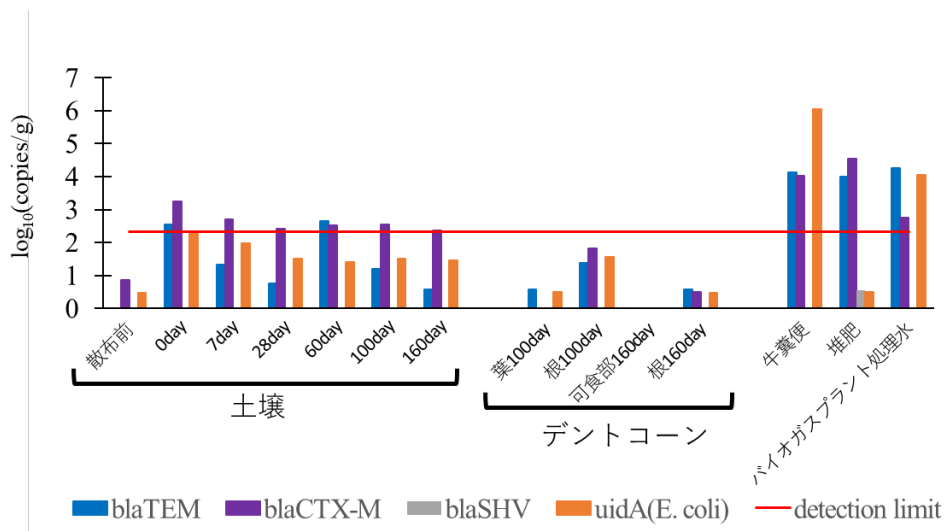


図 2. サンプル中の耐性遺伝子量、大腸菌遺伝子量の変動
Day は、散布後の日数を示す。

表 2. *bla* 遺伝子保有 *Escherichia* 属菌の分離結果

	<i>bla</i> 遺伝子	土壌			牛糞便	バイオガスプラント処理水
		散布前	散布後 0day	散布後 7day		
<i>E. coli</i>	CTX-M-2	ND	+	+	+	+
	TEM	ND	ND	ND	+	ND
<i>E. fergusonii</i>	TEM	+	+	ND	+	+

+: 陽性, ND: not detected

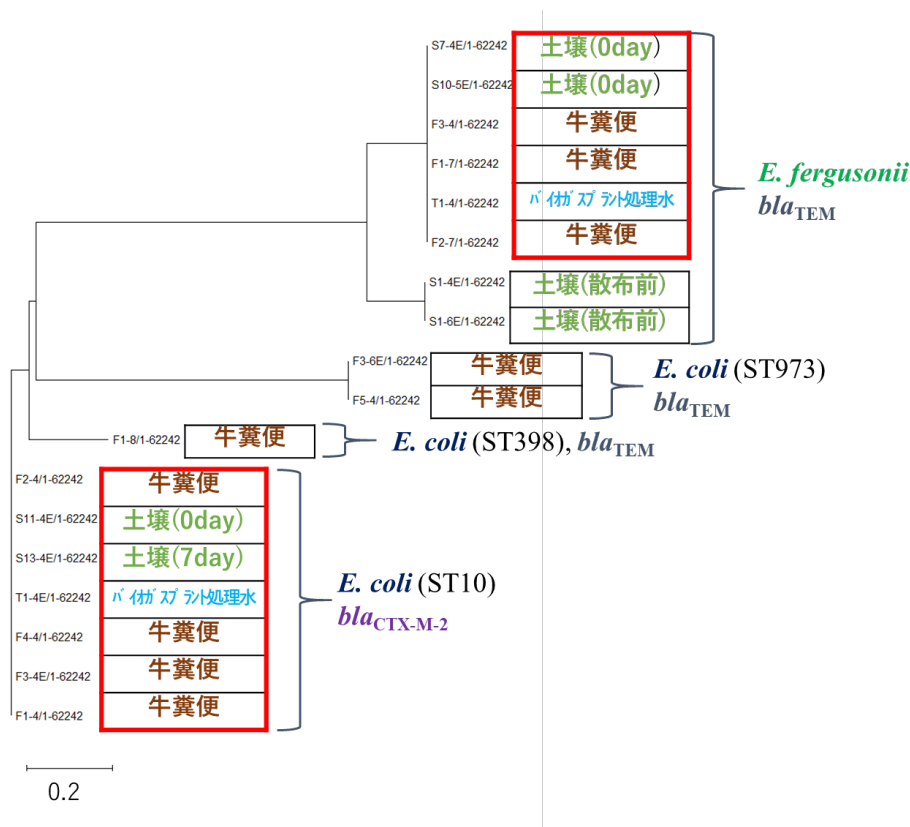


図 3. 次世代シーケンスを用いた SNPs 解析による *bla* 遺伝子保有 *Escherichia* 属菌の系統樹解析
*bla*_{TEM} 保有 *E. fergusonii* 及び *bla*_{CTX-M-2} 保有 *E. coli*(ST10) で、ステージを超えて近縁な株が認められた。

b) 灌漑水および対象となる圃場における耐性菌/耐性遺伝子の定量

研究内容・方法

北海道の道東の野外の 3 つの牛農場 (3 酪農場:Y, K, S) において、牛糞便流入口、支線用水路、排水調整池(好気性発酵処理)、灌漑水散布土壌(受益地)のサンプリングを行った。受益地としての土壌は各農場 3 地点から採材した。a) と同様の方法でアンピシリン耐性大腸菌を含む大腸菌数の定量、分離を行った。分離された菌株は MALDI-TOF MASS を用いて菌種同定を行い、大腸菌に分類される菌株について薬剤感受性試験(アンピシリン、セファゾリン、セフトキシム)を実施した。CLSI の Break Point を適用し、 β -ラクタム系抗菌薬に対し、耐性を示した大腸菌株において、耐性遺伝子(*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M}、*bla*_{CMY-2})の保有を PCR で確認した。また、*bla* 遺伝子の保有が確認された β -ラクタム耐性大腸菌 15 株について、次世代シーケンスを用いて WGS を行い、SNPs に基づく近縁性を解析した。(研究項目名: 分離菌株に対する包括的なゲノム解析)。さらに、サンプル中に含まれる耐性遺伝子(*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M})の定量を qPCR 法で実施した。

研究結果

大腸菌、アンピシリン耐性大腸菌数は糞便流入口、排水調整池、受益地と次第に減少が認められた。支線用水路から大腸菌は検出されなかった(図 4)。個別サンプルデータは別途エクセルファイル補助資料 4 に記載した。

*bla*_{TEM} 遺伝子は全ての農場の糞便流入口、排水調整池で検出され、Y 農場の受益地からも検出された。

*bla*_{CTX-M} 遺伝子は K 農場の排水調整池と Y 農場の受益地から検出された。*bla*_{SHV} は全てのサンプルから検出されず、支線用水路からはいずれの *bla* 遺伝子も検出されなかった（図 5、補助資料 4）。

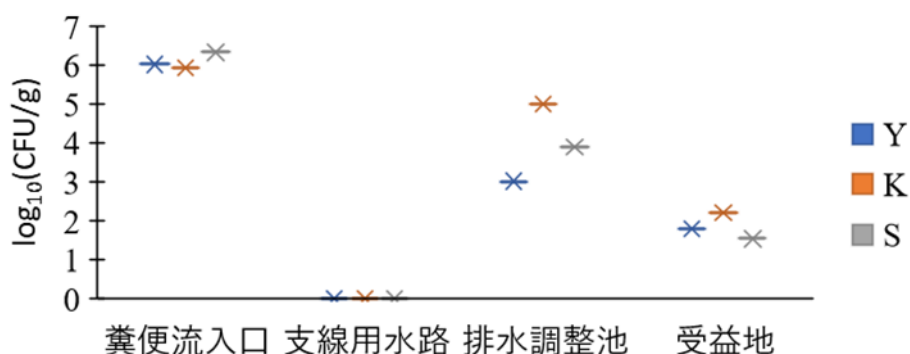
糞便流入口、排水調整池、受益地から分離された β -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す大腸菌から耐性遺伝子 (*bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M-101}) が検出された（表 3）。

次世代シーケンスを用いた SNPs 解析により、*bla*_{TEM1-D} 遺伝子保有 β -ラクタム耐性大腸菌において、糞便流入口、排水調整池、受益地とステージを超えて遺伝学的に近縁な株が確認された（図 6）。次世代シーケンス解析に用いた *bla* 遺伝子保有 β -ラクタム系抗菌薬耐性の薬剤感受性、*bla* 遺伝子保有状況、ST 型を別途エクセルファイル補助資料 5 に記載した。

糞便流入口に含まれる大腸菌は、排水調整池における好気性発酵処理により減少は認められるものの、残存していた。また、糞便流入口、排水調整池、受益地から遺伝学的に近縁な *bla* 遺伝子保有大腸菌株が検出され、家畜排泄物処理物処理物から土壌への伝播が示唆された。

以上の結果より、家畜排泄物処理物に含まれる家畜由来耐性菌/耐性遺伝子が、土壌に伝播及び残存している可能性は否定できないが、その頻度や量は少ないことが示された。

(4-1) 無添加クロモアガーECC 培地



(4-2) アンピシリン添加クロモアガーECC 培地

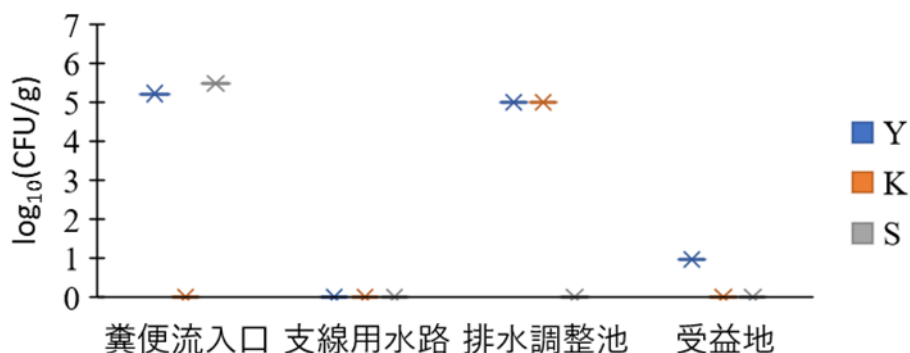
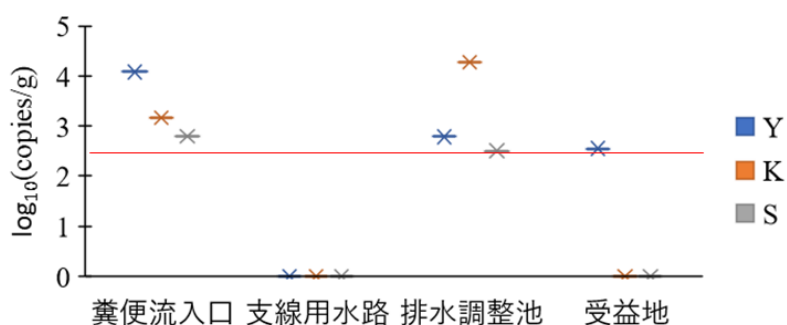


図 4. クロモアガーECC 培地を用いたサンプルに含まれる大腸菌数の推定

(5-1) *bla*_{TEM} 遺伝子量



(5-2) *bla*_{CTX-M} 遺伝子量

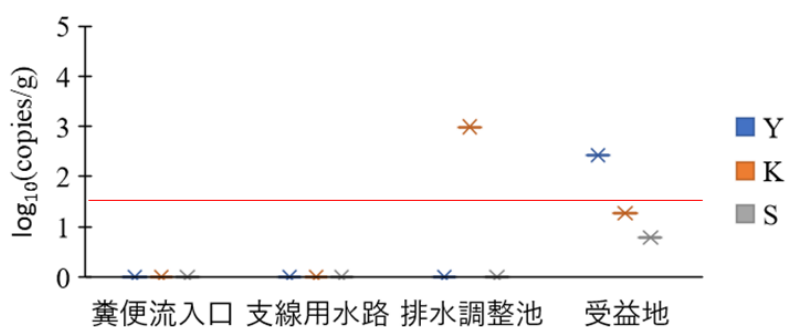


図 5. サンプルに含まれる耐性遺伝子量の定量結果(*bla*_{TEM} 遺伝子量、*bla*_{CTX-M} 遺伝子量)
赤線：検出限界

表 3. *bla* 遺伝子保有大腸菌の分離結果とその性状

農場	サンプル	アンピシリン耐性大腸菌 (n)	<i>bla</i> _{TEM} 保有アンピシリン耐性大腸菌 (n)	<i>bla</i> _{CTX-M-101} 保有アンピシリン耐性大腸菌 (n)
Y	糞便流入口	3	3	ND
	支線用水路	ND	ND	ND
	排水調整池	10	10	ND
	受益地	9	9	ND
K	糞便流入口	3	3	ND
	支線用水路	ND	ND	ND
	排水調整池	3	2	1
	受益地	ND	ND	ND
S	糞便流入口	4	ND	4
	支線用水路	ND	ND	ND
	排水調整池	3	ND	3
	受益地	ND	ND	ND

ND: not detected

※*bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2} 遺伝子保有アンピシリン耐性大腸菌は検出されなかった。

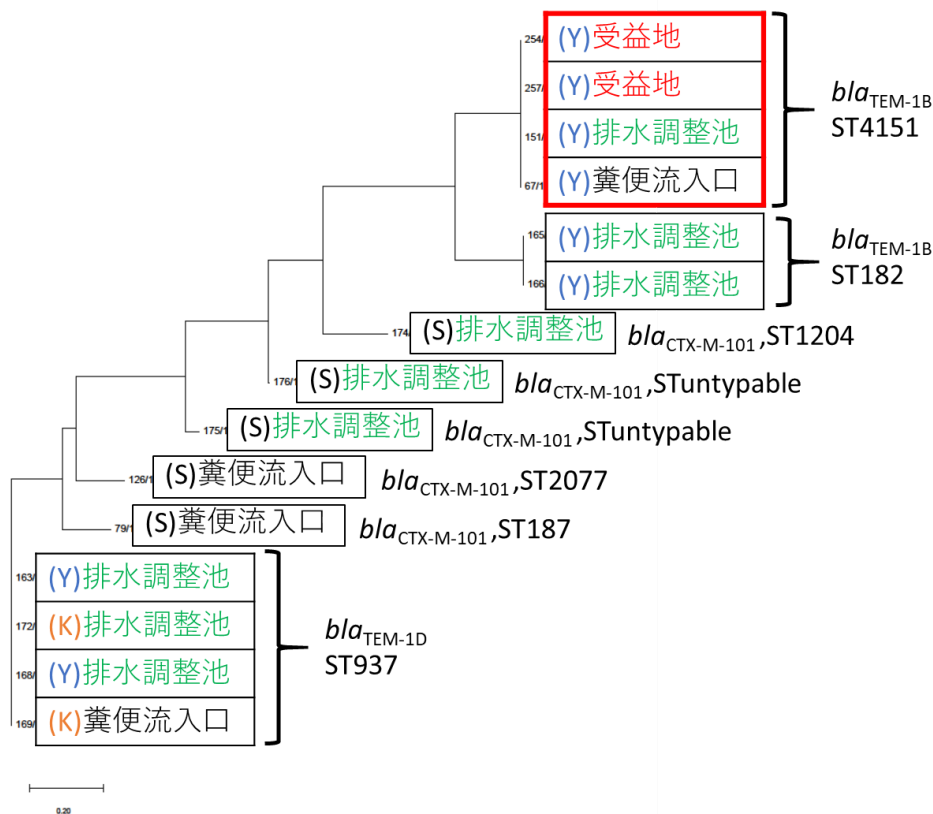


図 6. 次世代シーケンス解析による *bla* 遺伝子保有大腸菌の系統樹解析
ステージを超えて、近縁な *bla*_{TEM-1D} 保有株が認められた。

結論

- ・牛糞に大腸菌が多く含まれるものの、堆肥化により大腸菌の菌量は検出限界以下となった。
- ・バイオガスプラント処理水には、大腸菌が含まれており、バイオガスプラント処理水を圃場に散布することで、圃場の土壌に大腸菌が伝播した可能性がある。
- ・家畜排泄物処理物散布後、土壌の大腸菌数は徐々に減少し、1-2 か月程度で散布前と同程度となることが明らかとなった。
- ・圃場の土壌に散布された大腸菌は散布後 7 日程度までは家畜由来株と遺伝学的に近縁な耐性大腸菌が残存する事が明らかとなった。
- ・堆肥やバイオガスプラント処理水散布前の土壌から大腸菌群が検出されたことから、圃場には大腸菌群が常在していることが明らかとなった。
- ・大腸菌が存在している圃場において生産されたデントコーンからは、耐性大腸菌は検出されず、土壌中の家畜排泄物処理物由来大腸菌は時間とともに散布前と同程度まで減少していくことから、圃場に存在する家畜排泄物処理物由来大腸菌がデントコーンに移行する可能性は極めて低いことが示された。

【参考文献】

Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 65. 490-495.

Katada S., Fukuda A., Nakajima C., Suzuki Y., Azuma T., Takei A., Takada H., Okamoto E., Kato T., Tamura Y., Usui M. (2021) Aerobic composting and anaerobic digestion decrease the copy numbers of antibiotic-resistant genes and the levels of lactose-degrading Enterobacteriaceae in dairy farms in Hokkaido, Japan. *Front. Microbiol.* 12. 737420.

イ．日本の南部における牛農場での野菜への伝播量の解明（鈴木祥広（宮崎大学））

研究内容・方法

宮崎大学住吉牧場の農場において、牛糞便・敷料を原料とする完熟堆肥、堆肥散布の畑土、散布土壌で栽培されたデントコーン（モデル作物）から、作物の栽培時期に合わせて定期的にサンプリング（第1期：2020年4月～8月、第2期：8月～11月）を実施した。サンプルの詳細については表4に記載した。宮崎においては、2期作を行うため、サンプリングが年に2回実施された。

堆肥と畑土壌は、各試料10gを90mLのリン酸緩衝生理食塩水（PBS，和光純薬）に懸濁させ、2分間激しく攪拌混合し、上澄み液を10mlサンプルとして採取した。これを1サンプルとし、全部で1期36サンプル、2期42サンプルを準備した。デントコーンの茎部と根部（未洗浄、付着土壌は除去）はミキサー（TESCOM）で細かく裁断し、各試料25gとPBS 225mLをストマック袋（関東化学）に入れ、2分間ストマッキングを行った。その後、ストマック袋から抽出液を回収し、これを1サンプルとし、全部で1期24サンプル、2期36サンプル準備した。

表4. 各サンプルの採取日、採取量、及びサンプル数

【1期】

サンプル	採取日	採取量 (1地点当たり)	サンプル数 (採取地点数)
完熟堆肥	4/10	約1 kg	6
土（播種後1日経過）	4/16	約1 kg	6
土（播種後7日）	4/23	約1 kg	6
土（播種後28日）	5/14	約1 kg	6
土（播種後60日）	6/10	約1 kg	6
土（収穫日）	7/26	約1 kg	6
デントコーン（根）	6/17 7/26	6/17: 1株、約1kg/株 7/26: 1株、約2kg/株	6、6
デントコーン（茎）	6/17 7/26	6/17: 1本、高さ約1m 7/26: 1本、高さ2m以上	6、6

【2期】

サンプル	採取日	採取量 (1サンプル当たり)	サンプル数
完熟堆肥	8/6	約1 kg	6
土（施肥前）	8/6	約1 kg	6
土（播種後1日経過）	8/20	約1 kg	6
土（播種後7日）	8/27	約1 kg	6
土（播種後28日）	9/17	約1 kg	6
土（播種後60日）	10/19	約1 kg	6
土（収穫日）	11/18	約1 kg	6
デントコーン（根）	10/19 11/18	10/19: 5株、約0.1kg/株 11/18: 2-3株、約0.3kg/株	6、6

デントコーン（茎）	10/19	10/19：3本、高さ約0.5m	6、6
	11/18	11/18：3本、高さ約0.5m	
デントコーン（実）	11/18	3～4個	6、6

〔試験１〕 堆肥と畑土壌の懸濁液ならびにデントコーンの抽出液について、コリラート Quanti-Tray/2000キット (IDEXX) を用いて大腸菌数と大腸菌群数を測定し、陽性株を単離した。アンピシリン耐性大腸菌及び大腸菌群数は、アンピシリンの濃度が100 mg/L となるように調整したコリラートの試験液を用いて、陽性ウェル数をアンピシリン耐性菌として計数した。また、陽性ウェルからアンピシリン耐性株を単離した。なお、各サンプルは6地点から採取し、それぞれの菌数の平均値を求めて評価した。

〔試験２〕 各試料の単離した大腸菌群株及びアンピシリン耐性大腸菌群について、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS, microflexLT/SH, BRUKER) を用いて菌種同定を行い、菌種から完熟堆肥、畑土、そしてデントコーンに至る拡散の可能性を検証した。

〔試験３〕 アンピシリン耐性大腸菌群について、CHROMager™ ESBL で培養を行い、コロニーが形成されたものを ESBL 産生疑い株として判定した。

〔試験４〕 ESBL 産生疑い株から、DNeasy Blood&Tissue kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出した。ESBL 産生菌の遺伝子型 (TEM、SHV、CTX-M-1、CTX-M-2および CTX-M-9) は、Mutiplex-PCR 法に従って解析した (Dallene ら (2010) の報告)。

〔試験５〕 ESBL 産生疑い株について、微量液体希釈法を用いて、10種類の抗菌薬に対する最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration、MIC) 試験を実施した。MIC 試験には、Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) の情報を参照し、次の10種類の抗菌薬を使用した：ペニシリン系抗菌薬であるアンピシリン (ABPC) (和光純薬工業株式会社)、セファロスポリン系抗菌薬であるセファゾリン (CFZ) (和光純薬)、セフトキシム (CTX) (和光純薬)、アミノグリコシド系抗菌薬であるゲンタマイシン (GM) (和光純薬)、カナマイシン (KM) (和光純薬)、カルバペネム系抗菌薬であるイミペネム (IPM) (和光純薬)、キノロン系抗菌薬であるナジリクス酸 (NA) (和光純薬)、フルオロキノロン系抗菌薬であるシプロフロキサシン (CIP) (和光純薬)、テトラサイクリン系抗生物質であるテトラサイクリン (TC) (和光純薬)、フェニコール系抗生物質であるクロラムフェニコール (CHL) (和光純薬)。

研究結果

[試験 1 の結果]

表5. 各サンプルにおける大腸菌数

	大腸菌 (MPN/g)							
	第1期				第2期			
	通常 (MPN/g)	通常 (標準偏差)	ABPC耐性 (MPN/g)	ABPC耐性 (標準偏差)	通常 (MPN/g)	通常 (標準偏差)	ABPC耐性 (MPN/g)	ABPC耐性 (標準偏差)
堆肥	0	0	0	0	1.2×10^2	2.2×10^2	0	0
堆肥施肥前	N/A		N/A		0	0	0	0
畑土播種-1d	0	0	0	0	0	0	0	0
畑土-7d	2.4	3.5	0	0	1.4	3	0	0
畑土-28d	0	0	0	0	0	0	0	0
畑土-60d	0	0	0	0	0	0	0	0
コーン茎-60d	1.1×10^1	2.5×10^1	0	0	0	0	0	0
コーン根-60d	0	0	0	0	0	0	0	0
畑土-100d(収穫時)	0	0	0	0	1.6×10^2	2.4×10^2	0	0
コーン茎-100d(収穫時)	0	0	0	0	4.6×10^3	1.0×10^4	0	0
コーン根-100d(収穫時)	0	0	0	0	1.4×10^3	3.3×10^3	0	0
コーン実-100d(収穫時)	N/A		N/A		0	0	0	0

