

令和 5 年 4 月 20 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04285

研究課題名(和文) 薬剤耐性ホットスポットとしての農場環境(堆肥・畜産排水)の実態把握と制御法の提案

研究課題名(英文) Clarifying the farm environment (compost and livestock wastewater) as a hotspot for antimicrobial resistance and proposing a control method

研究代表者

臼井 優 (Usui, Masaru)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：60639540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌(AMR)の出現及び拡散は国際的な問題となっている。家畜で出現したAMRが堆肥や畜産排水を介してヒトへ伝播することについてのリスクが懸念される。そこで、堆肥や畜産排水中の耐性菌、耐性遺伝子量及び残留抗菌薬の定量を行うことで、農場環境におけるAMRの実態を解明し、さらにその制御法を開発した。結果、抗菌薬使用量の多い農場において、耐性菌、耐性遺伝子量、残留抗菌薬量が多いことが明らかとなった。また、バイオガスプラント処理や添加剤の利用が堆肥中のAMRのリスクを低減することに有効であることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌薬の使用量の多い農場での堆肥中に薬剤耐性菌、耐性遺伝子、残留抗菌薬量が多いことを解明した。農場での適切な抗菌薬の使用を促したり、適切な家畜由来排泄物の処理を行う際の根拠を示した意義は大きい。また、バイオガスプラント処理や添加剤の利用など、現状の問題点を解決する具体的な方法を示した意義も大きく、今後、野外農場での検証など、社会実装に向けた研究を推進していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The emergence and spread of antimicrobial-resistant bacteria is an international problem. There is concern about the risk of AMR emerging in livestock and spreading to humans via manure and livestock wastewater. Therefore, we investigated the actual situation of AMR in farm environments by quantifying the amount of antimicrobial-resistant bacteria, resistant genes, and residual antimicrobials in compost and livestock wastewater, and developed a method to control AMR. As a result, it was found that the amount of antimicrobial resistant bacteria, resistant genes, and residual antimicrobials was higher in farms with high antimicrobial use. The study also elucidated that anaerobic digestion treatment and the use of additives are effective in reducing the risk of AMR in compost.

研究分野：獣医学、細菌学

キーワード：薬剤耐性 堆肥 畜産排水

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌 (AMR) の出現及び拡散は国際的な問題となっており、このまま対策を行わなかった場合には AMR による年間死者数が 2050 年には 1000 万人を超えるという予測もある。このような背景から、2016 年には我が国においても「薬剤耐性アクションプラン (2016-2020)」が策定された。その中で、まずは取り組むべき課題として One Health 理念を中心とした、ヒト、動物、環境分野における AMR の実態を把握することが求められている。

農場における AMR の実態を調べる際に、これまでは家畜の糞便から分離される細菌を対象にその性状が主に指標として用いられてきた。家畜糞便は、家畜の尿や農場排水と一緒に、堆肥や畜産排水として処理され環境に放出される。堆肥と畜産排水は、農産物への散布や環境での循環をへて、人間生活に影響するだけでなく、衛生動物や衛生昆虫が暴露されることにより AMR を拡散している。そのため、堆肥と畜産排水は、農場における AMR の実態や人への影響を反映しており、畜産現場と環境をつなぐ重要な因子であることが想定される。

しかし、これまでのところ、畜種別や処理法別の堆肥や畜産排水の AMR 実態についての科学的なデータは絶対的に不足している。堆肥や家畜排水における AMR の実態については、堆肥中や畜産排水中では、家畜由来の細菌が死滅したとしても耐性遺伝子として残留し、耐性遺伝子がその他の細菌へ伝達することで AMR が広がっていくリスクがある。堆肥や畜産排水中の AMR 実態解明には、耐性菌を調べることに加えて、耐性遺伝子量や抗菌剤量を調べる必要がある。今後は、薬剤耐性菌、耐性遺伝子量、残留抗菌剤量を指標として、農場における AMR のホットスポットとしての堆肥や畜産排水の重要性を明らかにし、その制御のための処理法の検討が行われる必要がある。

2. 研究の目的

堆肥や畜産排水における AMR の実態を解明し、AMR の伝播・拡散抑制システムを提案し、家畜由来 AMR の人類への影響を低減することを目的とする。本研究では、堆肥や畜産排水中の耐性菌、耐性遺伝子量及び残留抗菌剤の定量を行うことで、農場環境における AMR の実態を解明し、さらにその制御法を開発する。

AMR 研究は、動物やヒトの AMR 実態を解明することにより、抗菌剤の使用量を減らすために注意を促すものが多かったが、今回の研究課題では、日本の堆肥や畜産排水における AMR の実態を明らかにするだけでなく、堆肥処理条件や排水処理条件を専用の機器で再現し、AMR 対策に効果的な処理法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 国内の牛農場 4 箇所および豚農場 29 箇所より完熟堆肥をサンプリングし、テトラサイクリン耐性遺伝子である *tetA* 遺伝子の qPCR による定量を行った。また、堆肥中に含まれるテトラサイクリン系抗菌剤量を定量した。

