（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・潅水、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インの把握

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変化は、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、土壌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。

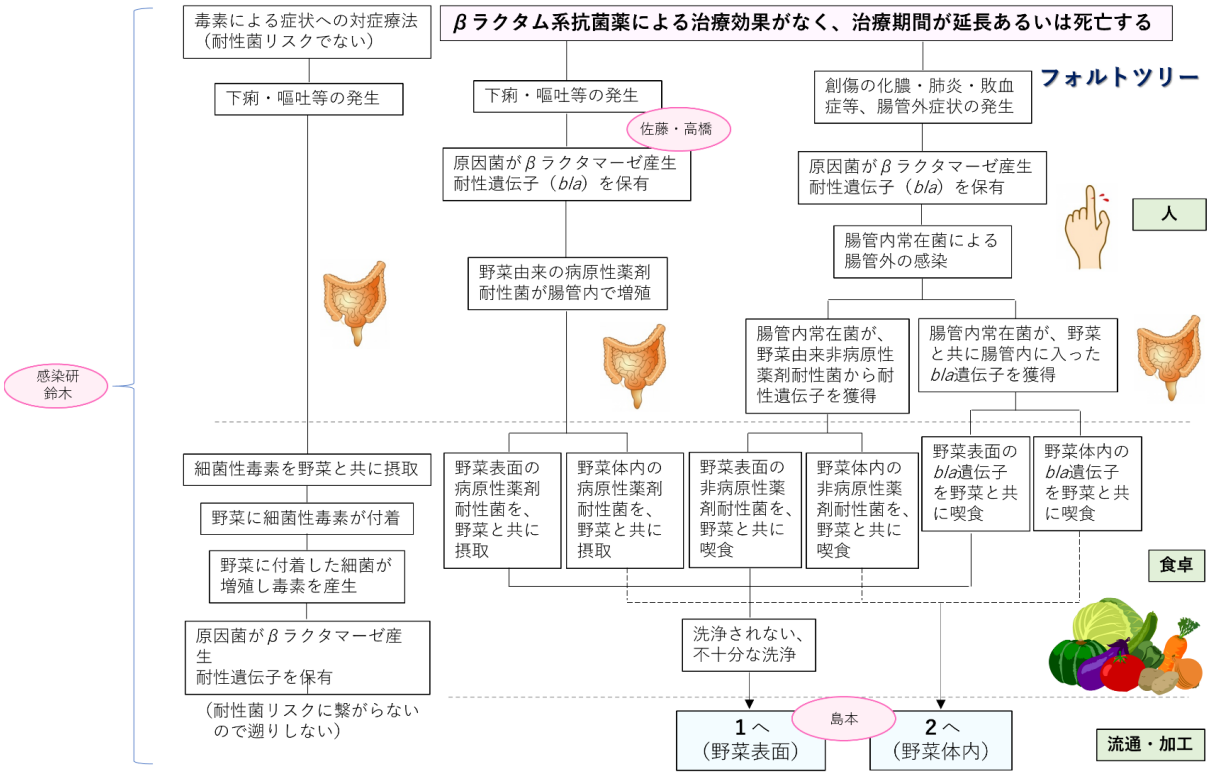

図16．健康影響発生から流通野菜の汚染までのフォルト・ツリーと実験との関係

βラクタマーゼ産生菌は流通する野菜の野菜体内と表面両方に存在する。選果場から圃場、潅水、スラリー・堆肥場、畜産農場に、βラクタマーゼ産生菌と耐性遺伝子の存在を遡った（図17）。

