

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 (白井優、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時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、セフォタキシム) 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<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>CTX-M</sub>*、*bla<sub>CMY-2</sub>*) 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<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>SHV</sub>*、*bla<sub>CTX-M</sub>*)、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壤以上に、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壤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。

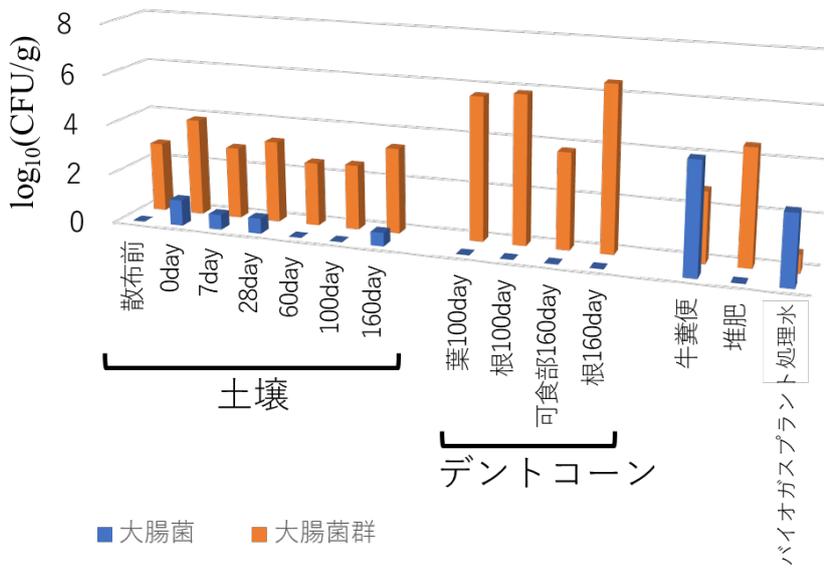
家畜排泄物処理物散布前の土壤における *bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子量は検出限界以下であったが、散布後には検出されるようになり、散布 28 日以降は、検出限界付近を推移した (図 2)。*bla*<sub>SHV</sub> 遺伝子は全てのサンプルにおいて検出限界以下であった。大腸菌遺伝子 (*uidA*) は、家畜排泄物処理物散布前の土壤においては検出限界以下であったが、散布 0 日後には検出され、その後、検出限界以下となった。*bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子は牛糞便、堆肥、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、土壤 (散布前、散布後 0 日、7 日) から  $\beta$ -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*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>) 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*<sub>TEM</sub> 保有 *E. fergusonii* 及び *bla*<sub>CTX-M-2</sub> 保有 *E. coli* において、家畜、バイオガスプラント処理水、散布土壤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  $\beta$ -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) / 耐性遺伝子が土壤に伝播し、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、散布後土壤からは牛糞便由来 *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、土壤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壤に伝播するものの、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、土壤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