表6. 各サンプルにおける大腸菌群数

	大腸菌群 (MPN/g)							
	第1期				第2期			
	通常 (MPN/g)	通常 (標準偏差)	ABPC耐性 (MPN/g)	ABPC耐性 (標準偏差)	通常 (MPN/g)	通常 (標準偏差)	ABPC耐性 (MPN/g)	ABPC耐性 (標準偏差)
堆肥	5.8×10^3	1.0×10^4	9.2	1.4×10^1	1.1×10^5	1.6×10^3	9.0×10^1	5.9×10^1
堆肥施肥前	N/A		N/A		3.9×10^2	7.8×10^2	4.3	8.5
畑土播種-1d	1.9×10^2	4.1×10^2	1.9	4.2	2.5	5.7	3.0×10^{-1}	6.6×10^{-1}
畑土-7d	1.9×10^2	3.7×10^2	5.8	1.3×10^1	3.8×10^3	8.0×10^3	6.3×10^1	1.2×10^2
畑土-28d	1.1×10^2	1.9×10^2	2.1	4.3	2.5×10^4	2.4×10^4	4.0×10^2	4.7×10^2
畑土-60d	2.1×10^2	9.4×10^3	1.8×10^3	2.9×10^3	5.6×10^4	8.2×10^4	8.1×10^2	1.3×10^3
コーン茎-60d	7.6×10^7	8.6×10^7	1.1×10^5	2.5×10^5	1.8×10^6	1.8×10^6	3.3×10^3	6.1×10^3
コーン根-60d	1.0×10^8	1.7×10^8	2.1×10^7	4.5×10^7	3.8×10^5	1.9×10^5	2.2×10^4	3.0×10^4
畑土-100d(収穫時)	1.3×10^4	6.5×10^3	5.8×10^8	4.1×10^2	9.4×10^3	6.9×10^3	3.0×10^3	6.1×10^3
コーン茎-100d(収穫時)	2.6×10^6	4.0×10^6	1.8×10^8	3.1×10^4	1.8×10^6	1.8×10^6	3.6×10^4	3.3×10^3
コーン根-100d(収穫時)	3.0×10^6	5.7×10^6	4.8×10^3	5.9×10^3	5.1×10^6	7.6×10^6	2.7×10^4	4.0×10^4
コーン実-100d(収穫時)	N/A		N/A		6.4×10^3	9.6×10^3	3.0×10^1	6.4×10^4

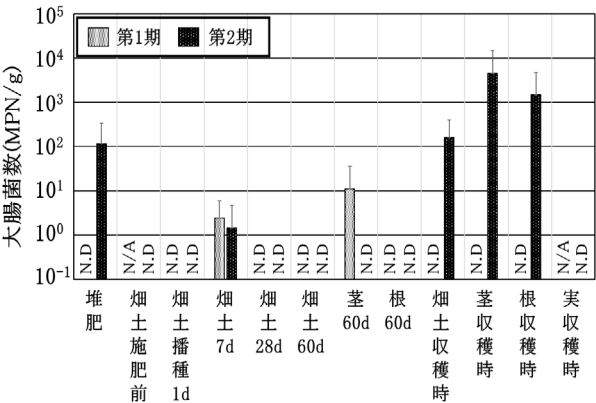


図7 各試料における大腸菌数

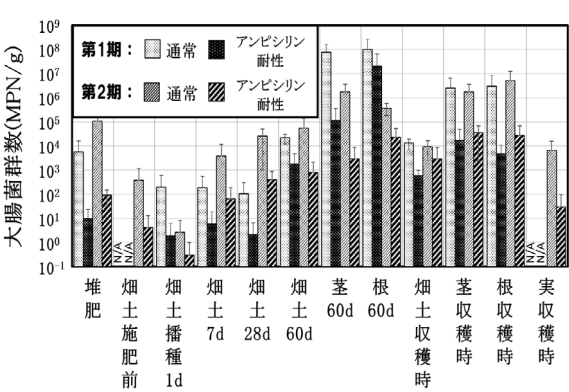


図8 各試料における大腸菌群数

表5と図7に、堆肥、畑土壌、およびコーンの茎部と根部の大腸菌数の検出結果を示す。第1期では、堆肥から大腸菌が検出されなかった。また、畑土7dを除く、全調査期間（1d、28d、60d、収穫期）の畑土からも大腸菌は検出されなかった。第1期の全サンプルのうちの2サンプルから、2.4MPN/g～11 MPN/g の範囲で大腸菌が検出された。第2期では、堆肥から大腸菌が2.1MPN/g で検出されたが、施肥直後

の畑土播種1dからは検出されなかった。大腸菌は、5試料から、 $1.4\text{MPN/g} \sim 4.6 \times 10^3\text{MPN/g}$ で検出された。アンピシリン耐性大腸菌は、調査期間を通して全ての試料から検出されなかった。第2期においても、第1期と同様に、1d、28d、60dの畑土からは大腸菌が検出されなかった。ところが、収穫時期の畑土、デントコーンの茎と根からは、大腸菌が $10^2 \sim 10^3\text{MPN/g} \sim 4.6 \times 10^3\text{MPN/g}$ で検出された。第1期と第2期の大腸菌の調査結果を総括すると、大腸菌の汚染源と想定した堆肥からは大腸菌が検出されなかったこと、ならびに堆肥調査期間を通して大腸菌が連続して検出されなかったことから、住吉牧場の農場では、堆肥の散布による大腸菌の伝播の可能性は極めて低いことがわかった。住吉牧場の完熟堆肥（含水率41%）は、原料となる使用済み敷料・ふん尿を発酵させ、さらに発酵熱で乾燥させるので、大腸菌は不活化されるためと考えられた。

表6と図8に、各試料における大腸菌群数とアンピシリン耐性大腸菌群数を示す。第1期では、調査期間における全てのサンプルから大腸菌群が $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8\text{MPN/g}$ の範囲で検出された。特に、60dのデントコーンの茎と根からは 10^8MPN/g の極めて高濃度の大腸菌群が検出された。また、収穫期のデントコーンの茎と根からも 10^6MPN/g を超過する高濃度の大腸菌群が検出された。一方、アンピシリン耐性大腸菌群についても、調査期間における全てのサンプルから $1.9 \sim 2.1 \times 10^7\text{MPN/g}$ の範囲で検出された。第2期における大腸菌群は、調査期間における全てのサンプルから $3.0 \times \sim 5.1 \times 10^6\text{MPN/g}$ の範囲で検出された。第1期と同様に、60dと収穫時のデントコーンの茎と根からは、 10^6MPN/g を超過する非常に高濃度の大腸菌群が検出された。大腸菌群のサンプル全体の菌数は、第2期よりも第1期の方が $10 \sim 10^2$ オーダー高い傾向を示した。一方、アンピシリン耐性大腸菌群は、全ての試料から $0.3 \sim 3.6 \times 10^4\text{MPN/g}$ の範囲で検出された。大腸菌群が高濃度であった60dと収穫時のデントコーンの茎と根からアンピシリン耐性大腸菌群も高濃度で検出された。大腸菌群のアンピシリン耐性率は、全体的には0.1～3%であったが、20%を超過する土壌試料も確認された。留意すべき結果として、調査期間を通して、土壌と比較してデントコーンの茎部と根部から $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8\text{MPN/g}$ の極めて高い大腸菌群数が検出されたことがあげられる。

[試験2の結果]

表7. 各サンプルから単離した大腸菌群株及びアンピシリン耐性大腸菌群の菌種同定結果

【大腸菌群】

	サンプル	同定に用いた 菌株数	同定された菌種	
			菌種	株数
1期	堆肥	19	<i>Serratia marcescens</i>	9
			<i>Leclercia adecarboxylata</i>	5
			<i>Enterobacter cloacae</i>	2
			<i>Leclercia amnigena</i>	1
			<i>Ochrobactrum intermedium</i>	2
	土（播種後1日経過）	21	<i>Serratia marcescens</i>	8
			<i>Leclercia adecarboxylata</i>	6
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	2
			<i>Enterobacter cloacae</i>	3
			<i>Enterobacter ludigii</i>	1
	土（播種後7日）	23	<i>Enterobacter asburiae</i>	1
			<i>Enterobacter cloacae</i>	8
			<i>Enterobacter asburiae</i>	8
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	4
			<i>Serratia marcescens</i>	2
			<i>Enterobacter kobei</i>	1

	土（播種後28日）	20	<i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	10 10
	土（播種後60日）	23	<i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Kosakonia cowanii</i> <i>Klebsiella variicola</i> <i>Cronobacter sp</i> <i>Enterobacter kobei</i>	10 6 2 1 1 1 1 1
	土（収穫日）	24	<i>Klebsiella variicola</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Klebsiella aerognes</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	10 6 5 2 1
	デントコーン（60日根）	11	<i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Serratia fonnicola</i> <i>Siccibacter turicensis</i> <i>Pantoea ananatis</i>	2 1 4 2 2
	デントコーン（60日茎）	21	<i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Pantoea ananatis</i> <i>Enterobacter kobei</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Citrobacter braakii</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	10 2 4 1 1 1 2
	デントコーン（収穫日根）	24	<i>Pantoea ananatis</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Serratia fonnicola</i> <i>Leclercia amnigena</i>	16 4 2 2
	デントコーン（収穫日茎）	24	<i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Pantoea ananatis</i> <i>Kosakonia cowanii</i> <i>Raoultella ornithinolytica</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella variicola</i> <i>Leclercia adecarboxylata</i>	6 5 4 4 2 1 1 1
2 期	堆肥	23	<i>Enterobacter cloacae</i>	23
	土（施肥前）	19	<i>Klebsiella variicola</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Pantoea anthophila</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea ananatis</i> <i>Klebsiella aerognes</i>	8 3 3 2 1 1 1
	土（播種後1日経過）	4	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter ludigii</i> <i>Enterobacter bugandensis</i>	2 1 1
	土（播種後7日）	19	<i>Enterobacter bugandensis</i> <i>Klebsiella aerognes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella variicola</i>	8 3 1 7
	土（播種後28日）	24	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella variicola</i> <i>Enterobacter asburiae</i>	8 6 4

			<i>Kosakonia cowanii</i>	3
			<i>Cronobacter</i> sp	1
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	1
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	土（播種後60日）	11	<i>Klebsiella variicola</i>	3
			<i>Enterobacter kobei</i>	2
			<i>Kosakonia cowanii</i>	2
			<i>Enterobacter asburiae</i>	1
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	1
			<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
			<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
	土（収穫日）	22	<i>Enterobacter asburiae</i>	17
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	3
			<i>Klebsiella variicola</i>	1
			<i>Enterobacter kobei</i>	1
	デントコーン（60日根）	24	<i>Klebsiella variicola</i>	16
			<i>Pantoea ananatis</i>	5
			<i>Enterobacter asburiae</i>	2
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	1
	デントコーン（60日茎）	23	<i>Klebsiella variicola</i>	10
			<i>Pantoea ananatis</i>	7
			<i>Pantoea anthophila</i>	3
			<i>Pantoea dispersa</i>	1
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1
			<i>Enterobacter ludwigii</i>	1
	デントコーン（収穫日根）	13	<i>Enterobacter asburiae</i>	7
			<i>Klebsiella variicola</i>	4
			<i>Pantoea dispersa</i>	2
	デントコーン（収穫日茎）	22	<i>Enterobacter asburiae</i>	13
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	5
			<i>Klebsiella variicola</i>	3
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	デントコーン（収穫日実）	24	<i>Enterobacter asburiae</i>	9
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	5
			<i>Enterobacter cancerogenus</i>	4
			<i>Pantoea ananatis</i>	4
			<i>Klebsiella variicola</i>	1
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1

【アンピシリン耐性大腸菌群】

	サンプル	同定に用いた 菌株数	同定された菌種	
			菌種	株数
1 期	堆肥	6	<i>Enterobacter cloacae</i>	3
			<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	1
			<i>Leclercia amnigena</i>	2
	土（播種後1日経過）	4	<i>Enterobacter cloacae</i>	3
			<i>Enterobacter ludigii</i>	1
	土（播種後7日）	5	<i>Enterobacter asburiae</i>	5
	土（播種後28日）	7	<i>Enterobacter asburiae</i>	4
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	3
	土（播種後60日）	22	<i>Enterobacter bugandensis</i>	10
			<i>Enterobacter asburiae</i>	9
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1
			<i>Enterobacter kobei</i>	1
			<i>Enterobacter ludigii</i>	1
	土（収穫日）	23	<i>Enterobacter asburiae</i>	12

			<i>Enterobacter bugandensis</i>	9
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1
			<i>Enterobacter kobei</i>	1
	デントコーン (60日根)	18	<i>Enterobacter bugandensis</i>	11
			<i>Enterobacter asburiae</i>	2
			<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1
	デントコーン (60日茎)	16	<i>Enterobacter cloacae</i>	4
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	9
			<i>Enterobacter asburiae</i>	2
			<i>Enterobacter cloacae</i>	5
	デントコーン (収穫日根)	20	<i>Enterobacter asburiae</i>	10
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	9
	デントコーン (収穫日茎)	24	<i>Pantoea ananatis</i>	1
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	15
			<i>Enterobacter asburiae</i>	6
			<i>Enterobacter cloacae</i>	3
2 期	堆肥	23	<i>Enterobacter bugandensis</i>	17
			<i>Klebsiella aerognes</i>	4
			<i>Enterobacter kobei</i>	2
	土 (施肥前)	8	<i>Enterobacter cloacae</i>	6
			<i>Enterobacter asburiae</i>	2
	土 (播種後1日経過)	2	<i>Enterobacter bugandensis</i>	2
	土 (播種後7日)	19	<i>Enterobacter cloacae</i>	5
			<i>Enterobacter asburiae</i>	3
			<i>Enterobacter kobei</i>	2
	土 (播種後28日)	24	<i>Enterobacter bugandensis</i>	9
			<i>Enterobacter asburiae</i>	7
			<i>Enterobacter kobei</i>	7
			<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	土 (播種後60日)	17	<i>Enterobacter bugandensis</i>	8
			<i>Enterobacter asburiae</i>	3
	土 (収穫日)	22	<i>Klebsiella aerognes</i>	3
			<i>Enterobacter kobei</i>	2
	デントコーン (60日根)	24	<i>Enterobacter asburiae</i>	11
			<i>Enterobacter cloacae</i>	5
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	4
			<i>Enterobacter kobei</i>	2
	デントコーン (60日茎)	23	<i>Enterobacter asburiae</i>	17
			<i>Enterobacter cloacae</i>	3
			<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	2
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	1
			<i>Enterobacter kobei</i>	1
	デントコーン (60日茎)	23	<i>Enterobacter cloacae</i>	12
			<i>Enterobacter asburiae</i>	7
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	3
			<i>Enterobacter kobei</i>	1
	デントコーン (収穫日根)	24	<i>Enterobacter asburiae</i>	15
			<i>Enterobacter cloacae</i>	6
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	3
	デントコーン (収穫日茎)	21	<i>Enterobacter cloacae</i>	11
			<i>Enterobacter asburiae</i>	7
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	2
			<i>Klebsiella variicola</i>	1
	デントコーン (収穫日実)	16	<i>Enterobacter bugandensis</i>	12
			<i>Enterobacter asburiae</i>	4

表7に、各サンプルから単離した大腸菌群株及びアンピシリン耐性大腸菌群の菌種同定の結果を示す。第1期の大腸菌群における菌叢解析の結果において、堆肥の主要な菌種は、*Serratia marcescens*、*Leclercia adecarboxylata*、*Enterobacter cloacae*であった。これら堆肥中に含まれる主要な菌種は、試験期間を通して、播種1日、7日、28日、収穫時における土壌で検出された。大腸菌群の分離菌種において、連続的ではないが、堆肥から土壌との共通性が確認された。しかしながら、収穫時におけるデントコーンの茎と根からは、堆肥の主要な菌種は検出されなかった。第1期のアンピシリン耐性大腸菌群の菌叢解析では、堆肥中の主要な菌種は、*E. cloacae*、*Leclercia amnigena*、*Enterobacter xiangfangensis*であり、ノーマルな大腸菌群とアンピシリン耐性大腸菌群の菌叢が異なった。しかしながら、土壌、デントコーンの主要菌種は、*Enterobacter bugandensis* と *Enterobacter asburiae* であり、堆肥の主要なアンピシリン耐性大腸菌群の菌種とは異なった。

第2期の大腸菌群における菌叢解析の結果において、堆肥の主要な菌種は、*E. cloacae*であった。*E. cloacae* は、試験期間を通して、播種1日、28日における土壌、播種60日におけるデントコーンの茎および収穫時におけるデントコーンの茎と実で検出された。第2期における堆肥のアンピシリン耐性大腸菌群の主要な菌種は *E. cloacae* であり、全株の70% (17/23株) を占めた。土壌とデントコーンからも連続して *E. cloacae* が検出されたが、コーンの実からは検出されなかった。

調査期間を通して、土壌とデントコーンにおけるアンピシリン耐性大腸菌群の主要な菌種は *E. bugandensis* と *E. asburiae* であったが、*E. asburiae* は堆肥から検出されなかった。アンピシリン耐性大腸菌群の菌種の解析結果に基づいて、堆肥からの土壌とデントコーンへのアンピシリン耐性大腸菌群の伝播・拡散を検討したが、明瞭な結果は得られなかった。本調査結果からは、堆肥から作物へのアンピシリン耐性大腸菌群の伝播の可能性は低いことが推察された。

[試験3の結果]

表8. アンピシリン耐性大腸菌群における ESBL 産生疑い株の判定結果

		検査株数	ESBL 産生疑い株数
1期	堆肥	6	0
	土	63	5
	デントコーン (根)	38	1
	デントコーン (茎)	40	6
2期	堆肥	23	0
	土	92	5
	デントコーン (根)	48	1
	デントコーン (茎)	44	2
	デントコーン (実)	24	0

第1期と第2期にわたって、堆肥から単離されたアンピシリン耐性大腸菌群株からは、ESBL 産生疑い株は検出されなかった(表8)。したがって、堆肥からの大腸菌群の ESBL 産生疑い株の伝播の可能性は極めて低いと考えられる。アンピシリン耐性大腸菌群として単離した359株のうち、20株(5.6%)が ESBL 産生疑い株として検出された。土壌からはアンピシリン耐性大腸菌群株の6.5% (10/155) が ESBL 産生疑い株として検出された。また、デントコーンの根と茎からは、2.3% (2/86) と9.5% (8/84) の ESBL 産生疑い株がそれぞれ検出された。ESBL 産生疑い株は、土壌からのデントコーンへの伝播の可能性が示

唆されたが、ESBL 産生疑い株の起源は不明である。なお、デントコーンの実からは ESBL 産生疑い株は検出されなかった。

[試験 4 の結果]

表9. ESBL 産生疑い株における関連遺伝子型の保有結果

対象株	株リスト (採取日, サンプル, 株番号)	菌種	TEM	SHV	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-9
1	6/10 土3-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	-	-	-	-
2	6/10 土5-2	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	+	-	-	-
3	6/10 土5-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	-	-	-	-
4	6/10 土5-4	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	+	-	-	-
5	6/17 土5-4	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	-	+	-	-
6	7/26 土4-3	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	+	-	-	-
7	7/26 茎4-1	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	+	-	-	-
8	7/26 茎4-2	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	-	-	-	-
9	7/26 茎4-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	-	+	-	-
10	7/26 茎4-4	<i>Enterobacter bugandensis</i>	+	-	+	-	-
11	7/26 根1-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	-	+	-	-	-
12	7/26 根6-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	-	-	-
13	8/27 土1-1	<i>Klebsiella aerognes</i>	+	-	-	-	-
14	9/17 土3-1	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	+	-	-	-
15	9/17 土3-2	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	+	-	-	-
16	9/17 土3-3	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	+	-	-	-
17	10/18 土4-1	<i>Enterobacter kobei</i>	-	+	-	-	-
18	11/18 茎3-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	-
19	11/18 茎6-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	-	-	+
20	11/18 根1-4	<i>Enterobacter asburiae</i>	-	+	-	-	-

ESBL 産生疑い株20株の菌種は、*Enterobacter bugandensis*が9株、*Enterobacter asburiae*が6株、*Enterobacter cloacae*が3株、*Klebsiella aerognes*と *Enterobacter kobei*はともに1株ずつ検出された(表9)。ESBL の遺伝子型は、SHV 型が10株、TEM 型が2株、CTX-M-1が2株、CTX-M-9が1株、TEM 型と CTX-M-1が共に見られた株が1株、残りの4株は ESBL 遺伝子がマルチプレックス PCR では検出されなかつ

た。最も多く検出された SHV 型が検出された菌種は、*Enterobacter asburiae* が6株、*Enterobacter bugandensis* が3株、*Enterobacter kobei* が1株であった。また、CTX-M-2は20株すべてから検出されなかった。

[試験 5 の結果]

表10. ESB� 産生疑い株の薬剤耐性プロファイル (MIC 試験結果)

対象株	ABPC	CFZ	CTX	GM	KM	IPM	NA	CIP	TC	CHL
1	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
2	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
3	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
4	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
5	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
6	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
8	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
9	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
10	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
11	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
12	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
13	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
14	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
15	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
16	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
17	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S
18	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
19	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
20	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S

S:感受性, I:中度耐性, R:耐性

表11. ESBL産生疑い株の類似性比較

試料名	菌種	薬剤耐性	遺伝子型
第1期(播種60日)土壌3-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	ND
第1期(播種60日)土壌5-2	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	SHV
第1期(播種60日)土壌5-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	ND
第1期(播種60日)土壌5-4	<i>Enterobacter asburiae</i>	ABPC, CEZ	SHV
第1期(播種60日)デントコーン茎5-4	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ, CTX	CTX-M-1
第1期(収穫日)土壌4-3	<i>Enterobacter asburiae</i>	ABPC, CEZ	SHV
第1期(収穫日)デントコーン茎4-1	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	SHV
第1期(収穫日)デントコーン茎4-2	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	ND
第1期(収穫日)デントコーン茎4-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	CTX-M-1
第1期(収穫日)デントコーン茎4-4	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	TEM, CTX-M-1
第1期(収穫日)デントコーン根1-3	<i>Enterobacter bugandensis</i>	ABPC, CEZ	SHV
第1期(収穫日)デントコーン根6-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	ABPC, CEZ	TEM
第2期(播種7日)土壌1-1	<i>Klebsiella aerogenes</i>	ABPC, CEZ	TEM
第2期(播種28日)土壌3-1	<i>Enterobacter asburiae</i>	ABPC, CEZ	SHV
第2期(播種28日)土壌3-2	<i>Enterobacter asburiae</i>	ABPC, CEZ	SHV
第2期(播種28日)土壌3-3	<i>Enterobacter asburiae</i>	ABPC, CEZ	SHV
第2期(播種60日)土壌4-1	<i>Enterobacter kobei</i>	ABPC, CEZ	SHV
第2期(収穫日)デントコーン茎3-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	ABPC, CEZ, CTX	ND
第2期(収穫日)デントコーン茎6-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	ABPC, CEZ, CTX	CTX-M-9
第2期(収穫日)デントコーン根1-4	<i>Enterobacter asburiae</i>	ABPC, CEZ, CTX	SHV

表10に、ESBL 産生疑い株 (20株) の薬剤耐性プロファイルを示す。アンピシリン添加培地から分離された株は、アンピシリン耐性大腸菌群株であるため、アンピシリン (ABPC) に対して、全て耐性を示した。また、全ての ESBL 産生疑い株がセファゾリン (CFZ) にも耐性を示した。さらに、CTX に耐性を示した株が4株で検出されが、菌種は *E. bugandensis*、*E. cloacae*、*E. asburiae* であった。そこで、菌種、10種の抗菌薬に対する薬剤耐性プロファイル、ESBL 関連遺伝子から類似性を総合的に比較した (表11)。第1期の試料についてみると、土壌とデントコーンの ESBL 産生疑い株において、菌種が同一の *E. bugandensis* であり、ABPC と CEZ に耐性を有し、かつ SHV 遺伝子を保有している株が確認された。土壌からデントコーンへの伝播の可能性が考えられる。また、ABPC と CEZ に耐性を有し、かつ SHV 遺伝子を保有している *E. asburiae* が採取日の異なる60日と収穫日の土壌から検出された。一方の第2期では、土壌とデントコーンからは、菌種、耐性抗菌薬、および ESBL 関連遺伝子が全て一致する株は、確認されなかった。しかし、第1期と同様に、28日と60日の土壌から全ての特徴が一致する *E. asburiae* 株が検出されており、長期間にわたって同一の ESBL 産生疑い株が畑の土壌に生残していることが示唆された。

総括

住吉牧場における本調査研究で得られた情報・知見を以下に総括する。

- ・本牧場において堆肥 (完熟乾燥処理) が薬剤耐性菌の拡散に関わる可能性は極めて低い。
- ・土壌とデントコーン (茎部と根部) には、ESBL 産生菌を含むアンピシリン耐性大腸菌群が存在する。

