

家畜糞便中の薬剤耐性菌・耐性遺伝子に対する  
堆肥化の影響に関する研究

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

吉澤 頌樹

食品衛生学

指導教員 准教授 白井 優

2022 年度

## 目次

	頁
緒論	1
第 I 章 各温度条件が豚糞便中のテトラサイクリン (TC) 耐性 <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) 及び TC 耐性遺伝子 ( <i>tetA</i> 遺伝子) の消長に与える影響	
1. 序文	5
2. 材料と方法	
1) 供試菌	6
2) 供試材料	7
3) 各温度条件下における菌添加豚糞便培養試験	7
4) 生菌数計測	7
5) DNA 抽出	8
6) TC 耐性遺伝子 ( <i>tetA</i> 遺伝子) 定量	8
7) 統計解析	8
3. 結果	9
4. 考察	11
5. 小括	12
第 II 章 小型堆肥化実験装置を用いた好氣的堆肥化が TC 耐性 <i>E. coli</i> 及び TC 耐性遺伝子 ( <i>tetA</i> 遺伝子) の消長に与える影響	
1. 序文	14
2. 材料と方法	
1) 供試菌	15

2) 供試材料	15
3) 実験的好気的堆肥化試験	15
4) 生菌数計測	16
5) DNA 抽出	16
6) TC 耐性遺伝子 ( <i>tetA</i> 遺伝子) 定量	16
7) 16S rRNA 遺伝子定量	16
8) 統計解析	16
3. 結果	18
4. 考察	21
5. 小括	22

### 第Ⅲ章 日本の野外家畜糞便由来完熟堆肥中に存在するオキシテトラサイクリン (OTC) 耐性菌数、TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) 量及び残留 TC 系抗菌薬濃度に関する調査

1. 序文	24
2. 材料と方法	
1) 供試材料	24
2) OTC 耐性菌 (TCr) 生菌数計測	25
3) DNA 抽出	25
4) TC 耐性遺伝子 ( <i>tetA</i> 遺伝子) 定量	25
5) 残留 TC 系抗菌薬濃度計測	25
6) 統計解析	26
3. 結果	26
4. 考察	28
5. 小括	30

第IV章	豚飼料中への飼料添加物としてのコリスチン（CST）添加中止が 豚糞便由来 <i>E. coli</i> のプラスミド性 CST 耐性遺伝子 ( <i>mcr</i> 遺伝子) 保有率及び CST 耐性率に与える影響	
1.	序文	31
2.	材料と方法	
1)	検体採材	32
2)	CST 耐性遺伝子 ( <i>mcr</i> 遺伝子) 保有 <i>E. coli</i> 分離	33
3)	薬剤感受性試験	34
3.	結果	34
4.	考察	36
5.	小括	38
	総括	39
	謝辞	43
	引用文献	45
	英文要旨	56

## 緒論

抗菌薬は、細菌感染症に対する治療のためにヒト医療分野や獣医療分野、畜産分野などにおいて広く使用されている。さらに、畜産分野においては治療目的だけでなく、成長促進や飼料効率の改善のためにも使用されており、抗菌薬の過剰使用は薬剤耐性菌の選択圧となる上に、薬剤耐性遺伝子の伝播や獲得を促進させる[33]。日本における抗菌薬使用量の約50%は畜産分野が占めており[67]、世界的にも家畜由来の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の出現は大きな問題となっている[33, 52]。また、家畜由来の薬剤耐性菌/耐性遺伝子は、食品や環境などを介してヒトに伝播し、ヒトの細菌感染症に対する治療効果が十分に得られなくなる可能性があることから、公衆衛生上大きな問題となっている[51]。

家畜の糞尿には、病原微生物だけでなく薬剤耐性菌/耐性遺伝子も含まれており、家畜から環境への家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子の伝播経路のひとつとして挙げられる[7, 33]。病原微生物は、堆肥化や嫌氣的処理、浄化槽などで処理されることにより死滅するとされているが[16, 38, 41]、薬剤耐性菌/耐性遺伝子が病原微生物と同様に死滅/除去されるかは十分に検証されていない。堆肥化などで処理された後の家畜糞尿中に薬剤耐性菌/耐性遺伝子が残存していた場合、堆肥や排水などとともに土壌や河川に拡散される。土壌に拡散された薬剤耐性菌は土壌中で生存・増殖し[40]、野菜などを介してヒトに伝播する可能性がある[54]。したがって、家畜糞尿処理過程において、病原微生物だけでなく薬剤耐性菌も死滅させることが必要である。また、土壌中において、家畜由来薬剤耐性菌のプラスミド性薬剤耐性遺伝子や染色体上のトランスポゾンが土壌由来菌に水平伝達し、新たな薬剤耐性菌となることや[15, 26]、土壌由来菌が家畜由来薬剤

耐性遺伝子を形質転換により獲得し、薬剤耐性菌となることが示唆されている[30, 32, 37]。さらに、家畜糞尿中の薬剤耐性遺伝子が土壌を介して植物に伝播することが示唆されている[56]。以上のことから、家畜からヒトへの伝播リスクとしては、薬剤耐性菌だけでなく薬剤耐性遺伝子にも着目する必要がある。

米国の環境保護庁（United States Environmental Protection Agency ; EPA）は、家畜糞尿を堆肥化する際に堆肥温度を 55°C 以上、かつ 3 日間以上持続させることで、病原微生物の死滅が保証されると提言している[41]。日本において主に用いられている好氣的堆肥化では、好気性微生物による発酵熱が生じることで EPA の提言と同程度の条件となることから、病原微生物を死滅させることが可能と考えられる。また、EPA の提言と同程度の条件で、家畜糞尿中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子も死滅/除去させることができる可能性があるが、科学的なデータを基に検証する必要がある。

過去の報告において、実験的堆肥化による薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に関する調査がされているが、各報告によって堆肥化に用いる資材や堆肥化条件が様々であり、結果が異なっている[53, 55]。したがって、堆肥化による薬剤耐性菌/耐性遺伝子への影響については、様々な条件下における情報が必要とされている。しかし、日本で一般的に行われている好氣的堆肥化過程において、薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に関する調査を行った報告はない。

本研究では、好氣的堆肥化が薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与える影響の解明を試みた。はじめに、テトラサイクリン（TC）耐性 *Escherichia coli* (*E. coli*) は、豚糞便中において 55°C で 1 日、37°C で 10 日、25°C で 30 日、4°C で 100 日の培養により検出限界（50 CFU/g）以下まで減少することを明らかにした。環境由来菌として用いた *Pseudomonas aeruginosa* は、

豚糞便中において 55°C で 1 日、37°C で 30 日、25°C で 100 日の培養により検出限界 (50 CFU/g) 以下まで減少し、4°C で 100 日以上生存することを明らかにした。TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) は、豚糞便中において 55°C で 5 日、37°C で 25 日の培養により有意に減少し、25°C、4°C で 100 日間の培養により減少することを明らかにした (第 I 章)。次に、豚糞便を資材とした小型堆肥化実験装置による実験的好氣的堆肥化試験において、TC 耐性 *E. coli* は、6 日目に堆肥温度が 55°C に到達したことに伴い、7 日目に検出限界 (50 CFU/g) 以下になることを明らかにした。*tetA* 遺伝子は、4 日目の堆肥温度上昇に伴い、5 日目に有意に減少することを明らかにした (第 II 章)。次に、日本の野外家畜糞便由来完熟堆肥において、オキシテトラサイクリン (OTC) 耐性菌は 54.5% 検出 (豚由来 4/7 サンプル、牛由来 2/4 サンプル)、*tetA* 遺伝子は 100% 検出 (豚由来 7/7 サンプル、牛由来 4/4 サンプル) されることを明らかにした。また、TC 系抗菌薬は 100% 検出 (豚由来 29/29 サンプル、牛由来 4/4 サンプル) され、豚糞便由来堆肥サンプルの残留 TC 系抗菌薬濃度は牛糞便由来堆肥サンプルよりも有意に高値を示すことを明らかにした。さらに、野外家畜糞便由来完熟堆肥中の *tetA* 遺伝子コピー数及び残留 TC 系抗菌薬濃度間には有意な正の相関が認められることを明らかにした (第 III 章)。最後に、家畜糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子量を減少させる方法として、豚飼料中への飼料添加物としてのコリスチン (CST) 添加中止が豚糞便由来 *E. coli* のプラスミド性 CST 耐性遺伝子保有率及び CST 耐性率に与える影響の解明を試みた。飼料中に CST が添加されていた豚舎において、CST 添加中止により *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* 分離率及び CST 耐性率が約 6 か月で減少することを明らかにした (第 IV 章)。

以上、好氣的堆肥化が家畜糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与

える影響及び養豚農場における飼料中への抗菌薬添加中止が糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与える影響を解明し、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子が堆肥を介して環境中に拡散することを防ぐための基礎的知見の構築を試みた。

# 第 I 章 各温度条件が豚糞便中のテトラサイクリン (TC) 耐性 *Escherichia coli* (*E. coli*) 及び TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) の消長に与える影響

## 1. 序文

家畜由来の薬剤耐性菌/耐性遺伝子は、食品や環境などを介してヒトに伝播し、ヒトの細菌感染症に対する治療効果が十分に得られなくなる可能性があることから、公衆衛生上大きな問題となっている [51]。家畜から環境への家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子の伝播経路のひとつとして、家畜糞尿が挙げられる [33]。米国の環境保護庁 (United States Environmental Protection Agency ; EPA) は、家畜糞尿を堆肥化する際に堆肥温度を 55°C 以上かつ 3 日間以上持続させることで、病原微生物の死滅が保証されると提言しているが [41]、同様の条件で家畜糞尿中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子も死滅/除去させることができるかは十分に検証されていない。

家畜糞尿中には、ヒト医療分野においても問題となっている薬剤耐性菌として、*Escherichia coli* (*E. coli*)、*Enterococcus spp.* (vancomycin-resistant enterococci など)、*Salmonella spp.* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium definitive type 104 など)、*Campylobacter spp.*、*Staphylococcus spp.* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* など)、*Clostridioides (Clostridium) difficile* などが含まれている可能性があるが [1, 43]、本試験では糞便由来菌として *E. coli* を調査対象とした。また、ヒト医療分野で多剤耐性菌として問題となっている *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) は家畜糞尿中には含まれていないが、堆肥副資材のモミガラや稲わらに含まれていることがあることから [18]、環境由来菌として調査対象とした。

日本における抗菌薬使用量の約 50%は畜産分野が占めており [67]、治療目的だけでなく成長促進や飼料効率の改善のためにも使用されている [33]。加えて、家畜種別では豚に対する使用量が最も多いことから [64]、豚糞便を堆肥資材として用いた堆肥化における薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長を調査することとした。

また、日本の畜産分野で使用される抗菌薬のうち、テトラサイクリン (TC) 系抗菌薬が最も多く販売されており (311,177kg/年, 2018 年) [64]、海外においても日本と同様に畜産分野において TC 系抗菌薬が広く使用されていることから [23]、TC 耐性を調査対象とした。

TC 系抗菌薬に対する細菌の耐性機構は、排出ポンプによる薬剤の菌体外への能動的排出、リボソーム保護タンパク質の産生によるリボソームの保護・防御、修飾酵素による薬剤の不活化の 3 つが主である [39]。なかでも、グラム陰性菌の TC 耐性の多くは、排出ポンプに関連したプラスミド性 TC 耐性遺伝子によるものである [60]。排出ポンプに関連したプラスミド性 TC 耐性遺伝子は少なくとも 26 種類が報告されているが [39]、特に家畜から頻繁に分離され [21, 35, 45]、農場に広く存在していると考えられる *tetA* 遺伝子を調査対象とした。

本章では、堆肥化過程における堆肥温度を想定した各温度条件が、豚糞便に添加した *tetA* 遺伝子保有 *E. coli* 及び *P. aeruginosa* の消長に与える影響の解明を試みた。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌

供試菌は、*E. coli* 及び *P. aeruginosa* を用いた。供試菌株は、プラスミド性 TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) を保有し、加えて、染色体性リファン

