

飼料添加物バチルス サブチルスの基準・規格の改正

飼料添加物については、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）第 2 条第 3 項並びに第 3 条第 1 項及び第 2 項の規定に基づき、農林水産大臣が農業資材審議会の意見を聴いて指定し、その基準又は規格を設定している。

平成 23 年 6 月 7 日付け 23 消安第 1406 号をもって諮問された飼料添加物バチルス サブチルスについて、効果安全性の確認や基準・規格の改正案を作成した。その概要は次のとおりである。

1. 要望品目

飼料添加物名：バチルス サブチルス

用 途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

2. 経過

平成 23 年 6 月 7 日 諮問

23 年 6 月 17 日 第 1 回飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）

26 年 3 月 17 日 第 12 回飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）

27 年 7 月 29 日 第 18 回飼料安全部会（飼料添加物規格）

3. 飼料安全部会の審議結果

資料 5-2 及び資料 5-3 のとおり。

バチルス サブチルスの概要（規格・基準の改正）

項 目	概 要
製品の概要	・ バチルス サブチルスは、生菌剤として用いられており、腸内細菌叢のバランスを整え、飼料の栄養成分の有効な利用を促進し、増体量や飼料効率の改善を効果としている。 ・ これまでに、国内では、牛用、豚用及び鶏用の飼料添加物として指定されており、4 株について規格・基準が設定されている。 ・ 今回追加設定を要望するバチルス サブチルス JA-ZK 株は、日本国内で新しく発見された株であり、諸外国では飼料添加物としての承認は受けていない。 ・ 要望者が推奨する飼料への添加量 豚用飼料：$10^5 \sim 10^7$ 個/g 鶏用飼料：$10^5 \sim 10^7$ 個/g ・ 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）の審議では、鶏及び豚用飼料に $10^5 \sim 10^7$ 個/g で添加した場合において、飼料添加物としての効果及び安全性が確認された。 ・ バチルス サブチルス JA-ZK 株を飼料添加物として追加するにあたり、バチルス サブチルスの飼料添加物の基準及び規格の改正案が作成された。
日本における審議状況	H23.6.17 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性） H26.3.17 飼料安全部会（飼料添加物効果安全性）（終了） H27.7.29 飼料安全部会（飼料添加物規格）（終了）

飼料添加物の効果安全性について（案）

バチルス サブチルス JA-ZK 株

平成 27 年 8 月 31 日

農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課

目 次

1	名称等	2
2	起源又は発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等	2
3	効果に関する事項	2
3-1	効果を裏付ける基礎的試験	2
3-1-1	<i>in vitro</i> 試験	2
3-1-2	<i>in vivo</i> 試験（鶏）	3
3-2	抗菌性飼料添加物との併用による影響に関する試験	3
3-2-1	<i>in vitro</i> 試験	3
3-2-2	<i>in vivo</i> 試験（鶏）	5
3-2-3	<i>in vivo</i> 試験（豚）	5
3-3	効果を裏付ける野外応用による試験	5
3-3-1	鶏	5
3-3-2	豚	6
4	安全性に関する事項	6
4-1	一般毒性試験	6
4-1-1	単回投与毒性試験	6
4-1-2	反復投与毒性試験（短期）	7
4-2	生体内動態に関する試験	7
4-2-1	鶏	7
4-2-2	豚	7
4-3	対象家畜等を用いた飼養試験	8
4-3-1	鶏	8
4-3-2	豚	8
5	耐性菌出現に関する試験	8
5-1	動物用抗生物質（動物用医薬品）に対する薬剤感受性試験	8
5-2	抗菌性飼料添加物に対する耐性獲得に関する調査	9
6	自然環境に及ぼす影響に関する試験	11
7	審議結果	11
8	参照（参考文献及び参考資料）	11

バチルス サブチルス JA-ZK 株に関する効果安全性について

1 名称等

一般名：*Bacillus subtilis* JA-ZK 株

和名：枯草菌

細菌学的性状：グラム陽性桿菌（長さ 2～3μm）で芽胞を形成。好気性菌であり、嫌気性条件下では発育できない。芽胞は熱や放射線等に対して耐性を示す。

対象家畜及び至適添加量（企業推奨量）：鶏及び豚 10⁵～10⁷ 個/g

2 起源又は発見の経緯、外国での飼料添加物としての許可状況及び使用状況等

Bacillus subtilis（以下「*B. subtilis*」という。）は、土壌や枯れた植物等に広く存在し、稲わらに付着していることから、間接的に家畜に摂取されており、食用としての安全性は広く知られている。*B. subtilis*を飼料に添加し、家畜に給与することでその生産性が改善することが報告されており、一部の菌株（4 株）は日本で既に飼料添加物として指定されている（表 1 参照）。また、例えば、*B. subtilis* C-3102 株は、EU で飼料添加物として指定（EC No 1444/2006）され、アメリカでは大手食肉企業に採用される等、*B. subtilis*は世界的に広く使用されている。