重要菌種は、*E. bugandensis*、*E. cloacae*、*E. asburiae* である。

- ・堆肥以外の要因を明確にすることはできなかったが、野生動物などを介して薬剤耐性菌が農作物に伝播する可能性がある。

【参考文献】

Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multi

plex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

(2)のア、イにおいて、農場-土壌-作物における薬剤耐性菌及び耐性遺伝子の伝播の可能性について検証を行った。日本の北部の酪農学園大学と南部の宮崎大学の附属農場において試験を行ったが、耐性菌及び耐性遺伝子の家畜から土壌への伝播については、いずれの農場においても伝播の可能性は否定できないものの頻度や量は少ないことが示唆された。また、家畜排泄物処理物中に含まれる家畜由来細菌の量については、北部と南部という地理的な気候要因以上に、家畜排泄物の処理法による違いが大きいと考えられた。

（３）家畜、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析に関する研究

ア．家畜が保有する薬剤耐性菌の解析（嶋崎洋子（動物医薬品検査所）、臼井優（酪農学園大学））

動物由来薬剤耐性菌モニタリング（JVARM）により収集された家畜由来大腸菌のうちアンピシリンに耐性を示す株（ABPC 耐性株）について、系統発生分類及び β ラクタマーゼ遺伝子の解析を実施した。また、 β ラクタマーゼ遺伝子保有株については「（５）分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

研究内容・方法

本研究は、家畜への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌又は耐性遺伝子が食品等を介してヒトへ伝播し、直接あるいは間接的にヒトの細菌感染症の治療を困難にする危険性を評価するものである。本研究の課題のうち、牛、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析のため、動物医薬品検査所のJVARMで収集された株について解析した。対象とする家畜由来大腸菌は、と畜場において健康な牛より採取した直腸便から分離されたものを主体とし、比較参考として家畜保健衛生所において病畜から採取した牛由来大腸菌、また、と畜場において健康豚の直腸便から分離した豚由来大腸菌についても解析した。対象菌株についてアンピシリン、セファゾリン（CEZ）及びセフトキシム（CTX）に対する薬剤感受性を確認し、ABPC耐性株については、系統発生分類（Clermontら（2013）の報告）及び β -ラクタマーゼ遺伝子型別（Dalleneら（2010）の報告）による性状解析を行った。

研究結果

2015～2019年に収集した牛由来大腸菌1261株のうち、ABPC耐性株は86株（6.8％）であり、CEZ及びCTXに耐性の株は、それぞれ11株（0.9％）及び2株（0.3％）であった。ABPC耐性株について系統発生分類を確認した結果、系統型B1が48株（55.9％）と半数以上を占めた（表12）。ABPC耐性株のうち75株（87.2％）で β -ラクタマーゼ遺伝子が確認され、その殆ど（72株）はTEM型であり、その他にSHV型、CTX-M1型、CTX-M9型及びCIT型が各1株から検出された（表13）。

また、2018年に収集された病気の牛由来大腸菌87株について解析した結果、ABPC耐性株は45株（51.7％）であり、系統発生分類は系統型B1が25株（55.6％）と半数以上を占めた。ABPC耐性株中 β -ラクタマーゼ遺伝子を保有する41株ではTEM型が最も優勢（40株（88.9％））であり、次いでCTX-M9型が5株（11.1％）で検出された。

健康な豚由来大腸菌については、2016～2019年に収集した336株のうちABPC耐性株は116株（34.5％）であり、CEZ及びCTXに耐性の株は、それぞれ11株（3.3％）及び4株（1.2％）であった。ABPC耐性株の系統発生分類では、系統型B1及び系統型Aが多く、それぞれ50株（43.1％）及び45株（38.8％）と全体の8割以上を占めた。また、 β -ラクタマーゼ遺伝子は114株（98.3％）で確認され、そのうち112株（96.6％）はTEM型であり、その他にCTX-M9が3株（2.6％）から検出された。

以上より家畜由来のABPC耐性大腸菌においては、系統学的分類として牛由来株はB1、豚由来株はB1及びAが最も優勢であること、ABPC耐性大腸菌の約9割が β -ラクタマーゼ遺伝子を保有し、その殆どはTEM型であることが明らかとなった。なお、病気の牛から分離した大腸菌ではABPC耐性株の分離率やCTX-M型遺伝子の保有率は健康な牛由来大腸菌よりも高いものの、系統学的分類及び β -ラクタマーゼ遺伝子の保有状況は健康な牛由来株と同じ傾向が確認された。

β ラクタマーゼ遺伝子のうちTEM型、CTX-M1型及びCTX-M9型が確認された228株（一部の株は複数の型を保有）については「（５）分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含

めた比較解析を行った。

表12. 家畜由来ABPC耐性大腸菌の系統発生分類結果

由来		分離年	ABPC 耐性株	系統型								
				A	B1	B2	C	D	E	F	clade I	型別 不能
牛	健康	2015～2019	86 (%)	9 (7.4)	48 (55.9)	0	0	5 (4.4)	6 (5.9)	0	0	18 (26.5)
	病気	2018	45 (%)	8 (17.8)	25 (55.6)	0	2 (4.4)	4 (8.9)	2 (4.4)	3 (6.7)	0	1 (2.2)
豚	健康	2016～2019	116 (%)	45 (38.8)	50 (43.1)	3 (2.6)	7 (6.0)	1 (0.9)	2 (1.7)	4 (3.4)	2 (1.7)	2 (1.7)

表13. 家畜由来ABPC耐性大腸菌のβ-ラクタマーゼ遺伝子(*bla*)保有状況

由来		分離年	ABPC 耐性株	<i>bla</i> 保有株	<i>bla</i> 型				
					TEM	SHV	CTX-M1	CTX-M9	CIT
牛	健康	2015～2019	86 (%)	75 (87.2)	72 (83.7)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)	1 (1.2)
	病気	2018	45 (%)	41 (91.1)	40 (88.9)	1 (2.2)	2 (4.4)	5 (11.1)	0
豚	健康	2016～2019	116 (%)	114 (98.3)	112 (96.6)	0	0	3 (2.6)	1 (0.9)

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

イ、排水に存在する薬剤耐性菌の解析（島本整（広島大学）、浅井鉄夫（岐阜大学）臼井優（酪農学園大学））

A、浅井(岐阜大学)

肉牛、肉用鶏、採卵鶏農場では污水处理施設を保有しないため、岐阜県内の豚 4 農場の污水处理施設からの排水を採取した。また、養豚場 4 施設に加えて、牛豚のと場 2 施設、食鳥処理場 2 施設の污水处理施設の計 4 施設の排水を対象とした。いずれの污水处理施設にいても処理前及び処理後のものを採水した。

【材料と方法】

表 14 のとおりサンプルを採取した。

表 14. サンプル詳細

由来污水处理施設		サンプル数 (1 サンプルあたり 100 ml の排水を採水)		サンプル採取日
		処理前	処理後	
豚農場	①	1	1	2020 年 7 月 7 日
	②	1	1	2020 年 7 月 14 日
	③	1	1	2020 年 7 月 31 日
	④	1	1	2020 年 7 月 31 日
と畜場	①	1	1	2020 年 8 月 3 日
	②	1	1	2020 年 7 月 8 日
食鳥処理場	①	1	1	2020 年 6 月 18 日
	②	1	1	2020 年 7 月 15 日

それぞれのサンプルを 10 倍に連続希釈し、それぞれ 100 μ l をクロモアガーECC 培地及びアンピシリン(100mg/l)添加クロモアガーECC 培地へコンラージ棒で塗布し、培養後、大腸菌のコロニー数をカウントした。アンピシリン添加培地にて得られたコロニー数を無添加培地のコロニー数で除することで、アンピシリン耐性菌の割合を算出した（試験 1）。

また、1 サンプル当たり無添加培地において大腸菌が疑われる青色コロニーから最大 3 株を単離し、API20E を用いて菌種を同定し、微量液体希釈法により ABPC、KM、TC、NA、CPFX、CP、ST、CEZ、CTX、MEPM、GM 及び CL に対する薬剤感受性試験を微量液体希釈法で実施した。ブレイクポイント（BP）は CLSI を参照した。（試験 2）

さらに、アンピシリン添加培地より得られたアンピシリン耐性大腸菌株の、 β ラクタマーゼの型別を、既報の multiplex PCR により実施した（Dallene ら（2010）の報告）。（試験 3）

最後に、大腸菌の系統発生分類を既報の multiplex PCR により実施した（Clermont ら（2013）の報告）（試験 4）

【結果と考察】

試験 1 の結果を表 15 に示す。豚農場の污水处理後の排水に含まれるアンピシリン耐性大腸菌数は <10~1700CFU/ml で、放出される大腸菌のうち、30~40%の割合でアンピシリン耐性が認められた。

一方、と畜場及び食鳥処理場の処理水ではほとんど大腸菌が認められなかった。これは、汚水処理施設の処理能力に起因していることが示唆された。

表 15. 排水に存在する大腸菌数とアンピシリン耐性大腸菌数

区分	記号	汚水処理前 大腸菌数 CFU/ml (参考)	汚水処理後 大腸菌数 CFU/ml	処理後/ 処理前 (%)	汚水処理後 アンピシリン 耐性大腸菌 CFU/ml	AMP 耐性%
農場 (豚)	PA	216,000	4,300	1.99	1700	39.5
	PB	74,000	840	1.14	240	28.6
	PC	37,000	<10	<0.03	<10	NA
	PD	351,000	150	0.04	40	26.7
食肉処理場	SA (鶏)	87,000	<10	<0.01	<10	NA
	SB (牛豚)	10,300	600	5.83	<10	NA
	SC (鶏)	33,000	<10	<0.03	<10	NA
	SD (牛豚)	10,400	10	0.10	<10	NA

試験 2 の結果を表 16 に示す。4 農場の汚水処理前後の排水から 18 株、2 食鳥処理施設の汚水処理前後の排水から 7 株、2 と畜場の汚水処理前後の排水から 10 株を分離した。

分離された大腸菌 35 株の薬剤感受性を調べたところ、7 薬剤に対する耐性が認められ、ABPC と TC に対する耐性割合が高かった。CEZ、CTX、MEPM、GM および CL に対する耐性は認められなかった。

ABPC 耐性を示した 16 株について β ラクタマーゼの型別を実施したところ、全て 16 株の ABPC 耐性菌は *bla*_{TEM} を保有していた。

表 16. 由来別汚水処理前後の排水から分離した大腸菌の薬剤感受性

	ABPC	KM	TC	NA	CPFX	CP	ST
養豚場 (n=18)	8 (44.4)	0	7 (38.9)	0	0	2 (11.0)	4 (22.2)
食鳥処理場 (n=7)	5 (71.4)	2 (28.6)	6 (85.7)	1 (14.3)	0	0	3 (42.9)
と畜場 (n=10)	3 (30.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	1 (10.0)
総計 (n=35)	16 (45.7)	3 (8.6)	15 (42.9)	2 (5.7)	1 (2.9)	3 (8.6)	8 (22.9)

株数を示し、カッコ内の数値は%を示す。

アンピシリン添加培地より分離された食鳥処理施設の処理前排水由来のアンピシリン耐性株3株、食鳥処理施設の処理前排水由来を3株、農場の処理前後排水由来24株の β ラクタマーゼ型を調べたところ、全て *bla*_{TEM} を保有していた。 β ラクタマーゼ遺伝子保有株については「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

試験4の結果を図9に示す。養豚場の排水から分離した大腸菌の系統は、A0、A1およびB1が主で、その他、B2とD1が認められた。養豚場排水由来大腸菌では、アンピシリン添加の有無に関わらずA0、A1およびB1が同程度の割合であった。食鳥処理場排水由来大腸菌では、アンピシリン非添加培地で分離した株はB1が優勢で、アンピシリン添加培地で分離した3株では、2株がA0であった。と畜場由来サンプルからアンピシリン非添加培地で分離した株の構成比はBIタイプが主で、アンピシリン添加培地で分離した3株では、A0、A1及びB1が1株ずつ認められた。

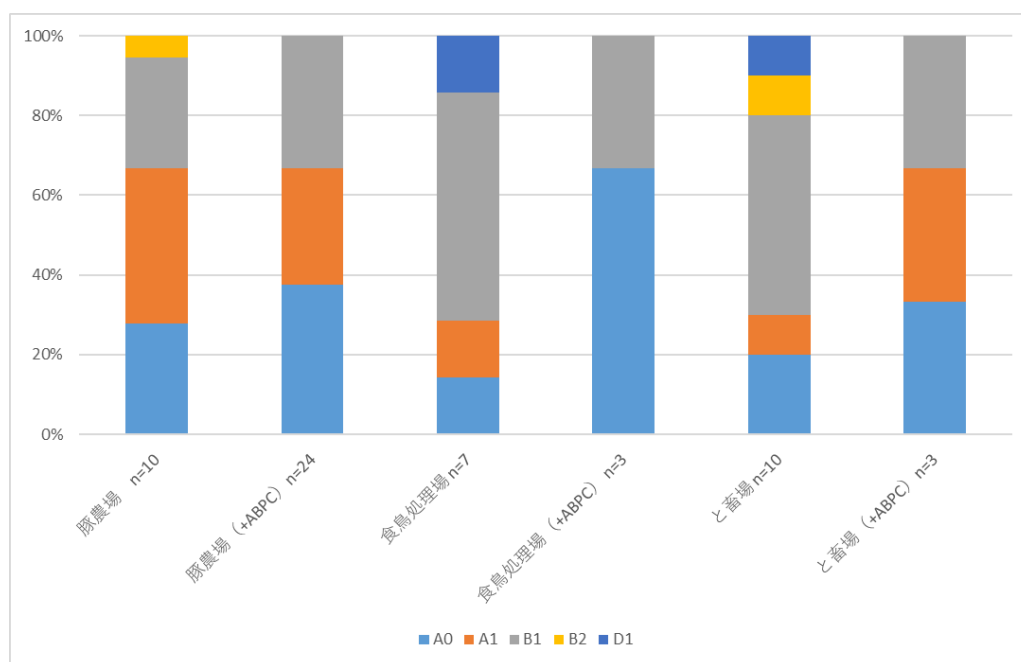


図9. 由来別大腸菌の系統分類

(+ABPC は、アンピシリン添加培地で分離された大腸菌の結果を示す)

β ラクタマーゼ遺伝子のうちTEM型が確認された株については「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

B. 臼井（酪農学園大学）

北海道オホーツク地域において、10 酪農場の排水が流入する河川水 10 箇所を対象に、農場から 50m 以内の水を採水し、大腸菌、アンピシリン耐性大腸菌の分離を行った。

【材料と方法】

採水されたサンプル 10 サンプルについて、クロモアガー-ECC 培地及びアンピシリン含有(100mg/L) クロモアガー-ECC 培地を用いて大腸菌の分離を行った。サンプル当たり大腸菌が疑われるコロニー3 株を単離し、MALDI-TOF MS を用いて同定し、微量液体希釈法により薬剤感受性試験を行った(12 薬剤)。βラクタマーゼの型別は、既報の multiplex PCR により実施した (Dallene ら (2010) の報告)。大腸菌の系統分類は、既報の multiplex PCR により実施した (Clermont ら (2013) の報告)

【結果と考察】

合計 57 株の大腸菌が分離された。そのうち、14 株がアンピシリン耐性大腸菌であった。アンピシリン耐性大腸菌の性状を以下の表 17 に示す。

14 株中 11 株は *bla*_{TEM} 遺伝子、3 株は *bla*_{CTX-M} 遺伝子を保有していた。また、系統発生分類の結果、2 株が A 型、7 株が B1、5 株が D 型であった。これらの株のうち、*bla*_{TEM} 陽性株 7 株について、他の由来とのゲノム比較のため NGS 解析を実施し「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

表 17. 酪農場流入河川由来アンピシリン耐性大腸菌の性状

Strain Name	Origin	系統分類	<i>bla</i> gene	MIC (mg/L)												NGS解
				ABPC	CEZ	CTX	SM	GM	KM	TC	NA	CPFX	CL	CP	TMP	
9-2	オホーツク 9	B1	TEM	>128	16	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.25	>128	>16	実施
1A-1	オホーツク 1	D	TEM	>128	16	≦0.5	>128	4	>128	>64	>128	>4	0.25	>128	≦0.25	実施
1A-2	オホーツク 1	A	TEM	>128	>128	2	>128	4	>128	>64	>128	0.5	1	>128	≦0.25	実施
1A-3	オホーツク 1	D	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	>128	>4	0.25	>128	≦0.25	
4A-1	オホーツク 4	A	TEM	>128	16	≦0.5	>128	4	16	>64	4	0.06	1	8	>16	実施
4A-3	オホーツク 4	B1	TEM	>128	16	≦0.5	>128	4	>128	>64	>128	>4	1	>128	0.5	実施
6A-1	オホーツク 6	D	CTX-M-1	>128	>128	>64	32	4	16	2	2	0.06	1	8	≦0.25	実施
6A-2	オホーツク 6	D	CTX-M-1	>128	>128	>64	16	4	16	2	2	≦0.03	0.5	8	≦0.25	
6A-3	オホーツク 6	D	CTX-M-1	>128	>128	>64	32	2	16	2	2	≦0.03	0.5	8	≦0.25	
7A-1	オホーツク 7	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	16	>64	2	≦0.03	1	4	≦0.25	実施
7A-3	オホーツク 7	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	16	>64	4	0.06	0.5	8	≦0.25	
9A-1	オホーツク 9	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.5	>128	>16	
9A-2	オホーツク 9	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.5	>128	>16	
9A-3	オホーツク 9	B1	TEM	>128	8	≦0.5	>128	2	>128	>64	4	≦0.03	0.5	>128	>16	

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

C. 島本

【研究内容・方法】

広島県内（6カ所）の下水処理施設の放流口付近より環境水（河川水または海水）を3回ずつ採取した（表18）。具体的には、汚水と雨水を同じ管に流して集める合流式処理施設が3カ所、汚水と雨水を別の管で集める分流式の処理施設が3カ所である。また、下水処理水の放流口が河川となっている施設が1カ所（淡水）、放流口が河口付近の河川である施設が2カ所（汽水）、放流口が海である施設が3カ所（海水）である。

表 18. 下水処理施設の情報とサンプリング実施日

サンプリング 場所	処理方法	水域	実施日		気温 (°C)	備考
A	分流式	淡水	1	2020/12/16	3.0	
			2	2021/6/8	25	
			3	2021/10/18	19	
B	合流式	汽水	1	2021/4/15	14	2回目のサンプリング時は前日の天気が雨
			2	2021/6/14	23	
			3	2021/11/26	14	
C	合流式	汽水	1	2021/4/15	14	2回目のサンプリング時は前日の天気が雨
			2	2021/6/14	23	
			3	2021/12/7	11	
D	分流式	海水	1	2021/5/11	20	
			2	2021/6/21	27	
			3	2021/10/18	19	
E	合流式	海水	1	2021/5/11	20	
			2	2021/6/21	27	
			3	2021/10/18	19	
F	分流式	海水	1	2021/6/14	23	満潮時にサンプリング
			2	2021/11/26	14	
			3	2021/12/7	11	

採水サンプルから細菌を分離するにあたり、採水サンプルを濃縮するため、以下の方法でフィルターろ過を行った。孔径 0.2 μm のメンブレンフィルター（Mixed Cellulose Ester、ADVANTEC）を使用して 1 L の採水サンプルをろ過した。フィルターを 10 mL の PBS（phosphate buffered saline、リン酸緩衝生理食塩水）の中に入れてボルテックスミキサーで激しく攪拌したものを 100 倍濃縮原液とした。濃縮原液を PBS で適切に希釈し、一般生菌数については標準寒天培地（NA）、アンピシリン耐性菌数は NA に 100 mg/L のアンピシリンを添加した培地（NA100）に 100 μL ずつ塗抹し、37°C で 24 時間培養した。3 枚の NA に生育したコロニー数をカウントして平均値を求め生菌数とした。また、3 枚の NA100 に生育したコロニー数をカウントして平均値を求めてアンピシリン耐性菌数とした。アンピシリン耐性化率（%）を（アンピシリン耐性菌数）／（生菌数） $\times 100$ によって求めた。

大腸菌群および腸内細菌科細菌を分離するため、濃縮原液を CHROMagar ECC および 100 mg/L アンピシリン添加 CHROMagar ECC に塗抹し、大腸菌である可能性が高い青色コロニーと大腸菌群である可能性が高い赤色コロニーの中から 3 個以上選択継代した。また、大腸菌や大腸菌群の細菌が得られにくい可能性を考えて濃縮原液を LB 液体培地に接種して 37°C で一晩増菌培養し、同様に CHROMagar ECC

とアンピシリン添加 CHROMagar ECC に塗抹した。前述の菌原液を塗抹した培地上に生育したコロニーを優先的に選択し、青色または赤色コロニーが得られなかった場合には増菌培養後に CHROMagar ECC (±アンピシリン) に生育した青色または赤色コロニーを選択した。いずれの培地にも青色または赤色コロニーが生育していなかった場合は、白色コロニー (大腸菌群以外) を選択し、以下の実験に用いた。さらに、カルバペネム耐性菌の分離を目的として 2 mg/L のメロペネムを添加した MacConkey 寒天培地を用い、生育したコロニーを選択した。

得られた 231 株の分離株について、 β -ラクタマーゼ遺伝子を中心とした 19 の薬剤耐性遺伝子と rRNA 遺伝子を同時に検出可能な multiplex PCR 法 (EicosaPlex PCR) によって耐性遺伝子の検出を行った (Nariya et al., 2019)。また、薬剤耐性遺伝子を保有していた 57 株について、アンピシリン (ABPC)、アミカシン (AMK)、アズトレオナム (AZT)、セフトジジム (CAZ)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、シプロフロキサシン (CPFX)、セフトキシム (CTX)、メロペネム (MEPM)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST) の 10 剤に対するディスク法を用いた分離菌株の薬剤感受性試験を行った。薬剤ディスクは KB ディスク (栄研化学) を用い、ディスクに添付された判定基準によって感受性の判定を行った。そして、それらの菌株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、菌種の同定を行った。さらに、*bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子が陽性の株については、short read によるドラフトゲノム解析を行い、(感染研・菅井グループ)、「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。

【研究結果・考察】

各採水サンプルにおける一般生菌数とアンピシリン耐性菌数にはばらつきがあり、アンピシリン耐性率は 4.27%~17.1%と大きな開きがあった (図 10)。雨水と汚水を別の管で流す分流式と比較して雨水と汚水を同じ管で流す合流式は、大雨の後に未処理の汚水を河川や海に流すことがあるため、雨の後には下水処理水放流口付近の生菌数が多くなることが予想される。両者を比較すると、生菌数、アンピシリン耐性菌数、いずれも合流式処理場放流水の方が多く (図 11A)、アンピシリン耐性化率も合流式下水処理施設の方が高いことが示された (図 11B)。しかし、数値のばらつきが多かったため統計解析の結果、アンピシリン耐性菌数のみ有意の差が認められた ($p < 0.05$)。

