

抗生物質耐性遺伝子の農業環境中における
分布と拡散に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（農学）学位論文

小橋 有里

目次

第 1 章 背景および目的	1
第 2 章 農業環境中の抗生物質耐性細菌数	6
2.1 材料および方法	6
2.1.1 供試試料	6
2.1.2 供試抗生物質	7
2.1.3 使用培地	8
2.1.4 抗生物質耐性細菌の計数	8
2.2 結果	10
2.2.1 豚ふん中の抗生物質耐性細菌数	10
2.2.2 鶏ふん中の抗生物質耐性細菌数	11
2.2.3 豚ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌数	12
2.2.4 鶏ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌数	12
2.2.5 市販堆肥中の抗生物質耐性細菌数	14
2.2.6 農地土壌中の抗生物質耐性細菌数	14
2.2.7 森林土壌中の抗生物質耐性細菌数	15
2.3 考察	17
2.3.1 家畜への抗生物質投与の現状	17
2.3.2 家畜ふん中の抗生物質耐性菌レベル	18
2.3.3 家畜ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌レベル	19
2.3.4 耐性菌のリスクを低減する堆肥化条件	21
2.3.5 家畜ふん堆肥施用履歴のない土壌中の抗生物質耐性細菌レベル	22
2.3.6 家畜ふん堆肥連用による抗生物質耐性細菌数への影響	23
2.3.7 抗生物質耐性菌の耕地における拡散の可能性	24

第 3 章 農業環境中における多剤耐性菌の出現 -----	42
3.1 材料および方法-----	42
3.1.1 供試細菌株-----	42
3.1.2 供試抗生物質-----	42
3.1.3 使用培地-----	43
3.1.4 多剤耐性の検討-----	43
3.2 結果-----	44
3.2.1 豚ふん中の抗生物質耐性細菌株の多剤耐性-----	44
3.2.2 豚ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌株の多剤耐性-----	44
3.2.3 堆肥無施用畑土壌中の抗生物質耐性細菌株の多剤耐性-----	44
3.2.4 森林土壌中の抗生物質耐性細菌株の多剤耐性-----	45
3.3 考察-----	46
第 4 章 農業環境中のテトラサイクリン耐性菌の多様性 -----	50
4.1 材料および方法-----	50
4.1.1 テトラサイクリン耐性細菌の単離-----	50
4.1.2 テトラサイクリン耐性細菌からの DNA 抽出-----	50
4.1.3 16S rRNA gene の増幅-----	61
4.1.4 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析-----	62
4.1.5 シーケンス解析-----	62
4.2 結果-----	54
4.2.1 豚ふん分離株-----	54
4.2.2 鶏ふん分離株-----	54
4.2.3 豚ふん堆肥分離株-----	54
4.2.4 鶏ふん堆肥分離株-----	55

4.2.5 牛ふん堆肥分離株	55
4.2.6 堆肥施用土壌分離株	55
4.2.7 堆肥無施用土壌分離株	55
4.2.8 森林土壌分離株	55
4.3 考察	57
4.3.1 家畜ふん分離株はグラム陽性細菌と Enterobacteriaceae 科が大半	57
4.3.2 堆肥分離株は家畜由来細菌と環境細菌が混在	58
4.3.3 土壌分離株の構成種は非常に多様	59
第5章 農業環境中のテトラサイクリン耐性遺伝子の分布	72
5.1 材料および方法	72
5.2 結果	74
5.2.1 家畜ふん由来株の <i>tet</i> 遺伝子型	74
5.2.2 家畜ふん堆肥由来株の <i>tet</i> 遺伝子型	76
5.2.3 土壌由来株の <i>tet</i> 遺伝子型	77
5.3 考察	79
5.3.1 PTYG 培地の有効性	80
5.3.2 新規 <i>tet</i> 遺伝子を保持する属	80
5.3.3 新規 <i>tet</i> 遺伝子ー保持菌組み合わせ	81
5.3.4 家畜ふん由来 <i>tet</i> 遺伝子の環境中への拡散の可能性	82
第6章 発酵リキッドが抗生物質耐性菌割合に与える影響 (第1回目)	93
6.1 材料および方法	93
6.1.1 供試動物	93
6.1.2 飼料調製と管理	93

6.1.3 大腸菌の検出および単離 -----	94
6.1.4 NCCLS 法に準拠した薬剤感受性試験 -----	95
6.2 結果 -----	96
6.2.1 大腸菌数 -----	96
6.2.2 最小発育阻止濃度 -----	96
6.2.3.抗生物質耐性菌割合 -----	97
6.3 考察 -----	98
6.3.1 薬剤耐性モニタリングの重要性 -----	98
6.3.2 抗生物質使用停止と発酵リキッドの効果 -----	99
6.3.3 E-farm 区の抗生物質耐性 -----	101
第7章 発酵リキッドが抗生物質耐性菌割合に与える影響 (第2回目)---	112
7.1 材料および方法-----	112
7.1.1 供試動物-----	112
7.1.2 飼料調製と管理 -----	112
7.1.3 大腸菌と乳酸菌の検出および単離-----	112
7.1.4 NCCLS 法に準拠した薬剤感受性試験-----	113
7.2 結果 -----	114
7.2.1 乳酸菌 -----	114
7.2.1.1 乳酸菌数 -----	114
7.2.1.2 最小発育阻止濃度 -----	114
7.2.2 大腸菌 -----	114
7.2.2.1 大腸菌数-----	114
7.2.2.2 最小発育阻止濃度 -----	115
7.2.2.3.抗生物質耐性菌割合 -----	115

7.3 考察	117
7.3.1 発酵リキッドフィーディングの腸内細菌叢への影響	117
7.3.2 乳酸菌の抗生物質耐性	118
7.3.3 大腸菌の抗生物質耐性	119
7.3.4 発酵リキッドフィーディングの有効性	120
第 8 章 総括	130
引用文献	134
謝辞	143

第1章 背景および目的

(1) 研究背景

抗生物質は、様々な細菌性感染症に有効な薬剤としてヒト用医薬品、動物用医薬品、水産医薬品、家畜飼料添加物として汎用されている。しかし近年、医療現場のみならず畜産や水産の現場でも抗生物質耐性細菌が出現し、問題となっている⁹⁵⁾。特に医療現場ではメチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）などの抗生物質多剤耐性細菌の出現により、当該病原菌に対して投与した抗生物質が効かないために、死亡にいたるケースも起きている²⁸⁾。

一方、食品の安全性を求める声が高まっており、安全・安心な畜産物や水産物、および作物を生産することが求められ、このような現場に抗生物質耐性菌が拡散することは、人体への影響が懸念されるため、徹底したリスク評価が必要となっている。

我が国の抗生物質使用量は年間約 2,210 t であるが、そのうちの 830 t が動物用医薬品、230 t が家畜飼料添加物として使用されており、ヒトよりも動物に対し使用されている量が多い（図 1）⁶¹⁾。特に、動物医薬品が高用量で短期間使用されるのに対し、飼料添加物は、低用量で長期的に使用されるため、暴露期間が長くなり、細菌が耐性を獲得する機会が高まると考えられる。

欧米では、家畜生産の場において抗生物質耐性菌の出現が確認されたことを踏まえ、モニタリングや抗生物質使用の規制措置が取られ始めている。まず、スウェーデンが 1986 年に治療目的でない抗生物質の使用を禁止し、続いてデンマークが 1999 年から体重 30 kg 以上の豚の飼料に抗生物質を添加することを禁止した⁹³⁾。そして、EU は抗生物質耐性菌の伝播を抑制・防止するために、耐性菌の出現状態および抗生物質使用に関するモニタリング、抗生物質乱用の抑制、代替薬品の開発を含む研究開発や、国際協力を軸に、抗生物質耐性菌に対処する戦略を打ち出し、2006 年に成長促進のための使用を全面禁止する方針を決定し、施行されている²⁵⁾。米国では、食品医薬品局（FDA）が「人体に与える影響に応じて審査を強化する」としている⁹⁾。

わが国でも、農林水産省が、2003 年 11 月に「食品に関するリスクコミュニ

ケーション（家畜に使用する抗菌性物質に関する意見交換会）」を開催し、2003年12月に抗菌性物質が飼料添加物又は動物用医薬品として家畜等に給与又は投与された場合に、選択される薬剤耐性菌について食品安全委員会に意見を聴くことを決定した⁷⁰⁾。また、抗生物質耐性遺伝子は *in vitro* では微生物細胞間で比較的伝播しやすいことから、環境中での抗生物質耐性遺伝子の伝播とその人間への伝播の実態について関心が高まっており、動物の病原菌、人獣共通病原菌、常在菌の主要なカテゴリーの細菌について、耐性モニタリングおよびサーベイランスが国レベルで求められている¹⁰⁾。しかし、抗生物質耐性菌の研究は、医療分野では進んでいるが、農業環境での研究はほとんどなされていない。家畜への抗生物質の使用に伴って家畜の腸内で出現した抗生物質耐性菌は、家畜排泄物を原料とした堆肥を介して土壌へと施用されるが、環境中でどのような動態を示し、ヒトへどう関わっていくのか、なども不明確である。

様々な取り組みが始められる中、新たな問題が浮き彫りになってきた。デンマークでは1999年に成長促進目的での抗生物質投与を禁止した結果、耐性割合は減少したが、治療薬としての使用が増加してしまったという報告がされた¹⁾。このことから、耐性菌発生のリスクを最小限に抑えるための新たな基準作りが必要であるとの見方が強まっている。

また日本では、農林水産省消費・安全局が耐性菌の観点から飼料添加物の見直しを開始しようと、食品安全委員会に意見を聴くなどの調査の結果、食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについての政策を作成したが⁵⁴⁾、耐性菌のリスク評価は食品を介するルートに限定されており、家畜排泄物を介した環境へのルートには目が向けられていない。

家畜由来抗生物質耐性菌の解決方策のために薬剤の使用量と耐性菌発生、および抗生物質低減による病害発生の関連性を裏付ける科学的なデータが必要である。そのためには、まず畜産を取り巻く様々な環境中の抗生物質耐性菌に関するバックグラウンド調査がなくてはならない。また、実環境中から得られた耐性菌株の多剤耐性がどの程度であるのかを知ることが第一に求められる。それにより、家畜由来の抗生物質耐性菌が環境中へどのような影響を与える可能性があるのかを検討し、その指標となる耐性菌、耐性遺伝子を選出すること

へ発展させることが耐性菌問題解決につながると考えられる。

(2) 研究目的

多量に抗生物質が添加された飼料を給餌された家畜体内では、抗生物質耐性菌が高レベルで存在すると考えられ、堆肥化の過程で抗生物質そのものが失活していても、耐性菌が堆肥中に残存し、それを施用した土壌にも伝播している恐れがある（図2）。そこで、本研究では、(1) 家畜排泄物、堆肥、土壌中の抗生物質耐性細菌の分布実態を明らかにするために、作用機構の異なる6種類の抗生物質を用いて、家畜へ飼料添加物として与えられた抗生物質が選抜圧となって、家畜排泄物中に抗生物質耐性菌がどの程度出現しており、堆肥や土壌中に耐性菌がどの程度生存しているかを調査するとともに、(2) 多剤耐性の抗生物質耐性菌がどの程度の頻度で出現するのか、(3) 広域スペクトル抗生物質として現在臨床で最も多く使用されており、飼料添加物としても家畜に汎用されているテトラサイクリンに着目し、テトラサイクリン耐性菌はどれほどの種の多様性を有しているのか、(4) テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet*) はどのようなメカニズムで遺伝子が拡散しているのかを解明することを目的とした。

さらに、近年抗生物質の代替効果が期待され、プロバイオティクス効果も注目されている発酵リキッドフィーディング飼料給与による離乳子豚の排泄物中の耐性菌割合を調べることによって、(5) 抗生物質の使用中止または開始が腸内細菌の耐性に与える影響、(6) 発酵リキッドフィーディングによる腸内細菌の耐性への影響といった具体的解決案の有効性の評価も検討した。

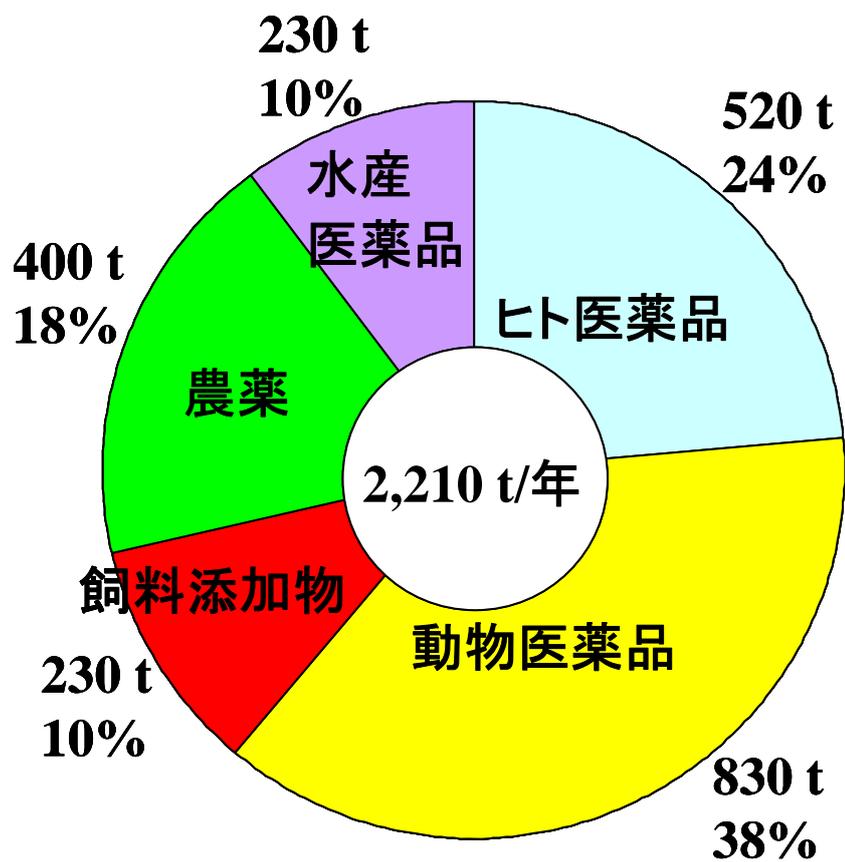


図1 日本国内での抗生物質の使用量とその目的
 (農林水産省、厚生労働省 2003 年データより作図)

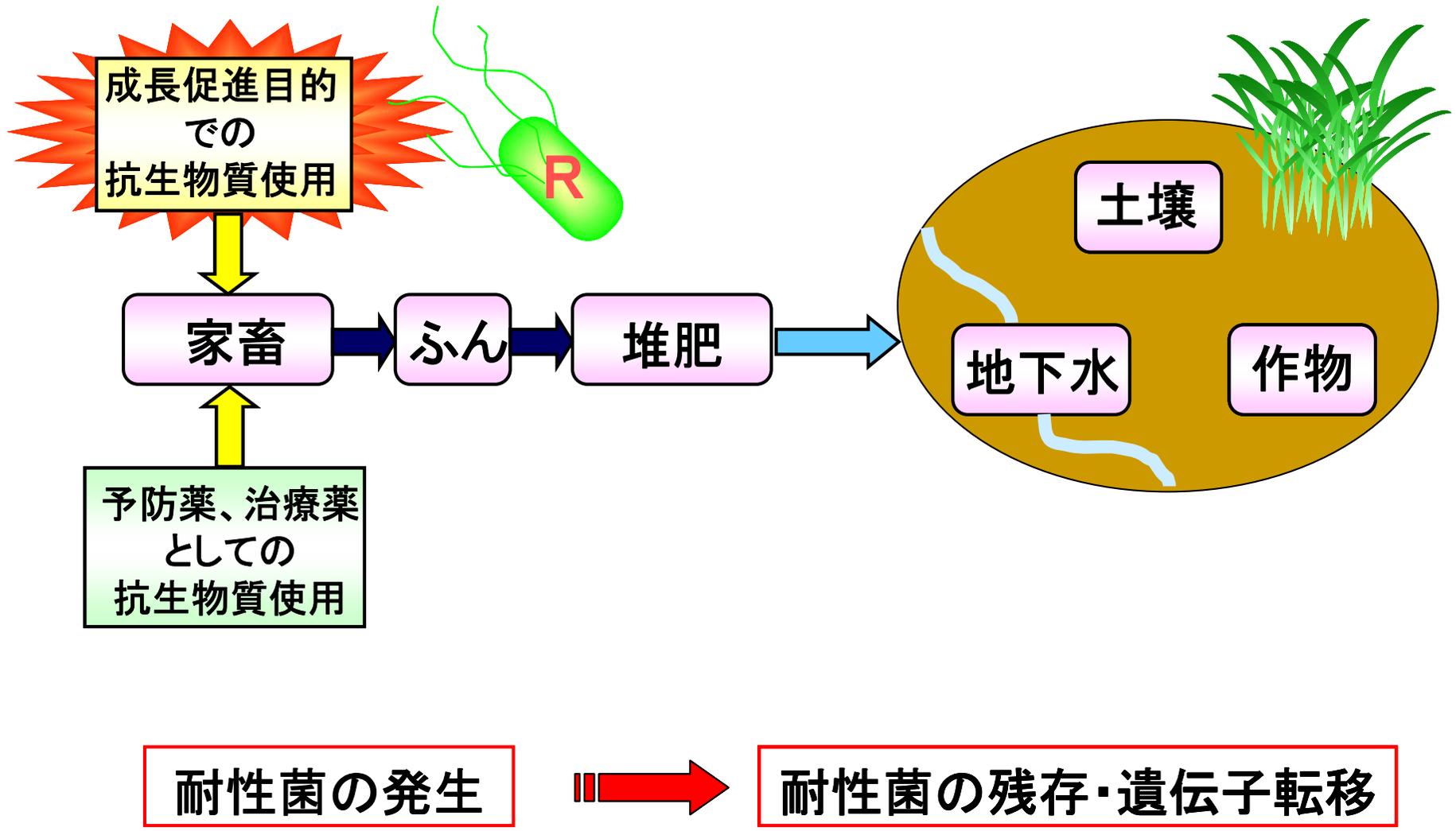


図2 抗生物質耐性菌、耐性遺伝子のフロー

第2章 農業環境中の抗生物質耐性細菌数

家畜排泄物、堆肥、土壌中の抗生物質耐性細菌の分布実態を明らかにするために、作用機構の異なる6種類の抗生物質を用いて、家畜排泄物中に抗生物質耐性菌がどの程度出現しており、家畜排泄物を原料とした堆肥中や堆肥を施用した土壌中に耐性菌がどの程度生存しているかを調査した。また、自然状態の土壌の抗生物質耐性細菌レベルを知るために、人為の影響が極めて低いと考えられる森林土壌中についても調査をした。

2.1 材料および方法

2.1.1 供試試料

2002年から2003年にかけて、家畜ふん（豚ふんおよび鶏ふん）は畜産草地研究所と茨城県の畜産経営体から、また家畜ふん堆肥（豚ふん堆肥、鶏ふん堆肥および牛ふん堆肥）については茨城県の畜産経営体と大型ホームセンターから、家畜ふん堆肥施用土壌については主に茨城県の耕種農家と、一部他県の農家から採取した（表1）。採取した試料は、すぐに4°Cで保管し、3時間以内に希釈液に懸濁した。それぞれの由来の詳細を以下に記述する。

豚ふんは、つくば市養豚農家の母豚（使用抗生物質は不明）並びに、畜産草地研究所のLWD交雑種の子豚と「梅山豚」子豚（写真1）（両者の飼料には1t当たりエフロトマイシン12g（力価）と硫酸コリスチン40g（力価）を添加）から採取した。

鶏ふんは、畜産草地研究所の「チャンキー」ブロイラー雛鳥（写真2）（飼料には1t当たり硫酸コリスチン10g（力価）とサリノマイシンナトリウム50g（力価）を添加）、および、小川町イセ・ファーム社の採卵鶏（抗生物質無添加）と、小川町養鶏農家の採卵鶏（抗生物質無添加）から採取した。

豚ふん堆肥は、つくば市内ホームセンターで市販されていた豚ふん堆肥（使用抗生物質不明）と、上記のつくば市養豚農家の母豚の排泄物から調製した熟成度合いの違う2種類の豚ふん堆肥（使用抗生物質使用）から採取した（写真3）。

鶏ふん堆肥は、つくば市内ホームセンターで市販されていた鶏ふん堆肥（使用抗生物質不明）、小川町ニラ生産農家の屋外堆積のおがくず鶏ふん堆肥（使用抗生物質不明）（写真 4）、小川町イセ・ファーム社の採卵鶏の排泄物から作られた熟成度合いの違う 2 種類の鶏ふん堆肥（抗生物質無添加）（写真 5）、および、小川町養鶏農家の抗生物質の使用が不明な採卵鶏の排泄物から作られた熟成度合いの違う 2 種類の鶏ふん堆肥（使用抗生物質不明）（写真 6）から採取した。

牛ふん堆肥は、つくば市内ホームセンターで市販されていた堆肥（使用抗生物質不明）から採取した。

豚ふん堆肥連用土壌は、愛知県の農家畑の 10 年以上豚ふん堆肥を 40 t/ha ずつ連用しているキャベツおよびタマネギを栽培している畑から採取した。

鶏ふん堆肥連用土壌は、愛知県の果樹農家の 8 年間鶏ふん堆肥を 15 t/ha/y 連用しているナシ栽培土壌、小川町のニラ生産農家の野外堆積したおがくず鶏ふん堆肥を 10 年間 100 t/ha/y 連用しているニラ栽培土壌の施用直後の畑と施用半年後の畑から採取した。

堆肥無施用畑土壌は、小川町ニラ生産農家の堆肥を施用していない畑土壌と、農業環境技術研究所の堆肥を施用していない畑圃場から採取した。畑土壌からは、いずれも表土（深さ 5~15 cm）を採取した。

また、人為の影響の極めて少ない土壌として森林土壌として、筑波山山頂付近のブナ林土壌の O 層（堆積有機質層）、A 層（0~15 cm）B 層（15~50 cm）（写真 7）と、筑波山山麓のシイ・カシ林土壌の O 層、A 層、B 層（写真 8）の土壌を採取した。

2.1.2 供試抗生物質

① アンピシリン（Ap）

細胞壁合成阻害剤。グラム陽性細菌、グラム陰性細菌に有効。

② バンコマイシン（Vm）

細胞壁合成阻害剤。グラム陰性細菌に有効。

③ カナマイシン（Km）

タンパク質合成阻害剤。グラム陽性細菌、グラム陰性細菌に有効。

④ クロラムフェニコール (Cp)

タンパク質合成阻害剤。グラム陰性細菌に有効。

⑤ リファンピシン (Rf)

RNA 合成阻害剤。グラム陽性細菌、グラム陰性菌および結核菌に有効。

⑥ テトラサイクリン (Tc)

タンパク質合成阻害剤。グラム陽性、グラム陰性菌、スピロヘータ、マイコプラズマ、リッチケア、クラミジアなどに有効。

2.1.3 使用培地

下記①～④の培地を使用した。

① 全生細菌数：PTYG 培地

Peptone 0.25 g、Tryptone 0.25 g、Yeast extract 0.5 g、Glucose 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.03 g、CaCl₂ · 2H₂O 0.0035 g、Agar 15.0 g/L

② 全腸球菌数：EF 寒天基礎培地 (Nissui, Taito, Japan)

Brain extract 8.5、Heart extract 8.5、Peptone 10.0 g、Glucose 10.0 g、KH₂PO₄ 2.5 g、Brom thymol blue 0.032 g、Triphenyl terazolium chloride 0.15 g、Agar 15.0 g/L

③ 全大腸菌群数：Desoxycholate 培地 (Nissui)

Desoxycol natrium 1.0 g、Peptone 10.0 g、Citrate Fe ammonium 2.0 g、NaCl 5.0 g、KH₂PO₄ 2.0 g、Lactose 10.0 g、Neutral red 0.033 g、Agar 15.0 g/L

④ 連鎖球菌・乳酸菌数：MRS 培地 (Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, USA)

Proteose peptone 10.0 g、Beef extract 10.0 g、Yeast extract 5.0 g、Glucose 20.0 g、Polysorbate 80 1.0 g、Ammonium citrate 2.0 g、Sodium acetate 5.0 g、Magnesium sulfate 0.1 g、Manganese sulfate 0.05 g、Dipotassium phosphate 2.0 g、Agar 15.0 g/L

2.1.4 抗生物質耐性細菌の計数

下記の操作によって抗生物質耐性菌を計数した。

① 試料を約 100 g サンプルングした後、実験に供試するまで硬質ビニール袋に入れ 4 °C で保存した。

- ② 試料 30 g を一晩 105 °C で乾燥し、水分含量を求めた。
- ③ 試料 5 g を 45 ml の希釈水（pH7.0、滅菌 15 mM リン酸緩衝液）に加え、1 分間 Vortex で激しく振盪した。
- ④ 一次希釈水 100 μ l を 900 μ l の希釈水に加えて攪拌した。（ 10^2 希釈液）
- ⑤ 同じ要領で順次 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 希釈液を作成した。
- ⑥ 寒天平板培地に抗カビ剤としてシクロヘキシミドを終濃度 100 μ g/ml となるように加えた。
- ⑦ アンピシリン、バンコマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコール、リファンピシン、テトラサイクリンを終濃度 50 μ g/ml となるように加え、抗生物質無添加と各抗生物質含有平板培地を作成した。
- ⑧ 希釈液 100 μ l を各プレート表面に塗布した。各希釈液 3 段階について 2 枚ずつのプレートを使用し、3 連で行った。
- ⑨ 30 °C で 7 日間静置培養し、生育したコロニー数を計測した。
- ⑩ 腸内細菌群については、EF 寒天基礎培地、Desoxycholate 培地と MRS 培地の抗生物質無添ならびにテトラサイクリン含有平板培地に希釈液 100 μ l を塗布し、37 °C で 48 時間静置培養して生育したコロニー数を計測した。
- ⑪ MRS 培地は嫌気ジャー内でガス置換を行い、嫌気培養を行った。
- ⑫ 培養後、細菌数を 1 g 当たりのコロニー形成数（CFU/g）乾物・乾土に換算した。

2.2 結果

2.2.1 豚ふん中の抗生物質耐性細菌数

A. 6種類の抗生物質に対する総耐性細菌数

豚ふん中の抗生物質耐性細菌数を調べ、下記の結果を得た（図3、表2.1）。

つくば市養豚農家の母豚（使用抗生物質は不明）の豚ふん中では、全生細菌数が約 10^{11} CFU/g 乾物で非常に多かった。抗生物質耐性細菌は、Km（約 10^{10} /g のオーダー）、Ap（ 10^9 /g のオーダー）、Cp（ 10^6 /g のオーダー）、Tc（ 10^6 /g のオーダー）、Vm（ 10^4 /g のオーダー）の順で検出され、調べた家畜の生ふんの中では例外的に、リファンピシン耐性細菌が検出限界以下であった。

畜産草地研究所の「LWD」子豚（飼料にエフロトマイシン、硫酸コリスチンを添加）のふんでは、全生細菌数が約 10^9 CFU/g DM 乾物で、つくば市養豚農家豚ふんに比べ菌数レベルは 2 オーダー低かった。抗生物質耐性細菌は Km（ 10^8 /g のオーダー）、Ap（ 10^8 /g のオーダー）、Tc（ 10^7 /g のオーダー）、Cp（ 10^7 /g のオーダー）、Vm（ 10^7 /g のオーダー）、Rf（ 10^5 /g のオーダー）の順で検出された。

畜産草地研究所の「梅山豚」子豚（飼料にエフロトマイシンと硫酸コリスチンを添加）のふんでは、全生細菌数は約 10^9 CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Tc（ 10^9 /g のオーダー）、Ap（ 10^9 /g のオーダー）、Km（ 10^8 /g のオーダー）、Cp（ 10^7 /g のオーダー）、Vm（ 10^7 /g のオーダー）、Rf（ 10^6 /g のオーダー）の順で検出された。また、用いた 6 種類の抗生物質全てに耐性な細菌が高レベルで存在した。中でも、全生細菌数のほぼ 100% が Tc 耐性を、約 83% が Ap 耐性を保持していた。

B. 腸内細菌数

生ふん中には大腸菌、腸球菌、乳酸菌などが多いことから、腸内細菌群のうち全大腸菌群数と全腸球菌数、ならびにそれらの Tc 耐性を調べた（図4、表2.3）。

つくば市養豚農家の豚ふんでは、全大腸菌群数は約 10^5 CFU/g 乾物で、その 100% が Tc 耐性を保持していた。全腸球菌数は約 10^4 CFU/g 乾物で、その約 40% が Tc 耐性を保持していた。

畜産草地研究所の「LWD」子豚のふんでは、全大腸菌群数は約 10^5 CFU/g 乾物で、その約 75 %が Tc 耐性を保持していた。全腸球菌数は約 10^6 CFU/g 乾物で、その約 94 %が Tc 耐性を保持していた。

畜産草地研究所の「梅山豚」子豚のふんでは、全大腸菌群数は約 10^7 CFU/g 乾物で、その 100 %が Tc 耐性を保持していた。全腸球菌数は約 10^8 CFU/g 乾物で、その約 56 %が Tc 耐性を保持していた。

2.2.2 鶏ふん中の抗生物質耐性細菌数

A. 6 種類の抗生物質に対する総耐性細菌数

鶏ふん中の抗生物質耐性細菌数を調べ、下記の結果を得た（図 5、表 2.1）。

畜産草地研究所の「チャンキー」ブロイラー雛鳥（飼料に硫酸コリスチンとサリノマイシンナトリウムを添加）のふんでは、全生細菌数が約 10^{13} CFU/g 乾物と非常に多かった。抗生物質耐性細菌は Ap (10^{12} /g のオーダー)、Km (10^{12} /g のオーダー)、Vm (10^{11} /g のオーダー)、Tc (10^{10} /g のオーダー)、Cp (10^8 /g のオーダー)、Rf (10^7 /g のオーダー) の順で検出された。また、用いた 6 種類の抗生物質全てに耐性な細菌が高レベルで検出された。

小川町イセ・ファーム社の採卵鶏（抗生物質無添加）のふんでは、全生細菌数が約 10^{12} CFU/g 乾物であった。この採卵鶏の飼料には抗生物質が全く添加されていないにもかかわらず、抗生物質耐性細菌が Ap (10^{13} /g のオーダー)、Tc (10^9 /g のオーダー)、Km (10^8 /g のオーダー)、Vm (10^7 /g のオーダー)、Cp (10^6 /g のオーダー)、Rf (10^6 /g のオーダー) の順で検出された。

小川町養鶏農家の採卵鶏（使用抗生物質が不明）のふんは、全生細菌数が約 10^{11} CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Vm (10^8 /g のオーダー)、Ap (10^7 /g のオーダー)、Km (10^6 /g のオーダー)、Tc (10^6 /g のオーダー)、Rf (10^5 /g のオーダー)、Cp (10^4 /g のオーダー) の順で検出された。

B. 腸内細菌数

鶏ふん中の大腸菌群数、腸球菌数とそれらの Tc 耐性を調べた。イセ・ファーム社採卵鶏、小川町養鶏農家採卵鶏では連鎖球菌・乳酸菌類数とそれらの Tc 耐性を加えて調べ、下記の結果を得た（図 6、表 2.3）。

畜産草地研究所の「チャンキー」ブロイラー雛鳥のふんでは、全大腸菌群数が約 10^9 CFU/g 乾物で、その約 12 %が Tc 耐性を保持していた。全腸球菌数は約 10^{10} CFU/g 乾物で、その約 53 %が Tc 耐性を保持していた。

小川町イセ・ファーム社の採卵鶏（抗生物質無添加）のふんでは、全大腸菌群数が約 10^9 CFU/g 乾物で、飼料に抗生物質が添加されていないにもかかわらず、その約 36 %が Tc 耐性を保持していた。全腸球菌数は約 10^8 CFU/g 乾物で、その約 2 %が Tc 耐性を保持していた。全連鎖球菌・乳酸菌類数は約 10^{10} CFU/g 乾物で、その約 0.2 %が Tc 耐性を保持していた。

小川町養鶏農家の採卵鶏（使用抗生物質が不明）のふんでは、全大腸菌群数は約 10^5 CFU/g 乾物で、その約 23 %が Tc 耐性を保持していた。全腸球菌数は約 10^9 CFU/g 乾物で、その約 2 %が Tc 耐性を保持していた。全連鎖球菌・乳酸菌類数は約 10^{10} CFU/g 乾物で、その約 1 %が Tc 耐性を保持していた。

2.2.3 豚ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌数

つくば市養豚農家の母豚（使用抗生物質が不明）の排泄物からその農家の調整した熟成度合いの違う 2 つの豚ふん堆肥について、抗生物質耐性細菌数を調べ、生豚ふんの結果と比較した（図 7、表 2.1）。なお、下記において未熟堆肥や完熟堆肥という表現は、当該農家の表現によるものである。

未熟豚ふん堆肥中では、全生細菌数が約 10^8 CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^6 /g のオーダー)、Tc (10^5 /g のオーダー)、Vm (10^4 /g のオーダー)、Cp (10^4 /g のオーダー) の順で検出された。一方、Km、Rf 耐性細菌は検出限界以下であった。完熟豚ふん堆肥中では、全生細菌数が約 10^9 CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^6 /g のオーダー)、Cp (10^5 /g のオーダー)、Tc (10^3 /g のオーダー) の順で検出された。一方、Vm、Km、Rf 耐性細菌は検出限界以下であった。

2.2.4 鶏ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌数

小川町養鶏農家の採卵鶏（使用抗生物質が不明）の排泄物から作られた熟成度合いの違う 2 つの鶏ふん堆肥における抗生物質耐性細菌数を調べ、生鶏ふんでの結果と比較した（図 8、表 2.1）。なお、下記において未熟堆肥や完熟堆肥という表現は、当該農家の表現によるものである。

未熟鶏ふん堆肥中では、全生細菌数が約 10^7 CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Km (10^6 /g のオーダー)、Ap (10^6 /g のオーダー)、Cp (10^4 /g のオーダー)、Tc (10^3 /g のオーダー) の順で検出された。一方、Vm、Rf 耐性細菌は検出限界以下であった。完熟鶏ふん堆肥中では、全生細菌数が約 10^8 CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^6 /g のオーダー)、Km (10^4 /g のオーダー)、Vm (10^4 /g のオーダー)、Tc (10^3 /g のオーダー) の順で検出された。一方、Cp、Rf 耐性細菌は検出限界以下であった。

小川町イセ・ファーム社の採卵鶏（抗生物質無添加）の排泄物から作られた熟成度合いの違う 2 つの鶏ふん堆肥における抗生物質耐性細菌数を調べ、生鶏ふんでの結果と比較した（図 9、表 2.1）。なお、下記において未熟堆肥や完熟堆肥という表現は、当該社の表現によるものである。未熟高温堆積中鶏ふんでは、全生細菌数が約 10^3 CFU/g 乾物であったが、6 種類の抗生物質に耐性な細菌は全て検出限界以下であった。完熟鶏ふん堆肥中では、全生細菌数が約 10^7 CFU/g 乾物であった。そして、Ap 耐性細菌が約 10^3 CFU/g 乾物検出されたが、他の 5 種類の抗生物質に耐性な細菌は全て検出限界以下であった。

小川町の養鶏農家とイセ・ファーム社の鶏ふん堆肥については、大腸菌群数、腸球菌数、連鎖球菌・乳酸菌類数とその Tc 耐性も調査した（図 10、表 2.3）。

養鶏農家の未熟鶏ふん堆肥中では、全大腸菌群数が 10^4 CFU/g 乾物で、そのほぼ 100 % が Tc 耐性を保持していた。全腸球菌数は約 10^5 CFU/g 乾物で、Tc 耐性を保持している細菌は検出限界以下であった。全連鎖球菌・乳酸菌類数は約 10^6 CFU/g 乾物で、その約 0.4 % が Tc 耐性を保持していた。完熟堆肥中では、全大腸菌群数、Tc 耐性大腸菌群数、腸球菌数、Tc 耐性腸球菌数は全て検出限界以下であった。全連鎖球菌・乳酸菌類数は約 10^6 CFU/g 乾物で、Tc 耐性を保持している細菌は検出限界以下であった。

イセ・ファーム社の未熟鶏ふん堆肥中では、全大腸菌群数、Tc 耐性大腸菌群数、腸球菌数、Tc 耐性腸球菌数、全連鎖球菌・乳酸菌類数、Tc 耐性全連鎖球菌・乳酸菌類数は全て検出限界以下であった。完熟堆肥中でも、全大腸菌群数、Tc 耐性大腸菌群数、腸球菌数、Tc 耐性腸球菌数は全て検出限界以下であった。全連鎖球菌・乳酸菌類数は約 10^5 CFU/g 乾物で検出されたが、Tc 耐性を保持している細菌は検出限界以下であった。

小川町ニラ生産農家の屋外堆積のおがくず鶏ふん堆肥では、全生細菌数が約 10^9 CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^7 /g のオーダー)、Km (10^7 /g のオーダー)、Vm (10^6 /g のオーダー)、Rf (10^6 /g のオーダー)、Cp (10^5 /g のオーダー)、Tc (10^5 /g のオーダー) の順に高レベルで検出された。

2.2.5 市販堆肥中の抗生物質耐性細菌数

市販の家畜ふん堆肥について抗生物質耐性細菌を調べた。なお、市販牛ふん堆肥については、大腸菌群数とその Tc 耐性を調査した (図 11、表 2.2)。

市販豚ふん堆肥では、全生細菌数が約 10^{12} CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^{10} /g のオーダー)、Km (10^9 /g のオーダー)、Vm (10^9 /g のオーダー)、Cp (10^7 /g のオーダー)、Tc (10^5 /g のオーダー) の順で検出された。一方、Rf 耐性細菌は検出限界以下であった。

市販鶏ふん堆肥では、全生細菌数が約 10^8 CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Tc (10^5 /g のオーダー)、Cp (10^5 /g のオーダー)、Km (10^4 /g のオーダー)、Ap (10^3 /g のオーダー) の順で高次に検出された。一方、Vm、Rf 耐性細菌は検出限界以下であった。

市販牛ふん堆肥では、全生細菌数が約 10^{10} CFU/g 乾物であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^9 /g のオーダー)、Km (10^8 /g のオーダー)、Vm (10^8 /g のオーダー)、Rf (10^8 /g のオーダー)、Cp (10^6 /g のオーダー)、Tc (10^5 /g のオーダー) の順で検出された。市販牛ふん堆肥中の全大腸菌群数は約 10^4 CFU/g 乾物で、その約 27% が Tc 耐性を保持していた (表 2.3)。

2.2.6 農地土壌中の抗生物質耐性細菌数

A. 家畜ふん堆肥連用土壌中の抗生物質耐性細菌数

生家畜ふん、堆肥製造と堆肥施用が一貫して行われている生産現場において、それぞれの段階における抗生物質耐性細菌数を比較できるのが理想である。しかし、家畜ふんと家畜ふん堆肥を生産する畜産経営体と、堆肥を利用する耕種経営体は分離されており、比較可能な一貫した経営体を調査することは極めて難しい。このため、家畜ふんと堆肥での結果と直接比較できないが、家畜ふん堆肥を多量に施用している畑について、抗生物質耐性細菌数を調査した (図 12、

表 2.2)。

愛知県の農家の豚ふん堆肥を毎年 40t/ha を連用した野菜畑土壌では、全生細菌数が約 10^9 CFU/g 乾土に達していた。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^8 /g のオーダー)、Km (10^8 /g のオーダー)、Vm (10^7 /g のオーダー)、Rf (10^7 /g のオーダー)、Cp (10^6 /g のオーダー)、Tc (10^5 /g のオーダー) の順に検出された。