B. subtilis JA-ZK 株は、土壌から分離し、変異処理や選抜を行わず野生株のまま培養して製剤としている。また、*B. subtilis* JA-ZK 株は、高密度で増殖させることが可能

表 1 飼料添加物として既指定の *B. subtilis* の対象家畜と飼料添加量

名 称	株 名	対象家畜	飼料への推奨添加量（個/g）
バチルス サブチルス（その 1）	BN 株	牛、豚、鶏	
バチルス サブチルス（その 2）	C-3102 株		
バチルス サブチルス（その 3）	DB9011 株		
バチルス サブチルス（その 4）	NT 株		
今回検討の菌株	JA-ZK 株	豚、鶏	10 ⁵ ～10 ⁷

3 効果に関する事項

3-1 効果を裏付ける基礎的試験

3-1-1 *in vitro* 試験

B. subtilis JA-ZK 株が他菌種の増殖に与える影響を調べるため、SCD 液体培地中で試験菌の単独培養と試験菌と *B. subtilis* JA-ZK 株の混合培養（好気条件、37℃、48 時間）を行い、24 時間ごとに試験菌の菌数を測定した。試験菌株は以下の 9 株である（大

腸菌：*Escherichia coli* NBRC 14249、N-810、2D-5、サルモネラ菌：*Salmonella* Enteritidis ZK-3、黄色ブドウ球菌：*Staphylococcus aureus* NBRC 12732、乳酸菌：*Lactobacillus johnsonii* LA-3 株、*Lactobacillus plantarum* LP-1 株、腸球菌：*Enterococcus faecalis* APU-14 株、*Enterococcus mundtii* APU-27 株。

B. subtilis JA-ZK 株との混合培養で、大腸菌の増殖は 10 分の 1 以下（特に、NBRC 14249 と N-810 は検出限界未満）、サルモネラ菌の増殖は検出限界未満まで抑制された。黄色ブドウ球菌では、増殖への影響は見られなかった。

乳酸菌 2 株（豚の消化管内容物から分離）及び腸球菌 2 株（鶏から分離）の増殖には、混合培養による抑制傾向は認められなかった。〔参照 1〕

3-1-2 *in vivo* 試験（鶏）

鶏（白色レグホン系、8 日齢、体重 49～56g）に、*B. subtilis* JA-ZK 株を 0（対照群）、 10^6 、 10^8 個/g で基礎飼料に添加し、6 日間給与した（1 群 7 羽（3 反復））。

一般状態に異常は認められなかった。増体量は 10^8 個/g 添加群で、有意に増加した（ $p<0.05$ ）、飼料摂取量は、 10^6 及び 10^8 個/g 添加群で、有意に減少した（ $p<0.01$ 、 $p<0.05$ ）。飼料要求率は両添加群とも有意に低下した（ $p<0.05$ ）（表 2 参照）。また、試験終了時に全羽剖検したが、肉眼的異常は見られなかった。

以上より、 10^6 個/g で添加することで飼料要求率が有意に低下したため、 10^6 個/g を *B. subtilis* JA-ZK 株の常用量とした。〔参照 2〕

表 2 鶏用飼料に添加したときの効果

	対照群	<i>B. subtilis</i> JA-ZK 株添加群	
		10^6 個/g	10^8 個/g
試験動物数（羽）	21	21	21
増体量（g/羽）	64.2 (0.9)	65.4 (1.2)	67.6* (2.2)
飼料摂取量（g/羽）	116.4 (1.6)	111.6** (1.8)	113.0* (0.6)
飼料要求率	1.8 (0.1)	1.7* (0.1)	1.7* (0.1)

増体量、飼料摂取量及び飼料要求率の値は平均値、（ ）は標準偏差

対照群との比較で有意な差あり（*： $p<0.05$ 、**： $p<0.01$ ）

3-2 抗菌性飼料添加物との併用による影響に関する試験

3-2-1 *in vitro* 試験

B. subtilis JA-ZK 株、*S. aureus* NBRC 12732 及び *E. coli* NBRC 14249 を用い、日本化学療法学会標準法に準拠し、寒天平板希釈法により、抗菌性飼料添加物に対する最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。菌株はミュラーヒントン変法培地で 18 時間培養後、 $10^5 \sim 10^6$ 個/mL となるように希釈し、抗菌性飼料添加物を 2 倍段階希釈した寒天培地に接種後、37℃で 24 時間培養した。