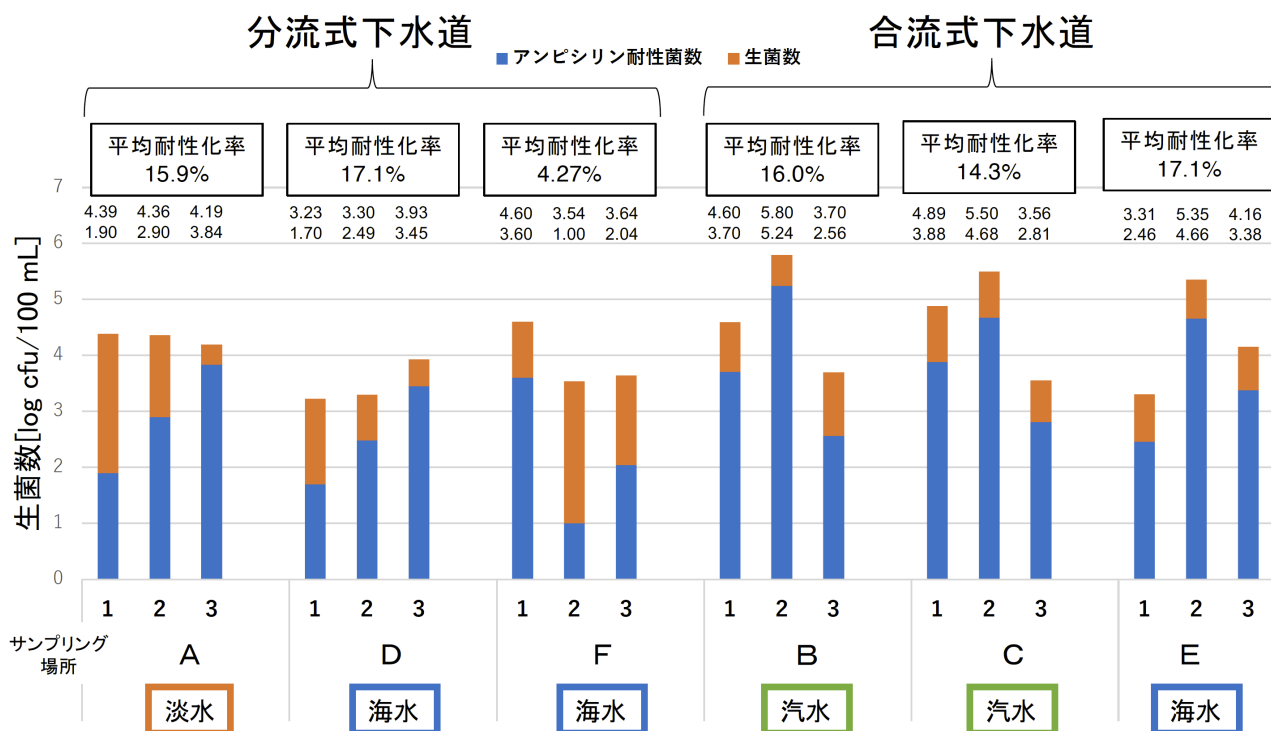


図 10. 各採水地点における生菌数とアンピシリン耐性菌数

左側 3 カ所が分流式下水処理施設、右側 3 カ所が合流式下水処理施設である。各グラフバーのオレンジ色が生菌数、青色がアンピシリン耐性菌数を表しており、上部の数値の上段が生菌数 (log cfu/100 mL)、下段がアンピシリン耐性菌数 (log cfu/100 mL) を表している。また、その上には 3 回のアンピシリン耐性化率の平均値を示した。

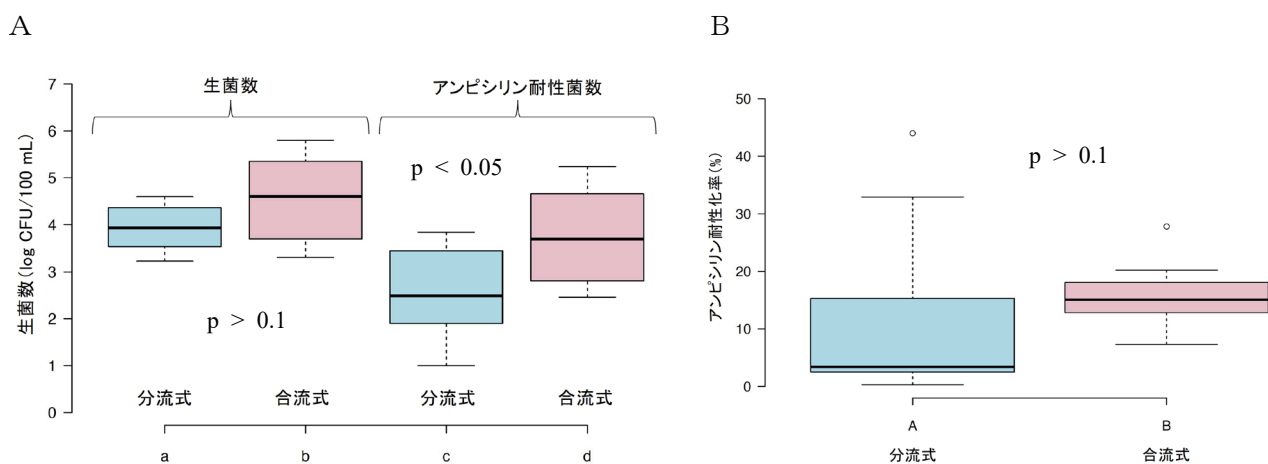


図 11. 下水処理放流水の生菌数とアンピシリン耐性菌数 (A) およびアンピシリン耐性化率 (B) グラフの作成は BoxPlotR (<http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>) によって行った。2 群間の有意差解析は、Wilcoxon の順位和検定 (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/MEPHAS/wilc.html>) を利用した。

計 18 回の採水サンプルより 231 株の分離株が得られた。分離株について EicosaPlex PCR 法による薬剤耐性遺伝子の検出を行った。検出された耐性遺伝子の分布状況を下水処理施設ごとにまとめた (表

19)。 *bla*_{TEM} 遺伝子や ESBL 遺伝子である *bla*_{CTX-M} 遺伝子、耐性遺伝子カセットを転移させるインテグロンが比較的高い頻度で検出された。全体的に合流式下水処理施設の方が耐性遺伝子を保有している割合が高い傾向にあった。

表 19. 各分離菌株の薬剤耐性遺伝子分布

		β-lactamase					<i>aac</i> (6′)-Ib	Integron	
		CTX-M	TEM	SHV	OXA-2	AmpC		<i>intI1</i>	<i>intI2</i>
分流式	A(39株)	3 (7.7)	1 (2.6)	1 (2.6)	—	3 (7.7)	1 (2.6)	3 (7.7)	2 (5.1)
	D(39株)	—	1 (2.6)	—	—	5 (12.8)	—	—	—
	F(35株)	4 (11.4)	4 (11.4)	—	1 (2.9)	2 (5.7)	—	4 (11.4)	1 (2.9)
合流式	B(41株)	9 (22.0)	4 (9.8)	3 (7.3)	—	3 (7.3)	1 (2.4)	3 (7.3)	—
	C(31株)	3 (9.7)	6 (19.4)	—	—	3 (9.7)	1 (3.2)	5 (16.1)	—
	E(46株)	—	5 (10.9)	—	—	9 (19.6)	—	6 (13.0)	—
合計(231株)		19 (8.2)	22 (9.5)	4 (1.7)	1 (0.4)	25 (10.8)	3 (1.3)	20 (8.7)	3 (1.3)

数値は菌株数、括弧内はそれぞれの下水処理施設分離株に占める割合 (%) を表している。

次に、AmpC 以外の耐性遺伝子保有株 (57 株) について、ディスク法による薬剤感受性試験を行った。用いた抗生物質は、表 20 に示す 10 種類である。3 種類以上の異なるグループの抗生物質に耐性を示す多剤耐性菌は 26 株 (45.6%, 26/57) 確認された (サンプリング場所 A: 4 株、B: 8 株、C: 6 株、E: 4 株、F: 4 株) (補助資料 6)。合流式下水処理施設でのみ検出された耐性菌株も比較的多かった (表 20)。また、同じ菌株について 16S rRNA 遺伝子の配列を決定し、菌種の同定を行った。その結果、大腸菌 (*Escherichia coli*) が最も多く 35 株であった (補助資料 6)。次いで多かった菌種は、同じ大腸菌群である肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) が 5 株であった。

表 20. 薬剤耐性遺伝子保有株の薬剤耐性表現型の解析

		AMP	CTX	CAZ	AZT	MEPM	CP	CL	AMK	CPFX	ST
分 流 式	A(9株)	9 (100)	4 (44.4)							4 (44.4)	4 (44.4)
	D(1株)	1 (100)									
	F(11株)	10 (90.9)	4 (27.3)							4 (36.4)	5 (45.5)
合 流 式	B(17株)	17 (100)	8 (47.1)		1 (5.9)		1 (5.9)	3 (23.5)	1 (5.9)	5 (29.4)	8 (47.1)
	C(11株)	11 (100)	3 (27.3)	3 (27.3)	2 (18.2)	2 (18.2)	1 (9.1)		1 (9.1)	4 (36.4)	3 (27.3)
	E(8株)	7 (87.5)					2 (12.5)	2 (25.0)		2 (25.0)	5 (62.5)
合計(57株)		55 (96.5)	19 (33.3)	3 (5.3)	3 (5.3)	2 (3.5)	4 (7.0)	5 (8.8)	2 (3.5)	19 (33.3)	25 (43.9)

各抗生物質欄の数値は菌株数、括弧内はそれぞれの下水処理施設分離株に占める割合 (%) を表している。枠で囲んだ菌株は、合流式下水処理施設でのみ検出されたものを意味する。

ABPC, アンピシリン; AMK, アミカシン; AZT, アズトレオナム; CAZ, セフトアジジム; CL, コリスチン; CP, クロラムフェニコール; CPFX, シプロフロキサシン; CTX, セフトキシム; MEPM, メロペネム; ST, スルファメトキサゾール・トリメトプリム

これらの菌株の中から同一サンプルから分離された類似の菌株を除いた 22 株 (大腸菌 18 株、大腸

菌以外 4 株) の TEM または CTX-M 陽性株について、ドラフトゲノム解析を行った (表 21)。その結果、TEM-1A 保有株が 1 株、TEM-1B 保有株が 7 株、CTX-M-14 保有株が 3 株、CTX-M-27 保有株が 4 株、TEM-1B と CTX-M-14 両保有株が 1 株、TEM-1B と CTX-M-15 両保有株が 2 株、TEM-1B と CTX-M-27 両保有株が 1 株であった。その他には、テトラサイクリン耐性を付与する *tet* 遺伝子、クロラムフェニコール耐性を付与する *catA*、*cmlA*、*floR* 遺伝子、マクロライド耐性を付与する *mph* 遺伝子、ホスホマイシン耐性を付与する *fosA* 遺伝子、キノロン耐性遺伝子 *qnr* や薬剤排出ポンプ遺伝子である *oqxAB* など多数の薬剤耐性遺伝子が検出された。この結果より複数の耐性遺伝子を含む多剤耐性菌が下水放流水を介して拡散している可能性が示唆された。

表 21. *bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子を保有する株のドラフトゲノム解析と耐性表現型解析

菌株名	処理場	菌種	耐性遺伝子	薬剤耐性表現型
CAH-1-1	A	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>mph</i> (A), <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i>	ABPC, CTX, CPFX, ST
CE-1-1	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>sitABCD</i> , <i>mph</i> (A), <i>sul1</i> , <i>qacE</i> , <i>aadA5</i> , <i>dfrA17</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	ABPC, CTX, CPFX, ST
CE-1-2	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{LAP-2} , <i>qnrS1</i> , <i>tet</i> (A), <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>formA</i>	ABPC
CE-1-4	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>sitABCD</i> , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>aph</i> (6)-Id, <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>sul2</i>	ABPC, CP, ST
CAE-1-1	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>formA</i> , <i>sitABCD</i> , <i>mdf</i> (A), <i>dfrA17</i> , <i>aadA5</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>tet</i> (A)	ABPC, CTX, ST
CAE-1-4	B	<i>Raoultella planticola</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>fosA</i> , <i>bla</i> _{PLA2b} , <i>oqxB</i> , <i>oqxA</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>dfrA14</i> , <i>qnrB1</i>	ABPC, CTX, AZT, ST
ME-1-1	B	<i>Morganella morganii</i>	<i>catA2</i> , <i>bla</i> _{DHA-13} , <i>tet</i> (D)	ABPC, CL
CE-2-4	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>mdf</i> (A), <i>aac</i> (3)-IIa, <i>formA</i>	ABPC, CTX, CPFX
CAE-2-4-1	B	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>catA</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>tet</i> (A), <i>tet</i> (B)	ABPC, CTX, CPFX, ST
CS-1-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>formA</i>	ABPC, CPFX
CAS-1-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>aac</i> (3)-IIa	ABPC, CAZ, CTX, AZT, CPFX
CS-2-1-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-27} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>sitABCD</i> , <i>mdf</i> (A), <i>catA</i> , <i>formA</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id, <i>tet</i> (A)	ABPC, CTX, AZT, ST
CS-2-3	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>mdf</i> (A), <i>formA</i> , <i>cmlA1</i> , <i>qacE</i> , <i>tet</i> (B), <i>mph</i> (A), <i>dfrA1</i>	ABPC, CTX, CPFX, ST
CAS-2-1	C	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>aph</i> (6)-Id, <i>dfrA14</i> , <i>sul2</i> , <i>tet</i> (A), <i>sitABCD</i>	ABPC, ST
CAS-2-2	C	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>bla</i> _{CMY-48} , <i>aac</i> (3)-IIa, <i>mph</i> (A), <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i>	ABPC, ST
CT-1-5	D	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>tet</i> (B)	ABPC
CAA-1-1	E	<i>Escherichia coli</i>	<i>mdf</i> (A), <i>formA</i>	ABPC, CPFX, ST
CAA-1-2-①	E	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>tet</i> (B)	ABPC
CAA-1-5-r	E	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>bla</i> _{PLA1b} , <i>fosA</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>floR</i> , <i>tet</i> (A), <i>qnrS1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	ABPC
MA-1-1-b	E	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>catA1</i> , <i>dfrA12</i> , <i>aadA2</i> , <i>qacE</i> , <i>sul1</i> , <i>mph</i> (A), <i>aac</i> (3)-IIa, <i>tet</i> (B)	ABPC, CPFX, ST
CN-1-3	F	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>sitABCD</i>	ABPC, CTX, AZT, ST
CAN-1-3	F	<i>Escherichia coli</i>	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>formA</i> , <i>mdf</i> (A), <i>tet</i> (A), <i>sitABCD</i> , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3'')-Ib, <i>aph</i> (6)-Id	ABPC

ゲノムデータに基づく菌種の同定は DFAST、耐性遺伝子の検出は ResFinder を利用して行った。青字は *bla*_{TEM} 遺伝子、赤字は *bla*_{CTX-M} 遺伝子を表している。薬剤耐性表現型は、ディスク試験の結果耐性を示した薬剤名を記載した。略称は表 3 と同じである。

(注) 当初 26 株についてゲノム解析を行ったが、ゲノム解析の結果同一株であると判断された 4 株についてはすべてのリストから除外した。

【文献】

Nariya H., Soliman, A.M., Shimamoto, T., Shimamoto, T. (2019) First detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from retail vegetable in Japan. 第 92 回日本細菌学会総会 (札幌市), 4 月 23 日～25 日。

補助資料 6 下水放流水 (環境水) より分離された菌株リスト (耐性遺伝子が検出された菌株のみ)
Eicosa-Plex PCR 法によって耐性遺伝子が検出された菌株をまとめた。

菌株名の最初の C は CHROMagar 培地より単離された菌株、CA はアンピシリンを添加した CHROMagar 培地より単離された菌株、M はコリスチンを添加した MacConkey 寒天培地より単離された菌株、MM はメロペネムを添加した MacConkey 寒天培地より単離された菌株を示している。C、CA、M、MM の次の H は「サンプリング場所 A」で分離された菌株、S は「サンプリング場所 C」で分離された菌株、E は「サンプリング場所 B」で分離された菌株、A は「サンプリング場所 E」で分離された菌株、T は「サンプリング場所 D」で分離された菌株、N は「サンプリング場所 F」で分離された菌株をそれぞれ示している。アルファベットの次の数字がそれぞれの採水場所でのサンプリング回を示しており、ハイフンの次の数字がそれぞれの菌株番号である。

”Resistance genes (PCR)” は、Eicosa-Plex PCR 法によって検出された AmpC 以外の耐性遺伝子を示している。int11 はクラス 1 インテグロンを表しており、括弧内は検出された耐性遺伝子カセットを示している。”AmpC genes” は、PCR によって検出された AmpC 遺伝子の種類を示している。オレンジ色でハイライトした耐性遺伝子は、ゲノム解析によって同定された耐性遺伝子である。”Species” は、16S rRNA 遺伝子配列より同定された菌種名を示している。なお、菌種が未同定または同定できなかった株は空欄となっている。菌種名をブルーでハイライトした菌株は、ゲノム解析の結果より同定した菌種名を表している。”Resistance phenotypes” は、ディスク法の結果明らかになった薬剤耐性表現型を示しており、耐性 (Resistance) となった薬剤名を記載した。”-” は調べた 10 の薬剤に対してすべて感受性 (Sensitive) となったものであり、空欄は薬剤感受性試験を行わなかった菌株を示している。黄色でハイライトした耐性表現型は、多剤耐性であることを示している。

ウ. 野菜が保有する薬剤耐性菌の解析（島本整（広島大学））

【研究内容・方法】

2年間の研究期間で、補助資料7のとおり、市販の野菜200サンプルを購入し、試験に用いた。

購入した野菜を未洗浄の状態で25 g採取し、225 mLの滅菌BPW (buffered peptone water, 緩衝ペプトン水) に加え、ストマッカーで1分間処理した。野菜残渣を除いた液を菌原液とし、PBS (phosphate buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水) で10~10000倍に希釈して標準寒天培地 (NA) および100 mg/L アンピシリンを含むNA (NA100) に100 μ Lずつ塗抹し、37°Cで24時間培養した。コロニーカウントの際は、コロニーをカウントできる希釈を接種した培地を選択し、3枚のNAに生育したコロニー数をカウントして平均値を求め生菌数とした。また、3枚のNA100に生育したコロニー数をカウントして平均値を求めてアンピシリン耐性菌数とした。そして、アンピシリン耐性化率 (%) を (アンピシリン耐性菌数) / (生菌数) $\times$ 100 によって求めた。さらに、大腸菌群および腸内細菌科細菌を分離するため、菌原液をCHROMagar ECC および100 mg/L アンピシリン添加CHROMagar ECC に塗抹し、大腸菌である可能性が高い青色コロニーと大腸菌群である可能性が高い赤色コロニーの中から3個以上選択し継代した。また、大腸菌や大腸菌群の細菌が得られにくい可能性を考えて菌原液をLB液体培地に接種して、37°Cで一晩増菌培養し、同様にCHROMagar ECC とアンピシリン添加CHROMagar ECC に塗抹した。前述の菌原液を塗抹した培地上に生育したコロニーを優先的に選択し、青色または赤色コロニーが得られなかった場合には、増菌培養後にCHROMagar ECC (±アンピシリン) に生育した青色または赤色コロニーを選択・継代した。いずれの培地にも青色または赤色コロニーが生育していなかった場合は、白色コロニー (大腸菌群以外) を選択し、以下の実験に用いた。(試験1)

さらに、上記の分離より得られた大腸菌群あるいは腸内細菌科細菌を中心とした計1,142株の分離株について、 β -ラクタマーゼ遺伝子を中心とした複数の薬剤耐性遺伝子を同時に検出可能な multiplex PCR 法 (Eicosaplex PCR) によって耐性遺伝子の検出を行った (Nariya ら (2019) の報告)。多数検出された AmpC 遺伝子を除き、検出された耐性遺伝子の塩基配列を決定し、耐性遺伝子型を明らかにした (補助資料8)。(試験2)

また、1,142株の分離株の中から耐性遺伝子を保有していた株を中心に227株について、ディスク法によるアンピシリン (AMP)、セフトキシム (CTX)、セフトジジム (CAZ)、アズトレオナム (AZT)、メロペネム (MPM) に対する薬剤感受性試験を行った。令和3年度は、CHROMagar 培地とアンピシリン添加CHROMagar 培地より分離されたすべての菌株について、分離された152株まで薬剤感受性試験を行った。しかし、耐性遺伝子が検出されなかったものに対して薬剤感受性試験を行うことは、時間と経費を考えると非効率的と考えたため、令和4年度は、AmpC以外の耐性遺伝子が検出された菌株(75株)に絞って薬剤感受性試験を行った。薬剤ディスクはKBディスク (栄研化学) を用い、添付の判定基準によって感受性の判定を行った。補助資料8に記載の52株と多剤耐性の *Stenotrophomonas maltophilia* 4株と大腸菌11株の計67株については、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定することによって菌種の同定を行った。また、大腸菌と同定された11株については、Clermont らの方法によって phylotyping を行った (Clermont ら (2013) の報告)。(試験3)

最後に、*bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子が陽性となった13株について、MiniSeq (Illumina) を用いて short read によるドラフトゲノム解析を行った (感染研・菅井グループ)。得られたゲノム配列データについては、「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」においてプラスミド配列を含めた比較解析を行った。詳細な試験方法と結果は (5) 参照。(試験4)

【研究結果・考察】

試験 1 の結果を図 1 2 と補助資料 7 に示す。

市販野菜 200 サンプルについて、生菌数とアンピシリン耐性菌数について調べたところ、生菌数の平均値は 6.36 log CFU/g、アンピシリン耐性菌数の平均値は 5.52 log CFU/g であった（図 1 A、補助資料 7）。アンピシリン耐性化率はサンプルによるばらつきが大きく、野菜 200 サンプルの平均値は 31.0% であった（図 1 B、補助資料 7）。大腸菌については、2.5%（5/200 サンプル）から分離された。

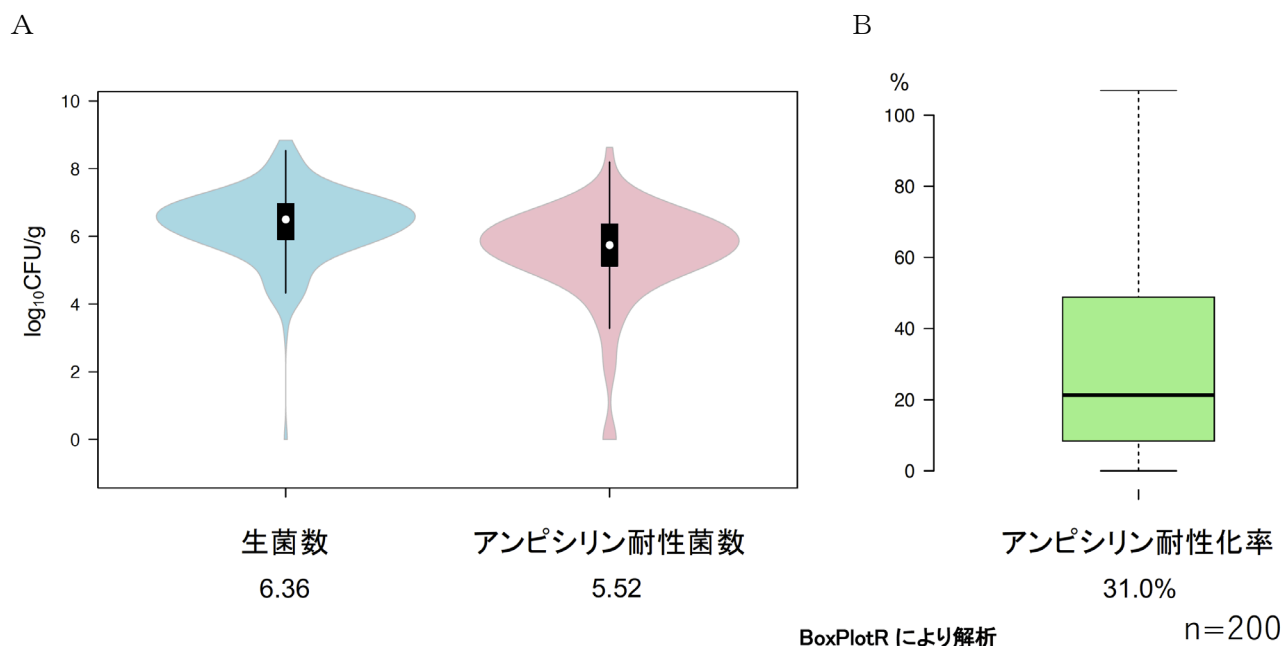


図 1 2. 市販野菜サンプルにおける生菌数とアンピシリン耐性菌数（A）およびアンピシリン耐性化率（B）

試験 2 の薬剤耐性遺伝子の検出結果を補助資料 8 に示す。

200 サンプルより得られた全 1,142 株の分離株について multiplex PCR による薬剤耐性遺伝子の検出を行ったところ、384 株で薬剤耐性遺伝子が検出された。*bla*_{CTX-M} 遺伝子グループが 76 株 (6.7%)、*bla*_{TEM} 遺伝子が 19 株 (1.7%)、*bla*_{SHV} 遺伝子グループが 5 株 (0.44%)、AmpC 遺伝子グループが 280 株 (24.5%) において検出された。なお、4 株 (0.35%) についてはクラス 1 インテグロン (3 株) または *aac* (6')-Ib (1 株) が検出されたが、β-ラクタマーゼに関する遺伝子は検出されなかった。