ピシシ耐性 (Minimum Inhibitory Concentration (MIC) : 512  $\mu$ g/mL) を示す実験室系統株 *E. coli* (TC7-1/DH5  $\alpha$  [13]) 及びリファンピシシ弱耐性 (MIC : 16–64  $\mu$ g/mL) を示す *P. aeruginosa* (ATCC 27853) を用いた。Mueller-Hinton Broth (MHB) (OXOID、Hampshire、UK) 5mL に *E. coli* (TC7-1/DH5  $\alpha$ ) もしくは *P. aeruginosa* (ATCC 27853) を懸濁し、37°C、24 時間培養したものを各供試菌液とした。

## 2) 供試材料

母豚糞便を酪農学園大学附属農場において採材後 4°C で保管し、3 日以内に試験に供した。

## 3) 各温度条件下における菌添加豚糞便培養試験

豚糞便 10g を入れたプラスチックチューブ に *E. coli* 菌液 500  $\mu$ L 及び 0.85% 滅菌生理食塩水 1,500  $\mu$ L (最終菌濃度 :  $10^6 \sim 10^7$  Colony Forming Unit (CFU) /g)、もしくは *P. aeruginosa* 菌液 2,000  $\mu$ L (最終菌濃度 :  $10^6 \sim 10^7$  CFU/g) を添加し、4°C、25°C、37°C、55°C の恒温器で 100 日間培養した。*E. coli* 添加群は 0、1、3、5、7、10、15、20、25、30、60、80、100 日目、*P. aeruginosa* 添加群は 0、1、5、10、30、60、80、100 日目に同一プラスチックチューブからサンプルを回収した。試験は 3 回繰り返して行い、平均値及び標準誤差を算出した。

## 4) 生菌数計測

回収したサンプル 0.2g を 0.85% 滅菌生理食塩水 1mL に懸濁した後に 10 倍段階希釈を行ってサンプル希釈液とし、以下の各選択培地に 100  $\mu$ L 塗布した後 37°C、24 時間培養し、生菌数を測定した。*E. coli* (TC7-1/DH5  $\alpha$ ) の選択培地として、リファンピシシ (SIGMA-ALDRICH、MO、USA) 50mg/L を添加した Mueller-Hinton agar (MHA)

(OXOID)、*P. aeruginosa* (ATCC 27853) の選択培地として、リファン

ピシン (SIGMA-ALDRICH) 8mg/L を添加した MHA (OXOID) を使用した。

#### 5) DNA 抽出

ISOFECAL (NIPPON GENE、東京、日本) を添付のプロトコールに従って用い、回収したサンプル 0.2g から DNA を抽出した。

#### 6) TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) 定量

SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) 10  $\mu$  L に *tetA* 遺伝子を標的とした 20  $\mu$  M プライマー (表 1) 各 0.4  $\mu$  L 及び希釈液 5  $\mu$  L を加え、滅菌蒸留水 4.2  $\mu$  L で 20  $\mu$  L に調整した調整液を作成し、Light Cycler 480 II (Roche-Diagnostics、Basel、Switzerland) を用いて *tetA* 遺伝子のコピー数を測定した。反応条件は 95°C、30 秒間の初期変性、95°C、3 秒間の変性及び 52°C、30 秒間のアニーリング/伸長反応を 45 サイクル繰り返した後、融解曲線分析を行った。リアルタイム PCR は二重反復法で 3 回行い、遺伝子コピー数の平均値及び標準誤差を求めた。

#### 7) 統計解析

試験 0 日目と比較したサンプル回収日の生菌数及び *tetA* 遺伝子コピー数を Dunnett's test により多重比較検定し、 $p < 0.05$  を有意差とした。統計解析は R software を用いて実施した。

表 1. 使用プライマー

標的 遺伝子	塩基配列 (5'-3')	アニーリング 温度 (°C)	増幅 産物 (bp)	引用 文献
<i>tetA</i>	Forward GCTACATCCTGCTTGCCTTC	52	210	[27]
	Reverse CATAGATCGCCGTGAAGAGG			

### 3. 結果

各温度条件下における *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 生菌数、*P. aeruginosa* (ATCC 27853) 生菌数、*tetA* 遺伝子コピー数の推移を図 1 に示す。

*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *P. aeruginosa* (ATCC 27853) は 55°C 培養により、試験 1 日目に検出限界 (50CFU/g) 以下となった。*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) は、37°C で 7 日目、25°C で 25 日目、4°C で 80 日目まで生存した (図 1A)。

*P. aeruginosa* (ATCC 27853) は、37°C で 10 日目、25°C で 80 日目、4°C で 100 日目まで生存した (図 1B)。

*tetA* 遺伝子は 100 日間の培養により、55°C で 8.6 log copies/g から 2.5 log copies/g に、37°C で 8.1 log copies/g から 3.4 log copies/g に有意に減少した。25°C では 8.2 log copies/g から 5.6 log copies/g、4°C では 7.5 log copies/g から 5.4 log copies/g となった (図 1C)。

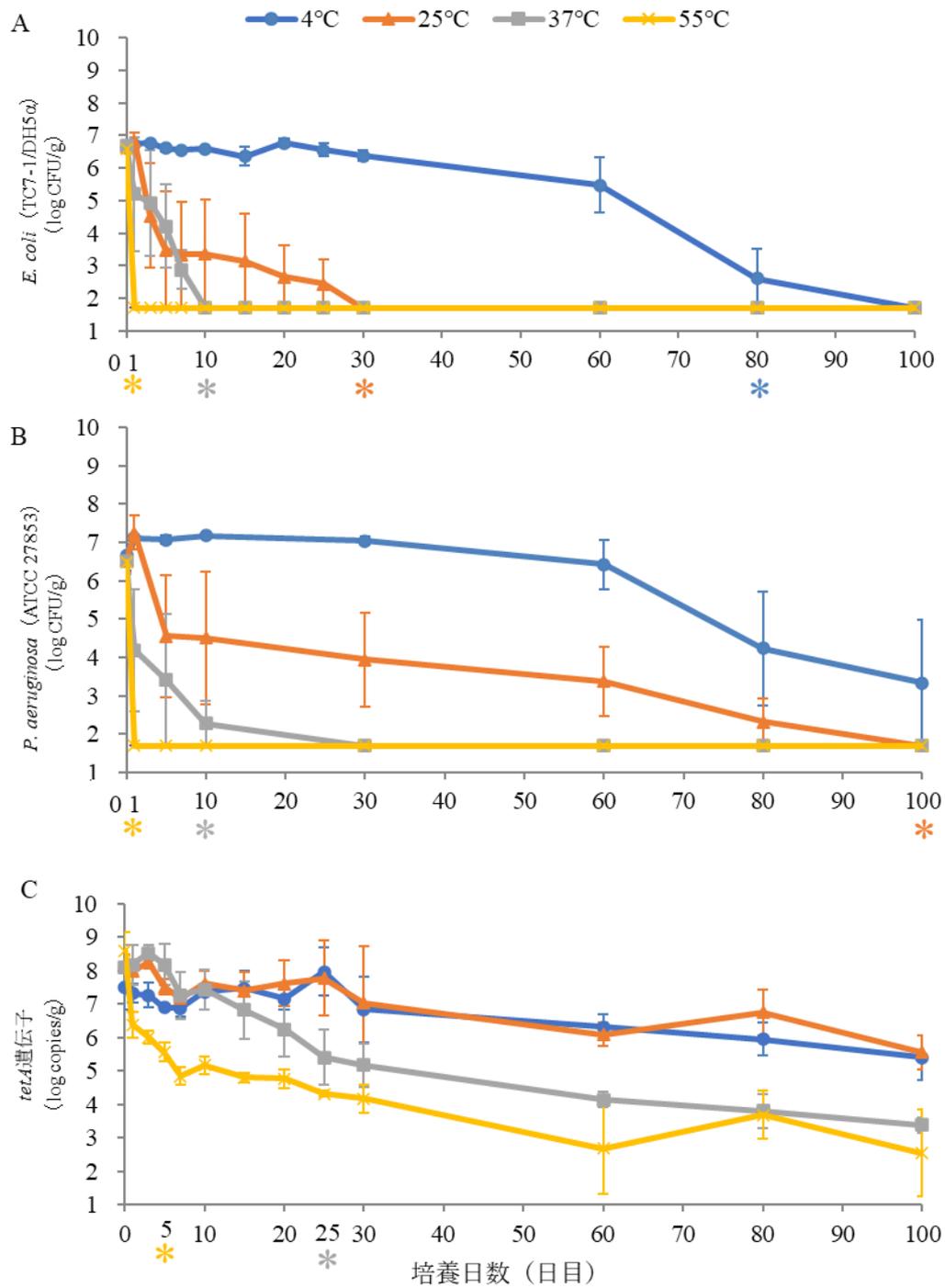


図 1. 各温度条件下の菌添加豚糞便培養試験における (A) *Escherichia coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 生菌数、(B) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) 生菌数、(C) *tetA* 遺伝子コピー数の推移 (\* : 0 日目と比較して最初に有意差が認められた日目)

#### 4. 考察

本試験において、豚糞便に添加した *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *P. aeruginosa* (ATCC 27853) は 55°C で 1 日以内に検出限界以下となった。この結果から、EPA が提言する条件 (55°C 以上かつ 3 日間以上) を満たす好氣的堆肥化により、TC 耐性 *E. coli* 及び *P. aeruginosa* の多くが減少することが示唆された。堆肥温度が 55°C 以上に上昇した家畜糞便由来堆肥から多剤耐性 *P. aeruginosa* が分離されたという報告があるが [18]、本試験で再現性はみられなかった。しかし、*P. aeruginosa* や *E. coli* は耐熱性変異株の存在が報告されていることから [10]、堆肥温度によっては生存する可能性がある。さらに、芽胞形成菌の *Clostridioides difficile* が 55°C に加温した豚糞便中で 10 日間生存したという報告がある [42]。以上のことから、EPA が提言する条件を満たす好氣的堆肥化により病原微生物や薬剤耐性菌の全てを完全に死滅させることは困難であるが、菌量を減少させることが示唆された。

また、*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *P. aeruginosa* (ATCC 27853) は、37°C、25°C 及び 4°C では 7~100 日間生存し、低温であるほど長期間生存した。農場によっては堆肥化までの間に家畜糞尿を数日間保管する場合があります、病原微生物や薬剤耐性菌の環境中への拡散源となりうることから、早期に処理を行う必要がある。また、*E. coli* が 20°C 以下の乳用牛スラリー中で 3 か月間生存したという報告があり [28]、堆肥中の水分量が過剰な場合や好氣的堆肥化過程における通気量が過剰もしくは不十分な場合、寒冷期に堆肥化を行う場合などに堆肥温度の上昇が不十分となり [61, 65]、薬剤耐性菌を含む細菌が堆肥中に長期間生存することが示唆されている。また、一度検出限界以下まで減少した家畜糞便由来堆肥において、*E. coli* などの病原菌が再増殖することが報告されている [14]。したがって、堆肥温度を均一に上昇させる必要があり、堆肥材料の均質化及び適切な切り返し

の実施、堆肥化期間の延長、堆肥材料の加熱等の工夫が必要であると考えられる。

*tetA* 遺伝子は、55°C及び 37°Cで 100 日間の培養により有意に減少したが、検出限界以下までは減少しなかった。排水沈殿物の嫌氣的処理において 55°Cで 5 日間、恒温器内における豚糞便の好氣的堆肥化において 55°Cで 48 日間 *tetA* 遺伝子が残存した報告がある[8, 48]。さらに、豚糞便中の *tetA* 遺伝子を含む TC 耐性遺伝子がオートクレーブ処理（121°C、30 分、3 回）後も残存したという報告がある[17]。以上のことから、*tetA* 遺伝子は EPA が提言する条件を満たす好氣的堆肥化により減少するものの完全に除去することは困難であることが示唆された。

本章では、55°C、37°C、25°C、4°Cの温度条件が豚糞便に添加した *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ )、*P. aeruginosa* (ATCC 27853)、*tetA* 遺伝子の消長に与える影響を明らかにした。これは、家畜糞尿を処理する際の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の低減に関する基礎的知見となり、今後、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子を低減/除去するための家畜糞尿処理条件の構築に貢献するものと考えられる。