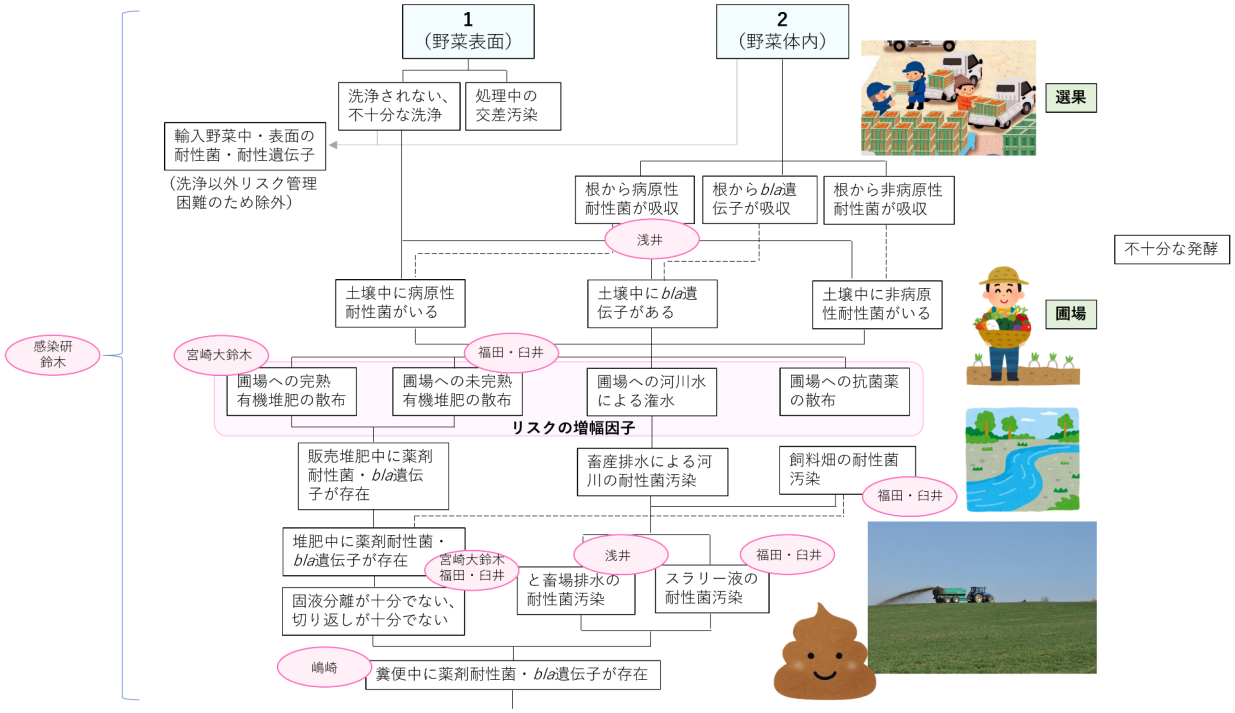

図17．汚染野菜の選果から畜産農場での糞便中耐性菌排出までのフォルト・ツリーと実験との関係

畜産農場では、認可されているβラクタム系動物用抗菌薬の適用症例発生における使用と、獣医師の裁量による適用外使用の両方の場合がある。本研究では、全ての認可されているβラクタム系動物