*bla*_{CTX-M} 遺伝子グループの多くが RAHN、OXY、FONA などの細菌が本来保有している *bla* 遺伝子であり、*bla*_{CTX-M} 遺伝子と同定されたものはわずかであった。検出された *bla*_{TEM} 遺伝子はすべて TEM-1 であった。今回の結果より野菜から分離された菌株の約 4 分の 1 が AmpC 遺伝子を保有していることがわかった。また、AmpC の中でも MIR/ACT が最も多く、222 株より検出された。

試験 3 の薬剤感受性試験の結果を表 22 と補助資料 8 に示す。

耐性遺伝子を持った野菜分離菌は、アンピシリンのみに耐性を示すものが多かった。また、カルバペネマーゼ遺伝子を含む耐性遺伝子はいずれも検出されなかったが、メロペネム耐性を示す株が 4 株得られ (CHA2-2, CHA2-3, CHA5-2, CHA11-1)、すべて *Stenotrophomonas maltophilia* という多剤耐性菌であった (この 4 株は、耐性遺伝子が検出された株ではないので、補助資料 8 には未記載)。

一方、1,142 株中大腸菌はわずか 11 株であり、いずれの株も調べた薬剤耐性遺伝子は保有しておらず、すべて薬剤感受性であった。大腸菌 11 株についてタイピングを行ったところ、A 型が 1 株、B1 型が 4 株、B2 型が 3 株、E 型が 3 株という結果であった（表 23）。

表 22. 薬剤耐性遺伝子を保有する野菜分離菌株の薬剤耐性表現型の解析

Antibiotic	Resistant No. (%)	Intermediate No. (%)	Sensitive No. (%)
AMP (10 µg)	148 (65.2)	16 (7.0)	63 (27.8)
CTX (30 µg)	21 (9.3)	11 (4.8)	195 (85.9)
CAZ (30 µg)	8 (3.5)	2 (0.9)	208 (91.6)
AZT (30 µg)	14 (6.2)	5 (2.2)	217 (95.6)
MEM (10 µg)	4 (1.8)	0 (0.0)	223 (98.2)

(n=227)

AMP, アンピシリン; CTX, セフトキシム; CAZ, セフトジジム; AZT, アズトレオナム; MEM, メロペネム

表 23. 分離された大腸菌の系統分類の結果

Strain	Phylo-type	Vegetable
CH8-1	A	オクラ
CH9-1	B1	パセリ
CH125-1	E	ルッコラ
CH125-2	E	ルッコラ
CH125-3	E	ルッコラ
CH147-1	B1	ズッキーニ
CH147-2	B1	ズッキーニ
CH147-3	B1	ズッキーニ
CH165-1	B2	ベビーリーフ
CH165-2	B2	ベビーリーフ
CH165-3	B2	ベビーリーフ

なお、ルッコラ（野菜サンプル 125）由来の 3 株、ズッキーニ（野菜サンプル 147）由来の 3 株、ベビーリーフ（野菜サンプル 165）由来の 3 株については、それぞれ同一菌株である可能性が高い。

試験 4 のゲノム解析の結果を表 24 に示す。

bla_{TEM} 遺伝子または *bla_{CTX-M}* 遺伝子を保有する野菜分離菌株について、short read によるドラフトゲノム解析を行った。同一サンプルから分離された類似の菌株などを除いた 7 株について解析結果をまとめた（表 24）。いくつかの分離株については複数の耐性遺伝子が検出され、多剤耐性菌であることが明らかになった。特に、サムライネギより分離された 2 株の *Kluyvera sichuanensis* は、*bla_{CTX-M}* 遺伝子の新たな variant を保有していることが明らかになった。

表 24. *bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子を保有する野菜分離菌株のドラフトゲノム解析

Strains	Species*	Sources	Resistance genes**
CHA4-2	<i>Pantoea eucrina</i>	ニラ	<i>bla</i> _{TEM-1C}
CHA20-1	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	キャベツ	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aadA16</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>arr-3</i> , <i>bla</i> _{KLUC-2} , <i>bla</i> _{KLUC-3} , <i>dfrA27</i> , <i>floR</i> , <i>qacE</i> , <i>qnrB6</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i>
CH150-1	<i>Kluyvera sichuanensis</i>	サムライネギ	<i>bla</i> _{CTX-M} (new variant), <i>fosA3</i>
CH150-2	<i>Kluyvera sichuanensis</i>	サムライネギ	<i>bla</i> _{CTX-M} (new variant), <i>fosA3</i>
CHA113-3	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	キュウリ	<i>bla</i> _{TEM-1A} , <i>mdf(A)</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i> , <i>aph(6)-Id</i>
CHA91-2	<i>Pantoea eucrina</i>	ニラ	<i>bla</i> _{TEM-1C} , <i>oqxB</i>
CHA96-3	<i>Enterobacter soli</i>	レタス	<i>bla</i> _{TEM-1B} , <i>oqxB</i> , <i>oqxA</i> , <i>bla</i> _{ACT-6} , <i>fosA</i> , <i>sul2</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>tet(D)</i>

黄色でハイライトした遺伝子は *bla*_{TEM} 遺伝子または *bla*_{CTX-M} 遺伝子を表している。

ゲノムデータに基づく菌種の同定は DFAST、耐性遺伝子の検出は ResFinder を利用して行った。

200 サンプルの市販野菜より 1,142 株を分離し、解析を行った。薬剤耐性遺伝子はある程度検出されたが、βラクタマーゼ遺伝子は AmpC 遺伝子が多く、そのほとんどは細菌が本来保有する内因性の耐性遺伝子であり、転移性を有するプラスミド性のもの (TEM、SHV、CTX-M など) は、他の由来サンプルと比較して少なかった。また、野菜分離菌の中に大腸菌は少なく、わずか 5 つの野菜サンプル (8、9、125、147、165) より分離されたのみであった (表 23)。しかも、今回分離された 11 株の大腸菌はいずれも調べた範囲の耐性遺伝子を保有しておらず、薬剤感受性であった。しかし、野菜から多剤耐性株が分離され、*bla*_{CTX-M} 遺伝子については新たな variant も検出されたことから、今後も野菜由来細菌のモニタリングを続けていく必要があると考えられる。

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Nariya H., Soliman, A.M., Shimamoto, T., Shimamoto, T. (2019) First detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from retail vegetable in Japan. 第 92 回日本細菌学会総会 (札幌市), 4 月 23 日～25 日.

補助資料 7 購入した野菜に関する情報

小売店で市販の野菜を購入し、サンプルとした。購入日、野菜名、産地、生産農家等、購入店舗名を記載した。No. 137～146 は、広島県竹原市の店舗で購入し、それ以外はすべて広島県東広島市の店舗で購入した。No. 7、48、54、141、143、163 の 6 サンプルは、それぞれ土付き野菜であった No. 6、47、53、140、142、162 を水道水で洗浄してサンプルとしたものである。“NA” は野菜 1 g あたりの生菌数 (log PFU/g)、“NA100” は野菜 1 g あたりのアンピシリン耐性菌数 (log PFU/g) を示している。“Rate of Amp^r” は各野菜サンプルの生菌数のアンピシリン耐性化率 (%) を示している。最下段にはそれぞれの平均値を示した。

補助資料 8 野菜より分離された菌株リスト（耐性遺伝子が検出された菌株のみ）

Eicosa-Plex PCR 法によって耐性遺伝子が検出された菌株をまとめた。

菌株名の CH は CHROMagar 培地より単離された菌株を、また CHA はアンピシリンを添加した CHROMagar 培地より単離された菌株を示している。CH または CHA の次の数字は分離した野菜サンプルの番号を表しており、ハイフンの次の数字がそれぞれの菌株番号に該当する。” Resistance genes” は、Eicosa-Plex PCR 法によって検出された AmpC 以外の耐性遺伝子を示している。intI1 はクラス 1 インテグロンを表しており、括弧内は検出された耐性遺伝子カセットを示している。” AmpC genes” は、検出された AmpC 遺伝子の種類を示している。” Species” は、16S rRNA 遺伝子配列より同定された菌種名を示している。なお、菌種が未同定または同定できなかった株は空欄になっている。” Resistance phenotypes” は、ディスク法の結果明らかになった薬剤耐性表現型を示しており、耐性（Resistance）となった薬剤名を記載し、括弧内は中間耐性（Intermediate）となった薬剤名を示している。” x” は、調べた 5 つの薬剤に対してすべて感受性（Sensitive）となったものであり、” - “ は、薬剤感受性試験を行わなかった菌株を示している。黄色でハイライトした菌株は、ゲノム解析を行った株である（表 24）。

(3) 家畜、環境、野菜、ヒトが保有する耐性菌の比較解析に関する研究
エ. ヒトの臨床例から分離される薬剤耐性菌の解析 (佐藤豊孝 (北海道大学)、高橋聡 (札幌医大))

ヒトの臨床症例から分離された大腸菌について過去の分離株を含めた564株についてアンピシリン (ABPC) に対する感受性を確認し、 β -ラクタマーゼ遺伝子保有細菌については、プラスミド配列を含めた解析を行った。

研究内容・方法

2020 年 4 月から 12 月にかけて、札幌医科大学附属病院のヒト臨床検体から腸内細菌科細菌 (329 株) を分離・収集し、大腸菌を MALDI-TOF MS により同定した。大腸菌だった株は、微量液体希釈法による ABPC の感受性試験から ABPC 耐性率 (BP は 16 mg/L) を算出し、ABPC 耐性株を選択した。また第 3 世代セフォロスポリンであるセフポドキシム (CPDX) (BP は 4 mg/L) およびカルバペネム系抗菌薬であるメロペネム (MEPM) (BP は 2 mg/L) の微量液体希釈法による薬剤感受性試験も行った。これらの分離菌株の、系統発生分類 (phylogenetic grouping) および β -ラクタマーゼ遺伝子の検出を行なった。Phylogenetic grouping は、Clermont らの方法による multiplex PCR を行い、それぞれ Group A, B1, B2, C, E, D, F に分類した。 β -ラクタマーゼ遺伝子の検出は Dallenne らの方法による multiplex PCR を行い、TEM, SHV, OXA, CTX-M-1 group, CTX-M-2 group, CTX-M-9 group に分類した。加えて、TEM および CTX-M 型の β -ラクタマーゼ遺伝子のバリエーションの決定をサンガーシケン法または全ゲノム解析によって行った。2017-2019 年に本学附属病院の臨床検体から分離・同定済みの大腸菌 375 株においても同様の解析を行った。

研究結果

本学附属病院のヒト臨床検体から大腸菌 189 株を分離・同定した。そのうち、ABPC の MIC が $>16\text{mg/L}$ の大腸菌は 64 株 (ABPC 耐性率は 33.9%) であった (表 25)。CPDX 耐性株 (MIC が >4) は 38 株 (16.8%) であったが、MEPM 耐性株は認められなかった。また、2017-2019 年に同定・保存済みの大腸菌の ABPC 感受性を調査した結果、141 株 (37.6%) の ABPC 耐性大腸菌を認めた。CPDX 耐性株は 63 株 (20.0%) であったが、MEPM 耐性株は認められなかった。

これらの ABPC 耐性大腸菌について phylogenetic grouping を行なったところ、2017-19 年および 2020 年ともに Group B2 が全体の 70% 以上を占め優勢であった (表 26)。その他の Group の分布においても 2017-19 年および 2020 年の間で大きな差は認められなかった。以上から、臨床上問題となる ABPC 耐性大腸菌は系統学的に Group B2 が優勢であると考えられた。

β -ラクタマーゼ遺伝子の検出を行なった結果、2017-19 年および 2020 年ともに TEM が全体の約 60% 近くを占めた (表 27)。次いで、CTX-M-9 group が 19.1% (2017-2019 年) または 32.8% (2020 年) であった。以上から人臨床検体由来大腸菌の ABPC 耐性は TEM または CTX-M-9 group を保有する phylogroup B2 が dominant であることが明らかとなった。

TEM 型の β -ラクタマーゼ遺伝子の多くは TEM-1 型のバリエーションに属していた (表 28)。中でも TEM-1B が優勢であり ABPC 耐性大腸菌全体の約半数を占めた。CTX-M-9 group では、CTX-M-27 が主要なバリエーション (2017-19 年で 11.3%, 2020 年で 23.4%) であり、次いで CTX-M-14 (2017-19 年で 9.4%, 2020 年で 7.8%) であった。以上から人臨床検体由来大腸菌の ABPC 耐性の約半数が TEM-1B 型の β -ラクタマーゼ遺伝子を保有しており dominant となることを明らかにした。

β -ラクタマーゼ遺伝子保有株 156 株については「(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析」におい

てプラスミド配列を含めた比較解析を行った。本 156 株は、PCR で陽性であった 179 株の β -ラクタマーゼ遺伝子保有株のうち TEM 陽性株全株 (n=121 株) を選択し、TEM 陰性の β -ラクタマーゼ遺伝子保有株 (n= 35 株) を対象として任意に選択した。

表25. ヒト臨床検体由来大腸菌のABPC, CPDX, MEPM耐性率

分離年	株数	耐性率		
		ABPC	CPDX	MEPM
2017-2019	375	37.6% (141)	16.8% (63)	0%
2020	189	33.9% (64)	20.0% (38)	0%

表26. ヒト臨床検体由来大腸菌の系統発生分類 (Phylogenetic group) の結果

分離年	株数	Phylogenetic group						
		A	B1	B2	C	D	E	F
2017-2019	141	0.7% (1)	6.4% (9)	79.4% (112)	2.1% (3)	7.8% (11)	1.4% (2)	2.1% (3)
2020	64	4.7% (3)	6.3% (4)	70.3% (45)	0	14.1% (9)	0	4.7% (3)

表27. ヒト臨床検体由来大腸菌の β -ラクタマーゼの検出結果

分離年	株数	Beta-lactamase genes (<i>bla</i>)					
		TEM	SHV	OXA	CTX-M Group 1	CTX-M Group 2	CTX-M Group 9
2017-2019	141	59.6% (84)	0.7% (1)	2.8% (4)	5.7% (8)	0	19.1% (27)
2020	64	57.8% (37)	0	1.6% (1)	3.1% (2)	0	32.8% (21)

表28. ヒト臨床検体由来大腸菌の各 β -ラクタマーゼ遺伝子のバリエントの決定

分離年	TEM				CTX-M group 1			CTX-M group 2	CTX-M group 9	
	1A	1B	1C	Other	1	15	55		14	27
2017-2019	2.1% (3)	47.5% (67)	4.3% (6)	5.7% (8)	1.4% (2)	2.8% (4)	1.4% (2)	0	7.8% (11)	11.3% (16)
2020	0	56.2% (36)	0	1.6% (1)	0	3.1% (2)	0	0	9.4% (6)	23.4% (15)

【参考文献】

- Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. (2013) The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-group. Environ. Microbiol. Rep. 5, 58-65.
- Dallenne C., Costa A.D., Decre D., Favier C., Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. 65. 490-495.

（４）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（浅井鉄夫（岐阜大学））

市販野菜から薬剤耐性菌を含む細菌が検出されることがあり、野菜に起因する細菌性食中毒も報告されている。野菜からの細菌の検出は主に栽培環境からであると考えられるが、肥料や灌漑用水として堆肥や畜産排水を利用することで、その中に含まれる細菌が農作物へ伝播する危険性が危惧されている。本研究は、畜産に由来する薬剤耐性菌が野菜へ伝播するかを明らかにするため、家畜由来基質特異性拡張型 β ラクタマーゼ（Extended spectrum β -lactamases：ESBL）産生菌を用いて、土壤から野菜への伝播試験を実施した。

【材料と方法】

令和2年度に、小松菜を対象に、土壤から茎葉への細菌の伝播を検証した。実験室内で野菜を園芸用ポットで栽培して、5枚以上の葉が生育した後、被検菌を接種し、接種後1、2、3、6、10日後に葉を切断した。葉について、0.5 g採取し、4.5 mLの滅菌生理食塩水に加え、ストマッカーで1分間処理した。野菜残渣を除いた液を菌原液とし、細菌検査に供した。培養土中の菌数は、別の鉢から培養土1gを試験日ごとに採取した。供試菌は、ブロイラー由来CTX-M-3型ESBL産生 *Escherichia coli* (TMICEX24)、*Enterobacter cloacae* (TMICEX6)、及び*Klebsiella pneumoniae* (TMICEX23)の3菌種で、トリプティックソイ液体培地を用いて1晩培養したものを土壤に接種した。

小松菜に対する接種菌量の影響を調べるため、CTX-M-3型ESBL産生 *Enterobacter cloacae*を用いて、 10^{10} CFUから 10^4 CFUまで希釈して土壤に接種した。

令和3年度は、生食する野菜としてレタスとミニトマトを対象に前述の3株の他、CTX-M-2型ESBL産生 *E. coli* (S11とS13)を追加して単濃度（レタス：約 10^{10} CFU、ミニトマト：約 10^{11} CFU）を土壤に接種することで実施した。レタスに関して、1回目は培養液（トリプティックソイ液体培地）を接種し、2回目は培養液を遠心後滅菌蒸留水で再浮遊した菌液を用いた。ミニトマトを用いた接種試験は、培養液を遠心後滅菌蒸留水で再浮遊した菌液を用いた。レタスについて、0.5 g採取し、4.5 mLの滅菌生理食塩水に加え、ストマッカーで1分間処理した。野菜残渣を除いた液を菌原液とし、細菌検査に供した。また、ミニトマトについては、10 g採取し、ストマッカーで1分間処理した。野菜残渣を除いた液を菌原液とし、細菌検査に供した。レタスとミニトマトは、岐阜大学応用生物科学部附属岐阜フィールド科学教育研究センターから購入した。ここで、ミニトマト栽培土壤への接種菌量を多くした理由は、栽培ポットが大きかったためである。

培養液を接種すると同時に、接種菌量を測定するため10倍段階希釈を行って菌数をセフトキシム添加DHL培地でカウントした。一部の発育した菌を単離し、菌種をAPI20Eにより同定し、PCRにより接種菌が保有するESBL遺伝子の保有を確認した。

【結果と考察】

小松菜への接種試験の結果、*Enterobacter cloacae*は接種2～6日後に回収され、*Escherichia coli*は接種2日後に回収された。*Klebsiella pneumoniae*は、いずれの日においても回収されなかった（表29）。培養土中の菌数は、 10^{10} の菌を接種すると、 10^8 CFU/gとなった。

次に、接種菌量の影響を*Enterobacter cloacae*を用いて調べたところ、 10^6 CFU以上を土壤に接種した時に、茎葉から回収された（表30）。土壤中の菌量は 10^3 CFU以上と推定された。接種翌日には、培養土1 g当たりの菌数は1/100～1/1000に減少するが、観察した接種3日後まで 10^8 CFU以上接種したグループでは土中の菌数変化は認められなかった。

その後2回（3回目と4回目）小松菜への接種試験を実施したが、3菌種とも分離されなかった。また、接種翌日には、培養土1 g当たりの菌数は1/100～1/1000に減少するが、接種3日後まで土中の菌数変化は認められなかったが、調査した接種10日後まで、徐々に減少した。

以上から、複数回実施したが小松菜への伝播は不安定で、常に伝播するわけではないことが示唆された。また、野菜への伝播に接種菌の濃度が影響する可能性が示唆されたことから、未完熟な堆肥や未処理汚水を圃場にまく場合は、家畜由来細菌が伝播する可能性があると考えられた。

表29、小松菜への接種試験の結果

菌種	接種菌量	1 dpi	2 dpi	3 dpi	6 dpi	10 dpi
<i>E. cloacae</i>	5.2×10^{10}	-	2.2×10^3	2×10^2	4×10^2	-
<i>K. pneumoniae</i>	7.8×10^{10}	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	6.8×10^{10}	-	2.0×10^3	-	-	-
培養土中の菌数 (<i>E. coli</i>)		2.1×10^8	1.2×10^8	4.5×10^7	1.5×10^7	2.2×10^6

CFU/gを示す。

表30、小松菜への接種試験の結果

接種菌	1 dpi		2 dpi		3 dpi		7 dpi
	培養土	葉茎	培養土	葉茎	培養土	葉茎	葉茎
5.9×10^{10}	3.7×10^7	2×10^2	7.8×10^7	-	1.3×10^7	-	-
5.9×10^9	1.0×10^7	2×10^2	4.1×10^6	-	1.8×10^6	-	-
5.9×10^8	2.0×10^5	-	4.7×10^5	-	1.2×10^5	-	-
5.9×10^7	1.8×10^5	9×10^2	4.3×10^3	1.1×10^3	8.8×10^3	-	-
5.9×10^6	NT	1.3×10^3	NT	-	NT	-	-
5.9×10^5	2.1×10^2	-	2.9×10^2	-	<100	-	-
5.9×10^4	<100	-	<100	-	<100	-	-

CFU/gを示す。

レタスを対象にした1回目の試験では、*Enterobacter cloacae*は接種3、6と10日後に回収された（表31）。*Escherichia coli*では1株(TMICEX24)は接種6と10日後、1株(S11)では3と10日後に回収され、残りの1株(S13)では回収されなかった。*Klebsiella pneumoniae*では接種3と10日後に回収された。2回目の試験では、*Escherichia coli*では2株(TMICEX24とS13)は接種2日後に回収されたが、1株(S11)は回収されなかった（表32）。*Klebsiella pneumoniae*では接種2と3日後に回収されたが、*Enterobacter cloacae*は回収されなかった。

表 31、レタスへの接種試験の結果（1 回目）

結果：レタス1回目

菌種（株名、接種菌量）		菌数				
		1 dpi	2 dpi	3 dpi	6 dpi	10 dpi
<i>Enterobacter cloacae</i> (TMICEX6, 2.4×10^{10})	1	0	0	1	10	1
	2	0	0	∞	0	∞
	培養土	5.7×10^9	2.7×10^9	5.9×10^8	1.8×10^8	1.2×10^7
<i>Escherichia coli</i> (TMICEX24, 3.0×10^{10})	1	0	0	0	13	3
	2	0	0	0	0	0
	培養土	4.8×10^9	2.2×10^9	5.4×10^8	9.8×10^8	2.9×10^7
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TMICEX23, 2.0×10^{10})	1	0	0	5	0	0
	2	0	0	0	0	26
	培養土	4.2×10^8	1.8×10^9	6.1×10^8	6.0×10^8	4.0×10^7
<i>Escherichia coli</i> (S11, 2.5×10^{10})	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	138	0	∞
	培養土	2.1×10^9	3.0×10^9	5.4×10^8	3.6×10^8	1.5×10^8
<i>Escherichia coli</i> (S13, 2.4×10^{10})	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	培養土	1.8×10^9	3.6×10^9	7.6×10^8	1.7×10^8	2.1×10^8

- ・ 1回目は培養液(トリプティクソイブロス)を接種
- ・ 細菌は葉茎から数日の間分離される。

表 32、レタスへの接種試験の結果（2 回目）

結果：レタス2回目

菌種（株名、接種菌量）		菌数				
		1 dpi	2 dpi	3 dpi	6 dpi	10 dpi
<i>Enterobacter cloacae</i> (TMICEX6, 4.3×10^{10})	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	培養土	3.6×10^8	8.6×10^7	6.5×10^6	5.2×10^6	4.3×10^6
<i>Escherichia coli</i> (TMICEX24, 3.1×10^{10})	1	0	0	0	0	0
	2	0	141	0	0	0
	培養土	1.8×10^8	4.1×10^7	1.5×10^7	2.0×10^8	5.8×10^6
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TMICEX23, 4.2×10^{10})	1	0	23	∞	0	0
	2	0	0	0	0	0
	培養土	4.3×10^6	4.8×10^7	8.0×10^6	1.8×10^6	6.3×10^4
<i>Escherichia coli</i> (S11, 4.4×10^{10})	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	培養土	2.1×10^8	1.7×10^7	2.5×10^6	3.7×10^6	< 116
<i>Escherichia coli</i> (S13, 3.9×10^{10})	1	0	∞	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
	培養土	3.8×10^8	1.5×10^7	3.9×10^6	1.7×10^6	< 102

