

調査資料

2 飼料中の腸球菌の薬剤耐性モニタリング調査（令和5年度）

新井 詠子*¹, 奥山 紀子*¹, 久保田 恵理*², 井上 華歩*¹, 橋本 仁康*¹

Monitoring Results of Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Animal Feed
(in the Fiscal Year 2023)

ARAI Eiko*¹, OKUYAMA Noriko*¹, KUBOTA Eri*², INOUE Kaho*¹ and HASHIMOTO Yoshiyasu*¹

(*¹Fertilizer and Feed Inspection Department, Food and Agricultural Materials Inspection Center (FAMIC),

*²Fertilizer and Feed Inspection Department, FAMIC (Now Yokohama Office, FAMIC))

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

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 physiological characteristics, enterococci were identified with PCR and Rapid ID 32 STREP API. The minimum inhibitory concentration (MIC) was subsequently measured using the broth micro-dilution method according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Enterococci isolated from feed ingredients and formula feed were 28 *Enterococcus faecalis*, 20 *E. faecium*, and 45 other species. The antimicrobial resistance rates were 0.0 % to 22.2 % for *E. faecalis*, 0.0 % to 84.6 % for *E. faecium*, and 0.0 % to 53.1 % for other species.

Key words: antimicrobial resistance; soybean meal; fish meal; poultry by-product meal; swine and poultry by-product meal; formula feed; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; minimum inhibitory concentration (MIC)

キーワード：薬剤耐性；大豆油かす；魚粉；チキンミール；原料混合肉骨粉；配合飼料；*Enterococcus faecalis*；*Enterococcus faecium*；最小発育阻止濃度（MIC）

1 緒 言

近年、薬剤耐性菌による感染症の増加が世界的に懸念されている¹⁾。2015年5月に開催された世界保健機関（WHO）の総会では、「薬剤耐性（Antimicrobial Resistance, AMR）に関するグローバル・アクション・プラン」が採択された²⁾。これを受けて2016年4月に日本政府は「薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン」を公表し、ヒト、動物、食品、環境に関する薬剤耐性問題について、2016年から2020年までを計画期間として分野横断的に取組（ワンヘルスアプローチ）を進めてきた³⁾。当該計画は新型コロナウイルス感染症まん延の影響による延長を経て2022年に期間を終え、新たなアクションプランへの取組が2023年からの5年間を期間として進められている⁴⁾。

腸球菌（*Enterococcus*）は、ヒトの医療現場では従来から病原性が低く日和見感染菌として考え

*¹ 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

*² 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，現横浜事務所

られてきた。しかし、1980年代以降に日本を含む各国で *E. faecalis* 及び *E. faecium* の多剤耐性菌が病院内感染症の主要な起因菌となった⁵⁾。国内の農場では1999年から実施されている動物由来薬剤耐性菌モニタリング（Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System, JVARM）の調査で、牛、豚及び鶏（以下「食用動物」という。）の腸内容物から薬剤耐性腸球菌が高い頻度で検出されている^{6)~9)}。食用動物に分布する薬剤耐性腸球菌は畜産物を介して食品媒介性感染症を引き起こす可能性があり、畜産物と食用動物との薬剤耐性の関連について調査が進められている¹⁰⁾。一方、飼料では海外における飼料中の薬剤耐性腸球菌の分布^{11)~14)}及び食用動物との薬剤耐性の関連¹⁴⁾についての報告はあるが、国内の状況に関する情報は充分でない。

本調査では、国内流通の飼料原料及び配合飼料から腸球菌を分離し、現在の薬剤耐性の実態を把握することを目的とした。2018年度から2020年度の調査^{15)~19)}において腸球菌の分離率が比較的高かったもの及び重要性の高い腸球菌の分離源となったものを中心に、飼料原料として大豆油かす、魚粉、チキンミール及び原料混合肉骨粉を、配合飼料として牛用、豚用及び鶏用を対象とし、腸球菌の分離を試みた。分離した菌株についてグラム染色、生化学的性状及び生物学的性状により菌種同定の上、薬剤感受性試験を行ったので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

試料は2023年4~12月に国内の飼料製造事業場において、飼料等検査実施要領²⁰⁾に規定された微生物試験用の試料の採取方法で採取した。試料は試験開始まで4℃で保存し、採取後5週間以内に試験に供した。なお、配合飼料においては、原材料に生菌剤が使用されていないものを採取した。

2.2 試薬

1) 試薬は等級があるものは特級を用いた。水はRFD230RA（東洋製作所製）により精製した蒸留水（JIS K 0211の5213に定義された蒸留水）又はDirect-QUV3（Millipore製）により精製した超純水（JIS K 0211の5218に定義された超純水）を用いた。

2) AC液体培地

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

3) エンテロココセル寒天培地（以下「ECS寒天培地」という。）

Enterococcosel Agar（Becton, Dickinson and Company製）56g又はEnterococcosel Agar（極東製薬工業製）58gを蒸留水1000mL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、シャーレに一樣に広がるように15~20mL分注し凝固させた。その後、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。

4) ブレインハートインフュージョン培地（以下「BHI寒天培地」という。）

Brain Heart Infusion Agar（Becton, Dickinson and Company製）52gを蒸留水1000mL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、シャーレに一樣に広がるように15~20mL分注し凝固させた。その後、37℃で17時間以上培養し、培地のコンタミネーションを確認した。培地表面に水滴があった場合は倒置してふたをわずかにずらし、

37 °C で 1 時間静置して培地表面を乾燥させた。

5) 生理食塩水

塩化ナトリウム濃度が 0.9 w/v% となるように蒸留水に加えて溶かし、121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