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イン

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。

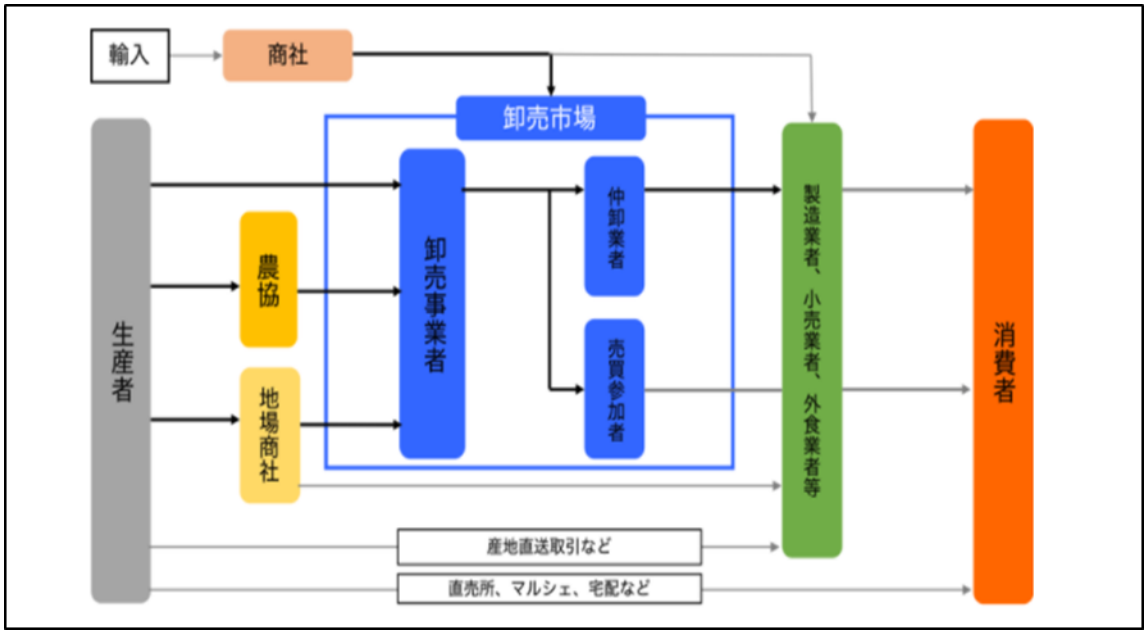

図19．近年の野菜の流通

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。

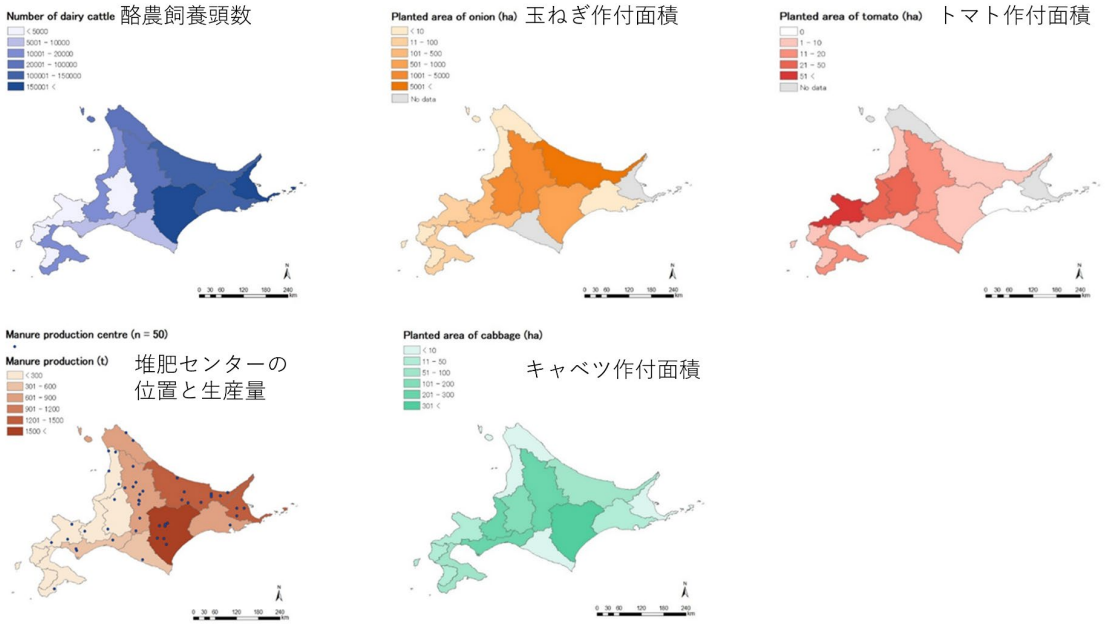