B. subtilis JA-ZK 株は、鶏用抗菌性飼料添加物、豚用抗菌性飼料添加物のうち、それぞれ 6 系統 13 種類、5 系統 8 種類に対して感受性を示した（表 3 参照）。〔参照 3〕

表 3 抗菌性飼料添加物に対する MIC 比較表

No.	飼料添加物	抗菌性飼料添加物		MIC (g/g)		
		名称	種類	MIC (g/g)	MIC (g/g)	MIC (g/g)
1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20
21	21	21	21	21	21	21
22	22	22	22	22	22	22
23	23	23	23	23	23	23
24	24	24	24	24	24	24
25	25	25	25	25	25	25
26	26	26	26	26	26	26
27	27	27	27	27	27	27
28	28	28	28	28	28	28
29	29	29	29	29	29	29
30	30	30	30	30	30	30
31	31	31	31	31	31	31
32	32	32	32	32	32	32
33	33	33	33	33	33	33
34	34	34	34	34	34	34
35	35	35	35	35	35	35
36	36	36	36	36	36	36
37	37	37	37	37	37	37
38	38	38	38	38	38	38
39	39	39	39	39	39	39
40	40	40	40	40	40	40
41	41	41	41	41	41	41
42	42	42	42	42	42	42
43	43	43	43	43	43	43
44	44	44	44	44	44	44
45	45	45	45	45	45	45
46	46	46	46	46	46	46
47	47	47	47	47	47	47
48	48	48	48	48	48	48
49	49	49	49	49	49	49
50	50	50	50	50	50	50
51	51	51	51	51	51	51
52	52	52	52	52	52	52
53	53	53	53	53	53	53
54	54	54	54	54	54	54
55	55	55	55	55	55	55
56	56	56	56	56	56	56
57	57	57	57	57	57	57
58	58	58	58	58	58	58
59	59	59	59	59	59	59
60	60	60	60	60	60	60
61	61	61	61	61	61	61
62	62	62	62	62	62	62
63	63	63	63	63	63	63
64	64	64	64	64	64	64
65	65	65	65	65	65	65
66	66	66	66	66	66	66
67	67	67	67	67	67	67
68	68	68	68	68	68	68
69	69	69	69	69	69	69
70	70	70	70	70	70	70
71	71	71	71	71	71	71
72	72	72	72	72	72	72
73	73	73	73	73	73	73
74	74	74	74	74	74	74
75	75	75	75	75	75	75
76	76	76	76	76	76	76
77	77	77	77	77	77	77
78	78	78	78	78	78	78
79	79	79	79	79	79	79
80	80	80	80	80	80	80
81	81	81	81	81	81	81
82	82	82	82	82	82	82
83	83	83	83	83	83	83
84	84	84	84	84	84	84
85	85	85	85	85	85	85
86	86	86	86	86	86	86
87	87	87	87	87	87	87
88	88	88	88	88	88	88
89	89	89	89	89	89	89
90	90	90	90	90	90	90
91	91	91	91	91	91	91
92	92	92	92	92	92	92
93	93	93	93	93	93	93
94	94	94	94	94	94	94
95	95	95	95	95	95	95
96	96	96	96	96	96	96
97	97	97	97	97	97	97
98	98	98	98	98	98	98
99	99	99	99	99	99	99
100	100	100	100	100	100	100

1. 抗菌性飼料添加物の MIC 値は、
 2. 抗菌性飼料添加物の MIC 値は、
 3. 抗菌性飼料添加物の MIC 値は、
 4. 抗菌性飼料添加物の MIC 値は、

3-2-2 *in vivo*試験 (鶏)

鶏 (白色レグホン系、雌、1日齢) を3週間予備飼育し (安定した採糞のため採卵鶏を使用)、1群10羽使用した。前項3-2-1で感受性が認められた鶏用抗菌性飼料添加物6系統13種類のうち、各系統から代表的な抗菌性飼料添加物 (6系統7種類) を選定した。*B. subtilis* JA-ZK株を 10^6 個/gで添加した飼料を7日間給与した。糞便中の*B. subtilis* JA-ZK株菌数を測定し、菌数が一定であることを確認した後、*B. subtilis* JA-ZK株添加飼料に各鶏用抗菌性飼料添加物を最高用量で添加して7日間給与した。

飼料中の*B. subtilis* JA-ZK株菌数は $10^{5.8}$ 個/gであった。糞便中の*B. subtilis* JA-ZK株菌数には、併用給与開始後も減少傾向は見られず、これら抗菌性飼料添加物との併用が可能であることが確認された。[参照4]

3-2-3 *in vivo*試験 (豚)

豚 (LWD、雄、4週齢、平均体重6.9kg) を1週間予備飼育し、1群5頭使用した。前々項3-2-1で感受性が認められた豚用抗菌性飼料添加物5系統8種類のうち、各系統から代表的な抗菌性飼料添加物 (5系統5種類) を選定した。*B. subtilis* JA-ZK株を 10^6 個/gで添加した飼料を7日間給与した。糞便中の*B. subtilis* JA-ZK株菌数を測定し、菌数が一定であることを確認した後、*B. subtilis* JA-ZK株添加飼料に各豚用抗菌性飼料添加物を最高用量で添加して7日間給与した。

飼料中の*B. subtilis* JA-ZK株菌数は $10^{6.2}$ 個/gであった。糞便中の*B. subtilis* JA-ZK株菌数には、併用給与開始後も減少傾向は見られず、これら抗菌性飼料添加物との併用が可能であることが確認された。[参照5]

3-3 効果を裏付ける野外応用による試験

3-3-1 鶏

鶏 (チャンキー、1日齢、平均体重41g) を3試験場でそれぞれ1群雌雄50羽、雄100羽、雄30羽を用い、*B. subtilis* JA-ZK株を0 (対照群) 及び 10^6 個/gで基礎飼料に添加し、6週間給与した (5反復)。