(2) 国内の 4 つの牛農場において堆肥処理またはバイオガスプラント処理前後の廃棄物をサンプリングし、廃棄物に含まれる大腸菌量、テトラサイクリン耐性大腸菌量、*tetA* 遺伝子量、残留抗菌剤量を定量し、メタゲノム解析を実施した。

(3) 薬剤耐性対策となり得る添加剤 (カルシウムシアナミド等) について、実験室内及び野外の

豚農場の堆肥場で家畜排泄物に添加して、好気性堆肥化を実施し、薬剤耐性対策としての有効性を調べた。

4. 研究成果

(1) 国内の牛農場 4 箇所および豚農場 29 箇所の完熟堆肥に含まれる *tetA* 遺伝子量は、豚農場のものが牛農場のものよりも高い値を示した(図 1)。また、豚農場の堆肥は、牛農場の堆肥に比べて高いテトラサイクリン系抗菌薬量を示した。*tetA* 遺伝子量とテトラサイクリン系抗菌薬量は相関を示した。一般的に、豚農場では牛農場に比べて多くのテトラサイクリン系抗菌薬が使用されていることが知られている。以上のことから、抗菌薬の使用頻度が高い農場由来の堆肥に多くの薬剤耐性遺伝子及び薬剤耐性遺伝子が残留し、土壌及び作物への汚染リスクが高いことを示唆した。

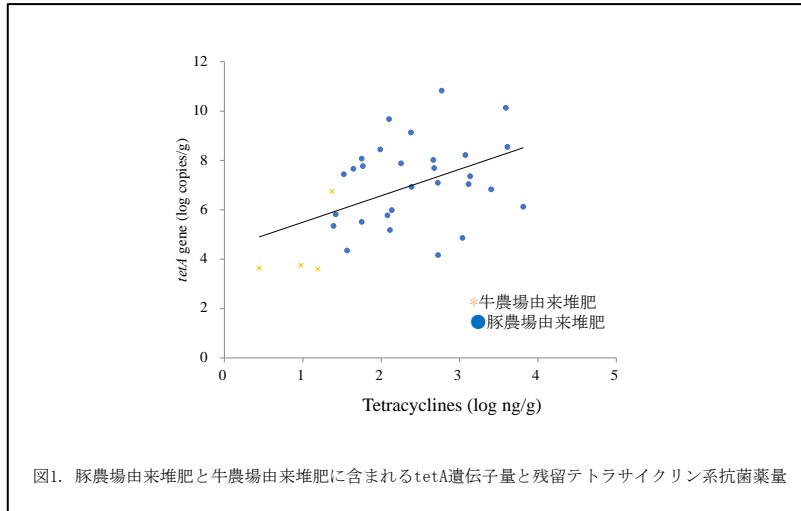


図1. 豚農場由来堆肥と牛農場由来堆肥に含まれる *tetA* 遺伝子量と残留テトラサイクリン系抗菌薬量

(2) 堆肥処理およびバイオガスプラント処理のいずれにおいても家畜排泄物に含まれる大腸菌量(テトラサイクリン耐性大腸菌量、セファゾリン耐性大腸菌量を含む)は減少した(図 2)。減少程度はバイオガスプラント処理で堆肥処理より大きかった。また、耐性遺伝子量に

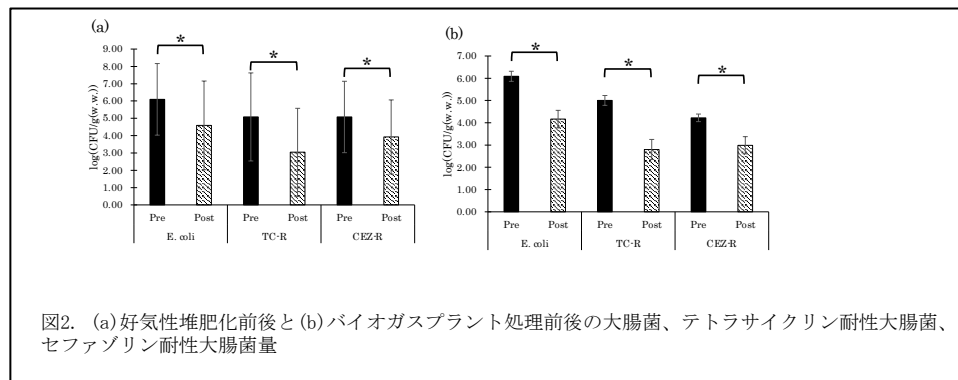


図2. (a)好気性堆肥化前後と(b)バイオガスプラント処理前後の大腸菌、テトラサイクリン耐性大腸菌、セファゾリン耐性大腸菌量

ついては、バイオガスプラント処理により、複数の薬剤耐性遺伝子において有意に減少した(図 3)。残留抗菌薬量は、いずれの処理によっても減少傾向を示した。以上の結果より堆肥処理およびバイオガスプラント処理は、家畜糞便中の耐性菌、耐性遺伝子量、抗菌薬量を減少させ、土壌および作物への汚染リスクを減少させることが示された。また、その程度はバイオ