愛知県の農家の鶏ふん堆肥を毎年 15 t/ha ずつ連用した果樹園土壌では、全生細菌数が約 10^9 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^7 /g のオーダー)、Vm (10^6 /g のオーダー)、Km (10^6 /g のオーダー)、Cp (10^6 /g のオーダー)、Rf (10^5 /g のオーダー)、Tc (10^4 /g のオーダー) の順で検出された。また、6 種類の抗生物質全てに耐性な細菌が存在した。

小川町のニラ生産農家のおがくず鶏ふん堆肥を 10 t/ha/y 連用した土壌については、堆肥施用直後の土壌と、堆肥施用半年後の土壌について調査したが、両者で有意な差がなく、唯一認められた差は、Tc 耐性細菌が堆肥施用直後土壌で約 10^5 CFU/g 乾土であったのが、堆肥施用半年後土壌では約 10^3 CFU/g 乾土となっていた点であった。

B. 家畜ふん堆肥無施用畑土壌中の抗生物質耐性細菌数

小川町ニラ生産農家の上記連用土壌に近接した鶏ふん堆肥無施用畑土壌では、全生細菌数が約 10^8 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^7 /g のオーダー)、Tc (10^6 /g のオーダー)、Km (10^6 /g のオーダー)、Vm (10^6 /g のオーダー)、Rf (10^6 /g のオーダー)、Cp (10^6 /g のオーダー) の順で検出された。

農業環境技術研究所の堆肥無施用畑土壌について 4 月、7 月と 11 月に調査を行った (図 13、表 2.2)。

年間を通して全生細菌数が約 10^8 CFU/g 乾土であった。この圃場にはこれまで家畜ふん堆肥が施用されていないが、抗生物質耐性細菌が検出され、Ap 耐性細菌が約 10^7 CFU/g 乾土、Vm 耐性細菌が約 10^6 CFU/g 乾土、Km 耐性細菌が約 10^7 CFU/g 乾土、Cp 耐性細菌が約 10^6 CFU/g 乾土、Rf 耐性細菌が約 10^6 CFU/g 乾土、Tc 耐性細菌が約 10^5 CFU/g 乾土存在した。

2.2.7 森林土壌中の抗生物質耐性細菌数

上記の農業環境技術研究所の畑土壌には、抗生物質を含む家畜ふん堆肥がこ

れまで施用されていないが、近隣の施用畑から土壌粒子とともに耐性細菌が飛散してきて定着している可能性を否定できない。そこで、筑波山山頂近くの人為の影響が極めて少ないと考えられる森林土壌中の抗生物質耐性細菌数を調査した（図 14、15、表 2.3）。

ブナ林土壌の O 層では全生細菌数が約 10^9 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Vm (10^9 /g のオーダー)、Ap (10^9 /g のオーダー)、Km (10^9 /g のオーダー)、Cp (10^8 /g のオーダー)、Rf (10^6 /g のオーダー)、Tc (10^6 /g のオーダー) の順に検出された。また、6 種類の抗生物質全てに耐性な細菌が存在した。

ブナ林土壌の A 層では全生細菌数が約 10^7 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Vm (10^6 /g のオーダー)、Km (10^6 /g のオーダー)、Ap (10^6 /g のオーダー)、Cp (10^6 /g のオーダー)、Rf (10^5 /g のオーダー)、Tc (10^5 /g のオーダー) の順に検出された。また、6 種類の抗生物質全てに耐性な細菌が存在した。

ブナ林土壌の B 層では全生細菌数が約 10^6 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Vm (10^5 /g のオーダー)、Km (10^5 /g のオーダー)、Ap (10^5 /g のオーダー)、Cp (10^4 /g のオーダー)、Rf (10^3 /g のオーダー) の順に検出された。一方、Tc 耐性細菌は検出限界以下であった。

シイ・カシ林土壌の O 層では全生細菌数が約 10^9 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Ap (10^8 /g のオーダー)、Vm (10^8 /g のオーダー)、Km (10^8 /g のオーダー)、Cp (10^7 /g のオーダー)、Rf (10^6 /g のオーダー)、Tc (10^6 /g のオーダー) の順に検出された。

シイ・カシ林土壌の A 層では全生細菌数が約 10^7 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Vm (10^6 /g のオーダー)、Km (10^6 /g のオーダー)、Ap (10^6 /g のオーダー)、Tc (10^5 /g のオーダー)、Cp (10^5 /g のオーダー)、Rf (10^5 /g のオーダー) の順で検出された。

シイ・カシ林土壌の B 層では全生細菌数が約 10^6 CFU/g 乾土であった。抗生物質耐性細菌は、Km (10^5 /g のオーダー)、Vm (10^5 /g のオーダー)、Ap (10^5 /g のオーダー)、Cp (10^5 /g のオーダー)、Rf (10^4 /g のオーダー)、Tc (10^4 /g のオーダー) の順に検出された。

2.3 考察

2.3.1 家畜への抗生物質投与の現状

飼料添加物とは、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進のために使用の認められた抗生物質のことで⁶⁰⁾、現在 19 品目が認められている³¹⁾。抗生物質投与により、腸内でのクロストリジウム症やコクシジウム症等を起こす有害細菌と有害物質産生が減少し、またこれらによって腸管内壁が薄くなり栄養吸収率が高くなり、成長促進の効果があるとされている。しかし、疑問の声もある。長年、飼料添加を行ってきたために、その添加効果よりも、添加しないことによる病気の発生などへの不安が大きく働いているようである。

動物体内における抗生物質耐性菌の出現原因の 1 つとして、この成長促進剤としての抗生物質使用が挙げられる。治療目的に高用量で短期間使用されるよりも、低用量で長期に抗生物質に曝されると、動物体内の細菌がそれらの抗生物質に耐性を獲得する機会が高まるからである。これによって家畜体内で抗生物質耐性菌が増加し、耐性菌が付着した畜産物を食べることや家畜に接触することによって、ヒトの体内でも耐性菌が増殖し、抗生物質が効かないという危険性が生まれてくることが懸念されている。また、動物専用医薬品であっても、ヒトに使用される抗生物質と類似化合物であるために、影響を与える可能性もある。例えば、動物用肥育促進剤のアボパルシンがバンコマイシンの構造に類似していたために、動物体内でできた VRE がヒトに広がったのではないかという議論が起き、そのため、日本では 1997 年にアボパルシンは使用禁止となった⁶²⁾。

最近の家畜生産は大規模経営体で集約的に行われるようになった。また、近年問題となっている狂牛病や鳥インフルエンザなどの社会的不安から消費者の求める安全性レベルが向上した。そのため、徹底した衛生管理が重要となり、予防効果を求めて過剰に薬剤投与する風潮が生じている。

農林水産省消費・安全局が耐性菌の観点から飼料添加物の見直しを開始しようと、食品安全委員会に意見を聴くなどの調査の結果、食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについての政策を作成したが⁵⁴⁾、ここでは、「家畜等に動物用抗菌性物質を使用することに

より選択される薬剤耐性菌が食品を介してヒトに伝播し、ヒトが当該耐性菌に起因する感染症を発生した場合に、ヒト用抗菌性物質による治療効果が減弱あるいは喪失する可能性及びその程度」のリスク評価を行うためのものであり、食品を介するルートに限定されており、家畜排泄物を介した環境へのルートには目が向けられていない。

2.3.2 家畜ふん中の抗生物質耐性菌レベル

本実験では、つくば市養豚農家の母豚（使用抗生物質不明）のふんからの PTYG 培地分離細菌には、他の豚ふんサンプルと比べてバンコマイシン耐性細菌が少なく、リファンピシン耐性細菌は検出限界以下であった（図 3、表 2.1）。これは、この農家では飼料添加物にリファンピシン、あるいはそれに類似した抗生物質が使用されておらず、これらに多くの細菌が感受性を持っていたのではないかと推定される。それに対し、畜産草地研究所の「LWD」子豚のふんには、つくば市養豚農家豚ふんに比べ全生細菌数レベルが低かったものの、用いた 6 種類の抗生物質に耐性な細菌が高レベルで存在していた。さらに、畜産草地研究所の「梅山豚」子豚のふんには、「LWD」子豚のふんと同様に、用いた 6 種類の抗生物質に耐性な細菌が高レベルで存在し、全生細菌数の 100 %がテトラサイクリン耐性、83 %がアンピシリン耐性、20 %がカナマイシン耐性を示し、耐性細菌レベルが非常に高かった。畜産草地研究所の 2 種類のブタには、飼料添加物としてエフロトマイシンと硫酸コリスチンが使用されていたが、アンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリンにも耐性な細菌が高レベルで存在した。

子豚は、多発性漿膜炎を起こすグレーサー病、呼吸器感染症であるマイコプラズマ肺炎などにかかりやすく、飼料添加物にはもちろん、治療薬や予防薬としても抗生物質が多量に使用されている。グレーサー病にはペニシリン系やテトラサイクリン系抗生物質が、マイコプラズマ肺炎にはテトラサイクリン系やマクロライド系などの抗生物質が有効であるとされている³⁸⁾。ペニシリン系のアンピシリンやテトラサイクリンに耐性な細菌レベルが高かったのは、抗生物質が飼料添加または投与され、耐性細菌が増加したのではないかと推定される。また、つくば市養豚農家の母豚のふんよりも畜産草地研究所の豚ふんにおいて

抗生物質耐性細菌の割合が高かったのは、抗生物質が多種類かつ多量に与えられていた子豚由来であったためと推定される。

3つの鶏ふんサンプルからも、用いた6種類の抗生物質に耐性を持った細菌が検出された。日本では1997年に飼料添加物としての使用が禁止となったアボパルシンに類似したバンコマイシンに耐性な細菌も多数検出された。これらの耐性細菌の耐性メカニズムは不明であるが、抗生物質の添加が禁止になった後にも、耐性細菌が鶏ふん中に存在していることは注目される。また、飼養過程で抗生物質を一切使用していないとしている小川町イセ・ファーム社の採卵鶏鶏ふんにも、用いた6種類の抗生物質に耐性な細菌が存在した。治療目的や成長促進剤としては抗生物質を使用していないことから、自然界由来の抗生物質耐性細菌が既に飼料に存在していたためと推定される。畜産草地研究所のブロイラー雛鳥のふんでは、全生細菌数が 10^{13} CFU/g 乾物以上と非常に多く、各抗生物質耐性細菌数も多く検出された。これに対して、小川町養鶏農家の採卵鶏のふんは、排泄直後のものではなく、鶏の羽が多く混入したものであった。そのため、全生細菌数や抗生物質耐性細菌数が3サンプル中で最も少なかったと推測される。(図5、表2.1)。より家畜体内の耐性細菌を正確に把握するためには、直腸ふんに近い新鮮な糞便が望ましいと考えられる。

ふん中の抗生物質耐性細菌数がブロイラー雛鶏で採卵鶏よりも多い傾向を示したのは、飼料採取した2002年時、飼養羽数が採卵鶏では13,730万羽、ブロイラーでは1,037万羽と採卵鶏が10倍以上⁶⁸⁾であるのに対し、採卵鶏の7倍近くの抗生物質が飼料添加物としてブロイラーに使用されており⁶⁷⁾、ブロイラー雛鶏でより多くの抗生物質が使用されていることを反映している可能性が高い。

2.3.3 家畜ふん堆肥中の抗生物質耐性菌レベル

家畜ふんから、極めて多数の抗生物質耐性細菌が検出されたが、堆肥化すると、減少・消失する抗生物質耐性細菌があることが明らかになった。また、高温での十分な堆肥化が行われていないために、耐性細菌が残存しているケースがあると推定された。

つくば市養豚農家の2種類の豚ふん堆肥中では、生ふんに比べて、カナマイ

シン耐性細菌とバンコマイシン耐性細菌が明らかに減少しており、堆肥化によって両抗生物質耐性細菌数が減少することが確認された。堆肥化程度の違うサンプルの比較から、前者は比較的早期に、後者は時間をかけて減少したと推定される（図 7、表 2.1）。

小川町養鶏農家の 2 種類の鶏ふん堆肥中では、堆肥化に伴い数の減少した抗生物質耐性細菌と増加した耐性細菌が認められた。すなわち、堆肥化に伴い、リファンピシン耐性細菌は比較的短時間で、クロラムフェニコールは長時間かけて減少したと推定される。未熟鶏ふん堆肥中では検出限界以下であったバンコマイシン耐性細菌が完熟鶏ふん堆肥中で約 10^4 CFU/g 乾物検出されたことが注目された（図 8、表 2.1）。これは、堆肥化過程である程度温度が上昇して耐性細菌数が一時的に減少したものの、その後の温度低下で細菌が増加したと推測される。

小川町イセ・ファーム社の 2 種類の鶏ふん堆肥中では、堆肥化により、抗生物質耐性細菌数の顕著な減少が確認された。未熟高温堆積中鶏ふん中では、全生細菌数が約 10^3 CFU/g 乾物であったが、用いた 6 種類の抗生物質に耐性な細菌は、全て検出限界以下であった。完熟鶏ふん堆肥中では、アンピシリン耐性細菌がわずかに検出されたが、他の 5 種類の抗生物質に耐性な細菌は、全て検出限界以下であった。イセ・ファーム社は、大型の屋内施設で堆肥化を行っており、素手では熱いと感ずるほどの温度が出ており、 $70\sim 80^{\circ}\text{C}$ に達する高温での堆肥化が行われていたものと推測される（図 9、表 2.1、写真 5）。

小川町ニラ生産農家の屋外に堆積したおがくず鶏ふん堆肥については、どの養鶏場で飼養された鶏のふんをどのように堆肥化したかは具体的には不明であった。全生細菌数が小川町養鶏農家、小川町イセ・ファーム社の完熟堆肥よりも約 10～100 倍多く、抗生物質耐性細菌は用いた 6 種類の抗生物質に耐性を持つ細菌が高レベルで検出された（表 2.1、写真 4）。この結果は、堆肥化過程で十分な高温が発生しなかったために、抗生物質耐性細菌が生き残っていたと推定される。

また、ホームセンターで販売されている堆肥についても調査を行った（図 11、表 2.1）。その結果、市販豚ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌は、リファンピシン耐性細菌は検出限界以下であったものの、他の抗生物質耐性細菌数はつくば市

養豚農家豚ふんと同じようなレベルであり、十分な堆肥化が行われていないと推測された。テトラサイクリン耐性細菌を除いて、明らかに畑土壌よりも多くの抗生物質耐性細菌が存在しており、このような堆肥を畑に大量に施用することにより、土壌細菌叢にも影響を与える恐れがあると考えられる。

市販鶏ふん堆肥では、バンコマイシンおよびリファンピシン耐性細菌は検出限界以下であり、他の堆肥では多く検出されたアンピシリン耐性細菌、バンコマイシン耐性細菌、カナマイシン耐性細菌が少なく、テトラサイクリン耐性細菌が最も多かった。この堆肥は、全生細菌数が畑土壌と同レベルであり、最も多く検出されたテトラサイクリン耐性細菌も畑土壌と同レベルで、市販堆肥の中では、比較的良く堆肥化されたものと推測された。

市販牛ふん堆肥では、アンピシリン耐性細菌、カナマイシン耐性細菌、バンコマイシン耐性細菌、リファンピシン耐性細菌が非常に高い割合であった。さらに、市販堆肥の中では唯一大腸菌群が検出され、全大腸菌群数の約 27%がテトラサイクリン耐性を保持していた（表 2.3）。この堆肥は、テトラサイクリン耐性細菌を除いて、全生細菌数、他の抗生物質耐性細菌数が畑土壌の細菌数レベルを越えており、市販豚ふん堆肥同様に、畑に大量に施用すると、土壌細菌相に影響を与える恐れがあると推測された。

3 サンプルのみの調査であったが、市販堆肥には、農家や大型堆肥化施設で作られた堆肥よりも抗生物質耐性細菌がはるかに多いものも存在していることが認められた。中でも、豚ふん堆肥と牛ふん堆肥は抗生物質耐性細菌数が畑土壌の細菌数レベルを越えており、堆肥としては不十分な段階のものであることが推測された。

2.3.4 抗生物質耐性菌のリスクを低減させる堆肥化条件

イセ・ファーム社のように高温で長期間をかけて堆肥化を行えば、家畜ふん中の抗生物質耐性細菌が大幅に減少すると推定される。市販牛ふん、豚ふんおよび鶏ふん堆肥に、*Salmonella*、*Enterohemorrhagic E. coli* O157:H7 や *L. monocytogenes* を接種し、32°C で保存し、生残性を見た後藤らの研究では、4ヶ月後でもこれらの接種菌が残存していたことから、堆肥化の際に十分に高温発酵させることの重要性が述べられている²⁷⁾。

また、全国の堆肥センターから送付された 60 点の家畜ふん堆肥から抗生物質の検出を試みた調査では、すべての堆肥で陰性であったことが報告されている¹⁵⁾。堆肥化の過程で抗生物質が微生物に分解されたり、60～70°C の高温で、分解、失活したりしたと考えられる。しかし、耐性細菌の中には高温・乾燥状態でも生き残れるものが多数存在する。そして、異種細菌の間で、耐性をコードする遺伝子の乗ったプラスミド DNA を介した耐性遺伝子の伝達もできる。つまり、堆肥化によって抗生物質が消失したとしても、耐性細菌が堆肥化後に生き残り、環境中の一般細菌へ耐性遺伝子だけを転移する可能性は否定できない。

「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」の施行⁶⁹⁾や有機農業への関心の高まりから、今後、家畜ふん堆肥の施用量はますます増加すると予測される。家畜ふんは、こうしたリスクを持った細菌を含んでいることを認識し、安全な堆肥作りをすることが大切となる。

2.3.5 家畜ふん堆肥施用履歴のない土壌中の抗生物質耐性細菌レベル

一般的には抗生物質の乱用によって抗生物質耐性細菌が出現したと理解されているが、抗生物質を使用していないイセ・ファーム社の採卵鶏のふん中、堆肥無施用畑土壌中や森林土壌中でも抗生物質耐性細菌が多数検出された(図 5、13、14、15、表 2.1、2.2)。これらの結果から、土壌などの自然の場においては細菌が他の微生物との競争に打ち勝って、自ら生存を確保するために抗生物質を生産し、それに対抗するメカニズムとして抗生物質耐性機構が多く細菌に獲得されているのではないかと推定することができる。そして、抗生物質を使用することによって、自然界に存在する抗生物質耐性細菌の中から耐性細菌が選択的に増加しているのではないかと推定される。

本実験で、家畜ふん堆肥無施用土壌表土と人為の影響の極めて少ないと考えられる森林土壌 A 層での抗生物質耐性菌数はほぼ同レベルで、 $10^8/\text{g}$ 乾土のオーダーの全生細菌数に対して、抗生物質耐性細菌数は $10^5 \sim 10^7 \text{ CFU/g}$ 乾土のレベルで存在した。これらの結果は、旧西ドイツとオランダの土壌でカナマイシン耐性細菌数が $10^5/\text{g}$ のオーダーで検出されたとの報告⁸²⁾よりも、100 倍近く多かった。また、いくつかの国における土壌中の抗生物質耐性細菌数を調査した結果では、アンピシリン(全菌数より 1 オーダー低い)、カナマイシン、クロ

ラムフェニコール、リファンピシンおよびテトラサイクリン（全菌数より3~4オーダー低い）で検出された報告³³⁾がなされており、それらの結果と比較して、本実験のカナマイシン、クロラムフェニコールおよびリファンピシン耐性細菌数は1~2オーダー多かった。しかし、各国の土壤中の餌となる有機物含量の違いが細菌数にも影響している可能性もあるので、比較が難しい。

2.3.6 家畜ふん堆肥連用による抗生物質耐性細菌数への影響

家畜ふん堆肥を多量に連用した畑土壌では、家畜ふん堆肥に残存している抗生物質耐性細菌が土壌中でも生き残り、元々土壌中に存在していた耐性細菌に加えて耐性細菌数が増加するのではないかと想定して調査を行った。愛知県農家豚ふん堆肥連用畑土壌中では、農業環境技術研究所の堆肥無施用畑土壌中と比べて、全生細菌数が約20~30倍多く、抗生物質耐性細菌数は、約10倍程度多かった（Student *t*-test ; $p < 0.05$ ）。このことから、家畜ふん堆肥連用により全生細菌数、抗生物質耐性細菌数が増加したのではないかと推測される。しかし、愛知県農家豚ふん堆肥連用畑土壌以外のサンプルでは、明確な差異を確認できなかった。

また、小川町ニラ生産農家の屋外堆積のおがくず鶏ふん堆肥を連用した土壌では、堆肥の施用直後、施用半年後で明確な差は見られず、唯一認められた差はテトラサイクリン耐性細菌が施用直後で約 10^5 CFU/g 乾土であったのが、施用半年後では約 10^3 CFU/g 乾土となっていた点で、施用直後の土壌中では堆肥由来のテトラサイクリン耐性細菌が多く残存しており、施用後に減少したものと推測される。

デンマークにおいて、年0~31 t/haの豚ふんスラリー施用が土壌中の抗生物質耐性細菌に与える影響を5つの農場において調査した結果によると、施用直後にテトラサイクリン耐性菌が10倍程度増加し、1年後には元土壌のレベルに低下したことが示された⁸⁰⁾。さらに、テトラサイクリン耐性菌の割合は、テトラサイクリンの投与量が多い農場で高く、投与量が低いまたはしていない農場では低いという相関が得られた。これらの結果は、家畜ふん堆肥施用により土壌中の抗生物質耐性細菌数が増加することを示している。

本実験では、対照土壌として同農家の鶏ふん堆肥無施用畑土壌を採取し、比

較してみたが、明確な増減は見られなかった（図 12、表 2.2）。堆肥を施用している畑と距離が近かったため、耐性細菌が飛散している可能性もあり、対照土壌としては望ましいものではなかったと推測される。今後は、厳密な実験系で家畜ふん堆肥施用による土壌中への抗生物質耐性細菌数の影響を調査することが必要である。

2.3.7 抗生物質耐性菌の耕地における拡散の可能性

現在、家畜ふん堆肥の耕種での利用が促進されている。その際、家畜体内に生存している抗生物質耐性菌の問題について、食肉としての安全性という観点から多くの研究がなされているが、ふん尿を通した野外環境への流出についての関心はまだ低い。しかし、家畜への抗生物質使用により抗生物質耐性細菌が選択され、ふん尿スラリーを通じて地下水、畑作物へと流出し、ヒトへ影響を与える可能性が指摘されている⁹⁵⁾。また、有機肥料中の細菌の 2~25 %から VRE が検出され、この菌と同じ遺伝子型を保有する細菌が、国産および輸入野菜の 33 および 34 %から検出されたという報告がある²⁷⁾。その中で、家畜腸管病原菌の生残する未熟堆肥を介した栽培野菜への二次汚染の懸念が述べられている。また、堆肥中に病原性細菌が存在していたとすると、家畜ふん尿に由来する病原性大腸菌、サルモネラ菌、リステリア菌などの有害細菌が、家畜糞尿→農地土壌→作物体→収穫物という過程の中で、収穫した農産物に付着する可能性を否定できないという指摘もされている⁸³⁾。未熟堆肥を多量施用した場合、土壌の抗生物質耐性菌数が一時的に増加し、植物根や、降雨で跳ね上がった土壌とともに茎葉に定着する可能性を否定できない。こうしたリスク評価に必要な研究を早急に蓄積することが望まれる。

欧州委員会は食品安全白書の中で、家畜への成長促進剤としての抗生物質の段階的廃止や禁止の意向を発表した²⁴⁾。また、抗生物質の臨床および家畜衛生上での使用の安全性を提起し、科学運営委員会で抗生物質耐性細菌の安全性の評価基準を調査した²⁵⁾。日本では、内閣府食品安全委員会が飼料添加物及び動物用医薬品に起因する薬剤耐性菌の食品健康影響を評価するための基礎資料として、「食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度のランク付けについて」⁵⁴⁾ を発表した。循環型社会構築に際して抗生物質耐

性細菌の問題は、避けられない課題であることが認識されつつある。

表1 供試試料

		サンプリング地点	採取期日	備考	
家畜ふん	豚ふん	つくば市酒丸養豚農家	2002年9月5日	母豚	
		畜産草地研究所豚舎	2002年10月15日	豚1 (LWD子豚)	
		3点 畜産草地研究所豚舎	2002年10月15日	豚2 (梅山豚子豚)	
	鶏ふん	畜産草地研究所養鶏舎	2002年10月15日	ブロイラー雛鳥	
		イセ・ファーム鶏ふん堆肥製造施設	2003年3月12日	抗生物質無添加・採卵鶏	
		6点 3点 小川町養鶏農家養鶏舎	2003年3月12日	抗生物質無添加・採卵鶏	
家畜ふん 堆肥	豚ふん堆肥	市販豚ふん堆肥 (つくば市)	2002年5月8日		
		つくば市酒丸養豚農家堆肥場	2002年9月5日	堆肥1 (未熟堆肥)	
	鶏ふん堆肥	3点 つくば市酒丸養豚農家堆肥場	2002年9月5日	堆肥2 (完熟堆肥)	
		市販鶏ふん堆肥 (つくば市)	2002年5月8日		
		小川町農家野積み堆肥場	2002年5月15日		
		イセ・ファーム鶏ふん堆肥製造施設	2003年3月12日	堆肥1 (未熟堆肥)	
		イセ・ファーム鶏ふん堆肥製造施設	2003年3月12日	堆肥2 (完熟堆肥)	
		小川町養鶏農家	2003年3月12日	堆肥1 (未熟堆肥)	
		6点 小川町養鶏農家	2003年3月12日	堆肥2 (完熟堆肥)	
	10点 牛ふん堆肥	市販牛ふん堆肥 (つくば市)	2002年5月8日		
	農地土壌	豚ふん堆肥連用土壌	愛知県農家畑土壌	2002年7月26日	40 t/ha・8年間連用
		鶏ふん堆肥連用土壌	愛知県農家果樹圃場	2002年7月26日	15 t/ha・10年間連用
			小川町農家畑圃場	2002年5月15日	100 t/ha・10年間連用 (施用直後)
3点 小川町農家畑圃場			2002年5月15日	100 t/ha・10年間連用 (施用半年後)	
8点		堆肥無施用土壌	小川町農家畑圃場	2002年5月15日	
		農業環境技術研究所畑圃場	2002年4月24日		
	農業環境技術研究所畑圃場	2002年7月9日			
	4点 農業環境技術研究所畑圃場	2002年11月30日			
森林土壌	広葉樹林土壌1	筑波山ブナ林	2003年9月29日	O層	
		筑波山ブナ林	2003年9月29日	A層	
		3点 筑波山ブナ林	2003年9月29日	B層	
	広葉樹林土壌2	筑波山シイ・カシ林	2003年9月29日	O層	
		筑波山シイ・カシ林	2003年9月29日	A層	
		6点 3点 筑波山シイ・カシ林	2003年9月29日	B層	



写真1 畜産草地研究所「梅山豚」子豚



写真2 畜産草地研究所「チャンキー」肉鶏舎



写真3 つくば市養豚農家堆肥場



写真4 小川町ニラ農家屋外堆積おがくず鶏ふん堆肥



写真5 イセ・ファーム社堆肥化施設



写真6 小川町養鶏農家



写真7 筑波山ブナ林



写真8 筑波山シイ・カシ林

表 2.1 家畜ふんおよび家畜ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌数

	畜草研 LWD 豚ふん	畜草研梅山豚豚ふん	畜草研チャンキー鶏ふん	つくば市養豚農家豚ふん	つくば市養豚農家未熟堆肥	つくば市養豚農家完熟堆肥
全生細菌数	8.14×10 ⁸	2.63×10 ⁹	1.14×10 ¹³	3.83×10 ¹¹	7.80×10 ⁷	1.07×10 ⁹
アンピシリン耐性細菌	1.10×10 ⁸	2.19×10 ⁹	7.50×10 ¹¹	1.15×10 ⁹	7.88×10 ⁵	2.27×10 ⁶
バンコマイシン耐性細菌	1.01×10 ⁷	1.28×10 ⁷	3.51×10 ¹⁰	5.36×10 ⁴	1.17×10 ⁴	^a N.D.
カナマイシン耐性細菌	2.76×10 ⁸	5.25×10 ⁸	3.23×10 ¹¹	9.10×10 ⁹	N.D.	N.D.
クロラムフェニコール耐性細菌	1.31×10 ⁷	2.28×10 ⁷	1.80×10 ⁸	3.21×10 ⁶	3.90×10 ³	1.24×10 ⁵
リファンピシリン耐性細菌	6.21×10 ⁵	1.02×10 ⁶	1.34×10 ⁷	N.D.	N.D.	N.D.
テトラサイクリン耐性細菌	5.06×10 ⁷	3.01×10 ⁹	3.66×10 ⁹	3.83×10 ⁶	5.93×10 ⁴	1.07×10 ³
	イセ・ファーム社鶏ふん	イセ・ファーム社未熟堆肥	イセ・ファーム社完熟堆肥	小川町養鶏農家鶏ふん	小川町養鶏農家未熟堆肥	小川町養鶏農家完熟堆肥
全生細菌数	3.19×10 ¹²	3.28×10 ³	1.34×10 ⁷	2.64×10 ¹¹	1.36×10 ⁷	1.16×10 ⁸
アンピシリン耐性細菌	5.82×10 ⁹	N.D.	1.25×10 ³	3.84×10 ⁶	1.42×10 ⁶	7.38×10 ⁵
バンコマイシン耐性細菌	2.61×10 ⁷	N.D.	N.D.	4.20×10 ⁷	N.D.	6.77×10 ³
カナマイシン耐性細菌	1.70×10 ⁸	N.D.	N.D.	1.56×10 ⁶	1.48×10 ⁶	2.52×10 ⁴
クロラムフェニコール耐性細菌	3.12×10 ⁶	N.D.	N.D.	8.40×10 ³	4.37×10 ³	N.D.
リファンピシリン耐性細菌	5.58×10 ⁵	N.D.	N.D.	1.20×10 ⁵	N.D.	N.D.
テトラサイクリン耐性細菌	6.03×10 ⁸	N.D.	N.D.	1.33×10 ⁶	7.45×10 ²	1.85×10 ³
	市販豚ふん堆肥	市販鶏ふん堆肥	市販牛ふん堆肥	小川町おがくず鶏ふん堆肥		
全生細菌数	7.42×10 ¹¹	8.84×10 ⁷	3.57×10 ⁹	9.14×10 ⁹		
アンピシリン耐性細菌	7.42×10 ⁹	2.17×10 ³	3.15×10 ⁸	9.14×10 ⁶		
バンコマイシン耐性細菌	1.05×10 ⁹	N.D.	2.34×10 ⁸	2.71×10 ⁶		
カナマイシン耐性細菌	1.20×10 ⁹	5.42×10 ³	2.49×10 ⁸	8.91×10 ⁶		
クロラムフェニコール耐性細菌	6.11×10 ⁶	3.38×10 ⁴	2.81×10 ⁶	7.04×10 ⁴		
リファンピシリン耐性細菌	N.D.	N.D.	4.11×10 ⁷	1.28×10 ⁶		
テトラサイクリン耐性細菌	4.67×10 ⁴	2.99×10 ⁵	8.50×10 ⁴	3.63×10 ⁴		

^aN.D.: Not detected

(CFU/g DM)

表 2.2 農地土壌および森林土壌中の抗生物質耐性細菌数

	農環研畑土壌 4 月	農環研畑土壌 7 月	農環研畑土壌 11 月	小川町堆肥無施用畑土壌		
全生細菌数	4.03×10 ⁷	4.76×10 ⁷	5.32×10 ⁷	4.50×10 ⁷		
アンピシリン耐性細菌	3.65×10 ⁶	1.01×10 ⁷	3.38×10 ⁶	5.59×10 ⁶		
バンコマイシン耐性細菌	1.73×10 ⁶	1.90×10 ⁶	2.84×10 ⁶	1.95×10 ⁶		
カナマイシン耐性細菌	2.73×10 ⁶	5.41×10 ⁶	3.95×10 ⁶	2.96×10 ⁶		
クロラムフェニコール耐性細菌	7.80×10 ⁵	1.03×10 ⁶	1.78×10 ⁶	4.19×10 ⁵		
リファンピシン耐性細菌	2.14×10 ⁶	2.56×10 ⁶	4.13×10 ⁶	6.47×10 ⁵		
テトラサイクリン耐性細菌	6.25×10 ⁴	8.94×10 ⁴	9.69×10 ⁴	3.04×10 ⁶		
	小川町当年鶏ふん堆肥施用土壌	小川町前年鶏ふん堆肥施用土壌	愛知鶏ふん堆肥連用土壌	愛知豚ふん堆肥連用土壌		
全生細菌数	8.24×10 ⁷	7.43×10 ⁷	1.11×10 ⁹	6.99×10 ⁹		
アンピシリン耐性細菌	8.36×10 ⁶	6.48×10 ⁷	7.51×10 ⁶	1.08×10 ⁸		
バンコマイシン耐性細菌	1.50×10 ⁶	2.59×10 ⁶	2.02×10 ⁶	1.69×10 ⁷		
カナマイシン耐性細菌	5.02×10 ⁶	3.42×10 ⁶	1.98×10 ⁶	3.13×10 ⁷		
クロラムフェニコール耐性細菌	3.37×10 ⁵	5.68×10 ⁵	1.02×10 ⁶	2.09×10 ⁶		
リファンピシン耐性細菌	7.70×10 ⁵	5.68×10 ⁵	5.65×10 ⁴	4.64×10 ⁶		
テトラサイクリン耐性細菌	7.14×10 ⁴	1.08×10 ³	1.26×10 ⁴	1.33×10 ⁵		
	ブナ林土壌 O 層	ブナ林土壌 A 層	ブナ林土壌 B 層	シイ・カシ林土壌 O 層	シイ・カシ林土壌 A 層	シイ・カシ林土壌 B 層
全生細菌数	2.52×10 ⁹	1.09×10 ⁷	2.19×10 ⁶	1.61×10 ⁹	7.45×10 ⁶	1.57×10 ⁶
アンピシリン耐性細菌	5.15×10 ⁸	1.39×10 ⁶	7.67×10 ⁴	2.25×10 ⁸	1.12×10 ⁶	1.11×10 ⁵
バンコマイシン耐性細菌	5.52×10 ⁸	1.74×10 ⁶	2.63×10 ⁵	2.14×10 ⁸	1.79×10 ⁶	1.57×10 ⁵
カナマイシン耐性細菌	3.31×10 ⁸	1.51×10 ⁶	1.64×10 ⁵	5.78×10 ⁷	1.19×10 ⁶	2.10×10 ⁵
クロラムフェニコール耐性細菌	5.06×10 ⁷	4.52×10 ⁵	8.76×10 ³	2.24×10 ⁷	1.49×10 ⁵	4.00×10 ⁴
リファンピシン耐性細菌	2.54×10 ⁶	8.47×10 ⁴	1.10×10 ³	2.26×10 ⁶	8.20×10 ⁴	1.05×10 ⁴
テトラサイクリン耐性細菌	2.02×10 ⁶	8.12×10 ⁴	N.D.	7.49×10 ⁵	2.24×10 ⁵	7.86×10 ³

^aN.D.: Not detected

(CFU/g Dry soil)

表 2.3 テトラサイクリン耐性腸内細菌数

	つくば市養豚農家豚ふん	畜草研 LWD 豚ふん	畜草研梅山豚豚ふん	畜草研チャンキー鶏ふん	市販牛ふん堆肥	
全大腸菌群数	2.37×10^5	1.10×10^5	1.21×10^7	2.32×10^9	1.40×10^4	
テトラサイクリン耐性大腸菌群数	2.69×10^5	8.28×10^4	1.36×10^7	2.81×10^8	3.83×10^3	
全腸球菌数	7.65×10^3	1.96×10^6	7.04×10^7	7.13×10^9	N.D.	
テトラサイクリン耐性腸球菌数	3.06×10^3	1.85×10^6	3.96×10^7	3.75×10^9	N.D.	
	イセ・ファーム社鶏ふん	イセ・ファーム社未熟堆肥	イセ・ファーム社完熟堆肥	小川町養鶏農家鶏ふん	小川町養鶏農家未熟堆肥	小川町養鶏農家完熟堆肥
全大腸菌群数	1.11×10^9	N.D.	N.D.	1.56×10^5	7.45×10^3	N.D.
テトラサイクリン耐性大腸菌群数	4.00×10^8	N.D.	N.D.	3.55×10^4	26.8×10^4	N.D.
全腸球菌数	2.78×10^8	N.D.	N.D.	6.71×10^8	3.20×10^4	N.D.
テトラサイクリン耐性腸球菌数	5.10×10^6	N.D.	N.D.	1.13×10^7	N.D.	N.D.
全乳酸菌類数	1.29×10^{10}	N.D.	2.44×10^5	5.14×10^9	8.34×10^5	4.92×10^5
テトラサイクリン耐性乳酸菌類数	3.20×10^7	N.D.	N.D.	3.88×10^7	3.73×10^3	N.D.