- ・ 培養液を遠心後滅菌蒸留水で再浮遊した菌液を接種
- ・ 細菌は葉茎から分離されるが、再現性や規則性は認められない。

ミニトマトを用いた接種試験は、培養液を遠心後滅菌蒸留水で再浮遊した菌液を用いて 2 回実施した

。2回ともトマト（実）から回収されなかった（表33）。しかし、2回目の試験では、葉茎から*Enterobacter cloacae*が接種3日後に回収された。レタスの2回目およびトマトの試験で、培地を直接接種するのではなく試験菌を蒸留水に再浮遊した理由は、植物の塩分抵抗性が小松菜に比べてレタスやトマトでは低いためである。

表33、ミニトマトへの接種試験の結果（1回目＝上段、2回目＝下段）

結果：ミニトマト（上段：1回目、下段：2回目）

菌種（株名）	接種菌数	菌数(トマト実)				
		1 dpi	2 dpi	3 dpi	6 dpi	10 dpi
<i>Enterobacter cloacae</i> (TMICEX6)	2.4x10 ¹²	0	0	0	0	0
		3.7x10 ⁶	2.8x10 ⁶	1.7x10 ⁶	8.1x10 ⁴	1.2x10 ³
<i>Escherichia coli</i> (TMICEX24)	3.1x10 ¹¹	0	0	0	0	0
		8.2x10 ⁶	1.9x10 ⁶	2.2x10 ⁶	1.4x10 ⁶	2.2x10 ⁴
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TMICEX23)	4.2x10 ¹¹	0	0	0	0	0
		9.1x10 ³	2.8x10 ⁵	7.7x10 ³	2.6x10 ²	1.7x10 ²
<i>Escherichia coli</i> (S13)	3.9x10 ¹¹	0	0	0	0	0
		2.6x10 ²	8.7x10 ¹	5.7x10 ⁴	7.0x10 ⁴	3.2x10 ³

菌種（株名）	接種菌数	菌数(トマト実/茎葉)				
		1 dpi	2 dpi	3 dpi	6 dpi	10 dpi
<i>Enterobacter cloacae</i> (TMICEX6)	2.5x10 ¹¹	0/0	0/0	0/6	0/0	0/0
		4.7x10 ⁶	3.6x10 ⁵	4.5x10 ⁴	2.9x10 ³	4.8x10 ²
<i>Escherichia coli</i> (TMICEX24)	2.1x10 ¹¹	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		2.3x10 ⁷	1.2x10 ⁷	1.3x10 ⁵	5.4x10 ⁴	1.9x10 ³
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (TMICEX23)	2.1x10 ¹¹	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		8.9x10 ⁵	4.4x10 ⁴	2.4x10 ³	2.0x10 ³	5.0x10 ²
<i>Escherichia coli</i> (S13)	1.4x10 ¹¹	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
		6.3x10 ⁷	2.5x10 ⁶	4.4x10 ⁴	4.3x10 ³	8.2x10 ²

今回使用したCTX-M-3型ESBL産生菌3株はブロイラーの同一鶏群から分離された株で、菌種は異なるが同一多剤耐性プラスミド（80Kbp）を保有する。プラスミド上には、*bla*_{CTX-M-3}以外に*aac*(3)-IIId（ゲンタマイシン耐性）、*aadA2*（ストレプトマイシン耐性）、*su11*（サルファ剤耐性）、*dfrA12*（トリメトプリム耐性）が存在する（Yossapolらの報告（2020））。TMICEX24株（*Escherichia coli*）は、血清型O138:H48 MLST型ST219（O138:H48-ST219）で、病原因子の検索により腸管凝集付着性大腸菌耐熱性毒素遺伝子（*astA*）を保有していた。さらに、耐性遺伝子検索によりプラスミド性耐性遺伝子以外にクロラムフェニコール耐性（*catA1*）やテトラサイクリン耐性（*tet*(A)）遺伝子を保有していた。一方、酪農学園大学から提供されたCTX-M-2型ESBL産生大腸菌2株は074:H39-ST10で、*bla*_{CTX-M-2}以外に*aadA12*、*su11*、*dfrA12*を保有する多剤耐性菌であった。このように、ウシやブロイラーに分布するESBL産生多剤耐性菌が高濃度に暴露した場合には野菜への伝播が成立することから、堆肥や汚水などの畜産に由来する廃棄物の適正な管理が必要と考えられる。

【参考文献】

Yossapol M., Suzuki K., Odio J.O., Sugiyama M., Usui M., Asai T. 2020. Persistence of extended-spectrum beta-lactamase plasmids among Enterobacteriaceae in commercial broiler farms. Microbiol. Immunol. 64. 712-718.

(5) 分離菌株に対する包括的なゲノム解析（鈴木仁人（感染症研究所））

課題を通して分離された細菌について、その相同性を含む関連性について解析を行い、家畜、水圏、野菜、ヒトとの関連性を明らかにするため、次世代シーケンス解析を行なった。

【材料と方法】

表34のとおり、分担課題II、1（2）（3）において分離された合計739株のアンピシリン耐性菌（主に大腸菌）について、各分担研究者が実施したマルチプレックスPCRによるβラクタマーゼ遺伝子の検出及びPhylogenetic group型別の結果をもとに、*bla_{TEM}*陽性株のgDNAをそれぞれ分担担当者より受け取り、ゲノム解析を行なった。

表34. 各分担研究課題において分離されたアンピシリン耐性菌（主に大腸菌）の一覧

研究番号	担当	由来	株数
1（2）ア	酪農学園大学*	牛糞便、畜産廃棄物、土壌（附属農場）	18
		牛糞便、畜産廃棄物、土壌（別海）	15
1（3）ア	動物用医薬品検査所	健康牛直腸便	86
		病畜（牛）	45
		健康豚直腸	116
1（3）イ	岐阜大学**	養豚場排水	25
		食鳥処理場排水	6
		と畜場排水	6
	酪農学園大学	酪農場排水	14
	広島大学	下水処理施設	55
1（3）ウ	広島大学	市販野菜	148
1（3）エ	北海道大学・札幌医大	ヒトの臨床例	205
合計			739

*1（2）の課題については、分離されたアンピシリン耐性菌の伝播の可能性の解明を目的としてNGS解析を実施したため、分離された全てのアンピシリン耐性株を対象にしたわけではない。

**アンピシリン添加培地から分離された大腸菌株も含むため、分担課題の結果（表16）で示した株数とは異なる。

ライブラリー調製（2x150 bp paired-end）はNextera XT DNA Library Preparation Kit（Illumina社）、配列解読はHiSeq X（Illumina社）を用いて行った。配列解読後、de novo assemblyをShovill v1.1.0（<https://github.com/tseemann/shovill>）を用いて行った。菌種同定はFastANI v1.32（<https://github.com/ParBLISS/FastANI>）、薬剤耐性遺伝子およびプラスミドレプリコンの検出、MLST（multilocus sequence typing）による型別はStaramr v0.7.2（<https://github.com/phac-nml/staramr>）、系統解析はRoary v3.13.0（<https://github.com/sanger-pathogens/Roary>）を用いて行った。また、薬剤耐性遺伝子と関連したMGEの検出はMobileElementFinder（<https://bitbucket.org/mhkj/mgedb/src/develop/>）を用いて行った。

【結果と考察】

対象としたアンピシリン耐性菌計739株から、 β ラクタマーゼ遺伝子 (bla_{TEM} 、 bla_{CTX-M} など) を検出した。その結果を表35に記す。

表35. アンピシリン耐性菌の β ラクタマーゼ遺伝子の検出結果

研究番号	由来	株数	TEM	SHV	CTX-M1	CTX-M9
1 (2) ア	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
1 (3) ア	健康牛直腸便	86	72	1	1	1
	病畜 (牛)	45	40	1	2	5
	健康豚直腸	116	112	0	0	3
1 (3) イ	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**
1 (3) ウ	市販野菜*	148	19	5	76**	76**
1 (3) エ	ヒトの臨床例	205	121	1	10	48

ND, 検出なし

*野菜由来細菌については、多くが大腸菌ではない。

**下水処理施設と市販野菜の bla 型別については、CTXグループであることを確認しており、M1groupとM9groupの区別は未実施。

全ての由来から bla_{TEM} 遺伝子が検出され、分離頻度も高かった。

また、分担研究者が実施したアンピシリン耐性大腸菌のPhylogenetic group解析の結果を表36に記す。

表36. 分離されたアンピシリン耐性大腸菌株の属するPhylogenetic group

研究番号	由来	株数	A	B1	B2	C	D	E	F
1 (3) ア	健康牛直腸便	86	9	48	0	0	5	6	0
	病畜 (牛)	45	8	25	0	2	4	2	3
	健康豚直腸	116	45	50	3	7	1	2	4
1 (3) イ	養豚場排水	25	16	9	0	0	0	0	0
	食鳥処理場排水	6	2	3	0	0	1	0	0
	と畜場排水	6	3	3	0	0	0	0	0

	酪農場排水	2	7	0	0	0	5	0	0
1 (3) ウ	市販野菜	11	1	4	3	0	0	3	0
1 (3) エ	ヒトの臨床例	205	4	13	157	3	20	2	6

分離株が属するphylogenetic group (A~F) は、由来ごとに偏りは認められるものの、多岐に渡っていた。このことから、特定のアンピシリン耐性株が由来ごとに分布している訳ではないことが明らかとなった。

全ての由来から *bla*_{TEM} 遺伝子が検出され、phylogenetic group は多岐にわたることから、複数の由来から分離された *bla*_{TEM} 遺伝子を保有する332株（詳細を表37及び別添のエクセルファイル補助資料9に記す）について、同遺伝子の周辺構造を解析した。

表37. NGS解析を実施した *bla*_{TEM} 遺伝子陽性株の一覧

研究番号	由来	アンピシリン耐性株数	<i>bla</i> _{TEM} 陽性株数	NGS解析実施株数	IS26を含む構造を決定できた株数
1 (2) ア	牛糞便、畜産廃棄物、土壌（附属農場）	18	11	11	3
	牛糞便、畜産廃棄物、土壌（道東牛農場）	15	10	8	4
1 (3) ア	健康牛直腸便	86	72	57	6
	病畜（牛）	45	40	32	6
	健康豚直腸	116	112	93	6
1 (3) イ	養豚場排水	25	25	23	1
	食鳥処理場排水	6	6	4	0
	と畜場排水	6	6	4	1
	酪農場排水	14	11	5	2
	下水処理施設	55	22	12*	2
1 (3) ウ	市販野菜	148	19	5**+2***	0
1 (3) エ	ヒトの臨床例	205	121	76****	16

*NGS解析は、22株で実施。TEM陽性は12株。

**NGS解析は、7株で実施。TEM陽性は5株。

***別のプロジェクトでTEM陽性だった野菜由来株2株を追加で解析。

****NGS解析は、156株で実施。TEM陽性は121株。

結果、211株において *bla*_{TEM} と同一のcontigにMGE (mobile genetic element) が認められた。そのうち、47株で、*bla*_{TEM} 遺伝子とそれに隣接したIS26を含む構造が検出された(図13)。これら、47株について、由来や系統発生分類について、並べたところ、由来は多岐に渡り、系統発生分類も多岐にわたっていた(図14)。さらに、周辺構造の類似性をもとに、19株について、*bla*_{TEM} 遺伝子とそれに隣接したIS26を含む構造について、配列比較を実施したところ、複数の由来で、類似した遺伝子配列が認められた(図15)。以上のことから、*bla*_{TEM} 遺伝子を保有する株の由来や系統発生分類は多岐にわたり、*bla*_{TEM} 遺伝子周辺のMGEの1つであるIS26を含む構造が、由来に限らずプラスミドなどを介して幅広く拡散・伝播している可能性が示唆された。ただし、ゲノム比較については、同一の構造を注目する解析方法となってしまうため、低い頻度の拡散・伝播の可能性について、過剰な評価となってしまう可能性もある。

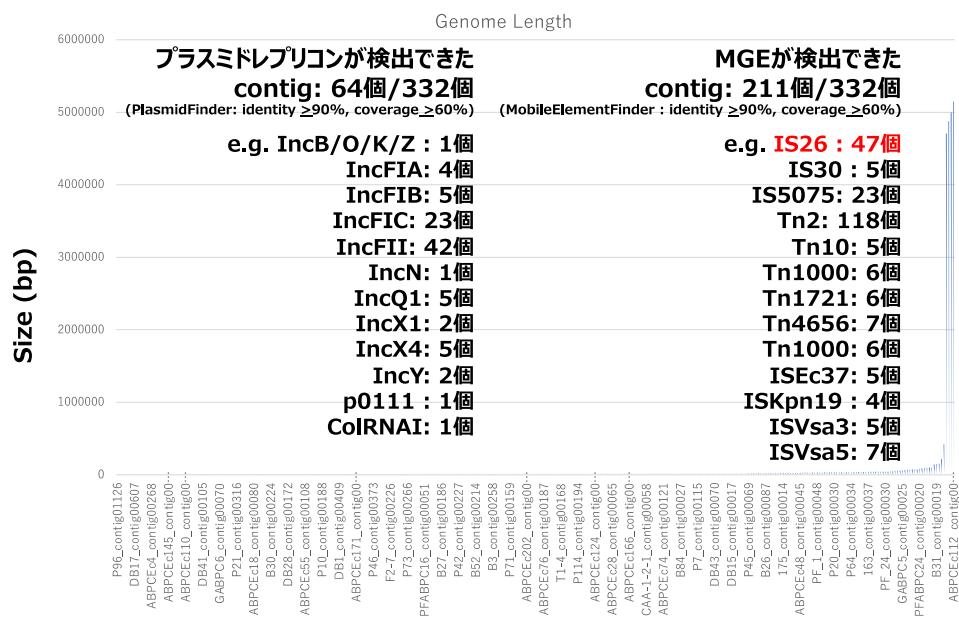


図13. ドラフトゲノム解析で得られた *bla*_{TEM} 陽性 contig の羅列

Source	Isolate	Species	MLST	Group	ARG
NVAL	DB36	ecoli	744	A	aadA5, aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, catA1, dfrA17, mph(A), qacE, sul1, sul2
NVAL	P114	ecoli	10	A	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA8, sul2
NVAL	P4	ecoli	10	A	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA14, sul2
NVAL	P54	ecoli	1244	A	blaTEM-1B, floR
GU	PFABPC11	ecoli	542	A	blaTEM-1B, sul3
RGU	163	ecoli	937	B1	blaTEM-1D
NVAL	B36	ecoli	642	B1	blaTEM-1B
NVAL	B49	ecoli	164	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1A, floR, sul2, tet(A)
NVAL	B63	ecoli	164	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1A, sul2, tet(A)
NVAL	B66	ecoli	164	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1A, floR, sul2, tet(A)
NVAL	B7	ecoli	58	B1	blaTEM-1B
NVAL	B81	ecoli	1704	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1A, sul2, tet(A)
HU	CE-1-2	ecoli	4623	B1	blaLAP-2, blaTEM-1B, qnrS1, tet(A)
NVAL	DB26	ecoli	56	B1	blaTEM-1B, dfrA17
NVAL	DB37	ecoli	101	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, sul2, tet(A)
NVAL	DB38	ecoli	224	B1	aac(3)-II d, blaTEM-1B
NVAL	DB42	ecoli	58	B1	blaTEM-1B
NVAL	DB43	ecoli	2329	B1	blaTEM-1B
GU	GABPC5	ecoli	795	B1	blaTEM-1B, sul2
HU	MA-1-1b	ecoli	7937	B1	aac(3)-II d, aadA2, blaTEM-1B, catA1, dfrA12, mph(A), qacE, sul1
NVAL	P104	ecoli	101	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, sul2, tet(A)
NVAL	P20	ecoli	58	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, sul2
NVAL	P64	ecoli	1727	B1	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA14, sul2, tet(A)
NVAL	P80	ecoli	641	B1	aadA1, blaTEM-1B, dfrA1, sul3
SMU	ABPCEc11_2	ecoli	131	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc112	ecoli	131	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc129	ecoli	131	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc141	ecoli	131	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc170	ecoli	1193	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc24	ecoli	569	B2	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, sul2
SMU	ABPCEc5	ecoli	131	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc51	ecoli	131	B2	aac(3)-II d, blaTEM-1B
SMU	ABPCEc81	ecoli	131	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc9	ecoli	73	B2	aac(3)-II d, blaCTX-M-3, blaTEM-1B
SMU	ABPCEc91	ecoli	12	B2	ant(3'')-Ia, blaTEM-1B, qacE, sul1
SMU	ABPCEc97	ecoli	N/A	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc98	ecoli	131	B2	blaTEM-1B
SMU	ABPCEc1_1	ecoli	69	D	blaTEM-1B
RGU	F3-6E	ecoli	973	D	blaTEM-1B
RGU	F5-4	ecoli	973	D	blaTEM-1B
RGU	165	ecoli	182	E	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA7, qacE, sul1, sul2
RGU	166	ecoli	182	E	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA7, qacE, sul1, sul2, tet(A)
SMU	ABPCEc194	ecoli	648	F	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA14, sul2
SMU	ABPCEc195	ecoli	648	F	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA14, sul2
SMU	ABPCEc198	ecoli	648	F	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, sul2
RGU	175	ecoli	N/A	G	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA5, sul2, tet(A)
RGU	S10-5E	efergusonii	7852	fergus	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA14, sul2

図14. *bla*_{TEM}遺伝子とそれに隣接したIS26を含む構造が検出された47株(左側に由来を示す: NVAL, 動物医薬品検査所、HU, 広島大学、GU, 岐阜大学、SMU, 札幌医大、RGU, 酪農学園大学)

IS26-*bla*_{TEM-1}



Source	Isolate	Species	MLST	Group	contig	ARG	MGE	Plasmid/replcon	Length
NVAL	P114	ecoli	10	A	P114_contig00194	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA8, sul2	IS26, Tn6205	None	8,484
NVAL	B86	ecoli	642	B1	B86_contig00182	blaTEM-1B	IS26	None	1,935
NVAL	DB88	ecoli	224	B1	DB88_contig00114	aac(3)-11d, blaTEM-1B	IS26	None	3,297
SMU	ABPCEc129	ecoli	131	B2	ABPCEc129_contig00160	blaTEM-1B	IS26, IS629	None	6,658
SMU	ABPCEc170	ecoli	1193	B2	ABPCEc170_contig00057	blaTEM-1B	IS26	None	6,921
SMU	ABPCEd5	ecoli	131	B2	ABPCEd5_contig00093	blaTEM-1B	IS26, IS629	None	16,396
SMU	ABPCEd81	ecoli	131	B2	ABPCEd81_contig00131	blaTEM-1B	IS26	None	10,948
SMU	ABPCEd97	ecoli	N/A	B2	ABPCEd97_contig00168	blaTEM-1B	IS26	None	3,746
SMU	ABPCEc1_1	ecoli	69	D	ABPCEc1_1_contig00158	blaTEM-1B	IS26	None	8,219

IS26-*bla*_{TEM-1}



Source	Isolate	Species	MLST	Group	contig	ARG	MGE	Plasmid/replcon	Length
SMU	ABPCEc112	ecoli	131	B2	ABPCEc112_contig00056	blaTEM-1B	IS26	IncFI B(AP001918)	9,976
SMU	ABPCEd98	ecoli	131	B2	ABPCEd98_contig00232	blaTEM-1B	IS26	None	2,630

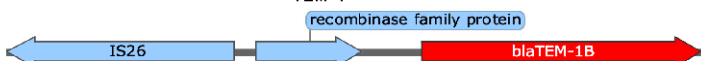
IS26(Δ57aa)-*bla*_{TEM-1}



Source	Isolate	Species	MLST	Group	contig	ARG	MGE	Plasmid/replcon	Length
NVAL	P54	ecoli	1244	A	P54_contig00105	blaTEM-1B, floR	IS26, IS903	None	9,155

図15a. IS26-*bla*_{TEM-1}周辺構造の解析例(12株)

IS26-recombinase-*bla*_{TEM-1}



Source	Isolate	Species	MLST	Group	contig	ARG	MGE	Plasmid/replcon	Length
NVAL	DB86	ecoli	744	A	DB86_contig00063	aadA5, aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, catA1, dfrA17, mph(A), qacE, sul1, sul2	IS26, IS26, IS26, IS6100, Tn6205	IncQ1	24,950
GU	GABPC5	ecoli	795	B1	GABPC5_contig00025	blaTEM-1B, sul2	IS26, IS679, ISVas5	IncFI1	58,643

*bla*_{TEM-1}-IS26



Source	Isolate	Species	MLST	Group	contig	ARG	MGE	Plasmid/replcon	Length
RGU	163	ecoli	937	B1	163_contig00037	blaTEM-1D	IS26	None	41,843
NVAL	B7	ecoli	58	B1	B7_contig00188	blaTEM-1B	IS26, Tn2	None	6,396
RGU	F9-6E	ecoli	973	D	F9-6E_contig00272	blaTEM-1B	IS26	None	2,597
RGU	P5-4	ecoli	973	D	P5-4_contig00262	blaTEM-1B	IS26	None	2,368
RGU	175	ecoli	N/A	G	175_contig00014	aph(3'')-1b, aph(6)-1d, blaTEM-1B, dfrA5, sul2, tet(A)	IS26, IS26, Tn1721, Tn6205	IncQ1	23,742

図15b. IS26-*bla*_{TEM-1}周辺構造の解析例(7株)

（６）家畜由来薬剤耐性菌の野菜への伝播に関する定量的食品影響評価（蒔田浩平（酪農学園大学））

目的

日本の酪農場で、 β ラクタム系抗菌薬を使用することによる、 β ラクタマーゼ産生大腸菌の野菜への伝播の可能性を、菌数として評価した。

研究方法

１．健康影響事象発生までのシナリオ・ツリーの作成

文献を整理しつつ、フォルト・ツリーを用いて、 β ラクタム系抗菌薬への薬剤耐性が人に健康影響を及ぼす事象の発生が起こる原因について、ヒトの体内、流通加工、野菜生産、施肥・灌水、堆肥生産・農場排水、 β ラクタム系抗菌薬の使用、適応症例の発生、と可能性がある全てのシナリオを段階的に遡り、本研究で実施されている実験の関連と共に整理した。フォルト・ツリーは、家畜で抗菌薬をもちいることによる人への健康被害までのロジックを整理したシナリオ・ツリーを作成するためのものであり、問題発生が起こる全ての可能性がある原因を順番に遡っていくことで、ロジックの見落としを防ぐために実施した。家畜用に認可されている β ラクタム系抗菌薬と適応症のリストは、動物用抗菌剤研究会編「動物用抗菌剤マニュアル、インターズー」を用いて作成した。

２．国内の野菜バリューチェーンの把握

わが国の野菜の生産から食卓までの一連のメカニズムについて、国内の資料を収集し、整理した。野菜流通と有機堆肥の施肥について、野菜生産現場の実態を確認するため、北海道と長野県の野菜生産者一戸ずつを訪問、オンライン会議、電話会議を用いて情報収集した。さらに、商品としての堆肥生産流通実態の把握のため、民間企業へのインタビューを実施した。

国内の都道府県および北海道内の乳牛飼養頭数分布と、牛由来堆肥の利用が多い野菜について栽培面積を調査し、その比較のため地図を作成した。

３．定量的発生評価

１のシナリオ・ツリーを参考に、乳用牛への β ラクタム系抗菌薬の使用から耐性菌の選択、堆肥化・スラリータンクでの処理、圃場への堆肥ならびにスラリー散布、野菜集荷時の野菜体表および体内の耐性菌数を段階的にシミュレートする発生評価モデルをデザインした。

酪農場での成牛、育成牛、仔牛における β ラクタム系抗菌薬適応症の発生ならびに当該疾病発生時の治療データは、北海道NOSAIから2016年から2018年について提供を受けた。 β ラクタム系抗菌薬による治療後の耐性菌数の変化は、公表論文（Ahmed Aらの報告（2016））の図からデータを作成した。

酪農場における*bla*遺伝子保有大腸菌の浸潤農場割合は、JVARMデータから確率分布を作成した。JVARMデータはと畜場で採材した大腸菌を検査しており、酪農場のみのデータはない。しかしながら、と畜場で処理される牛の多くは乳用種であること、実験班のデータからJVARMデータと限られているが酪農場での調査結果には同じ傾向が見られることから、JVARMデータを使用することとした。

耐性遺伝子*bla*保有大腸菌浸潤農場における牛生糞の β ラクタマーゼ産生大腸菌数の計算は、公表論文から仔牛、育成牛、成牛の一日糞便排出量を用いて、それぞれの成育区分で β ラクタム系抗菌薬適応症が発生し、北海道NOSAIの記録に基づく確率で特定の抗菌剤を使用、それにより一時的な耐性菌数の増加が起こり、Ahmed et al. 2016のデータで観察された耐性菌数の減少を再現した。

