

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

宮崎大学大学院工学研究科 学生会員 ○堀田智之
宮崎大学農学部 非会員 小林郁雄
酪農学園大学 獣医学群 非会員 臼井優
宮崎大学工学部 正会員 鈴木祥広

1. はじめに

抗菌薬の持続的な投与や不適切な使用によって、抗菌薬に対して耐性を獲得した薬剤耐性菌が出現している。薬剤耐性菌の中でも、特にβラクタム系抗菌薬に耐性を示す基質特異性拡張型βラクタマーゼ (Extend Spec-trum β Lactamase, ESBL) 産生大腸菌が世界中で出現し、極めて深刻な問題となっている。米国では ESBL によって年間で 9,000 人が感染症を引き起こし、そのうち 600 人の死者が確認されている¹⁾。

畜産場では、産業動物の生産過程において発生する畜産廃棄物すなわち家畜のふん便が堆肥化され、農作物栽培の肥料として圃場土壌に施肥される場合が多い。したがって、家畜等に抗菌薬を使用することによって出現した薬剤耐性菌がふん便とともに排泄され、堆肥を経由して農作物に伝播し、最終的にヒトへと経口感染する経路が想定される。薬剤耐性菌を保有した農作物がヒトに伝播し、感染症を発生した場合には、抗菌薬による治療効果が著しく低下する可能性は否定できない。したがって、畜産場における堆肥、土壌、および作物における薬剤耐性菌の情報蓄積は極めて重要である。しかしながら、堆肥、土壌、作物に至る薬剤耐性菌の出現・伝播・拡散に関して、施肥から作物の収穫に至る一連の栽培過程について、同一のフィールド内で追跡した調査事例は見当たらない。

そこで本研究では、家畜由来の堆肥が施肥されている牧場の圃場において、堆肥、畑土壌、農作物のデントコーンを対象として、ふん便細菌の大腸菌と大腸菌群からの薬剤耐性菌の出現とその拡散実態について調査を実施した。

2. 実験方法

2.1 調査場所・試料採取

宮崎県宮崎市に位置する宮崎大学農学部住吉牧場では、2期にわたって完熟堆肥を施肥した圃場において、飼料用のデントコーンを栽培している。そこで、本調査では、播種から収穫に至る栽培期間において、完熟堆肥、畑土壌、デントコーンを定期的に採取した。なお、堆肥の原料は牛の飼育で発生する糞便や尿尿を含む敷料である。

試料採取は、第1期を、2020年4月16日から7月26日、第2期を2020年8月6日から11月18日の期間で実施した。試料採取日は、播種から1日、7

日、28日、60日、および収穫時に、畑土壌、デントコーン採取を6地点から採取した。また、播種前に施肥する完熟堆肥も採取した。

2.2 大腸菌および大腸菌群の計数

各試料の大腸菌数と大腸菌群数は、Colilert®-18法 (IDEXX Laboratories) を用いて、堆肥、畑土壌、デントコーンの茎部、根部および過食部の実 (未洗浄) について使用マニュアルに従って計数した。

2.3 アンピシリン耐性菌のスクリーニング

アンピシリン (ABPC) は、低コストで副作用の少なさから広く使用されており、現代における重要な抗菌薬の1つである。そのため、薬剤耐性菌として、アンピシリンに耐性を持つ大腸菌と大腸菌群のスクリーニングを行い、計数および菌叢解析を行うことで、薬剤耐性菌の出現とその拡散実態を分析した。スクリーニングは、アンピシリンを 100 μg/mL 添加した Colilert®-18 を用いた。

2.4 大腸菌群の菌種同定

単離した大腸菌群株について、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) を用いて菌種を同定した。

2.5 PCR法によるESBL産生菌の検出

アンピシリン耐性大腸菌群の単離株を、CHROMager (関東化学) 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。ESBL 産生疑い株は、DNeasy Blood&Tissue (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²⁾。PCR 反応試薬は、TaKaRa Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を使用し、プライマーは、5つの遺伝子 (TEM, SHV, CTX-M-1, CTX-M-2 および CTX-M-9) を使用した。

3. 結果と考察

3.1 収集された試料における細菌計数結果

図-1に、堆肥、畑土壌、およびコーンの茎部と根部の大腸菌のモニタリング結果を示す。第1期における大腸菌は、堆肥を除く2試料から、2.4MPN/g~11 MPN/gで検出された。第2期における大腸菌は、5試料から、1.4MPN/g~4.6×10³MPN/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。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、これ