^aN.D.: Not detected

(CFU/g DM)

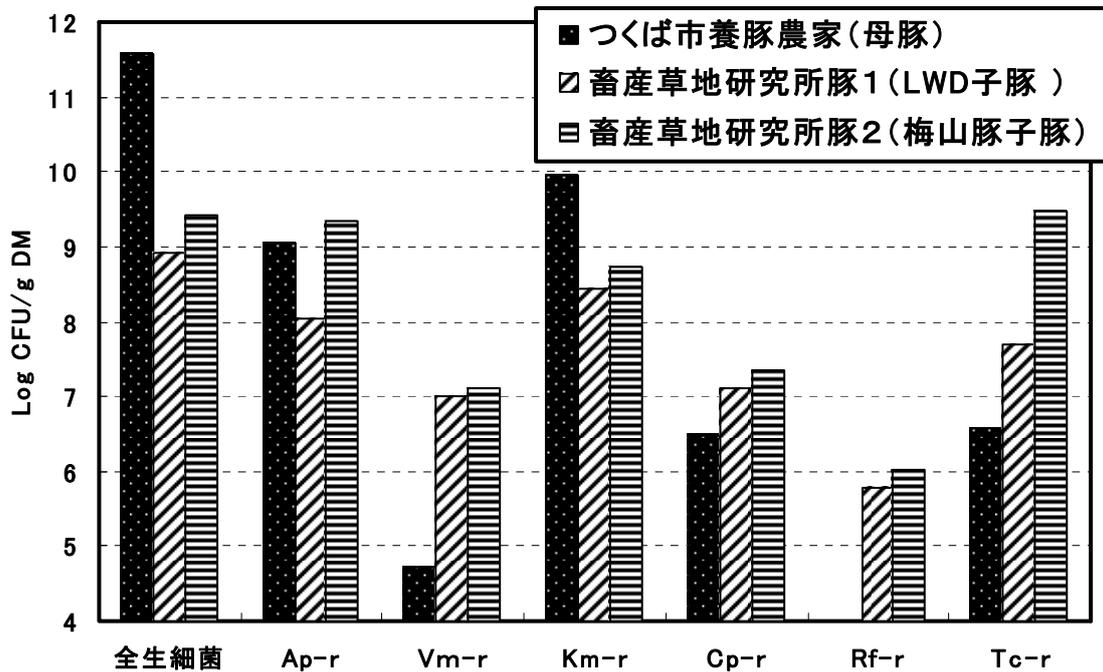


図3 豚ふん中の6種類の抗生物質に対する耐性細菌数

Ap-r: アンピシリン耐性細菌、Vm-r: バンコマイシン耐性細菌、
 Km-r: カナマイシン耐性細菌、Cp-r: クロラムフェニコール耐性細菌、
 Rf-r: リファンピシン耐性細菌、Tc-r: テトラサイクリン耐性細菌

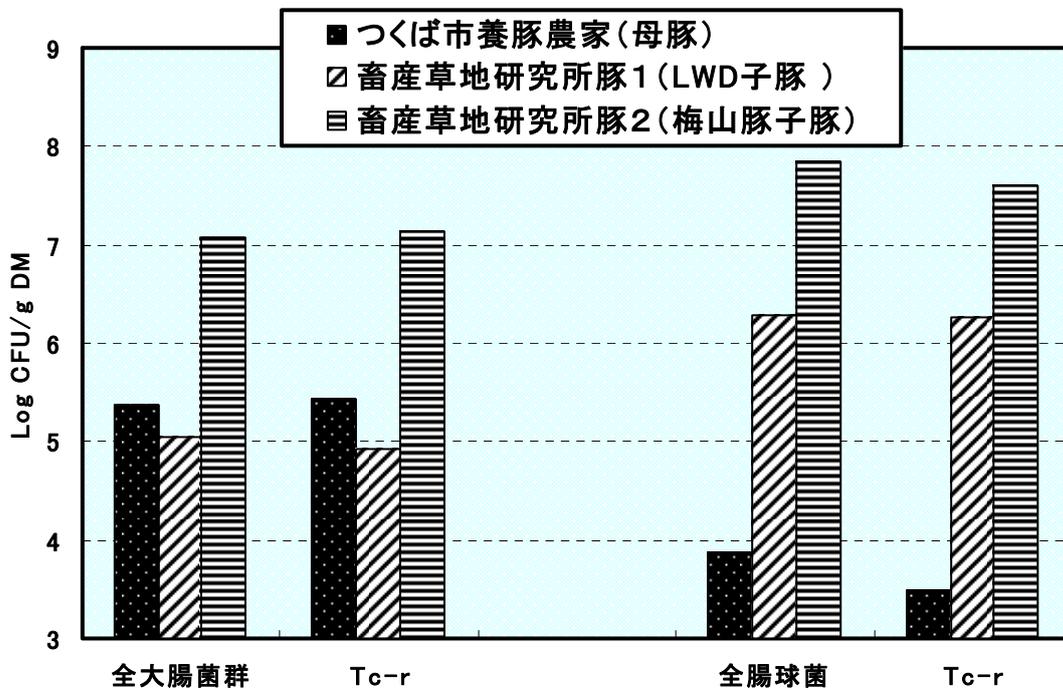


図4 豚ふん中腸内細菌群におけるテトラサイクリン耐性細菌数

Tc-r: テトラサイクリン耐性細菌

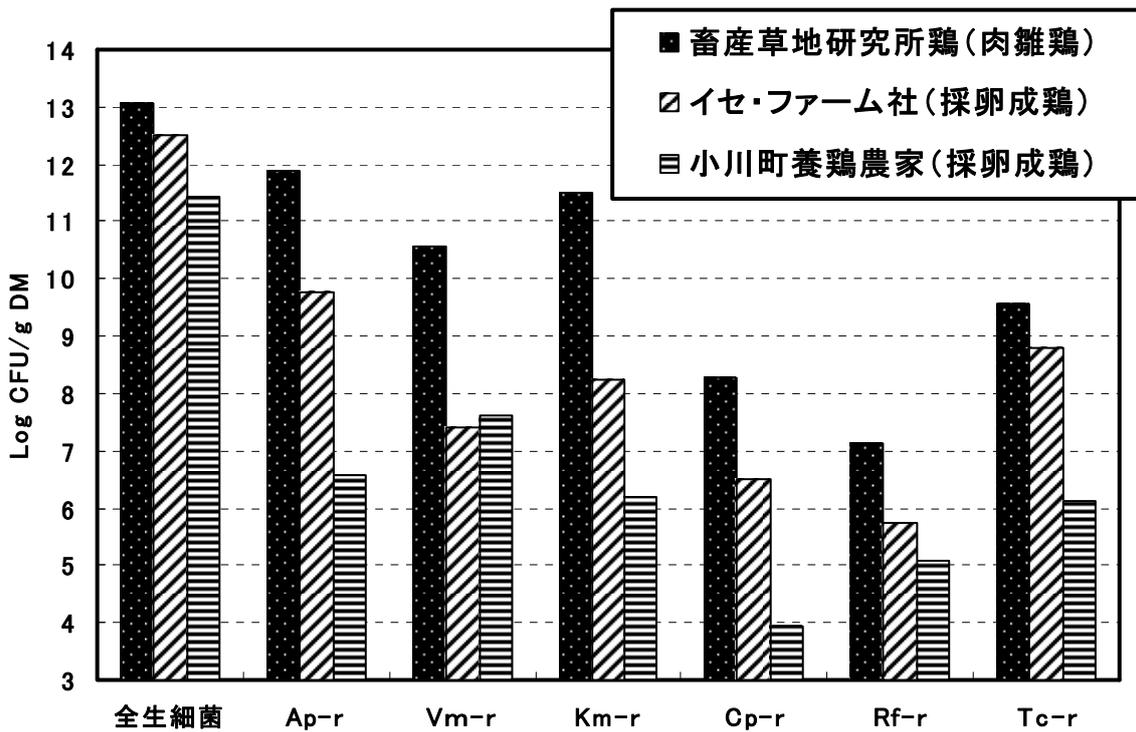


図5 鶏ふん中の6種類の抗生物質に対する耐性細菌数

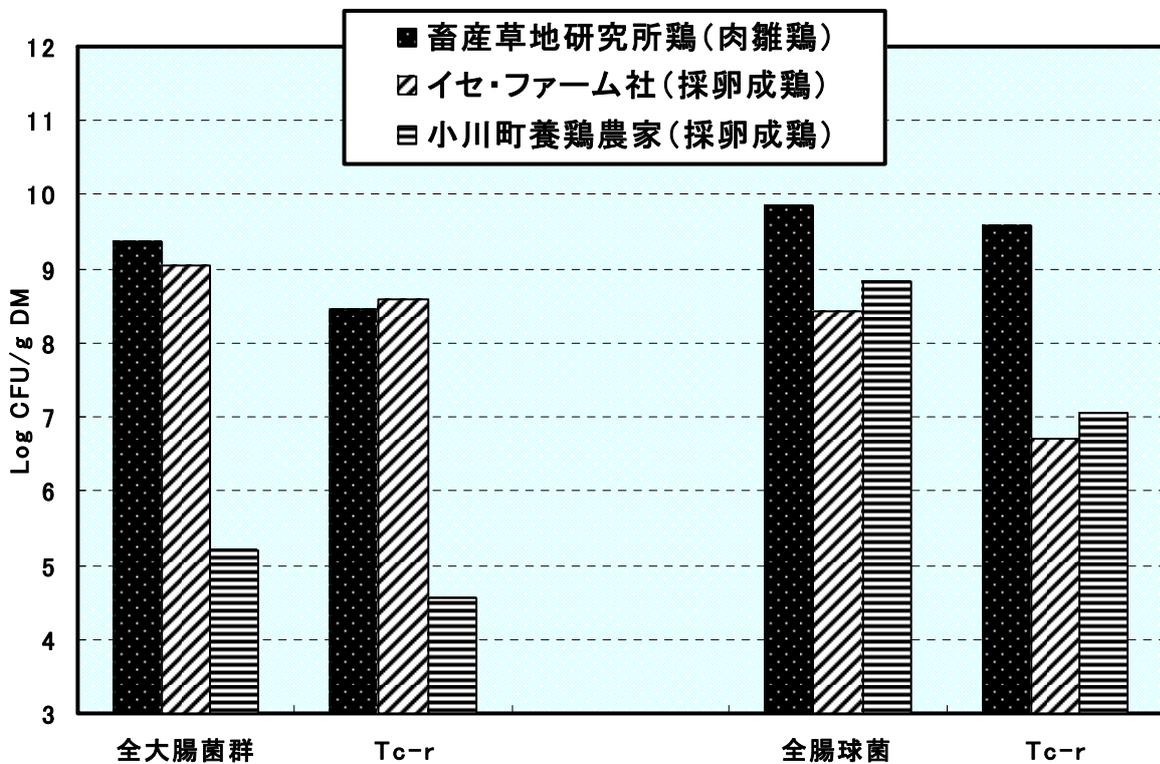


図6 鶏ふん中腸内細菌群におけるテトラサイクリン耐性細菌数

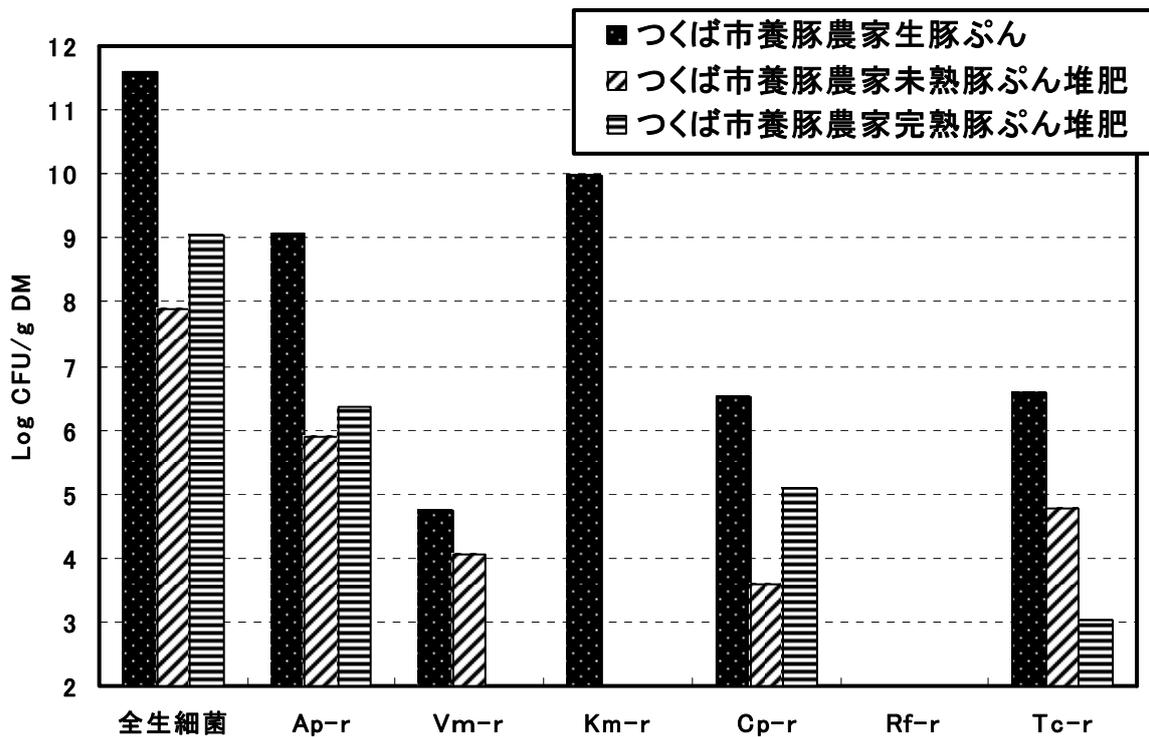


図7 豚ふん堆肥中の6種類の抗生物質に対する耐性細菌数

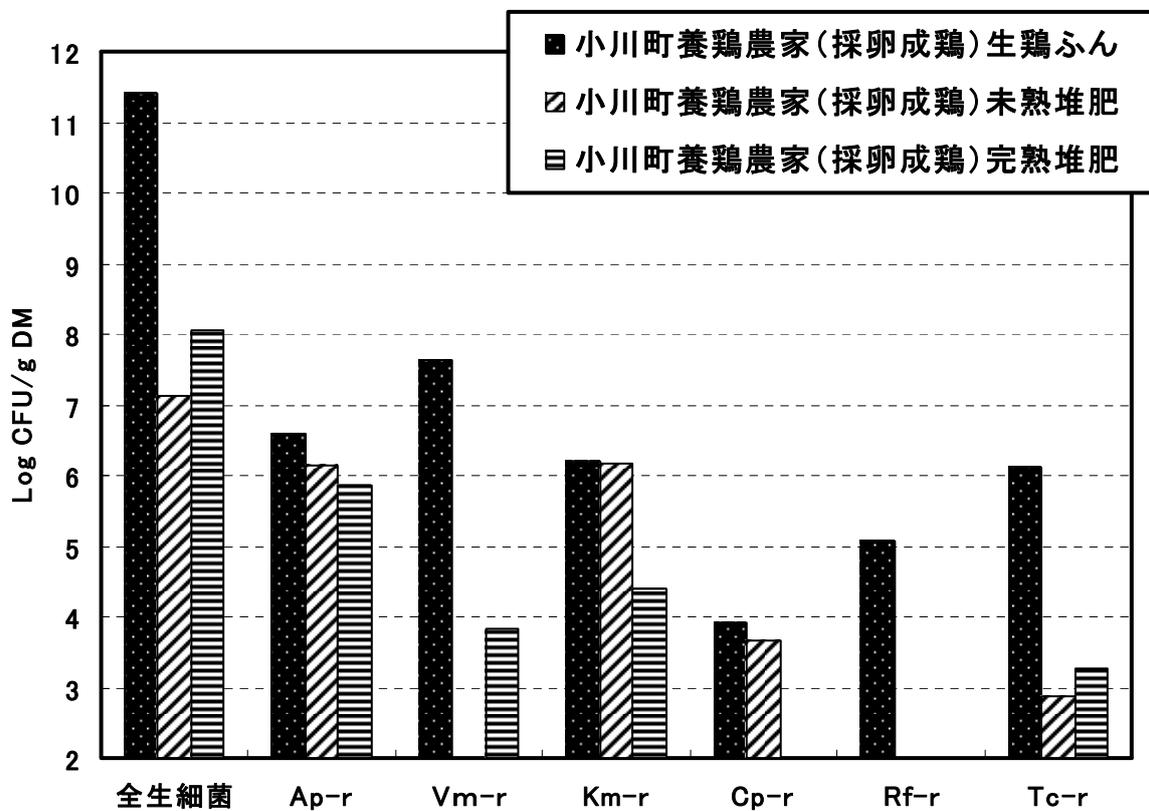


図8 鶏ふん堆肥中の6種類の抗生物質に対する耐性細菌数 (1)

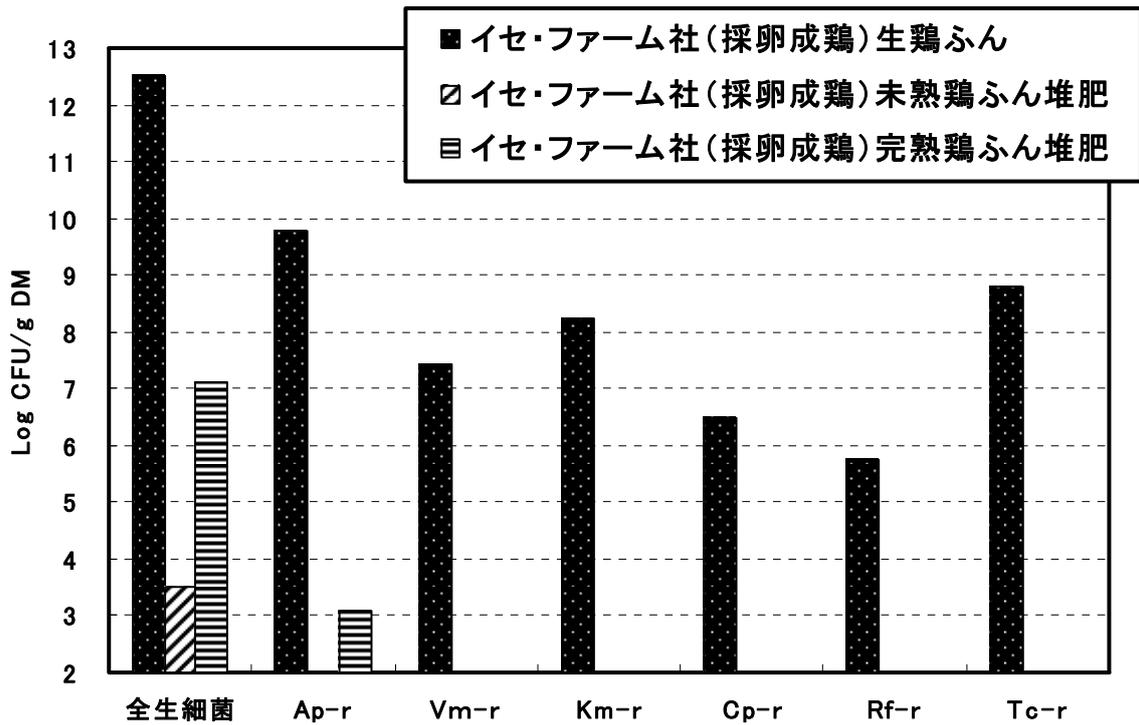


図9 鶏ふん堆肥中の6種類の抗生物質に対する耐性細菌数 (2)

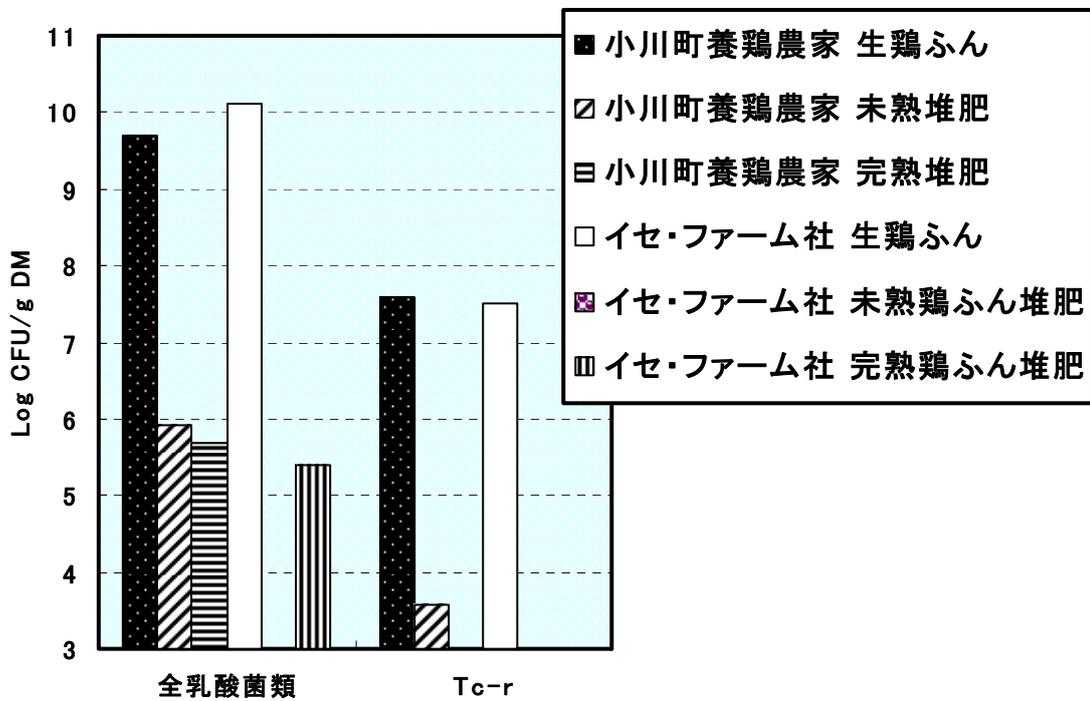


図10 鶏ふん、鶏ふん堆肥中連鎖球菌・乳酸菌類におけるテトラサイクリン耐性菌数

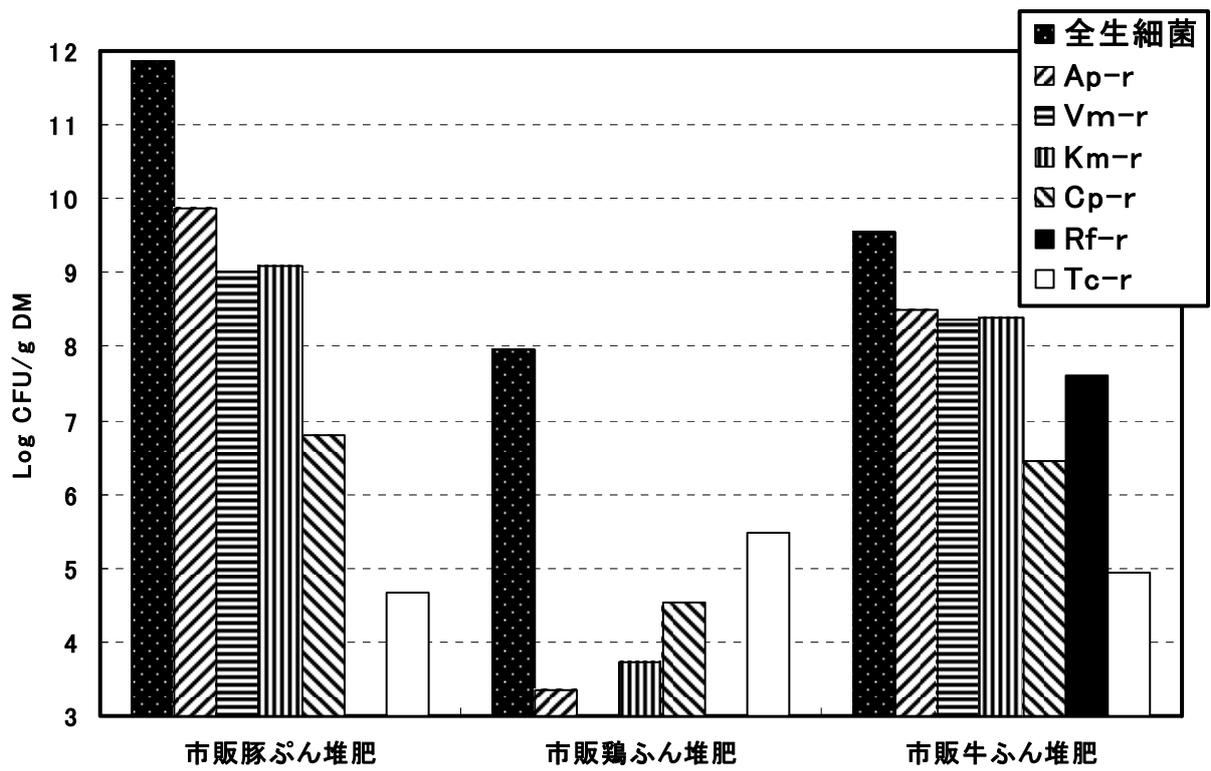


図 11 市販堆肥中の 6 種類の抗生物質に対する耐性細菌数

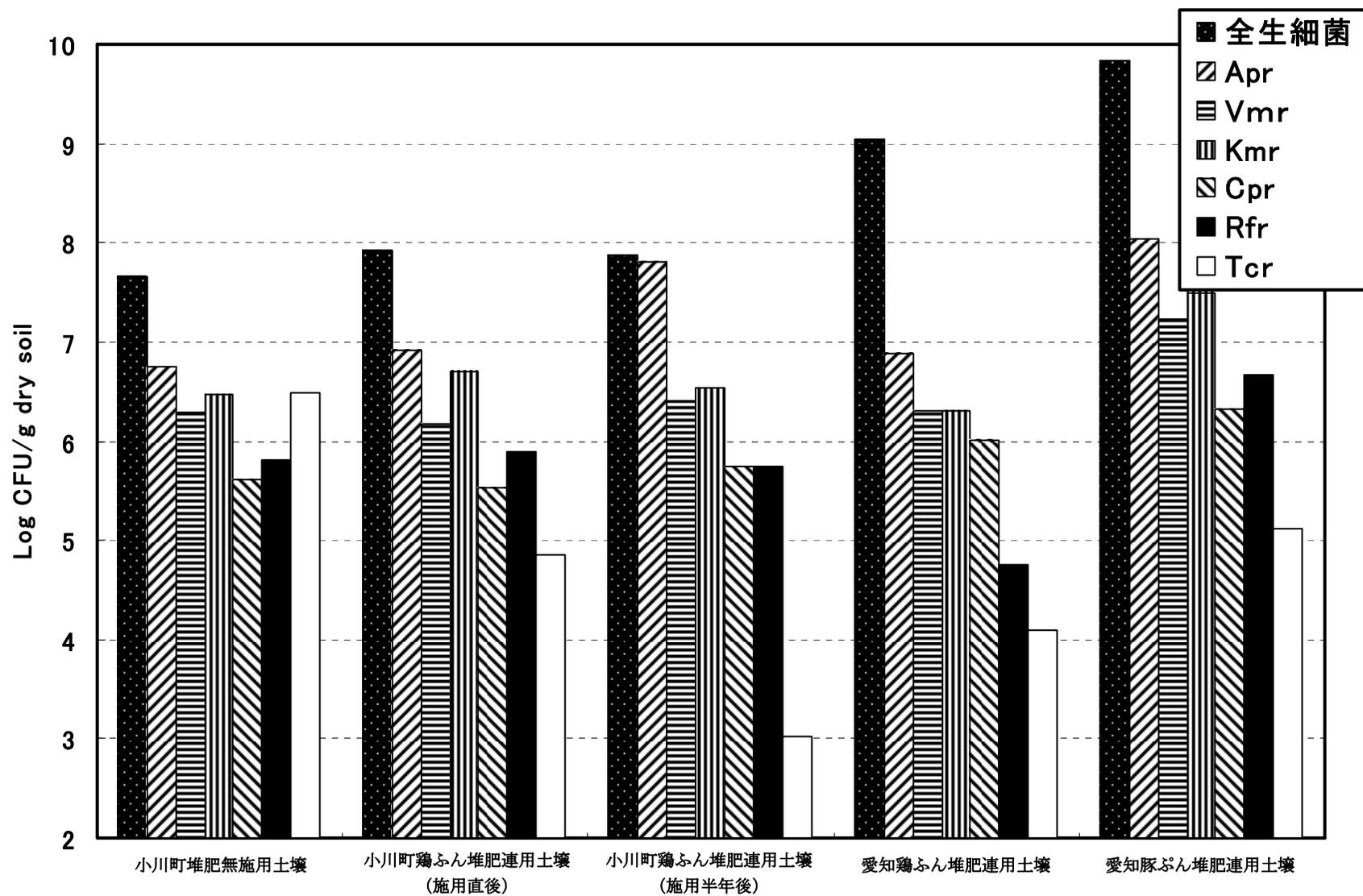


図 12 堆肥連用畑状態土壤中の抗生物質耐性細菌数

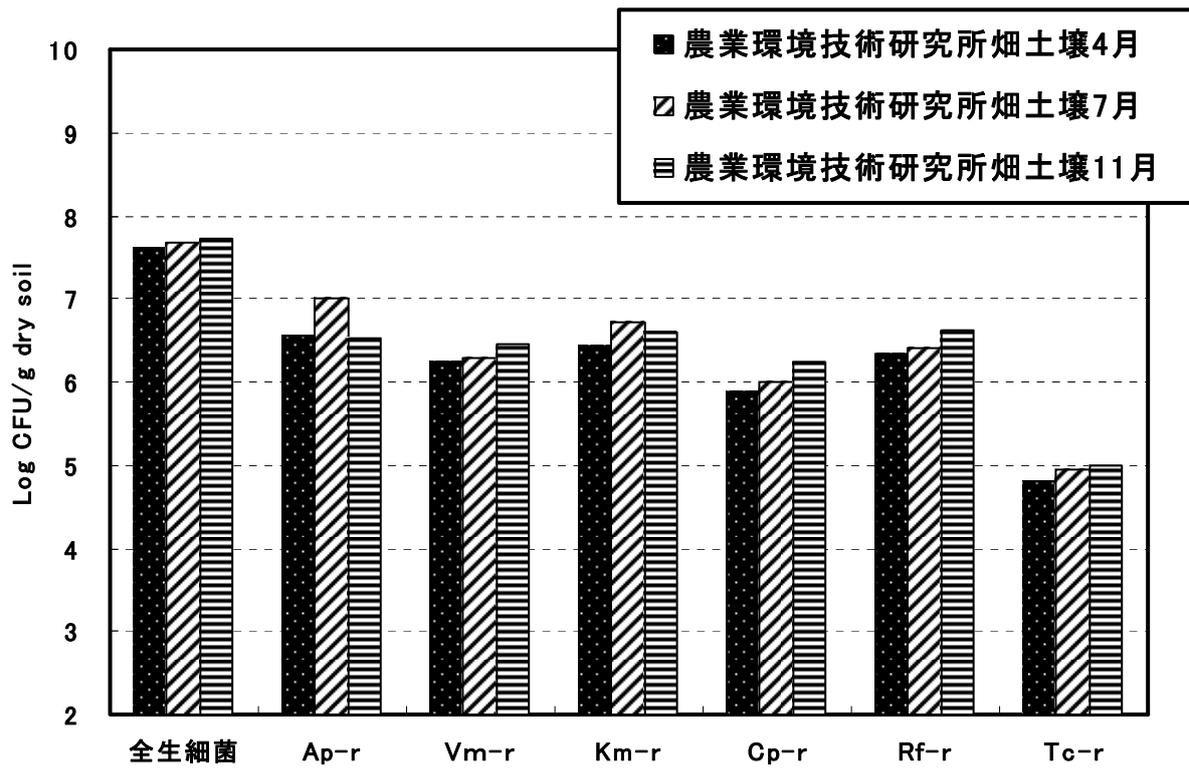


図 13 堆肥無施用畑土壤中の抗生物質耐性細菌数

(同一地点において4月、7月、11月に土壌採取した)

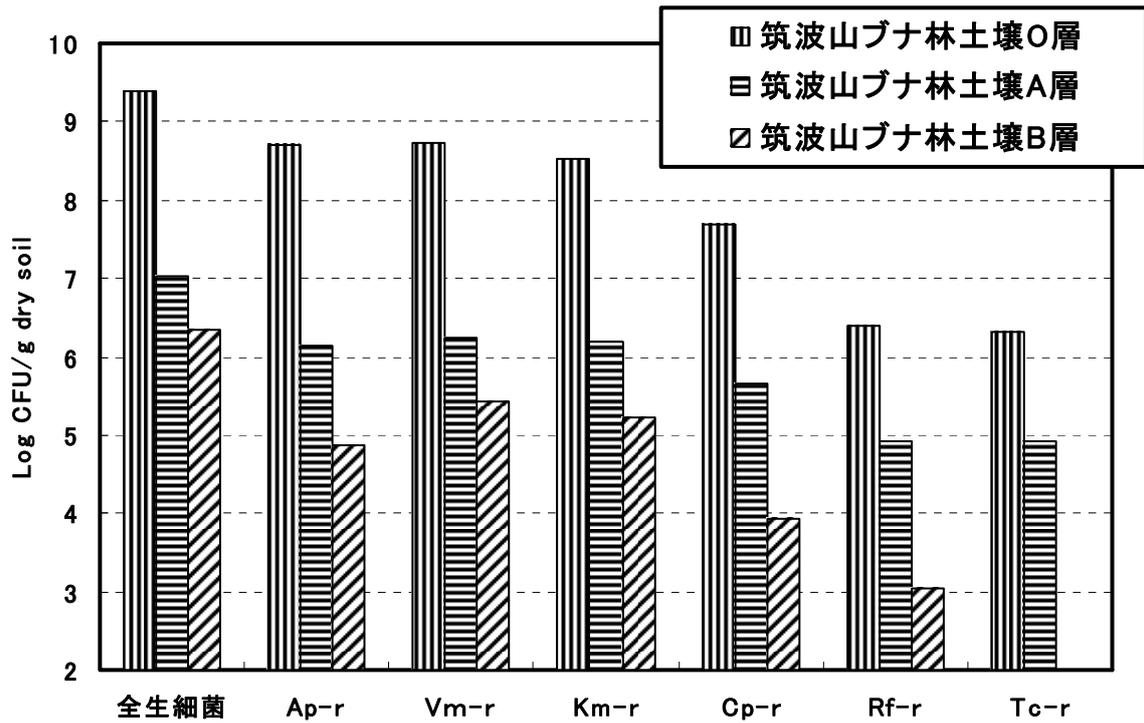


図 14 ブナ林土壌中の抗生物質耐性細菌数

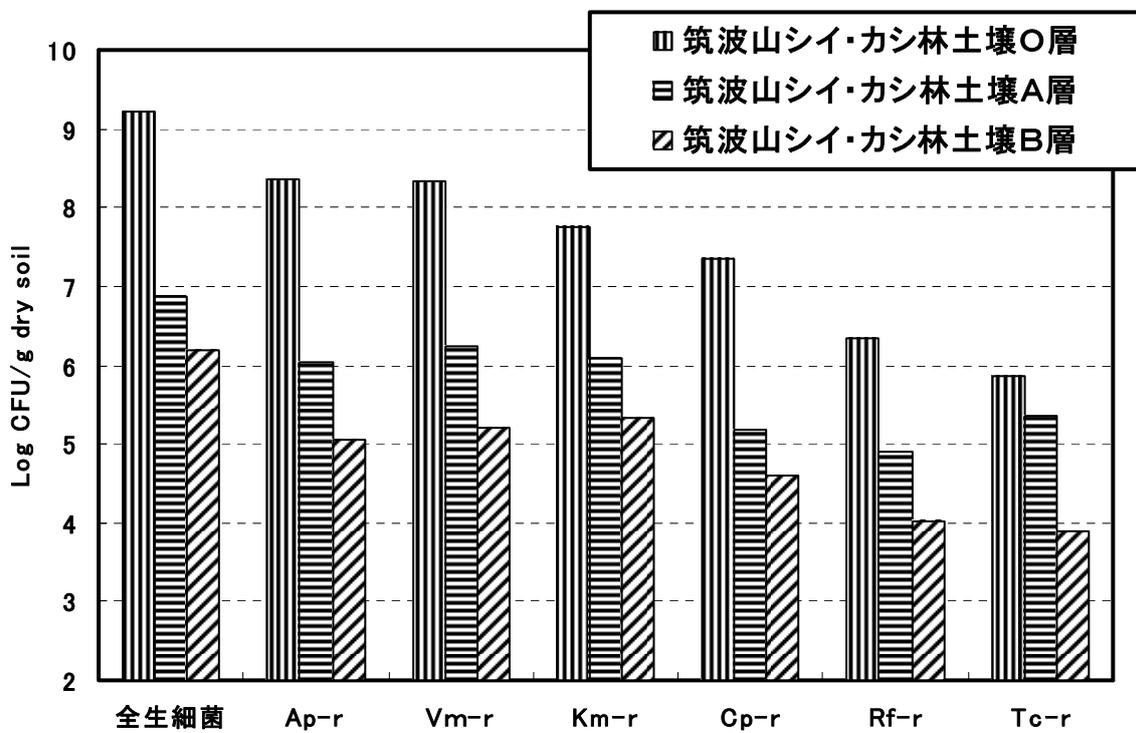


図 15 シイ・カシ林土壌中の抗生物質耐性細菌数

第3章 農業環境中における多剤耐性菌の出現

医療現場では、抗生物質多剤耐性菌が深刻な問題となっているが、農業環境中では多剤耐性菌が存在するのか、また、その多剤耐性レベルはどれくらいのものなのかを調査するために、上記の実験で豚ふん、鶏ふん、豚ふん堆肥、堆肥無施用土壌及び森林土壌から分離した6種類の抗生物質に耐性な細菌を、サンプルごとに各10株を供試し、他の5つの抗生物質に対する耐性を調査した。

3.1 材料および方法

3.1.1 供試細菌

畜産草地研究所の「LWD」子豚の豚ふんから分離した各抗生物質耐性細菌各10株、つくば市内ホームセンターで市販されていた豚ふん堆肥から分離した同各10株、農業環境技術研究所の堆肥無施用畑圃場の土壌（2002年11月採取）から分離した同各10株、筑波山のブナ林土壌のA層から分離した同各10株、合計4サンプル×6抗生物質×10株の240菌株を用いた。なお、市販豚ふん堆肥については、リファンピシン耐性細菌が検出されなかったため、リファンピシンを除く5抗生物質耐性細菌を用いた。各細菌は、以下の方法によって純化した。

- ① コロニーを計数の後、各抗生物質耐性細菌10コロニーを無作為に選び、分離培地と同種類、同濃度の抗生物質含有PTYG平板培地に白金耳で植菌した。
- ② コロニー形成後、単一コロニーを分離培地と同種類、同濃度の抗生物質含有PTYG液体培地5mlに移植し、30℃で3日間振盪培養した。
- ③ 培養液を希釈し、順次作成した希釈液を、再度分離培地と同種類、同濃度の抗生物質含有平板培地に100µl塗布し、30℃で3日間静置培養した。
- ④ ②、③の作業を再度行い、各抗生物質耐性細菌を純粋分離した。

3.1.2 供試抗生物質

家畜ふん、堆肥および土壌中の抗生物質耐性細菌の計数に用いた6種類の抗生物質のほか、畜産草地研究所の「LWD」子豚に硫酸コリスチンが飼料添加物と

して使用されていたことから、「LWD」子豚の豚ふんから得られた各抗生物質耐性細菌の多剤耐性の検討には、硫酸コリスチンも加えた。なお、コリスチンは細胞質膜傷害剤でグラム陰性細菌に有効なペプチド系抗生物質である。性状は以下の通りである。

3.1.3 使用培地

PTYG 培地に各抗生物質を 50 µg/ml 加えた寒天平板を使用した。

3.1.4 多剤耐性の検討

単離した各抗生物質耐性細菌各 10 株をそれぞれ他の 5 種類（畜産草地研究所の「LWD」子豚の豚ふんの抗生物質耐性細菌においてはコリスチンも含めて 6 種類）の抗生物質含有平板培地に移植し、30°C で培養し、24 時間後の生育の有無により多剤耐性を検討した。

3.2. 結果

3.2.1 豚ふん中の抗生物質耐性細菌の多剤耐性

豚ふんについては、畜産草地研究所の LWD 子豚（飼料にエフロトマイシン、硫酸コリスチンを添加）のふんから分離された耐性株について調べた（図 16、表 3）。

その結果、分離された細菌の多くが多剤耐性を有していることと、アンシピリン耐性株と他の 5 つの抗生物質耐性株との間には、多剤耐性の点でかなりの違いがあることが注目された。すなわち、Ap 耐性株は、10 株中 8 株が他の 1 剤に、1 株が他の 2 剤に、1 株が 3 剤に耐性を示した。そして、Vm、Km、Cp、Rf、Tc 耐性株は、10 株全てが他の 5 剤にも耐性を有していた。

また、畜産草地研究所の子豚のふんから分離した菌株については、飼料に添加されていた、グラム陰性細菌に特異的に作用するコリスチンに対する耐性の有無も調べた。その結果、Ap 耐性の 10 株は全て感受性を示し、他の Vm、Km、Cp、Rf、Tc 耐性株は 10 株全てが耐性を示した。

3.2.2 豚ふん堆肥中の抗生物質耐性細菌の多剤耐性

豚ふん堆肥については、ホームセンターで市販されていた豚ふん堆肥から分離された耐性株について調べた。Rf 耐性株については試料から検出されなかったため、これを除く他の抗生物質耐性株について調査した。その多くが多剤耐性を有し、Rf を除く他の抗生物質 4 剤全てにも耐性な株が多く認められた。

Ap 耐性株は、3 株が他の 1 剤に、4 株が 2 剤に、2 株が 3 剤に、1 株が 4 剤に耐性を有し、Vm 耐性株は、10 株全てが他の 4 剤に耐性を有し、Km 耐性株は、4 株が他の 3 剤に、6 株が 4 剤に耐性を有し、Cp 耐性株は、4 株が他の 1 剤に、1 株が 3 剤に、4 株が 4 剤に耐性を有し、Tc 耐性株は、10 株全てが他の 4 剤に耐性を有していた。