## 5. 小括

各温度条件が豚糞便中の TC 耐性 *E. coli* 及び TC 耐性遺伝子の消長に与える影響を小括すると以下の通りである。

1) *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *P. aeruginosa* (ATCC 27853) は 55°Cで 1 日以内に検出限界以下となった。EPA が提言する条件（55°C以上かつ 3 日間以上）を満たす好氣的堆肥化により病原微生物や薬剤耐性菌の全てを完全に死滅させることは困難であるが、菌量を減少させうることが示唆された。

2) *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *P. aeruginosa* (ATCC 27853) は、37°C、25°C及び 4°Cでは 7~100 日間生存し、低温であるほど長期間生存した。堆肥化の際には堆肥温度を均一に上昇させる必要があり、堆肥材料の均質化及び適切な切り返しの実施、堆肥化期間の延長、堆肥材料の加熱等の工夫が必要であると考えられる。

3) *tetA* 遺伝子は、55°C及び 37°Cで 100 日間の培養により有意に減少したが、検出限界は下回らなかった。*tetA* 遺伝子は EPA が提言する条件を満たす好氣的堆肥化により減少するものの完全に除去することは困難であることが示唆された。

## 第 II 章 小型堆肥化実験装置を用いた好氣的堆肥化が TC 耐性 *E. coli* 及び TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) の消長に与える影響

### 1. 序文

第 I 章において、豚糞便に添加した *tetA* 遺伝子保有 *E. coli* 及び *P. aeruginosa* は、EPA が提言する条件 (55°C 以上かつ 3 日間以上) によって検出限界以下まで減少することが示唆された。一方、*tetA* 遺伝子は有意に減少するものの、完全に除去することは困難であることが示唆された。しかし、本試験はサンプルを均一かつ一定に加温することにより堆肥温度を再現したものであり、堆肥資材や産生される発酵熱の不均一性、切り返し作業や外気温の影響による堆肥温度の上昇及び下降などは再現されていない。したがって、実際の好氣的堆肥化を再現した条件において、さらなる検証が必要である。

好氣的堆肥化では、はじめに中温性細菌によって堆肥材料中の易分解性物質 (糖質やたんぱく質など) が分解される際に発酵熱が生じ、堆肥温度が上昇する。次に、高温性 (好熱性) 細菌によってセルロースやヘミセルロースが分解される際にさらに発酵熱が生じ、堆肥温度は 60~80°C まで上昇する。各成分が分解された後は再び中温性細菌が優勢となり、堆肥温度は低下する [57]。

実験的な好氣的堆肥化により、薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長を観察した報告はあるが、堆肥温度の変化をウォーターバスで再現したものや [47]、コンピューターでコントロールされたものであり [36]、好氣的堆肥化過程で産生される発酵熱による堆肥温度の変化の下で薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長を観察した報告はない。

実験的に好氣的堆肥化を行う際の課題として、資材 (家畜糞便) 及び副

資材（モミガラ、稲わらなど）の確保、堆肥化場所の確保、通気及び切り返し作業の実施、堆肥温度の経時的測定、複数試験の実施、サンプル採材の簡便性などがある。したがって、本試験では通気ポンプ及び温度記録計を有し、少量の資材及び副資材で複数台同時に試験を実施可能な、市販の小型堆肥化実験装置（かぐやひめ）（富士平工業株式会社、東京、日本）を用いて行うこととした[58]。

本章では、小型堆肥化実験装置を用いた好氣的堆肥化が、堆肥材料に添加した *tetA* 遺伝子保有 *E. coli* の消長に与える影響の解明を試みた。

## 2. 材料と方法

### 1) 供試菌

供試菌は、*E. coli* を用いた。供試菌株は、第 I 章と同様に *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) を用いた。MHB (OXOID) 50mL に *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) を懸濁し、37°C、24 時間培養したものを供試菌液とした。

### 2) 供試材料

母豚糞便を酪農学園大学附属農場において採材後 4°C で保管し、3 日以内に試験に供した。乾燥器を用いて水分含量を測定 (105°C、48 時間) した豚糞便 1,877g (水分含量: 66.64%)、モミガラ 623g (水分含量: 9.58%)、*E. coli* 菌液 500mL (最終菌濃度: 10<sup>7</sup>CFU/g) (水分含量: 97.94%) を総重量 3kg、最終水分含量 60% になるように混合した。

### 3) 実験的好氣的堆肥化試験

実験的好氣的堆肥化試験は、小型堆肥化実験装置（かぐやひめ）（富士平工業株式会社、東京、日本）（図 2）への投入群及び室温でプラスチックバケツ内に投入したコントロール群の 2 群作成し、2016 年 3 月～4 月に実施した。小型堆肥化実験装置投入群は、添付のプロトコールに従って 20 日

間の堆肥化を行った。0.5L/min の送気により好気条件にし、小型温度記録計 (TR-52i) (株式会社ティアンドデイ、長野、日本) を用いて堆肥の中心温度及び室温を記録した。20 日間の試験のうち、1、2、3、5、6、8、9、11、13、15 日目に堆肥化装置投入群で切り返しを行った。コントロール群では切り返しは行わずに室温で静置した。堆肥化装置投入群、コントロール群共に 0、1、3、5、7、9、11、13、15、17、20 日目にサンプルを回収した。堆肥化装置投入群は同時に二台の装置を用いて行い、平均値及び標準誤差を測定した。

#### 4) 生菌数計測

第 I 章 2-4) の手順に準拠して行った。

#### 5) DNA 抽出

第 I 章 2-5) の手順に準拠して行った。

#### 6) TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) 定量

第 I 章 2-6) の手順に準拠して行った。

#### 7) 16S rRNA 遺伝子定量

SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) 10  $\mu$  L に 16S rRNA 遺伝子を標的とした 20  $\mu$  M プライマー (表 2) 各 0.4  $\mu$  L 及び希釈液 5  $\mu$  L を加え、滅菌蒸留水 4.2  $\mu$  L で 20  $\mu$  L に調整した調整液を作成し、Light Cycler 480 II (Roche-Diagnostics) を用いて 16S rRNA 遺伝子のコピー数を測定した。反応条件は 95°C、30 秒間の初期変性、95°C、3 秒間の変性及び 60°C、30 秒間のアニーリング/伸長反応を 45 サイクル繰り返した後、融解曲線分析を行った。リアルタイム PCR は二重反復法で 3 回行い、遺伝子コピー数の平均値及び標準誤差を求めた。

#### 8) 統計解析

第 I 章 2-7) の手順に準拠して行った。

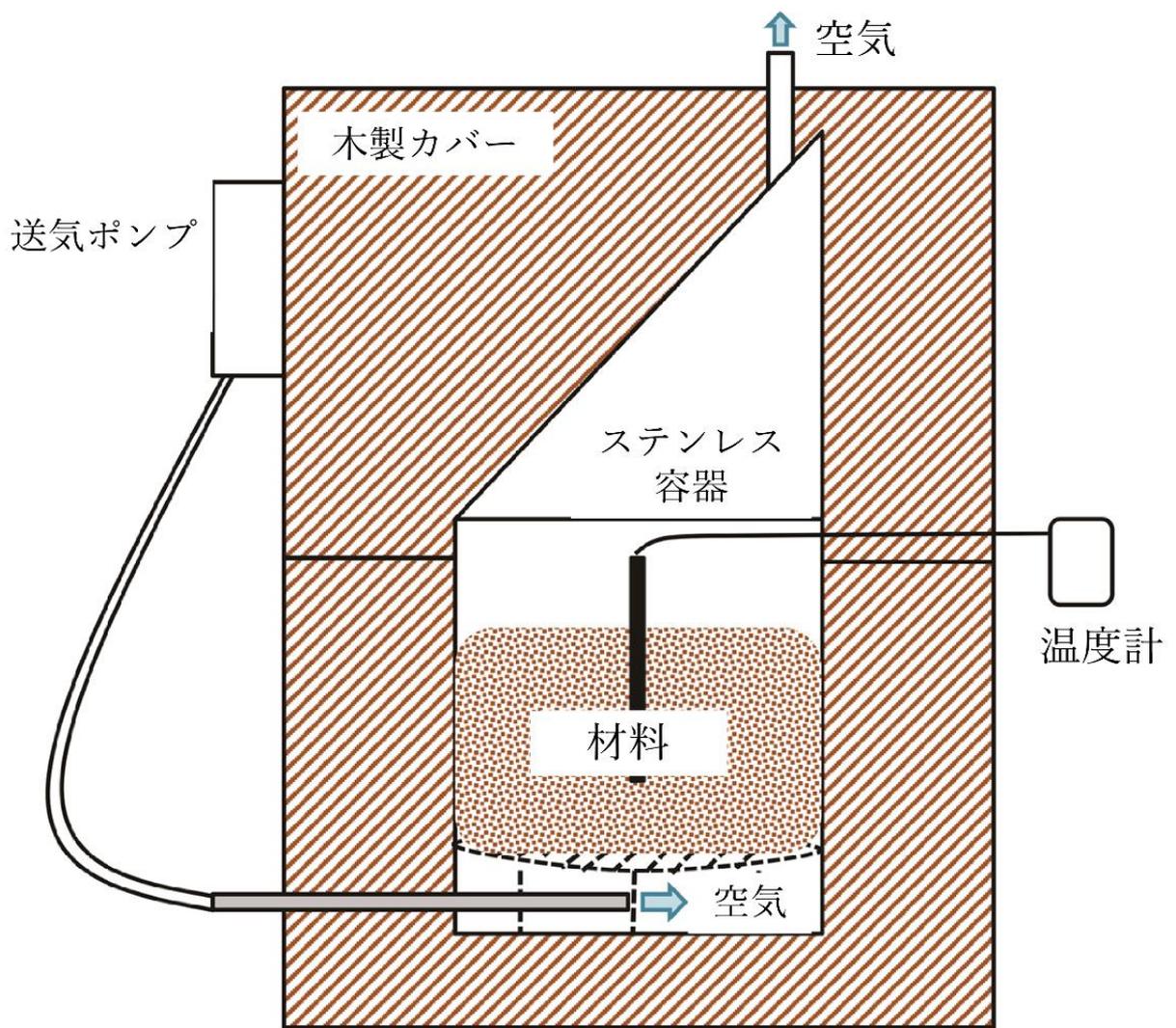


図 2. 小型堆肥化実験装置（かぐやひめ）図面

表 2. 使用プライマー

標的 遺伝子		塩基配列 (5'-3')	アニーリング 温度 (°C)	増幅 産物 (bp)	引用 文献
16S rRNA	Forward	CCTACGGGAGGCAGCAG	60	192	[50]
	Reverse	ATTACCGCGGCTGCTGG			

### 3. 結果

小型堆肥化実験装置による実験的好気的堆肥化試験における *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 生菌数、*tetA* 遺伝子コピー数、16S rRNA 遺伝子コピー数、堆肥温度、室温の推移を図 2 に示す。

小型堆肥化実験装置投入群において、試験 3 日目から堆肥温度の上昇が認められ、4 日目に 40.4°C、6 日目に最高到達温度の 62.8°C、10 日目に 49.5°C に達した。*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) は 6 日目に堆肥温度が 55°C まで到達した後、1 日以内に検出限界 (50 CFU/g) 以下となった。*tetA* 遺伝子コピー数は、4 日目の堆肥温度上昇に伴い、0 日目の 7.8 log copies/g から 5 日目に 3.8 log copies/g、20 日目に 3.5 log copies/g まで有意に減少した。16S rRNA 遺伝子コピー数は、5、15、17 日目に有意な減少が認められたものの、20 日目には有意な変化は認められなかった (図 3A)。

コントロール群において、20 日間で堆肥温度の上昇は認められなかった。*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 生菌数は 11 日目に検出限界 (50 CFU/g) 以下となったが、20 日目には 0 日目と同程度の生菌数が検出された。*tetA* 遺伝子コピー数、16S rRNA 遺伝子コピー数は 20 日間で変化は認められなかつ