各試験で、熱中症及び脚弱による衰弱・死亡が見られたが、生存率は対照群と添加群で同等であった。3試験場の結果を統合したところ、添加群において増体量は有意に増加し、飼料要求率は有意に低下した ($p<0.01$)。飼料摂取量に関しては、有意な差は見られなかった (表4参照)。[参照6]

表 4 鶏用飼料に添加したときの効果

	対照群	JA-ZK 株添加群 (10 ⁶ 個/g)
試験動物数 (羽)	900	900
増体量 (g/羽)	2,403	2,497**
飼料摂取量 (g/羽)	4,512	4,526
飼料要求率	1.89	1.82**

増体量、飼料摂取量及び飼料要求率の値は平均値

対照群との比較で有意な差あり (** : p<0.01)

3-3-2 豚

離乳後の豚 (LWD、去勢雄・雌、平均体重 6.1~8.8kg) を 3 試験場でそれぞれ 1 群 4 頭用い、*B. subtilis* JA-ZK 株を 0 (対照群) 及び 10⁶ 個/g で基礎飼料に添加し、6 週間給与した (5 反復)。

対照群で 1 頭死亡が見られたが、病理学的検査の結果、胸膜性肺炎によるものであり、添加群には死亡例はなかった。その他、生育上に異常は見られなかった。3 試験場の結果を統合したところ、添加群において増体量は有意に増加し (p<0.05)、飼料要求率は有意に低下した (p<0.05)。飼料摂取量に関しては、有意な差は見られなかった (表 5 参照)。^{〔参照 7〕}

表 5 豚用飼料に添加したときの効果

	対照群	JA-ZK 株添加群 (10 ⁶ 個/g)
試験動物数 (頭)	60	60
増体量 (kg/頭)	20.2	23.0*
飼料摂取量 (kg/頭)	39.7	41.1
飼料要求率	1.94	1.78*

増体量、飼料摂取量及び飼料要求率の値は平均値

対照群との比較で有意な差あり (* : p<0.05)

4 安全性に関する事項

4-1 一般毒性試験

4-1-1 単回投与毒性試験

SPF ラット (SD 系、4 週齢) を 1 週間予備飼育した後、*B. subtilis* JA-ZK 株の製剤を精製水に懸濁し、10mL/kgBW でゾンデにより 0 (対照群)、10^{9.3}、10^{10.3}、10^{11.3} 個/kgBW で単回経口投与し、14 日間飼育した (1 群雌雄各 5 匹)。

死亡は見られず、一般状態、体重及び剖検しての肉眼的観察において異常は認められなかった。LD50 は求めることができず、最大無作用量は雌雄とも 10^{11.3} 個/kgBW を超える値であった。^{〔参照 8〕}

4-1-2 反復投与毒性試験（短期）

SPF ラット（SD 系、雌雄、4 週齢）を 1 週間予備飼育した後、*B. subtilis* JA-ZK 株を 0（対照群）、 $10^{6.8}$ 、 $10^{7.8}$ 、 $10^{8.8}$ 個/g（飼料中濃度はそれぞれ 0、0.05、0.5、5%）で基礎飼料に添加し、13 週間給与した（1 群雌雄各 10 匹）。

死亡は見られず、一般状態に *B. subtilis* JA-ZK 株に起因する異常は認められなかった。また、対照群と投与群で増体量及び飼料効率に有意な差は見られなかった。尿検査及び血液学的検査においては、いずれの群にも異常は認められなかった。血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査においては、群間での有意な差が見られる項目があったが、いずれも用量相関性はなかった。〔参照 9〕

4-2 生体内動態に関する試験

4-2-1 鶏

鶏（白色レグホン、1 日齢）を 2 週間予備飼育した後、10 羽使用した。*B. subtilis* JA-ZK 株を 10^6 個/g で基礎飼料に添加し、7 日間給与した。7 日間経過後、基礎飼料に戻しさらに 7 日間飼養した。

試験飼料中の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数は、 $10^{5.8}$ 個/g であった。糞便中の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数は、*B. subtilis* JA-ZK 株給与前は検出限界未満であった。給与開始後 1 日目には、糞便中の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数は飼料中と同程度に達し、給与期間中の菌数は安定していた。また、給与中止後 1 日目には、糞便中の菌数は検出限界未満であった。試験終了時に全羽解剖し、消化管内容物の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数を検査したところ、検出限界未満であり、全ての器官において、*B. subtilis* JA-ZK 株は陰性であった。以上の結果から、*B. subtilis* JA-ZK 株は鶏の消化管内へ定着しないことが考えられ、また器官に侵入しないことを確認した。〔参照 10〕

4-2-2 豚

豚（LWD、4 週齢）を 1 週間予備飼育した後、5 頭使用した。*B. subtilis* JA-ZK 株を 10^6 個/g で基礎飼料に添加し、14 日間給与した。14 日間経過後、基礎飼料に戻しさらに 7 日間飼養した。