3.2.3 堆肥無施用畑土壌中の抗生物質耐性細菌の多剤耐性

農業環境技術研究所の堆肥無施用畑土壌から 11 月に分離した耐性株について調べた。その結果、家畜ふん堆肥を施用した履歴がないにもかかわらず、耐

性株の多くが多剤耐性を示すことが認められた。

Ap 耐性株は、3 株が他の 2 剤に、6 株が 3 剤に、1 株が 4 剤に耐性を有し、Vm 耐性株は、2 株が他の 3 剤に、8 株が 5 剤に耐性を有し、Km 耐性株は、4 株が他の 4 剤に、6 株が 5 剤に耐性を有し、Cp 耐性株は、3 株が他の 1 剤に、3 株が他の 2 剤に、3 株が 3 剤に、1 株が 4 剤に耐性を有し、Rf 耐性株は、6 株が他の 4 剤に、4 株が 5 剤に耐性を有し、Tc 耐性株は、10 株全てが他の 5 剤に耐性を有していた。

3.2.4 森林土壌中の抗生物質耐性細菌の多剤耐性

筑波山ブナ林の A 層から分離した耐性株について調べた。その結果、人為の影響がほとんどないと考えられる土壌からの分離株であるにもかかわらず、耐性株の多くは多剤耐性を示し、他の 5 剤全てにも耐性な株が少なからず認められた。

Ap 耐性株は、1 株が他の 1 剤に、5 株が 2 剤に、3 株が 3 剤に、2 株が 4 剤に耐性を有し、Vm 耐性株は、3 株が他の 1 剤に、5 株が他の 2 剤に、1 株が 3 剤に、1 株が 4 剤に耐性を有し、Km 耐性株は、2 株が他の 1 剤に、2 株が 2 剤に、4 株が 3 剤に、1 株が 4 剤に、1 株が 5 剤に耐性を有し、Cp 耐性株は、5 株が他の 3 剤に、2 株が他の 4 剤に、3 株が 5 剤に耐性を有し、Rf 耐性株は、3 株が他の 4 剤に、7 株が 5 剤に耐性を有し、Tc 耐性株は、1 株が他の 3 剤に、6 株が他の 4 剤に、3 株が 5 剤に耐性を有していた。

3.3 考察

医療現場では、メチシリン耐性ブドウ球菌（MRSA）、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）、病原性大腸菌、*Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium DT104 などが深刻な問題となっている^{43, 92)}。特に、*S. enterica* serovar Typhimurium DT104 は 1988 年英国でウシから検出が報告され、その後、家禽、ブタ、ウマからも分離された。この菌株は、アンピシリン、クロラムフェニコール、ストレプトマイシン、サルファ剤、テトラサイクリンの 5 剤に耐性を持っていることが明らかにされている。わが国でも今後、人畜共通感染症として注意が必要とされている²¹⁾。また、水産現場でも α 溶血性連鎖球菌症に感染した養殖ブリから分離された *Lactococcus garvieae* がテトラサイクリン系、マクロライド系、リンコマイシンに対し多剤耐性を示したことが報告されている⁴²⁾。

多剤耐性を検討した本実験結果から、豚ふん、豚ふん堆肥、堆肥無施用畑土壌および森林土壌から分離した 6 種類のいずれかの抗生物質に耐性を持つ細菌の多くは、他のいくつかの抗生物質に対しても耐性を持っていることが明らかになった（図 16、表 3）。特に、豚ふんから分離されたバンコマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコール、リファンピシンおよびテトラサイクリンに耐性な細菌は、それぞれ 10 株全てが他の 5 剤にも耐性を示した。また、豚ふん堆肥から分離されたバンコマイシン耐性細菌も 10 株全てが他の 4 剤に耐性を示した。豚ふん、豚ふん堆肥および堆肥無施用畑土壌から分離されたテトラサイクリン耐性細菌は、それぞれ 10 株全てが他の 5 薬剤にも耐性を示したが、森林土壌から分離されたテトラサイクリン耐性細菌は他の 3 剤または 4 剤にしか耐性を持っていない株も認められた。しかし、多剤耐性細菌が人為の極めて少ないと考えられる森林土壌からも分離されたことから、自然界にもすでに多剤耐性細菌は存在していることが明らかとなった。しかし、多剤耐性細菌の割合が森林土壌では低く、家畜ふん、家畜ふん堆肥や畑土壌で高かったことから、家畜飼料への抗生物質添加という人為が多剤耐性細菌の出現を加速していると推定される。

多数の薬剤耐性遺伝子がゲノム上の抗生物質耐性アイランドに集中的に乗っ

ているため、遺伝子転移の際、隣の抗生物質耐性遺伝子までもが一緒に転移していることが多剤耐性化の原因ともいわれている⁴⁵⁾。本実験で、テトラサイクリン耐性細菌が他の5剤にも耐性という高度な多剤耐性を示すことが確認された。これは、テトラサイクリン系抗生物質が、他の多くの薬剤に耐性な細菌にも有効であるために多用された結果、テトラサイクリン耐性細菌が他の耐性細菌にも接触する機会が多くなり、多くの耐性遺伝子を獲得することができたのではないかと推測される。

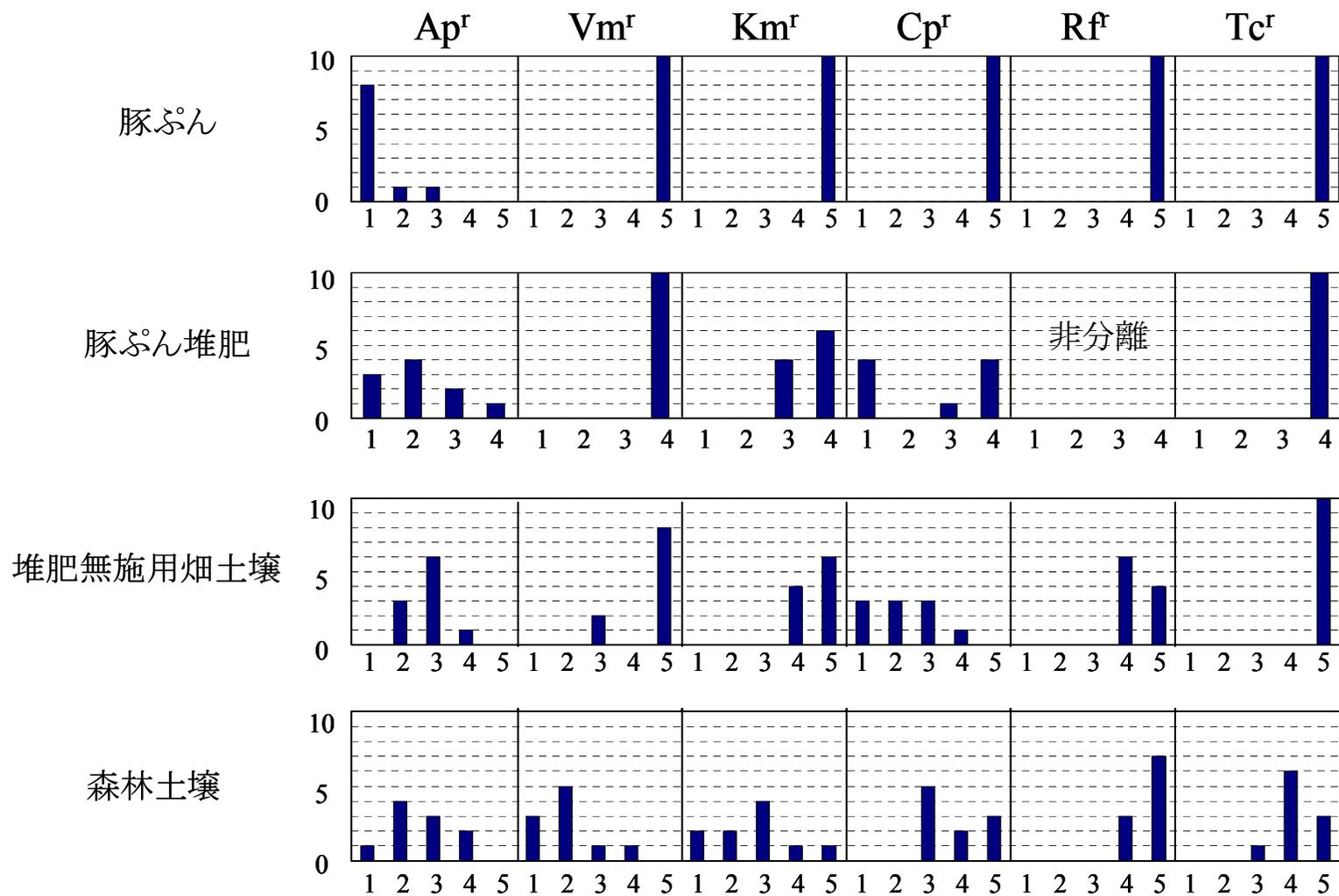


図 16 抗生物質耐性細菌株の多剤耐性
(横軸の数値は耐性の示された薬剤数)

第4章 農業環境中のテトラサイクリン耐性細菌の多様性

第2章で行った 50 µg/ml のテトラサイクリン含有寒天培地上に成育したコロニーを単離・純化することにより、豚ふんから 74 株、鶏ふんから 102 株、豚ふん堆肥から 21 株、鶏ふん堆肥から 23 株、牛ふん堆肥から 18 株、豚ふん堆肥連用土壌から 9 株、堆肥無施用畑土壌から 32 株、森林土壌から 44 株、合計 350 株のテトラサイクリン耐性菌を分離した。これらの分離株の系統解析により、テトラサイクリン耐性細菌の多様性を調査した。

4.1 材料および方法

4.1.1 テトラサイクリン耐性細菌の単離

- ⑤ コロニー数を計測の後、各抗生物質耐性細菌 10 コロニーを無作為に選び、PTYG 培地分離株は 50 µg/ml のテトラサイクリン含有 PTYG 平板培地に白金耳で植菌し、30 °C で 3 日間生育させた。
- ⑥ EF 培地、Desoxycholate 及び MRS 培地分離株は、50 µg/ml のテトラサイクリン含有 LB 培地 (Tryptone 10.0 g、Yeast extract 5.0 g、NaCl 10.0 g、Agar 15.0 g/L) に白金耳で植菌し、37 °C で 24 時間生育させた。
- ⑦ コロニー生育後、単コロニーを分離培地と同種類の、テトラサイクリン含有液体培地 5 ml に移し、一次分離と同温度・同時間振盪培養した。
- ⑧ 培養液を希釈し、順次作成した希釈液を、再度一次分離培地と同平板培地に 100 µl を塗布し、同温度・同時間静置培養した。
- ⑨ ③、④の作業をさらに 2 回行い、各抗生物質耐性細菌を純粋分離した。

4.1.2 テトラサイクリン耐性細菌からの DNA 抽出

4.1.1 の手順によって分離されたテトラサイクリン耐性細菌 350 株から CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide)法⁷⁷⁾によってゲノム DNA を抽出した。

- ① 菌体培養液 1.5 ml を 4 °C、8,000 rpm で 2 分間遠心分離した。
- ② ピペットで上清を吸い上げ菌体のみを回収した。
- ③ 菌体ペレットに 567 µl の TE バッファー (10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA) を

加えて懸濁した。

- ④ 1 mg のリゾチームを加え、37 °C で 30 分間インキュベートした。
- ⑤ 30 μ l の 10 % SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、3 μ l のプロテナーゼ K (1 mg/ml) を加え、軽く懸濁後、37°C で 1 時間インキュベートした。
- ⑥ 5 M NaCl を 100 μ l 加えて懸濁した。
- ⑦ CTAB/NaCl 溶液 (0.7 M NaCl、10 % (w/v) 臭化セチルトリメチルアンモニウム) を 80 μ l 加え、懸濁後、65 °C で 10 分間インキュベートした。
- ⑧ 600 μ l の CI (24:1 クロロホルム・イソアミルアルコール) を加え、20 秒間よく懸濁し、室温、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。
- ⑨ 上清を新しいチューブに移した。
- ⑩ 600 μ l の PCI (25: 24: 1 フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール) を加え、20 秒間よく懸濁し、室温、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。
- ⑪ 上清を新しいチューブに移した。
- ⑫ 300 μ l のイソプロパノールを加え、DNA の存在を確認しながらチューブを転倒した。
- ⑬ 室温、15,000 rpm で 15 分間遠心分離した。
- ⑭ 上清を取り除き、500 μ l の 70 % エタノールを加え、DNA ペレットを洗浄した。
- ⑮ 4 °C、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。
- ⑯ 真空デシケータでエタノールを完全に除去し、ペレットを乾燥させた。
- ⑰ ペレット状 DNA を 100 μ l の TE バッファーに溶解させ、分光光度計 (BECKMAN 社製) で DNA 濃度を測定するとともに、1 %アガロースゲル中で 100 V、30 分間電気泳動を行い、UV 照射により得られた DNA の分子量を確認した。
- ⑱ 後の PCR のために 1 mg/ml に調製したテンプレート DNA を作成した。

4.1.3. 16S rRNA gene の増幅

16S rRNA gene (16S rDNA gene) 増幅のために、63f (5' - CAGGCCTAACACATGCAAGTC - 3')、1387r (5' - GGGCGGWGTGTACAAGGC - 3') の各プライマーを用いた⁴⁸⁾。PCR 反応液は 1.0 U の Ex *Taq* polymerase (Takara,

Shiga, Japan)、5 μ l の 10 \times Ex *Taq* reaction buffer (Takara)、10 nmol の dNTPs、1 nmol のテンプレート DNA、及び 25 pmol の各プライマーを混合し、全量 50 μ l とした。反応は I-Cycler (Bio Rad, Hercules, USA) を用いた。反応条件は初期変性 94°C で 30 秒、アニーリング 58°C で 30 秒、伸長 72°C で 30 秒を 30 サイクル、final extension を 72°C で 10 分行った。

PCR 産物は分光光度計で濃度を測定するとともに、1.2 %アガロースゲル中で 100 V、30 分間電気泳動を行い、UV 照射により得られた産物の分子量を確認した。また、PCR 産物の精製のために、Exo-SAP IT (GE Healthcare Bio-Sciences Corp. Piscataway, USA) を 1/10 量添加し、37°C、15 分間消化し、エキソヌクレアーゼによるプライマー分解とシュリンプアルカリフォスファターゼによる dNTP の脱リン酸化を行い、その後 80°C、15 分間酵素を失活させた。

4.1.4. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析

精製した PCR 産物を制限酵素 *Hae*III (Toyobo, Osaka, Japan) と *Rsa*I (Toyobo) で消化し、クラスター分類を行った⁵³⁾。反応はそれぞれ、Buffer (*Hae*III は 10 \times M Buffer、*Rsa*I は 10 \times L Buffer) 1 μ l、制限酵素 0.2 μ l、PCR 産物 2 μ l を混合した全量 10 μ l で行った。37°C、2 時間の反応終了後、生成物 5 μ l を 2 %アガロースゲル中で 100 V、30 分間電気泳動を行い、UV 照射により得られた遺伝子断片のバンドの位置や数の違いから目視によってクラスター分類を行った。

3.1.5. シークエンス解析

3.1.4 の RFLP 解析で得られたグループの代表株をシークエンス解析した。シークエンス反応は、Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行った。プライマーは 3.1.3. で 16S rRNA gene の増幅に使用した 63f と 1387r に加え、530f (5'-GTGCCATCCAGCCGCGG-3')⁹⁷⁾ を用いて、1 テンプレート DNA に対し 3 種類のプライマーでそれぞれ行った。反応液は Sequence Mix 1 μ l、Big Dye 5 \times Buffer 1.5 μ l、2.5 pmol/ μ l のプライマー溶液 0.5 μ l、PCR 産物 DNA を 0.25 μ l 加え、全量 10 μ l とした。反応条件は初期変性 95°C、30 秒、アニーリング 50°C、15 秒、伸長 60°C、4 分を 25 サイクル行った。得られた反応物は、QIAquick 96 PCR

Purification Kit (QIAGEN, GmbH, Germany)で精製し、ABI PRISM 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)によって解析した。シーケンスデータはDNASIS Pro (Hitachi Software Engineering Co., Tokyo, Japan)内で編集し、Contig Managerで配列の連結を行い、およそ 1,200bpの塩基配列を得た。これらをDDBJ database (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-e.html>) 内BLAST programで相同性検索を行った。本研究で得られた 16S rRNA geneの配列情報は、DDBJ databaseに登録された。アクセッションナンバーはAB272318 からAB272386 である。

4.2 結果

豚ふんから 74 株、鶏ふんから 102 株、豚ふん堆肥から 21 株、鶏ふん堆肥から 23 株、牛ふん堆肥から 18 株、豚ふん堆肥連用土壌から 9 株、堆肥無施用畑土壌から 32 株、森林土壌から 44 株、合計 350 株のテトラサイクリン耐性菌を分離した。350 株は、RFLP によりバンドの位置や数の違いから 69 グループに分けられた (表 4)。およそ 1,200 bp のダイレクトシーケンスの相同性検索の結果は、グループ 27 が *Kurthia gibsonii* に 96.7 %、グループ 53 が *Alcaligenes* sp. に 95.8 %、グループ 54、56 が *Bordetella* sp. にそれぞれ 96.1 と 96.8 %、グループ 55 が *Clostridium* sp. に 94.5% の相同性を示した以外は、全て 97 % 以上の相同性であった (表 5)。

69 のグループは 28 細菌属に分類された。そのうち、グラム陽性細菌は 8 属、グラム陰性細菌は 20 属であった (表 6)。これらのグループの代表株の塩基配列は、DDBJ database に登録された。アクセッション番号は表 7 に示す。

4.2.1 豚ふん分離株

豚ふんから分離された 74 株は、22 株が *Enterococcus faecalis*、16 株が *Serratia marcescens*、15 株が *Escherichia coli*、7 株が *Proteus mirabilis*、2 株が *Kurthia gibsonii*、2 株が *Acinetobacter* sp.、1 株が *Staphylococcus epidermidis*、1 株が *Staphylococcus saprophyticus* に最も近縁であった (表 8)。3 株が *Kurthia gibsonii* に 96.7% の相同性であった。

4.2.2 鶏ふん分離株

鶏ふんから分離された 102 株は、38 株が *Enterococcus faecalis*、29 株が *Escherichia coli*、10 株が *Pediococcus* sp.、8 株が *Kurthia gibsonii*、6 株が *Providencia heimbachae*、3 株が *Staphylococcus saprophyticus*、2 株が *Alcaligenes faecalis*、2 株が *Proteus mirabilis*、1 株が *Alcaligenes* sp.、1 株が *Kurthia zopfii*、1 株が *Vagococcus fluvialis* に最も近縁であった (表 8)。

4.2.3 豚ふん堆肥分離株

豚ふん堆肥から分離された 21 株は、9 株が *Escherichia coli*、3 株が *Ochrobactrum grignonense*、3 株が *Staphylococcus saprophyticus*、3 株が *Staphylococcus xylosu*、1 株が *Bacillus* sp.、1 株が *Bradyrhizobium elkanii*、1 株が *Bradyrhizobium* sp. に最も近縁であった (表 8)。

4.2.4 鶏ふん堆肥分離株

鶏ふん堆肥から分離された 23 株は、5 株が *Alcaligenes* sp.、4 株が *Staphylococcus xylosus*、3 株が *Bordetella* sp.、3 株が *Staphylococcus equorum*、1 株が *Bradyrhizobium elkanii* に最も近縁であった (表 8)。1 株が *Alcaligenes* sp. に 95.8 %、6 株が *Bordetella* sp. に 96.1-98.0 %、3 株が *Clostridium* sp. に 94.5 % の相同性であった。

4.2.5 牛ふん堆肥分離株

牛ふん堆肥から分離された 18 株は、16 株が *Serratia marcescens*、2 株が *Ochrobactrum* sp. に最も近縁であった (表 8)。

4.2.6 堆肥施用土壌分離株

堆肥施用土壌から分離された 36 株は、8 株が *Burkholderia cenocepacia*、6 株が *Afipia massiliensis*、5 株が *Staphylococcus epidermidis*、4 株が *Burkholderia cepacia*、4 株が *Flexibacter* sp.、4 株が *Nordella oligomobilis*、4 株が *Serratia marcescens*、1 株が *Rhodopseudomonas* sp. に最も近縁であった (表 8)。

4.2.7 堆肥無施用土壌分離株

堆肥無施用土壌から分離された 32 株は、1 株が *Bradyrhizobium elkanii*、14 株が *Burkholderia cenocepacia*、12 株が *Flexibacter* sp.、2 株が *Lysobacter gummosus*、2 株が *Variovorax paradoxus* に最も近縁であった (表 8)。

4.2.8 森林土壌分離株

森林土壌から分離された 44 株は、11 株が *Burkholderia cepacia*、10 株が

Burkholderia cenocepacia、5株が *Dyella koreensis*、5株が *Luteibacter rhizovicinus*、3株が *Bradyrhizobium* sp.、3株が *Flexibacter* sp.、1株が *Inquilinus limosus*、1株が *Lysobacter* sp.、1株が *Pandoraea* sp.、1株が *Serratia marcescens*、1株が *Streptomyces olivaceus* に最も近縁であった（表 8）。

4.3 考察

69 のグループは 28 細菌属に分類された。そのうち、グラム陽性細菌は 8 属、グラム陰性細菌は 20 属であった (表 6)。16S rDNA シークエンスによって得られたおよそ 1,200 bp の塩基配列をもとに、DDBJ database 内 BLAST program で相同性検索を行った結果、69 株中 5 株が 94.5~96.9 % の相同性であった。97 % 以上の相同性が得られたものについては、分子系統学上同種である可能性が高いと判断した⁸¹⁾。豚ふん分離株 SF7 は swine fecal bacterium を生物名として配列を DDBJ に登録した。また同様に、鶏ふん堆肥分離株 MUC1、MUC2、MUC3、MUC7 は poultry manure bacterium を生物名として登録した (表 7)。また、94.5 ~96.9 % の相同性であった 10 株は同属である可能性が高いと判断し、以後、本論文内では、SF5、SF7、SF10 株は *Kurthia* sp.、MUC1 株は *Alcaligenes* sp.、MUC2、MUC4、および MUC7 株は *Bordetella* sp.、MUC3、MUC5、および MUC6 株は *Clostridium* sp. に近縁な細菌として扱うこととした。

4.3.1 家畜ふん分離株はグラム陽性細菌と Enterobacteriaceae 科が大半

家畜ふん分離株 176 株は、95 株 (54.0 %) がグラム陽性細菌、81 株 (46.0 %) がグラム陰性細菌であった。グラム陽性菌が多く検出されたのは、乳酸菌である *Enterococcus*、*Pediococcus* および *Vagococcus* と、バチルス属である *Kurthia*、*Staphylococcus* が存在したためと考えられる (表 6)。*Acinetobacter*、*Serratia* は鶏ふんから検出されず、豚ふんからのみで見られた。また、*Alcaligenes*、*Pediococcus*、*Vagococcus* は豚ふんから検出されず、鶏ふんのみに見られた。家畜ふん分離株からは、 α -proteobacteria は検出されなかった。

豚ふん中で優先していた細菌種は *Enterococcus faecalis* (29.7 %)、*Serratia marcescens* (21.6 %)、*Escherichia coli* (20.3 %) にそれぞれ近縁種であった。通常の離乳子豚の腸内細菌叢は、40 % 程度が Enterobacteriaceae 科、20 % 程度が Bacteroides 科、20 % 程度が Clostridium 科であるとされている⁸⁹⁾。本実験において、家畜ふんから多く分離されるであろうと想定した Bacteroides 属は嫌気要求度が高いため、排泄されてから時間が経過し酸素に接触した糞便では、検出されなかった可能性が高いと考えられる。

鶏ふん中で優占していた細菌種は *Enterococcus faecalis* の近縁種 (37.3 %)、*Escherichia coli* の近縁種 (28.4 %)、*Pediococcus sp.* の近縁種 (9.8 %) であった。通常の鶏の腸内細菌叢は出生直後には乳酸球菌が 60 %、好気性菌が 40 %程度であり、成長に伴い乳酸菌以外の嫌気性菌が増加し、40 日齢では乳酸桿菌が 10 %、その他は乳酸菌以外の嫌気性菌が 90 %程度になるとされている。多くの嫌気性菌が排泄後に生存できないと考えられるが、バチルス属や *Alcaligenes* 属はその後も生き残るのではないかと推察された。

家畜ふん分離株 176 株中、171 株 (97.2 %) がグラム陽性細菌と *Enterobacteriaceae* 科で構成されていることが特徴的であり、その傾向は豚ふんと鶏ふんに共通であった。

4.3.2 家畜ふん堆肥分離株は家畜由来細菌と環境細菌が混在

家畜ふん堆肥分離株 62 株は、17 株 (27.4 %) がグラム陽性細菌、45 株 (72.6 %) がグラム陰性細菌であった。*Bacillus* と *Escherichia* は豚ふん堆肥からのみ検出され、*Alcaligenes*、*Bordetella*、*Clostridium* は鶏ふん堆肥からのみ検出され、*Serratia* は牛ふん堆肥からのみ検出された (表 8)。家畜ふん堆肥から分離されたグラム陽性細菌は *Bacillus* 属と *Staphylococcus* 属であった。また未熟鶏ふん堆肥分離株 MUC3 は *Clostridium sp.* と 94.5 % の相同性を示し、*Clostridium* 属であると考えられる。これらの細菌は環境中の多くの分野から分離されており、*Bacillus* 属細菌は絶対もしくは通性好気性の芽胞形成細菌であり、多くが土壌由来とされており⁵⁹⁾、*Clostridium* 属細菌は偏性嫌気性の胞形成細菌であり、未熟堆肥から分離されたため、家畜ふん由来である可能性が高い。*Staphylococcus* 属細菌は偏性嫌気性の非芽胞形成細菌であり、ヒトや動物由来であることが多いが、十分に完熟した鶏ふん堆肥から分離されており、由来は特定できない。

豚ふん堆肥中で優占していた細菌種は *Escherichia coli* (42.9 %) の近縁種であった。9 株全てつくば市養豚農家未熟堆肥から分離された菌株であり、堆肥化が進んでいないために、家畜腸内細菌が残存していたと考えられる。

鶏ふん堆肥中で優占していた細菌種は *Alcaligenes sp.* (26.1 %) と *Bordetella sp.* (26.1 %) にそれぞれ近縁の種であった。これらの細菌は、 β -proteobacteria に属し、偏性好気性細菌であり、環境中に広く分布する種と親動物性の種がある

と報告されている⁵⁹⁾。これらは、5株が小川町おがくず鶏ふん堆肥から分離され、7株が小川町養鶏農家未熟堆肥から分離されている。小川町おがくず鶏ふん堆肥は、「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」の施行前に採取した野積みの堆肥であり（第2章、写真4）、切り返しなど十分な堆肥化が行われていないと考えられた。そのため、これらの優占種は未熟堆肥に特徴的な細菌である可能性が高いと考えられた。

牛ふん堆肥中で優占していた細菌種は *Serratia marcescens* の近縁種（88.9%）であった。*Serratia* は、Enterobacteriaceae 科で、主に動物や臨床から分離される腸内細菌であるが、院内感染などの原因菌としても知られており⁷²⁾、環境中に広く分布しているため、由来は特定できない。

家畜ふん堆肥分離株は家畜由来と考えられる細菌と環境細菌が混在しており、両者の接触が起きている場であると考えられ、遺伝子伝播などのコミュニケーションが行われている可能性が高いと推測された。

4.3.3 土壌分離株の構成種は非常に多様

土壌分離株 112 株は、6 株（5.4%）がグラム陽性細菌、106 株（95%）がグラム陰性細菌であった。*Afipia*、*Nordella*、*Rhodopseudomonas* および *Staphylococcus* は、堆肥施用土壌からのみ検出された。また、*Variovorax* は堆肥無施用土壌からのみ検出された。さらに、*Dyella*、*Inquilinus*、*Luteibacter*、*Pandora* および *Streptomyces* は森林土壌からのみ検出された（表8）。小川町前年鶏ふん堆肥施用土壌から分離された5株の *Staphylococcus epidermidis* とシイ・カン林土壌B層から分離された1株以外は、全てグラム陰性細菌であった。

堆肥施用土壌中では、特徴的に優占していた細菌種はなく、*Burkholderia cenocepacia* の近縁種（22.2%）、*Afipia massiliensis* の近縁種（16.7%）、*Staphylococcus epidermidis* の近縁種（13.9%）、*Burkholderia cepacia* の近縁種（11.1%）、*Flexibacter* sp. の近縁種（11.1%）、*Nordella oligomobilis* の近縁種（11.1%）、*Serratia marcescens* の近縁種（11.1%）など、多様な細菌が検出された。この中で、*Serratia* と *Staphylococcus* は、家畜ふんや堆肥からも検出され、堆肥無施用土壌からは検出されなかったことから、家畜由来の細菌である可能性が示唆されたが、*Serratia* は森林土壌からも1株であるが検出されており、

また、この2種の細菌は、様々な環境中からも検出されている報告があり⁵⁹⁾、明確な由来は不明であった。

堆肥無施用土壤中では優占していた細菌種は、*Burkholderia cenocepacia* の近縁種 (43.8%)、*Flexibacter* sp. の近縁種 (37.5%) であった。これらの細菌種は、他の土壌分離株からも多く検出されたことから、一般的な土壌細菌の細菌叢を示していたと考えられた。*Burkholderia* は、土壌細菌あるいは植物病原菌であることが良く知られているが、*Flexibacter* は近年、多環芳香族炭化水素分解微生物として注目を集めている⁹¹⁾。

森林土壌分離株中で優占していた細菌種は、*Burkholderia cepacia* の近縁種 (25.0%)、*Burkholderia cenocepacia* の近縁種 (22.7%) であった。*Burkholderia cenocepacia* は *Burkholderia cepacia* の複合種である⁸⁸⁾ ことを考慮すると、分離株の半数近くは *Burkholderia* 属で占められていたと推定される。しかしその一方、 α 、 β 、 γ -proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria、Sphingobacteria と多くの属の細菌が検出され、人為の影響が極めて少ないと考えられる環境の土壌中の微生物叢は、極めて多様性が高いことが明らかになった。

表 4 RFLP によるテトラサイクリン耐性分離株のグループ分け

Group	Isolates									
1	KA1	KA7	KA8	KA10	KJ4	KJ5	AS2	AS7	1-A-1	1-A-3
2	KA5	KA6	KJ1	KJ2	KJ6	KJ7	KJ10	KN1	KN2	KN3
	KN4	KN5	KN6	KN9	AP1	AP5	AP6	AP8	AP10	AS3
	AS4	AS8	2-O-1	2-O-10	2-A-3	2-A-5	2-A-6	2-B-2	2-B-3	2-B-4
	2-B-6	2-B-8								
3	KJ3	KJ8	KJ9	KN7	KN8	KN10	OZ2			
4	OT1	OT2	OT3	OT4						
5	OT5	OT6	OT7	OT8	OT9	OT10				
6	OZ1									
7	OZ5	OZ6	OZ8	OZ9	OZ10					
8	OO4	OO5	OO8	OO9	OO10	PC4				
9	OC1									
10	OC2									
11	OC3	OC4								
12	OC5	OC6								
13	PM1	PM2	PM6	SM6	SM8					
14	PM3									
15	PM7									
16	PM8	PM10								
17	PM9	SM1								
18	SM7									
19	SM9									
20	BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	BM8	BM9	BM10
	BMC1	BMC2	BMC3	BMC5	BMC6	BMC7				
21	BMC4	BMC8								
22	AP2	AP3	AP4	AS1	2-O-8					
23	AS7									
24	AP9	2-O-3	2-O-4	2-A-1	2-A-2	2-A-4	2-A-7	2-A-8	2-A-9	2-A-10
25	AS5	AS9	AS10	2-O-2	2-O-5					
26	SF2	SF4								
27	SF5	SF7	SF10							
28	SF6	SF9								
29	SF8	SFC1	SFC2	SFC3	SFC4	SFC5	SFC7	SFC8	SFC10	SU3
	SCC5	SCC7	SCC8	SCC9	PC1	PC3	PC5	PC10	PCC1	PCC3
	PCC4	PCC6	PCC8	PCC9	PCC10	IF1	IF2	IF3	IF5	IF6
	IF7	IF8	IF9	IF10	IFC1	IFC2	IFC4	IFC5	IFC7	IFC8
	IFC9	IFC10								
30	SFC6	SU1	SU2	SU4	SU5	SU6	SU7	SU9	SU10	
31	SFC9									
32	SFE1									
33	SU8									
34	SRC1	SRC2	SRC4							
35	SL5	SL10	SLC1	SLC2	SLC4	SLC5	SLC6	SC5	SC6	SC7
	SC8	SC9	SC10	PC2						
36	SLC7	SLC8	SCC1	SCC2	SCC3	SCC4	SCC6			

37	SLC9	SLC10	SLE1	SLE2	SLE3	SLE4	SLE5	SLE6	SLE7	SLE8
	SLE9	SLE10	SCE1	SCE2	SCE3	SCE4	SCE5	SCE6	SCE7	SCE8
	SCE9	SCE10	PCE1	PCE2	PCE3	PCE4	PCE5	PCE6	PCE7	PCE8
	PCE9	PCE10	IFE1	IFE2	IFE3	IFE4	IFE5	IFE6	IFE7	IFE8
	IFE9	IFE10	MFE1	MFE2	MFE3	MFE4	MFE5	MFE6	MFE7	MFE8
	MFE9	MFE10	MFS1	MFS2	MFS3	MFS4	MFS5	MFS8	MFS9	MFS10
38	SC1	SC2	SC3							
39	PC6									
40	PC7	PC8	PC9	SR1	SR2	SR3	SL2	SL3	SL6	SL7
	SL8	SL9								
41	IF4									
42	IFC3									
43	IFS1	IFS2	IFS5	IFS9						
44	IFS3									
45	IFS4									
46	IFS6									
47	IFS7									
48	IFS8									
49	IFS10									
50	MF1	MF3	MF4	MF6	MF7	MF8				
51	MF2	MF5								
52	MFC1	MFC2	MFC3	MFC4	MFC5	MFC6	MFC7	MFC8	MFC9	MFC10
53	MUC1									
54	MUC2	MUC4								
55	MUC6	MUC3	MUC5							
56	MUC7									
57	MUC8	MUC9	MUC10							
58	1-O-1	1-O-8								
59	1-O-2	1-O-6								
60	1-O-3	1-O-4								
61	1-O-5									
62	1-O-7									
63	1-O-9									
64	1-O-10	1-A-4	1-A-5	1-A-9	1-A-10					
65	1-A-2									
66	1-A-6	1-A-8								
67	2-O-6									
68	2-O-7									
69	2-B-10									

赤字はシーケンス解析した菌株

<家畜ふん分離株 I.D.>

PC:畜草研チャンキー鶏ふん (PTYG 培地由来)、**PCC:**畜草研チャンキー鶏ふん (desoxycholate 培地由来)、**PCE:**畜草研チャンキー鶏ふん (EF 培地由来)、**IF:**イセ・ファーム社鶏ふん (PTYG 培地由来)、**IFC:**イセ・ファーム社鶏ふん (desoxycholate 培地由来)、**IFS:**イセ・ファーム社鶏ふん (MRS 培地由来)、**MF:**小川町養鶏農家鶏ふん (PTYG 培地由来)、**MFE:**小川町養鶏農家鶏ふん (EF 培地由来)、**SF:**つくば市養豚農家豚ふん (PTYG 培地由来)、**SFC:**つくば市養豚農家豚ふん (desoxycholate 培地由来)、**SFE:**つくば市養豚農家豚ふん (EF 培地由来)、**SL:**畜草研 LWD 豚ふん (PTYG 培地由来)、**SLC:**畜草研 LWD 豚ふん (desoxycholate 培地由来)、**SLE:**畜草研 LWD 豚ふん (EF 培地由来)、**SC:**畜草研梅山豚豚ふん (PTYG 培地由来)、**SCC:**畜草研梅山豚豚ふん (desoxycholate 培地由来)、**SCE:**畜草研梅山豚豚ふん (EF 培地由来)

<家畜ふん堆肥分離株 I.D.>

OO:小川町おがくず鶏ふん堆肥 (PTYG 培地由来)、**PM:**市販鶏ふん堆肥 (PTYG 培地由来)、**MUC:**小川町養鶏農家未熟堆肥 (desoxycholate 培地由来)、**SU:**つくば市養豚農家未熟堆肥 (PTYG 培地由来)、**SR:**つくば市養豚農家完熟堆肥、**SRC:**つくば市養豚農家完熟堆肥 (desoxycholate 培地由来)、**SM:**市販豚ふん堆肥 (PTYG 培地由来)、**BM:**市販牛ふん堆肥 (PTYG 培地由来)、**BMC:**市販牛ふん堆肥 (desoxycholate 培地由来)

<土壌分離株 I.D.>

KA:農環研畑土壌 4 月、**KJ:**農環研畑土壌 7 月、**KN:**農環研畑土壌 11 月、**OC:**小川町堆肥無施用畑土壌、**OT:**小川町鶏ふん堆肥施用直後土壌、**OZ:**小川町鶏ふん堆肥施用半年後土壌、**AP:**愛知鶏ふん堆肥連用土壌、**AS:**愛知豚ふん堆肥連用土壌、**1-O:**ブナ林土壌 O 層、**1-A:**ブナ林土壌 A 層、**1-B:**ブナ林土壌 B 層、**2-O:**シイ・カシ林土壌 O 層、**2-A:**シイ・カシ林土壌 A 層、**2-B:**シイ・カシ林土壌 B 層

以上、全て PTYG 培地から分離された。

表 5 相同性検索結果

Group	Strain	Closest relatives	Similarity (%)	Group	Strain	Closest relatives	Similarity (%)
1	KA1	<i>Flexibacter</i> sp.	98.7	36	SLC7	<i>Proteus mirabilis</i>	100
2	KN9	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	98.8	37	SLE1	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
3	KN8	<i>Flexibacter</i> sp.	97.1	38	SC3	<i>Serratia marcescens</i>	99.0
4	OT1	<i>Nordella oligomobilis</i>	98.3	39	PC6	<i>Kurthia gibsonii</i>	99.9
5	OT5	<i>Afpia massiliensis</i>	98.5	40	PC8	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100
6	OZ1	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	97.0	41	IF4	<i>Escherichia coli</i>	100
7	OZ5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.8	42	IFC3	<i>Proteus mirabilis</i>	98.2
8	OO4	<i>Alcaligenes</i> sp.	98.5	43	IFS1	<i>Kurthia gibsonii</i>	99.9
9	OC1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99.8	44	IFS3	<i>Vagococcus fluvialis</i>	100
10	OC2	<i>Variovorax paradoxus</i>	99.1	45	IFS4	<i>Kurthia gibsonii</i>	99.8
11	OC3	<i>Lysobacter gummosus</i>	99.5	46	IFS6	<i>Kurthia zopfii</i>	99.5
12	OC5	<i>Lysobacter antibioticus</i>	99.3	47	IFS7	<i>Kurthia gibsonii</i>	99.1
13	PM1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.5	48	IFS8	<i>Kurthia gibsonii</i>	99.9
14	PM3	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99.2	49	IFS10	<i>Proteus mirabilis</i>	99.8
15	PM7	<i>Staphylococcus equorum</i>	99.8	50	MF1	<i>Providencia heimbachae</i>	99.5
16	PM8	<i>Staphylococcus equorum</i>	99.6	51	MF2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	97.6
17	PM9	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.0	52	MFC1	<i>Pediococcus</i> sp.	99.9
18	SM7	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99.1	53	MUC1	<i>Alcaligenes</i> sp.	95.8
19	SM9	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	54	MUC2	<i>Bordetella</i> sp.	96.1
20	BM1	<i>Serratia marcescens</i>	100	55	MUC3	<i>Clostridium</i> sp.	94.5
21	BMC4	<i>Ochrobactrum</i> sp.	99.3	56	MUC7	<i>Bordetella</i> sp.	96.8
22	AP2	<i>Serratia marcescens</i>	99.1	57	MUC8	<i>Bordetella</i> sp.	98.0
23	AS7	<i>Flexibacter</i> sp.	99.0	58	1-O-1	<i>Variovorax</i> sp.	100
24	AP9	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.4	59	1-O-2	<i>Luteibactor rhizovicinus</i>	98.3
25	AS10	<i>Burkholderia cepacia</i>	99.3	60	1-O-3	<i>Luteibactor rhizovicinus</i>	98.3
26	SF2	<i>Kurthia gibsonii</i>	98.0	61	1-O-5	<i>Inquilinus ginsengisoli</i>	99.4
27	SF7	<i>Kurthia gibsonii</i>	96.7	62	1-O-7	<i>Flexibacter</i> sp.	97.1
28	SF6	<i>Acinetobacter</i> sp.	98.6	63	1-O-9	<i>Luteibactor rhizovicinus</i>	98.2
29	SF8	<i>Escherichia coli</i>	99.5	64	1-A-4	<i>Dyella korensis</i>	98.3
30	SFC6	<i>Escherichia coli</i>	99.4	65	1-A-2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	99.9
31	SFC9	<i>Escherichia coli</i>	99.0	66	1-A-6	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100
32	SFE1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.4	67	2-O-6	<i>Pandoraea</i> sp.	99.8
33	SU8	<i>Bacillus</i> sp.	98.9	68	2-O-7	<i>Lysobacter</i> sp.	100.0
34	SRC1	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	97.3	69	2-B-10	<i>Streptomyces olivaceus</i>	99.5
35	SL10	<i>Serratia marcescens</i>	99.5				