た（図 3B）。

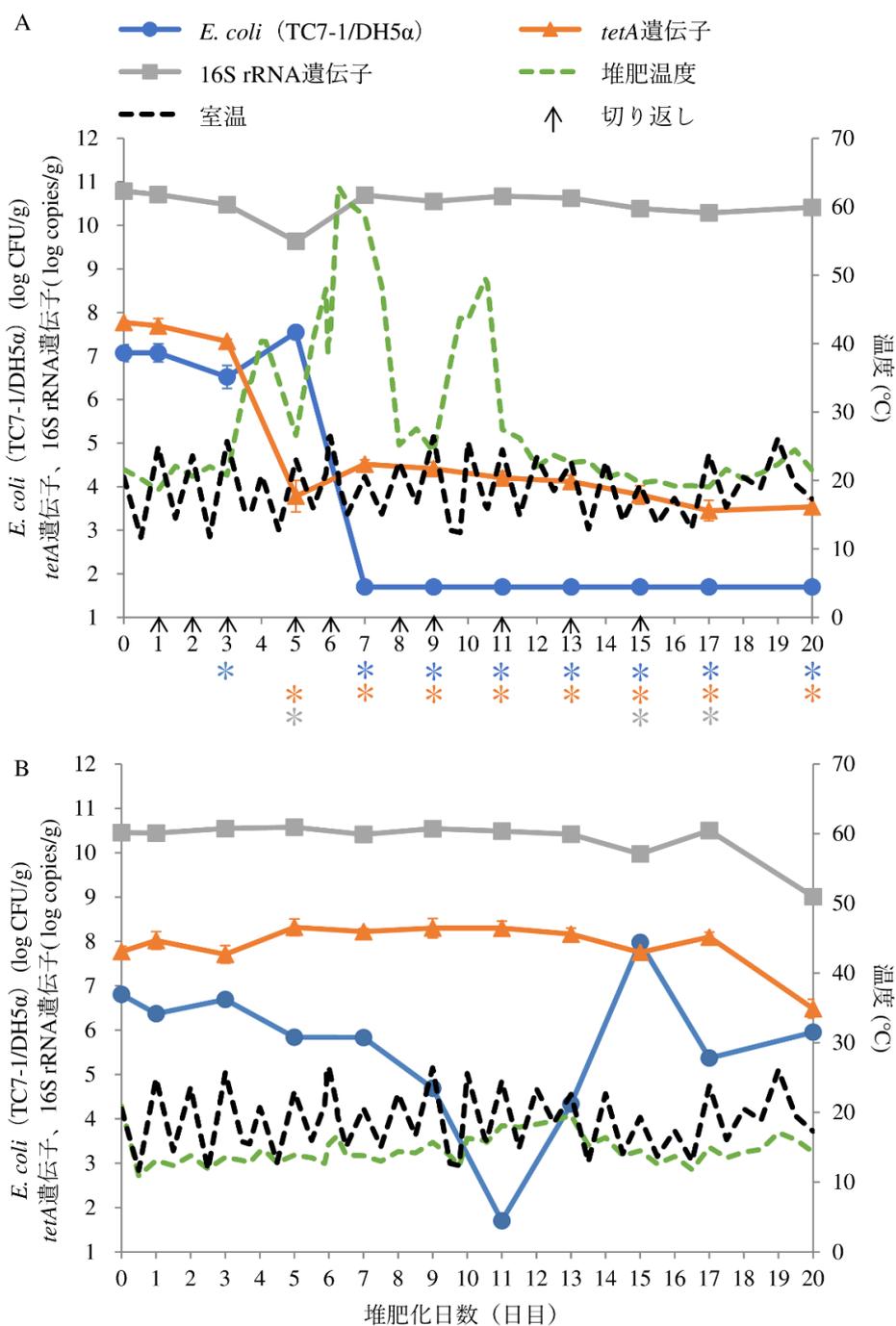


図 3. (A) 小型堆肥化実験装置投入群及び (B) コントロール群の実験的好気性堆肥化試験における *Escherichia coli* (TC7-1/DH5α) 生菌数、*tetA* 遺伝子コピー数、16S rRNA 遺伝子コピー数、堆肥温度、室温の推移 (\* : 小型堆肥化実験装置投入群のみ 0 日目と比較して有意差が認められた日目)

#### 4. 考察

本試験において、堆肥温度は EPA が提言する条件（55°C以上かつ 3 日間以上）のうち、55°C以上の条件は満たしたが、3 日間以上の条件を満たすことができなかった。好氣的堆肥化では、堆肥材料中の易分解性物質（糖質やたんぱく質など）や、セルロース、ヘミセルロースが分解される際に発酵熱が生じることから、これらの成分が枯渇したことにより 55°C以上の堆肥温度を維持できなかったものと考えられた。

小型堆肥化実験装置投入群において、試験 6 日目に堆肥温度が 55°Cに到達し、堆肥化材料に添加した *E. coli* (TC7-1/DH5  $\alpha$ ) は 1 日以内に検出限界（50 CFU/g）以下まで減少した。したがって、EPA が提言する条件に満たない好氣的堆肥化においても TC 耐性 *E. coli* の多くが減少したことから、EPA が提言する条件ではさらに TC 耐性 *E. coli* の多くが減少することが示唆された。

一方、*tetA* 遺伝子コピー数は、試験 4 日目に堆肥温度が 40.4°Cまで上昇したことに伴い 5 日目に有意に減少したが、検出限界以下までは減少しなかった。また、試験 6 日目に堆肥温度は 62.8°Cに達したが、5 日目から 20 日目までは、有意な変化はみられなかった。したがって、*tetA* 遺伝子は好氣的堆肥化による堆肥温度上昇によって減少するものの、完全に除去することは困難であることが示唆された。

16S rRNA 遺伝子コピー数は、試験 5、15、17 日目に有意な減少が認められたが、20 日目には有意な変化は認められなかった。16S rRNA 遺伝子コピー数は細菌種によって異なるが、サンプル中の総細菌量の推定及び細菌集団中の耐性遺伝子量の標準化に使用されている [2]。したがって、堆肥材料中の総細菌量は本試験期間中に変動がみられたものの、試験終了時には *E. coli* (TC7-1/DH5  $\alpha$ ) 及び *tetA* 遺伝子コピー数が特異的に減少して

いたことが示唆された。

本章では、小型堆肥化実験装置を用いた実験的好氣的堆肥化により、堆肥温度が 55°C 以上に達し、*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *tetA* 遺伝子が有意に減少することを明らかにした。しかし、*tetA* 遺伝子を完全に除去することは困難であることが示唆された。これは、日本において家畜糞尿の処理に一般的に用いられている好氣的堆肥化における薬剤耐性菌/耐性遺伝子の低減に関する基礎的知見となり、今後、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子をより低減/除去可能な好氣的堆肥化条件の構築に貢献するものと考えられる。

## 5. 小括

小型堆肥化実験装置を用いた好氣的堆肥化が TC 耐性 *E. coli* 及び TC 耐性遺伝子の消長に与える影響を小括すると以下の通りである。

1) *E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) は、小型堆肥化実験装置投入群の堆肥温度が試験 6 日目に 55°C に到達してから 1 日以内に検出限界 (50 CFU/g) 以下まで減少した。このことから、好氣的堆肥化により TC 耐性 *E. coli* の多くが減少することが示唆された。

2) *tetA* 遺伝子コピー数は、小型堆肥化実験装置投入群の堆肥温度が試験 4 日目に 40.4°C まで上昇したことに伴い 5 日目に有意に減少したが、検出限界以下までは減少しなかった。また、試験 6 日目に堆肥温度は 62.8°C に達したが、5 日目から 20 日目までは有意な変化はみられなかった。このことから、好氣的堆肥化により *tetA* 遺伝子は減少するものの完全に除去することは困難であることが示唆された。

3) 16S rRNA 遺伝子コピー数は、試験 5、15、17 日目に有意な減少が認められたが、20 日目には有意な変化は認められなかった。このことから、*E.*

*coli* (TC7-1/DH5  $\alpha$ ) 及び *tetA* 遺伝子コピー数が特異的に減少したことが示唆された。

### 第Ⅲ章 日本の野外家畜糞便由来完熟堆肥中に存在するオキシテトラサイクリン（OTC）耐性菌数、TC耐性遺伝子（*tetA*遺伝子）量及び残留TC系抗菌薬濃度に関する調査

#### 1. 序文

第Ⅰ章及び第Ⅱ章において、TC耐性 *E. coli* 及び TC耐性遺伝子（*tetA*遺伝子）はそれぞれ好氣的堆肥化により減少するが、TC耐性遺伝子（*tetA*遺伝子）は完全に除去できないことが示唆された。しかし、実際の畜産農場において好氣的堆肥化処理された家畜糞便由来完熟堆肥中に残存するTC耐性菌数及びTC遺伝子量については十分に調査されていない。

また、家畜に投与された抗菌薬の約75%は吸収されずに排泄されるという報告があることから[6]、家畜糞尿中には薬剤耐性菌/耐性遺伝子だけでなく残留抗菌薬も含まれていると考えられる。豚糞尿中のテトラサイクリン系抗菌薬が堆肥化処理により減少するという報告があるが[5]、実際の農場で好氣的堆肥化処理された家畜糞便由来完熟堆肥中に残留する抗菌薬量については十分に調査されていない。

したがって、本章では、日本の牛及び豚農場において好氣的堆肥化処理された家畜糞便由来完熟堆肥中に存在するオキシテトラサイクリン（OTC）耐性菌数、TC耐性遺伝子（*tetA*遺伝子）量及び残留TC系抗菌薬濃度を計測することとともに、残留TC系抗菌薬濃度とTC耐性遺伝子量の関係について解明を試みた。

#### 2. 材料と方法

##### 1) 供試材料

野外家畜糞便由来完熟堆肥中のオキシテトラサイクリン（OTC）耐性菌（TCr）生菌数及び *tetA* 遺伝子コピー数を計測するため、2014年8月か

ら 2015 年 11 月に採材された豚糞便由来完熟堆肥 7 農場 7 サンプル、牛糞便由来完熟堆肥 4 農場 4 サンプルの計 11 サンプルを用いた。

野外家畜糞便由来完熟堆肥中の *tetA* 遺伝子コピー数と残留抗菌薬濃度の相関を明らかにするため、2014 年 8 月から 2015 年 11 月に採材された豚糞便由来完熟堆肥 11 農場 29 サンプル、牛糞便由来完熟堆肥 4 農場 4 サンプルの計 33 サンプルを用いた。

全てのサンプルは、各農場において好氣的に堆肥化された。サンプルは全て採材後 -80°C で保存されたものを試験に供した。

## 2) OTC 耐性菌 (TCr) 生菌数計測

サンプル 0.2g を 0.85% 滅菌生理食塩水 1mL に懸濁した後に 10 倍段階希釈を行ってサンプル希釈液とし、OTC (SIGMA-ALDRICH) 50mg/L を添加した普通寒天培地 (日水製薬株式会社、東京、日本) に 100  $\mu$  L 塗布した後 37°C、24 時間培養し、生菌数を測定した。

## 3) DNA 抽出

第 I 章 2-5) の手順に準拠して行った。

## 4) TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) 定量

第 I 章 2-6) の手順に準拠して行った。

## 5) 残留 TC 系抗菌薬濃度計測

東京農工大学に依頼し、野外家畜糞便由来完熟堆肥サンプル中の TC 系抗菌薬 (TC、OTC、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、クロルテトラサイクリン) 濃度を固相カートリッジ (Oasis HLB resin) (Waters Corp., Milford, MA, USA) による固相抽出後、高速液体クロマトグラフィー (Accela) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 及びタンデム質量分析計 (Liquid Chromatograph-tandem mass Spectrometry (LC-MS/MS)) (Quantum Access) (Thermo Fisher Scientific) を用いて分析し

た。

## 6) 統計解析

豚糞便由来堆肥及び牛糞便由来堆肥間における TCr 生菌数及び *tetA* 遺伝子コピー数、残留 TC 系抗菌薬濃度の差を比較するため、Shapiro-Wilk test による正規性判定及び Wilcoxon rank sum test による順位和検定により判定した。