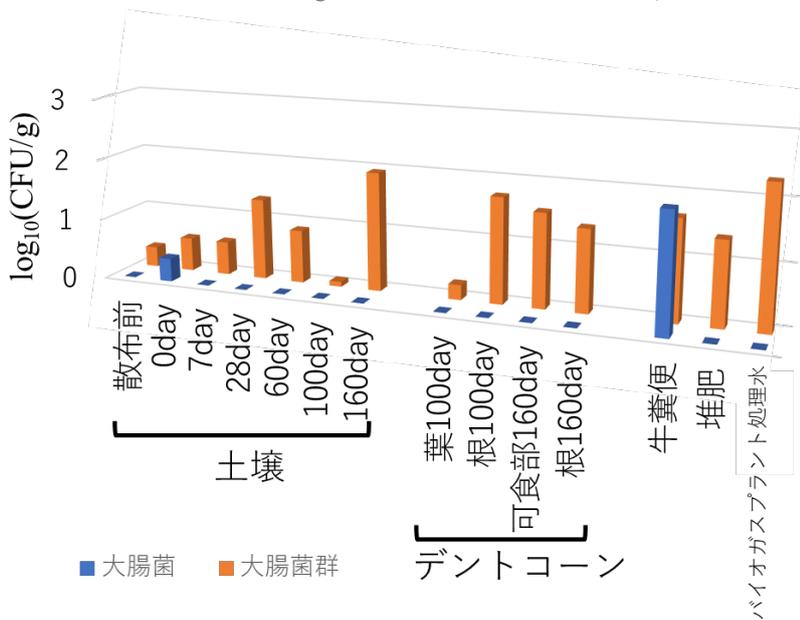


図1. クロモアガーECC 培地を用いた継時的な菌数（大腸菌、大腸菌群）の変動  
Day は、散布後の日数を示す。

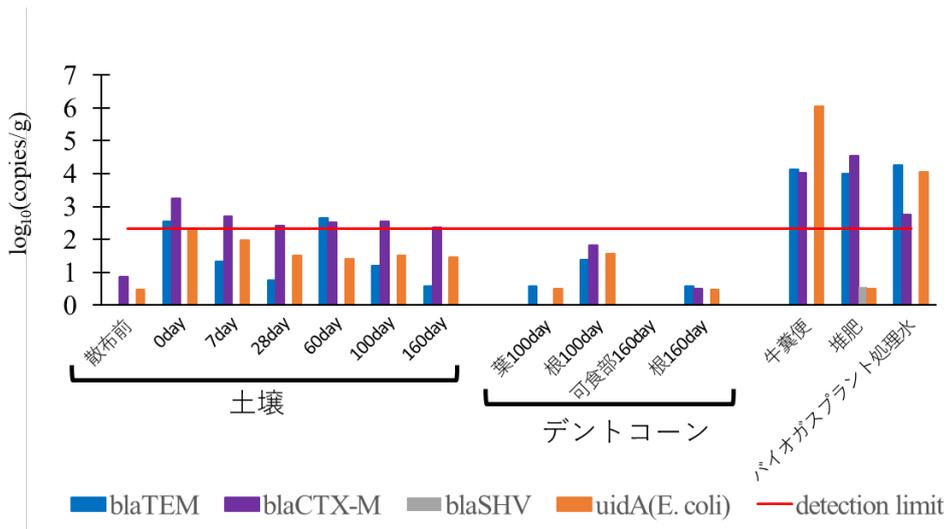


図2. サンプル中の耐性遺伝子量、大腸菌遺伝子量の変動  
Day は、散布後の日数を示す。

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



*bla<sub>CTX-M</sub>* 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<sub>SHV</sub>* 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)。

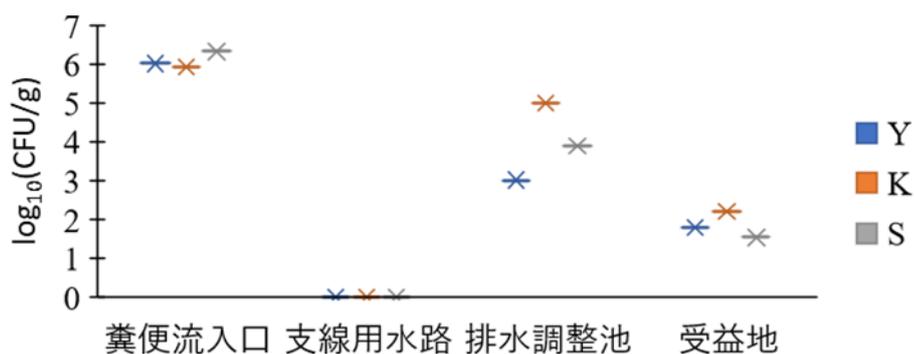
糞便流入口、排水調整池、受益地から分離された  $\beta$ -ラクタム系抗菌薬に耐性を示す大腸菌から耐性遺伝子 (*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>CTX-M-101</sub>*) が検出された (表 3)。

次世代シーケンスを用いた SNPs 解析により、*bla<sub>TEM-D</sub>* 遺伝子保有  $\beta$ -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  $\beta$ -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