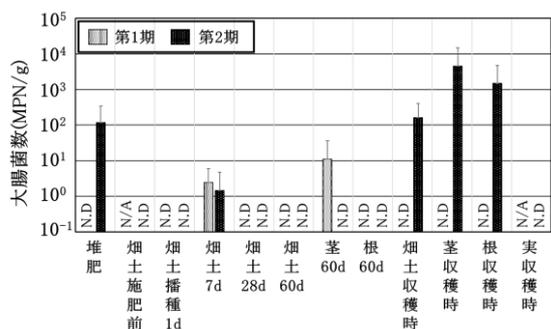


図-1 各試料における大腸菌数

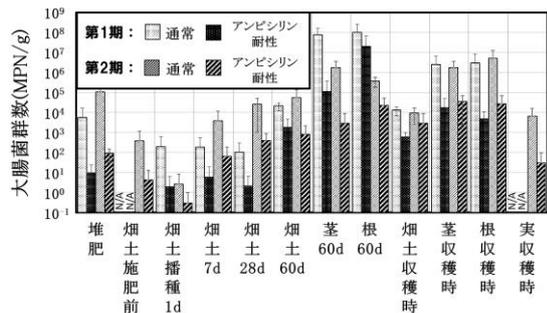


図-2 各試料における大腸菌群数

らの試料の大腸菌は、野生動物等からの混入によるスポット的な汚染に由来するのではないかと考えられる。

図-2 に、各試料における通常の大腸菌群数とアンピシリン耐性大腸菌群数を示す。第 1 期における通常の大腸菌群は、全ての試料から $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ MPN/g の範囲で検出され、アンピシリン耐性大腸菌群は、全ての試料から $1.9 \sim 2.1 \times 10^7$ MPN/g の範囲で検出された。第 2 期における通常の大腸菌群は、全ての試料から $3.0 \times \sim 5.1 \times 10^6$ MPN/g の範囲で検出され、アンピシリン耐性大腸菌群は、全ての試料から $0.3 \sim 3.6 \times 10^4$ MPN/g の範囲で検出された。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の菌数が高く検出された。

3.2 菌叢解析結果

第 1 期の各試料から、通常のコリラート法によって陽性ウェルから単離した大腸菌群における菌叢解析の結果、堆肥の主要な菌種は、*Serratia marcescens*, *Leclercia adecarboxylata*, *Enterobacter cloacae* であった。これらの堆肥の主要な菌種は、モニタリング期間を通して、播種 1 日、7 日、28 日、収穫時における土壌で検出された。また、収穫時におけるコーンの茎と根から堆肥の主要な菌種は検出されなかった。

第 1 期の各試料から単離したアンピシリン耐性大腸菌群の菌叢解析の結果、堆肥の主要な菌種は、*E. cloacae*, *Leclercia amnigena*, *Enterobacter xiangfangensis* であった。これらの堆肥の主要な菌種は、モニタリング期間を通して、播種 1 日、60 日、収穫時における土壌、播種 60 日におけるデントコーンの茎と根および収穫時におけるデントコーンの茎で検出された。

第 2 期の各試料から、通常の大腸菌群における菌叢解析の結果、堆肥の主要な菌種は、*E. cloacae* で

表-1 ESBL産生菌の遺伝子型別

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

あった。これらの堆肥の主要な菌種は、モニタリング期間を通して、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 期の各試料におけるアンピシリン耐性大腸菌群の菌叢解析の結果、堆肥の主要な菌種は、*E. cloacae*, *Enterobacter bugandensis*, *Klebsiella aerognes* であった。堆肥の主要な菌種は、モニタリング期間を通して、施肥前における土壌、収穫時におけるデントコーンの実で検出された。調査期間を通して、病原性が疑われる *E. cloacae* が検出された。

3.3 ESBL 産生菌の遺伝子型別

アンピシリン耐性大腸菌群 359 株のうち、20 株が ESBL 産生疑いとして検出された。堆肥と収穫時における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。ESBL 産生疑い株 20 株の ESBL 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 遺伝子が検出されなかった (表-1)。

4. まとめ

本研究では、家畜由来の堆肥を施肥する牧場において、完熟堆肥、畑土壌、および農作物のデントコーンを対象とし、アンピシリンに耐性を持つ大腸菌と大腸菌群の出現とその拡散実態を調査した。完熟堆肥からは、アンピシリン耐性大腸菌、ESBL 産生疑いの大腸菌群は検出されなかった。本牧場では、熟堆肥が薬剤耐性菌の拡散に関わる可能性は極めて低い。その一方で、畑土壌から収穫時のデントコーンに至るまでの間において、ESBL 産生菌を含むアンピシリン耐性大腸菌群が検出された。農作物を栽培する過程において、堆肥以外の要因によって圃場にアンピシリン耐性大腸菌群が負荷され、農作物に伝播する可能性があることが示唆された。

参考文献

- Centers for Disease Control and Prevention ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013, pp. 1-112, 2013
- Shibata N, Kurokawa H, Doi Y, et al: PCR clas-sification of CTX-M-type beta-lactamase genes identified in clinically isolated gram-negative ba-cilli in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* 50:791-795 (2006).