*tetA* 遺伝子コピー数及び残留 TC 系抗菌薬濃度の相関関係を Pearson's test により判定した。

各検定において  $p < 0.05$  を有意差とし、統計解析は R software を用いて実施した。

## 3. 結果

野外家畜糞便由来完熟堆肥における、由来家畜種及び農場毎の TCr 生菌数及び *tetA* 遺伝子の検出量を表 3 に示す。TCr は 54.5% (6/11) から検出され、そのうち豚糞便由来堆肥から 57.1% (4/7)、3.4–4.4 log CFU/g、牛糞便由来堆肥から 50.0% (2/4)、4.2–4.6 log CFU/g 検出された。*tetA* 遺伝子は全サンプル (11/11) から検出され、そのうち豚糞便由来堆肥から 4.2–8.6 log copies/g、牛糞便由来堆肥から 2.8–5.9 log copies/g 検出された。

TC 系抗菌薬は全サンプル (33/33) から検出された。豚糞便由来堆肥サンプルの残留 TC 系抗菌薬濃度は牛糞便由来堆肥サンプルよりも有意に高値を示した ( $p = 0.00007331$ )。*tetA* 遺伝子コピー数及び残留 TC 系抗菌薬濃度間には有意な正の相関が認められた ( $y = 1.0729x + 4.4226$ ,  $R = 0.47$ ,  $p = 0.005590$ ) (図 4)

表3. 野外堆肥中のオキシテトラサイクリン耐性菌 (TCr) 生菌数及び *tetA* 遺伝子コピー数

由来家畜種	農場	TCr(log CFU/g) <sup>a)</sup>	<i>tetA</i> 遺伝子 (log copies/g) <sup>b)</sup>
豚	A	4.35	4.35
	B	UD <sup>c)</sup>	5.82
	C	4.03	5.19
	D	3.38	8.56
	E	UD	6.00
	F	UD	4.18
	G	3.42	4.87
牛	H	4.64	2.91
	I	4.18	2.75
	J	UD	5.90
	K	UD	2.79

a) TCr生菌数検出限界：1.70 log CFU/g (50 CFU/g)

b) *tetA*遺伝子コピー数検出限界：2.92 log copies/g

c) 検出限界以下

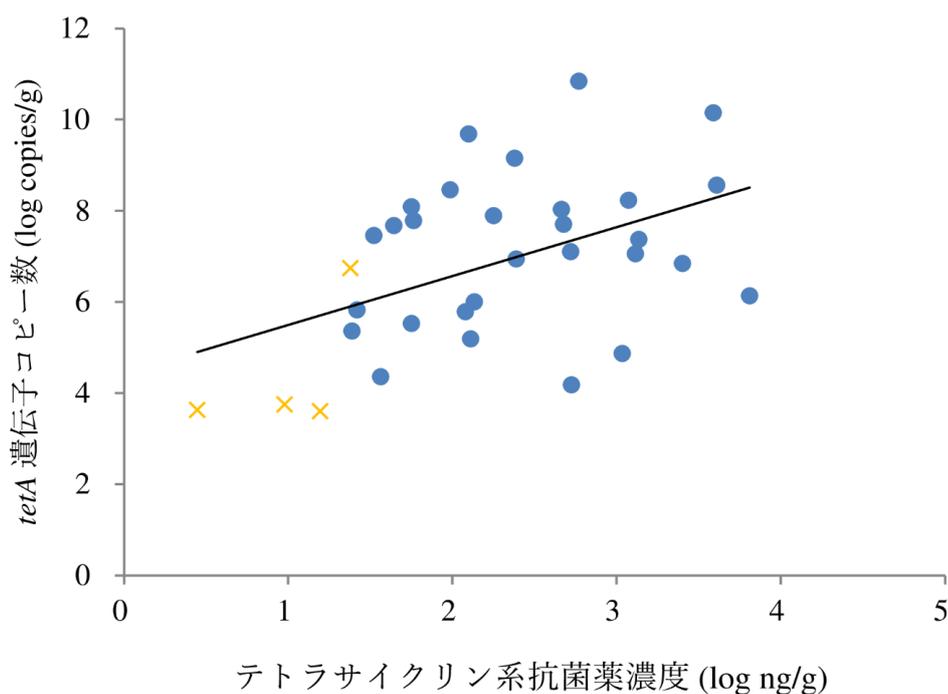


図 4. 野外家畜糞便由来完熟堆肥中における *tetA* 遺伝子コピー数及び残留テトラサイクリン系抗菌薬（オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、クロルテトラサイクリン）濃度の相関図（豚由来：青色●、牛由来：橙色×）（ $y = 1.0729x + 4.4226$ ,  $R = 0.47$ ,  $p = 0.005590$ ）

#### 4. 考察

本試験において、TCr は野外家畜糞便由来完熟堆肥 6 サンプル (54.5%) から検出された。由来家畜種別では、豚由来が 4 サンプル (57.1%) で 3.4–4.4 log CFU/g、牛由来が 2 サンプル (50.0%) で 4.2–4.6 log CFU/g の幅で検出された。第 I 章及び第 II 章の結果から、55°C 以上かつ 3 日間以上の条件を満たす好氣的堆肥化により、TC 耐性 *E. coli* の多くが減少することが示唆されたが、野外における完熟堆肥の半数以上に TC 耐性菌が残存していることが示唆された。実際の農場では、堆肥温度、堆肥化期間、堆肥材料 (水分量、副資材など)、外気温などの様々な要因により TC 耐性菌が死滅していない可能性が考えられた。

*tetA* 遺伝子は野外家畜糞便由来完熟堆肥 11 サンプル (100%) から検出された。由来家畜種別では、豚由来が 7 サンプル (100%) で 4.2–8.6 log copies/g、牛由来が 4 サンプル (100%) で 2.8–5.9 log copies/g の幅で検出された。第 I 章及び第 II 章の結果と同様に、好氣的堆肥化では *tetA* 遺伝子を低減させるものの完全に除去することは困難であり、野外における家畜糞便由来完熟堆肥の多くに *tetA* 遺伝子が残存していることが示唆された。家畜糞尿由来堆肥中に存在する薬剤耐性遺伝子は、散布された土壤中でヒトの病原性細菌に水平伝達し、薬剤耐性を獲得する可能性があることから、公衆衛生上のリスクと考えられている [11, 15]。また、実験室内における *E. coli* の形質転換効率は塩化カルシウム濃度及びプラスミド濃度に依存することから [24]、多くの薬剤耐性遺伝子存在下では形質転換効率が上昇し、薬剤耐性菌が生じる可能性が高まると考えられる。したがって、好氣的堆肥化により薬剤耐性遺伝子を低減させることは、薬剤耐性菌が生じる頻度を減少させるために有効ではあるが、完全に除去することが望ましいと考えられる。

TC 系抗菌薬は野外家畜糞便由来完熟堆肥 33 サンプル（100%）から検出された。実験的堆肥化において、堆肥材料中の TC 系抗菌薬濃度が減少するという報告がある一方[5, 9, 36]、野外における乳牛糞便由来堆肥中に TC 系抗菌薬が残留しているという報告がある[34]。実際の農場では、堆肥化の際に残留抗菌薬を減少させる条件（堆肥温度、堆肥材料の均質性など）が満たされず、結果として野外における家畜糞便由来完熟堆肥の多くに抗菌薬が残留している可能性がある。

由来家畜種別では、豚由来サンプルの残留 TC 系抗菌薬濃度は牛由来サンプルよりも有意に高値を示した。2014 年及び 2015 年の日本の養豚における TC 系抗菌薬販売量（原末換算量）は約 233~236 トンで、約 12 トンの乳用牛と比べて約 20 倍、約 6 トンの肉用牛と比べて約 40 倍多いことから[62, 63]、抗菌薬使用量が多いほど堆肥中の残留抗菌薬濃度が高くなることが示唆された。

野外家畜糞便由来完熟堆肥中の *tetA* 遺伝子コピー数及び残留 TC 系抗菌薬濃度間には、有意な正の相関が認められた（図 4）。したがって、家畜糞便由来堆肥中の残留抗菌薬濃度が高いほど薬剤耐性遺伝子が維持されやすいことが示唆された。

本章では、日本における複数の野外家畜糞便由来完熟堆肥中に TC 耐性菌及び *tetA* 遺伝子が残存し、TC 系抗菌薬が残留していることを明らかにした。また、堆肥中の残留 TC 系抗菌薬濃度と *tetA* 遺伝子コピー数には正の相関があることを明らかにした。本結果は、日本の農場において堆肥化された家畜糞便由来完熟堆肥が、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子の環境への拡散源となりうることを示唆する重要な知見である。今後、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子をより低減/除去可能な好気堆肥化条件の検討や、他の家畜糞尿処理方法に関するさらなる研究が必要であると考えられる。

## 5. 小括

日本の野外家畜糞便由来完熟堆肥中に存在するオキシテトラサイクリン（OTC）耐性菌数、TC 耐性遺伝子量及び残留 TC 系抗菌薬濃度に関する調査を小括すると以下の通りである。

- 1) OTC 耐性菌（TCr）は野外家畜糞便由来完熟堆肥 6 サンプル（54.5%）から検出された。第 I 章及び第 II 章の結果から、55°C 以上かつ 3 日間以上の条件を満たす好氣的堆肥化により、TC 耐性 *E. coli* の多くが減少することが示唆されたが、野外における完熟堆肥の半数以上に TC 耐性菌が残存していることが示唆された。
- 2) *tetA* 遺伝子は野外家畜糞便由来完熟堆肥 11 サンプル（100%）から検出された。好氣的堆肥化では *tetA* 遺伝子を完全に除去することは困難であり、野外における完熟堆肥の多くに *tetA* 遺伝子が残存していることが示唆された。
- 3) TC 系抗菌薬は野外家畜糞便由来完熟堆肥 33 サンプル（100%）から検出され、豚由来サンプルの残留 TC 系抗菌薬濃度は牛由来サンプルよりも有意に高値を示した。抗菌薬使用量と堆肥中の残留抗菌薬濃度には相関があることが示唆された。
- 4) 野外家畜糞便由来完熟堆肥中の *tetA* 遺伝子コピー数及び残留 TC 系抗菌薬濃度間には、有意な正の相関が認められた。家畜糞便由来堆肥中における残留抗菌薬濃度が高いほど薬剤耐性遺伝子が維持されやすいことが示唆された。

#### 第IV章 豚飼料中への飼料添加物としてのコリスチン（CST）添加中止が豚糞便由来 *E. coli* のプラスミド性 CST 耐性遺伝子 (*mcr* 遺伝子) 保有率及び CST 耐性率に与える影響

##### 1. 序文

第 I 章及び第 II 章において、豚糞便中の TC 耐性 *E. coli* 及び TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) は、好氣的堆肥化によりそれぞれ有意に減少することを明らかにしたが、TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) は堆肥化過程において完全に除去できないことが示唆された。また、第 III 章において、野外の家畜糞便由来完熟堆肥の多くに TC 耐性菌及び TC 耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) が残存し、さらに TC 系抗菌薬が残留していることが示唆された。家畜糞尿の処理過程における薬剤耐性遺伝子及び残留抗菌薬を除去するための対策として、より効果的な好氣的堆肥化条件の検討、堆肥副資材 (添加剤) の検討、好氣的堆肥化以外の家畜糞便処理方法 (嫌氣的処理やイエバエ幼虫堆肥化など) の検討などが考えられる [19, 46]。しかし、家畜糞尿の処理前の対策として、家畜糞便中の薬剤耐性遺伝子量を減少させることも重要な対策であると考えられる。したがって、家畜飼養時における抗菌薬使用量の削減が家畜糞便中の薬剤耐性遺伝子量の低減に与える影響を調査することとした。