6) グラム染色液, 脱色液

前染色液はビクトリアブルー液, 脱色液はピクリン酸エタノール溶液, 後染色液はサフラニン液 (全て日水製薬製) を用いた。

7) 1.6 w/v% ブロモクレゾールパープルエタノール溶液

ブロモクレゾールパープル (和光純薬工業製) 0.8 g をエタノール 47.5 mL に溶かし, 蒸留水 2.5 mL に加えて調製した。

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

Heart Infusion Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 25 g, 塩化ナトリウム 60~65 g, ブドウ糖 1 g 及び指示薬として 1.6 w/v% ブ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 (内径 10 mm) に 3 mL 分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した。

9) Rapid ID32 STREP API (ビオメリュー製) (以下「API」という。)

10) InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories 製)

11) PCR プライマー

菌種判定に用いた PCR プライマーを Table 1 に示した。腸球菌属の検出には 16S ribosomal RNA 領域を増幅するプライマーセットを用いた²¹⁾。腸球菌種の検出には *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* 及び *E. hirae* に特異的な superoxide dismutase (*sodA*) 領域を増幅するプライマーセットを用いた²²⁾。各プライマーは北海道システム・サイエンスに委託し合成した。合成されたプライマーは超純水で 100 µmol/L に溶解した。

Table 1 Primers

Species and gene	Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Positive control	Reference
Genus detection						
16S rRNA gene	E1	F	TCA ACC GGG GAG GGT	733		21)
	E2	R	ATT ACT AGC GAT TCC GG			
Species identification						
Multiplex PCR						
<i>E. faecalis</i>	FL1	F	ACT TAT GTG ACT AAC TTA ACC	360	ATCC 29212	22)
	FL2	R	TAA TGG TGA ATC TTG GTT TGG			
<i>E. faecium</i>	FM1	F	GAA AAA ACA ATA GAA GAA TTA T	215	ATCC 6057	22)
	FM2	R	TGC TTT TTT GAA TTC TTC TTT A			
<i>E. durans</i>	DU1	F	CCT ACT GAT ATT AAG ACA GCG	295	ATCC 6056	22)
	DU2	R	TAA TCC TAA GAT AGG TGT TTG			
Duplex PCR						
<i>E. casseliflavus</i>	CA1	F	TCC TGA ATT AGG TGA AAA AAC	288	ATCC 700327	22)
	CA2	R	GCT AGT TTA CCG TCT TTA ACG			
<i>E. gallinarum</i>	GA1	F	TTA CTT GCT GAT TTT GAT TCG	173	ATCC 49753	22)
	GA2	R	TGA ATT CTT TGA AAT CAG			
<i>E. hirae</i>	HI1	F	CTT TCT GAT ATG GAT GCT GTC	187	ATCC 8043	22)
	HI2	R	TAA ATT CTT CCT TAA ATG TTG			

- 12) 10×PCR 緩衝液 10×PCR Gold Buffer (Thermo Fisher Scientific 製)
- 13) 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2.5 mmol/L dNTPs (Thermo Fisher Scientific 製)
- 14) 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 25 mmol/L MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific 製)
- 15) DNA ポリメラーゼ液 AmpliTaq Gold DNA polymerase (5 unit/μL) (Thermo Fisher Scientific 製)
- 16) PCR 反応液
- i) *E. faecalis*, *E. faecium* 及び *E. durans* を同時に検出する反応系
 10×PCR 緩衝液 2.5 μL, 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2.0 μL, 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 1.5 μL, DNA ポリメラーゼ液 0.7 μL, 各プライマー0.2 μL (E1, E2, FL1, FL2, FM1, FM2, DU1 及び DU2) 及び超純水 14.2 μL を混合した PCR 反応液 22.5 μL を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とした。これらの試薬について、必要本数分の量をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) で混合して調製した。
- ii) *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* 又は *E. hirae* を個別に検出する反応系
 10×PCR 緩衝液 2.5 μL, 2.5 mmol/L デオキシヌクレオシド三リン酸混合液 2.0 μL, 25 mmol/L 塩化マグネシウム溶液 1.5 μL, DNA ポリメラーゼ液 0.7 μL, 各プライマー0.2 μL (E1, E2, CA1 及び CA2), (E1, E2, GA1 及び GA2) 又は (E1, E2, HI1 及び HI2) 及び超純水 15.0 μL を混合した PCR 反応液 22.5 μL を PCR チューブ 1 本あたりの必要量とした。これらの試薬について、必要本数分の量をプラスチック製遠心沈殿管 (容量 1.5 mL) で混合して調製した。
- 17) PCR 陽性対照
 標準株の *E. faecalis* (ATCC 29212), *E. faecium* (ATCC 6057), *E. casseliflavus* (ATCC 700327), *E. durans* (ATCC 6056), *E. gallinarum* (ATCC 49753) 及び *E. hirae* (ATCC 8043) を供して、2.6 の 1)の方法で菌体から DNA を抽出した。