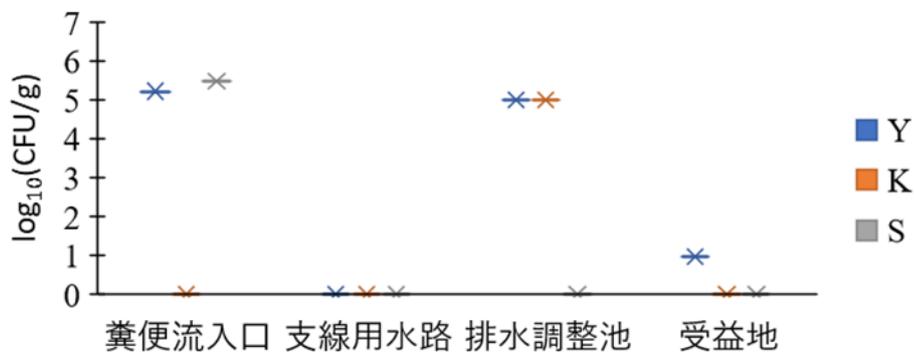
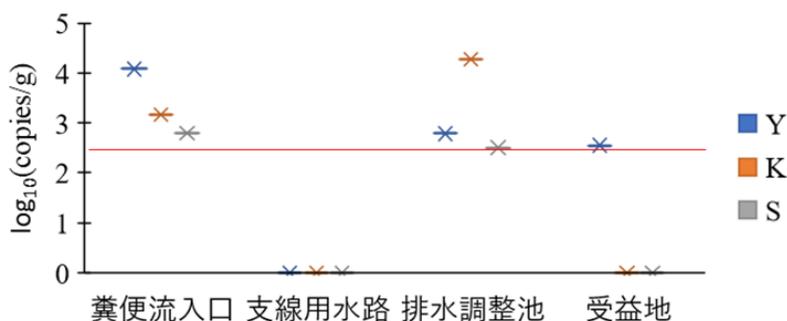


図 4. クロモアガーECC 培地を用いたサンプルに含まれる大腸菌数の推定

(5-1) *bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子量



(5-2) *bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子量

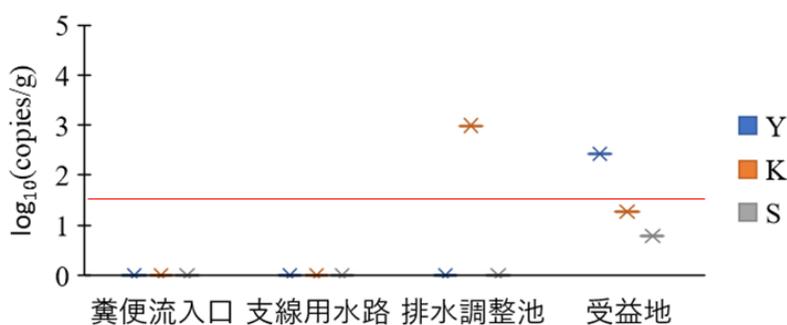


図5. サンプルに含まれる耐性遺伝子量の定量結果(*bla*<sub>TEM</sub> 遺伝子量、*bla*<sub>CTX-M</sub> 遺伝子量)  
赤線：検出限界

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> <sub>TEM</sub> 保有アンピシリン耐性大腸菌 (n)	<i>bla</i> <sub>CTX-M-101</sub> 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*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CMY-2</sub> 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。