表 6 系統分類表

Group	Closest relatives	Microbial Systematics	Gram
28	<i>Acinetobacter</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales; Moraxellaceae; Acinetobacter.	N
5	<i>Afipia massiliensis</i>	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Afipia.	N
51	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Alcaligenes.	N
8, 53	<i>Alcaligenes</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Alcaligenes.	N
34	<i>Bacillus</i> sp.	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.	P
54, 56, 57	<i>Bordetella</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Alcaligenaceae; Bordetella.	N
9, 14, 18	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium.	N
19, 65, 66	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Bradyrhizobium.	N
24, 25	<i>Burkholderia cepacia</i>	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex.	N
2	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Burkholderia; Burkholderia cepacia complex.	N
55	<i>Clostridium</i> sp.	Bacteria; Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiaceae; Clostridium.	P
64	<i>Dyella koreensis</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Dyella.	N
37	<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Enterococcus.	P
29, 30, 31, 41	<i>Escherichia coli</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Escherichia.	N
1, 3, 23, 62	<i>Flexibacter</i> sp.	Bacteria; Bacteroidetes; Sphingobacteria; Sphingobacteriales; Flexibacteraceae; Flexibacter.	N
65	<i>Inquilinus grinsengisoni</i>	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Inquilinus.	N
26, 27, 39, 43, 45, 47, 48	<i>Kurthia gibsonii</i>	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Planococcaceae; Kurthia.	P
46	<i>Kurthia zopfii</i>	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Planococcaceae; Kurthia.	P
59, 60, 63	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Luteibacter.	N
12	<i>Lysobacter antibioticus</i>	Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Lysobacterales; Lysobacteraceae; Lysobacter.	N
11	<i>Lysobacter gummosus</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Lysobacter.	N
68	<i>Lysobacter</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; gamma subdivision; Xanthomonas group; Lysobacter.	N
4	<i>Nordella oligomobilis</i>	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Nordella.	N
34	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum.	N
21	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Brucellaceae; Ochrobactrum.	N
67	<i>Pandoraea</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Burkholderiaceae; Pandoraea.	N
54	<i>Pediococcus</i> sp.	Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Pediococcus.	P
36, 42, 49	<i>Proteus mirabilis</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Proteus.	N
50	<i>Providencia heimbachae</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Providencia.	N
6	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Bradyrhizobiaceae; Rhodopseudomonas.	N
20, 22, 35, 38	<i>Serratia marcescens</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Serratia.	N
7, 32	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.	P
15, 16	<i>Staphylococcus equorum</i>	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.	P
40	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.	P
13, 17	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Bacteria; Firmicutes; Bacillales; Staphylococcus.	P
69	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Bacteria; Actinobacteria; Actinobacteridae; Actinomycetales; Streptomycineae; Streptomycetaceae; Streptomyces.	P
44	<i>Vagococcus fluvialis</i>	Bacteria; Firmicutes; Lactobacillales; Enterococcaceae; Vagococcus.	P
10	<i>Variovorax paradoxus</i>	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Variovorax.	N
58	<i>Variovorax</i> sp.	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Variovorax.	N

表 7 DDBJ への登録番号

Group	Strain	Registered organism	Accession No.
1	KA1	<i>Flexibacter</i> sp.	AB272318
2	KN9	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	AB272319
3	KN8	<i>Flexibacter</i> sp.	AB272320
4	OT1	<i>Nordella oligomobilis</i>	AB272321
5	OT5	<i>Afipia massiliensis</i>	AB272322
6	OZ1	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	AB272323
7	OZ5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB272324
8	OO4	<i>Alcaligenes</i> sp.	AB272325
9	OC1	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	AB272326
10	OC2	<i>Variovorax paradoxus</i>	AB272327
11	OC3	<i>Lysobacter gummosus</i>	AB272328
12	OC5	<i>Lysobacter antibioticus</i>	AB272329
13	PM1	<i>Staphylococcus xylosum</i>	AB272330
14	PM3	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	AB272331
15	PM7	<i>Staphylococcus equorum</i>	AB272332
16	PM8	<i>Staphylococcus equorum</i>	AB272333
17	PM9	<i>Staphylococcus xylosum</i>	AB272334
18	SM7	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	AB272335
19	SM9	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AB272336
20	BM1	<i>Serratia marcescens</i>	AB272337
21	BMC4	<i>Ochrobactrum</i> sp.	AB272338
22	AP2	<i>Serratia marcescens</i>	AB272339
23	AS7	<i>Flexibacter</i> sp.	AB272340
24	AP9	<i>Burkholderia cepacia</i>	AB272341
25	AS10	<i>Burkholderia cepacia</i>	AB272342
26	SF2	<i>Kurthia gibsonii</i>	AB272343
27	SF7	swine fecal bacterium	AB272344
28	SF6	<i>Acinetobacter</i> sp.	AB272345
29	SF8	<i>Escherichia coli</i>	AB272346
30	SFC6	<i>Escherichia coli</i>	AB272347
31	SFC9	<i>Escherichia coli</i>	AB272348
32	SFE1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	AB272349
33	SU8	<i>Bacillus</i> sp.	AB272350
34	SRC1	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	AB272351
35	SL10	<i>Serratia marcescens</i>	AB272352

Group	Strain	Registered organism	Accession No.
36	SLC7	<i>Proteus mirabilis</i>	AB272353
37	SLE1	<i>Enterococcus faecalis</i>	AB272354
38	SC3	<i>Serratia marcescens</i>	AB272355
39	PC6	<i>Kurthia gibsonii</i>	AB272356
40	PC8	<i>Staphylococcus</i>	AB272357
41	IF4	<i>Escherichia coli</i>	AB272358
42	IFC3	<i>Proteus mirabilis</i>	AB272359
43	IFS1	<i>Kurthia gibsonii</i>	AB272360
44	IFS3	<i>Vagococcus fluvialis</i>	AB272361
45	IFS4	<i>Kurthia gibsonii</i>	AB272362
46	IFS6	<i>Kurthia zopfii</i>	AB272363
47	IFS7	<i>Kurthia gibsonii</i>	AB272364
48	IFS8	<i>Kurthia gibsonii</i>	AB272365
49	IFS10	<i>Proteus mirabilis</i>	AB272366
50	MF1	<i>Providencia heimbachae</i>	AB272367
51	MF2	<i>Alcaligenes faecalis</i>	AB272368
52	MFC1	<i>Pediococcus</i> sp.	AB272369
53	MUC1	poultry manure bacterium	AB272370
54	MUC2	poultry manure bacterium	AB272371
55	MUC3	poultry manure bacterium	AB272372
56	MUC7	poultry manure bacterium	AB272373
57	MUC8	<i>Bordetella</i> sp.	AB272374
58	1-O-1	<i>Variovorax</i> sp.	AB272375
59	1-O-2	<i>Luteibactor rhizovicinus</i>	AB272376
60	1-O-3	<i>Luteibactor rhizovicinus</i>	AB272377
61	1-O-5	<i>Inquilinus ginsengisoli</i>	AB272378
62	1-O-7	<i>Flexibacter</i> sp.	AB272379
63	1-O-9	<i>Luteibactor rhizovicinus</i>	AB272380
64	1-A-4	<i>Dyella koreensis</i>	AB272381
65	1-A-2	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AB272382
66	1-A-6	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	AB272383
67	2-O-6	<i>Pandoraea</i> sp.	AB272384
68	2-O-7	<i>Lysobacter</i> sp.	AB272385
69	2-B-10	<i>Streptomyces olivaceus</i>	AB272386

表 8 16S rDNA 系統解析に基づくテトラサイクリン耐性菌の分離源

Closest relative	Feces		FYM			Soil			Total
	Swine	Poultry	Swine	Poultry	Cattle	Soil(+) ^a	Soil(-) ^b	F-soil ^c	
<i>Acinetobacter</i> sp.	2								2
<i>Afipia massiliensis</i>						6			6
<i>Alcaligenes faecalis</i>		2							2
<i>Alcaligenes</i> sp.		1		6					7
<i>Bacillus</i> sp.			1						1
<i>Bordetella</i> sp.				6					6
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>			1	1			1		3
<i>Bradyrhizobium</i> sp.			1					3	4
<i>Burkholderia cepacia</i>						4		11	15
<i>Burkholderia cenocepacia</i>						8	14	10	32
<i>Clostridium</i> sp.				3					3
<i>Dyella koreensis</i>								5	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	22	38							60
<i>Escherichia coli</i>	15	29	9						53
<i>Flexibacter</i> sp.						4	12	3	19
<i>Inquilinus limosus</i>								1	1
<i>Kurthia gibsonii</i>	5	8							13
<i>Kurthia zopfii</i>		1							1
<i>Luteibacter rhizovicinus</i>								5	5
<i>Lysobacter antibioticus</i>							2		2
<i>Lysobacter gummosus</i>							2		2
<i>Lysobacter</i> sp.								1	1
<i>Nordella oligomobilis</i>						4			4
<i>Ochrobactrum grignonense</i>			3						3
<i>Ochrobactrum</i> sp.					2				2
<i>Pandoraea</i> sp.								1	1
<i>Pediococcus</i> sp.		10							10
<i>Proteus mirabilis</i>	7	2							9
<i>Providencia heimbachae</i>		6							6
<i>Rhodopseudomonas</i> sp.						1			1
<i>Serratia marcescens</i>	16				16	4		1	38
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1					5			6
<i>Staphylococcus equorum</i>				3					3
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	6	3	3						12
<i>Staphylococcus xylosus</i>			3	4					7
<i>Streptomyces olivaceus</i>								1	1
<i>Vagococcus fluvialis</i>		1							1
<i>Variovorax paradoxus</i>							1		1
<i>Variovorax</i> sp.									2
Total	74	102	21	23	18	36	32	44	350

^a:堆肥施用土壌、^b:堆肥無施用土壌、^c:森林土壌

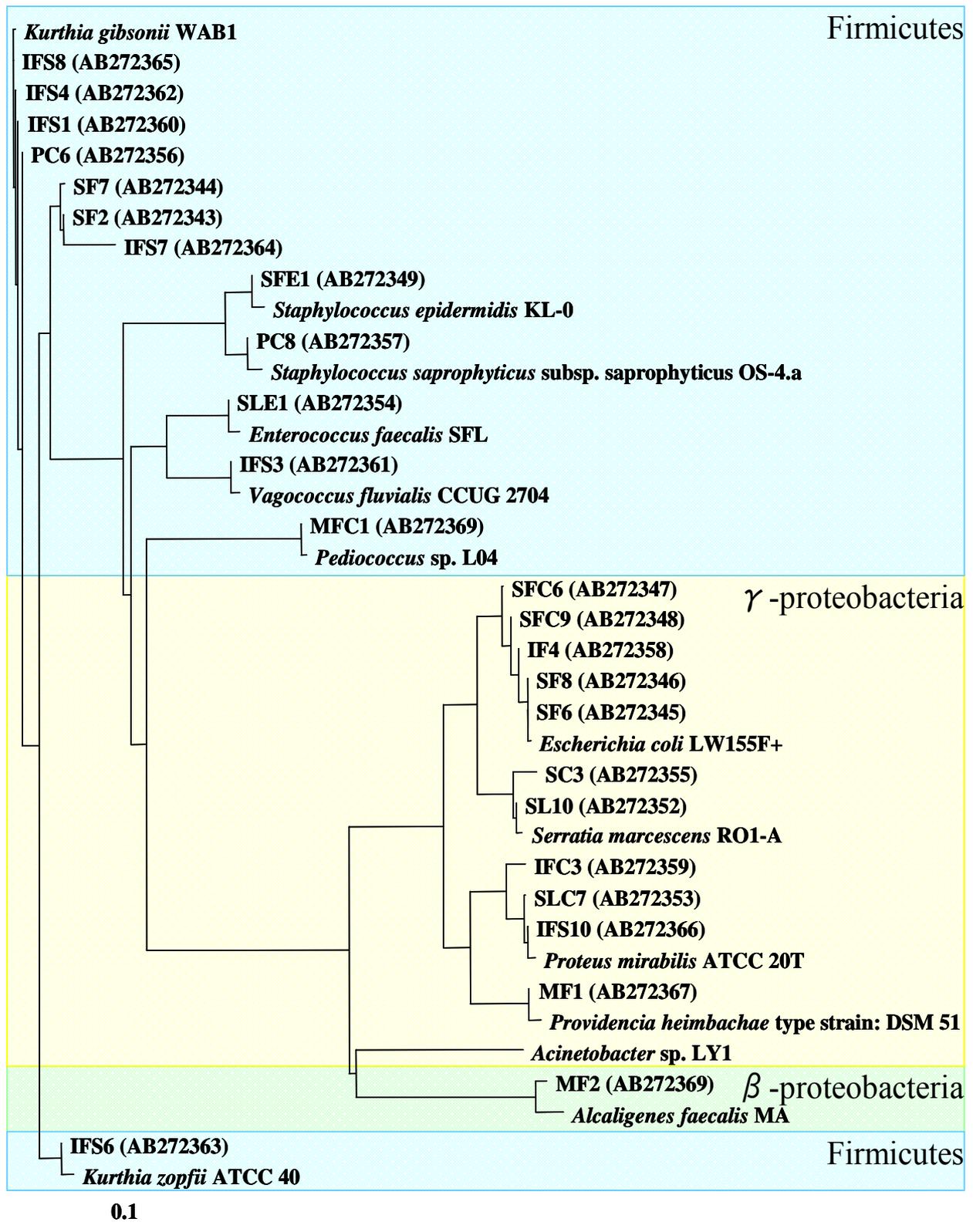


図 17.1 家畜ふん分離株の系統分類

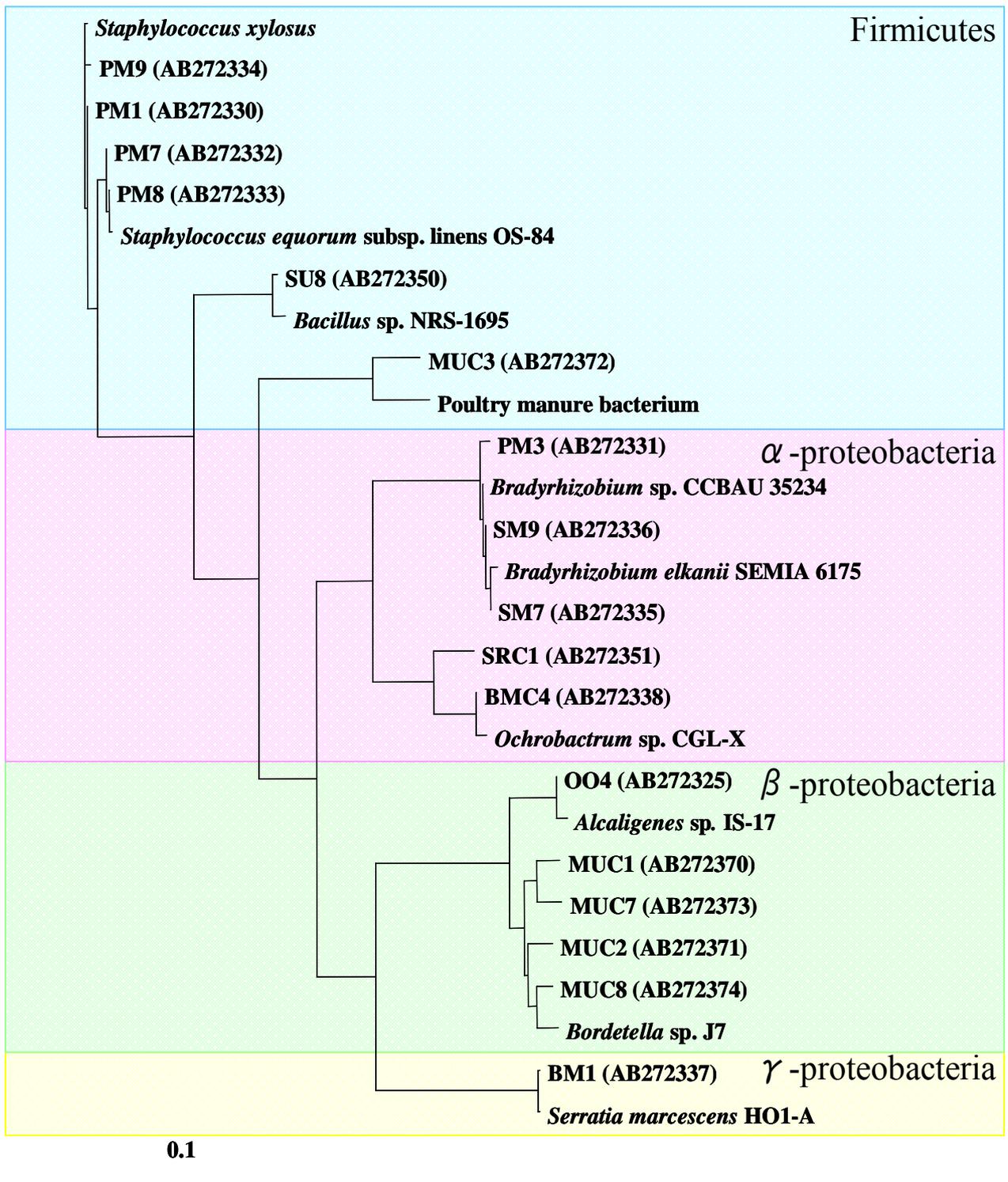


図 17.2 家畜ふん堆肥分離株の系統分類

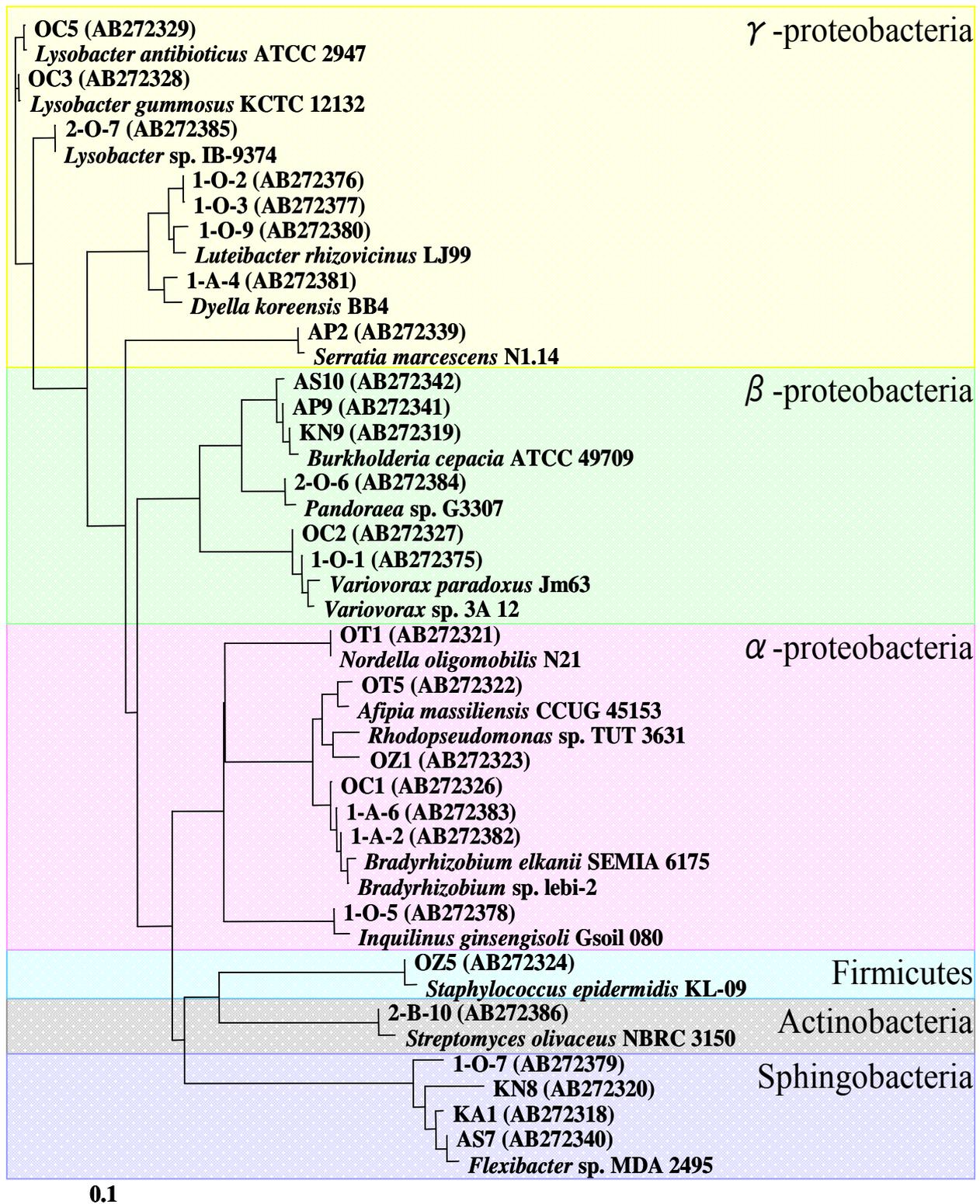


図 17.3 土壤分離株の系統分類

第5章 農業環境中のテトラサイクリン耐性遺伝子の分布

分離されたテトラサイクリン耐性細菌株はどのような耐性遺伝子を保持しているのだろうか。これまでのテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet* 遺伝子) の研究は実験微生物や病原菌に限られていた。本研究では、特定の細菌に限定せずに家畜ふん、家畜ふん堆肥、農業土壌および森林土壌という広い環境中から分離した 350 株のテトラサイクリン耐性細菌を対象とすることで、今まで研究されてこなかった一般細菌にも焦点を当てた。また、*tet* 遺伝子の研究は、ある特定の遺伝子タイプに限定した詳細な分子遺伝学的解明が多くなされてきたが、まず、全体像を把握するために Efflux 型: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, および RPP 型: *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, *tetP(B)*, *otr(A)* の 19 の遺伝子をターゲットとした。

5.1 材料および方法

4.1.2 で抽出したゲノム DNA をテンプレートとしてテトラサイクリン耐性遺伝子の検出を行った。

350 株について、PCR により *tet* gene の検出を試みた。Aminov *et al.*^{6, 7)} によって設計された 19 の遺伝子 {11 efflux pump genes (Efflux 型) : *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, および 8 ribosomal protection proteins genes (RPP 型) : *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, *tetP(B)*, *otr(A)*} をターゲットとしたプライマーペアを用いた (表 9)。PCR 反応液は 1.0 U の Ex *Taq* polymerase (Takara, Shiga, Japan)、5 μ l の 10 \times Ex *Taq* reaction buffer (Takara)、10 nmol の dNTPs、1 nmol のテンプレート DNA、及び 25 pmol の各プライマーを混合し、全量 50 μ l とした。反応は I-Cycler (Bio Rad) を用いた。反応条件はターゲット遺伝子によって異なるため、表 10 に示す。1 回目の PCR で目的の増幅産物が得られなかったときには、1 回目の PCR 産物 1 μ l をテンプレートとして 2 回目の PCR を同条件で行った。

PCR 産物は分光光度計で濃度を測定するとともに、2.0 %アガロースゲル中で 100 V で 30 分間電気泳動を行い、UV 照射により得られた産物の分子量を確認

した。また、PCR産物の精製のために、Exo-SAP IT (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.)を 1/10 量添加し、37°C、15 分間消化し、エキソヌクレアーゼによるプライマー分解とシュリンプアルカリフォスファターゼによる dNTP の脱リン酸化を行い、その後 80°C、15 分間酵素を失活させた。

さらに、増幅されたPCR産物の代表株をシーケンス解析した。シーケンス反応は、Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて行った。プライマー、反応条件は遺伝子検出に用いたものと同じである。反応液組成、反応物の精製法は 4.1.5 と同様である。シーケンスデータは DNASIS Pro (Hitachi Software Engineering Co.)内で編集し、およそ 200bpの塩基配列を得た。これらをDDBJ database (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-e.html>)内BLAST programで相同性検索を行った。

6.2 結果

350 株中 249 株 (71.1 %) から 15 種類の *tet* 遺伝子が検出された。RPP 型の *tet* 遺伝子を保有している株が 109 株 (31.1 %)、Efflux 型の *tet* 遺伝子を保有している株が 140 株 (40.0 %) であることが明らかになった (表 11)。

Efflux 型の *tet* 遺伝子は、*tet(A)*、*tet(B)*、*tet(C)*、*tet(G)*、*tet(H)*、*tet(J)*、*tet(Y)*、および *tet(Z)* の 8 遺伝子が検出された (図 18)。最も多く検出された遺伝子は *tet(B)* であり、140 株中 50 株 (35.7 %) から検出された。次に多かったのは *tet(H)* であり、140 株中 37 株 (26.4 %) から検出された。その他、*tet(J)* が 140 株中 26 株 (18.6 %)、*tet(Z)* が 140 株中 13 株 (9.3 %)、*tet(A)* が 140 株中 6 株 (4.3 %)、*tet(C)* が 140 株中 3 株 (2.1 %)、*tet(Y)* が 140 株中 3 株 (2.1 %)、*tet(G)* が 140 株中 2 株 (1.4 %) の順であった。*tet(B)* と *tet(J)* は家畜ふん、堆肥、土壌分離株から広く検出され、*tet(A)*、*tet(C)* および *tet(H)* は家畜ふん分離株からに限られ、*tet(G)* は土壌分離株からに限られていた。

RPP 型の *tet* 遺伝子は *tet(M)*、*tet(O)*、*otr(A)*、*tet(Q)*、*tet(S)*、および *tet(W)* の 6 遺伝子が検出された (図 18)。最も多く検出された遺伝子は *tet(M)* であり、109 株中 74 株 (67.9 %) から検出された。次に多かったのは *tet(W)* であり、109 株中 26 株 (23.9 %) から検出された。その他、*tet(Q)* が 109 株中 4 株 (3.7 %)、*tet(O)* が 109 株中 3 株 (2.8 %)、*otr(A)* が 109 株中 2 株 (1.8 %)、*tet(S)* が 109 株中 2 株 (1.8 %) の順であった。*tet(M)* と *tet(W)* は家畜ふん、堆肥、土壌分離株から広く検出され、*tet(O)* は家畜ふん分離株からに限られ、*tet(S)* は堆肥分離株に限られ、*otr(A)* は土壌分離株に限られていた。また、鶏ふんから分離された 2 株は *tet(M)* と *tet(O)* の両方を同時に保持していた。

5.2.1 家畜ふん分離株の *tet* 遺伝子の分布

家畜ふんから分離された 176 株のテトラサイクリン耐性細菌の *tet* 遺伝子型を調べた。その結果、19 株 (10.8 %) が非検出であったが、RPP 型の *tet* 遺伝子を保有している株が 81 株 (46.0 %)、Efflux 型の *tet* 遺伝子を保有している株が 31 株 (43.2 %) であることが明らかになった (表 11)。

豚ふん分離株では、74 株中 61 株 (82.4 %) から *tet* 遺伝子が検出された。31

株が Efflux 型の *tet* 遺伝子 *tet(A)*、*tet(B)*、*tet(C)*、*tet(H)*、*tet(J)*、または *tet(Y)* のいずれかを保有しており、30 株が RPP 型の *tet* 遺伝子 *tet(M)*、*tet(Q)*、または *tet(W)* のいずれかを保有していた。豚ふん分離株から検出された *tet* 遺伝子と菌種を表 12.1 に示す。最も多く検出されたのは *tet(M)* であり、20 株が *Enterococcus faecalis*、2 株が *Kurthia gibsonii*、1 株が *Kurthia sp.*、1 株が *Escherichia coli* にそれぞれ近縁の種であった。次に多く検出されたのは *tet(B)* であり、5 株が *Serratia marcescens*、4 株が *Escherichia coli*、2 株が *Kurthia sp.*、1 株が *Staphylococcus saprophyticus* にそれぞれ近縁の種であった。次に多く検出されたのは *tet(H)* であり、5 株が *Proteus mirabilis*、4 株が *Escherichia coli*、1 株が *Enterococcus faecalis* にそれぞれ近縁の種であった。さらに、*tet(A)* を保持していた 4 株が *Escherichia coli* の、*tet(W)* を保持していた 2 株が *Escherichia coli*、1 株が *Acinetobacter sp.*、1 株が *Serratia marcescens* にそれぞれ近縁の種であった。また、*tet(J)* を保持していた 2 株が *Proteus mirabilis*、1 株が *Serratia marcescens* に近縁な種であり、*tet(Q)* を保持していた 1 株が *Enterococcus faecalis*、1 株が *Staphylococcus saprophyticus* にそれぞれ近縁の種であり、*tet(C)* を保持していた 1 株が *Staphylococcus epidermidis*、*tet(Y)* を保持していた 1 株が *Acinetobacter sp.* にそれぞれ近縁の種であった。

鶏ふん分離株では、102 株中 96 株 (94.1 %) から *tet* 遺伝子が検出された。45 株が Efflux 型の *tet* 遺伝子 *tet(A)*、*tet(B)*、*tet(C)*、*tet(H)*、または *tet(J)* のいずれかを保有しており、51 株が RPP 型の *tet* 遺伝子 *tet(M)*、*tet(O)*、*tet(Q)*、または *tet(W)* のいずれかを保有していた。鶏ふん分離株から検出された *tet* 遺伝子と菌種を表 12.2 に示す。最も多く検出されたのは *tet(M)* であり、30 株が *Enterococcus faecalis*、7 株が *Escherichia coli*、4 株が *Kurthia gibsonii*、1 株が *Kurthia zopfii*、1 株が *Proteus mirabilis* にそれぞれの近縁種であった。次に多く検出されたのは *tet(H)* であり、19 株が *Escherichia coli*、3 株が *Staphylococcus saprophyticus*、1 株が *Alcaligenes sp.*、1 株が *Kurthia gibsonii*、1 株が *Pediococcus sp.*、1 株が *Proteus mirabilis*、1 株が *Serratia marcescens* にそれぞれの近縁種であった。次に多く検出されたのは *tet(B)* であり、3 株が *Kurthia gibsonii*、3 株が *Providencia heimbachae*、2 株が *Enterococcus faecalis*、2 株が *Pediococcus sp.*、1 株が *Vagococcus fluvialis* にそれぞれ近縁の種であった。さらに、*tet(W)* を保持し

ていた4株が *Enterococcus faecalis*、1株が *Escherichia coli*、1株が *Pediococcus* sp. にそれぞれ近縁の種であった。また、*tet(J)*を保持していた2株が *Pediococcus* sp.、1株が *Providencia heimbachae* にそれぞれ近縁の種であった。また、*tet(O)*を保持していた2株が *Enterococcus faecalis*、1株が *Pediococcus* sp.にそれぞれ近縁の種であった。その他、*tet(A)*を保持していた2株が *Alcaligenes faecalis*、*tet(C)*を保持していた2株が *Escherichia coli*、*tet(Q)*を保持していた1株が *Providencia heimbachae* にそれぞれ近縁の種であった。

5.2.2 家畜ふん堆肥分離株の *tet* 遺伝子の分布

家畜ふん堆肥から分離された62株のテトラサイクリン耐性細菌の *tet* 遺伝子型を調べた。その結果、22株(35.5%)が非検出であったが、RPP型の *tet* 遺伝子を保有している株が15株(24.2%)、Efflux型の *tet* 遺伝子を保有している株が25株(40.3%)であることが明らかになった(表11)。

豚ふん堆肥分離株では、21株中14株(66.7%)から *tet* 遺伝子が検出された。7株が Efflux 型の *tet* 遺伝子 *tet(B)*または *tet(J)*のいずれかを保有しており、7株が RPP 型の *tet* 遺伝子 *tet(M)*、*tet(S)*または *tet(W)*のいずれかを保有していた。豚ふん堆肥分離株から検出された *tet* 遺伝子と菌種を表12.3に示す。最も多く検出されたのは *tet(B)*であり、3株が *Ochrobactrum grignonense*、2株が *Escherichia coli* にそれぞれ近縁の種であった。次に多く検出されたのは *tet(M)*であり、2株が *Staphylococcus saprophyticus*、1株が *Bacillus* sp.、1株が *Escherichia coli* にそれぞれ近縁の種であった。その他、*tet(J)*を保持していた2株が *Escherichia coli*、*tet(W)*を保持していた2株が *Paenibacillus* sp.、*tet(S)*を保持していた1株が *Escherichia coli* にそれぞれ近縁の種であった。

鶏ふん堆肥分離株では、23株中10株(43.5%)から *tet* 遺伝子が検出された。4株が Efflux 型の *tet* 遺伝子 *tet(B)*を保有しており、6株が RPP 型の *tet* 遺伝子 *tet(S)*または *tet(W)*のいずれかを保有していた。鶏ふん堆肥分離株から検出された *tet* 遺伝子と菌種を表12.3に示す。最も多く検出されたのは *tet(W)*であり、2株が *Bordetella* sp.、2株が *Staphylococcus xylosum*、1株が *Clostridium* sp.にそれぞれ近縁の種であった。次に多く検出されたのは *tet(B)*であり、1株が *Alcaligenes* sp.、1株が *Bordetella* sp.、1株が *Bradyrhizobium elkanii*、1株が *Staphylococcus*

xylosum にそれぞれ近縁の種であった。その他、*tet(S)*を保持していた 1 株が *Clostridium sp.*の近縁種であった。

牛ふん堆肥分離株では、18 株中 16 株 (88.9 %) から *tet* 遺伝子が検出された。14 株が Efflux 型の *tet* 遺伝子 *tet(B)*、*tet(J)*、または *tet(Z)*のいずれかを保有しており、2 株が RPP 型の *tet* 遺伝子 *tet(W)*を保有していた。牛ふん堆肥分離株から検出された *tet* 遺伝子と菌種を表 12.3 に示す。最も多く検出されたのは *tet(J)*で 10 株、その他 *tet(B)*、*tet(Z)*、*tet(W)*が 2 株ずつ検出され、すべて *Serratia marcescens* の近縁種であった。

5.2.3 土壌分離株の *tet* 遺伝子の分布

土壌から分離された 112 株のテトラサイクリン耐性細菌の *tet* 遺伝子型を調べた。その結果、60 株 (53.6 %) が非検出であったが、RPP 型の *tet* 遺伝子を保有している株が 13 株 (11.6 %)、Efflux 型の *tet* 遺伝子を保有している株が 39 株 (34.8 %) であることが明らかになった (表 11)。

豚ふん堆肥連用土壌分離株では、9 株中 5 株から *tet* 遺伝子が検出された。2 株が Efflux 型の *tet* 遺伝子を保持しており、1 株は *tet(B)*を持つ *Burkholderia cenocepacia* の近縁種、また別の 1 株が *tet(J)*を持つ *Burkholderia cepacia* の近縁種であった。また、3 株が RPP 型の *tet* 遺伝子を保持しており、2 株は *tet(W)*を持つ *Flexibacter sp.*、1 株は *otr(A)*を持つ *Serratia marcescens* にそれぞれ近縁の種であった (表 12.4)。

鶏ふん堆肥連用土壌分離株では、27 株中 22 株 (81.5 %) から *tet* 遺伝子が検出された。20 株が Efflux 型の *tet* 遺伝子 *tet(B)*、*tet(G)*、*tet(J)*、または *tet(Z)*のいずれかを保有しており、2 株が RPP 型の *tet* 遺伝子 *tet(Q)*または *tet(W)*のいずれかを保有していた。鶏ふん堆肥連用土壌分離株から検出された *tet* 遺伝子と菌種を表 12.4 に示す。最も多く検出されたのは *tet(B)*であり、6 株が *Afipia massiliensis*、3 株が *Staphylococcus epidermidis* にそれぞれ近縁の種であった。次に多く検出されたのは *tet(J)*と *tet(Z)*であり、*tet(J)*を保持していた 3 株が *Nordella oligomobilis*、2 株が *Serratia marcescens*、*tet(Z)*を保持していた 4 株が *Burkholderia cenocepacia*、1 株が *Serratia marcescens* にそれぞれ近縁の種であった。その他、*tet(G)*を保持していた 1 株が *Rhodopseudomonas sp.*、*tet(Q)*を保持していた 1 株

が *Flexibacter* sp. の近縁種、*tet(W)* を保持していた 1 株が *Nordella oligomobilis* の近縁種であった。

堆肥無施用土壌分離株では、32 株中 11 株 (34.4 %) から *tet* 遺伝子が検出された。11 株が Efflux 型の *tet* 遺伝子 *tet(B)*、*tet(G)*、*tet(J)*、または *tet(Z)* のいずれかを保有しており、8 株が RPP 型の *tet* 遺伝子 *tet(M)*、*otr(A)*、または *tet(W)* のいずれかを保有していた。堆肥無施用土壌分離株から検出された *tet* 遺伝子と菌種を表 12.4 に示す。最も多く検出されたのは *tet(Z)* であり、6 株が *Burkholderia cenocepacia* の近縁種であった。次に多く検出されたのは *tet(W)* であり、3 株が *Flexibacter* sp.、1 株が *Burkholderia cenocepacia* にそれぞれ近縁の種であった。次に多く検出されたのは *tet(M)* であり、2 株が *Flexibacter* sp.、1 株が *Burkholderia cenocepacia* にそれぞれ近縁の種であった。その他、*tet(B)* を保持していた 2 株が *Lysobacter antibioticus*、*tet(J)* を保持していた 1 株が *Burkholderia cenocepacia*、1 株が *Lysobacter gummosus*、*tet(G)* を保持していた 1 株が *Flexibacter* sp.、*otr(A)* を保持していた 1 株が *Burkholderia cenocepacia* にそれぞれ近縁の種であった。

森林土壌分離株では、44 株中 6 株から *tet* 遺伝子が検出され、すべて Efflux 型の *tet* 遺伝子であった。*tet(B)* を保持していた 3 株が *Flexibacter* sp.、1 株が *Burkholderia cepacia*、*tet(Y)* を保持していた 1 株が *Luteibacter rhizovicinus*、1 株が *Dyella koreensis* にそれぞれ近縁の種であった (表 12.4)。