- 18) Tris-acetate, EDTA 緩衝液 (以下「TAE 緩衝液」という.)
50×TAE 緩衝液 (ニッポンジーン製) 20 mL を超純水で希釈して 1000 mL とした.
- 19) 2.5 %アガロースゲル
Agarose L03 「TaKaRa」 (タカラバイオ製) 2.5 g を TAE 緩衝液 100 mL に加え, 電子レンジで加熱して溶かし, ゲルの厚さが 3~4 mm になるようにコームを差し込んだゲルメーカーに流し込み, 室温で静置し固化させた.
- 20) 電気泳動用色素溶液 6×Loagind Buffer (タカラバイオ製)
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 (富士フィルム和光純薬製) 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 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 21) DNA 分子量マーカー 100 bp DNA Ladder (タカラバイオ製)
- 22) ゲル染色液
0.625 mg/mL 臭化エチジウム溶液 (フナコシ製) 40 µL を TAE 緩衝液 50 mL に加えて染色液とした.
- 23) ハートインフュージョン液体培地 (以下「HI 液体培地」という.)
Heart Infusion Broth (Becton, Dickinson and Company 製) 25 g を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 2 mL 分注し, 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 24) 20 w/v%スキムミルク液 (以下「20 %スキムミルク」という.)
Skim Milk (Becton, Dickinson and Company 製) 200 g を蒸留水 1000 mL に溶かした. これを試験管に 2 mL 分注し, 110 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌した.
- 25) 薬剤感受性試験用プレート ‘栄研’ (オーダープレート) 栄研化学製 (以下「フローズンプレート」という.)
供試薬剤及び各薬剤の濃度範囲を Table 2 に示した. フローズンプレートは 2 倍系列で 10~12 段階に希釈した各薬剤及び Ca^{2+} , Mg^{2+} を MH 液体培地に添加し, それらを 96 穴マイクロプレートに充填したものをを用いた. フローズンプレートは -80 °C で冷凍保存し, 使用時は室温で解凍し試験に用いた.

Table 2 Antimicrobial agents

Group	Antimicrobial agent	Abbreviation	Concentration range (µg/mL)		Breakpoint (µg/mL)
Aminoglycosides	Gentamicin	GM	0.25	— 512	32 ^{a)}
	Kanamycin	KM	0.5	— 1024	128 ^{a)}
	Streptomycin	SM	0.5	— 512	—
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	CPFX	0.12	— 128	4 ^{b)}
Glycopeptides	Vancomycin	VCM	0.12	— 128	32 ^{b)}
Lincomycins	Lincomycin	LCM	0.25	— 512	128 ^{a)}
Macrolides	Azithromycin	AZM	0.25	— 64	—
	Erythromycin	EM	0.12	— 128	8 ^{b)}
	Tylosin	TS	0.12	— 256	64 ^{a)}
Penicillins	Ampicillin	ABPC	0.12	— 128	16 ^{b)}
Phenicol	Chloramphenicol	CP	0.25	— 512	32 ^{b)}
Polyethers	Salinomycin Sodium	SNM	0.12	— 32	—
Polypeptides	Bacitracin	BC	0.25	— 512	—
Tetracyclines	Tetracycline	TC	0.12	— 64	16 ^{b)}

a) Defined microbiologically in JVARM. Intermediate values of the two peaks were defined as breakpoints when MICs were bimodally distributed²³⁾.

b) Criteria published by CLSI²⁴⁾

2.3 装置及び器具

- 1) インキュベーター：176-4S 佐竹化学機械工業製，FMU-1301 福島工業製，IS802 ヤマト科学製
- 2) 光学顕微鏡：BX41 オリンパス製
- 3) プラスチック製滅菌シャーレ（以下「シャーレ」という。）：ニプロ製（内径 90 mm，高さ 15 mm）
- 4) アルミブロック恒温槽：Dry Thermo Unit DTU-2C タイテック製
- 5) 遠心分離機：MX-300 トミー精工製
- 6) DNA 増幅装置：GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosystems 製
- 7) 電気泳動装置：Mupid-exU
- 8) 電気泳動パターン撮影システム：AE-6932GXES-U アトー製
- 9) トランスファーセット：ステム製
- 10) マイクロプレートリーディングミラー：極東製薬工業製

2.4 分離

- 1) 選択増菌培養
無菌操作で採取した試料 25 g を AC 液体培地に入れ，振り混ぜた後，37 °C で 18~48 時間培養した。
- 2) 選択分離培養
選択増菌培養液の 1 白金耳を ECS 寒天培地に画線塗布し，37 °C で 18~72 時間培養した。

3) 純粹分離培養

ECS 寒天培地上より、腸球菌の典型性状である周囲が黒褐色又は黒色帯で中心が半透明の集落を 1~2 個釣菌し、それぞれ生理食塩液 10~15 μL で懸濁した。各懸濁液の 1 白金耳を BHI 寒天培地に画線塗布し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養した。BHI 寒天培地上に形成された 1 集落を釣菌し、再度 BHI 寒天培地で培養した。

2.5 同定

1) 性状試験

i 形態学的性状

分離株の形態学的性状を確認するため、グラム染色を実施した。BHI 寒天培地から 1 集落を釣菌し、生理食塩液 10~15 μL に懸濁した。懸濁液をスライドガラス上に薄く広げて自然乾燥し、バーナーで塗抹面を火炎固定した。塗抹面に前染色液を十分滴下し、1 分間静置した後、水洗した。前染色液が溶け出さなくなるまで脱色液を滴下し水洗した。その後、後染色液を十分滴下し、1 分間静置した後、水洗した。スライドガラス上の水分をろ紙でふき取った。性状を光学顕微鏡で観察し、グラム陽性球菌であるかを鑑別した。同時にコンタミネーションを確認した。

ii 生理学的性状

分離株の生理学的性状を確認するため、高塩化ナトリウム耐性、高温耐性の試験を実施した。BHI 寒天培地から白金線で 1 集落を釣菌し、6.5 % NaCl 加 HI 液体培地に接種して、45 $^{\circ}\text{C}$ で 18~24 時間培養し性状を観察した。6.5 % NaCl 加 HI 液体培地が紫色から黄色や灰色に変化又は混濁があった分離株は高塩化ナトリウム耐性及び高温耐性が陽性とした。また、色素産生性は集落を観察し、鮮やかな黄色であった分離株は陽性とし、白色又はクリーム色であった分離株は陰性とした。

iii 生化学的性状

2.5 の 1) の i) においてグラム陽性球菌であることが確認され、かつ 2.5 の 1) の ii) において高塩化ナトリウム耐性及び高温耐性が陽性であった分離株について、API を用いてキットの説明書に従い試験を実施した。測定結果の判定は同定ソフトである APIWEB[®]を用いた。判定結果が「acceptable」、 「good」、 「very good」又は「excellent」の場合は判定された菌種を採用した。

