

## 調査資料

## 2 飼料原料及び配合飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（令和元年度）

浅尾 美由起<sup>\*1</sup>, 奥山 紀子<sup>\*2</sup>, 山上 陽平<sup>\*2</sup>

## Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Feed Ingredients and Formula Feed (in the Fiscal Year 2019)

Miyuki ASAO<sup>\*1</sup>, Noriko OKUYAMA<sup>\*2</sup> and Yohei YAMAGAMI<sup>\*2</sup>(\*<sup>1</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC)  
(Now Planning and Coordination Department, FAMIC),\*<sup>2</sup> Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC)

We have made an antimicrobial susceptibility test on enterococci isolated from soybean meal, fish meal, poultry by-product meal and formula feed for poultry.

In order to isolate the enterococci from samples, their selective enrichment culture in AC broth, selective culture on Enterococcosel agar and two-time pure isolations on Brain Heart Infusion agar were conducted in due order. Then isolated gram-positive cocci were detected by the cultivation in Heart Infusion broth with 6.5 % NaCl. Having confirmed the biochemical characteristics of the mobility and pigment production, enterococci was identified with Rapid ID 32 STREP API. The minimum inhibitory concentration (MIC) was subsequently measured by using the broth microdilution method according to the guideline of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Enterococci isolated from feed ingredients and formula feed were 11 *Enterococcus faecalis*, 6 *E. faecium* and 12 other species. The antimicrobial resistance rates were 0.0 % to 9.1 % for *E. faecalis*, 0.0 % to 50.0 % for *E. faecium* and 0.0 % to 8.3 % for other species.

The concentration of viable bacteria in soybean meal, fish meal, poultry by-product meal and formula feed for poultry was  $5.8 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^5$  CFU/g,  $3.2 \times 10^2 \sim 4.4 \times 10^5$  CFU/g,  $0 \sim 2.1 \times 10^5$  CFU/g and  $2.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$  CFU/g respectively.

Key words: antimicrobial resistance; soybean meal; fish meal; poultry by-product meal; formula feed for poultry; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; minimum inhibitory concentration (MIC); colony forming units (CFU)

キーワード：薬剤耐性；大豆油かす；魚粉；チキンミール；鶏用配合飼料；*Enterococcus faecalis*；*Enterococcus faecium*；最小発育阻止濃度（MIC）；生菌数（CFU）

## 1 緒 言

薬剤耐性菌に対する国際行動計画が2015年にWHOで採択され、日本では「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン 2016-2020」<sup>1)</sup>が策定された。畜産分野では「慎重使用の推進等の強化、薬剤耐性の動向調査・監視を強化、養殖水産動物用医薬品の使用に専門家が関与する仕組みを導入、ア

\*<sup>1</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部，現 企画調整部

\*<sup>2</sup> 独立行政法人農林水産消費安全技術センター肥飼料安全検査部

ジア地域における国際協力の強化」などに取り組んでいる。独立行政法人農林水産消費安全技術センターは、平成11年度から実施されているJVARM（動物由来薬剤耐性菌モニタリング）の中で農場（平成11年度から平成27年度）や、と畜場（平成24年度から）で採材した直腸便又は盲腸便から分離される腸球菌を担当しているが、飼料等から分離される腸球菌は対象外である。また、飼料中の腸球菌の薬剤耐性の動向に関する知見や研究事例が少ないことから、平成30年度<sup>2)</sup>より飼料原料から分離される腸球菌の薬剤感受性の調査を実施している。

本年度は、昨年度に引き続き大豆油かす、魚粉及びチキンミールを調査対象とし、新たに鶏用配合飼料を加えた4種類の試料から分離した腸球菌の薬剤感受性を調査したので報告する。また、飼料の微生物による汚染状況を調べるために生菌数の測定も行ったので合わせて報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試料

平成31年4月から令和元年12月までの9ヶ月の間に、大豆油かす、魚粉、チキンミール及び鶏用配合飼料を飼料等検査実施要領の微生物試験用の飼料の採取方法<sup>3)</sup>で採取した。採取場所は大豆油かすについては配合飼料工場、その他については各製造事業場であった。試料受け入れ後から試験開始までは、冷蔵庫中4℃で保存し、腸球菌の分離は採材後5週間以内に行った。

また、上記の試料から各種類15点を任意に抽出し、採材後3週間以内に生菌数の測定を行った。

### 2.2 試薬

1) 水はRFD240RA（東洋製作所製）により蒸留した蒸留水（JIS K 0211の5213に定義された蒸留水）を用いた。なお、調製に用いた試薬は、等級があるものは特級を用いた。

2) 生理食塩液

塩化ナトリウム溶液（0.9 w/v%）を121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。

3) 1.6 w/v%プロモクレゾールパープルエタノール溶液

プロモクレゾールパープル 0.8 gを無水エタノール 47.5 mLに溶かし、蒸留水 2.5 mLを加えて調製した。

4) AC培地

ACブイオン基礎培地（日水製薬製）50.5 g及びアジ化ナトリウム（和光純薬工業製）0.25 gを蒸留水 1000 mLに溶かし、500 mL培養瓶に250 mL分注して、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。

5) エンテロコッコセル寒天培地（以下「ECS培地」という。）

ECS培地（Becton, Dickinson and Company製）56 g又は（極東製薬工業製）58 gを蒸留水 1000 mLに溶かし、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。これを60℃まで冷却した後、プラスチック製滅菌シャーレに一様に広がるように15 mL分注し、水平に静置して凝固させた後、倒置してふたをわずかにずらし、37℃で1時間静置して培地表面を乾燥させた。

6) ブレインハートインフュージョン寒天培地（以下「BHI寒天培地」という。）

BHI Agar（Becton, Dickinson and Company製）52 gを蒸留水 1000 mLに溶かし、121℃で15分間高圧蒸気滅菌した。以下、5)によった。