5.3. 考察

テトラサイクリン系抗生物質は広域スペクトル抗生物質であり、グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、プロトゾア、さらにはクラミジア、マイコプラズマ、リッチケアにも有効性を示すタンパク質合成阻害剤である⁹²⁾。テトラサイクリン系抗生物質としては、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、デメクロサイクリン、クロルテトラサイクリンが挙げられる。これらの薬剤は優れた特性と安価であったことから人間、養殖魚、および動物の感染症に対し、治療だけでなく予防薬としても60年近く大規模に使用されてきた^{16, 26, 50, 73)}。さらに、世界中の多くの国で、成長促進剤として、家畜や養殖魚の餌に添加をしている。その結果、急速にテトラサイクリン耐性菌が蔓延し、臨床だけでなく自然環境中にも耐性遺伝子が拡大した^{5, 8, 11, 14, 29)}。特に、農業環境から分離されたテトラサイクリン耐性細菌は広域多剤耐性であった⁴¹⁾。しかし、これまでのテトラサイクリン耐性細菌に関する学術研究の多くは病原菌や疫学上重要な細菌に限られていた⁸⁾。これらの研究は、生態系全体を考えたとき、自然状態や選択圧がない状態で存在しているテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet* 遺伝子) の存在状態を評価できない。そして、ヒトや家畜病原菌が自然状態で存在している一般細菌へ与えるインパクトやリスクを十分に予測できない。

本研究では、実験微生物や病原菌に限定せずに家畜ふん、家畜ふん堆肥、農業土壌および森林土壌という広い環境中から試料を採取し、350株のテトラサイクリン耐性細菌を対象とすることで、今まで研究されてこなかった一般細菌にも焦点を当てた。また、*tet* 遺伝子の研究は、ある特定の遺伝子タイプに限定した詳細な分子遺伝学的解明が多くなされてきたが、まず、全体像を把握するために Efflux 型: *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D), *tet*(E), *tet*(G), *tet*(H), *tet*(J), *tet*(Y), *tet*(Z), *tet*(30); および RPP 型: *tet*(M), *tet*(S), *tet*(O), *tet*(W), *tet*(Q), *tet*(T), *tet*P(B), *otr*(A) の 19 の遺伝子をターゲットとした。

5.3.1 PTYG 培地の有効性

2001年に発表されたテトラサイクリン耐性細菌に関する総説では、39属のグラム陰性細菌、23属のグラム陽性細菌について耐性遺伝子が検出されたことが報告された¹⁶⁾。2005年にはその改訂版が発表され、*tet* 遺伝子を持つ細菌属は62属から115属に増えた⁷⁶⁾。本研究ではさらに、13細菌属が新たに *tet* 遺伝子を持つことが明らかになった。

これには2つの理由が考えられる。まず、本研究では環境中の広い分野から細菌を分離したことが挙げられる。特に、森林土壌といった自然本来の土壌微生物叢を対象にしたものはなかった。次に、PTYG 培地といった非選択培地を用い、従属栄養土壌細菌も分離できたことが挙げられる。PTYG 培地は、これまで研究対象とされていなかった貧栄養環境に生息する細菌を検出できるとともに、家畜ふんや家畜ふん堆肥からも、*Alcaligenes faecalis*、*Escherichia coli*、*Kurthia gibsonii*、*Providencia heimbachae*、*Serratia marcescens* および *Staphylococcus saprophyticus* にそれぞれ近縁であり、通常は栄養リッチな選択培地で検出する細菌も検出可能であった。

5.3.2 新規 *tet* 遺伝子を保持する属

本研究では、分離した350株中、*tet* 遺伝子を持つ細菌としては24属が明らかになった。これまでに *tet* 遺伝子保持菌として報告されてきた115属のうち、11属から *tet* 遺伝子が検出された。新規に *tet* 遺伝子を保持する細菌としては、家畜ふん分離株から *Kurthia*、*Pediococcus* および *Vagococcus* が、家畜ふん堆肥分離株から *Bordetella*、*Bradyrhizobium* と *Ochrobactrum* が、土壌分離株からは *Burkholderia*、*Dyella*、*Flexibacter*、*Luteibacter*、*Lysobacter*、*Nordella* および *Rhodopseudomonas* にそれぞれ近縁である13細菌属が挙げられる。

Bordetella からは *tet*(B)と *tet*(W)、*Bradyrhizobium* からは *tet*(B)、*Burkholderia* からは *tet*(B)、*tet*(J)、*tet*(Z)、*tet*(M)、*tet*(W)、および *otr*(A)、*Dyella* からは *tet*(Y)、*Flexibacter* からは *tet*(B)、*tet*(G)、*tet*(M)、*tet*(Q)、および *tet*(W)、*Kurthia* からは *tet*(B)、*tet*(H)、および *tet*(M)、*Luteibacter* からは *tet*(Y)、*Lysobacter antibioticus* からは *tet*(B)と *tet*(J)、*Nordella* からは *tet*(J)と *tet*(W)、*Ochrobactrum* からは *tet*(B)、

Pediococcus からは *tet(B)*、*tet(H)*、*tet(J)*、*tet(O)*、および *tet(W)*、*Rhodopseudomonas* からは *tet(G)*、*Vagococcus* からは *tet(B)*が検出された。

上記の細菌だけでなく、今までに研究の対象とならなかつただけで、報告されていなかった細菌が *tet* 遺伝子を持っている可能性があることが示唆された。

5.3.3 新規 *tet* 遺伝子—保持菌組み合わせ

これまで *tet* 遺伝子保持菌として報告されていたもののうち、新たな *tet* 遺伝子を持つものも多いことが明らかになった。特に、腸内細菌については、医学野のみならず、家畜衛生分野でも研究が進んでいる。まず、*Enterococcus* 属細菌は *tet(K)*、*tet(L)*、*tet(M)*、*tet(O)*、および *tet(S)*を持つことが報告されているが^{2, 3, 34)}、*tet(B)*、*tet(H)*、および *tet(W)*の検出は本研究が始めてである。次に *Escherichia* 属細菌は *tet(A)*、*tet(B)*、*tet(C)*、*tet(D)*、*tet(E)*、*tet(G)*、*tet(I)*、*tet(M)*、および *tet(R)*を持つことが報告されているが^{11, 12, 19, 44, 46, 52)}、*tet(W)*の検出は本研究が始めてである。また、*Serratia* 属細菌は *tet(A)*、*tet(B)*、*tet(C)*、*tet(G)*、*tet(E)*、および *tet(34)*を持つことが報告されているが^{16, 50, 76)}、*tet(H)*、*tet(J)*、*tet(Z)*、*otr(A)*、および *tet(W)*の検出については報告例がない。また、*Staphylococcus* 属細菌は MRSA など耐性遺伝子に関する研究が多くなされていて、*tet(K)*、*tet(L)*、*tet(38)*、*tet(M)*、*tet(O)*、*tet(W)*、および *tet(U)*を持つことが報告されているが^{14, 58, 35)}、*tet(B)*、*tet(C)*、*tet(H)*および *tet(Q)*の検出については報告例がない。また、*Proteus* 属細菌は *tet(C)*と *tet(J)*を持つことが報告されているが^{16, 47)}、*tet(H)*と *tet(M)*の検出については報告例がない。また、*Alcaligenes* 属細菌は *tet(A)*と *tet(E)*を持つことが報告されているが⁴⁾、*tet(B)*と *tet(H)*の検出については報告例がない。また、*Providencia* 属細菌は、*tet(B)*、*tet(E)*、*tet(G)*および *tet(I)*を持つことが報告されているが^{16, 76)}、*tet(J)*と *tet(Q)*の検出については報告例がない。また、*Clostridium* 属細菌は *Clostridium perfringens* が病原菌であることから研究が進み、*tet(K)*、*tet(L)*、*tetA(P)*、*tet(M)*、*tet(W)*、*tet(Q)*、*tet(32)*、および *tet(36)*を持つことが報告されているが^{37, 87)}、*tet(S)*と *tet(W)*の検出については報告例がない。また、腸内細菌ではないが、*Acinetobacter* 属細菌についても、*Acinetobacter baumannii* が日和見感染の原因菌となることから臨床での研究が進んでおり、*tet(A)*、*tet(B)*、*tet(H)*、*tet(39)*、および *tet(M)*を持つことが報告されているが^{49, 75)}、

*tet(Y)*と*tet(W)*の検出については報告例がない。また、土壌細菌として知られている *Afipia* 属細菌は根粒菌であるとともに、2、4-D 分解菌としても研究されており、*tet(M)*を持つことが報告されているが *tet(B)*の検出は報告がない⁷⁶⁾。

上記の細菌は、ほとんどが腸内細菌や病原菌であるために、耐性遺伝子の研究が進んでいるが、その生息環境が細菌密度の高いことから、遺伝子伝播の確率は高く、さらに、新たな *tet* 遺伝子を獲得する可能性も非常に高いことが示唆された。

5.3.4 家畜ふん由来 *tet* 遺伝子の環境中への拡散の可能性

本研究では、広い範囲の環境試料 350 株のテトラサイクリン耐性細菌から、19 種の *tet* 遺伝子の検出を試みた。その結果、非病原性細菌や非臨床株の一般細菌では、想定した以上の割合でテトラサイクリン耐性遺伝子を保持することが明らかになった。抗生物質耐性遺伝子の中でも特にテトラサイクリン耐性遺伝子が問題となるのは、その遺伝子がプラスミド上に存在することや転移因子（トランスポゾン）であることに起因する。これらが染色体やプラスミド間を頻繁に転移するうちに、細菌は新しい性質を獲得し、新しい耐性を持つなどの機会が増えるのである。

プラスミド上に頻繁に見られる *tet* 遺伝子としては *tet(B)*、*tet(S)* および *tet(O)*、トランスポゾンに頻繁に見られる *tet* 遺伝子としては *tet(M)*、*tet(Q)* および *tet(W)* が挙げられる^{16, 78)}。また、*tet(B)*、*tet(M)* および *tet(W)* はそのホスト菌種が多いことが特徴であり、耐性遺伝子の拡散の一旦を担っている可能性が高い¹⁷⁾。*tet(B)* はグラム陰性細菌でよく見られるが、本研究では *Enterococcus* 属細菌、*Kurthia* 属細菌、*Staphylococcus* 属細菌、*Pediococcus* 属細菌、*Vagococcus* 属細菌といったグラム陽性細菌からも検出された。また、*tet(M)* と *tet(W)* はトランスポゾンによって転移することが知られており、細菌種を乗り越えて伝播する可能性が高い¹⁶⁾。本研究でも、*tet(M)* と *tet(W)* は、腸内細菌から土壌細菌にいたるまで広い範囲で検出された。しかし、テトラサイクリンが元々は抗菌スペクトルの非常に広い薬剤であったことを考えると、薬剤耐性遺伝子の獲得による耐性化が主要な原因ではないかと推察される。

また、家畜ふんに特徴的な *tet* 遺伝子として、豚ふんと鶏ふんでは *tet(M)*、家

畜ふん堆肥に特徴的な *tet* 遺伝子としては豚ふん堆肥では *tet(B)*、鶏ふん堆肥では *tet(W)*、牛ふん堆肥では *tet(J)*、土壌に特徴的な *tet* 遺伝子としては *tet(B)* が挙げられた。これら特徴的な *tet* 遺伝子型の変動を見ることで、他の環境からの遺伝子の移動を評価できるのではないかと考えられた。しかし、分離株が少なかったサンプルもあったため、集団の特徴を正確に捉えたとは言えない。今後、さらに様々なサイトから多くの細菌を分離し、*tet* 遺伝子タイプの特徴づけを行うことにより、遺伝子拡散の可能性についてさらに踏み込んだ言及ができるのではないかと考えられた。

表 9.1 *tet* 遺伝子検出プライマーの塩基配列と増幅サイズ (RPP 型)

Primer pair	Class targeted	Sequence	PCR annealing temp (°C)	Amplicon size (bp)
Tet B/P-FW Tet B/P-RV	P(B)	AAA ACT TAT TAT ATT ATA GTG TGG AGT ATC AAT AAT ATT CAC	46	169
Tet M-FW Tet M-RV	M	ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC	55	171
Tet O-FW Tet O-RV	O	ACG GAR AGT TTA TTG TAT ACC TGG CGT ATC TAT AAT GTT GAC	60	171
Otr A-FW Otr A-RV	otr A	GGC AYT YCT GGC CCA CGT CCC GGG GTG TCG TAS AGG	66	212
Tet Q-FW Tet Q-RV	Q	AGA ATC TGC TGT TTG CCA GTG CGG AGT GTC AAT GAT ATT GCA	63	169
Tet S-FW Tet S-RV	S	GAA AGC TTA CTA TAC AGT AGC AGG AGT ATC TAC AAT ATT TAC	50	169
Tet T-FW Tet T-RV	T	AAG GTT TAT TAT ATA AAA GTG AGG TGT ATC TAT GAT ATT TAC	46	169
Tet W-FW Tet W-RV	W	GAG AGC CTG CTA TAT GCC AGC GGG CGT ATC CAC AAT GTT AAC	64	168

^a: FW, forward; RV, reverse

^b: PCR 条件は表 10 を参照

表 9.2 *tet* 遺伝子検出プライマーの塩基配列と増幅サイズ (Efflux 型)

Primer pair	Class targeted	Sequence	PCR annealing temp (°C)	Amplicon size (bp)
Tet A-FW Tet A-RV	A	GCG CGA TCT GGT TCA CTC G AGT CGA CAG YRG CGC CGG C	61	164
Tet B-FW Tet B-RV	B	TAC GTG AAT TTA TTG CTT CGG ATA CAG CAT CCA AAG CGC AC	61	206
Tet C-FW Tet C-RV	C	GCG GGA TAT CGT CCA TTC CG GCG TAG AGG ATC CAC AGG ACG	68	207
Tet D-FW Tet D-RV	D	GGA ATA TCT CCC GGA AGC GG CAC ATT GGA CAG TGC CAG CAG	68	187
Tet E-FW Tet E-RV	E	GTT ATT ACG GGA GTT TGT TGG AAT ACA ACA CCC ACA CTA CGC	61	199
Tet G-FW Tet G-RV	G	GCA GAG CAG GTC GCT GG CCY GCA AGA GAA GCC AGA AG	68	134
Tet H-FW Tet H-RV	H	CAG TGA AAA TTC ACT GGC AAC ATC CAA AGT GTG GTT GAG AAT	61	185
Tet J-FW Tet J-RV	J	CGA AAA CAG ACT CGC CAA TC TCC ATA ATG AGG TGG GGC	61	184
Tet Y-FW Tet Y-RV	Y	ATT TGT ACC GGC AGA GCA AAC GGC GCT GCC GCC ATT ATG C	68	181
Tet Z-FW Tet Z-RV	Z	CCT TCT CGA CCA GGT CGG ACC CAC AGC GTG TCC GTC	61	204
Tet 30-FW Tet 30-RV	30	CAT CTT GGT CGA GGT GAC TGG ACG AGC ACC CAG CCG AGC	68	210

表 10 *tet* 遺伝子検出のための PCR 条件

TetT, Tet B(P)		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
46 °C	30 sec	25 cycles
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

Tet O		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	25 cycles
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

Tet M		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
55 °C	30 sec	25 cycles
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

Otr A		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
63 °C	30 sec	25 cycles
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

Tet Q		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
63 °C	30 sec	25 cycles
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

Tet S		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
50 °C	30 sec	25 cycles
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

Tet W		
94 °C	5 min	
94 °C	30 sec	
64 °C	30 sec	25 cycles
72 °C	30 sec	
72 °C	7 min	

Tet A, Tet B, Tet E, Tet H, Tet J, Tet Z		
94 °C	5 min	
94 °C	5 sec	
61 °C	30 sec	25 cycles
61 °C	7 min	

Tet C, Tet D, Tet G, Tet Y, Tet 30		
94 °C	5 min	
94 °C	5 sec	
68 °C	10 sec	25 cycles
68 °C	7 min	

表 11 テトラサイクリン耐性細菌分離株の分離源と *tet* 遺伝子型

Origin	Media ^a	No. of isolates	<i>tet</i> genes		
			Efflux genes	RPP genes	Unknown
Swine feces	PTYG	25	10	6	9
	Deso	28	20	4	4
	EF	21	1	20	0
	Subtotal	74	31	30	13
Poultry feces	PTYG	28	22	5	1
	Deso	26	17	6	3
	EF	30	0	30	0
	MRS	18	6	10	2
	Subtotal	102	45	51	6
Swine FYM	PTYG	18	4	7	7
	Deso	3	3	0	0
	Subtotal	21	7	7	7
Poultry FYM	PTYG	13	2	2	9
	Deso	10	2	4	4
	Subtotal	23	4	6	13
Cattle FYM	PTYG	10	8	2	0
	Deso	8	6	0	2
	Subtotal	18	14	2	2
Soil (swine FYM applied)	PTYG	9	2	3	4
Soil (poultry FYM applied)	PTYG	27	20	2	5
Soil (FYM not applied)	PTYG	32	11	8	13
Forest soil	PTYG	44	6	0	38
Total	All media	350	140	109	101

^a PTYG: PTYG agar medium for detection of heterotrophic bacteria; Deso: desoxycholate agar medium for detection of coliform bacteria; EF: EF agar medium for detection of enterococci; MRS: MRS agar medium for detection of lactic acid bacteria

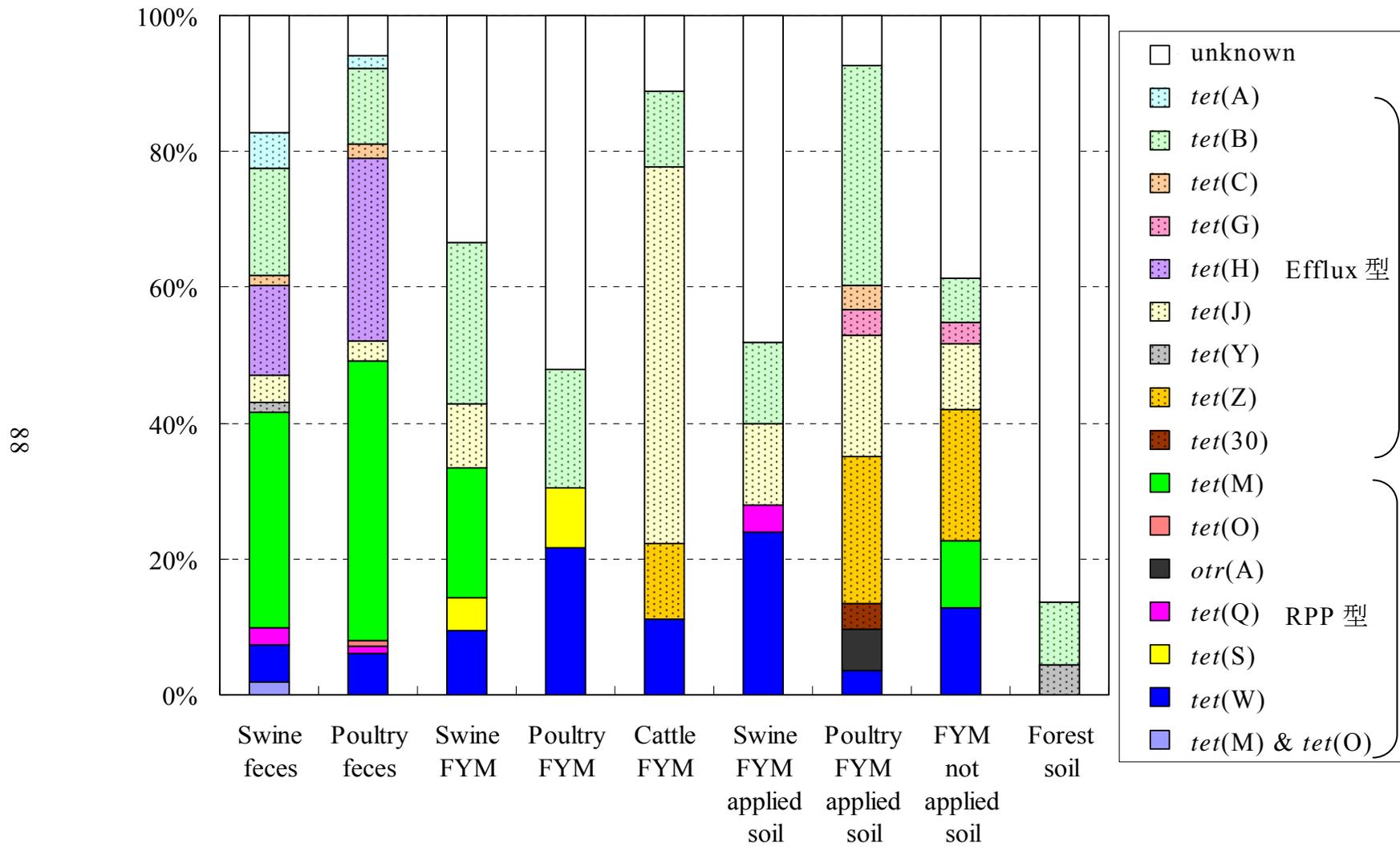


図 18 テトラサイクリン耐性遺伝子の検出

表 12.1 豚ふん分離株の *tet* gene の分布

Gene	Closest relatives	Medium	Isolates ^a
<i>tet</i> (A)	<i>Escherichia coli</i>	Deso	SFC4, SFC5, SFC7, SFC9
<i>tet</i> (B)	<i>Escherichia coli</i>	PTYG	SF8
		Deso	SFC1, SFC6, SFC10
	<i>Kurthia</i> sp.	PTYG	SF5, SF10
	<i>Serratia marcescens</i>	PTYG	SL10
		Deso	SLC1, SC1, SC3, SC6
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	PTYG	SL3
<i>tet</i> (C)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	EF	SFE1
<i>tet</i> (H)	<i>Escherichia coli</i>	Deso	SCC5, SCC7, SCC8, SCC9
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Deso	SLC10
	<i>Proteus mirabilis</i>	Deso	SLC7, SCC2, SCC3, SCC4, SCC6
<i>tet</i> (J)	<i>Serratia marcescens</i>	PTYG	SC5
	<i>Proteus mirabilis</i>	Deso	SLC8, SCC1
<i>tet</i> (Y)	<i>Acinetobacter</i> sp.	PTYG	SF6
<i>tet</i> (M)	<i>Enterococcus faecalis</i>	EF	SLE1, SLE2, SLE3, SLE4, SLE5, SLE6, SLE7, SLE8, SLE9, SLE10, SCE1, SCE2, SCE3, SCE4, SCE5, SCE6, SCE7, SCE8, SCE9, SCE10
		Deso	SFC3
		PTYG	SF2, SF4
		PTYG	SF7
<i>tet</i> (Q)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Deso	SLC9
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	PTYG	SL9
<i>tet</i> (W)	<i>Acinetobacter</i> sp.	PTYG	SF9
	<i>Escherichia coli</i>	Deso	SFC2, SFC8
	<i>Serratia marcescens</i>	PTYG	SC8

^a 表 4、分離株 I.D.を参照

表 12.2 鶏ふん分離株の *tet gene* の分布

Gene	Closest relatives	Medium	Isolates	
<i>tet(A)</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	PTYG	MF2, MF5	
<i>tet(B)</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	MRS	MFS3, MFS4	
	<i>Kurthia gibsonii</i>	MRS	IFS1, IFS2, IFS4	
	<i>Pediococcus sp.</i>	Deso	MFC1, MFC5	
	<i>Providencia heimbachae</i>	PTYG	MF6, MF7, MF8	
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	MRS	IFS3	
<i>tet(C)</i>	<i>Escherichia coli</i>	Deso	PCC3, PCC10	
<i>tet(H)</i>	<i>Alcaligenes sp.</i>	PTYG	PC4	
	<i>Escherichia coli</i>	PTYG	PC3, PC5, IF1, IF2, IF3, IF4, IF5, IF6, IF7, IF8	
		Deso	PCC4, PCC6, PCC8, PCC9, IFC1, IFC4, IFC5, IFC7, IFC9	
		PTYG	PC6	
	<i>Pediococcus sp.</i>	Deso	MFC4	
	<i>Proteus mirabilis</i>	Deso	IFC3	
	<i>Serratia marcescens</i>	PTYG	PC2	
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	PTYG	PC7, PC8, PC9	
	<i>tet(J)</i>	<i>Pediococcus sp.</i>	Deso	MFC6, MFC9
<i>Providencia heimbachae</i>		PTYG	MF4	
<i>tet(M)</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	EF	PCE1, PCE2, PCE3, PCE4, PCE5, PCE6, PCE7, PCE8, PCE9, PCE10, IFE1, IFE2, IFE3, IFE4, IFE5, IFE6, IFE7, IFE8, IFE9, IFE10, MFE1, MFE2, MFE3, MFE4, MFE5, MFE6, MFE7, MFE8, MFE9, MFE10	
		PTYG	PC1, PC10, IF9, IF10	
			Deso	IFC2, IFC8, IFC10
		<i>Kurthia gibsonii</i>	MRS	IFS5, IFS7, IFS8, IFS9
		<i>Kurthia zopfii</i>	MRS	IFS6
		<i>Proteus mirabilis</i>	MRS	IFS10
<i>tet(O)</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	EF	PCE1, PCE4
		<i>Pediococcus sp.</i>	Deso	MFC8
<i>tet(Q)</i>		<i>Providencia heimbachae</i>	PTYG	MF1
<i>tet(W)</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	MRS	MFS1, MFS2, MFS5, MFS10
	<i>Escherichia coli</i>	Deso	PCC1	
	<i>Pediococcus sp.</i>	Deso	MFC10	

表 12.3 家畜ふん堆肥分離株の *tet* gene の分布

Gene	Closest relatives	Medium	Origin	Isolates
<i>tet</i> (B)	<i>Escherichia coli</i>	PTYG	Swine FYM	SU4, SU5
	<i>Ochrobactrum grignonense</i>	Deso	Swine FYM	SRC1, SRC2, SRC4
<i>tet</i> (J)	<i>Escherichia coli</i>	PTYG	Swine FYM	SU7, SU10
<i>tet</i> (M)	<i>Bacillus</i> sp.	PTYG	Swine FYM	SU8
	<i>Escherichia coli</i>	PTYG	Swine FYM	SU3
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	PTYG	Swine FYM	SR1, SR2
<i>tet</i> (S)	<i>Escherichia coli</i>	PTYG	Swine FYM	SU6
<i>tet</i> (W)	<i>Paenibacillus</i> sp.	PTYG	Swine FYM	SU1, SU9
<i>tet</i> (B)	<i>Alcaligenes</i> sp.	Deso	Poultry FYM	MUC1
	<i>Bordetella</i> sp.	Deso	Poultry FYM	MUC7
	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	PTYG	Poultry FYM	PM3
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	PTYG	Poultry FYM	PM9
<i>tet</i> (S)	<i>Clostridium</i> sp.	Deso	Poultry FYM	MUC6
<i>tet</i> (W)	<i>Bordetella</i> sp.	Deso	Poultry FYM	MUC4, MUC8
	<i>Clostridium</i> sp.	Deso	Poultry FYM	MUC3
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	PTYG	Poultry FYM	PM1, PM2
<i>tet</i> (B)	<i>Serratia marcescens</i>	PTYG	Cattle FYM	BM3
		Deso	Cattle FYM	BMC2
<i>tet</i> (J)	<i>Serratia marcescens</i>	PTYG	Cattle FYM	BM2, BM4, BM5, BM6, BM8, BM9, BM10
		Deso	Cattle FYM	BMC1, BMC3, BMC6
<i>tet</i> (Z)	<i>Serratia marcescens</i>	Deso	Cattle FYM	BMC5, BMC7
<i>tet</i> (W)	<i>Serratia marcescens</i>	PTYG	Cattle FYM	BM1, BM7

表 12.4 土壤分離株の *tet gene* の分布

Gene	Closest relatives	Origin	Isolates
<i>tet(B)</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Soil (swine FYM applied)	AS4
<i>tet(J)</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	Soil (swine FYM applied)	AS9
<i>otr(A)</i>	<i>Serratia marcescens</i>	Soil (swine FYM applied)	AS1
<i>tet(W)</i>	<i>Flexibacter</i> sp.	Soil (swine FYM applied)	AS2, AS7
<i>tet(B)</i>	<i>Afipia massiliensis</i>	Soil (poultry FYM applied)	OT5, OT6, OT7, OT8, OT9, OT10
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Soil (poultry FYM applied)	OZ5, OZ6, OZ10
<i>tet(G)</i>	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	Soil (poultry FYM applied)	OZ1
<i>tet(J)</i>	<i>Nordella oligomobilis</i>	Soil (poultry FYM applied)	OT2, OT3, OT4
	<i>Serratia marcescens</i>	Soil (poultry FYM applied)	AP3, AP4
<i>tet(Z)</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Soil (poultry FYM applied)	AP5, AP6, AP8, AP10
	<i>Serratia marcescens</i>	Soil (poultry FYM applied)	AP2
<i>tet(Q)</i>	<i>Flexibacter</i> sp.	Soil (poultry FYM applied)	AP7
<i>tet(W)</i>	<i>Nordella oligomobilis</i>	Soil (poultry FYM applied)	OT1
<i>tet(B)</i>	<i>Lysobacter antibioticus</i>	Soil (FYM not applied)	OC5, OC6
<i>tet(G)</i>	<i>Flexibacter</i> sp.	Soil (FYM not applied)	KJ8
<i>tet(J)</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Soil (FYM not applied)	KN1
	<i>Lysobacter gummosus</i>	Soil (FYM not applied)	OC3
<i>tet(Z)</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Soil (FYM not applied)	KJ1, KJ2, KJ6, KJ7, KN2, KN3
<i>tet(M)</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Soil (FYM not applied)	KN9
	<i>Flexibacter</i> sp.	Soil (FYM not applied)	KN8, KN10
<i>otr(A)</i>	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Soil (FYM not applied)	KJ10
<i>tet(W)</i>	<i>Flexibacter</i> sp.	Soil (FYM not applied)	KA7, KA10, KJ4
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Soil (FYM not applied)	KN6
<i>tet(B)</i>	<i>Flexibacter</i> sp.	Forest soil	1-A-1, 1-A-3, 1-O-7
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Forest soil	2-A-4
<i>tet(Y)</i>	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	Forest soil	1-O-9
	<i>Dyella koreensis</i>	Forest soil	1-O-10

第6章 発酵リキッド飼料給与が抗生物質耐性菌割合に与える影響 (第1回目)

前章までの結果を受けて、抗生物質耐性菌対策の必要性が浮かび上がり、その一環として独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 機能性飼料研究チームとの共同研究を行った。抗生物質の代替効果が期待され注目されているプロバイオティクス飼料である発酵リキッドフィーディング飼料給与による耐性菌割合への影響を調べることによって、抗生物質使用と家畜腸内での耐性菌出現の関係、発酵リキッドフィーディングにより腸内細菌の耐性の増加が抑制されるのか、といった具体的解決案の有効性の評価を行った。

6.1 材料および方法

6.1.1 供試動物

2004年12月23日生まれの同腹のLWD交雑種子豚を5頭用い、生後4週齢で離乳し、個別飼育を行った。母豚にはクロルテトラサイクリンとリンコマイシンの投与歴があった。また、子豚には離乳までリンコマイシン、カナマイシン、セフトオフルの投与歴があった。

離乳後、試験区1. 子豚用人工乳飼料(表13)を同量の水と混合(以下対照区)―2頭、試験区2. 発酵リキッド(以下発酵区)―3頭の2区に分け、8週齢まで飼育した(写真9)。

また参考までに母豚、子豚ともに全く抗生物質の投与歴がないバークシャー種の離乳子豚について、生後5週齢の糞便を採取し同様に実験を行った(E-farm区、写真10)。この子豚の飼料内容は食品残渣、コーンミール、米ぬか、薫煎黄粉、魚粉、糖蜜、炭酸カルシウム、第2リン酸カルシウム、ビタミンを配合したものであった。

6.1.2 飼料調製と管理

発酵リキッドは子豚用人工乳飼料に乾物率30%となるように加水し、*Lactobacillus plantarum* LQ80と*Bacillus subtilis* LQ13の複合スターター菌液を培

養開始時にそれぞれ 10^6 CFU/ml になるように添加し、24 時間、37 °C で培養した。培養後、pH 測定で pH4.0 以下であることにより発酵終了を確認し、4 °C で保存した。

6.1.3 大腸菌の検出および分離

新鮮糞便は離乳後 0、7、14、21、28 日後に、直腸刺激により 5 g 程度を採取した。飼料は、採取後直ちに乾物重の測定、細菌検出に供した。

- ① 試料 0.3 g を 2.7 ml の検体希釈液 (KH_2PO_4 4.5 g、 Na_2HPO_4 6.0 g、L-cystein·HCl·H₂O 0.5 g、Tween 80 0.5 g、Agar 1.0 g/L) に加え、30 分間激しく振盪した。
- ② 一次希釈液 100 μl を 900 μl の希釈液に加えて攪拌した。(10² 希釈液)
- ③ 同じ要領で順次 10³-10¹⁰ 希釈液を作成した。
- ④ Desoxycholate 培地のプレート表面に希釈液 100 μl を塗布した。各希釈液 3 段階について 2 枚ずつのプレートを使用し、3 連で行った。
- ⑤ 37 °C で 24 時間静置培養し、生育したコロニー数を計測した。
- ⑥ 1 区 60 コロニーを無作為に選び、LB 平板培地に白金耳で植菌し、37 °C で 24 時間生育させた。
- ⑦ コロニー生育後、単コロニーを LB 液体培地 5 ml に移植し、37 °C で 24 時間振盪培養した。
- ⑧ 培養液を希釈し、順次作成した希釈液を、再度 LB 平板培地に 100 μl を塗布し、37 °C で 24 時間静置培養した。
- ⑨ ⑦、⑧の作業をさらに 2 回行い、細菌を純粋分離した。
- ⑩ 菌数 1×10^8 /ml 程度になるように液体培養をし、終濃度 50 %になるように滅菌グリセロールと混合し、-80 °C で保存した。
- ⑪ 単離した菌株から DNA を抽出し、16S rDNA のシーケンス解析により、菌の同定を行った。

6.1.4 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards、現 CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute) 法⁵⁷⁾ に準拠した薬剤感受性試験

子豚排泄物から全 600 株の大腸菌を分離し、カナマイシンとテトラサイクリンに対する抗生物質感受性試験を行った。

① カナマイシン、テトラサイクリン原末を希釈溶液に溶解して薬剤原液を調製した。

薬剤有効量 ($\mu\text{g/ml}$) \times 薬剤の秤量 (mg) / 原液の濃度 ($\mu\text{g/ml}$) = 溶媒量 (ml)

② 抗生物質 1,280 $\mu\text{g/ml}$ マスターA 液を 12 ml 作成し、フィルターろ過滅菌を行った。

③ 表 14 に従い、滅菌水を用いて希釈を行った。

④ Muller-Hinton Agar (Difco) 23.21 g を 550 ml の蒸留水に添加し、オートクレーブし、50 °C で保持した。

⑤ 角型シャーレに③で調製した抗生物質希釈液を 4 ml と Muller-Hinton Agar 36 ml を入れ、混合し固化させた。同時に、薬剤無添加の対照平板も作成した。

⑥ 6.1.2 で保存した披検株を TRYPT-SOY BROTH (Eiken Chemical Co., Bunkyo, Japan) 内で増殖させ、滅菌生理食塩水で菌数 1×10^8 CFU/ml 程度になるように調製した。

⑦ 調製した接種菌液を滅菌 96 穴プレートに 100 μl ずつ分注した。

⑧ 火炎滅菌したマルチピンブロッターを用いて接種用菌液を抗生物質含有平板および対照平板にスポットした。

⑨ 寒天平板表面の菌液が完全に乾いた後、35 °C で 16-20 時間培養し、生育の有無によって判定を行った。

6.2 結果

子豚排泄物から全 600 株の大腸菌を分離し、大腸菌の抗菌スペクトルに入っているカナマイシンとテトラサイクリンに対する抗生物質感受性試験を行った。エンドポイントの決定は、接種起因の薬剤含有培地での発育が完全に阻害された薬剤の最小濃度をエンドポイントと判定し、その値を最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration) とした。また、*E.coli* ATCC25922 を精度管理菌株として使用した。写真 11 に、感受性試験の一例を示す。

6.2.1 大腸菌数

離乳日を 0 日目として 28 日目まで 1 週間毎に大腸菌の計数を行った (図 20)。対照区は $2.75 \times 10^5 \sim 3.38 \times 10^9$ CFU/g DM、発酵区は $7.43 \times 10^5 \sim 3.81 \times 10^9$ CFU/g DM の間で推移したが、処理区による差、日数による増減などの傾向は見られなかった。

E-farm 区では、3 頭について調べた結果、 $2.63 \times 10^8 \sim 3.46 \times 10^8$ CFU/g DM であった。

6.2.2 最小発育阻止濃度 (MIC)

分離した細菌はシーケンス解析によって 600 株すべてが *Escherichia coli* であることが確認された。これらの感受性試験の結果を表 15.1、15.2 に示す。

カナマイシン感受性試験においては、対照区、発酵区ともに MIC 値が 1~4 $\mu\text{g/ml}$ の菌株が数株と $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ の菌株が 80 % 程度という二峰性を示した。また、両区ともに MIC50 が 0 日目から 28 日目まで継続して $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ であり、高度耐性株が多くを占めていた。E-farm 区では、MIC50 が 0.25 $\mu\text{g/ml}$ であり耐性株は 1 株しかなく、対照区、発酵区の全ての期間と比較して、最も感受性が高かった。

テトラサイクリン感受性試験においては、対照区では MIC50 (50 % の発育を阻止する MIC 値) が 14 日目で 64 $\mu\text{g/ml}$ であった以外は 128 $\mu\text{g/ml}$ であった。発酵区では、MIC50 が 0 日目、7 日目は 128 $\mu\text{g/ml}$ であったが、14 日目以降は 64 $\mu\text{g/ml}$ に減少し、MIC 値が 0.5、1 $\mu\text{g/ml}$ の菌株が増加した。 $\geq 128 \mu\text{g/ml}$ の高度耐性株も、対照区では 28 日目まで検出されたのに対し、発酵区では 7 日目以

降は見られなかった。また、E-farm 区では MIC50 が 64 $\mu\text{g/ml}$ であり、MIC 値が 0.25、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の菌株が 24 株と 40 %を占めており、対照区、発酵区の全ての期間と比較して、最も感受性が高かった。

6.2.3 抗生物質耐性菌割合

NCCLS ガイドラインによる *E.coli* の薬剤耐性ブレイクポイント基準を参考に、カナマイシンは $\text{MIC} \geq 64 \mu\text{g/ml}$ 、テトラサイクリンは $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ を耐性であると判断した。

カナマイシン耐性は、0 日目では耐性割合が 95.0 %と非常に高く、7 日目においては対照区で 98.3 %、発酵区で 83.3 %と耐性割合の違いが見られたが、14 日目と 21 日目では逆転し、28 日目ではそれぞれ 80.0 と 81.6 %、と同程度になっており、明確な差は得られなかった (図 21)。E-farm 区では、0 日目が 1.7 %と非常に低い耐性割合であった。

テトラサイクリン耐性は、0 日目では耐性割合が 100 %と非常に高く、両区とも 21 日目までは 93.3 %以上であったが、28 日目では、対照区が 100 %であったのに対し、発酵区では 71.7 %となり、減少する傾向が見られた。E-farm 区では、0 日目が 58.3 %と発酵区の 28 日目よりも低い耐性割合であった。