試験飼料中の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数は、 $10^{6.5}$ 個/g であった。糞便中の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数は、*B. subtilis* JA-ZK 株給与前は検出限界未満であった。給与開始後 1 日目には、糞便中の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数は飼料中と同程度に達した。また、給与中止後 1 日目には、1/10 まで減少し、7 日目には検出限界未満となった。試験終了時に全頭解剖し、消化管内容物の *B. subtilis* JA-ZK 株菌数を検査したところ、検出限界未満であり、全ての器官において、*B. subtilis* JA-ZK 株は陰性であった。以上の結果から、*B. subtilis* JA-ZK 株は豚の消化管内へ定着しないことが考えられ、また器官に侵入しないことを確認した。〔参照 11〕

4-3 対象家畜等を用いた飼養試験

4-3-1 鶏

鶏（チャンキー、雌雄、初日齢）に、*B. subtilis* JA-ZK 株を 0（対照群）、 $10^{6.1}$ （常用量群）、 $10^{8.1}$ （100 倍量群）個/g で標準飼料に添加し、8 週間給与した（1 群雌雄各 15 羽）。

各群とも、試験期間中に死亡例はなく、一般性状（食欲等）に異常は認められなかった。血液学的検査及び血液生化学的検査の各項目について、各群間で有意な差は認められなかった。また、病理学検査において、各群とも剖検所見に異常は認められず、器官重量（体重比）についても各群間で有意な差は認められなかった。

以上のことから、本試験において、*B. subtilis* JA-ZK 株に起因する異常は認められなかった。〔参照 12〕

4-3-2 豚

豚（LWD 系、去勢雄、3 週齢）に、*B. subtilis* JA-ZK 株を 0（対照群）、 $10^{6.1}$ （常用量群）、 $10^{8.1}$ （100 倍量群）個/g で成長段階に応じた標準飼料に添加して、21 週間給与した（1 群 6 頭）。飼料の切り替えは、約 3 日かけて行った。

各群とも、試験期間中に死亡例はなく、一般性状（食欲等）に異常は認められなかった。血液学的検査及び血液生化学的検査の各項目について、各群間で有意な差は認められなかった。また、病理学検査において、各群とも剖検所見に異常は認められず、器官重量（体重比）についても各群間で有意な差は認められなかった。

以上のことから、本試験において *B. subtilis* JA-ZK 株に起因する異常は認められなかった。〔参照 13〕

5 耐性菌出現に関する試験

5-1 動物用抗生物質（動物用医薬品）に対する薬剤感受性試験

ヒト用抗生物質と同系統の動物用抗生物質 11 種類（アンピシリン、セファゾリン、シプロフロキサシン、エリスロマイシン、バンコマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、クリンダマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール）に対する、*B. subtilis* JA-ZK 株の MIC を測定した。試験は CLSI の寒天平板希釈法に準じて行った。発育が完全に阻止及び発育が 1 集落以下の場合、発育阻止とみなした。供試薬剤はミューラーヒントン寒天培地で希釈した。各薬剤濃度の寒天培地に *B. subtilis* JA-ZK 株の菌液を接種して培養した。*B. subtilis* JA-ZK 株の MIC が、CLSI の判断基準における「耐性」の濃度以上を示した場合に耐性菌と判断した。また、CLSI の耐性基準が定められていないものについては、EFSA の Cut-off 値を採用した。

B. subtilis JA-ZK 株は、11 種類の動物用抗生物質全てに対して感受性を示した（表 6 参照）。

6 自然環境に及ぼす影響に関する試験

国内各地から採取した土壌 45 点から菌を分離、同定し、*Bacillus* 属および *B. subtilis* の分布状況を評価した。その結果、42 点の土壌から *Bacillus* 属菌が分離され、15 点では、*B. subtilis* が優性菌種であった。〔参照 23〕

7 審議結果

バチルス サブチルス JA-ZK 株（企業推奨量：鶏及び豚 $10^5 \sim 10^7$ 個/g）の効果安全性について審議した。

「飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進」による増体を本剤の効果とし、給与対象は鶏及び豚で、飼料へ添加することが適当であると判断された。

- ①本剤の効果：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進
- ②給与対象：鶏及び豚

8 参照（参考資料及び参考文献）

1. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 効果を裏付ける基礎的試験 in vitro 試験（科学飼料研究所）
2. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 効果を裏付ける基礎的試験 in vivo 試験（科学飼料研究所）
3. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 抗菌性飼料添加物との併用による影響に関する試験 in vitro 試験（科学飼料研究所）
4. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 抗菌性飼料添加物との併用による影響に関する試験 鶏における in vivo 試験（科学飼料研究所）
5. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 抗菌性飼料添加物との併用による影響に関する試験 豚における in vivo 試験（科学飼料研究所）
6. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 効果を裏付ける野外応用による試験 鶏における試験（科学飼料研究所）
7. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 効果を裏付ける野外応用による試験 豚における試験（科学飼料研究所）
8. 生菌剤 *Bacillus subtilis* JA-ZK 株のラットを用いる経口投与による単回投与毒性試験（畜産生物科学安全研究所）（2005）
9. 生菌剤 *Bacillus subtilis* JA-ZK 株のラットを用いる 3 か月間混餌投与による反復投与試験（畜産生物科学安全研究所）（2006）
10. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 生体内動態に関する試験 鶏における試験（科学飼料研究所）
11. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 生体内動態に関する試験 鶏における試験（科学飼料研究所）

12. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 耐性菌出現に関する試験 (科学飼料研究所)
13. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株生菌剤のブロイラーにおける飼養試験 (畜産生物科学安全研究所) (2006)
14. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株生菌剤の豚における飼養試験 (畜産生物科学安全研究所) (2008)
15. CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline-Second Edition. M45-A2, Vol. 30 No.18, Replace M45-A, Vol.26 No.19.
16. EFSA. Guidance on the assessment of bacterial antimicrobial susceptibility. EFSA Journal 2012;10(6):2740
17. Adimpong DB, et al. 2012. Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis. Appl Environ Microbiol. 78:7903-14
18. 動物用医薬品・飼料添加物評価書「セデカマイシン」、2010年6月、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会
19. 飼料添加物評価書「エフロトマイシン」、2010年4月、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会
20. 動物用医薬品・飼料添加物評価書「ビコザマイシン」、2013年3月、食品安全委員会肥料・飼料等専門調査会
21. 堀江 正一ら、食肉中に残留する抗菌性物質の微生物学的簡易検査法、2008年1月、食衛誌、Vol. 49、No.3
22. Paolo Landini, et al. 1992. Sensitivity of elongation factor Tu (EF-Tu) from different bacterial species to the antibiotics efrotomycin, pulvomycin and MDL 62879. J Gen Microbiol. 139(4):769-74.
23. *Bacillus subtilis* JA-ZK 株 自然環境に及ぼす影響に関する試験 (科学飼料研究所)

飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和五十一年農林省令第三十五号）の改正案
別表第2の8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

バチルス サブチルス（その5）

ア 製造用原体

(7) 成分規格

本品は、*Bacillus subtilis* JA-ZK 株を増殖させ、凍結乾燥又は凍結した製造用種菌である。

由来 原株は、2000年に土壌から分離された *Bacillus subtilis* JA-ZK 株である。

物理的・化学的性質 バチルス サブチルス（その1）製造用原体の物理的・化学的性質と同じ。

確認試験 バチルス サブチルス（その1）製造用原体の確認試験を準用する。

(イ) 保存の方法及び継代の基準

原株は、酵母エキス、デンプン等を含む培地で継代し、凍結乾燥後2～8℃又は凍結後－70℃以下で保存する。本品は、原株を同培地で増殖して小分けし、凍結乾燥又は凍結保存する。原株の継代は10代以内とし、本品は継代してはならない。

イ 製剤

(7) 成分規格

本品は、バチルス サブチルス（その5）製造用原体を培養した後、菌体を集め、デンプンを加え、乾燥し、賦形物質を混和した粉末である。

含量 本品は、定量するとき、1g中、表示量の 10^{-1} ～ 10^2 倍個の生菌を含む。

確認試験 バチルス サブチルス（その1）製剤の確認試験を準用する。

定量法

試料溶液の調製 希釈液として1号希釈液を用い、生菌剤定量法における試料溶液の調製に準じて1mL中に生菌を300～3,000個含む濃度に試料溶液を調製する。ただし、試料原液は、75℃の水浴中で20分間加熱して調製したものを、冷却して用いる。

操作法 試験用寒天培地として馬脱繊維血液を加えない9号培地を用い、生菌剤定量法第2法により操作し、28～30℃で1～2日間培養する。

(イ) 製造の方法の基準

バチルス サブチルス（その5）製造用原体を培養した後、菌体を集め、デンプンを加え、乾燥し、賦形物質を混和して製造すること。

(ウ) 保存の方法の基準

密閉容器に保存すること。

バチルス サブチルス（その１）の規格・基準

8 各飼料添加物の成分規格及び製造の方法等の基準

(147) バチルス サブチルス

バチルスサブチルス（その１）

ア 製造用原体

(7) 成分規格

本品は、*Bacillus subtilis* BN株を増殖させ、凍結した製造用種菌である。

由来 原株は、1928年に納豆から分離された*Bacillus subtilis* BN株である。

物理的・化学的性質 本品は、グラム陽性桿菌で、芽胞を形成し、嫌気条件下で発育しない。

確認試験

- ① 4号培地に本品を塗布し、36～38℃で1～2日間培養する。スライドグラス上に1白金耳量の水をとり、これに白金線を用いて培地に生じた集落をとり、かき混ぜて懸濁し、適当な大きさに広げ、室温又は遠火で乾燥する。次に、2～3回火炎の中を通過させて固定したものを試料とする。この試料につき、グラム染色法により試験を行うとき、青紫色～黒紫色に染まった桿菌を認める。
- ② 4号培地に本品を塗布し、36～38℃で3～7日間培養する。スライドグラス上に1白金耳量の水をとり、これに白金線を用いて培地に生じた集落をとり、かき混ぜて懸濁し、適当な大きさに広げ、室温又は遠火で乾燥する。次に、2～3回火炎の中を通過させて固定したものを試料とする。この試料につき、芽胞染色法により試験を行うとき、淡緑色～緑色に染まった芽胞を認める。
- ③ 4号培地に本品を塗布し、36～38℃で1～2日間培養する。培地に生じた集落をとり、7号培地10mLに接種し、36～38℃で2～3日間嫌氣的に培養するとき、菌の発育を認めない。