## 7) グラム染色液

フェイバーG「ニッスイ」(日水製薬製)の染色液 A (ビクトリアブルー), 脱色液 (ピクリン酸・エタノール液) 及び染色液 B (サフラニン)

## 8) 6.5 w/v%塩化ナトリウム加ハートインフュージョン培地 (以下「6.5 %NaCl 加 HI 培地」という.)

HI Broth (Difco 製) 25 g, 塩化ナトリウム 60 g, ブドウ糖 1 g 及び 1.6 %プロモクレゾールパープルエタノール溶液 1 mL を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 3 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

## 9) ミュラーヒントン半流動培地 (以下「MH 半流動培地」という.)

Muller Hinton Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 21 g 及び Bacto-Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 2.5 g を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 3 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した後, 高層に凝固させた.

## 10) Rapid ID32 STREP API (ビオメリュー製)

## 11) サスペンションメディウム 2mL (ビオメリュー製)

## 12) ハートインフュージョン培地 (以下「HI 培地」という.)

HI Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 25 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 試験管に 2 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

## 13) 20 w/v% スキムミルク (以下「20 %スキムミルク」という.)

スキムミルク (Becton, Dickinson and Company 製) 20 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 試験管に 2 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

## 14) 薬剤感受性試験用フローズンプレート「栄研」(オーダープレート) (栄研化学製)

培地には  $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  を添加した Muller Hinton Broth を用いた. 供試薬剤と薬剤濃度域については Table 1 のとおり. 試薬受け入れ後から使用までは, -80 °C で保存した. なお, 今年度, JVARM において測定薬剤が見直されたことに伴い, 本調査でも昨年度の測定薬剤から一部変更を行った.

## 15) ハートインフュージョン寒天培地 (以下「HI 寒天培地」という.)

HI Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 40 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した. 以下, 5) によった.

## 16) ミュラーヒントンプロス (以下「MHB 培地」という.)

Mueller Hinton Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 21 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 試験管に 4 mL 程度分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

## 17) 0.1 %ペプトン加生理食塩水

Peptone (Becton, Dickinson and Company 製) 1 g 及び塩化ナトリウム 8.5 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.

## 18) 標準寒天培地

ペプトン (Becton, Dickinson and Company 製) 5 g, 酵母エキス (Becton, Dickinson and Company 製) 2.5 g, ブドウ糖 1 g 及び Bacto-Agar (Becton, Dickinson and Company 製) 15 g を蒸留水 1000 mL に溶かし, 水酸化ナトリウム 1 mol/L 又は塩酸 1 mol/L を用いて pH7.0~7.2 に調整した後, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した. 滅菌後は 50 °C で保温した.

Table 1 Kind, concentration range and break point of antimicrobial agents

Group	Antibiotics	Abbreviation	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Break Point (BP)
Aminoglycosides	Gentamicin	GM	0.12 – 256	32
Aminoglycosides	Kanamycin	KM	0.25 – 512	128
Aminoglycosides	Streptomycin	SM	0.25 – 512	—
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CPFX	0.12 – 128	4 <sup>a)</sup>
Glycopeptide	Vancomycin	VCM	0.12 – 128	32 <sup>a)</sup>
Lincomycins	Lincomycin	LCM	0.25 – 512	128
Macrolides	Azithromycin	AZM	0.25 – 64	—
Macrolides	Erythromycin	EM	0.12 – 128	8 <sup>a)</sup>
Macrolides	Tylosin	TS	0.12 – 256	64
Penicillins	Ampicillin	ABPC	0.12 – 128	16 <sup>a)</sup>
Phenicol	Chloramphenicol	CP	0.25 – 512	32 <sup>a)</sup>
Polyether	Salinomycin Sodium	SNM	0.12 – 32	—
Polypeptide	Zinc Bacitracin	BC	0.25 – 512	—
Quinolone	Nalidixic acid	NA	0.12 – 256	—
Tetracyclines	Tetracycline	TC	0.12 – 64	16 <sup>a)</sup>

a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing of CLSI

### 2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：庫内温度を 35~45 °C（管理精度： $\pm 1$  °C）に設定できるもの
- 2) プラスチック製滅菌シャーレ（以下「シャーレ」という。）：内径 90 mm，高さ 15 mm
- 3) 白金耳：ポリプロピレン製，ガンマ滅菌済み，1  $\mu\text{L}$  ディスポールプ
- 4) トランファーセット：STEM 製，ポリプロピレン製，ガンマ滅菌済み
- 5) ストマッカー：EXNIZER400 オルガノ製
- 6) その他：試験に用いた器具のうち，培地及び菌液に接触するものは，乾熱滅菌又は高圧蒸気滅菌済みのものを用いた。

### 2.4 分離及び同定方法

#### 1) 分離

##### i 選択増菌培養

分析試料 25 g を量って AC 培地に入れ，振り混ぜた後，37 °C で 24~48 時間培養した。

##### ii 選択分離培養

選択増菌培養液の 1 白金耳を ECS 培地に画線塗抹し，倒置して 37 °C で 24~48 時間培養した。

##### iii 純粋分離培養

ECS 培地表面の腸球菌と疑われる集落（周囲が黒褐色又は黒色帯で，中心が半透明のコロニー）を 2 個釣菌し，それぞれ生理食塩液 15  $\mu\text{L}$  程度に懸濁した。各懸濁液の 1 白金耳を BHI 寒天培地に画線塗抹し，倒置して 37 °C で 18~24 時間培養した。