図20．北海道における酪農飼養頭数、堆肥センター、生食される野菜の作付面積

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。

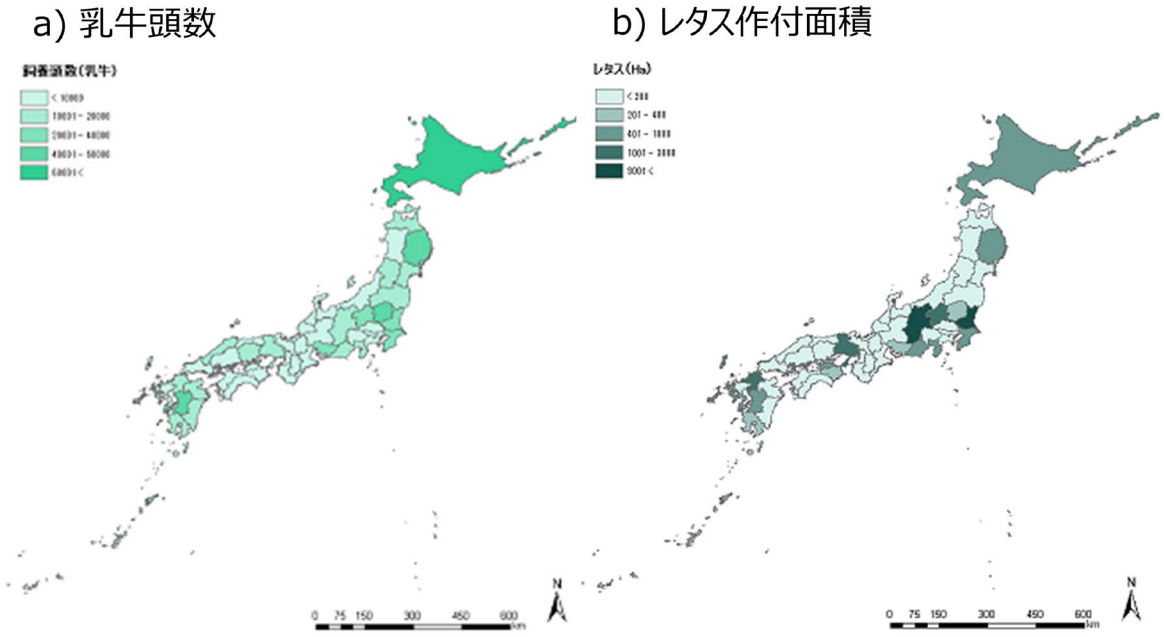

図 21. 都道府県別乳牛頭数（a）とレタス作付面積（b）の比較

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チ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. セフチオフル使用確率