2) PCR 法を用いた菌種同定

2.5 の 1) の i) においてグラム陽性球菌であることが確認され、かつ 2.5 の 1) の ii) において高塩化ナトリウム耐性及び高温耐性が陽性であった分離株を PCR に供した。

i DNA 抽出

標準株又は分離株を BHI 寒天培地で培養後、形成された集落を 1~2 個釣菌し 100 μL の生理食塩液が入った 1.5 mL チューブに懸濁した。懸濁した菌液を 12000 rpm で 1 分間遠心分離し上澄み液を除去した。その後、InstaGene Matrix を用いてキットの説明書に従って DNA の抽出操作を行い、陽性対照液及び DNA 試料液を調製した。

ii 試料溶液等の調製

PCR 反応液 22.5 μL を PCR チューブに入れ、DNA 試料液を 2.5 μL 加えて PCR 反応に供する試料溶液とした。同時に、PCR 反応液に陽性対照又は超純水を 2.5 μL 加えて、陽性対照

液及び陰性対照液を調製した。

iii PCR 反応

各試料溶液、陽性対照液及び陰性対照液の入った PCR チューブを DNA 増幅装置に入れ、*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. gallinarum* 及び *E. hirae* は、①：95 °C（4 分間保持）→ [95 °C（30 秒間保持）→55 °C（1 分間保持）→72 °C（1 分間保持）]（30 サイクル）→72 °C（7 分間保持）の条件で PCR 反応を行った。*E. casseliflavus* は②：95 °C（10 分間保持）→ [92 °C（30 秒間保持）→45 °C（1 分間保持）→72 °C（1 分間保持）]（30 サイクル）→72 °C（7 分間保持）の条件で PCR 反応を行った。

iv 電気泳動

TAE 緩衝液を入れた電気泳動装置に 2.5 %アガロースゲルを入れた。PCR 反応が終了した試料溶液、陽性対照液、陰性対照液及び DNA 分子量マーカー各 5 µL に電気泳動用色素溶液 1 µL をそれぞれ加えて混合した。各混合液の全量を先のアガロースゲルのウェルに注入し、100 V の定電圧でブロモフェノールブルーがウェルから 4~5 cm 移動するまで電気泳動を行った。電気泳動が終了したアガロースゲルをゲル染色液に入れ、約 30 分間浸して染色し、電気泳動パターン撮影システムで 312 nm の紫外線を照射し、PCR 増幅産物を確認した。

v 判定

陽性対照液において腸球菌属及び各腸球菌種の特異的なプライマーセットに対応する PCR 増幅産物がすべて検出され、陰性対照液において PCR 増幅産物が不検出の場合、かつ、試料溶液において腸球菌属及び各腸球菌種の特異的なプライマーセットに対応する PCR 増幅産物が検出された場合は *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum* 又は *E. hirae* と菌種を判定した。また、試料溶液において腸球菌属の特異的なプライマーセットに対応する PCR 増幅産物のみが検出された場合は腸球菌属として判定した。

3) 菌種判定

PCR 法で判定された菌種を判定結果とし、PCR 法で菌種を判定できなかったが API で判定できた場合は API の結果を判定結果とした。ただし、色素産生性が PCR 又は API で判定された菌種の性状と不一致であった場合の分離株は判定結果を *Enterococcus sp.* とした。PCR 法又は API により菌種が判定できず、腸球菌属とのみ判定された場合の分離株は *Enterococcus sp.* とした。なお、高塩化ナトリウム耐性が陰性であった場合、高温耐性が陰性であった場合、グラム陽性球菌であることが確認できなかった場合又は PCR 法で腸球菌属と判定されなかった場合は、腸球菌の分離がなかったと判断した。

分離した菌株は HI 液体培地 2 mL と 20 %スキムミルク 2 mL を混合した溶液に入れ、-80 °C で冷凍保存した。

2.6 薬剤感受性試験

菌種同定された株を試験に供した。なお、同一検体から分離された 2 株の菌種同定の結果が一致した場合はいずれか 1 株を試験に供し、異なる結果であった場合はいずれの株も試験に供した。

1) 接種菌液の調製

分離株を BHI 寒天培地で 35 °C で 18~24 時間培養した。形成された集落を釣菌し McFarland No. 1 となるよう生理食塩水に懸濁した。更に、調製した菌液 1 mL を生理食塩水 9 mL で希釈し、接種菌液とした。

2) 菌液の接種及び培養

トランスファーセットを用いて専用トレイに接種菌液を入れ、そこに浸した 96 ピンプレートをフローズンプレートに接種した。接種後、フローズンプレートにふたをして、35 °Cで 16~24 時間培養した。