培養後，BHI 寒天培地表面の集落を 1 個釣菌し，上記と同様に操作した。

## 2) 同定

## i 生化学的性状試験

以下のア～ウにより Table 2 の生化学的性状を確認した。

## ア 確認培養

BHI 寒天培地表面の集落を 1 個釣菌し，MH 半流動培地に穿刺した後，6.5 % NaCl 加 HI 培地に接種した。MH 半流動培地は 37 °C で 18~24 時間，6.5 % NaCl 加 HI 培地は 45 °C で 18~24 時間培養した。

## イ グラム染色

スライドガラスをエタノールに一晩以上浸漬し，バーナーで軽く焼き，冷ました。その上に，2 回目の純粋分離培養塗抹用の菌液 10  $\mu$ L を分注し，薄く広げた。乾燥後，火炎固定した塗抹面に染色液 A を十分添加し，1 分間静置した。染色液を水洗後，脱色液で染色液 A の青色が溶け出さなくなるまで脱色した。脱色液を水洗後，塗抹面に染色液 B を十分添加し，1 分間静置した。染色液を水洗後，ろ紙で水気をふき取り，光学顕微鏡で観察した。

## ウ 色素産生性

BHI 寒天培地上の集落を綿棒で掻き取り，色素産生の有無を確認した。

Table 2 Biochemical confirmation test of *Enterococcus*

Biochemical confirmation	Culture	Culture medium	Character of <i>Enterococcus</i>
High NaCl concentration	18~24 h at 45 $\pm$ 1 °C	HI <sup>a)</sup> broth with 6.5 w/v%NaCl	+
High temperature	18~24 h at 45 $\pm$ 1 °C	HI <sup>a)</sup> broth with 6.5 w/v%NaCl	+
Motility	18~24 h at 37 $\pm$ 1 °C	Mueller-Hinton semisorid agar	+ <sup>b)</sup> / -

Biochemical confirmation	Reagent	Character of <i>Enterococcus</i>
Gram stain	Faber G " Nissui "	Gram positive
Pigmentation	—	+ <sup>c)</sup> / -

## a) Heart Infusion

b) *E. gallinarum* and *E. casseliflavus*c) *E. casseliflavus*

上記の生化学的性状試験で腸球菌の性状を示した菌のうち，1 試料につき 1 株を Rapid ID32 STREP API で菌種を同定した。

## ii Rapid ID32 STREP API (以下「API」という。)

サスペンションメディウム 2 mL に McFarland 濁度 4 になるように菌を接種した。調製した菌液をプレートの各カップに 55  $\mu$ L ずつ分注し，ふたをして 37 °C で 4~4.5 時間培養した。キットの添付文書のとおり判定し，判定結果を APIWEB 同定ソフトウェアに入力し，菌種を同定した。

## iii 菌種の決定

まず，API の結果は同定確率が 80 %id 以上のものを採用することとした。このうち，API で判定された菌種と性状試験の結果が一致した株は，API の結果を同定結果としたが，同定

精度に対するコメントが「Identification to the genus」となった株は「*E. sp.*」とした。また、API で判定された菌種と性状試験の結果が一致しなかった株は「確定せず」とした。この他、腸球菌以外の菌種と同定された株やコメントが「unacceptable」や「doubtful」であった株は「分離なし」とした。菌種が決定した株は感受性試験菌株として、HI 培地と 20 %スキムミルクを等量ずつ混合した保存用培地に-80 °C で保存した。

#### iv 再分離・同定

上記で「*E. sp.*」又は「確定せず」となった株は、2 回目の純粋分離培養の BHI 培地から釣菌した菌を ECS 培地に塗抹し、再度、分離・同定試験を実施し、前述の菌種の決定方法で菌種を決定した。

なお、API を実施する前のグラム染色でコンタミネーションが確認された株は、この時点で再分離を実施したため、「*E. sp.*」又は「確定せず」となった場合でも再々分離は実施しなかった。

## 2.5 薬剤感受性試験（微量液体希釈法）

### 1) 精度管理株

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 を精度管理株として感受性試験菌株と同時に試験し、精度管理株の MIC（最小発育阻止濃度：Minimum Inhibitory Concentration）が Table 3 の精度管理限界値に入ることを確認した。

### 2) 菌液の調製

感受性試験菌株を HI 寒天培地に画線塗抹し、倒置して 37 °C で 18~24 時間培養した。HI 寒天培地表面の集落を 4~5 個釣菌し、MHB 培地に接種し、37 °C で 18~24 時間培養した。培養後の MHB 培地を生理食塩液で 10 倍希釈し、McFarland 濁度 0.5 に合わせ、その菌液をさらに生理食塩液で 10 倍希釈して、フローズンプレート接種用の菌液とした。

### 3) フローズンプレートへの接種及び培養

2) で調製した菌液の全量をトランスファーセットのトレイに入れ、96 ピンプレートを浸し、96 ピンプレートをフローズンプレートの容器に接種した。フローズンプレートに蓋をして、35 °C で 16~20 時間培養した。

### 4) 判定

リーディングミラーの上にフローズンプレートを置き、肉眼で懸濁又は沈殿が認められない場合及び沈殿物があっても 1 mm 未満で 1 個の場合は発育阻止とみなした。接種菌の発育が阻止された薬剤の最低濃度を MIC とした。