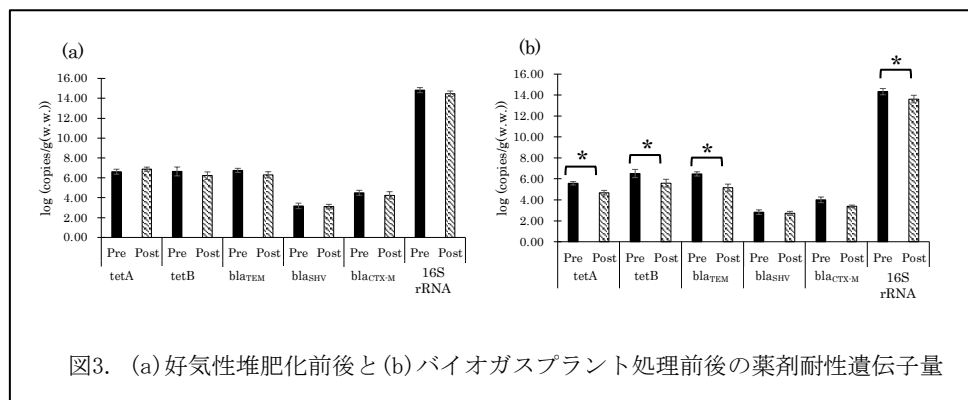
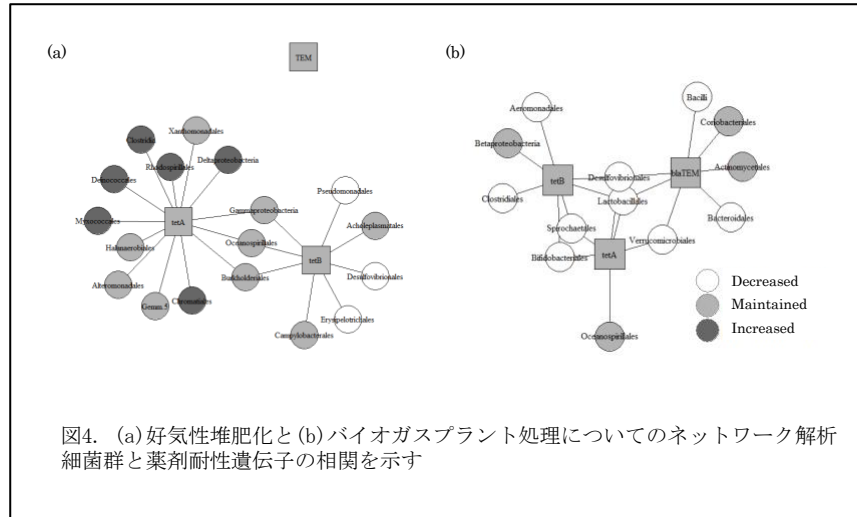
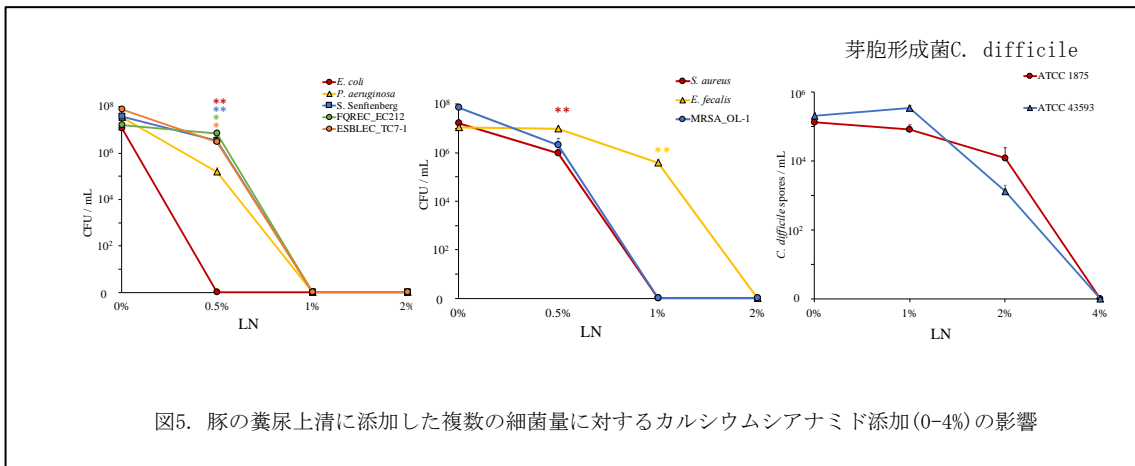