3) 判定

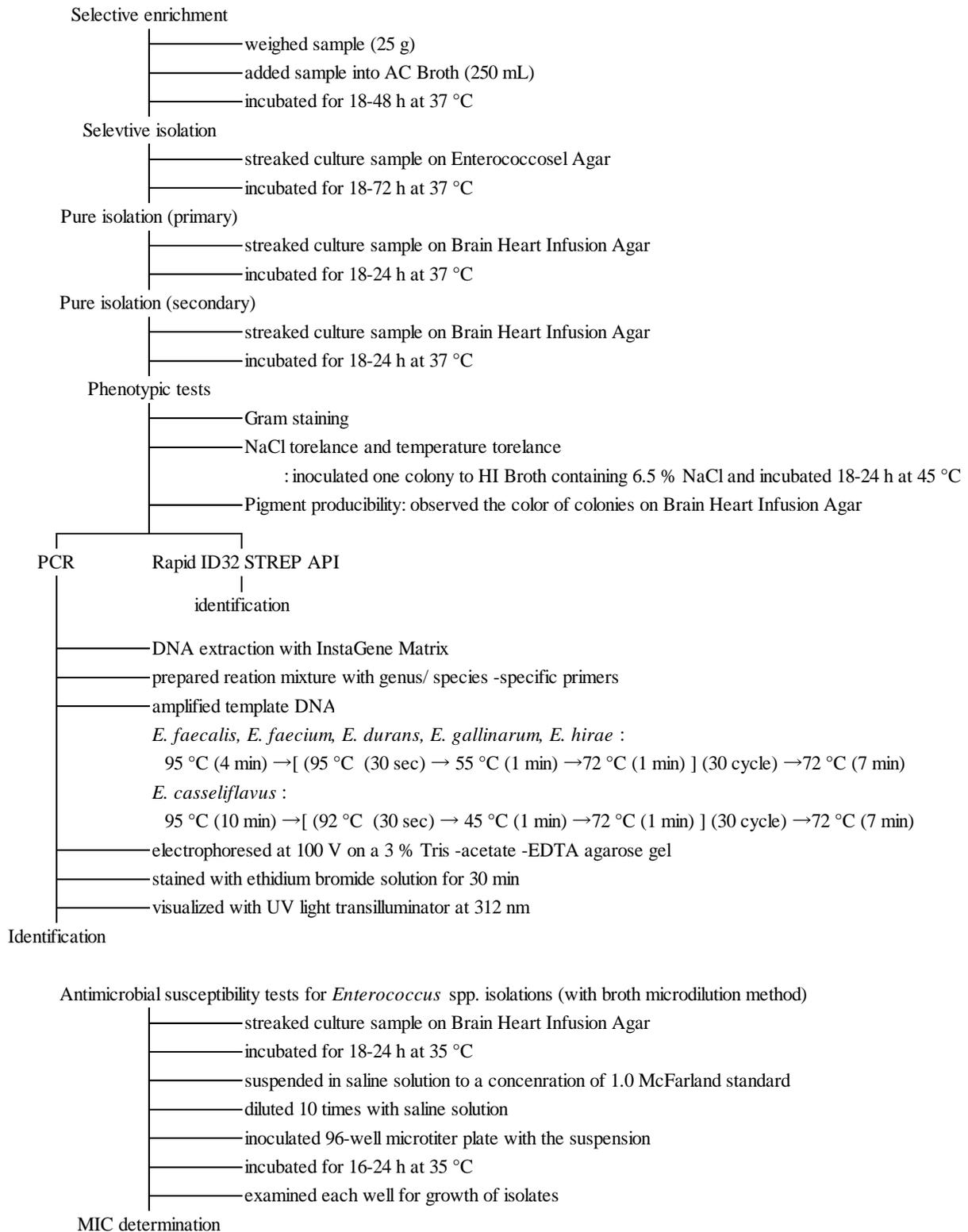
培養したフローズンプレートをマイクロプレートリーディングミラーの上に置き、肉眼で混濁又は沈殿が認められない場合及び沈殿物があっても直径が 1 mm 未満で 1 個の場合は発育阻止とみなした。それ以外の場合は発育とみなした。接種菌の発育が阻止された薬剤の最低濃度をもって最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration) (以下「MIC」という。) とした。フローズンプレートの薬剤を含まない Ca^{2+} , Mg^{2+} 添加 MH 液体培地が充填されたウェルに発育が認められない場合及び薬剤希釈系列中に不連続な発育が認められた場合 (スキップ現象) は再試験を行うこととし、再試験においても前述の事象が認められた場合は試験不成立とした。

各薬剤の耐性限界値 (以下「ブレイクポイント」という。) は、Clinical and Laboratory Standards Institute (以下「CLSI」という。) が規定するブレイクポイント²⁴⁾及び JVARM で得られた値 (二峰性を示す MIC 分布の中間点)²³⁾を用いた。供試株の MIC 値がブレイクポイント以上であった場合は耐性株とした。耐性率は供試株数 (試験不成立となったものを除く) における耐性株数の割合 (耐性株数/供試株数×100) で算出した。なお判定は、バンコマイシンについてのみ 24 時間培養後、その他の薬剤については 16~20 時間培養後に行った。

4) 試験の精度管理

精度管理株の *E. faecalis* (ATCC 29212) の MIC 値が CLSI の定める精度管理限界値²⁴⁾以内であることを試験成立条件とした。

なお、分離から薬剤感受性試験までの概要を Scheme 1 に示した。



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

3 結果及び考察

3.1 飼料原料及び配合飼料中の腸球菌の検出状況

調査の対象とした飼料原料及び配合飼料における腸球菌の分離頻度を Table 3 に示した。検体

とした 79 試料のうち 52 試料から腸球菌が分離された。動物質性原料においては魚粉の陽性率が 65 % と最も高く、次いでチキンミール、原料混合肉骨粉がそれぞれ 53 %、47 % であった。植物質性原料として大豆油かすを対象としたが、検体数が少なく引き続き調査が必要と考えられた。配合飼料の陽性率は鶏用及び牛用がいずれも 88 % と高かった。豚用配合飼料は検体数が少なく、引き続き調査が必要と考えられた。