なお、分離同定から感受性試験までの概要を Scheme 1 に、菌種の決定方法を Scheme 2 に示した。

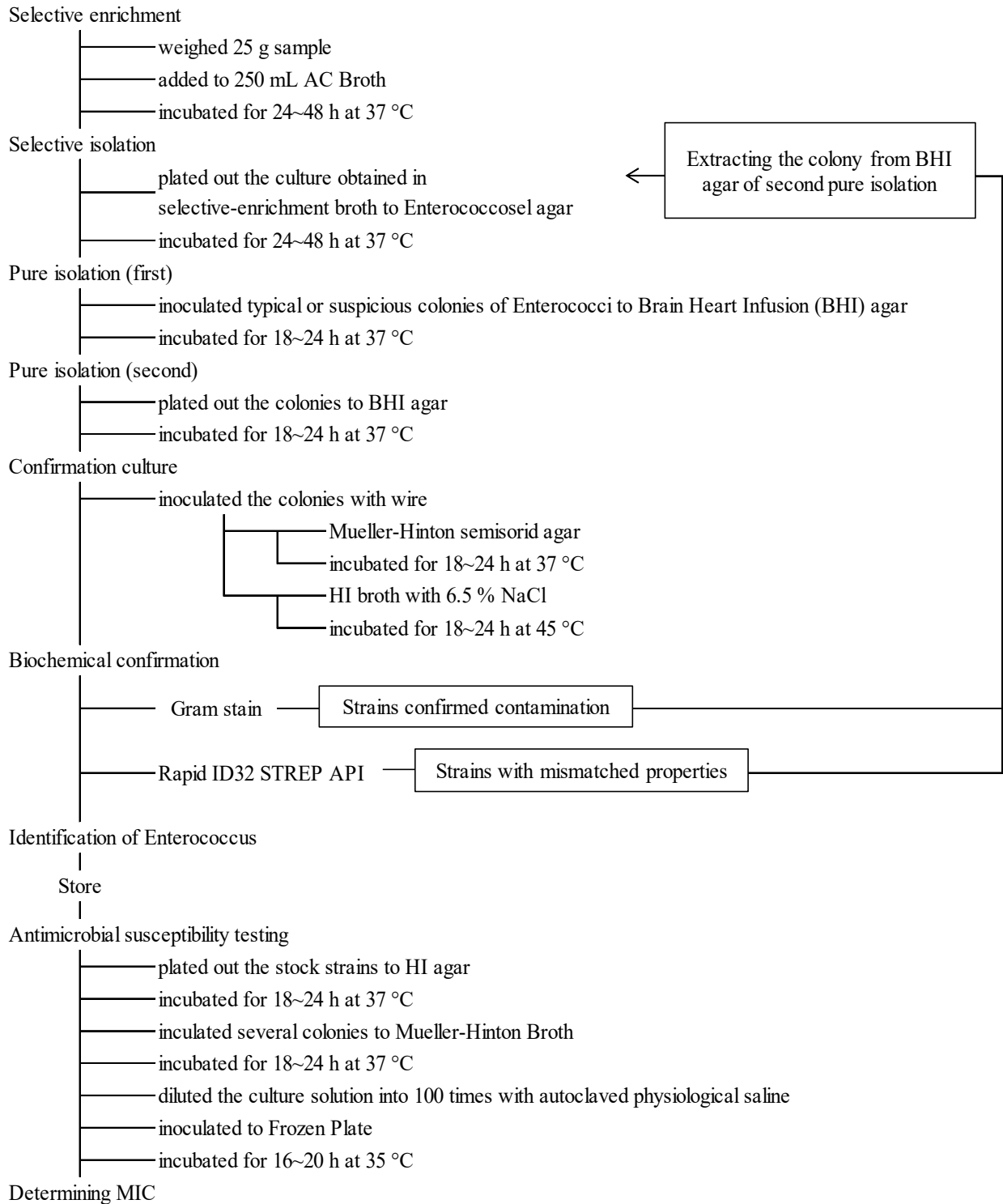
Table 3 Quality control limit of quality control strains ( $\mu\text{g/mL}$ )

Antimicrobial agent	Quality Control Strains			
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
GM <sup>a)</sup>	0.12 – 1	4 – 16	0.25 – 1	0.5 – 2
KM <sup>a)</sup>	1 – 4	16 – 64	1 – 4	*
SM	*	*	*	*
CPFX <sup>a)</sup>	0.12 – 0.5	0.25 – 2	<0.125 <sup>b)</sup>	0.25 – 1
VCM <sup>a)</sup>	0.5 – 2	1 – 4	*	*
LCM	0.25 – 2	8 – 32	$\geq 256$	$\geq 256$
AZM <sup>a)</sup>	0.5 – 2	*	*	*
EM <sup>a)</sup>	0.25 – 1	1 – 4	*	*
TS	0.5 – 4	0.5 – 4	> 32	> 32
ABPC <sup>a)</sup>	0.5 – 2	0.5 – 2	2 – 8	*
CP <sup>a)</sup>	2 – 16	4 – 16	2 – 8	*
SNM	0.5 – 2	0.25 – 2	*	*
BC	32 – 128	32 – 128	$\geq 256$	$\geq 256$
NA <sup>a)</sup>	*	*	1 – 4	*
TC <sup>a)</sup>	0.12 – 1	8 – 32	0.5 – 2	8 – 32