酪農場での生糞から未完熟堆肥およびスラリーへの菌数減少については、実験班のデータから菌数

を対数変換し、その二段階の差分データをブートストラップし、確率分布を作成した。完熟堆肥については、実験班による圃場でのデータから、生きた大腸菌は残存しないと判断した。未完熟堆肥およびスラリーの圃場散布後の経時的变化は、実験班のデータから、混合効果一般化線形モデルポワソン誤差を用いて、施肥後日数を説明変数、圃場の大腸菌数を目的変数として減少曲線を導いた。

野菜圃場での施肥から収穫までの日数は、二戸の野菜農家からの聞き取りに基づき設定し、異なる種類の野菜収穫時の圃場の β ラクタマーゼ産生大腸菌数をシミュレートした。

野菜体内の耐性菌数については、小松菜とレタスの実験結果から、土壤中の菌数と野菜体内の菌数について、対数変換した後差分を取り、菌数の減少程度を計算した。これを用いて、野菜収穫時の圃場における推定耐性菌数から、小松菜とレタスにおける収穫時の野菜体内菌数を推定した。トマトは実験で野菜体内から菌が検出されなかったため、トマト体内には耐性菌が侵入しないとし、推定を行わなかった。

Ahmed ら(Ahmed らの報告(2016))による公表論文では、糞便中の大腸菌の全てが β ラクタマーゼ産生菌ではないとしているため、前述のシミュレーションを実施した。しかし大腸菌数として考えた場合、生鮮野菜喫食時の菌数を計算しておくことには意義がある。このため、半熟堆肥とスラリーそれぞれによる圃場までの大腸菌数変化のシミュレーションを別途実施した。さらに、生の牛糞尿を投入したスラリータンクから、ばっ気をせずに圃場に散布した場合の野菜収穫時および喫食時の野菜体内 β ラクタマーゼ産生大腸菌数変化のシミュレーションを実施した。

研究成果

1. 健康影響事象発生までのシナリオ・ツリー

図16から18に、健康影響事象発生から家畜での β ラクタム系抗菌薬の使用まで遡るフォルト・ツリーを示す。健康影響は、 β ラクタマーゼ産生病原性細菌による下痢・嘔吐の発生、あるいは創傷、尿路感染症、敗血症など腸管外感染症の発生とした。図16のとおり人の腸管内でのシナリオは用意されたが、特に腸管内での野菜由来 β ラクタマーゼ産生菌から*bla*遺伝子受け渡しによって腸管内常在菌が β ラクタマーゼ産生菌となる確率について、その実態把握に課題が残ることも整理された。

用抗菌薬について、図18のとおり整理を行った。



図18. 各畜種における適応症と認可されているβラクタム系動物用抗菌薬

2. 国内の野菜バリューチェーン

かつて野菜は図19のように生産者、農協、卸売市場、小売りを介して消費者に届く形態が主であったが、近年ではインターネット宅配や農地直送取引が増加しており、多様化していた。

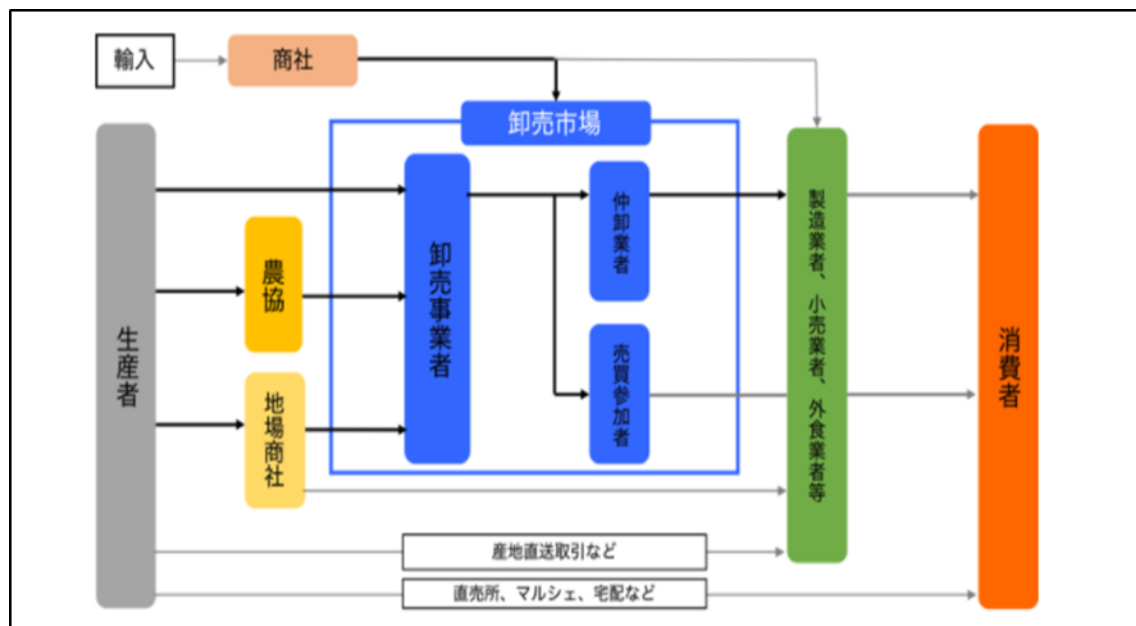


図19. 近年の野菜の流通

北海道における酪農飼養頭数と堆肥生産量、玉ねぎとキャベツの作付面積は地理的に一致が見られたが、トマトの作付面積は札幌近郊で大きく、有機堆肥の長距離輸送が盛んであることが考えられた（図20）。北海道以外の地域においては、畜産生産地からの有機堆肥の流通が考えられる。

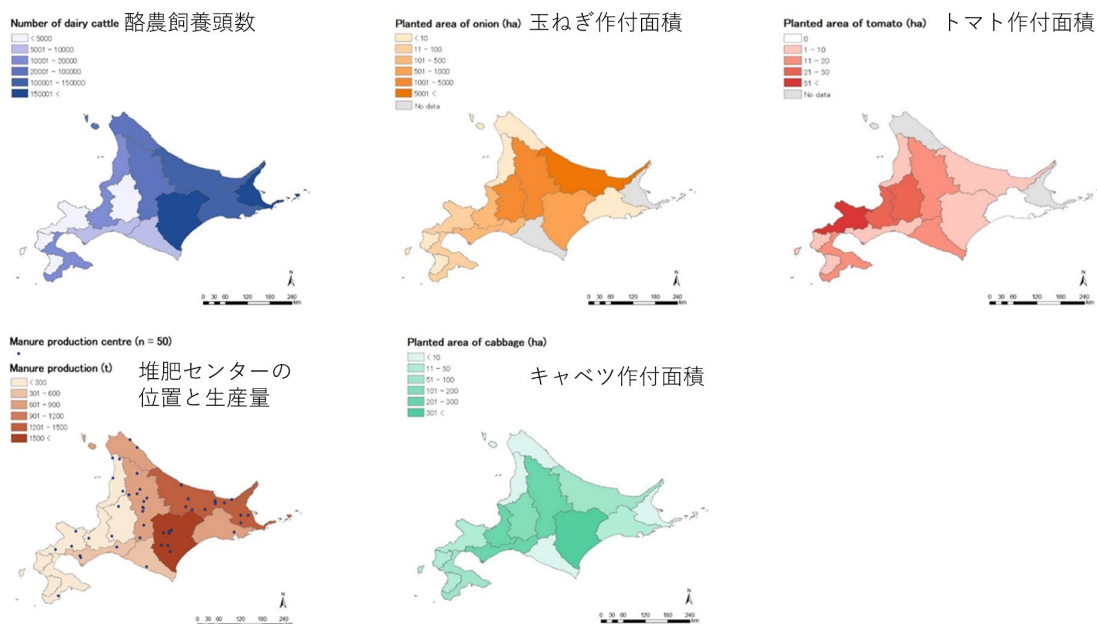


図20. 北海道における酪農飼養頭数、堆肥センター、生食される野菜の作付面積

農林水産省による家畜糞便を原料とする堆肥の使用状況調査（平成22年）によると、レタス農場の74%、きゅうり農場の69%、トマト農場の67%で牛糞堆肥が使用されている（表38）。

表 38. 家畜糞便を原料とする堆肥の使用（農林水産省プレスリリース（平成 22 年 6 月 8 日「生食用野菜における腸管出血性大腸菌及びサルモネラの実態調査結果」）

⑤ 家畜糞便を原料とする堆肥の使用

調査対象 ほ場	1.堆肥の使用		2.堆肥の入手先（複数回答）			3.堆肥の種類（複数回答）		
	有	無	自家製	畜産 農家	業者・堆肥 センター	牛糞	豚糞	鶏糞
レタス ほ場	282 (75)	95 (25)	32 (12)	181 (65)	71 (26)	208 (74)	29 (10)	63 (22)
キャベツ ほ場	114 (27)	304 (73)	12 (11)	50 (48)	57 (54)	53 (46)	25 (22)	45 (39)
ねぎ ほ場	244 (65)	131 (35)	6 (3)	176 (73)	60 (25)	85 (35)	96 (40)	65 (27)
トマト ほ場	290 (66)	151 (34)	29 (10)	143 (49)	119 (41)	189 (67)	61 (22)	28 (10)
きゅうり ほ場	346 (57)	259 (43)	25 (7)	183 (54)	138 (40)	234 (69)	60 (18)	57 (17)

数値は回答ほ場数（括弧内は割合(%)）。無効回答を除く。

野菜農家で牛糞堆肥の使用が多いレタスの作付け面積と乳牛頭数を都道府県別に地図上に図示すると、概ね一致が見られ、レタスについては近隣地域での堆肥流通が示唆された（図 21）。北海道の堆肥販売会社によると、都道府県域を超えた広域の堆肥流通もあるが、堆肥生産会社では品質管理しており、販売堆肥は完熟で大腸菌が大量に含まれることは考えにくいとのことであった。一方、有機野菜農家への聞取りでは、近隣畜産農家から未完熟堆肥を購入する場合もあるとの見解であった。

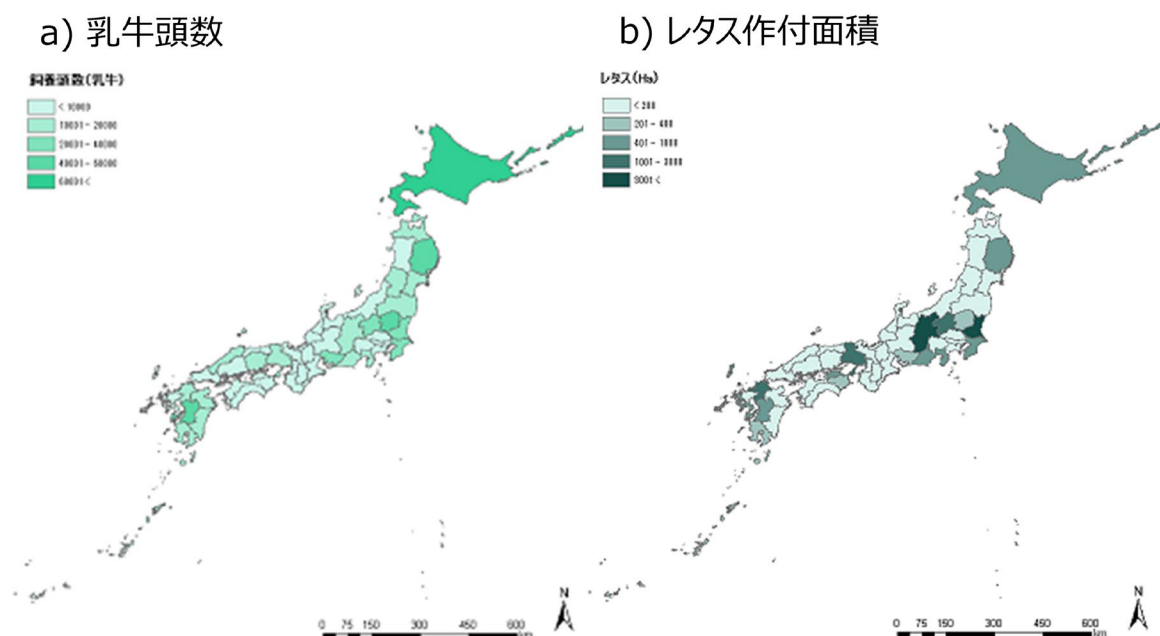


図 21. 都道府県別乳牛頭数（a）とレタス作付面積（b）の比較

3. 定量的発生評価

北海道 NOSAI から、2016 年、2017 年、2018 年についてそれぞれ合計 791,000 頭、779,400 頭、785,700 頭のデータを得た。表 39 に、仔牛、育成牛、成牛における β ラクタム系抗菌薬適応症発生数からガンマ分布を用いて推計した各疾病の年間発生率を示す。

表 39. β ラクタム系抗菌薬適応症の年間発生率

病名	母集団	中央値	2.5 - 97.5 パーセンタイル
仔牛の肺炎	仔牛	37.04%	36.87 - 37.20%
育成牛の肺炎	育成牛	4.29%	4.23 - 4.35%
仔牛の下痢	仔牛	31.74%	31.58 - 31.91%
育成牛の下痢	育成牛	1.01%	0.99 - 1.04%
臨床型・潜在性成牛乳房炎	成牛	57.63%	57.50 - 57.75%
未経産乳房炎	育成牛	0.18%	0.17 - 0.19%
産褥熱	成牛	2.58%	2.56 - 2.61%
趾間フレグモーネ	成牛	1.51%	1.49 - 1.53%
外科手術	成牛	12.89%	12.83 - 12.95 %

* 2.5-97.5 パーセンタイルとは、シミュレーションモデルが結果の不確実性（知識の欠如：uncertainty）を含んで計算するため、1000 回のシミュレーションでの下位 2.5%と上位 2.5%の値を示している。

薬剤ごとにまとめた表 40～45 に、各適応症発生時の抗菌剤使用確率を示す。βラクタム系抗菌薬の中でも、仔牛の肺炎と下痢症発生時に最も頻繁に使用されていたのはベンジルペニシリン注射剤であった（表 42）。成牛の乳房炎発生時に最も頻繁に使用されていたのはセファゾリン乳房内投与剤であった（73.24%、表 43）。産褥熱発生時にはアンピシリン注射剤の使用が最も多かった（30.01%、表 40）。外科手術時にはベンジルペニシリンのみ使用されており、その確率は 29.27%であった（表 42）。趾間フレグモーネ発生時にはセフトリオフルのみ使用されていた（25.38%、表 45）。

表 40. アンピシリン使用確率

病名と剤型	中央値	2.5 - 97.5 パーセンタイル
仔牛の肺炎発生時の注射剤使用	5.75%	5.64 - 5.86%
育成牛の肺炎発生時の注射剤使用	6.78%	6.46 - 7.12%
仔牛の下痢発生時の注射剤使用	5.85%	5.73 - 5.96%
育成牛の下痢発生時の注射剤使用	1.87%	1.52 - 2.27%
仔牛の下痢発生時の散剤使用	2.31%	2.24 - 2.39%
育成牛の下痢発生時の散剤使用	0.88%	0.65 - 1.19%
成牛の乳房炎発生時の注射剤使用	4.66%	4.62 - 4.71%
未経産乳房炎発生時の注射剤使用	12.90%	10.89 - 15.36%
産褥熱発生時の注射剤使用	30.01%	29.49 - 30.45%

* 2.5-97.5 パーセンタイルとは、シミュレーションモデルが結果の不確実性（知識の欠如：uncertainty）を含んで計算するため、1000 回のシミュレーションでの下位 2.5%と上位 2.5%の値を示している。

表 41. アモキシシリン使用確率

病名と剤型	中央値	2.5 - 97.5 パーセンタイル
仔牛の肺炎発生時の注射剤使用	3.89%	3.80 - 3.99%
育成牛の肺炎発生時の注射剤使用	5.47%	5.18 - 5.76%
仔牛の下痢発生時の注射剤使用	2.03%	1.96 - 2.10%
育成牛の下痢発生時の注射剤使用	0.76%	0.55 - 1.02%

* 2.5-97.5 パーセンタイルとは、シミュレーションモデルが結果の不確実性（知識の欠如：uncertainty）を含んで計算するため、1000 回のシミュレーションでの下位 2.5%と上位 2.5%の値を示している。

表 42. ベンジルペニシリン使用確率

病名と剤型	中央値	2.5 - 97.5 パーセンタイル
仔牛の肺炎発生時の注射剤使用	12.21%	12.06 - 12.38%
育成牛の肺炎発生時の注射剤使用	14.43%	13.95 - 14.90%
成牛の乳房炎発生時の注射剤使用	8.06%	8.00 - 8.12%
未経産乳房炎発生時の注射剤使用	57.44%	54.08 - 60.71%
外科手術時の注射剤使用	29.27%	29.04 - 29.46%
成牛の乳房炎発生時の乳房内投与剤使用	32.70%	32.59 - 32.79%
未経産乳房炎発生時の乳房内投与剤使用	39.84%	36.68 - 43.41%

* 2.5-97.5 パーセンタイルとは、シミュレーションモデルが結果の不確実性（知識の欠如：uncertainty）を含んで計算するため、1000 回のシミュレーションでの下位 2.5%と上位 2.5%の値を示している。

表 43. セファゾリン使用確率

病名と剤型	中央値	2.5 - 97.5 パーセンタイル
仔牛の肺炎発生時の注射剤使用	2.91%	2.82 - 2.98%
育成牛の肺炎発生時の注射剤使用	3.01%	2.78 - 3.27%
仔牛の下痢発生時の注射剤使用	5.44%	5.32 - 5.55%
育成牛の下痢発生時の注射剤使用	1.11%	0.83 - 1.40%
成牛の乳房炎発生時の注射剤使用	3.23%	3.19 - 3.27%
未経産乳房炎発生時の注射剤使用	4.93%	3.67 - 6.50%
成牛の乳房炎発生時の乳房内投与剤使用	73.24%	73.14 - 73.34%
未経産乳房炎発生時の乳房内投与剤使用	45.07%	41.99 - 48.32%

* 2.5-97.5 パーセンタイルとは、シミュレーションモデルが結果の不確実性（知識の欠如：uncertainty）を含んで計算するため、1000 回のシミュレーションでの下位 2.5%と上位 2.5%の値を示している。

表 44. セフロキシム使用確率

病名と剤型	中央値	2.5 - 97.5 パーセンタイル
成牛の乳房炎発生時の乳房内投与剤使用	12.87%	12.80 - 12.95%
未経産乳房炎発生時の乳房内投与剤使用	4.03%	2.95 - 5.49%

* 2.5-97.5 パーセンタイルとは、シミュレーションモデルが結果の不確実性（知識の欠如：uncertainty）を含んで計算するため、1000 回のシミュレーションでの下位 2.5%と上位 2.5%の値を示している。

表 45. セフトリオフル使用確率

病名と剤型	中央値	2.5 - 97.5 パーセンタイル
仔牛の肺炎発生時の注射剤使用	0.75%	0.71 - 0.79%
育成牛の肺炎発生時の注射剤使用	0.83%	0.71 - 0.97%
産褥熱発生時の注射剤使用	6.84%	6.59 - 7.09%
成牛の趾間フレグモーネ発生時の注射剤使用	25.38%	24.78 - 26.00%

* 2.5-97.5 パーセンタイルとは、シミュレーションモデルが結果の不確実性（知識の欠如：uncertainty）を含んで計算するため、1000 回のシミュレーションでの下位 2.5%と上位 2.5%の値を示している。

JVARM データでは 2015-2019 年の健康な牛を対象としたと畜場調査で、75/1,261 農場由来大腸菌が *bla* を保有していたため、全国の酪農場のうち、堆肥に *bla* が入っている確率は、6.0% (95%CI: 4.8 - 7.4%)と推定された。これら *bla* 保有大腸菌が浸潤している酪農場で、生糞中の β ラクタマーゼ産生大腸菌数は 3.32 log10CFU/g (95%CI: 3.31 - 3.32)と推定された。

堆肥化により、未完熟堆肥およびスラリーの β ラクタマーゼ産生大腸菌数は 1.52 log10CFU/g (95%CI: 1.03 - 1.96)、および 1.18 log10CFU/g (95%CI: 0.87 - 1.51)であった。圃場への施肥直後では、未完熟堆肥施肥の場合、 β ラクタマーゼ産生大腸菌数は 0.83 log10CFU/g (95%CI: 0.34 - 1.29)、スラリー施肥の場合、-0.57 log10CFU/g (95%CI: -1.04 - 0.12)であった。

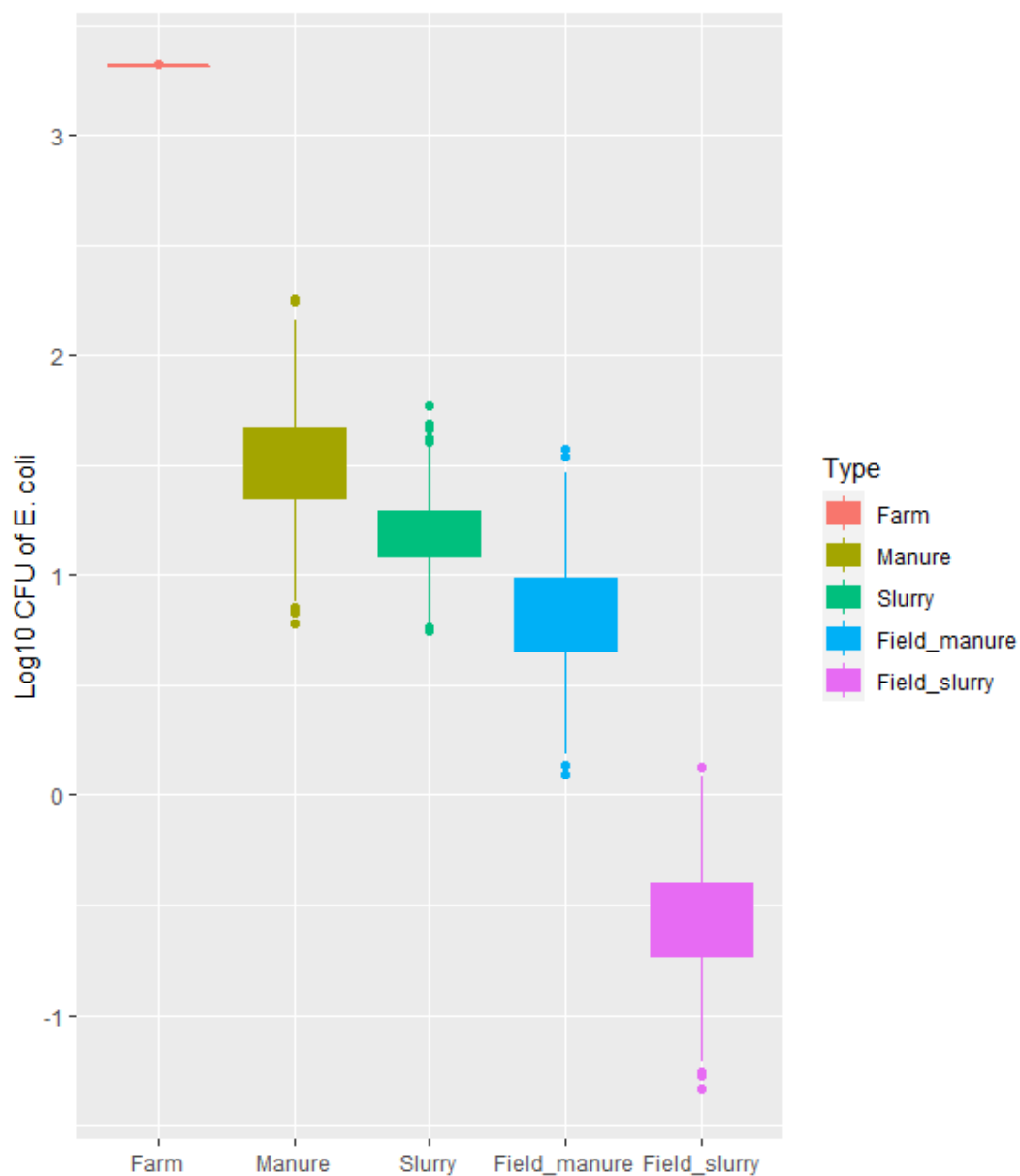


図 22. 酪農場の生糞 (Farm)、未完熟堆肥 (Manure)、スラリー (Slurry)、未完熟堆肥施肥日の圃場 (Field_manure)、およびスラリー散布日の圃場 (Field_slurry) における β ラクタマーゼ産生大腸菌数 (底 10 の対数表示)