コリスチン (CST) は、ヒト医療分野において多剤耐性グラム陰性桿菌感染症に対する最後の砦として重要な治療薬となっているとともに [29]、畜産分野においては、特に養豚農場において動物用医薬品や抗菌性飼料添加物として広く使用されてきた [20]。CST 耐性については、長らく染色体性機構のみが知られていたが、2015 年に中国でプラスミド性 CST 耐性遺伝子 (*mcr* 遺伝子) の *mcr-1* 遺伝子が初めて特定されて以降 [25]、日本を含む世界各国で検出報告があり [20, 22, 31]、CST 耐性の急速な拡大が懸

念されている。2017年には、食品安全委員会による「家畜に使用する硫酸コリスチンに係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価」により中程度のリスクと評価されたことから[66]、2018年7月に家畜の抗菌性飼料添加物としての指定が取り消され、動物用医薬品としては第二次選択薬に位置付けされた。

したがって、本章では、CSTの抗菌性飼料添加物としての指定取り消しを受けて、抗菌性飼料添加物としてCSTが添加されている飼料（CST添加飼料）からCSTが添加されていない飼料（CST未添加飼料）に切り替えを実施することとなった養豚農家において、豚飼料中への飼料添加物としてのCST添加中止が豚糞便における*E. coli*のプラスミド性CST耐性遺伝子保有率及びCST耐性率に与える影響を明らかにすることとした。

## 2. 材料と方法

### 1) 検体採材

愛媛県の養豚農家1農場において、繁殖豚舎1豚群（母豚）、分娩豚舎3豚群（1週齢、離乳1週前、離乳週）、離乳豚舎3豚群（移動後2週、移動後3週、移動後5週）、肥育豚舎2豚群（移動後5週、移動後7週）の計4豚舎9豚群の糞便を計3回採材した。繁殖豚舎では1個体の直腸便もしくは落下糞便を1検体、分娩豚舎、離乳豚舎及び肥育豚舎では5箇所の落下糞便を1検体とした。検体数は、繁殖豚舎では1豚群あたり5検体、分娩豚舎及び離乳豚舎では1豚群あたり2検体、肥育豚舎では1豚群あたり2検体とした（表4）。1回目の採材は、CST添加飼料からCST未添加飼料へ切り替えた2018年4月から約6~8か月前の2017年8月及び10月に実施した。2回目の採材は、CST未添加飼料へ切り替えた2018年4月から約6か月後の2018年11月に実施した。3回目の採材は、CST未添加飼

料へ切り替えた 2018 年 4 月から約 1 年後の 2019 年 3 月に実施した（図 5）。採材 1 回目時点では、分娩豚舎における 6 日齢から離乳豚舎における 70 日齢まで CST 添加飼料が給与されていたが、採材 2 回目及び 3 回目時点では CST 未添加飼料が給与されていた。

表4. 豚舎及び豚群（日齢）別採材検体数

豚舎	豚群	産歴・日齢	検体数
繁殖	母豚	初産～9産	5
分娩	1週齢	約7日	2
	離乳1週前	約18日	2
	離乳週	約25日	2
離乳	移動後2週	約42日	2
	移動後3週	約49日	2
	移動後5週	約63日	2
肥育	移動後5週	約120日	2
	移動後7～9週	約130～150日	2



図 5. 養豚場における飼料添加物コリスチン添加中止時期及び採材時期

## 2) CST 耐性遺伝子（*mcr* 遺伝子）保有 *E. coli* 分離

採材した糞便検体は、滅菌綿棒を用いて DHL（deoxycholate-hydrogen sulfate-lactose）寒天培地（日水製薬）に直接塗抹し、37°C、24 時間好気

培養した。赤色を呈したコロニーを 1 検体あたり 3 株釣菌し、PCR 法により *E. coli* と同定した [49]。次に、分離した *E. coli* を 1 検体あたり 2 株選択し、PCR 法により *mcr* 遺伝子 (*mcr-1*~*mcr-5*) の保有状況を確認した [31]。

### 3) 薬剤感受性試験

分娩豚舎及び離乳豚舎の分離株について、*mcr* 遺伝子保有株が分離された検体については 1 検体あたり *mcr* 遺伝子を保有する 1 株を選択、*mcr* 遺伝子保有株が分離されなかった検体については無作為に 1 検体あたり 1 株を選択し、CST の薬剤感受性を調査した。薬剤感受性は、寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し、European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) の定めるブレイクポイントから、 $MIC \geq 4 \mu\text{g/mL}$  を耐性とした。

## 3. 結果

全 3 回の採材において、繁殖豚舎及び肥育豚舎から *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* は分離されなかった。分娩豚舎からは、採材 1 回目に 2/3 豚群 4/6 検体、採材 2 回目に 2/3 豚群 3/6 検体、採材 3 回目に 1/3 豚群 1/6 検体、離乳豚舎からは、採材 1 回目に 3/3 豚群 6/6 検体、採材 2 回目に 1/3 豚群 1/6 検体、採材 3 回目に 2/3 豚群 3/6 検体から *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が分離された (表 5)。分離された *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* 18 検体のうち、採材 2 回目の分娩豚舎、離乳週 1 検体では *mcr-5* 遺伝子保有 *E. coli* であったが、他の 17 検体は、*mcr-1* 遺伝子保有 *E. coli* であった。

分娩豚舎及び離乳豚舎における *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* 分離率は、採材 1 回目が 83.3% (10/12 検体)、採材 2 回目及び 3 回目が 33.3% (4/12 検体) であった (表 6)。CST 耐性率は、採材 1 回目が 83.3% (10/12 検体)、採

材 2 回目が 16.7% (2/12 検体)、採材 3 回目 が 25.0% (3/12 検体) であ  
 った (表 6) (図 6)。

表5. *mcr*遺伝子保有*Escherichia coli*分離結果

豚舎	豚群	採材1回目		採材2回目		採材3回目	
		豚舎別分離率	保有 <i>mcr</i> 遺伝子	豚舎別分離率	保有 <i>mcr</i> 遺伝子	豚舎別分離率	保有 <i>mcr</i> 遺伝子
繁殖	母豚	0% (0/5)	— (0/5)	0% (0/5)	— (0/5)	0% (0/5)	— (0/5)
	1週齢		—		<i>mcr-1</i>		—
分娩	離乳1週前	66.7% (4/6)	<i>mcr-1</i> <i>mcr-1</i>	50.0% (3/6)	—	16.7% (1/6)	<i>mcr-1</i> —
	離乳週		<i>mcr-1</i> <i>mcr-1</i>		<i>mcr-1</i> <i>mcr-5</i>		— —
	移動後2週		<i>mcr-1</i> <i>mcr-1</i>		<i>mcr-1</i> —		<i>mcr-1</i> —
離乳	移動後3週	100% (6/6)	<i>mcr-1</i> <i>mcr-1</i>	16.7% (1/6)	—	50.0% (3/6)	<i>mcr-1</i> <i>mcr-1</i>
	移動後5週		<i>mcr-1</i> <i>mcr-1</i>		— —		— —
肥育	移動後5週	0% (0/4)	— (0/2)	0% (0/4)	(0/2)	0% (0/4)	(0/2)
	移動後7~9週		— (0/2)		— (0/2)		— (0/2)

表6. 分娩豚舎及び離乳豚舎における *mcr*遺伝子保有*Escherichia coli* (*E. coli*) 分離率とコリスチン耐性率

	採材1回目	採材2回目	採材3回目
<i>mcr</i> 遺伝子保有 <i>E. coli</i> 分離率	83.3% (10/12検体)	33.3% (4/12検体)	33.3% (4/12検体)
コリスチン耐性率	83.3% (10/12検体)	16.7% (2/12検体)	25.0% (3/12検体)

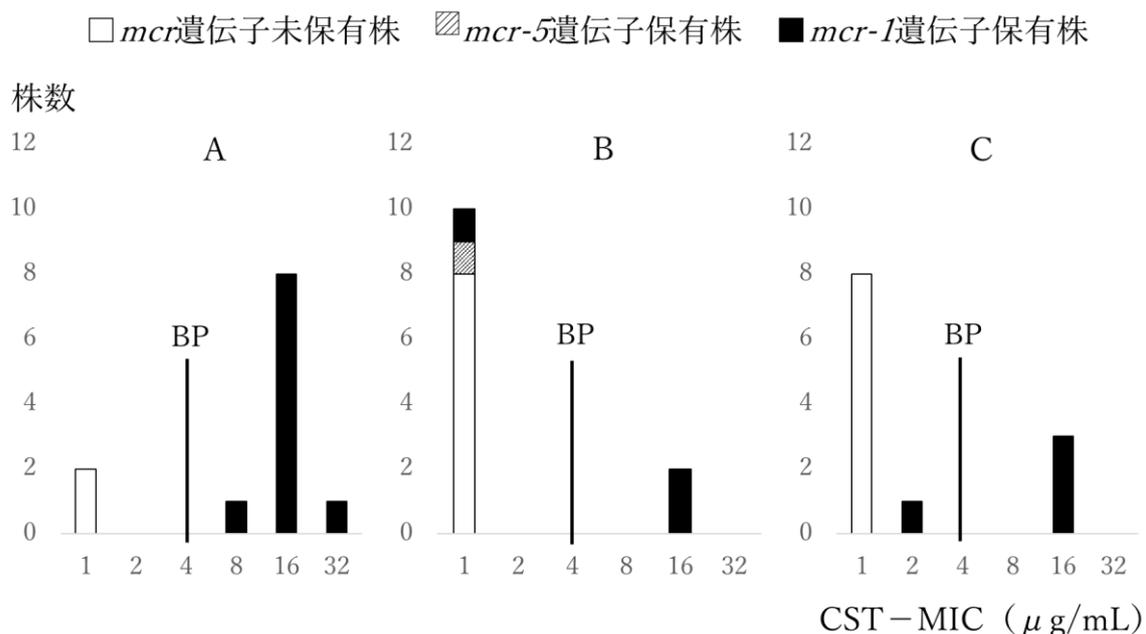


図 6. 分娩豚舎及び離乳豚舎分離株における *mcr* 遺伝子保有状況とコリスチン (CST) -MIC の推移 (A: 採材 1 回目 (CST 添加中止前)、B: 採材 2 回目 (CST 添加中止約 6 か月後)、C: 採材 3 回目 (CST 添加中止約 1 年後)) (BP: ブレイクポイント)

#### 4. 考察

3 回の採材全てにおいて、分娩豚舎及び離乳豚舎から *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が分離され、繁殖豚舎及び肥育豚舎からは分離されなかった。これは、1 回目の採材時に分娩豚舎及び離乳豚舎 (6~70 日齢) において抗菌性飼料添加物の CST が飼料中に添加されていたことが要因と考えられた。今回分離された *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* は、飼料中に添加された CST の選択圧により豚腸管内で選択されたことが示唆された。

分娩豚舎及び離乳豚舎から分離された *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* の分離率及び CST 耐性率は、採材 1 回目から採材 2 回目及び 3 回目にそれぞれ減少した。このことから、飼料中の CST 添加中止により CST の選択圧が無

くなることで、豚糞便中の *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が減少することが示唆された。一方、採材 2 回目と 3 回目では、*mcr* 遺伝子保有 *E. coli* 分離率及び CST 耐性率は減少しなかった。一般的に、薬剤耐性菌は感受性菌と比較して適応性が低下するため、抗菌薬による選択圧がなくなると耐性菌は淘汰され、感受性菌が優勢になるとされている[4]。しかし、*E. coli* やカンピロバクター属菌におけるクロラムフェニコール耐性や、カンピロバクター属菌におけるフルオロキノロン耐性においては、抗菌薬による選択圧がなくなっても耐性率が低下しないという報告や[59]、耐性を獲得しても適応性が減少しない、または増加するという報告がある[3]。Usui らは、本結果と同様に、飼料添加物としてのコリスチン使用禁止前後で豚糞便中 *E. coli* の CST 耐性率及び *mcr-1* 遺伝子保有率が有意に減少したものの、禁止から 1 年経過後も検出され続けたと報告していることから[44]、CST の選択圧が無い状態においても *mcr* 遺伝子または *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が豚糞便中に一定量維持されていることが示唆された。しかし、*mcr* 遺伝子の適応性については知見が少なく、CST 非選択圧下における *mcr* 遺伝子及び *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* の消長についてはさらなる研究が必要であると考えられる。