\* : No quality control limit

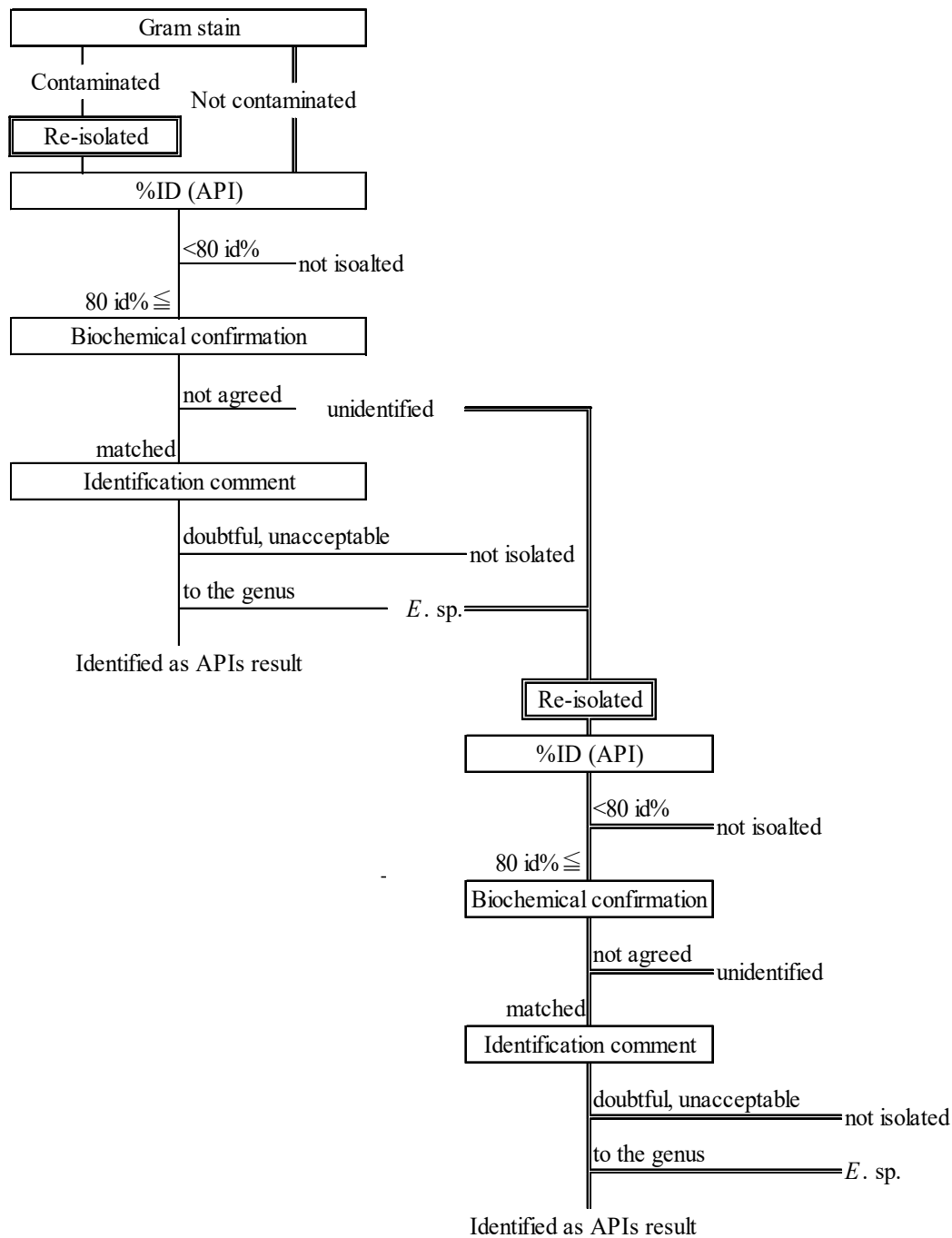
a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing (CLSI)

b) According to the CLSI regulations, it is 0.004  $\mu\text{g/mL}$  to 0.015  $\mu\text{g/mL}$ , but this time only 0.125  $\mu\text{g/mL}$  is measured, so "<0.125  $\mu\text{g/mL}$ " was set as the quality control limit value.



Scheme 1 Antimicrobial susceptibility testing of *Enterococcus* spp. isolated from feed ingredients and formula feed





Scheme 2 Flow of the identification

## 2.6 生菌数の測定方法

### 1) 試料の調製

分析試料 25 g を量って滅菌ストマッカー袋に入れ、0.1%ペプトン加生理食塩水 225 mL を加え、ストマッカーにより 200 rpm で 1 分間攪拌及び混合した試料液を生理食塩液で  $10^{-1}$  から  $10^{-5}$  まで希釈した。

### 2) 培養

同一希釈段階について 2 枚ずつシャーレを用意した。シャーレに試料液又は各希釈液 1 mL を分注し、標準寒天培地 15~20 mL を注いで、直ちに静かに混和し、固化するまで静置した。

固化後、ふたをずらして倒置し、35 °C の培養器の中で培地表面を乾燥させた。乾燥後、倒置して35 °C で22~26時間培養した。培養後、直ちに集落数を測定できない場合は、ラップフィルムに包んで冷蔵庫中4 °C に保存し、24時間以内に菌数を測定した。

### 3) 測定及び算出

培養後、シャーレ1枚当たり30~300個の集落が認められた希釈段階のシャーレの発育集落を計測し、2枚のシャーレの集落数の平均値に希釈倍数を乗じて試料1g当たりの生菌数を算出した。

## 3 結果及び考察

### 3.1 再分離

昨年度から菌種の同定にはRapid ID32 STREP APIを使用しているが、APIにより運動性がある菌種の*E. gallinarum*又は*E. casseliflavus*と判定される株(同定確率が80%以上)の中に、性状試験では運動性が陰性の株が多数あり、性状試験の結果とAPIの判定結果が不一致であった株は「分離なし」としていた。判定結果が不一致であった原因をコンタミネーションと考え、今年度は、判定結果が不一致であった株及びコメントが「Identification to the genus」となった株は再度、ECS培地に塗抹し、再分離、同定を行った。その結果はTable 4のとおりである。

再分離は33株実施(グラム染色でコンタミネーションが確認され再分離を実施した株を除く)した。再分離前に判定結果が不一致であった株は29株で、そのうちの27株がAPIの判定結果では*E. gallinarum*であった。また、再分離の結果、33株のうち4株は*E. faecium*、3株は*E. sp.*と同定された。残りの26株はAPIで運動性がある菌種の*E. gallinarum*又は*E. casseliflavus*と判定されたが、性状試験では運動性が陰性であったため、再分離を実施しても菌種を確定できなかった。