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。

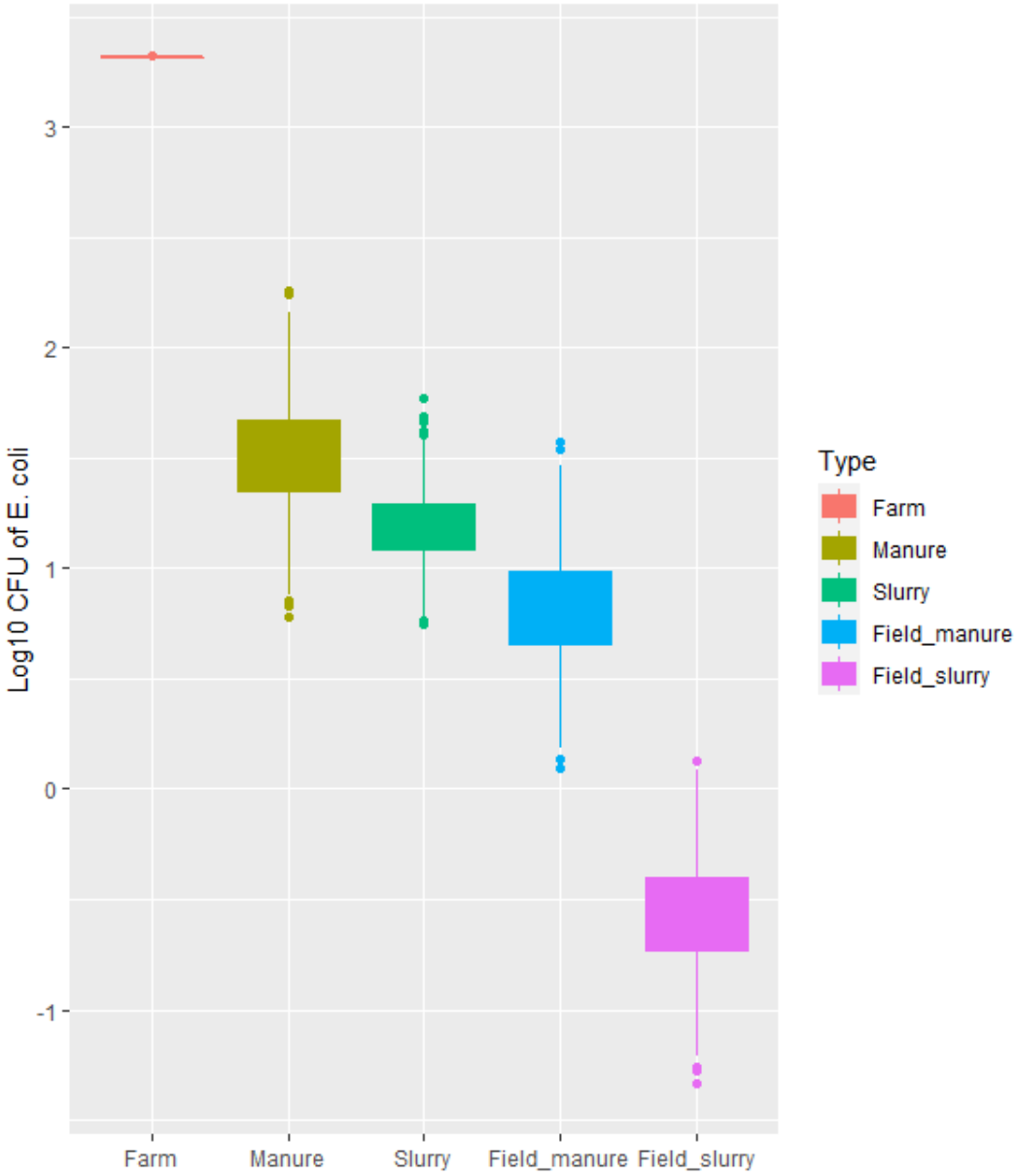

図 22. 酪農場の生糞（Farm）、未完熟堆肥（Manure）、スラリー（Slurry）、未完熟堆肥施肥日の圃場（Field_manure）、およびスラリー散布日の圃場（Field_slurry）におけるβラクタマーゼ産生大腸菌数（底 10 の対数表示）