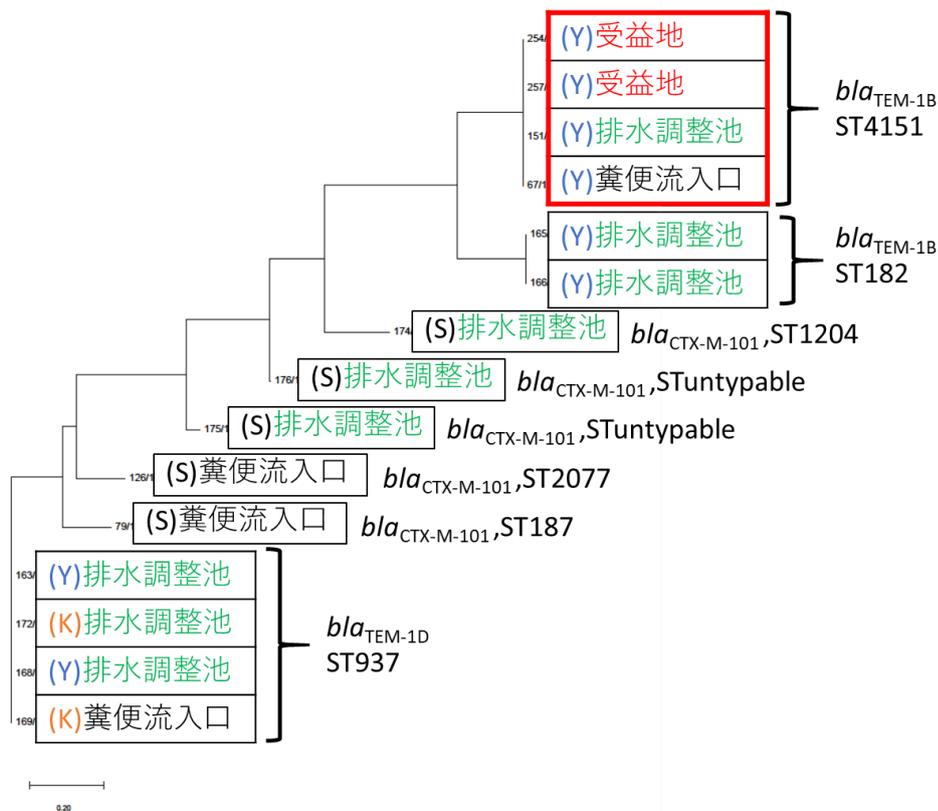


図 6. 次世代シーケンス解析による *bla* 遺伝子保有大腸菌の系統樹解析ステージを超えて、近縁な *bla*<sub>TEM-1D</sub> 保有株が認められた。

## 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	6/17: 1株、約1kg/株	6、6
	7/26	7/26: 1株、約2kg/株	
デントコーン（茎）	6/17	6/17: 1本、高さ約1m	6、6
	7/26	7/26: 1本、高さ2m以上	

#### 【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	10/19: 5株、約0.1kg/株	6、6
	11/18	11/18: 2-3株、約0.3kg/株	

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sporin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	$1.2 \times 10^2$	$2.2 \times 10^2$	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	$1.1 \times 10^1$	$2.5 \times 10^1$	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	$1.6 \times 10^2$	$2.4 \times 10^2$	0	0
コーン茎-100d(収穫時)	0	0	0	0	$4.6 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	0	0
コーン根-100d(収穫時)	0	0	0	0	$1.4 \times 10^3$	$3.3 \times 10^3$	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	$5.8 \times 10^3$	$1.0 \times 10^4$	9.2	$1.4 \times 10^1$	$1.1 \times 10^5$	$1.6 \times 10^3$	$9.0 \times 10^1$	$5.9 \times 10^1$
堆肥施肥前	N/A		N/A		$3.9 \times 10^2$	$7.8 \times 10^2$	4.3	8.5
畑土播種-1d	$1.9 \times 10^2$	$4.1 \times 10^2$	1.9	4.2	2.5	5.7	$3.0 \times 10^{-1}$	$6.6 \times 10^{-1}$
畑土-7d	$1.9 \times 10^2$	$3.7 \times 10^2$	5.8	$1.3 \times 10^1$	$3.8 \times 10^3$	$8.0 \times 10^3$	$6.3 \times 10^1$	$1.2 \times 10^2$
畑土-28d	$1.1 \times 10^2$	$1.9 \times 10^2$	2.1	4.3	$2.5 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$	$4.0 \times 10^2$	$4.7 \times 10^2$
畑土-60d	$2.1 \times 10^2$	$9.4 \times 10^3$	$1.8 \times 10^3$	$2.9 \times 10^3$	$5.6 \times 10^4$	$8.2 \times 10^4$	$8.1 \times 10^2$	$1.3 \times 10^3$
コーン茎-60d	$7.6 \times 10^7$	$8.6 \times 10^7$	$1.1 \times 10^5$	$2.5 \times 10^5$	$1.8 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$3.3 \times 10^3$	$6.1 \times 10^3$
コーン根-60d	$1.0 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7$	$4.5 \times 10^7$	$3.8 \times 10^5$	$1.9 \times 10^5$	$2.2 \times 10^4$	$3.0 \times 10^4$
畑土-100d(収穫時)	$1.3 \times 10^4$	$6.5 \times 10^3$	$5.8 \times 10^8$	$4.1 \times 10^2$	$9.4 \times 10^3$	$6.9 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$	$6.1 \times 10^3$
コーン茎-100d(収穫時)	$2.6 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$1.8 \times 10^8$	$3.1 \times 10^4$	$1.8 \times 10^6$	$1.8 \times 10^6$	$3.6 \times 10^4$	$3.3 \times 10^3$
コーン根-100d(収穫時)	$3.0 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$	$4.8 \times 10^3$	$5.9 \times 10^3$	$5.1 \times 10^6$	$7.6 \times 10^6$	$2.7 \times 10^4$	$4.0 \times 10^4$
コーン実-100d(収穫時)	N/A		N/A		$6.4 \times 10^3$	$9.6 \times 10^3$	$3.0 \times 10^1$	$6.4 \times 10^4$