Table 3 Isolates from feed samples

	No. of samples	No. of samples contain <i>Enterococci</i>	Rate of samples with <i>Enterococci</i> (%)	No. of isolates
Soybean meal	2	1	50	2
Fish meal	20	13	65	21
Poultry by-product meal	15	8	53	16
Swine and poultry by-product meal	15	7	47	12
Poultry feed	8	7	88	12
Swine feed	3	2	67	4
Cattle feed	16	14	88	26
Total	79	52	66	93

3.2 菌種別分離頻度

本調査で分離された腸球菌の菌種別分離頻度を Table 4 に示した。腸球菌として分離された 93 株のうち 59 株について菌種が同定された。*E. faecalis* が最も多く分離され (28 株)、次いで *E. faecium* (20 株)、*E. hirae* (10 株)、*E. durans* (4 株)、*E. casseliflavus* (1 株) の順に分離頻度が高かった。飼料の種類別に見ると、魚粉及びチキンミールでは *E. faecalis* がそれぞれ 48 % (10/21 株) 及び 44 % (7/16 株) の割合で分離され、これらの飼料中に存在する主要な腸球菌種であった。また牛用配合飼料では *E. faecalis* 及び *E. faecium* がそれぞれ 23 % (6/26 株) 及び 27 % (7/26 株) の頻度で分離され、この 2 菌種が主要な腸球菌種となっていた。菌種別では、*E. faecalis* は飼料原料からの分離頻度が高い傾向にあった (20/28 株) のに対して、*E. hirae* は配合飼料からの分離頻度が高い傾向にあった (7/10 株)。

Table 4 Isolation rate of *Enterococcus*

Samples	No. of <i>Enterococcus</i> -positive samples	No. of isolates					<i>Enterococcus</i> sp.	Total
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. hirae</i>		
Soybean meal	1	0	2	0	0	0	0	2
Fish meal	13	10	3	0	3	2	3	21
Poultry by-product meal	8	7	2	1	0	1	5	16
Swine and poultry by-product meal	7	3	2	0	0	0	7	12
Poultry feed	7	2	4	0	1	2	3	12
Swine feed	2	0	0	0	0	1	3	4
Cattle feed	14	6	7	0	0	4	9	26
Total	52	28	20	1	4	10	30	93

3.3 薬剤感受性

菌種同定により腸球菌と判定された 93 株のうち、同じ試料から分離され、同一菌株の可能性のあるものを除いた 70 株を薬剤感受性試験に供した。うち 7 株はフローズンプレート上で正常な菌の発育が認められず試験不成立となった。試験成立となった 63 株の耐性率を Table 5 に示した。ヒト医療の観点から重要とされている VCM に対して、耐性を示す菌株はなかった。その他、CP 及び ABPC に対しても耐性は認められなかった。一方でいずれかの薬剤に耐性を示した菌株は 40 株あり、そのうち 23 株は複数の薬剤に耐性を示した。KM に耐性を示す菌株が最も高い頻度で分離されたが (50.8 %)、KM はアミノグリコシド系薬剤であり、腸球菌はアミノグリコシド系薬剤に対して内因性耐性を持っている²⁵⁾ことが理由のひとつと考えられた。次いで EM 及び TC に耐性を示す菌株が多く見られた (それぞれ 34.9 %及び 12.7 %)。EM の属するマクロライド系薬剤はヒト及び畜水産分野において、TC の属するテトラサイクリン系薬剤は特に畜産分野において多く使用されており²³⁾、JVARM における 2020 年のと畜場等由来の腸球菌に関する調査でも高い耐性率が示されている²³⁾。本調査の結果から、飼料中にも EM 及び TC に対する耐性をもつ腸球菌が存在していることから、引き続き動向を調査する必要があると考えられた。

いずれかの薬剤に耐性を示した菌株の各耐性パターンを Table 6 に示した。多剤耐性菌 (内因性耐性を持つ KM を除く複数の薬剤に耐性を認めた菌株) は 10 株あった。

分離株数の多かった *E. faecalis*, *E. faecium* 及びその他の腸球菌について、各薬剤に対する耐性率を Table 7 に示した。いずれも KM に対して最も高い耐性率を示したが、耐性率及び MIC は *E. faecium* においてより高かった。

Table 5 Antibiotic susceptibility of *Enterococcus* spp. from each feed samples

	Fish meal (<i>n</i> = 12)				Poultry by-product meal (<i>n</i> = 8)				Swine and poultry by-product meal (<i>n</i> = 6)				Break point (µg/mL)
	MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance		
	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	
KM	64	256	4	33.3	64	>1024	3	37.5	128	512	3	50.0	128 ^{a)}
GM	8	16	0	0.0	8	16	0	0.0	8	16	0	0.0	32 ^{a)}
SM	32	128	-	-	64	>512	-	-	64	128	-	-	-
VCM	1	2	0	0.0	1	4	0	0.0	1	4	0	0.0	32 ^{b)}
TC	0.25	64	2	16.7	0.5	64	1	12.5	1	16	1	16.7	16 ^{b)}
CP	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	32 ^{b)}
CPFX	1	2	1	8.3	1	4	1	12.5	1	8	1	16.7	4 ^{b)}
ABPC	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	1	1	0	0.0	16 ^{b)}
SNM	1	2	-	-	2	2	-	-	1	2	-	-	-
BC	128	256	-	-	256	512	-	-	256	>512	-	-	-
AZM	16	32	-	-	2	>64	-	-	8	32	-	-	-
EM	4	16	4	33.3	1	>128	2	25.0	4	16	2	33.3	8 ^{b)}
TS	4	8	1	8.3	2	>256	1	12.5	4	16	0	0.0	64 ^{a)}
LCM	32	64	1	8.3	64	>512	1	12.5	16	64	0	0.0	128 ^{a)}