また、採材 1 回目の *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* は全 10 株が CST 耐性を示したが、採材 2 回目は 4 株中 2 株、採材 3 回目は 4 株中 1 株が *mcr* 遺伝子を保有しているにもかかわらず CST に感受性を示した。CST 感受性の *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* は、国内において分離報告が少数あるが[12, 20]、耐性の発現条件や遺伝子水平伝達頻度、CST 非選択圧下における消長については不明であるため、さらなる研究が必要であると考えられる。

本章では、飼料中の CST 添加中止により豚糞便由来 *E. coli* の *mcr* 遺伝子保有率及び CST 耐性率が約 6 か月で減少することを明らかにした。こ

これは、家畜糞便中及び家畜糞便由来堆肥中の薬剤耐性遺伝子量を減少させるためには、抗菌薬の添加量を削減することが有効であることを示唆する重要な知見である。今後は、CST 以外の抗菌薬においても同様の研究が必要である。

## 5. 小括

豚飼料中への飼料添加物としての CST 添加中止が豚糞便由来 *E. coli* のプラスミド性 CST 耐性遺伝子保有率及び CST 耐性率に与える影響を小括すると以下の通りである。

1) 1 回目の採材時に抗菌性飼料添加物の CST が飼料中に添加されていた分娩豚舎及び離乳豚舎（6～70 日齢）において、*mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が分離され、繁殖豚舎及び肥育豚舎からは分離されなかった。このことから、今回分離された *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* は、飼料中に添加された CST の選択圧により豚腸管内で選択されたことが示唆された。

2) 分娩豚舎及び離乳豚舎から分離された *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* の分離率及び CST 耐性率は、採材 1 回目から採材 2 回目及び 3 回目にそれぞれ減少した。このことから、飼料中の CST 添加中止により CST の選択圧が無くなることで、豚糞便中の *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が減少することが示唆された。

3) 採材 2 回目と 3 回目では、*mcr* 遺伝子保有 *E. coli* 分離率及び CST 耐性率は減少しなかった。このことから、CST の選択圧が無い状態においても *mcr* 遺伝子または *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が豚糞便中に一定量維持されていることが示唆された。

## 総括

本研究は、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子が堆肥を介して環境中に拡散することを防ぐための基礎的知見の構築を目的とし、堆肥化過程における堆肥温度を想定した各温度条件が、豚糞便に添加した *tetA* 遺伝子保有 *E. coli* 及び *P. aeruginosa* の消長に与える影響を解析した。また、小型堆肥化実験装置を用いた好氣的堆肥化が、堆肥材料に添加した *tetA* 遺伝子保有 *E. coli* の消長に与える影響を解析した。また、日本の牛及び豚農場において好氣的堆肥化処理された家畜糞便由来完熟堆肥中に存在するオキシテトラサイクリン（OTC）耐性 *E. coli* 数、TC 耐性遺伝子（*tetA* 遺伝子）量及び残留 TC 系抗菌薬濃度を計測することとともに、残留 TC 系抗菌薬濃度と TC 耐性遺伝子量の関係について解析した。さらに、豚飼料中への飼料添加物としての CST 添加中止が豚糞便における *E. coli* のプラスミド性 CST 耐性遺伝子保有率及び CST 耐性率に与える影響を解析した。これらの研究から以下の結果を得た。

1. 各温度条件が豚糞便中の TC 耐性 *E. coli* 及び TC 耐性遺伝子の消長に与える影響

*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *P. aeruginosa* (ATCC 27853) は、55°C で 1 日以内に検出限界以下となった。また、37°C、25°C 及び 4°C では 7~100 日間生存し、低温であるほど長期間生存した。*tetA* 遺伝子は、55°C 及び 37°C で 100 日間の培養により有意に減少したが、検出限界は下回らなかった。EPA が提言する条件（55°C 以上かつ 3 日間以上）を満たす好氣的堆肥化により病原微生物や薬剤耐性菌の全てを完全に死滅させることは困難であるが、菌量を減少させうることを示唆された。一方、*tetA* 遺伝子は EPA が

提言する条件を満たす好氣的堆肥化により減少するものの完全に除去することは困難であることが示唆された。以上のことから、堆肥化の際には堆肥温度を均一に上昇させる必要があり、堆肥材料の均質化及び適切な切り返しの実施、堆肥化期間の延長、堆肥材料の加熱等の工夫が必要であると考えられた。

## 2. 小型堆肥化実験装置を用いた好氣的堆肥化が TC 耐性 *E. coli* 及び TC 耐性遺伝子の消長に与える影響

*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) は、小型堆肥化実験装置投入群の堆肥温度が試験 6 日目に 55°C に到達してから 1 日以内に検出限界 (50 CFU/g) 以下まで減少した。このことから、好氣的堆肥化により TC 耐性 *E. coli* の多くが減少することが示唆された。*tetA* 遺伝子コピー数は、小型堆肥化実験装置投入群の堆肥温度が試験 4 日目に 40.4°C まで上昇したことに伴い 5 日目に有意に減少したが、検出限界以下までは減少しなかった。また、試験 6 日目に堆肥温度は 62.8°C に達したが、5 日目から 20 日目までは有意な変化はみられなかった。このことから、好氣的堆肥化により *tetA* 遺伝子は減少するものの完全に除去することは困難であることが示唆された。16S rRNA 遺伝子コピー数は、試験 5、15、17 日目に有意な減少が認められたが、20 日目には有意な変化は認められなかった。このことから、*E. coli* (TC7-1/DH5 $\alpha$ ) 及び *tetA* 遺伝子コピー数が特異的に減少したことが示唆された。

## 3. 日本の野外家畜糞便由来完熟堆肥中に存在するオキシテトラサイクリン (OTC) 耐性菌数、TC 耐性遺伝子量及び残留 TC 系抗菌薬濃度に関する調査

OTC 耐性菌 (TCr) は野外家畜糞便由来完熟堆肥 6 サンプル (54.5%) から検出された。このことから、野外における完熟堆肥の半数以上に TC 耐性菌が残存していることが示唆された。*tetA* 遺伝子は野外家畜糞便由来完熟堆肥 11 サンプル (100%) から検出された。好氣的堆肥化では *tetA* 遺伝子を完全に除去することは困難であり、野外における完熟堆肥の多くに *tetA* 遺伝子が残存していることが示唆された。TC 系抗菌薬は野外家畜糞便由来完熟堆肥 33 サンプル (100%) から検出され、豚由来サンプルの残留 TC 系抗菌薬濃度は牛由来サンプルよりも有意に高値を示した。このことから、抗菌薬使用量と堆肥中の残留抗菌薬濃度には相関があることが示唆された。また、野外家畜糞便由来完熟堆肥中の *tetA* 遺伝子コピー数及び残留 TC 系抗菌薬濃度間には、有意な正の相関が認められた。したがって、家畜糞便由来堆肥中における残留抗菌薬濃度が高いほど薬剤耐性遺伝子が維持されやすいことが示唆された。

#### 4. 豚飼料中への飼料添加物としての CST 添加中止が豚糞便由来 *E. coli* のプラスミド性 CST 耐性遺伝子保有率及び CST 耐性率に与える影響

1 回目の採材時に抗菌性飼料添加物の CST が飼料中に添加されていた分娩豚舎及び離乳豚舎 (6~70 日齢) において、*mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が分離され、繁殖豚舎及び肥育豚舎からは分離されなかった。このことから、今回分離された *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* は、飼料中に添加された CST の選択圧により豚腸管内で選択されたことが示唆された。分娩豚舎及び離乳豚舎から分離された *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* の分離率及び CST 耐性率は、採材 1 回目から採材 2 回目及び 3 回目にそれぞれ減少した。このことから、飼料中の CST 添加中止により CST の選択圧が無くなることで、豚糞便中の *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が減少することが示唆された。採材 2 回目と 3

回目では、*mcr* 遺伝子保有 *E. coli* 分離率及び CST 耐性率は減少しなかった。このことから、CST の選択圧が無い状態においても *mcr* 遺伝子または *mcr* 遺伝子保有 *E. coli* が豚糞便中に一定量維持されていることが示唆された。

以上の研究から、好氣的堆肥化による堆肥温度の上昇が家畜糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与える影響及び養豚農場における飼料中への抗菌薬添加中止が糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の消長に与える影響を解析することで、家畜糞便中の薬剤耐性菌/耐性遺伝子の低減に必要な条件の一部が解明された。得られた研究成果は、家畜由来薬剤耐性菌/耐性遺伝子が堆肥を介して環境中に拡散することを防ぐための重要な知見になり得るものと期待される。

## 謝辞

本研究の遂行及び本稿作成に当たり、終始懇切なる御指導、御助言と御校閲を賜りました本学食品衛生学ユニット准教授 白井 優 先生に深謝の意を表します。また、本稿作成に当たり、貴重な御指導、御助言と御校閲を賜りました本学獣医衛生学ユニット教授 樋口 豪紀 先生、本学獣医学ユニット教授 蒔田 浩平 先生、本学諸先生方に深謝の意を表します。また、本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行にあたって貴重な御指導、御助言を賜りました本学食品衛生学ユニット名誉教授 田村 豊 先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、多大なる御指導、御助言を賜りました本学食品衛生学ユニット講師 福田 昭 先生、野外堆肥中の残留抗菌薬濃度の計測を実施していただいた東京農工大学農学部水環境保全学/有機地球科学研究室教授 高田 秀重 先生、小型堆肥化実験装置に関する御指導、御助言を賜りました本学農食環境学群環境微生物学研究室准教授 岡本 英竜 先生、堆肥サンプルを恵与していただいた岐阜大学大学院連合獣医学研究科動物感染症制御学教授 浅井 鉄夫 先生、本学獣医衛生学ユニット教授 樋口 豪紀 先生、藤原動物病院 藤原 孝彦 先生、おかむらアニマルクリニック 岡村 雄司 先生、豚糞便を恵与していただいた本学農食環境学群中小家畜飼養学研究室教授 山田 未知 先生、貴重な御助言を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術研究機構動物衛生研究部門 楠本 正博 先生、貴重な御助言を賜るとともにサンプル採材にご協力いただいた愛媛県南予家畜保健衛生所（現所属：株式会社食環境衛生研究所） 大本 敦子 先生、貴重な御助言を賜るとともにコリスチン耐性遺伝子の検出及び薬剤感受性試験を実施していただいた愛媛県家畜病性鑑定所（現所属：愛媛県中予

家畜保健衛生所) 小菊 夕奈 先生、愛媛県南予家畜保健衛生所の皆様、愛媛県家畜病性鑑定所の皆様、本学食品衛生学ユニットの皆様、サンプル採材に御協力いただいた養豚農家の皆様に心から感謝の意を表します。

最後に、本稿作成に当たり、温かく見守ってくれた最愛の妻 吉澤 愛加に心から感謝いたします。

## 引用文献

1. Aarestrup, F. M. 2015. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**: 20140085.
2. Alexander, T. W., Yanke, J. L., Reuter, T., Topp, E., Read, R. R., Selinger, B. L. and Mcallister, T. A. 2011. Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different subtherapeutic antibiotics. *BMC Microbiol.* **11**: 19.
3. Andersson, D. I. and Hughes, D. 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 260–271.
4. Andersson, D. I. and Levin, B. R. 1999. The biological cost of antibiotic resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 489–493.
5. Chai, R., Huang, L., Li, L., Gielen, G., Wang, H. and Zhang, Y. 2016. Degradation of tetracyclines in pig manure by composting with rice straw. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **13**: 254.
6. Chee-Sanford, J. C., Mackie, R. I., Koike, S., Krapac, I. G., Lin, Y.-F., Yannarell, A. C., Maxwell, S. and Aminov, R. I. 2009. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J. Environ. Qual.* **38**: 1086–1108.
7. Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T. and Morrison, M. 2007.