6.3 考察

6.3.1 薬剤耐性モニタリングの重要性

我が国における家畜衛生分野における最初の全国的な薬剤耐性調査は、昭和 51 年度及び昭和 52 年度に農林水産省畜産局が実施した実態調査⁶⁶⁾である。当時、食用動物由来薬剤耐性菌の公衆衛生への影響が盛んに議論されており、抗菌性物質の畜産物への残留や薬剤耐性菌の増加による公衆衛生への影響を配慮した「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」（昭和 51 年施行）が成立した時期であった。そこで、同法に基づく規制前後の薬剤耐性菌の実態を把握することを目的として、薬剤耐性調査が実施されたものであった。その後、数回にわたり全国的な調査が行われたが、いずれも単発的であり継続的な調査は実施されていなかった。

1980 年代、世界保健機関 (WHO) は、ヒト医療における薬剤耐性菌問題の原因が食用動物に抗菌性物質を使用することにあるとの観点から、食用動物における抗菌性物質の使用を禁止若しくは制限しようとするキャンペーンを展開した⁸⁶⁾。しかし、これらの会議では、ヒト由来薬剤耐性菌の出現と食用動物への抗菌性物質の使用との因果関係の実証に至らなかった。その一因として食品媒介性病原菌の薬剤耐性に関する科学的なモニタリング情報の欠如が挙げられた。一方、家畜衛生の専門国際機関である国際獣疫事務局 (OIE) は、家畜衛生及び公衆衛生上問題となる薬剤耐性菌を制御するための戦略の一つとして、国際的に比較可能な薬剤耐性モニタリングの重要性を指摘した⁷¹⁾。

現在、家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング体制としては、欧州連合 (EARSS; European Antimicrobial Resistance Surveillance System)²³⁾、WHO (WHONET; WHO Network on Antimicrobial Resistance Monitoring)⁹⁴⁾、デンマーク (DANMAP; Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme)¹⁸⁾、米国 (NARMS; National Antimicrobial Resistance Monitoring System)⁵⁵⁾、スウェーデン (SVARM; Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring)⁸⁵⁾ 等の活動が知られている。

日本では、平成 7 年度から製造物責任法対応として実施していた家畜病原細菌の薬剤耐性調査に加え、平成 11 年度から健康動物由来食品媒介性病原細菌及

び指標細菌の全国的な薬剤耐性調査を開始した。さらに、平成12年度からは、畜産振興総合対策事業に基づき全国の家畜保健衛生所の全面的な支援を受け、全国的な薬剤耐性ネットワークを構築し、薬剤耐性モニタリング体制JVARM (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System)を整備した⁶³⁾。

6.3.2 抗生物質使用停止と発酵リキッドの効果

前章までの研究で、家畜由来の耐性菌がその後の物質循環の流れの中で、環境中の細菌にも影響を与える事例があり、その耐性遺伝子の宿主となる細菌も多様性に富んだものであることが明らかになった。しかし、長期、広範囲で行われたモニタリング結果からは、個々の農場における抗菌剤の使用と耐性菌の出現には必ずしも相関が認められない事例があるとの報告（厚生労働省科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業 H15-食品-012）や、デンマークでは1999年に成長促進目的での抗生物質投与を禁止した結果、耐性割合は年々減少したが、治療薬としての使用が増加してしまったという報告¹⁾があり、単純に抗生物質使用を中止すれば問題が解決するわけではないということが認識され始めた。また、家畜生産現場では、耐性菌蔓延防止のため、数年ごとに薬剤の種類を変えることや、抗生物質使用量の低減を目指して代替品を取り入れる動きが行われ始めた^{30, 84)}。しかし、それらの新たな取り組みに対する効果を科学的に評価するための基礎データが不足しているのが現状である。

抗生物質の代替品として期待される飼料添加物として、プロバイオティクス（培養微生物製品）、プレバイオティクス（オリゴサッカライド製品）、有機酸（プロピオン酸とギ酸等の単味または複合製品）、天然濃縮物（植物抽出物や漢方薬など）が挙げられる。

本研究では、畜産草地研究所機能性飼料研究チームと共同で乳酸菌発酵飼料である発酵リキッドフィーディングによるプロバイオティクス効果を抗生物質耐性菌の観点から検証した。乳酸発酵を利用したリキッドフィーディングは、家畜消化管内における微生物叢の改善、pH低下による有害微生物の除去、免疫賦活化の効果があることが多数報告されており、注目されている技術である³⁹⁾。

疾病にかかりやすい離乳子豚に対し、実験豚舎の通常管理ではリンコマイシ

ン、カナマイシン、セフトオフルの投与が行われているが、本実験の供試動物には、離乳日以降は全く薬剤を使用しなかった。子豚が耐性を獲得する方法としては、母豚から母乳や血液を通した垂直伝播、畜舎環境からの水平伝播などが考えられる。今回の実験では、離乳前は母豚舎で群飼いされており、様々な感染があったと推測されるが、離乳後は母豚舎とは別の畜舎での個別飼育を行ったので、すでに獲得してしまった耐性菌が抗生物質という選択圧がなくなったこと、発酵リキッドフィーディングというプロバイオティクス微生物の導入の2点についてどのように変動するかに着目した。

母豚にはクロルテトラサイクリンとリンコマイシンの投与歴があった。また、子豚には離乳までリンコマイシン、カナマイシン、セフトオフルの投与歴があった。この中で、抗菌スペクトル内に大腸菌が入っている薬剤はクロルテトラサイクリンとカナマイシンである²²⁾。

MIC 測定による抗生物質耐性菌割合調査の結果、テトラサイクリン耐性は、離乳直後の0日目では耐性割合が100%、21日目まで93.3%以上と非常に高かったが、28日目において発酵区では71.7%となり、減少した(図21)。28日目における対照区と発酵区のMIC値のt検定の結果から $p < 0.01$ で有意差があった。子豚は直接クロルテトラサイクリンへの暴露がなかったことから、母豚が獲得した耐性菌が子豚にも垂直伝播した可能性が高いと推測される。離乳後、通常の子豚用粉餌の給与ではテトラサイクリン耐性菌割合は減少しなかったが、発酵リキッド給餌により、テトラサイクリン耐性菌の割合が減少することが示された。また、大腸菌数の計数結果と照らし合わせてみても、28日目において発酵区の3頭はいずれも菌数は増加しておらず(図20)、腸内全体のテトラサイクリン耐性菌数が減少したことが明らかになった。

カナマイシン耐性については、離乳直後の0日目では耐性割合が95.0%であったが、28日目においては対照区、発酵区ともに81.7%までに減少する傾向が見られたが、統計検定による有意差は得られなかった。カナマイシンは、出生日、1週目、2週目、3週目と計4回に渡って離乳直前まで鼻噴霧による接種が行われていた。このため、耐性菌のほとんどが $MIC \geq 128$ の高度耐性菌であり(表15.1)、耐性減少には繋がらなかったと推測される。

6.3.3 E-farm 区の抗生物質耐性

母豚へも抗生物質が全く使用されていない E-farm 区では、テトラサイクリン耐性については 58.3 %と発酵区の 28 日目の 71.7 %よりもさらに低い耐性割合であった。また、カナマイシン耐性については、1.7 %と非常に低い耐性割合であった。

これらのことから、E-farm 区における母豚の腸内では耐性菌が極めて少なく、子豚への垂直伝播のリスクが抑制されていた可能性が示唆された。しかし、E-farm の畜舎は雑木林を開墾した広い開放系の土壌の上で飼育されていたため、周辺環境からの耐性菌の流入の可能性は否定できない。また、実験家畜は個体差の大きい動物でもあり、畜産草地研究所の 5 頭、E-farm の 3 頭のみと比較では不十分である。しかしながら、それらを考慮しても、E-farm の子豚腸内は、極めて抗生物質耐性菌の少ないことが明らかになり、抗生物質使用と耐性菌の出現には関係性があり、発酵リキッドフィーディングというプロバイオティクス微生物の導入により、耐性菌を減少させることができるのではないかという可能性が示された。

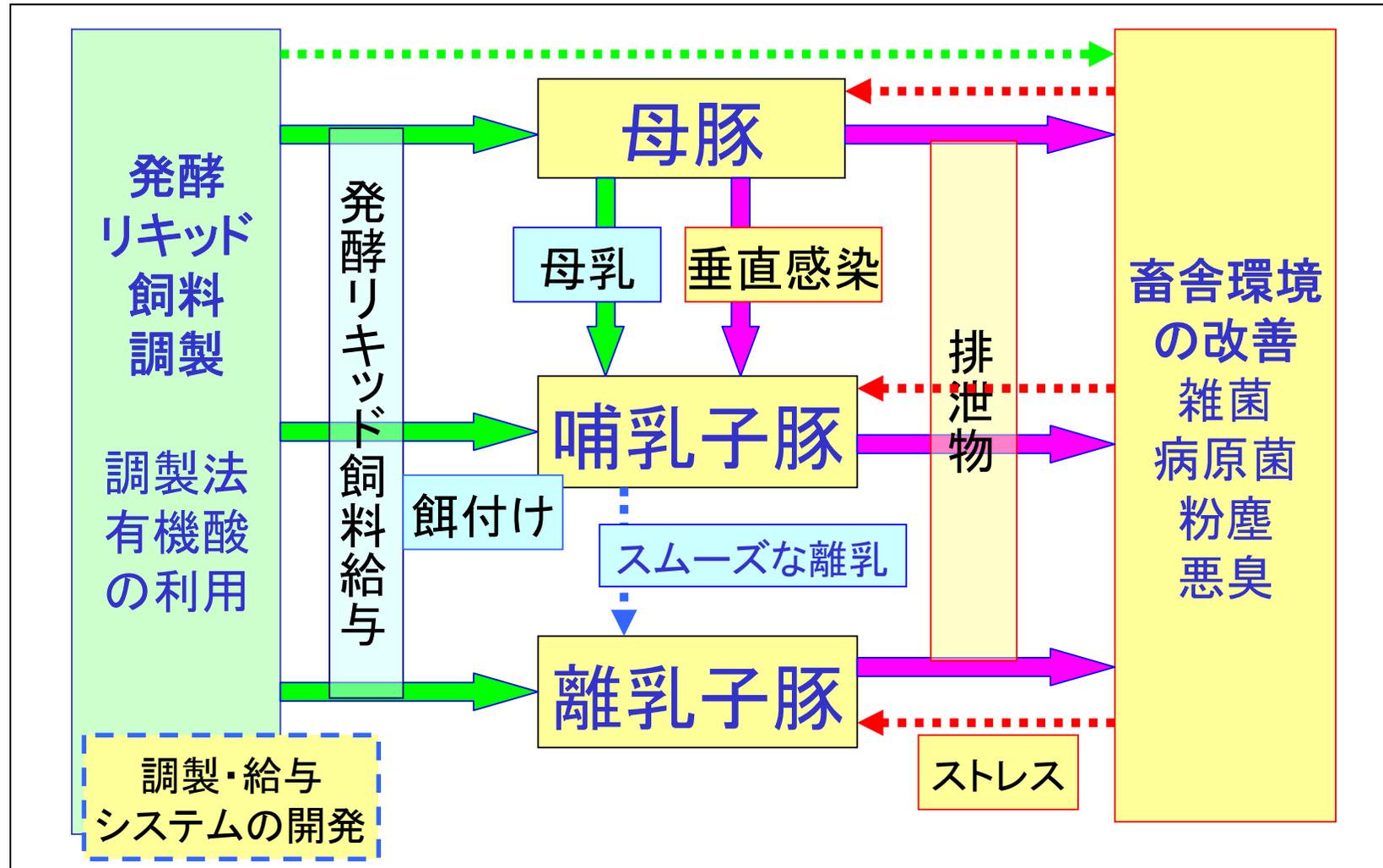


図 19 発酵リキッドフィーディングによる抗菌性飼料添加物に頼らない
母豚・子豚の飼養管理技術の開発

表 13 子豚用人工乳飼料組成

対照飼料、発酵リキッド飼料			抗生物質区飼料		
原料	現物%		原料	現物%	
トウモロコシ	33.73		トウモロコシ	33.73	
大豆粕	25.00		大豆粕	25.00	
脱脂粉乳	12.00		脱脂粉乳	12.00	
小麦粉	8.00		小麦粉	8.00	
ふすま	2.00		ふすま	2.00	
砂糖	5.00		砂糖	5.00	
コーンスターチ	5.35		コーンスターチ	5.35	
大豆油	4.00		大豆油	4.00	
第2リン酸カルシウム	2.50		第2リン酸カルシウム	2.50	
炭酸カルシウム	0.60		炭酸カルシウム	0.60	
食塩	0.50		食塩	0.50	
リジン塩酸塩	0.30		リジン塩酸塩	0.30	
DL-メチオニン	0.25		DL-メチオニン	0.25	
トレオニン	0.12		トレオニン	0.12	
エーフィードE-SB	0.20	(ビタミン)	エーフィードE-SB	0.20	(ビタミン)
ネオービーフィードM	0.25	(ビタミン)	ネオービーフィードM	0.25	(ビタミン)
ネオーミネフィードM	0.20	(ミネラル)	ネオーミネフィードM	0.20	(ミネラル)
酸化クロム	0.10		酸化クロム	0.10	
			アビラマイシン	0.04	(抗生物質)
			硫酸コリスチン	0.20	(抗生物質)
			クエン酸モランテル	0.01	(抗生物質)
合計	100.1		合計	100.35	



写真9 LWD 交雜種子豚 (3週齡)



写真 10 バークシャー種子豚 (5 週齢)

表 14 抗生物質希釈方法

段階	マスター希釈濃度 ($\mu\text{g/ml}$)		容量 (ml)	希釈用滅菌水 (ml)	中間濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	寒天平板での最終濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	Log ₂
1	1,280	A 液	4.0	0.0	1,280	128	9
2	1,280	A 液	2.5	2.5	640	64	8
3	1,280	A 液	1.5	4.5	320	32	7
4	1,280	A 液	1.0	7.0	160	16	6
5	160	B 液	2.5	2.5	80	8	5
6	160	B 液	1.5	4.5	40	4	4
7	160	B 液	1.0	7.0	20	2	3
8	20	C 液	2.5	2.5	10	1	2
9	20	C 液	1.5	4.5	5	0.5	1
10	20	C 液	1.0	7.0	2.5	0.25	0
11	2.5	D 液	2.5	2.5	1.25	0.125	-1
12	2.5	D 液	1.5	4.5	0.625	0.625	-2
13	2.5	D 液	1.0	7.0	0.3125	0.03125	-3

マスター希釈 A 液—A 液 12 ml (1,280 $\mu\text{g/ml}$)

マスター希釈 B 液—A 液 1 ml + 滅菌水 7 ml (160 $\mu\text{g/ml}$)

マスター希釈 C 液—B 液 1 ml + 滅菌水 7 ml (20 $\mu\text{g/ml}$)

マスター希釈 D 液—C 液 1 ml + 滅菌水 7 ml (2.5 $\mu\text{g/ml}$)

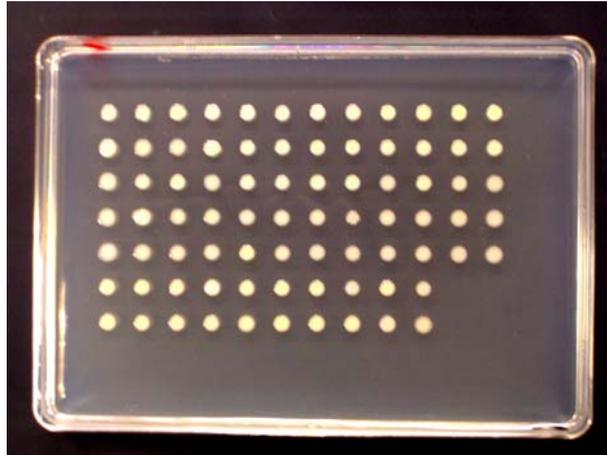


写真 11.1 Control 平板

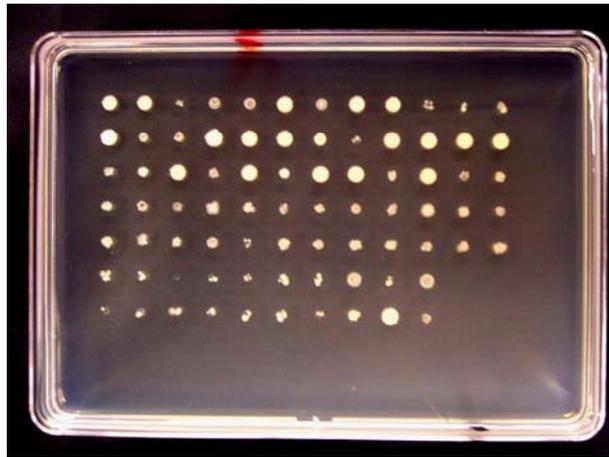


写真 11.2 Ceftiofur 0.25 μ g/ml 平板

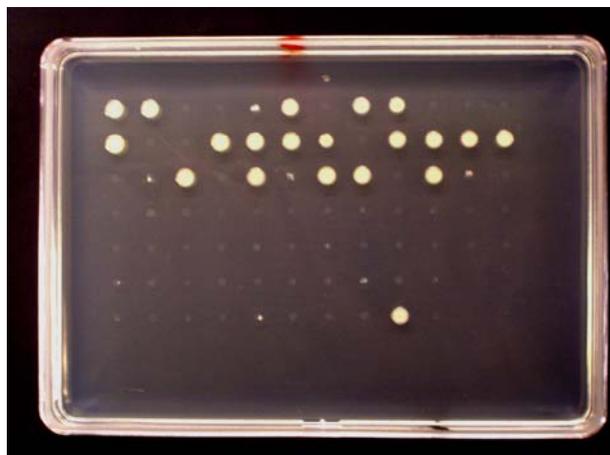


写真 11.3 Ceftiofur 0.5 μ g/ml 平板

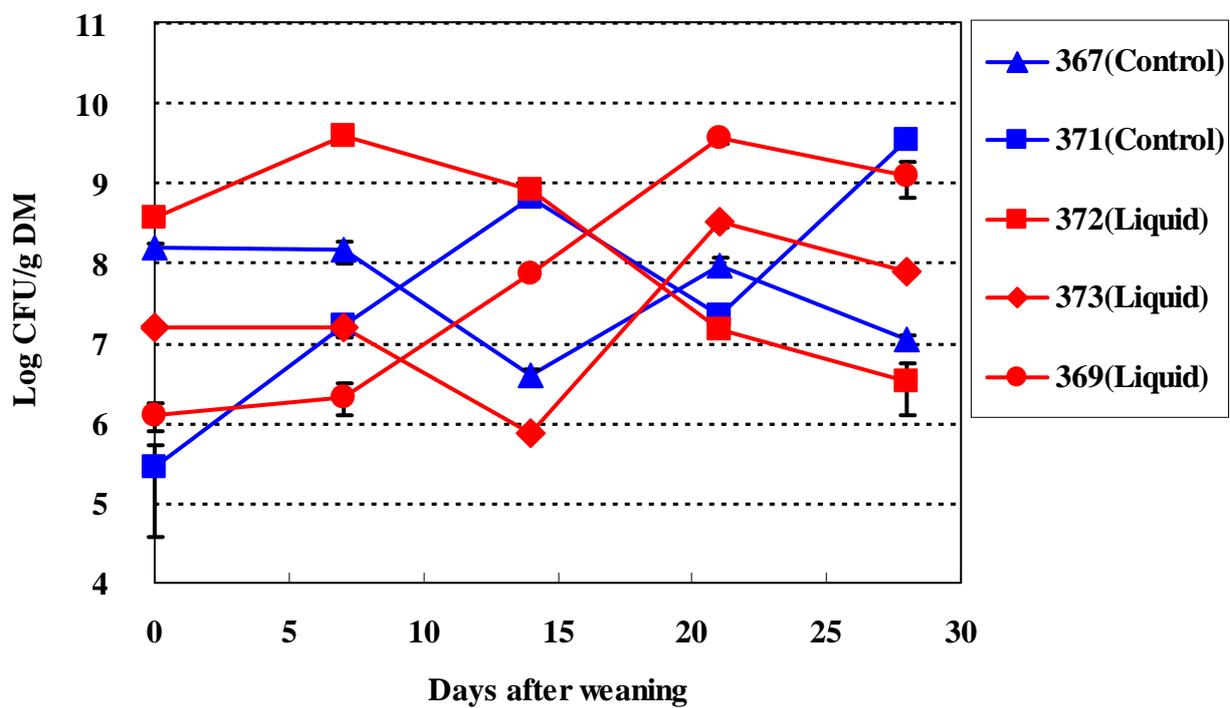


図 20 離乳後の個体別大腸菌数

表 15.1 大腸菌のカナマイシン感受性試験結果表

Days after weaning	No. of isolate	MIC($\mu\text{g/ml}$)														
		0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 128	
Cont	0	60					2		1							57
	7	60						1								59
	14	60					6	2	1							51
	21	60							10							50
	28	60					6	5						1		48
Liq	0	60					2		1							57
	7	60					7	3								50
	14	60					1	4								55
	21	60					2	3								55
	28	60					11									49
E-farm	0	60			40	11	7	1								1

Cont: Control、Liq: Liquid

赤線が耐性のブレイクポイント

表 15.2 大腸菌のテトラサイクリン感受性試験結果表

Days after weaning	No. of isolate	MIC($\mu\text{g/ml}$)													
		0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 128
Cont	0	60											3	54	3
	7	60											28	32	
	14	60				1	3						29	27	1
	21	60											17	43	
	28	60											7	48	5
Liq	0	60											3	54	3
	7	60				2	1					1		56	
	14	60			2								38	20	
	21	60				3							53	4	
	28	60				2	14		1				28	15	
E-farm	0	60			10	14				1			1	32	2

Cont: Control、Liq: Liquid

赤線が耐性のブレイクポイント

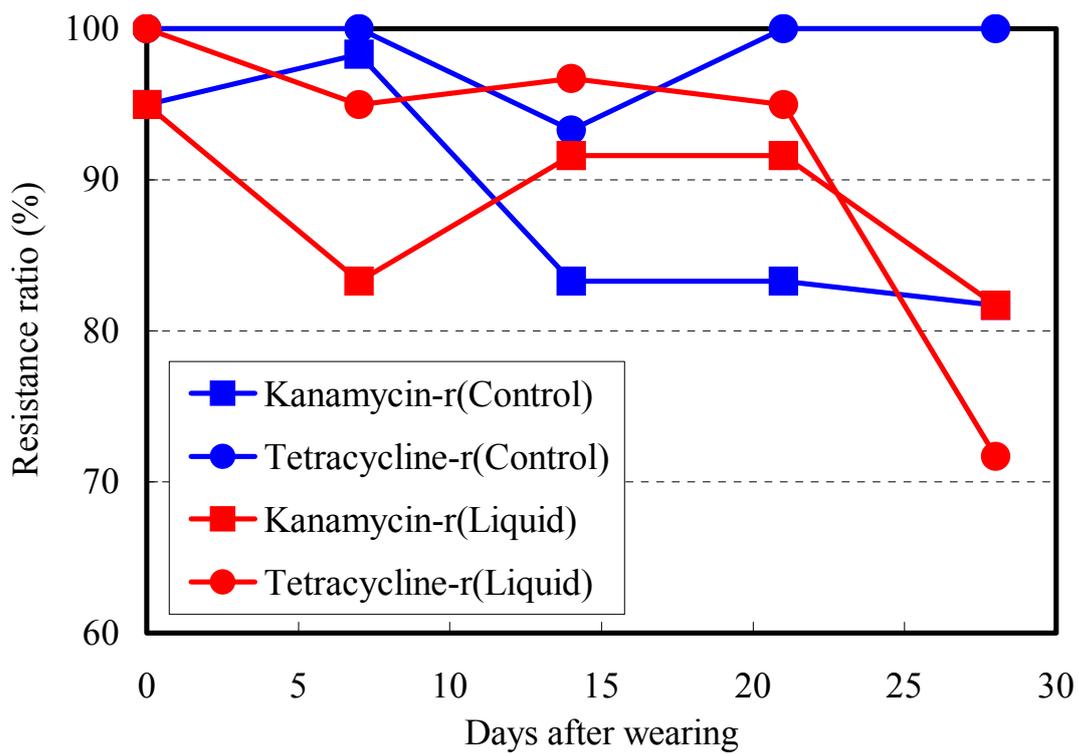


図 21 離乳子豚大腸菌の耐性菌割合
(各区 n=300 菌株)

第7章 発酵リキッド飼料給与が抗生物質耐性菌割合に与える影響 (第2回目)

前章に引き続き、発酵リキッドフィーディングが抗生物質耐性菌に与える影響を評価した。第1回目は大腸菌だけを対象にしていたが、第2回目は乳酸菌も分離し、同様に感受性試験を行った。

7.1 材料および方法

7.1.1 供試動物

2006年3月20日生まれのLWD種子豚を9頭用い、生後4週齢で離乳し、個別飼育を行った。同腹の子豚で、母豚にはクロルテトラサイクリンとリンコマイシンの投与歴があった。また、子豚には離乳までリンコマイシン、カナマイシン、セフトオフルの投与歴があった。

離乳後、試験区1. 子豚用人工乳飼料（以下対照区）—3頭、試験区2. 子豚用人工乳飼料にアピラマイシン、コリスチン添加（以下抗生区）—3頭、試験区3. 発酵リキッド（以下発酵区）—3頭の3区に分け、8週齢まで飼育した（表13、写真13.1-13.3）。

7.1.2 飼料調製と管理

発酵リキッドは子豚用人工乳飼料に乾物率30%となるように加水し、*Lactobacillus plantarum* LQ80 スターター菌液を培養開始時に 10^6 /mlになるように添加し、24時間、37°Cで培養した。培養後、pH測定で発酵終了を確認し、4°Cで保存した（写真12）。

7.1.3 大腸菌と乳酸菌の検出および分離

大腸菌の検出および分離は第6章と同様に行った。乳酸菌については、改変LBS培地{LBS寒天培地: Pancreatic digest of casein 10.0 g、Yeast extract 5.0 g、Monopotassium phosphate 6.0 g、Ammonium citrate 2.0 g、Dextrose 20.0 g、Polysorbate80 1.0 g、Sodium acetate hydrate 25.0 g、Magnesium sulfate 0.575 g、

Manganese sulfate 0.12 g、Ferrous sulfate 0.034 g、Agar 15.0 g (Becton, Dickinson and Co.) を 84.0 g、Lab-lemco powder (Oxoid Unipath, Basingstoke, England) 8.0 g、Sodium acetate 3H₂O 15.0 g/L をオートクレーブ後 Acetic acid 2.4 ml/L 添加} を用いて 37 °C で 48 時間静置し嫌気培養で検出を行い、GAM 培地 (Nissui) : Peptone 10.0、Soi peptone 3.0、Protease peptone 10.0、Hydrolyzed serum powder 13.5、Yeast extract 5.0、Meat extract 2.2、Liver extract 1.2、Glucose 3.0、KH₂PO₄ 2.5、NaCl 3.0、Soluble starch 5.0、L-cystein-HCl 0.3、Thioglycolate-sodium salt 0.3、Agar 15.0 g/L を用いて嫌氣的に分離した。

7.1.4 NCCLS 法に準拠した薬剤感受性試験

子豚排泄物から 540 株の乳酸菌と 434 株の大腸菌を分離し、乳酸菌に対してはアビラマイシン、大腸菌に対してはコリスチンとテトラサイクリンについて感受性試験を行った。

アビラマイシン、コリスチン、テトラサイクリン原末を希釈溶液に溶解して薬剤原液を調製し、6.1.4 と同様の方法で感受性試験を行った。乳酸菌の感受性試験平板には Muller-Hinton Agar の代わりに GAM Agar を用い、嫌気培養条件下 35 °C で 16-20 時間培養し、生育の有無により判定を行った。

7.2 結果

子豚排泄物から 540 株の乳酸菌と 434 株の大腸菌を分離し、乳酸菌に対してはアピラマイシン、大腸菌に対してはコリスチンとテトラサイクリンについて感受性試験を行った。エンドポイントの決定は、接種起因の薬剤含有培地での発育が完全に阻害された薬剤の最小濃度をエンドポイントと判定し、その値を最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration) とした。また、*E.coli* ATCC25922 を精度管理菌株として使用した。乳酸菌については精度管理株が示されていないが、NCCLS の嫌気性菌感受性試験標準法に準拠して行った G001)。

7.2.1 乳酸菌

7.2.1.1 乳酸菌数

離乳日を 0 日目として 28 日目まで 1 週間毎に乳酸菌の計数を行った(表 16、図 22)。0 日目においては全区で $5.06 \times 10^5 \sim 4.46 \times 10^9$ CFU/g DM、28 日後においては対照区で $8.62 \times 10^8 \sim 2.67 \times 10^{10}$ CFU/g DM、抗生区で $8.98 \times 10^9 \sim 5.78 \times 10^{10}$ CFU/g DM、発酵区で $1.11 \times 10^{10} \sim 3.36 \times 10^{12}$ CFU/g DM であった。発酵区においては、14 日目で検出されたコロニーの 50 %、21 日目で検出されたコロニーの 100 %が飼料添加菌 *Lactobacillus plantarum* LQ80 であることが形態観察、遺伝子解析によって確認された。

7.2.1.2 最小発育阻止濃度 (MIC)

540 株の分離細菌のアピラマイシン感受性試験の結果を表 18 に示す。

対照区においては MIC 値が 0 日目から 28 日目まで継続して $1 \sim \geq 128$ $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、日数経過による増減は見られなかった。抗生区においては、0 日目には MIC 値の範囲が $2 \sim \geq 128$ $\mu\text{g/ml}$ であったが、28 日目には $16 \sim \geq 128$ $\mu\text{g/ml}$ とシフトした。発酵区においても、0 日目には MIC 値の範囲が $2 \sim \geq 128$ $\mu\text{g/ml}$ であったが、28 日目には 36 株全て 128 $\mu\text{g/ml}$ と集束した。

7.2.2 大腸菌

7.2.2.1 大腸菌数

離乳日を 0 日目として 28 日目まで 1 週間毎に大腸菌の計数を行った(表 17、

図 22)。0 日目においては全区で $3.07 \times 10^9 \sim 1.43 \times 10^{10}$ CFU/g DM、28 日後においては対照区で $6.50 \times 10^3 \sim 3.61 \times 10^6$ CFU/g DM、抗生区で検出限界以下 $\sim 5.71 \times 10^2$ CFU/g DM、発酵区で $1.09 \times 10^4 \sim 1.46 \times 10^5$ CFU/g DM であった。抗生区の 7 日目では 3 頭、14 日目、21 日目および 28 日目では一部検出限界以下にまで減少した。

7.2.2.2 最小発育阻止濃度 (MIC)

434 株の分離細菌のコリスチン感受性試験の結果を表 19.1 に示す。対照区においては MIC 値が 0 日目から 28 日目まで 14 日目の 1 株を除くすべての株では継続して 1~8 $\mu\text{g/ml}$ の範囲にあり、日数経過による増減は見られなかった。発酵区においても、0 日目には MIC 値の範囲が 2~4 $\mu\text{g/ml}$ であったが、28 日目には 2~64 $\mu\text{g/ml}$ とややシフトしたが、対照区と発酵区の MIC90 の値は 14 日目以外すべて 4 $\mu\text{g/ml}$ と変わらなかった。抗生区においては、0 日目には MIC 値の範囲が 2~4 $\mu\text{g/ml}$ であったが、28 日目には 4~128 $\mu\text{g/ml}$ とシフトした。抗生区では、7 日目以降、検出された大腸菌が少なかったため 36 株を分離できなかったが、MIC90 の値は 14 日目では 64 $\mu\text{g/ml}$ 、21、28 日目では 128 $\mu\text{g/ml}$ と日数とともに高くなる傾向が見られた。

360 株のテトラサイクリン感受性試験の結果を表 19.2 に示す。対照区においては MIC 値が 32~64 $\mu\text{g/ml}$ であり、全てブレイクポイント以上であった。日数の経過とともに、1~128 $\mu\text{g/ml}$ と範囲が広がっていったが、MIC50 の値は 0 日目から 28 日目まで継続して 32~64 $\mu\text{g/ml}$ であった。発酵区においては 7 日目に MIC 値が 2~8 $\mu\text{g/ml}$ の菌株が出現し始め、28 日目には 0.125~64 $\mu\text{g/ml}$ とシフトし、MIC50 の値は発酵区においては 28 日目に 0.5 $\mu\text{g/ml}$ まで低下した。

7.2.2.3 抗生物質耐性菌割合

NCCLS ガイドラインによる *E.coli* の薬剤耐性ブレイクポイント基準を参考に、コリスチンは $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ 、テトラサイクリンは $\text{MIC} \geq 16 \mu\text{g/ml}$ を耐性であると判断した。

コリスチン耐性は、0 日目では耐性割合が 0 % と非常に低く、最も高い割合でも対照区で 2.7 %、発酵区で 8.3 % と同程度になっており、明確な差は得られ

なかった。抗生区では、分離菌株数が少なく正確な集団の割合を表す値ではないが、14日目から耐性割合が100%になり、21日目で37.5%、28日目で50.0%であった。

母豚に与えられていたクロルテトラサイクリンの子豚への影響を見るために、対照区と発酵区から分離された大腸菌を対象にテトラサイクリン耐性細菌割合を調査した(図23)。テトラサイクリン耐性は、0日目では耐性割合が100%と非常に高く、両区とも14日目までは94.4%以上であったが、21日目では、対照区が97.2%であったのに対し、発酵区では80.6%となり、減少する傾向が見られた。その後、28日目では、対照区が88.9%であったのに対し、発酵区では22.2%となり、著しく減少する傾向が見られた。

7.3 考察

7.3.1 発酵リキッドフィーディングの腸内細菌叢への影響

発酵リキッド飼料の特徴は乳酸発酵により pH がおよそ 4.0 以下であり、乳酸その他の有機酸を含むことが挙げられる。乳酸菌によるプロバイオティク効果はヒトでも研究が多く行われている。プロバイオティクスとは、「腸内微生物のバランスを改善することによって宿主に有益な作用を示す生きた微生物およびそれを含む食品」を指す。代表的な細菌は、*Lactobacillus* や *Bifidobacterium* などで、乳酸菌飲料、ヨーグルトをはじめとする発酵食品や生菌製剤として使われている。ヒトに関しては、免疫グロブリンの産生を高める免疫学的な効果やコレステロール低下作用、便性の改善、アトピー症状の軽減などの効果を示すことが確認されている。また獣医・畜産の分野では、抗生物質に代わる家畜の成長促進剤としても使用が進められており、多数のプロバイオティク微生物がスクリーニングされ、製品化されている²⁰⁾。

豚に対する発酵リキッドフィーディングにより、腸内の大腸菌の割合が減少し乳酸菌の割合が増加するという報告¹³⁾、乳酸菌の増加は認められたものの、大腸菌数には差がなかったという報告⁷⁹⁾、乳酸菌の中でも *Lactobacillus* のみを増加させる効果があるという報告⁷⁴⁾ など、様々な研究がなされている。本研究においては、大腸菌が 0 日目では 8.52×10^9 CFU/g DM であったのが 28 日目には対照区で 1.21×10^6 CFU/g DM に、発酵区で 1.08×10^5 CFU/g DM になった。また、乳酸菌は 0 日目では 6.95×10^8 CFU/g DM であったのが 28 日目には対照区で 1.15×10^{10} CFU/g DM に、発酵区で 1.23×10^{12} CFU/g DM になった。0 日目と 28 日目を比較すると大腸菌数が減少し、乳酸菌数が増加するという傾向が示された(図 22)。しかし個体差が大きく、1 区 3 頭という少ない母集団であったため、大腸菌、乳酸菌ともに 0 日目と 28 日目の間、対照区と発酵区の間には、統計的有意差が得られなかった。また、同様の試験で腸内細菌の全菌数を調査した結果、離乳日から 1 ヶ月程度は $10^{10} \sim 10^{12}$ CFU/g DM の間でほぼ一定に保持されることが明らかになっている。つまり、細菌数は変わらず、構成種の割合が変化すると考えられる。発酵区の 21 日目で検出された乳酸菌のほぼ 100% が添加乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* LQ80 であることが確認されたことから、

腸内細菌全体に占める乳酸菌の数は変化しなかったが、その構成種が LQ80 へ交代したものと考えられる。

ヒトの腸内細菌叢は、母乳から一般食に切り替わる離乳期に決定されている⁵¹⁾。豚もヒトと同様に母豚の胎内にいるときは無菌状態で、産道を通過する時から細菌との接触が始まり、その後も母豚の糞便などから細菌を徐々に体内へと取り込んで、自己の腸内細菌叢を獲得してゆくと言われている⁹⁰⁾。肥育期には、継続して同じ豚舎で飼育され、特定の飼料のみを与えられることから、離乳期に形成される腸内細菌叢が生涯保持されると考えられる。

このような理由から、離乳期に理想的な腸内細菌叢を形成させることが望まれるが、LQ80 菌株のプロバイオティクス効果は、現在反復試験を行っている最中であるため詳細な報告が待たれる。

7.3.2 乳酸菌の抗生物質耐性

本実験では、発酵飼料に乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* LQ80 を添加し、摂取 21 日後には腸内乳酸菌の最優占種となることが示されたが、乳酸菌の抗生物質耐性レベルがどの程度なのかを調査した。アビラマイシンは主にグラム陽性菌に抗菌力を示すオルトソマイシン系と呼ばれる新規の抗生物質群に属するオリゴ糖の動物専用抗生物質で、ヒト用および動物用として現在使用されている抗生物質のいずれの類にも属せず、他の抗生物質との交差耐性もなく、極めて安全な薬剤であると言われていた⁹⁶⁾。

1976 年にイーライ・リリー社によって行われた *Lactobacillus plantarum* を含む *Lactobacillus* sp. のアビラマイシン感受性試験では、MIC 値は 0.025~1.6 µg/ml であったことから、30 年前の時点ではアビラマイシンは乳酸菌に対して耐性を持っておらず有効な抗菌力を持っていたと考えられる。しかし、本実験においては、0 日目における MIC 値は 2~≥128 µg/ml であり、全株がアビラマイシン耐性菌であったと考えられる (表 18)。しかし、供試子豚は離乳日までアビラマイシンへの暴露が全く無く、抗生区だけが離乳後にアビラマイシンを与えられていたのであるが、処理区による差はなかった。アビラマイシンは、日本で飼料添加物として使用されている抗生物質の 10% 程度を占め、サリノマイシン、コリスチン、ナラシンの次に多く生産されており³²⁾、流通している配合飼料の

半数以上に含有されているという推測もある。アピラマイシンの使用量がこの30年近くで急激に増加したことに伴って、乳酸菌のアピラマイシン耐性が増加したと考えられる。

7.3.3 大腸菌の抗生物質耐性

大腸菌は常在細菌であり、病原性を持っていなければ宿主にとって無害である。しかし、大腸菌は多くがプラスミドを持つ細菌であり、DNA組換え実験で利用されているように遺伝子の運搬を行う機能をもつことが知られている。今回の試験では、離乳後に子豚に与えられ始めたコリスチン、母豚に与えられていたクロルテトラサイクリンの子豚への影響をみるためにコリスチンとテトラサイクリン耐性について調査した。コリスチンはグラム陰性菌に抗菌力を示すペプチド系抗生物質で飼料添加物として、国内ではサリノマイシンの次に多く使用されている抗生物質である³²⁾。