Table 4 API identification before / after isolation

#### Strains that changed the API identification after reisolation

	Before reisolation	After reisolation	species	No. of strains
Identified	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	4
	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. faecium</i> (to the genus)	<i>E. sp.</i>	1
Unidentified	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. casseliflavus</i>	-	2
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. gallinarum</i>	-	2
	<i>E. faecium</i> (to the genus)	<i>E. gallinarum</i>	-	2

#### Strains that not changed the API identification after reisolation

	Before/After reisolation	species	No. of strains
Identified	<i>E. faecium</i> (to the genus)	<i>E. sp.</i>	1
	<i>E. hirae</i> (to the genus)	<i>E. sp.</i>	1
Unidentified	<i>E. gallinarum</i>	-	20

### 3.2 腸球菌分離状況

平成31年4月から令和元年12月までに収集した試料の点数及び分離された腸球菌の株数はTable 5のとおりである。最も多く分離された菌種は*E. faecalis*で11株、次いで*E. faecium*と*E. hirae*が6株ずつであった。*E. faecalis*は主に動物質性原料から分離され、*E. faecium*及び*E. hirae*

は植物質性と動物質性の両方の原料から分離された。

Table 5 Number of *Enterococcus* spp. isolated from feeds

	No. of samples	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. sp.</i> <sup>a)</sup>	Unidentified <sup>b)</sup>
Soybean meal	30	0	1	0	2	1	0	14
Fish meal	43	5	3	1	1	0	2	12
Poultry by-product meal	26	4	0	0	2	1	1	1
Formula feed for poultry	27	2	2	0	1	0	0	14
Total	126	11	6	1	6	2	3	41

a) Judged "Identification to the genus" by Rapid ID32 STREP API

b) API result and biochemical confirmation did not agreed

### 3.3 薬剤感受性試験

試料 126 点から分離された腸球菌 29 株（1 試料から 1 株分離）の薬剤感受性試験の結果を、全菌種並びに耐性の性状が異なる *E. faecalis* 及び *E. faecium* の菌種別に Table 6 に示した。

MIC は細菌の発育が認められなかった濃度の最小値である。MIC<sub>50</sub>及び MIC<sub>90</sub>はそれぞれ50 % 及び90 %の菌株の発育を阻止した MIC であり、薬剤耐性菌の調査結果を大まかに把握できる。MIC<sub>90</sub>が低い場合には、大部分の株が感受性（一部耐性菌が出現している場合もある）で、MIC<sub>50</sub>が高い場合には、大部分が耐性化していると判断できる。また、MIC<sub>90</sub>と MIC<sub>50</sub>の幅が広い場合には、耐性株が増加、あるいは、耐性化傾向にあると考えられる<sup>4)</sup>。

供試薬剤のうちブレイクポイントが設定されている薬剤の耐性状況は、耐性率が最も高かったのは KM の 13.8 %（大豆油かす由来 1 株，魚粉由来 2 株，鶏用配合飼料由来 1 株），次いで TC の 3.4 %（魚粉由来 1 株）であり、その他の薬剤に対しては全ての株が感受性を示した。ただし、EM は MIC<sub>50</sub>と MIC<sub>90</sub>の間に 3 管の差があり、耐性化傾向にあると考えられた。

ブレイクポイントが設定されていないため耐性率が算出されない薬剤のうち、NA には全ての株の MIC が >256 µg/mL となったが、これは、NA がグラム陰性桿菌に有効な薬剤のためと考えられた。また、BC はグラム陽性菌に対して強い抗菌作用を有するが、MIC<sub>50</sub>が 256 µg/mL となった。

次に菌種別にみると、*E. faecalis* は TC に、*E. faecium* は KM に耐性があった。また、MIC の分布を比較すると、Fig. 1 及び Fig. 2 のとおり、AZM と EM で分布の違いが見られ、*E. faecium* の方が MIC<sub>50</sub>と MIC<sub>90</sub>の幅が広く、耐性化傾向にあることが分かった。その他の薬剤については、ほぼ同じような分布となった。

Table 6 Antimicrobial susceptibility of enterococci 29 isolates from each feed ingredient and formula feed

	<i>E. spp. (n = 29)</i>					
	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resistance Number	Resistance (%)	
GM	0.25 ~ 16	8	16	0	0.0	
KM	2 ~ 128	64	128	4	13.8	
SM	4 ~ 128	64	128			
CPFX	$\leq$ 0.12 ~ 2	1	2	0	0.0	
VCM	$\leq$ 0.12 ~ 8	1	2	0	0.0	
LCM	0.25 ~ 32	16	32	0	0.0	
AZM	0.25 ~ 8	2	8			
EM	$\leq$ 0.12 ~ 4	0.5	4	0	0.0	
TS	0.25 ~ 8	2	8	0	0.0	
ABPC	$\leq$ 0.12 ~ 2	1	2	0	0.0	
CP	2 ~ 8	8	8	0	0.0	
SNM	0.25 ~ 8	2	4			
BC	1 ~ > 512	256	> 512			
NA	> 256 ~ > 256	> 256	> 256			
TC	$\leq$ 0.12 ~ 64	0.5	0.5	1	3.4	