(4) 保存の方法及び継代の基準

原株は、加熱処理を施した麴及び大豆粉、ゼラチン等を含む培地で継代し、－80℃で凍結保存する。本品は、原株を同培地で増殖して小分けし、－80℃で凍結保存する。原株の継代は10代以内とし、本品は継代してはならない。

イ 製 剤

(7) 成分規格

本品は、バチルス サブチルス（その１）製造用原体を培養した後、菌体を集め、乾燥し、賦形物質を混和した粉末である。

含量 本品は、定量するとき、1g中、表示量の 10^{-1} ～ 10^2 倍個の生菌を含む。

確認試験

- ① スライドグラス上に1白金耳量の水をとり、これに白金線を用いて定量法により操作して得られた集落をとり、かき混ぜて懸濁し、適当な大きさに広げ、室温又は遠火で乾燥する。次に、2～3回火炎の中を通過させて固定したものを試料とする。この試料につき、グラム染色法により試験を行うとき、青紫色～黒紫色に染まった桿菌を認める。
- ② スライドグラス上に1白金耳量の水をとり、これに白金線を用いて定量法により調製した試料原液をとり、かき混ぜて懸濁し、適当な大きさに広げ、室温又は遠火で乾燥する。次に、2～3回火炎の中を通過させて固定したものを試料とする。この試料につき、芽胞染色法により試験を行うとき、淡緑色～緑色に染まった芽胞を認める。
- ③ 定量法により操作して得られた集落をとり、7号培地10mLに接種し、36～38℃で2～3日間嫌氣的

に培養するとき、菌の発育を認めない。

定量法

試料溶液の調製 希釈液として1号希釈液を用い、生菌剤定量法における試料溶液の調製に準じて1 mL中に生菌を30～300個含む濃度に試料溶液を調製する。必要ならば、試料溶液は、75℃の水浴中で、20分間加熱した後、流水で急冷したものを用いる。

操作法 試験用寒天培地として4号培地を用い、生菌剤定量法第1法により操作し、1～2日間培養する。

(イ) 製造の方法の基準

バチルス サブチルス (その1) 製造用原体を培養した後、菌体を集め、乾燥し、賦形物質を混和して製造すること。

(ウ) 保存の方法の基準

密閉容器に保存すること。

バチルス サブチルスの試験法

6 飼料添加物一般の試験法

(18) 生菌剤試験法

生菌剤試験法は、微生物学的方法又は化学的方法により試料中の生菌の同定を行う試験法である。この試験に使用する水、試薬・試液及び計量器・用器は、必要に応じ無菌のものを用いる。

培地の種類並びにその組成及びpH

別に規定する場合を除き、次の表に掲げる組成及びpHを有するものを使用する。ただし、培地の成分として単に「ペプトン」と記載してある場合は、カゼイン製ペプトンを用いても差し支えない。培地のpHの調整は、1 mol/L水酸化ナトリウム試液又は1 mol/L塩酸試液を用い、滅菌後のpHが所定のものとなるようにする。

培地の組成及びpH

培 地 番 号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
培地 1,000mL の組成	カゼイン製ペプトン (g)	5	20	20	10	5	17		10	15	
	プロテオーゼペプトン (g)	10							10		
	大豆ペプトン (g)	3					3		3	5	
	ペプトン (g)							10			
	肉エキスを (g)	2.4	10	10	5			5	2.2		
	塩化ナトリウム (g)	0.01	1.5	1.5	5	0.01	5		3	5	5
	酵母エキスを (g)	5	2.2	2.2		5			5		
	肝臓エキスを (g)	3.2							1.2		
	ブドウ糖 (g)	10				2	2.5	10			
	乳糖 (g)		20	20							
	ポリソルベート80 (mL)	1	1						1		
	可溶性デンプン (g)	0.5									
	リン酸二水素カリウム (g)	1				0.5			2.5		
	リン酸一水素カリウム (g)	1				0.5	2.5				
	硫酸マグネシウム (g)	0.2				0.3					
	硫酸第一鉄 (g)	0.01				0.01					
	硫酸マンガン (g)	0.007				0.01					
	硫酸亜鉛 (g)					0.001					
	硫酸コバルト (g)					0.001					
	硫酸銅 (g)					0.001					
	L-システイン塩酸塩一水和物 (g)	0.5							0.3		
	シリコーン (g)	0.2									
	消化血清 (g)								13.5		
	チオグリコール酸ナトリウム (g)								0.3		
	牛心臓抽出液 (g)										500
	トリプトース (g)										10
	ブロムクレゾールパープル試液 (mL)										1
	カンテン (g)	15		15	15	15	20			15	
	水	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量	適量
	滅菌後のpH	7.1～7.3	6.9～7.1	6.9～7.1	6.9～7.1	5.9～6.1	7.2～7.4	6.4～7.0	7.2～7.4	7.2～7.4	7.3～7.5