コリスチン耐性については、処理区間の明確な差は見られなかった。また、抗生区では、大腸菌数そのものが減少したため、比較検討できなかった。2005年に農林水産省動物医薬品検査所と肥飼料検査所が日本全国を対象に518株（肥育牛由来138株、肥育豚由来152株、採卵鶏由来121株及びブロイラー由来107株）から分離した大腸菌の薬剤耐性調査を行ったデータではコリスチン耐性率は0%であった⁶⁴⁾。本実験でも対照区、発酵区ではコリスチン耐性菌割合は0~8.3%と極めて低く、同様の傾向が見られた（表19.1）。コリスチンを与えていた抗生区では、離乳14日目で分離された大腸菌の100%が耐性菌であった。しかし、対照区、発酵区でも1株ずつではあるが耐性株が検出されている。また、抗生区における耐性菌割合は21日目で37.5%、28日目で50.0%となり、日数経過に伴って多く検出される傾向が見られたが、十分な分離株数が得られなかったため、抗生物質の使用によって耐性菌割合が増加したという明確な結果には結びつけられなかった。

一方、抗生物質を与えた区の子豚において、大腸菌が急激に減少して検出限界以下になるケースが多数見られた（表17）。この減少は、抗生区にのみ見られたことから抗生物質の使用と何らかの関係が示唆されたが、詳細は不明のままである。今後の再試験により、明らかにしていく予定である。

テトラサイクリン耐性については、MIC 測定による抗生物質耐性菌割合調査の結果、離乳直後の 0 日目では耐性割合が 100 %、14 日目まで 94.4 %以上と非常に高かったが、発酵区では 21 日目において 80.6 %、28 日目で 22.2 %と、明らかに減少した。28 日目における対照区と発酵区の MIC 値の t 検定の結果から $p < 0.01$ で有意差があった (図 23)。本試験も前章の試験と同様に子豚は直接クロルテトラサイクリンへの暴露がなかったことから、母豚が獲得した耐性菌が子豚にも垂直伝播したと推測される。離乳後、子豚用人工乳飼料の給餌ではテトラサイクリン耐性菌割合は減少しなかったが、発酵リキッド給餌により、テトラサイクリン耐性菌の割合が減少することが示された。また、両区の大腸菌数は離乳後日数の経過とともに減少しているため (図 22)、腸内全体のテトラサイクリン耐性菌数が減少したことが明らかになった。

第 6 章、第 7 章を通じてテトラサイクリン耐性に着目すると、母豚に対し数年にわたる使用歴があり、子豚には使用歴がない。また、離乳後子豚は配合飼料を給餌した対照区と発酵リキッド飼料を給餌した発酵区があり、同条件である。2 つの試験をまとめると、母豚から子豚にテトラサイクリン耐性菌が垂直伝播しており、離乳時の子豚の耐性菌割合はほぼ 100 %であり、抗生物質使用を止めても通常飼料の給餌では耐性菌は減少しない。発酵リキッド飼料を給餌するとその割合は 22 %から 72 %程度まで減少させることができると結論づけられる。今後は、その耐性菌減少に発酵リキッドがどのように作用しているのかといったメカニズムの解明へと発展させていくことが求められる。

7.3.4 発酵リキッドフィーディングの有効性

平成 17 年度から農林水産省の推進する「安全・安心な畜産物生産技術の開発—抗生物質に依存しない減投薬飼養管理システムの構築—」プロジェクトでは 3 大柱として 1.免疫機能を高める飼料の開発、2.効率的な投薬技術、3.疾病を防止する家畜管理を掲げており、その中の 1.の技術開発の一つとして乳酸菌を利用した発酵リキッドフィーディングが挙げられる⁶⁵⁾。

発酵リキッドフィーディングの利点としては、1.取り扱いやすい、2.衛生環境の向上、3.生産能力と飼料要求率の向上といった家畜生産の観点だけでなく、成長促進様作用³⁶⁾ や免疫賦活作用⁴⁰⁾、などの機能性が報告されており、離乳

子豚においては離乳時の餌付けをスムーズにするといった効果も期待される。本研究で使用した *Lactobacillus plantarum* LQ80 は短時間で増殖が良く、生存力が強く、取り扱いも簡便であり、多数の研究機関、飼料会社や農家などの実際の生産現場に導入が行われていることから、日本での発酵リキッドフィーディングのモデルになると考えられる。

本試験で得られた発酵リキッドフィーディングによる大腸菌の抗生物質耐性の減少のメカニズムを明らかにするには、乳酸菌もしくは乳酸菌の生産物が耐性菌に与える影響を詳細に知るための更なる解析が望まれる。

近年、乳酸菌は優れた機能性が見直され、ヒトに対するプロバイオティクス効果についての多くの有効性が発見されている。しかし、家畜に対する効果は報告例が少なく、評価を検討するデータが不足している。本試験で見られた乳酸菌による大腸菌の抗生物質耐性への影響についての研究例はなく、他の農場との比較ができないが、家畜への抗生物質使用を低減させるための一つの方法として、大きな可能性を示唆する結果が得られた。もし、発酵リキッドに抗生物質代替効果が見出されれば、抗生物質耐性菌の出現に与える選択圧が抑えられ、かつ離乳期における発酵リキッドフィーディングにより耐性菌を減少させ、家畜生産現場における全体の耐性菌レベルを低下させることが可能になるかもしれない。



写真 12 発酵リキッド飼料



写真 13.1 LWD 交雑種子豚 (実験開始 5 日目・発酵区)



写真 13.2 LWD 交雑種子豚 (実験開始 22 日目・対照区)



写真 13.3 LWD 交雑種子豚 (実験開始 27 日目・抗生区)

表 16 離乳後の個体別乳酸菌数

個体番号	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目
対照 1 112	6.06×10^5	1.33×10^9	3.69×10^8	3.71×10^6	8.62×10^8
対照 2 116	1.04×10^8	3.16×10^9	2.76×10^{10}	4.02×10^9	2.67×10^{10}
対照 3 118	1.31×10^8	1.30×10^9	7.00×10^9	8.38×10^9	6.93×10^9
抗生 4 111	1.72×10^8	2.24×10^{10}	4.05×10^{10}	1.98×10^{10}	3.83×10^{10}
抗生 5 114	1.62×10^8	3.55×10^9	2.56×10^8	8.93×10^9	5.78×10^{10}
抗生 6 117	6.53×10^8	2.93×10^9	1.91×10^9	1.12×10^{10}	8.98×10^9
発酵 7 110	4.46×10^9	3.07×10^{10}	5.79×10^{10}	1.16×10^{11}	3.36×10^{12}
発酵 8 115	2.09×10^7	2.87×10^{10}	1.01×10^{11}	2.38×10^{11}	3.26×10^{11}
発酵 9 119	5.49×10^8	9.73×10^{10}	2.63×10^9	4.52×10^{11}	1.11×10^{10}

(CFU/g DM)

表 17 離乳後の個体別大腸菌数

個体番号	0 日目	7 日目	14 日目	21 日目	28 日目
対照 1 112	3.81×10^9	3.70×10^5	1.46×10^6	3.99×10^6	3.61×10^6
対照 2 116	1.43×10^{10}	4.33×10^6	1.10×10^7	1.37×10^7	9.69×10^3
対照 3 118	8.44×10^9	1.61×10^7	1.04×10^6	9.13×10^4	6.50×10^3
抗生 4 111	4.48×10^9	N.D.	N.D.	N.D.	5.71×10^2
抗生 5 114	3.07×10^9	N.D.	1.71×10^3	4.99×10^4	N.D.
抗生 6 117	1.48×10^9	N.D.	N.D.	2.74×10^3	N.D.
発酵 7 110	3.96×10^9	2.16×10^8	3.86×10^6	1.63×10^5	1.46×10^5
発酵 8 115	4.25×10^9	1.52×10^6	3.68×10^7	6.70×10^4	1.67×10^5
発酵 9 119	8.60×10^9	2.70×10^9	7.51×10^5	7.86×10^4	1.09×10^4

N.D.: Not detected,

(CFU/g DM)

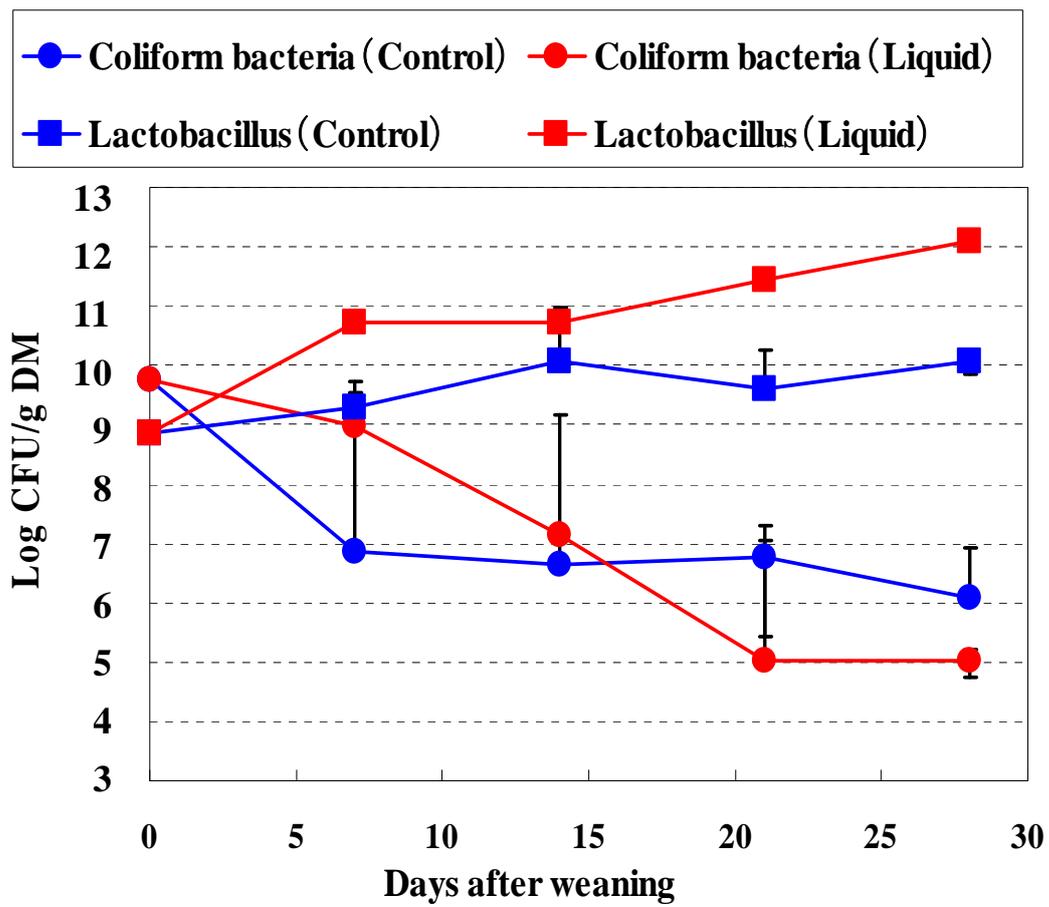


図 22 離乳後の大腸菌数と乳酸菌数

表 18 乳酸菌のアビラマイシン感受性試験結果表

Days after weaning	No. of isolate	MIC($\mu\text{g/ml}$)													
		0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 128
Cont	0	36						1	1			1	11	11	11
	7	36					1		13		1		11	10	
	14	36						6	7	2		4	14	1	2
	21	36							1	3			17	3	12
	28	36					1	1					34		
Anti	0	36						1	1			1	11	11	11
	7	36							3				21	12	
	14	36							6	1		7	21	1	
	21	36							2	1	1		25	2	5
	28	36									2			33	1
Liq	0	36						1	1			1	11	11	11
	7	36							3	2		9	22		
	14	36							4	13			19		
	21	36											26	10	
	28	36												36	

Cont: Control、Anti: Antibiotic、Liq: Liquid

表 19.1 大腸菌のコリスチン感受性試験結果表

Days after weaning	No. of isolate	MIC($\mu\text{g/ml}$)													
		0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 128
Cont	0	36						9	27						
	7	36						31	5						
	14	36							25	10		1			
	21	36						6	30						
	28	36					1	27	8						
Anti	0	36						9	27						
	7	0													
	14	12									8	4			
	21	24						1	14		5		2	2	
	28	2							1					1	
Liq	0	36						9	27						
	7	36						28	8						
	14	36							24	11	1				
	21	36						5	30					1	
	28	36						7	25		2		1		

Cont: Control、Anti: Antibiotic、Liq: Liquid、赤線が耐性のブレイクポイント

表 19.2 大腸菌のテトラサイクリン感受性試験結果表

Days after weaning	No. of isolate	MIC($\mu\text{g/ml}$)															
		0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	≥ 128		
Cont	0	36											31	5			
	7	36											5	20	11		
	14	36											6	13	17		
	21	36									1		13	6	16		
	28	36					1		1	2			12	6	13	1	
Liq	0	36											32	3	1		
	7	36						1		1			16	18			
	14	36											5	16	13	2	
	21	36					7						14		12	3	
	28	36			2		21	1	2		2			2	6		

Cont: Control、Anti: Antibiotic、Liq: Liquid
 赤線が耐性のブレイクポイント

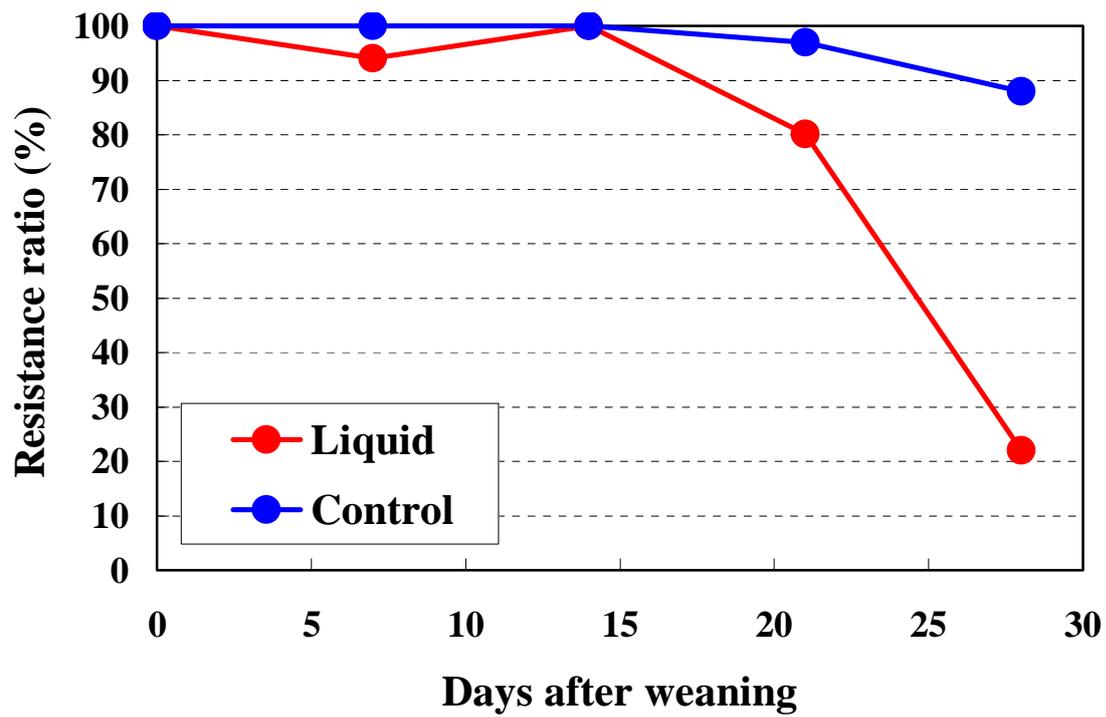


図 23 離乳子豚大腸菌のテトラサイクリン耐性菌割合
(各区 n=180 菌株)

第 8 章 総括

年々、食品の安全性を求める声が高まっており、安全・安心な畜産物や水産物、および作物を生産することが求められており、ヒトへの影響、環境への影響などを科学的にリスク評価するためのデータが必要とされている。本研究では、家畜由来の抗生物質耐性菌や耐性遺伝子が家畜排泄物を介して、環境中にどのように分布し、どのようなメカニズムで遺伝子が拡散しうるのかを解明することを目的とした。

まず第 1 章ではなぜ耐性菌が問題となるのか、日本を始め世界の国々がこの問題にどのように取り組んでいるのか、そして解決のために何が必要なのかを述べた。抗生物質耐性菌の研究は、病原菌や臨床上重要な細菌では進んでいるが、農業環境での研究はほとんどないのが現状である。しかし、抗生物質はもともと土壌細菌の生存戦略の一つとして生成されている物質であることから、土壌中には抗生物質耐性菌がある程度存在すると考えられる。そしてそのレベルがヒトの行為によって増減しているのではないかという仮説を建てた。

第 2 章では、バックグラウンド調査のために、様々な環境の 14 箇所、30 サンプルの家畜ふん、堆肥、土壌を採取し、作用機構の異なる 6 種類の抗生物質を用いて、抗生物質耐性細菌の分布実態を明らかにした。その結果、家畜ふん堆肥無施用の土壌や森林土壌でも $10^3 \sim 10^5$ CFU/g 乾土の抗生物質耐性細菌が存在しており、これは土壌における通常の抗生物質耐性細菌レベルと考えられた。豚ふん堆肥を 10 年以上連用した畑土壌では、10 年以上堆肥を施用していない畑土壌と比べると、全生細菌数が約 20~30 倍多く、抗生物質耐性細菌数は、どれも約 10 倍程度多かった。また、抗生物質を多種類、多量に与えられている家畜の腸内細菌を調べたところ、全菌数の 100 %がテトラサイクリン耐性を保持しているケースが見られた。また、家畜排泄物を原料とする堆肥の中には、家畜ふん中の耐性菌数のレベルであり、土壌に施用するのは危険であると考えられるものも存在した。これらのことから、抗生物質の飼料添加によって家畜ふん中の抗生物質耐性細菌が増加し、堆肥中では家畜ふん由来の耐性菌が多く残存している可能性が高いことが明らかになった。

第 3 章では、第 2 章で供試したサンプルのうち、豚ふん、豚ふん堆肥、堆肥

無施用土壌および森林土壌から分離した各抗生物質耐性菌 240 株の多剤耐性を検討した。その結果、豚ふんでは分離菌株多くが、高度多剤耐性菌であること、また用いた 6 種類の抗生物質のうち、森林土壌以外から分離したテトラサイクリン耐性菌株の全てが少なくとも 6 剤耐性であることが明らかになった。このことから、家畜飼料への抗生物質添加という人為が多剤耐性細菌の出現を加速していると推定された。

第 2 章、第 3 章の結果より、テトラサイクリン耐性菌が高度多剤耐性菌であるのは、テトラサイクリン系抗生物質が、他の多くの薬剤に耐性な細菌にも有効であるために多用された結果、テトラサイクリン耐性細菌株が他の耐性細菌株にも接触する機会が多くなり、多くの耐性遺伝子を獲得することができたのではないかと推測された。そこで、第 4 章ではテトラサイクリン耐性菌にはどのような微生物種が存在するのかを 16S rRNA 遺伝子系統解析によって多様性を探索した。第 2 章で供試したサンプルから分離した 350 株のテトラサイクリン耐性細菌の系統解析により家畜ふん分離株は 11 細菌属、家畜ふん堆肥分離株は 9 細菌属、土壌分離株は 15 細菌属に分類された。特に、自然環境土壌中のテトラサイクリン耐性細菌は、極めて多様性が高いことが明らかになった。

第 5 章では、第 4 章と同じ分離株を用いて、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tet* 遺伝子) の検出を試みた。これまでに行われてきた *tet* 遺伝子の研究は実験微生物や病原菌に限られており、一般細菌には目が向けられて来なかった。しかし、テトラサイクリン耐性細菌の多様性の高さから、今まで報告されていたよりも多くの細菌が *tet* 遺伝子の宿主となる可能性があるとして予測し、家畜ふん、家畜ふん堆肥、農業土壌および森林土壌という広い環境中のテトラサイクリン耐性細菌を対象とした。また、ある特定の遺伝子タイプに限定せずに、環境中から頻繁に分離される 19 の遺伝子をターゲットとした。その結果、新規に *tet* 遺伝子を保持する細菌として 13 細菌属が判明し、さらにこれまで *tet* 遺伝子保持菌として報告されていたもののうち、新たな *tet* 遺伝子タイプを持つものも多いことが明らかになった。また、*tet(B)*、*tet(M)* および *tet(W)* は様々な分離源に跨って検出されており、ホスト菌種が多いことも特徴であり、耐性遺伝子の拡散の一旦を担っている可能性が高いことが示唆された。

また、家畜ふんに特徴的な *tet* 遺伝子として、豚ふんと鶏ふんでは *tet(M)*、家

畜ふん堆肥に特徴的な *tet* 遺伝子としては豚ふん堆肥では *tet(B)*、鶏ふん堆肥では *tet(W)*、牛ふん堆肥では *tet(J)*、土壌に特徴的な *tet* 遺伝子としては *tet(B)* が挙げられた。これら特徴的な *tet* 遺伝子型の変動を見ることで、他の環境からの遺伝子の移動を評価できるのではないかと考えられた。しかし、分離株が少なかったサンプルもあったため、集団の特徴を正確に捉えたとは言えない。今後、さらに様々なサイトから多くの細菌を分離し、*tet* 遺伝子タイプの特徴づけを行うことにより、遺伝子拡散の可能性について言及できるのでないかと考えられる。

第 6 章、第 7 章では前章までの結果を受けて、抗生物質耐性菌対策の必要性が浮かび上がり、その一環として独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 機能性飼料研究チームとの共同研究を行った。抗生物質の代替効果が期待され注目されているプロバイオティクス飼料である発酵リキッドフィーディング飼料給与による耐性菌割合への影響を調べることによって、抗生物質使用と家畜腸内での耐性菌出現の関係、発酵リキッドフィーディングにより腸内細菌の耐性の増加が抑制されるのか、といった具体的解決案の有効性の評価を行った。その結果、第 1 回目の 2005 年の試験では母豚に投与されていたクロルテトラサイクリンに対し、子豚分離大腸菌は 100 % の耐性を持っていたが、抗生物質使用を中止し、かつ発酵リキッドフィーディングを行えば、耐性割合が減少することが明らかになった。第 2 回目の 2006 年の試験では、前年の再現性を取ることができ、さらに明確な減少を確認できた。もし、発酵リキッドに抗生物質代替効果が見出されれば、抗生物質耐性菌の出現に与える選択圧が抑えられ、発酵リキッドフィーディングにより耐性菌を減少させ、家畜生産現場における全体の耐性菌レベルを低下させることが可能になるかもしれない。今後は、その耐性菌減少に発酵リキッドがどのように作用しているのかといったメカニズムの解明へと発展させていくことが求められる。

以上のことから、家畜由来の抗生物質耐性遺伝子の農業環境中での分布と遺伝子拡散の可能性についての多くの知見が得られた。家畜由来の抗生物質耐性菌や耐性遺伝子が食品や家畜排泄物を介して、環境に対する影響、さらにはヒトに対しても影響を及ぼす可能性の評価には、畜産学と医学といった入口と出口までの間に多くの要因が複雑に関わり合っていることを再認識させられた。

今後も、本論文で得られたデータに、さらに広範囲、長期に渡るモニタリングデータを加えながら抗生物質耐性菌発生評価、暴露評価、影響評価などに関わる研究を行っていく必要があると考えられた。

引用文献

1. Aarestrup, F.M., A.M. Seyfarth, H-D. Emborg, K. Pedersen, R.S. Hendriksen and F. Bager. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 2054-2059.
2. Aarestrup, F.M., H. Hasman, L.B. Jensen, M. Moreno, I.A. Herrero, L. Dominguez, M. Finn and A. Franklin. 2002. Antimicrobial resistance among enterococci from pigs in three European countries. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4127-4129.
3. Aarestrup, F.M., Y. Agersø, P. Gerner-Smidt, M. Madsen and L.B. Jensen. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **37**: 127-137.
4. Agersø, Y., D. Sandvang. 2005. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 941-947.
5. Agersø, Y., G. Sengeløv, and L.B., Jensen. 2004. Development of a rapid method for direct detection of *tet(M)* genes in soil from Danish farmland. *Env. Int.* **30**: 117-122.
6. Aminov, R.I., J.C.Chee-Sanford, N.Garrigues, B.Teferedegne, I.J.Krapac, B.A.White and R.I.Mackie.2002. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1786-1793.
7. Aminov, R.I., N.Garrigues-Jeanjean and R.I.Mackie. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.***67**:22-32.
8. Ardic, N., M. Ozyurt, B. Sareyyupoglu and T. Haznedaroglu. 2005. Investigation of erythromycin and tetracycline resistance genes in methicillin-resistant

- staphylococci. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**: 213-218.
9. 朝日新聞. 2003. 中国エビから抗生物質. 10月2日.
 10. バイオインダストリー協会. 2003. 遺伝子の水平転移の可能性について. <
<http://www.jba.or.jp>>
 11. Blake, D.P., R.W. Humphry, K.P. Scott, K. Hillman, D.R. Fenlon and J.C. Low. 2003. Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations. *J. Appl. Microbiol.* **94**: 1087-1097.
 12. Bryan, A., N. Shapir and M.J. Sadowsky. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 2503-2507.
 13. Canibe, N., and B.B. Jensen. 2003. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: Effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *J Anim. Sci.* **81**: 2019-2031.
 14. Chee-Sanford, J.C., R.I. Aminov, I.J. Krapac, N. Garrigues-Jeanjean and R.I. Mackie. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1494-1502.
 15. 畜産環境整備機構. 2005. 堆肥の品質実態調査報告書. 102pp.
 16. Chopra, I. and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 232-260.
 17. Chopra, I., P.M.Hawkey and M.Hinton. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *J. Antimicrob. Chemother.* **29**: 245-277.
 18. Danish Integrated Antimicrobial resistance Monitoring and Research Programme 1995. <
<http://www.danmap.org/>>
 19. Delsol, A.A., M. Anjum, M.J. Woodward, J. Sunderland and J.M. Roe. 2003. The effect of chlortetracycline treatment and its subsequent withdrawal on multi-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and

- commensal *Escherichia coli* in the pig. J. Appl. Microbiol. **95**: 1226-1234.
20. De Preter, V., T. Vanhoutte, G. Huys, J. Swings, De L. Vuyst, P. Rutgeerts, and K. Verbeke. 2006. Effects of *Lactobacillus casei* shirota, *Bifidobacterium breve*, and oligofructose3-enriched inulin on the colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. < <http://ajpgi.physiology.org/cgi/reprint/00052.2006v1> >
21. 動物衛生研究所. 2003. *Salmonella* Typhimurium について. < <http://www.niah.affrc.go.jp> >
22. 動物用抗菌剤研究会編. 2004. 動物用抗菌剤マニュアル. インターズー. 東京.
23. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. 1999. < <http://www.rivm.nl/earss/> >
24. European Commission. 2000. White Paper on Food Safety. 52p. < http://europa.eu.int/eur-lex/en/com/wpr/1999/com1999_0719en01.pdf >
25. European Commission. 2002. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition on the Criteria for Assessing the Safety of Micro-organisms Resistant to Antibiotics of Human Clinical and Veterinary Importance. 20p. < http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out64_en.pdf >
26. Furushita, M., T. Shiba, T. Maeda, M. Yahata, A. Kaneoka, Y. Takahashi, K. Torii, T. Hasegawa and M. Ohta. 2003. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 5336-5342.
27. 後藤逸男・若月利之・中崎清彦・上田成子・羽賀清典・斉藤雅典. 2002. 土壌生物圏はどこまで有機物資源をリサイクルできるか? 日本土壌肥料学雑誌. **73**: 821-826.
28. Hanaki, H, K. Kuwahara-Arai, S. Boyle-Vavra, R.S. Daum, H. Labischinski, and K Hiramatsu. 1998. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. J. Antimicrob. Chemother. **42**: 199-209.
29. 橋本一・井上松久編. 1993. 病原菌の薬剤耐性. 学会出版センター. 東京.

30. 服部貴次. 2001. スウェーデンモデル. 畜産の研究. **55**: 39-543.
31. 肥飼料検査所. 2005. < <http://www.ffis.go.jp/index.shtml> >
32. 肥飼料検査所. 2006. 飼料添加物検定申請について. < <http://www.ffis.go.jp/> >
33. Holben, W.E., C.I. Lynch, A. Hasebe and J.M. Tiedje. 1989. Natural antibiotic resistance of bacteria in soils worldwide: Selection of antibiotics that best control indigenous bacterial populations. ISME. **5**: 146.
34. Huys, G., K. D'Haene, J.M.Collard and J. Swings. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. Appl. Environ. Microbiol. **70**: 1555-1562.
35. Huys, G., K. D'Haene, J. Van Eldere, A. von Holy and J. Swings. 2005. Molecular diversity and characterization of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a poultry processing plant. Appl. Environ. Microbiol. **71**: 574-579.
36. Jensen, B.B. and L.L. Mikkelsen. 1998. Feeding liquid diets to pigs. In: Recent advances in animal nutrition. pp107-126. Nottingham University Press. U. K.
37. Johansson, A., C. Greko, B.E. Engstrom and M. Karlsson. 2004. Antimicrobial susceptibility of Swedish, Norwegian and Danish isolates of *Clostridium perfringens* from poultry, and distribution of tetracycline resistance genes. Vet. Microbiol. **99**: 251-257.
38. 家畜衛生試験場. 2000. ブタの病気. 家の光協会. 東京.
39. 川島知之. 2003. 日本型発酵リキッドフィーディングの構築を目指して. 畜産の研究. **57**: 975-986.
40. Kimoto, H., K. Mizumachi, T. Okamoto, and J. Kurisaki. 2004. New *Lactococcus* strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. Microbiol. Immunol. **48**: 75-82.
41. Kobashi, Y., A. Hasebe and M. Nishio. 2005. Antibiotic-resistant bacteria from feces of livestock, farmyard manure, and farmland in Japan—case report—. Microbes. Environ. **20**: 53-60.
42. 小島明美・小畑晴美・小澤真名緒・佐々木貴正・高木昌美. 2002. 養殖魚から分離された *Lactococcus garvieae* の薬剤感受性. 第134回日本獣医学会

学術集会.

43. 国立感染症研究所. 2003. 多剤耐性サルモネラ. < <http://idsc.nih.go.jp> >
44. Kumai, Y., Y. Suzuki, Y. Tanaka, K. Shima, R.K. Bhadra, S. Yamasaki, K. Kuroda and G. Endo. 2005. Characterization of multidrug-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* strains isolated from swine from an abattoir in Osaka, Japan. *Epidemiol. Infect.* **133**: 59-70.
45. Kuroda, M, T. Ohta, I. Uchiyama, *et al*: 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **357**: 1225-1240.
46. Lanz, R., P. Kuhnert and P. Boerlin. 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* **91**: 73-84.
47. Magalhaes, V.D., B.A. Castilho. 1997. Mini-Mu insertions in the tetracycline resistance determinant from *Proteus mirabilis*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **30**: 363-367.
48. Marchesi, J.R., T. Sato, A.J. Weightman, T.A. Martin, J.C. Fry, S.J. Hiom and W.G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 795-799.
49. Marti, S., F. Fernandez-Cuenca, A. Pascual, A. Ribera, J. Rodriguez-Bano, G. Bou, J. Miguel Cisneros, J. Pachon, L. Martinez-Martinez and J. Vila. 2006. Prevalence of the *tetA* and *tetB* genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **24**: 77-80.
50. Miranda, C.D., C. Kehrenberg, C. Ulep, S. Schwarz and M.C. Roberts. 2003. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47**: 883-888.
51. 光岡知足. 1978. 腸内細菌の話. 岩波新書. 東京.
52. Morsceck, C., D. Langendorfer and J.M. Schierholz. 2004. A quantitative real-time PCR assay for the detection of *tetR* of Tn10 in *Escherichia coli* using SYBR Green and the Opticon. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **59**: 217-227.

53. Moyer, C.L., J.M. Tiedje, F.C. Dobbs, and D.M. Karl. 1996 . A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2501-2507.
54. 内閣府食品安全委員会. 2006. 食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌性物質の重要度ランク付けについて. < http://www.fsc.go.jp/senmon/hisiryoku/taiseikin_rank.pdf >
55. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. 1996. < <http://www.cdc.gov/narms/> >
56. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2001. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved Standard-Fifth Edition. M11-A5, **21**. U.S.A.
57. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performances standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M31-A2, **22**. U.S.A.
58. Ng, L.K., I. Martin, M. Alfa and M. Mulvey. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes.* **15**: 209-215.
59. 日本土壤微生物学会編. 2000. 新・土の微生物 (5) 博友社. 東京.
60. 日本科学飼料協会. 抗菌性飼料添加物研究会. 2004. 「安全・安心な畜産物生産における抗菌性飼料添加物の適正使用」4pp.
61. 農林水産省. 食品と暮らしの安全基金調べ. 2003年10月発表.
62. 農林水産省畜産局. 1997. 飼料添加物の指定の取消しについて. < <http://www.maff.go.jp/soshiki/chikusan/eisei/ekouhyou.html> >
63. 農林水産省動物医薬品検査所. 2000. 我が国の家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング体制. < <http://www.nval.go.jp/taisei/monitaisei.htm> >
64. 農林水産省動物医薬品検査所. 2006. 平成17年度家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査結果. < <http://www.nval.go.jp/taisei/17taisei/H17.htm> >
65. 農林水産省農林水産技術会議事務局. 2005. 安全・安心な畜産物生産技術の

- 開発. < http://www.s.affrc.go.jp/docs/project/2006/2006_project5.pdf >
66. 農林水産省生産局. 1979. 動物用抗菌性剤耐性菌調査成績.
 67. 農林水産省生産局畜産部. 2002. 飼料月報. 飼料添加物の内訳. 平成 14 年 3 月号.
 68. 農林水産省生産局畜産部. 2003. 畜産の動向. 12 月. < <http://lin.lin.go.jp/maff/frame01.html> >
 69. 農林水産省生産局畜産部. 2006. 家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律について. < <http://www.maff.go.jp/chikukan/1.law1.pdf> >
 70. 農林水産省消費・安全局. 2003. 食品安全委員会への食品健康影響評価の依頼について. < http://www.maff.go.jp/www/press/cont/20031208press_3.htm >
 71. Office International des Epizooties. 2001. Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agent in veterinary medicine. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. **20**: 797-870.
 72. Ostrowsky, B.E, C. Whitener, H.K Bredenberg, L.A. Carson, S. Holt, L. Hutwagner, M.J. Arduino and W.R. Jarvis. 2002. *Serratia marcescens* bacteremia traced to an infused narcotic. N. Engl. J. Med. **346**: 1529-1537.
 73. Petersen, A. and A. Dalsgaard. 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. Environ. Microbiol. **5**: 395-402.
 74. Pedersen, C., S. Roos, and J.E. Lindberg. 2005. Performance, feeding behavior and microbial diversity in weaned piglets fed liquid diets based on water or wet wheat-distillers grain. Arch. Anim. Nutr. **59**: 165-179.
 75. Ribera, A., J. Ruiz and J. Vila. 2003. Presence of the Tet M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents. Chemother. **47**: 2310-2312.
 76. Roberts, M.C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol. Lett. **245**: 195-203.
 77. Rogers, S.O. and A.J. Bendich. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. Plant Mol. Biol. **5**: 69-76.
 78. Salyers, A.A., N.B. Shoemaker and L.Y. Li. 1995. In the driver's seat: the

- Bacteroides conjugative transposons and the elements they mobilize. *J. Bacteriol.* **20**: 5727-5731.
79. Scholten, R.H., C.M. Peet-Schwering, L.A. Hartog, M. Balk, J.W. Schrama, and M.W. Verstegen. 2002. Fermented wheat in liquid diets: effects on gastrointestinal characteristics in weanling piglets. *J. Anim. Sci.* **80**:1179-1186.
80. Sengeløv, G., Y. Agersø, B. Halling-Sørensen, S.B. Baloda, J.S. Andersen and L.B. Jensen. 2003. Bacterial antibiotic resistant levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.* **28**: 587-595.
81. 篠田吉史、加藤暢夫、森田直樹. 2000. 16S rRNA 遺伝子解析による細菌の統計分類法. 島津評論. **57**: 121-132.
82. Smalla, K., L.S. van Overbeek, R. Pukall and J.D. van Elsas. 1993. Prevalence of *npt II* and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. *FEMS Microbiol. Ecology.* **13**: 47-58.
83. 染谷孝・井上興一. 2003. 堆肥施用と病原菌汚染. 農業技術体系. 土壤施肥編. 第 7-1 巻 資材の特性と利用. pp.資材 64-84~64-99. 農文協. 東京.
84. 鈴木章. 2000. 発育促進用の抗生物質に代わる飼料添加物. 畜産コンサルタント. **7**: 64-72.
85. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. 2005. <<http://w3.sva.se/pdf/svarm2005.pdf>>
86. 田村豊. 2001. 動物用抗菌性物質と薬剤耐性菌. モダンメディア. **47**: 219-226.
87. Taylor, D.E. and A. Chau. 1996. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **40**: 1-5.
88. Tomlin, K.L, R.J. Malott, G. Ramage, D.G. Storey, P.A. Sokol and H. Ceri. 2005. Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 5208-5218.
89. Tsukahara, T. and K. Ushida. 2002. ピッグジャーナル **7**: 57-59. アニマルメディア社. 東京.
90. Tsukahara, T. and K. Ushida. 2002. Succinate accumulation in pig large intestine during antibiotic-associated diarrhea and the constitution of succinate-producing flora. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **48**: 143-154.

91. Vinas, M., J. Sabate, M.J. Espuny, A.M. Solanas. 2005. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7008-7018.
92. Walsh, C. 2003. ANTIBIOTICS. 285-290. ASM Press. U.S.A.
93. Wegener, H.C. 2003. Ending the use of antimicrobial growth promoters is making a difference. *ASM News* **69**: 443-448.
94. WHO Network on Antimicrobial Resistance Monitoring. 1997. < www.who.int/docstore/world-health-day/en/documents1997/whd08.pdf >
95. Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**: 996-997.
96. 養豚情報編集部. 1992. 塩野義製薬(株)と日本イーライ・リリー(株) 飼料添加抗生物質「サーマックス 100」アビラマイシン製剤を新発売. 養豚情報報 . **20**: 102-103. < http://jliadb.lin.go.jp/bunken/cgi-bin/bunken_show.pl?56741 >
97. Zhu, X., Wittner M., Tanowitz H.B., Caki A., Weiss L.M. 1994. Ribosomal RNA sequences of *Enterocytozoon bieneusi*, *Septata intestinalis* and *Ameson michaelis*: phylogenetic construction and structural correspondence. *J. Eukaryot Microbiol.* **41**: 204-209.

謝辞

本研究を進めるに際し、格別なご指導、ご鞭撻を賜り、ご校閲の労をとられました筑波大学大学院生命環境科学研究科 内山裕夫教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文をまとめるにあたり、貴重なご教示とご助言を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科 中島敏明助教授、同大学大学院環境科学研究科 野村暢彦助教授に感謝申し上げます。

修士課程在学時、また博士課程に編入してからも熱心にご指導、ご教示を賜りました前・筑波大学農林工学系 西尾道德教授に深甚なる感謝の意を表します。

修士課程在学時に研究に有益なご意見、ご協力を頂いた農林水産省技術会議長谷部亮博士、独立行政法人農業環境技術研究所 藤井毅博士に心から感謝申し上げます。

感受性試験の手法をご教授下さいました独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 江口正志博士、秦英司博士に心から感謝申し上げます。

博士課程編入後、共同研究を行うにあたりご助力いただいた独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 川島知之博士、田島清博士、大森英之氏、大塚舞女史、花木千穂女史、山崎恭子女史および機能性飼料研究チームの室員の皆様に心から感謝申し上げます。

また、試料採取に快くご協力下さった研究機関、企業、農家の皆様に心からお礼申し上げます。

最後に、筑波大学において学生生活を支えて下さった山根國男 名誉教授をはじめ、古川理恵技官、内山研メンバーに深く感謝申し上げます。