	Poultry feed (<i>n</i> = 8)				Cattle feed (<i>n</i> = 23)				Total (<i>n</i> = 63)				Break point (µg/mL)	Reference ²¹⁾ Resistance of isolates from slaughterhouses in 2020 (%) ^{c)}
	MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance		MIC ₅₀		Resistance			
	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)	(µg/mL)	(µg/mL)	<i>n</i>	(%)		
KM	128	1024	4	50.0	128	1024	14	60.9	128	1024	32	50.8	128 ^{a)}	13.9 - 48.2
GM	8	32	1	12.5	8	16	1	4.3	8	16	2	3.2	32 ^{a)}	6.2 - 7.5
SM	64	64	-	-	64	128	-	-	64	128	-	-	-	-
VCM	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	32 ^{b)}	0.0 -
TC	0.5	>64	2	25.0	0.5	0.5	1	4.3	0.5	16	8	12.7	16 ^{b)}	28.5 - 66.9
CP	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	8	8	0	0.0	32 ^{b)}	0.4 - 16.1
CPFX	1	16	1	12.5	1	2	1	4.3	1	2	6	9.5	4 ^{b)}	0.0 - 7.3
ABPC	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	1	2	0	0.0	16 ^{b)}	0.0 - 0.5
SNM	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2	-	-	-	-
BC	256	>512	-	-	256	512	-	-	256	512	-	-	-	-
AZM	1	16	-	-	8	32	-	-	8	32	-	-	-	-
EM	0.25	16	2	25.0	4	16	8	34.8	2	16	22	34.9	8 ^{b)}	4.9 - 36.8
TS	4	8	0	0.0	4	16	0	0.0	4	16	2	3.2	64 ^{a)}	3.4 - 30.6
LCM	32	64	0	0.0	32	64	0	0.0	32	64	2	3.2	128 ^{a)}	3.4 - 40.9

- a) Defined microbiologically in JVARM. Intermediate values of the two peaks were defined as breakpoints when MICs were bimodally distributed²³⁾.
- b) Criteria as published by CLSI²⁴⁾.
- c) Maximum and minimum of resistance with poultry, swine and cattle.

Table 6 Pattern of antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp.

Feed ingredient	Species	Pattern of resistance	Compound feed	Species	Pattern of resistance
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM	Poultry feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Soybean meal	<i>E. faecium</i>	TC	Poultry feed	<i>E. faecium</i>	GM, KM, EM
Fish meal	<i>E. faecalis</i>	TC	Poultry feed	<i>E. durans</i>	TC
Fish meal	<i>E. faecalis</i>	KM	Poultry feed	<i>E. hirae</i>	TC, CPFX
Fish meal	<i>E. faecalis</i>	EM, TS, LCM	Poultry feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
Fish meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM, TC	Poultry feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
Fish meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM	Swine feed	<i>E. hirae</i>	KM, EM, CPFX
Fish meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM, CPFX	Swine feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
Poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	KM, EM, TS, LCM, TC	Swine feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
Poultry by-product meal	<i>E. hirae</i>	KM, EM	Cattle feed	<i>E. faecalis</i>	KM
Poultry by-product meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, CPFX	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM
Swine and poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	TC	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Swine and poultry by-product meal	<i>E. faecalis</i>	KM	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Swine and poultry by-product meal	<i>E. faecium</i>	KM, EM, CPFX	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM
Swine and poultry by-product meal	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM	Cattle feed	<i>E. faecium</i>	EM
			Cattle feed	<i>E. faecium</i>	KM, EM, TC
			Cattle feed	<i>E. faecium</i>	GM, KM, EM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	KM, EM
			Cattle feed	<i>Enterococcus</i> sp.	CPFX

Table 7 Antibiotic susceptibility of *E. faecalis*, *E. faecium* and other *Enterococci*

	<i>E. faecalis</i> (n = 18)				<i>E. faecium</i> (n = 13)				Others (n = 32)			
	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance n (%)		MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance n (%)		MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	Resistance n (%)	
KM	64	128	4 22.2		256	1024	11 84.6		128	1024	17 53.1	
GM	16	16	0 0.0		8	32	2 15.4		8	16	0 0.0	
TC	0.5	64	3 16.7		0.5	64	3 23.1		0.5	1	2 6.3	
CPFX	1	2	0 0.0		0.5	1	1 7.7		1	4	5 15.6	
ABPC	1	1	0 0.0		1	2	0 0.0		1	2	0 0.0	
EM	4	>128	2 11.1		8	16	11 84.6		0.25	16	9 28.1	
TS	2	>256	2 11.1		4	8	0 0.0		8	16	0 0.0	
LCM	32	512	2 11.1		16	32	0 0.0		32	64	0 0.0	
CP	8	8	0 0.0		8	16	0 0.0		8	8	0 0.0	
VCM	2	2	0 0.0		1	2	0 0.0		1	1	0 0.0	

4 まとめ

国内流通の飼料原料及び配合飼料から腸球菌を分離し、薬剤耐性の状況を調べた。2023年度の調査において得られた知見を以下に示した。

- 1) 調査対象として79点の試料を収集し、うち52点から腸球菌が分離された。
- 2) 93株の腸球菌が分離され、うち59株について菌種が判定された。菌種別分離頻度は *E. faecalis* が最も高く、*E. faecium*、*E. hirae*、*E. durans*、*E. casseliflavus* の順に高かった。