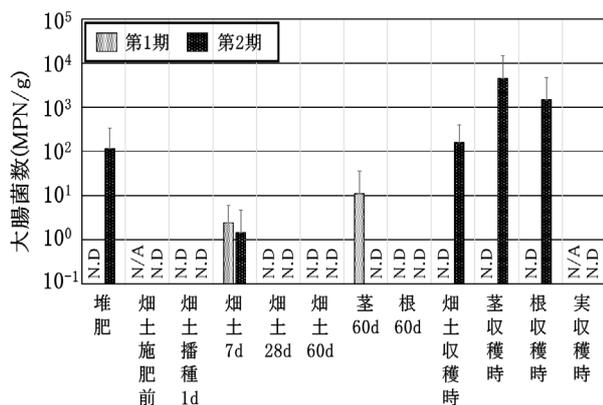


図7 各試料における大腸菌数

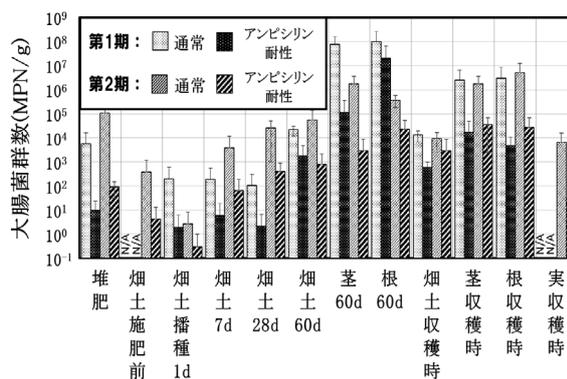


図8 各試料における大腸菌群数

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 $10^8\text{MPN/g}$ 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 $10^6\text{MPN/g}$ 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 $3.0 \times 10^5 \sim 5.1 \times 10^6\text{MPN/g}$ 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、 $10^6\text{MPN/g}$ 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>
	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 sp</i>	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
			<i>Enterobacter cloacae</i>	4
	デントコーン (60日茎)	16	<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
			<i>Pantoea ananatis</i>	1
	デントコーン (収穫日茎)	24	<i>Enterobacter bugandensis</i>	15
			<i>Enterobacter asburiae</i>	6
			<i>Enterobacter cloacae</i>	3
2 期	堆肥	23	<i>Enterobacter cloacae</i>	17
			<i>Klebsiella aerognes</i>	4
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	2
	土 (施肥前)	8	<i>Enterobacter bugandensis</i>	6
			<i>Enterobacter asburiae</i>	2
	土 (播種後1日経過)	2	<i>Enterobacter cloacae</i>	2
	土 (播種後7日)	19	<i>Enterobacter bugandensis</i>	9
			<i>Enterobacter cloacae</i>	5
			<i>Enterobacter asburiae</i>	3
			<i>Enterobacter kobei</i>	2
	土 (播種後28日)	24	<i>Enterobacter cloacae</i>	9
			<i>Enterobacter bugandensis</i>	7
			<i>Enterobacter asburiae</i>	7
			<i>Enterobacter kobei</i>	1
土 (播種後60日)	17	<i>Enterobacter cloacae</i>	8	
		<i>Enterobacter bugandensis</i>	3	
		<i>Enterobacter asburiae</i>	3	
		<i>Klebsiella aerognes</i>	2	
		<i>Enterobacter kobei</i>	1	
土 (収穫日)	22	<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日根)	24	<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. ESBL 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 aerognes</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。