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

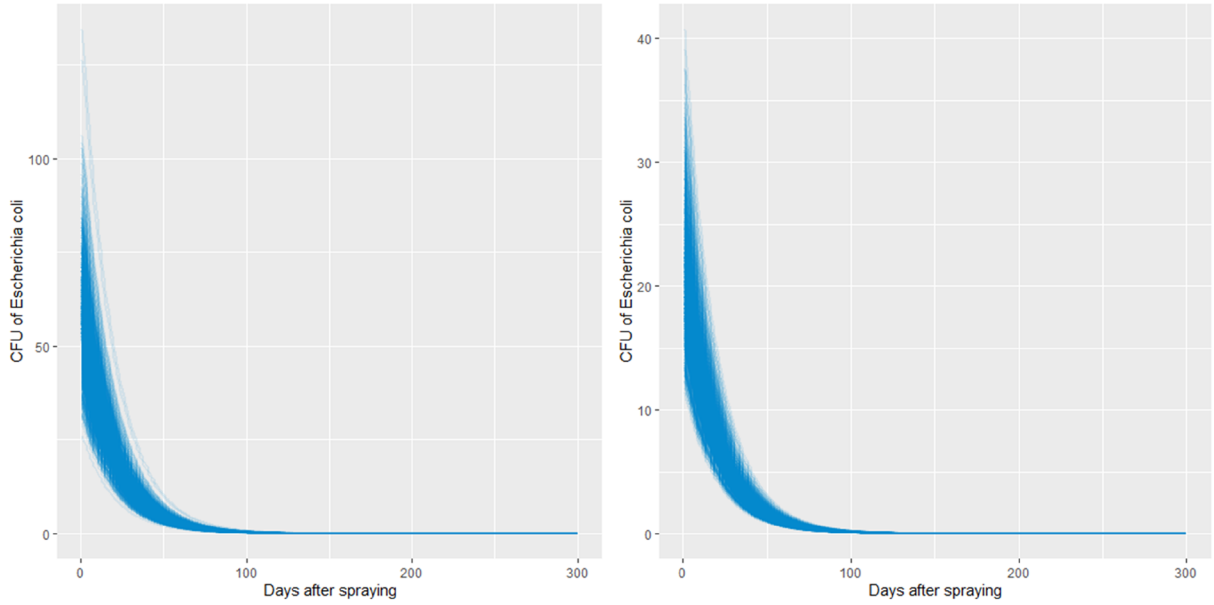

図 23. 未完熟堆肥（a）およびスラリー（b）施肥後のβラクタマーゼ産生大腸菌数の減少（施肥後 300 日間）

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 log10CFU/g（95%CI：-3.36 - -2.42)、トマトで-3.81 log10CFU/g（95%CI：-4.31 - -3.36)、大根で-1.99 log10CFU/g（95%CI：-2.48 - -1.54)、春撒き・秋収穫の玉ねぎで-5.35 log10CFU/g（95%CI：-5.86 - -4.90)、秋撒き・春収穫の玉ねぎで-5.94 log10CFU/g（95%CI：-6.43 - -5.49)であった（図 24）。