- 3) 各飼料等における腸球菌の陽性率は、鶏用配合飼料及び牛用配合飼料（88 %）、魚粉（65 %）、チキンミール（53 %）、原料混合肉骨粉（47 %）の順に高かった。大豆油かす及び豚用配合飼料については検体数が少なく、さらなる調査が必要と考えられた。
- 4) 感受性試験を行った 63 株のうち 40 株において薬剤耐性が認められ、23 株については複数の薬剤に対して耐性があった。EM 及び TC においても耐性率が高く（34.9 %及び 12.7 %）、引き続き調査が必要と考えられた。ヒト医療の観点から重要視される VCM についてはいずれの菌株においても耐性を認めなかった。

文 献

- 1) Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi, A K M, Wertheim H F L, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara G L, Gould I M, Goossens H, Greko C, So A D, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta A Q, Qamar F N, Mir F, Kariuki S, Bhutta Z A, Coates A, Bergstrom R, Wright G D, Brown E D, Cars O: Antibiotic resistance—the need for global solutions, *Lancet Infect. Dis.*, **13**(12), 1057-1098 (2013).
- 2) WHO: Global action plan on antimicrobial resistance. <https://www.emro.who.int/health-topics/drug-resistance/global-action-plan.html>, cited 2 Feb. 2024.
- 3) The government of Japan: National action plan on antimicrobial resistance (AMR) 2016-2020. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000138942.pdf>, cited 2 Feb. 2024.
- 4) The government of Japan: National action plan on antimicrobial resistance (AMR) 2023-2027. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001096228.pdf>, cited 10 Apr. 2024.
- 5) George R C, Uttley A H C: Susceptibility of enterococci and epidemiology of enterococcal infection in the 1980s, *Epidem. Inf.*, **103**, 403-413 (1989).
- 6) Kojima A, Morioka A, Kijima M, Ishihara K, Asai T, Fujisawa T, Tamura Y, Takahashi T: Classification and antimicrobial susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from apparently healthy food-producing animals in Japan, *Zoonoses and Public Health*, **57**, 137-141 (2010).
- 7) National Veterinary Assay Laboratory Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: A report on the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system 2000 to 2007, (2009). https://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/pdf/jvarm2000_2007_final_201005.pdf, cited 2 Feb. 2024.
- 8) National Veterinary Assay Laboratory Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries: A report on the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system 2008 to 2011, (2013). https://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/pdf/jvarm2008_2011.pdf, cited 2 Feb. 2024.
- 9) The AMR One Health Surveillance Committee: Nippon AMR One Health Report (NAOR) 2019. <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/000714628.pdf>, cited 2 Feb. 2024.
- 10) Bortolaia V, Espinosa-Gongora C, Guardabassi L: Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat, *Clin. Microbiol. Infect.*, **22**(2), 130-140 (2016).
- 11) da Costa P M, Oliveira M, Bica A, Vaz-Pires P, Bernardo F: Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients, *Vet. Microbiol.*, **120**, 122-131 (2007).

- 12) Ge B, LaFon P C, Carter P J, McDermott S D, Abbott J, Glenn A, Ayers S L, Friedman S L, Parige J C, Wagner D D, Zhao S, McDermott P F, Rasmussen M A: Retrospective analysis of *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* in animal feed ingredients, *Foodborne Pathog.*, **10**(8), 684-691 (2013).
- 13) Channaiah L H, Subramanyam B, Zurek L: Molecular characterization of antibiotic resistant and potentially virulent enterococci isolated from swine farms and feed mills, *J. Stored Prod. Res.*, **77**, 189-196 (2018).
- 14) Ge B, Domesle K, Gaines S, Lam C, Jones S M B, Yang Q, Ayers S L, McDermott P E: Prevalence and antimicrobial susceptibility of indicator organisms *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from U.S. animal food, 2005-2011. *Microorganisms*, **8**(7), 1048, doi: 10.3390/microorganisms8071048 (2020).
- 15) 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).
- 16) 浅尾 美由起, 奥山 紀子, 山上 陽平: 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), 飼料研究報告, **45**, 164-178 (2020).
- 17) 山上 陽平, 有原 若奈, 増井 亮太, 高橋 亜紀子, 橋本 仁康: 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 2 年度), 令和 2 年度飼料分析基準検討会 (2021).
- 18) 山上 陽平, 浅尾 美由起, 高橋 亜紀子, 橋本 仁康, 奥山 紀子, 新井 詠子, 有原 若奈, 増井 亮太: 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 3 年度), 令和 3 年度飼料分析基準検討会 (2022).
- 19) Yamagami Y, Asao M, Takahashi A, Hashimoto Y, Okuyama N, Arai E, Arihara W, Masui R, Shimazaki Y: Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from animal feed in Japan, *Front. Vet. Sci.*, Volume 10 - 2023, doi.org/10.3389/fvets.2023.1328552 (2024).
- 20) 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).
- 21) Deasy B M, Rea M C, Fitzgerald G F, Cogan T M, Beresford T P: A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*, *System. Appl. Microbiol.*, **23**, 510-522 (2000).
- 22) Jackson C R, Fedorka-Cray P J, Barrett J B: Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci, *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 3558-3565 (2004).
- 23) 厚生労働省: 薬剤耐性 (AMR) ワンヘルス動向調査年次報告書 2022, <https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001182435.pdf>, cited 2 Feb. 2024.
- 24) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33rd Edition., CLSI document M-100-ED33 (2023).
- 25) 日本臨床微生物学会: 抗菌薬感受性検査のための標準法 第 24 版 2014 年 1 月 (2014) (ISBN: 1-56238-000-0).