図3. (a)好気性堆肥化前後と(b)バイオガスプラント処理前後の薬剤耐性遺伝子量

ガスプラント処理が堆肥処理に比べて大きいことが明らかとなった。メタゲノム解析により、耐性遺伝子の宿主となっている細菌を推測することができた(図4)。



(3) 実験室内での試験の結果、いくつかの添加剤は、温度の上昇に関わらず、細菌量を減少させることが可能であることが明らかとなった(図5)。中でも、これまでの処理法では、死滅させることが困難であった、芽胞形成菌も、死滅させることが可能であることが明らかとなった。また、野外農場の堆肥場で、添加剤を加えた試験を実施したところ、十分に堆肥温度が上昇しなかった場合でも、添加剤を加えることで薬剤耐性菌を含む病原微生物を死滅させることが可能であることが明らかとなった。以上のことから、添加剤を活用することで、堆肥化が不十分な場合であっても薬剤耐性菌伝播のリスクを減少させることができることを示唆した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Katada S, Fukuda A, Nakajima C, Suzuki Y, Azuma T, Takei A, Takada H, Okamoto E, Kato T, Tamura Y, Usui M*.	4. 巻 12
2. 論文標題 Aerobic composting and anaerobic digestion decrease the copy numbers of antibiotic-resistant genes and the levels of lactose-degrading Enterobacteriaceae in dairy farms in Hokkaido, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 737420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.737420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshizawa N, Usui M*, Fukuda A, Asai T, Higuchi H, Okamoto E, Seki K, Takada H, Tamura Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Manure Compost Is a Potential Source of Tetracycline-Resistant Escherichia coli and Tetracycline Resistance Genes in Japanese Farms.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antibiotics (Basel).	6. 最初と最後の頁 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics9020076.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Usui M, Tamura Y, Asai T.	4. 巻 84
2. 論文標題 Current Status and Future Perspective of Antimicrobial-Resistant Bacteria and Resistance Genes in Animal-Breeding Environments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1292-1298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 江浪 誠俊、福田 昭、中島 千絵、鈴木 定彦、臼井 優
2. 発表標題 焼成ホタテ貝殻粉末と石灰窒素による堆肥中の薬剤耐性菌制御の可能性
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 臼井優
2. 発表標題 畜産排水と薬剤耐性菌
3. 学会等名 第57回日本水処理生物学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaru Usui
2. 発表標題 Current situation and future prospect of antibiotic-resistant bacteria derived from animals
3. 学会等名 FFTC-TLRI symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片田理志、福田昭、東剛志、武井彩華、高田秀重、田村豊、臼井優
2. 発表標題 乳牛糞便の堆肥化及び嫌気性消化による抗菌薬量・薬剤耐性菌数・薬剤耐性遺伝子量への影響の解明
3. 学会等名 第163回日本獣医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 臼井優
2. 発表標題 One Healthの視点からみた動物由来耐性菌の現状
3. 学会等名 福岡県One Health 国際フォーラム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaru Usui
2. 発表標題 One Health approach to antibiotic resistance in Japan
3. 学会等名 CZC and タマサート大学 joint seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井優
2. 発表標題 獣医療における薬剤耐性問題の実態とその対策
3. 学会等名 第22回水環境学会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaru Usui
2. 発表標題 One Health approach to antibiotic resistance in Japan
3. 学会等名 日仏セミナー[これからの微生物学] (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井優
2. 発表標題 獣医療や環境における薬剤耐性問題の実態とその対策
3. 学会等名 第9回家畜感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 臼井優
2. 発表標題 動物由来薬剤耐性菌の現状と今後の展望
3. 学会等名 第1回ワンヘルスネットワークセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru USUI
2. 発表標題 Potential Transmission of antimicrobial-resistant bacteria derived from livestock via vegetables in Japan
3. 学会等名 2nd ICAVESS (The second International Conference of Advance Veterinary Science for Sustainable Development) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masaru USUI
2. 発表標題 Current situation and future prospect of antibiotic-resistant bacteria derived from animals
3. 学会等名 第21回アジア獣医師会連合大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	東 剛志 (Azuma Takashi) (10634222)	大阪医科薬科大学・薬学部・助教 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	高田 秀重 (Takada Hideshige) (70187970)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授 (12605)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関