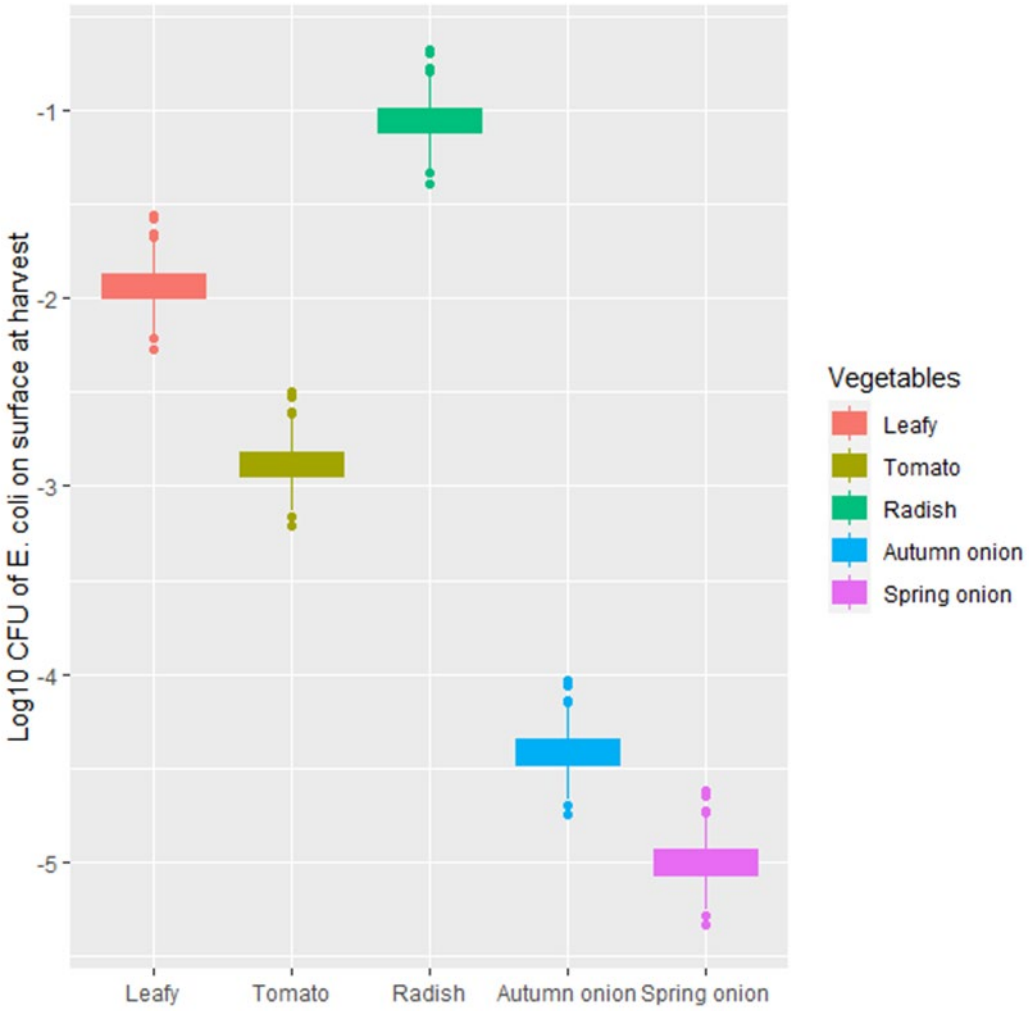

図 24. 野菜収穫時の圃場のβラクタマーゼ産生大腸菌数：葉物野菜（Leafy）、トマト（Tomato）、大根（Radish）、秋収穫玉ねぎ（Autumn onion）、春収穫玉ねぎ（Spring onion）

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ラクタマーゼ産生大腸菌数は-9.88 log10CFU/g（95%CI：-10.38 - -9.43）、レタスは-10.91 log10CFU/g（95%CI：-11.52 - -8.72）であった（図 25）。

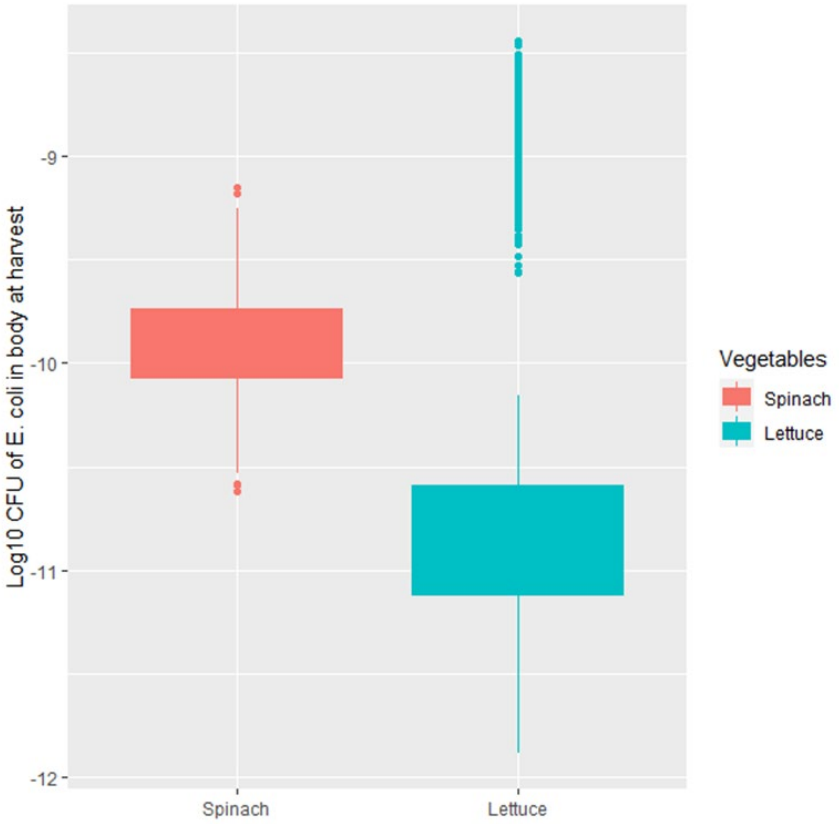

図 25. 収穫時の野菜体内βラクタマーゼ産生大腸菌数：小松菜（Spinach）とレタス（Lettuce）

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１ｇ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１ｇ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、潅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。本評価には潅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潅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潅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っており、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があるとすれば、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１ｇ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．獣医疫学会学術集会．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、*bla*$_{TEM}$-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 新型コロナウィ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。