圃場散布後の大腸菌数は、混合効果モデルの結果、対数スケールで日ごとに 0.05 (標準誤差 0.003、 $p < 0.0001$) ずつ減少した (図 23)。

a) 未完熟堆肥施肥圃場の耐性大腸菌数

b) スラリー施肥圃場の耐性大腸菌数

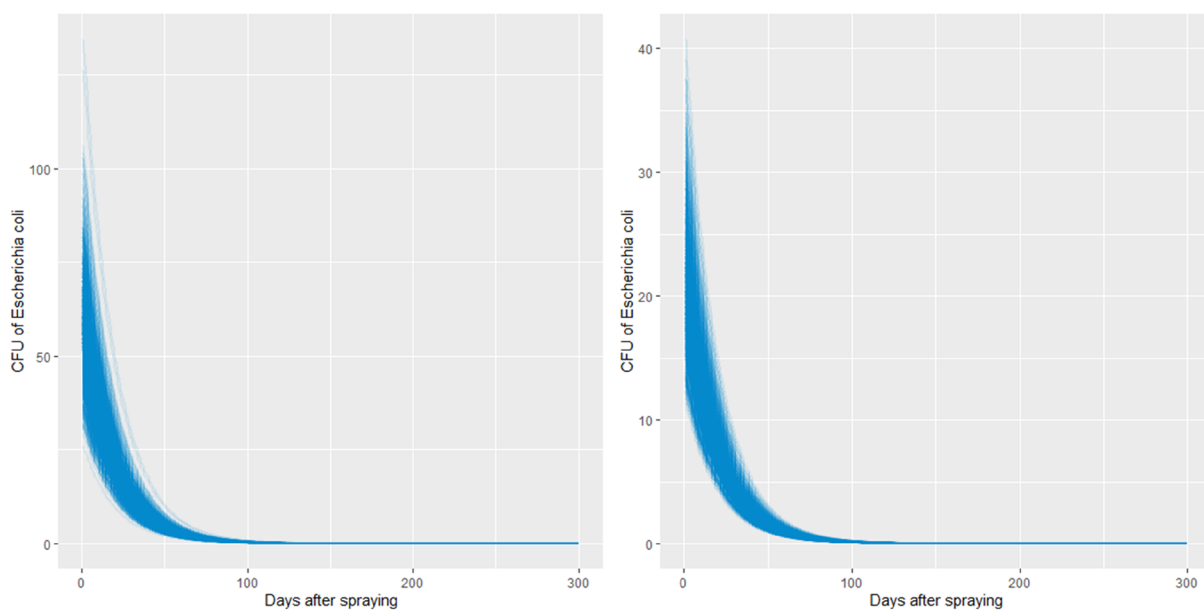


図 23. 未完熟堆肥 (a) およびスラリー (b) 施肥後の β ラクタマーゼ産生大腸菌数の減少 (施肥後 300 日間)

野菜農家への聞取り内容に基づく計算では、施肥後収穫までの日数は、葉物野菜で 164 日、トマトで 206 日、大根で 125 日、玉ねぎは春の種撒きで 274 日、秋撒きで 300 日であった。よって収穫時の圃場の β ラクタマーゼ産生大腸菌数は、葉物野菜で $-2.87 \log_{10}\text{CFU/g}$ (95%CI: $-3.36 - -2.42$)、トマトで $-3.81 \log_{10}\text{CFU/g}$ (95%CI: $-4.31 - -3.36$)、大根で $-1.99 \log_{10}\text{CFU/g}$ (95%CI: $-2.48 - -1.54$)、春撒き・秋収穫の玉ねぎで $-5.35 \log_{10}\text{CFU/g}$ (95%CI: $-5.86 - -4.90$)、秋撒き・春収穫の玉ねぎで $-5.94 \log_{10}\text{CFU/g}$ (95%CI: $-6.43 - -5.49$)であった (図 24)。

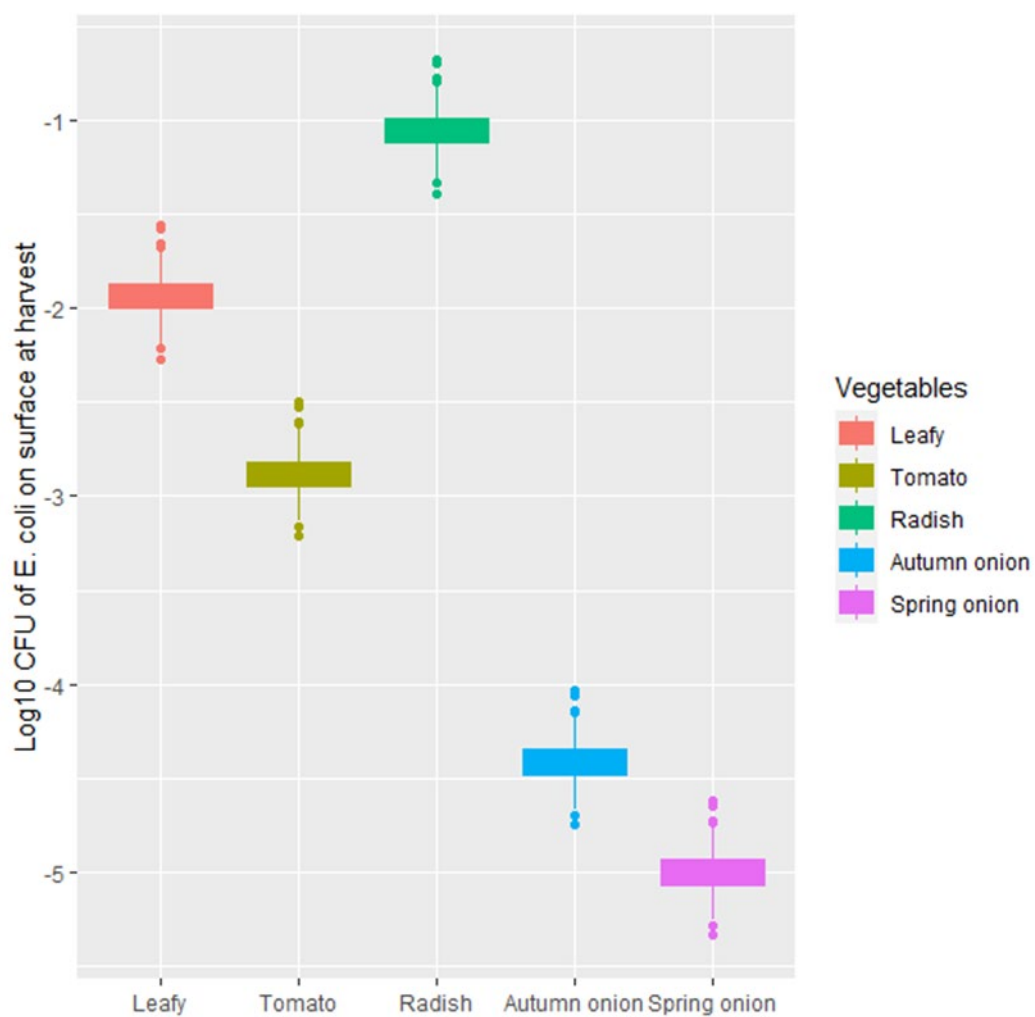


図 24. 野菜収穫時の圃場の β ラクターマーゼ産生大腸菌数：葉物野菜（Leafy）、トマト（Tomato）、大根（Radish）、秋収穫玉ねぎ（Autumn onion）、春収穫玉ねぎ（Spring onion）

本研究では大根について大腸菌土壌接種試験はされておらず、トマト体内からは実験で大腸菌は検出されていない。小松菜については、実験結果を用いると、収穫時の β ラクターマーゼ産生大腸菌数は $-9.88 \log_{10}\text{CFU/g}$ (95%CI: $-10.38 - -9.43$)、レタスは $-10.91 \log_{10}\text{CFU/g}$ (95%CI: $-11.52 - -8.72$) であった（図 25）。

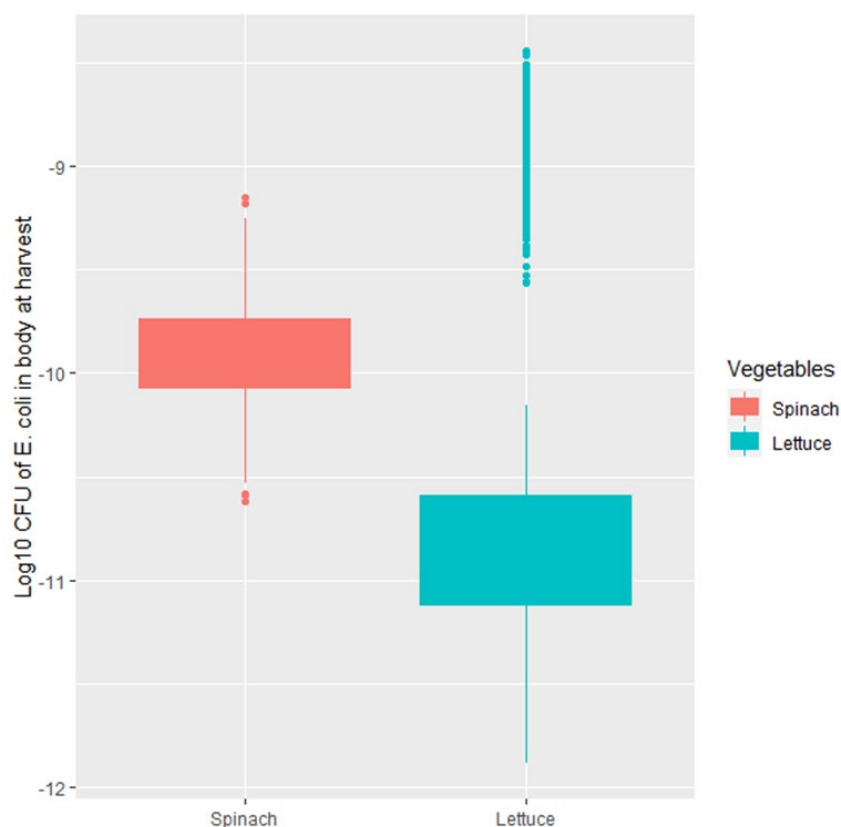


図 25. 収穫時の野菜体内 β ラクタマーゼ産生大腸菌数：小松菜（Spinach）とレタス（Lettuce）

野菜収穫までの各ステップについて、 β ラクタム系抗菌薬感受性大腸菌を含む大腸菌数を表 46 に示す。収穫時に土壌が付着している葉物野菜と大根の圃場では、収穫時にそれぞれ大腸菌数は 1.81 log10CFU/g (95%CI: 1.30 - 2.26) と 2.69 log10CFU/g (95%CI: 2.18 - 3.14) であった。小松菜とレタス体内の大腸菌数は両方とも 1g 当たり 1 個以下であった。

表 46. 野菜収穫までの各ステップにおける β ラクタム系抗菌薬感受性大腸菌を含む大腸菌数

段階	中央値 (log CFU/g)	2.5 - 97.5 パーセンタイル
未完熟堆肥	6.20	5.70 - 6.65
スラリー	5.87	5.58 - 6.20
未完熟堆肥施肥時の圃場	5.51	5.00 - 5.96
スラリー施肥時の圃場	4.11	3.64 - 4.56
葉物野菜収穫時の圃場	1.81	1.30 - 2.26
トマト収穫時の圃場	0.86	0.35 - 1.31
大根収穫時の圃場	2.69	2.18 - 3.14
秋収穫玉ねぎ収穫時の圃場	-0.67	-1.18 - -0.22
春収穫玉ねぎ収穫時の圃場	-1.26	-1.77 - -0.81
小松菜収穫時の野菜体内	-5.21	-5.72 - -4.75
レタス収穫時の野菜体内	-6.23	-6.88 - -4.06

最後に、ばっ気処理されていないスラリーを直接圃場に散布した場合の β ラクタマーゼ産生大腸菌数を表 47 に示す。このシナリオでは、施肥から収穫まで最も日数の短い大根で、収穫時に圃場の土壌 1g 当たり β ラクタマーゼ産生大腸菌数が 1 に近くなることが確認された。

表 47. ばっ気処理されていないスラリーを直接圃場に散布した場合の β ラクタマーゼ産生大腸菌数

段階	中央値 (log CFU/g)	2.5 - 97.5 パーセンタイル
生スラリー散布時の圃場	2.63	2.59 - 2.66
葉物野菜収穫時の圃場	-1.11	-1.07 - -1.04
トマト収穫時の圃場	-2.02	-2.06 - -1.99
大根収穫時の圃場	-0.19	-0.23 - -0.16
秋収穫玉ねぎ収穫時の圃場	-3.56	-3.59 - -3.53
春収穫玉ねぎ収穫時の圃場	-4.15	-4.18 - -4.11
小松菜収穫時の野菜体内	-8.09	-8.13 - -8.06
レタス収穫時の野菜体内	-9.10	-9.38 - -7.16

考察

本研究では酪農に限って家畜由来 β ラクタマーゼ産生菌の野菜への伝播の可能性について定量的に評価することが出来た。 β ラクタマーゼ産生菌が酪農場で浸潤している確率は 6.0%と想定され、それら酪農場由来の堆肥が圃場に運ばれることは、日本全国で日々起きていると考えられるが、 β ラクタマーゼ産生菌に限った場合、野菜収穫段階での圃場土壌中の菌数はすでに非常に低いレベルにあると推定された。一方、シミュレーションモデルのスタートを、感受性菌も含む大腸菌全体とした場合、推定結果からは、葉物野菜と大根では、収穫時の圃場土壌中には 1 g 当たり 100 個以上の大腸菌が含まれる場合も珍しくないと考えられた。すなわち野菜表面がよく洗浄されていないと、大腸菌を喫食してしまう可能性は低くない。これは表面が十分洗浄されていない野菜と一緒に、菌数は少ないはずであるが、 β ラクタマーゼ産生菌を喫食してしまうことも十分あり得るということになる。ただ野菜体内となると大腸菌数は極めて低く、野菜の生食自体を危険視する必要性は低いと考えられた。

またリスク管理措置として施肥に用いる家畜糞便の十分な堆肥化の推奨が考えられるが、表 47 で示したばっ気されていないスラリーの圃場への散布シナリオでは、 β ラクタマーゼ産生大腸菌も野菜表面に土壌 1 g 当たり 1 個程度の菌数が付着することになり、土壌が付着した状態の不十分な洗浄で食卓に上る場合は、人の野菜喫食の際に耐性菌が摂取される可能性は低くないということになる。このため、十分な堆肥化に加え、野菜洗浄の啓発は必要と考えられる。

本研究では、大根が堆肥の施肥から収穫まで時間が短く、収穫時に野菜表面に大腸菌が付着している可能性が高いことが示唆された。残念ながら本研究プロジェクトでは、大根体内への大腸菌の取り込みに関する実験が行われていない。レビュー論文 (Hirneisen K らの報告 (2012)) によると、病原菌の根からの吸収はそれほど多くないが、野菜の種類に限らず根が傷ついているときに起こりやすいことが示唆されている。本プロジェクトでは、水系における耐性大腸菌数は顕著でなかったが、大雨後には下水処理場からのオーバーフローなどで河川の大腸菌数が増加することが示唆されている。本リスク評価の目的である家畜由来耐性大腸菌が水系を汚染し、灌水として圃場に散布されるシナリオについても、大雨によるスラリータンクの増水時に河川への流入が起こることが考えられる。本評価には灌水による圃場汚染の検討が含まれておらず、今後大雨による河川汚染後等の灌水の影響を検討する余地がある。

今後の課題

野菜の大腸菌取込みの実験は、今後野菜の種類やシナリオを増やして検証した方が良いと思われる。本評価では大腸菌のみを扱ったが、今後は他菌種にも評価の幅を広げることが必要かもしれない。

本評価で家畜由来の β ラクタマーゼ産生大腸菌は、堆肥化過程や施肥後の時間的な経過を経て野菜収穫段階にはほぼ死滅していると推定されたが、土中に残った耐性遺伝子が、土壌菌に取り込まれる可能性など、大腸菌によらない人への暴露について、実験が進展することを期待したい。また大雨後、家畜排せつ物由来耐性菌により汚染された灌水による圃場汚染の影響についてさらに検討する余地がある。

【参考文献】

- Ahmed A., Zachariasen C., Christiansen L.E., Crasboll K., Toft N., Matthews L., Nielsen S. S., Olsen J.E. 2016. Modelling the growth dynamics of multiple *Escherichia coli* strains in the pig intestine following intramuscular ampicillin treatment. BMC Microbiol. 16.205.
- Hirneisen K.A., Sharma M., Kniel K.E. 2012. Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. Foodborne Pathog Dis. 9. 396-405.

2 研究全体の成果、考察及び結論

大学附属農場及び野外の農場において、家畜排泄物及びその処理物、散布土壌、作物を同一のフィールドで採材した結果、家畜排泄物に含まれる薬剤耐性菌と近縁な株が、土壌及び作物からも分離されたことから、家畜由来薬剤耐性菌が土壌を介して野菜に伝播する可能性は否定できなかった。しかし、耐性菌量、耐性遺伝子量を調べたことで、堆肥化やバイオガスプラント処理などの処理を経るごとに、耐性菌量/耐性遺伝子量共に減少していき、家畜排泄物を介して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ことが確認された。また、北部と南部の農場による差は、地域差よりも、家畜排泄物処理の結果に大きく影響されることが示唆された。

家畜、水圏、野菜、ヒト臨床由来耐性菌のゲノムについて、比較解析を行なった。今回、野菜を介した伝播について着目したため、野菜から多くの腸内細菌科細菌を分離する予定であったが、日本の市販野菜は、腸内細菌科細菌の汚染の程度が非常に低く、分離菌株を多く集めることはできなかった。ゲノム解析の結果、家畜、水圏、野菜、ヒト臨床由来耐性菌の系統発生分類は多岐にわたり、各由来株間での明確な関連性は確認できなかった。一方、家畜、水圏、野菜、ヒト臨床由来耐性菌の全てで *bla*_{TEM} 遺伝子保有株が認められ、NGS 解析の結果、*bla*_{TEM} 遺伝子とその周辺構造に IS26 の類似した遺伝子配列を保有する株が確認された。これらの株の疫学的関連性や伝播経路は不明であるが、プラスミドなどにより由来を超えて耐性遺伝子とその周辺構造が、伝播、拡散している可能性は否定できなかった。

実験室内での、土壌から野菜への薬剤耐性菌伝播の検証を行なった結果、安定しない結果も認められたが、仮に土壌が極めて高濃度の耐性菌で汚染され、かつ土壌が直接野菜へ付着した場合はあるとすれば、土壌から野菜へ耐性菌が伝播する可能性が示唆された。

野菜へ伝播する可能性について定量的に評価した結果、シミュレーションモデルのスタートを、感受性菌も含む大腸菌全体とした場合、推定結果からは、葉物野菜と大根では、収穫時の圃場土壌中には 1 g 当たり 100 個以上の大腸菌が含まれる場合も珍しくないと考えられた。すなわち野菜表面がよく洗浄されていないと、大腸菌を喫食してしまう可能性は低くない。ただし、野菜内部となると大腸菌数は極めて低く、野菜の生食自体を危険視する必要性は低いと考えられた。

一方、酪農に限って家畜由来 β ラクターマーゼ産生菌の野菜へ伝播する可能性について定量的に評価した結果、 β ラクターマーゼ産生菌が浸潤している酪農場は 6.0% と算出され、それら酪農場由来の堆肥が圃場に運ばれることは、日本全国で日々起きていると考えられるが、 β ラクターマーゼ産生菌に限った場合、野菜収穫段階での圃場土壌中の菌はほぼ死滅してしまうと推定された。

以上の結果より、家畜由来薬剤耐性菌が、土壌や野菜を介してヒトへ伝播する可能性は存在するが、リスクは極めて低いことが示された。

Ⅲ 本研究を基にした論文等

1 本研究を基にした論文と掲載された雑誌名のリスト

特になし

2 本研究を基にした学会発表の実績

- ・福田昭、臼井優、鈴木仁人、蒔田浩平、「畜産廃棄物の散布による土壌、作物への薬剤耐性菌/耐性遺伝子の伝播」、第15回細菌学若手コロッセウム、2021年8月
- ・福田昭、臼井優、鈴木仁人、蒔田浩平、「畜産廃棄物の散布による土壌、作物への薬剤耐性菌/耐性遺伝子の伝播量の解明」、第164回日本獣医学会学術集会、2021年9月
- ・堀田智之、小林郁雄、臼井優、鈴木祥広、家畜ふん堆肥の施肥土壌を介した薬剤耐性菌の作物への伝播・拡散に関する実態調査、土木学会地球環境委員会第29地球環境シンポジウム（オンライン開催）、2021.
- ・徳永七海・臼井優・浅井鉄夫・蒔田浩平、野菜喫食に伴う家畜由来βラクタム系薬剤耐性菌リスクプロファイル、獣医学会学術集会、2021年3月6日、オンライン.
- ・島本敏、菅原庸、菅井基行、島本整、市販野菜由来の薬剤耐性菌の解析、第95回日本細菌学会総会、2022年3月29日～31日（オンライン開催）
- ・中本佳子、島本敏、菅原庸、菅井基行、島本整、下水放流水由来の薬剤耐性菌の解析、第95回日本細菌学会総会、2022年3月29日～31日（オンライン開催）

3 特許権等の出願・申請等の状況

特になし

4 プログラムの著作物及びデータベースの著作物

特になし

5 その他（各種受賞、プレスリリース等）

土木学会地球環境委員会第29地球環境シンポジウム：優秀ポスター賞受賞

IV 研究開始時に申告した達成目標及び研究全体の自己評価

1 達成目標の自己評価

達成目標	評価結果	自己評価コメント
(1) 牛農場において家畜から水圏や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。	5	牛農場において、土壌や野菜へ伝播する耐性菌量/耐性遺伝子量を定量することができた。
(2) 牛が保有する薬剤耐性菌、環境に分布する薬剤耐性菌、野菜に分布する薬剤耐性菌、ヒトの臨床例で分離される薬剤耐性菌のプラスミドの類似性を明らかにするため、比較対象とする細菌を明確にする。	5	家畜、水圏、野菜、ヒト由来薬剤耐性菌のゲノム解析により、 <i>bla</i> _{TEM} -IS26 が由来を超えた水平伝播をしていることを証明することができた。
(3) 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およびその機序を明らかにする。	4	代表的な腸内細菌科細菌群 3 菌種を大量に接種することで、野菜への伝播を確認することができた。
(4) 野菜での薬剤耐性菌汚染についての定量的発生評価を試みる。	5	定量的リスク評価により、酪農場からの土壌、野菜を介した β ラクタマーゼ産生菌のリスクを定量的に評価することができた。

注) 評価結果欄は「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

2 研究全体の自己評価

項目	評価結果	自己評価コメント
(1) 研究目標の達成度	5	当初の目標の牛だけでなく、その他の家畜由来アンピシリン耐性菌も評価対象に加えて、事業を進めることができた。また、由来を超えたゲノム解析、定量的リスク評価を実施することができた。
(2) 研究成果の有用性	5	由来を超えたゲノム解析結果は、その他の耐性遺伝子の伝播の可能性について示すものであり、今後の耐性菌/耐性遺伝子解析の参考となることが期待できる。また、定量的リスク評価についても、別の重要な耐性菌や耐性遺伝子の評価にも応用可能であり、今後の活用が期待できる。
総合コメント 新型コロナウイルス蔓延の影響により、対面の会議を実施することができなかったことや、研究活動も一部制限されるなど、さまざまな制約があるなか、当初の目標以上の成果を得ることができた。今後、得られた研究成果を公表していくことを予定している。		

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で自己採点。

この報告書は、食品安全委員会の委託研究事業の成果について取りまとめたものです。
 本報告書で述べられている見解及び結論は研究者個人のものであり、食品安全委員会としての見解を示すものではありません。全ての権利は、食品安全委員会に帰属します。