- Development and application of real-time PCR assays for quantification of erm genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4407.
8. Diehl, D. L. and Lapara, T. M. 2010. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. *Environ. Sci. Technol.* **44**: 9128–9133.
  9. Dolliver, H., Gupta, S. and Noll, S. 2008. Antibiotic degradation during manure composting. *J. Environ. Qual.* **37**: 1245–1253.
  10. Droffner, M. L. and Yamamoto, N. 1992. Demonstration of cel operon expression of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Pseudomonas aeruginosa* at elevated temperatures refractory to their growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1784.
  11. Finley, R. L., Collignon, P., Larsson, D. G. J., McEwen, S. A., Li, X. Z., Gaze, W. H., Reid-Smith, R., Timinouni, M., Graham, D. W. and Topp, E. 2013. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin. Infect. Dis.* **57**: 704–710.
  12. Fukuda, A., Sato, T., Shinagawa, M., Takahashi, S., Asai, T., Yokota, S., Usui, M. and Tamura, Y. 2018. High prevalence of *mcr-1*, *mcr-3* and *mcr-5* in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **51**: 163–164.
  13. Fukuda, A., Usui, M., Okubo, T. and Tamura, Y. 2016. Horizontal transfer of plasmid-mediated cephalosporin resistance genes in the intestine of houseflies (*Musca domestica*). *Microb. Drug. Resist.*

- 22: 336–341.
14. Hanajima, D., Aoyagi, T. and Hori, T. 2019. Dead bacterial biomass-assimilating bacterial populations in compost revealed by high-sensitivity stable isotope probing. *Environ. Int.* **133**: 105235.
  15. Heuer, H., Schmitt, H. and Smalla, K. 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 236–243.
  16. Jiang, Y., Xie, S. H., Dennehy, C., Lawlor, P. G., Hu, Z. H., Wu, G. X., Zhan, X. M. and Gardiner, G. E. 2020. Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: A review. *Renew. Sustain. Energy. Rev.* **120**: 109654.
  17. Kang, Y., Gu, X., Hao, Y. and Hu, J. 2016. Autoclave treatment of pig manure does not reduce the risk of transmission and transfer of tetracycline resistance genes in soil: successive determinations with soil column experiments. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **23**: 4551–4560.
  18. Kaszab, E., Szoboszlay, S., Dobolyi, C., Háhn, J., Pék, N. and Kriszt, B. 2011. Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. *Bioresour. Technol.* **102**: 1543–1548.
  19. Katada, S., Fukuda, A., Nakajima, C., Suzuki, Y., Azuma, T., Takei, A., Takada, H., Okamoto, E., Kato, T., Tamura, Y. and Usui, M. 2021. Aerobic composting and anaerobic digestion decrease the copy numbers of antibiotic-resistant genes and the levels of lactose-degrading Enterobacteriaceae in dairy farms in Hokkaido,

- Japan. *Front Microbiol.* **12**: 737420.
20. Kawanishi, M., Abo, H., Ozawa, M., Uchiyama, M., Shirakawa, T., Suzuki, S., Shima, A., Yamashita, A., Sekizuka, T., Kato, K., Kuroda, M., Koike, R. and Kijima, M. 2017. Prevalence of colistin resistance gene *mcr-1* and absence of *mcr-2* in *Escherichia coli* isolated from healthy food-producing animals in Japan. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **61**: e02057–16.
  21. Koo, H. J. and Woo, G. J. 2011. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *Int. J. Food. Microbiol.* **145**: 407–413.
  22. Kusumoto, M., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T. and Akiba, M. 2016. Colistin-resistant *mcr-1*-positive pathogenic *Escherichia coli* in swine, Japan, 2007–2014. *Emerg. Infect. Dis.* **22**: 1315.
  23. Kyselková, M., Jirout, J., Vrchotová, N., Schmitt, H. and Elhottová, D. 2015. Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. *Front. Microbiol.* **6**: 536.
  24. Liu, X., Liu, L., Wang, Y., Wang, X., Ma, Y. and Li, Y. 2014. The study on the factors affecting transformation efficiency of *E. coli* competent cells. *Pak. J. Pharm. Sci.* **27**: 679–684.
  25. Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H. and Shen, J. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a

- microbiological and molecular biological study. *Lancet. Infect. Dis.* **16**: 161–168.
26. Martínez, J. L. and Baquero, F. 2014. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. *Ups. J. Med. Sci.* **119**: 68–77.
27. Ng, L. K., Martin, I., Alfa, M. and Mulvey, M. 2001. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol. Cell. Probes.* **15**: 209–215.
28. Nicholson, F. A., Groves, S. J. and Chambers, B. J. 2005. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. *Bioresour. Technol.* **96**: 135–143.
29. Paterson, D. L. and Harris, P. N. A. 2016. Colistin resistance: a major breach in our last line of defence. *Lancet. Infect. Dis.* **16**: 132–133.
30. Rahube, T. O. and Yost, C. K. 2012. Characterization of a mobile and multiple resistance plasmid isolated from swine manure and its detection in soil after manure application. *J. Appl. Microbiol.* **112**: 1123–1133.
31. Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., de Frutos, C., Escobar, Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A. and Hendriksen, R. S. 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for

- surveillance purposes. *Euro. Surveill.* **23**: 17–00672.
32. Romanowski, G., Lorenz, M. G., Sayler, G. and Wackernagel, W. 1992. Persistence of Free Plasmid DNA in Soil Monitored by Various Methods, Including a Transformation Assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3012–3019.
  33. Sarmah, A. K., Meyer, M. T. and Boxall, A. B. A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere.* **65**: 725–759.
  34. Schueler, J., Naas, K., Hurst, J., Aga, D. and Lansing, S. 2021. Effects of on-farm dairy manure composting on tetracycline content and nutrient composition. *Antibiotics (Basel).* **10**: 443
  35. Schwaiger, K., Hölzel, C. and Bauer, J. 2010. Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet. Microbiol.* **142**: 329–336.
  36. Selvam, A., Zhao, Z. and Wong, J. W. C. 2012. Composting of swine manure spiked with sulfadiazine, chlortetracycline and ciprofloxacin. *Bioresour. Technol.* **126**: 412–417.
  37. Smalla, K., Heuer, H., Gotz, A., Niemeyer, D., Krogerrecklenfort, E. and Tietze, E. 2000. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4854.
  38. Strauch, D. 1991. Survival of pathogenic micro-organisms and parasites in excreta, manure and sewage sludge. *Rev. Sci. Tech.* **10**:

- 813–846.
39. Thaker, M., Spanogiannopoulos, P. and Wright, G. D. 2009. The tetracycline resistome. *Cell. Mol. Life. Sci.* **67**: 419–431.
  40. Udikovic-Kolic, N., Wichmann, F., Broderick, N. A. and Handelsman, J. 2014. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 15202–15207.
  41. United States Environmental Protection Agency (EPA). 1994. Composting Yard Trimmings and Municipal Solid Waste. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPURL.cgi?Dockey=1000S77.txt>
  42. Usui, M., Kawakura, M., Yoshizawa, N., San, L. L., Nakajima, C., Suzuki, Y. and Tamura, Y. 2017. Survival and prevalence of *Clostridium difficile* in manure compost derived from pigs. *Anaerobe.* **43**: 15–20.
  43. Usui, M., Nanbu, Y., Oka, K., Takahashi, M., Inamatsu, T., Asai, T., Kamiya, S. and Tamura, Y. 2014. Genetic relatedness between Japanese and European isolates of *Clostridium difficile* originating from piglets and their risk associated with human health. *Front. Microbiol.* **5**: 513.
  44. Usui, M., Nozawa, Y., Fukuda, A., Sato, T., Yamada, M., Makita, K. and Tamura, Y. 2021. Decreased colistin resistance and *mcr-1* prevalence in pig-derived *Escherichia coli* in Japan after banning colistin as a feed additive. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **24**: 383–386.
  45. Usui, M., Shirakawa, T., Fukuda, A. and Tamura, Y. 2015. The role of flies in disseminating plasmids with antimicrobial-resistance

- genes between farms. *Microb. Drug. Resist.* **21**: 562–569.
46. Wang, H., Li, H., Gilbert, J. A., Li, H., Wu, L., Liu, M., Wang, L., Zhou, Q., Yuan, J. and Zhang, Z. 2015. Housefly larva vermicomposting efficiently attenuates antibiotic resistance genes in swine manure, with concomitant bacterial population changes. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 7668–7679.
47. Wang, J., Ben, W., Zhang, Y., Yang, M. and Qiang, Z. 2015. Effects of thermophilic composting on oxytetracycline, sulfamethazine, and their corresponding resistance genes in swine manure. *Environ. Sci. Process. Impacts.* **17**: 1654–1660.
48. Wang, L., Oda, Y., Grewal, S., Morrison, M., Michel, F. C. and Yu, Z. 2012. Persistence of resistance to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon treatments. *Microb. Ecol.* **63**: 32–40.
49. Wang, R. F., Cao, W. W. and Cerniglia, C. E. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1242–1247.
50. Wei, T., Miyanaga, K. and Tanji, Y. 2014. Persistence of antibiotic-resistant and -sensitive *Proteus mirabilis* strains in the digestive tract of the housefly (*Musca domestica*) and green bottle flies (*Calliphoridae*). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 8357–8366.
51. Woolhouse, M. E. J. and Ward, M. J. 2013. Microbiology. Sources of antimicrobial resistance. *Science.* **341**: 1460–1461.
52. Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B. and Farrar, J. 2015. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider

- environment. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**: 20140083.
53. Xie, W. Y., Shen, Q. and Zhao, F. J. 2018. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *Eur. J. Soil. Sci.* **69**: 181–195.
54. Yang, Q., Zhang, H., Guo, Y. and Tian, T. 2016. Influence of chicken manure fertilization on antibiotic-resistant bacteria in soil and the endophytic bacteria of pakchoi. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* **13**: 662.
55. Youngquist, C. P., Mitchell, S. M. and Cogger, C. G. 2016. Fate of antibiotics and antibiotic resistance during digestion and composting: A Review. *J. Environ. Qual.* **45**: 537–545.
56. Zhang, Y. J., Hu, H. W., Chen, Q. L., Singh, B. K., Yan, H., Chen, D. and He, J. Z. 2019. Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable microbiomes. *Environ. Int.* **130**: 104912.
57. 家畜改良センター 堆肥化処理の理論と実践.  
<http://www.nlbc.go.jp/gijutumanyuaru/manual1/manual1.pdf> [accessed on December 1, 2022]
58. 富士平工業株式会社 小型堆肥化実験装置かぐやひめ  
<http://www.fujihira.co.jp/seihin/chk/pdfcatalog/kaguyahime.pdf>  
[accessed on December 1, 2022]
59. 小澤真名緒 2016. 豚由来細菌における薬剤耐性菌の疫学. *豚病会報.* **68**: 19–23.
60. 山口明人, 澤井哲夫 1992. 抗生物質の細菌細胞膜透過機構. *ファルマシア.*

28: 867-871.

61. 羽賀清典 有機廃棄物のリサイクル及びバイオマス利用.  
[https://www.engineer.or.jp/c\\_cmt/cpd/topics/008/attached/attach\\_8458\\_1.pdf](https://www.engineer.or.jp/c_cmt/cpd/topics/008/attached/attach_8458_1.pdf) [accessed on December 1, 2022]
62. 農林水産省動物医薬品検査所  
動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報（別冊）各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量（2014）.  
<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/h26hanbaidaka20180205.pdf> [accessed on December 1, 2022]
63. 農林水産省動物医薬品検査所  
動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報（別冊）各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量（2015）.  
<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/h27hanbaidaka20180205.pdf> [accessed on December 1, 2022]
64. 農林水産省動物医薬品検査所  
動物用医薬品、医薬部外品及び医療機器販売高年報（別冊）各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量（2018）.  
<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/H30hanbaidaka202211.pdf> [accessed on December 1, 2022]
65. 阿部英則，井内浩幸，大原益博，小松輝行 1991.  
冬期における豚糞の断続添加による堆肥化の促進. *北海道立農誌集報*. **63**: 23-30.
66. 食品安全委員会  
家畜に使用する硫酸コリスチンに係る薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価.  
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=ky>

a03120816918&fileId=201 [accessed on December 1, 2022]

67. 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2020.

<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/000881539.pdf>

[accessed on December 1, 2022]