	<i>E. faecalis (n = 11)</i>						<i>E. faecium (n = 6)</i>					
	Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resistance Number	Resistance (%)		Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resistance Number	Resistance (%)	
GM	8 ~ 16	16	16	0	0.0		4 ~ 8	8	8	0	0.0	
KM	32 ~ 64	64	64	0	0.0		64 ~ 128	64	128	3	50.0	
SM	64 ~ 128	64	128				32 ~ 64	32	64			
CPFX	1 ~ 2	1	2	0	0.0		0.5 ~ 1	0.5	1	0	0.0	
VCM	1 ~ 2	1	2	0	0.0		0.5 ~ 1	0.5	1	0	0.0	
LCM	0.5 ~ 32	16	32	0	0.0		0.5 ~ 16	16	16	0	0.0	
AZM	2 ~ 8	4	8				0.25 ~ 4	0.5	4			
EM	0.5 ~ 2	2	2	0	0.0		$\leq$ 0.12 ~ 4	0.25	4	0	0.0	
TS	2 ~ 2	2	2	0	0.0		4 ~ 8	4	8	0	0.0	
ABPC	1 ~ 1	1	1	0	0.0		1 ~ 2	2	2	0	0.0	
CP	4 ~ 8	8	8	0	0.0		4 ~ 8	8	8	0	0.0	
SNM	1 ~ 2	2	2				2 ~ 8	2	8			
BC	128 ~ 512	256	512				128 ~ > 512	512	> 512			
NA	> 256 ~ > 256	> 256	> 256				> 256 ~ > 256	> 256	> 256			
TC	0.5 ~ 64	0.5	0.5	1	9.1		0.25 ~ 0.5	0.25	0.5	0	0.0	

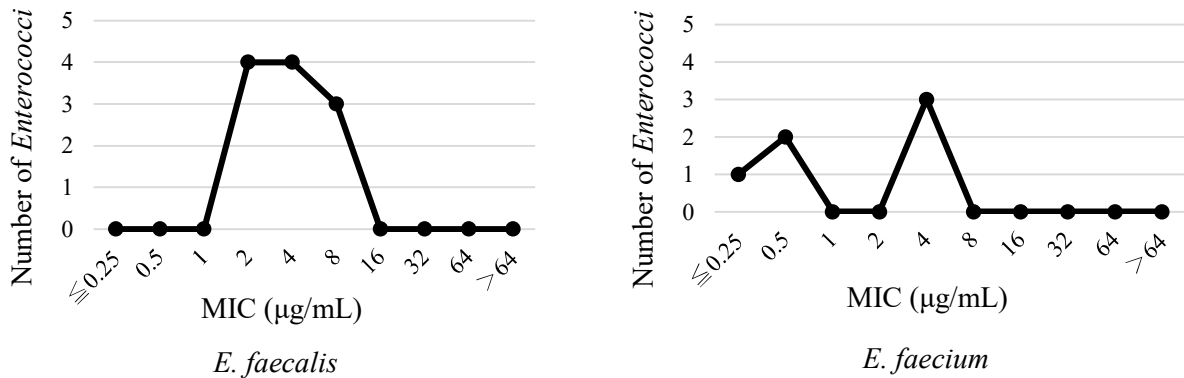


Fig. 1 MIC distribution of *E. faecalis* and *E. faecium* for AZM

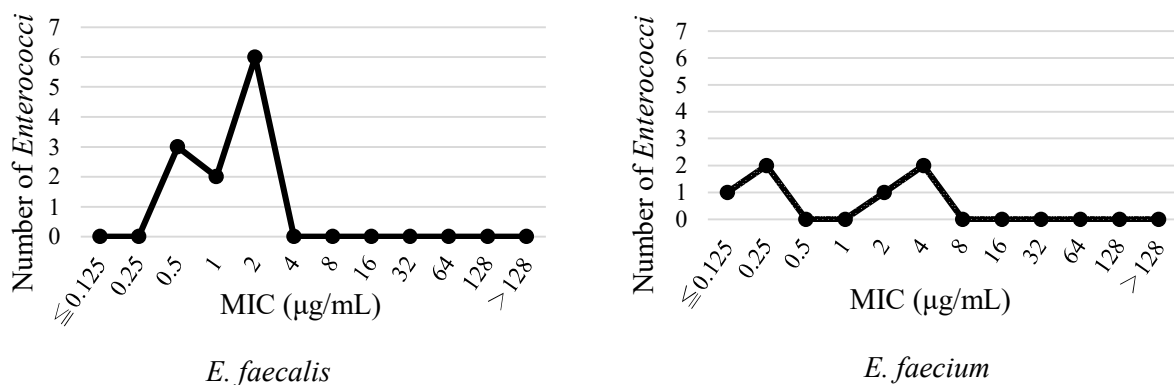


Fig. 2 MIC distribution of *E. faecalis* and *E. faecium* for EM

### 3.4 生菌数

昨年度の調査において129試料中41試料でECS培地に発育が見られなかったことから、微生物汚染自体がない可能性を考え、微生物による汚染状況を調べた。その結果はFig. 3のようになり、各試料の生菌数は、大豆油かすは $5.8 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^5$  CFU/g、魚粉は $3.2 \times 10^2 \sim 4.4 \times 10^5$  CFU/g、チキンミールは $0 \sim 2.1 \times 10^5$  CFU/g及び鶏用配合飼料は $2.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$  CFU/gで、チキンミール1点以外は微生物に汚染されていることが確認できた。また、汚染の程度は伊藤らの報告<sup>5) 6)</sup>と同様に配合飼料の方が原料よりも著しい傾向であった。

今年度、生菌数を測定した60試料のうち6試料がECS培地に発育が見られなかった。それらの生菌数は $0 \sim 1.3 \times 10^4$  CFU/gであり、ほとんどの試料は微生物に汚染されており、ECS培地に発育が見られなかったのは、腸球菌による汚染がなかったためと考えられた。

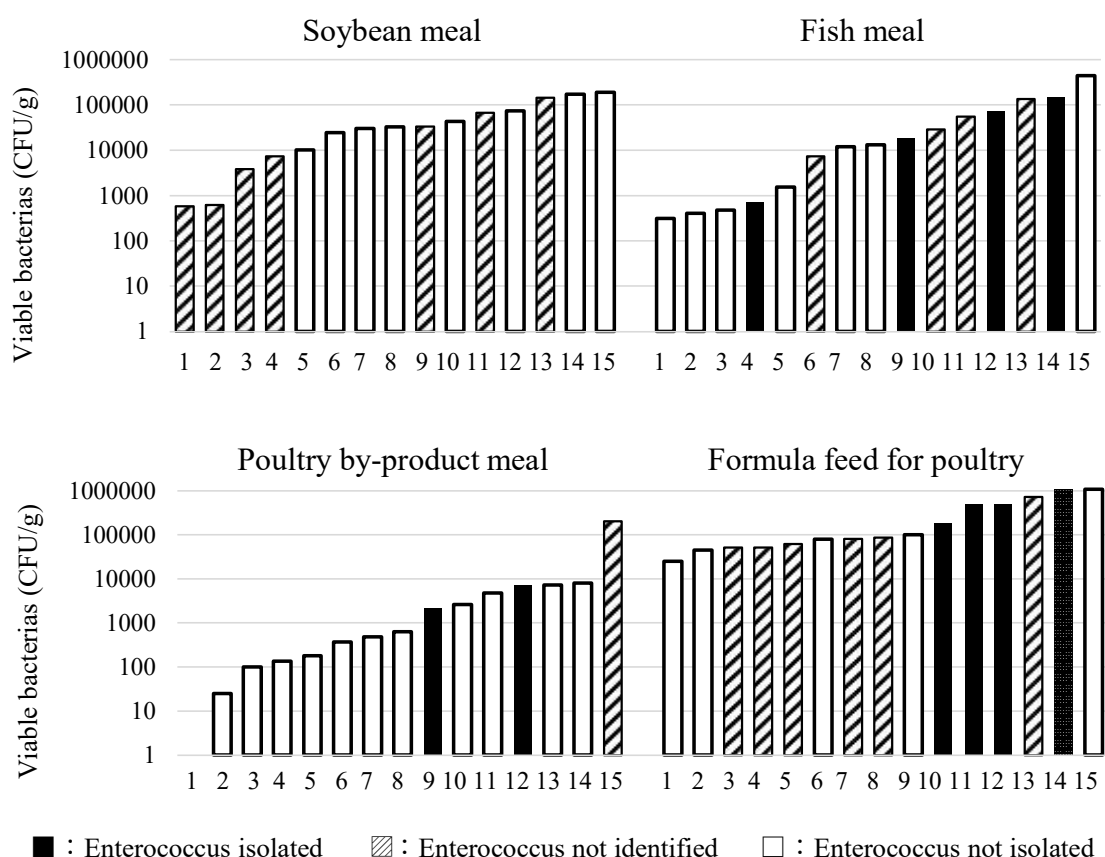


Fig. 3 Concentration of viable bacteria in feed samples

#### 4 まとめ

平成31年4月から令和元年12月までの9ヶ月の間に、採取した飼料（大豆油かす、魚粉、チキンミール及び鶏用配合飼料）から分離した腸球菌の同定と微量液体希釈法による薬剤感受性試験を行い、飼料における腸球菌の薬剤耐性の実態調査と、供試試料の生菌数測定を行った。

- 飼料（大豆油かす、魚粉、チキンミール及び鶏用配合飼料）126点から分離された腸球菌は、*E. faecalis* が11株、*E. faecium* が6株、その他の菌種（*E. sp.*を含む）が12株で、その他にAPIの判定結果と性状試験の結果が一致せず、菌種が確定できなかった株が41株あった。
- 菌種が同定された29株（*E. sp.*を含む）の薬剤感受性試験の結果のうち、ブレイクポイントが設定されている薬剤では、KMの耐性率が13.8%で最も高く、次いでTCが3.4%であった。その他の薬剤に対しては全て感受性を示し多剤耐性菌はなかった。ブレイクポイントが設定されていない薬剤では、NAとBCのMIC<sub>50</sub>の値が、それぞれ>256 µg/mLと256 µg/mLであった。
- E. faecalis* と *E. faecium* を菌種別に比較すると、AZMとEMに対して *E. faecium* の方が耐性化傾向にあった。
- 生菌数は、大豆油かすは  $5.8 \times 10^2 \sim 1.9 \times 10^5$  CFU/g、魚粉は  $3.2 \times 10^2 \sim 4.4 \times 10^5$  CFU/g、チキンミールは  $0 \sim 2.1 \times 10^5$  CFU/g 及び鶏用配合飼料は  $2.5 \times 10^4 \sim 1.1 \times 10^6$  CFU/g であり、配合飼料の方が原料よりも微生物による汚染が著しかった。

## 文 献

- 1) 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議：薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン 2016-2020, 平成 28 年 4 月 5 日 (2016).
- 2) 浅尾 美由起, 奥山 紀子：動物質性飼料原料等の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（平成 30 年度）, 飼料研究報告, **44**, 202-211(2019).
- 3) 農林水産省畜産局長通知：飼料等検査実施要領の制定について, 昭和 52 年 5 月 10 日, 52 畜 B 第 793 号 (1977).
- 4) 農林水産省 動物医薬品検査所 検査第二部抗生物質製剤検査室：薬剤耐性菌についての Q&A, 第二版 平成 22 年 1 月 7 日 (2010).
- 5) Hitoshi Ito, Tamikazu Kume, Masaaki Takehisa, Hiroshi Iizuka: Distribution of microorganisms in animal feeds and their disinfection by radiation, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **55**, 1081-1087 (1981).
- 6) Hitoshi Ito, Anwara Begum, Tamikazu Kume, Masaaki Takehisa: Distribution of microorganisms in fish meal of animal feed and their disinfection by radiation, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **57**, 9-16 (1983).