注1) 1号培地及び9号培地は滅菌後、100mLに対して馬脱繊維血液5mLを加えたものを使用する。

2) 5号培地のpH調整は、1 mol/L水酸化ナトリウム試液又は希硫酸を用いる。

① 染色法

染色法は、生菌を適当な染色液を用いて染色し、生菌の物理的・化学的性質、形状及び芽胞の有無を判定する試験法である。

(i) グラム染色法 次の2つの方法のいずれか適当な方法を用いる。

ア HUCKERの変法

スライドガラス上に塗抹し、固定した試料にフッカーの染色液2滴を加え、30～60秒間放置して染色した後、スライドガラスを軽く振って液をきる。次に、ルゴール液を十分に加え、60秒間放置した後、水洗し、ろ紙で水を吸収する。スライドガラスを軽く動かしながら、脱色液として無水エタノール又はエタノール・アセトン混液(7:3)を用いて洗液がほぼ無色になるまで脱色する。その後、水洗し、ろ紙で水を吸収する。これにサフラニン溶液(1→200)2滴を加え、60秒間放置し、後染色(対比染色)した後、水洗し、乾燥する。

イ Lillieの変法

スライドガラス上に塗抹し、固定した試料にリリーの染色液2滴を加え、30秒間放置して染色した後、スライドガラスを軽く振って液をきる。次に、ヨウ素・ルゴール試液で数回洗った後、ヨウ素・ルゴール試液3滴を加え、30秒間放置する。ヨウ素・アセトン試液で十分に洗い流した後、ヨウ素・アセトン試液3滴を加え、30秒間放置する。その後、水洗し、ろ紙で水を吸収する。これに弱石炭酸フクシン液2滴を加え、30秒間放置し、後染色(対比染色)した後、水洗し、乾燥する。

(ii) 芽胞染色法 WIRTZの法(SCHAEFFER-FULTONの変法)

スライドガラス上に塗抹し、固定した試料にマラカイトグリーン溶液(1→20)で1～3分間、加温又は加熱して染色した後、約30秒間水洗し、乾燥する。乾燥した塗抹面にサフラニン溶液(1→200)1～3滴を加え15～30秒間染色した後、水洗し、乾燥する。

② 糖分解能力試験法 (略)

③ 乳酸生成能力試験法 (略)

④ 酪酸生成能力試験法 (略)

(19) 生菌剤定量法

生菌剤定量法は、微生物学的方法により試料中の生菌の菌数の測定を行う試験法である。この試験に使用する水、試薬・試液及び計量器・用器は、必要に応じ無菌のものを用いる。

希釈液

希釈液は、次に掲げる組成及びpHを有するものを滅菌して使用する。

1号希釈液(pH7.0)

カゼイン製ペプトン1g(0.5～1.4g)及び塩化ナトリウム5g(4.5～5.4g)に水約750mLを加えて溶かし、pHを6.9～7.1に調整した後、更に水を加えて1,000mLとする。

2号希釈液(pH7.0)

リン酸二水素カリウム4.5g(4.45～4.54g)、リン酸一水素ナトリウム12水塩6g(5.5～6.4g)、ポリソルベート80 0.5g(0.45～0.54g)、L-システイン塩酸塩一水和物0.5g(0.45～0.54g)及びカンテン0.5g(0.45～0.54g)に水約750mLを加えて溶かし、pHを6.9～7.1に調整した後、更に水を加えて1,000mLとする。

培地の種類並びにその組成及びpH

(18)の生菌剤試験法の項を準用する。

試料溶液の調製

別に規定する場合を除き、次の方法によるものとする。

本品約 1g を 0.001g の桁まで量り、その数値を記録し、全量ピペットを用いて希釈液 50mL を加え、よく振り混ぜ、試料原液とする。この原液 1 mL を全量ピペットを用いて量り、別に、全量ピペットを用いて量った希釈液 9 mL に加え、10 倍に希釈する。この操作を繰り返し、1 mL 中に生菌を 30～300 個を含む濃度又は 300～3,000 個含む濃度に調製し、試料溶液とする。なお、必要に応じて希釈時に界面活性剤を用いる。

操作法

試料溶液が 1 mL 中に生菌を 30～300 個含む濃度の場合は、第 1 法を、1 mL 中に生菌を 300～3,000 個含む濃度の場合は、第 2 法を用いる。

① 第 1 法

試料溶液 1 mL ずつを 5 枚のペトリ皿に入れ、これに 50℃ に保った試験用寒天培地を 20 mL ずつ加え、30 秒以内に混和し、固化させる。必要ならば、ペトリ皿の底に試験用寒天培地で基層を作り、上記操作を行った後、更に試験用寒天培地を加えて重層とする。これを 36～38℃ で各条に規定する期間培養して出現した集落を数え、平均集落数を求める。

$$\text{試料 1 g 中の生菌数} = \frac{\text{平均集落数} \times \text{希釈倍率} \times 50}{\text{試料採取量 (g)}}$$

希釈倍率：10 倍希釈法による希釈倍数

② 第 2 法

あらかじめ試験用寒天培地を 20 mL ずつ加え、固化させた 5 枚のペトリ皿に、試料溶液 0.1 mL ずつを入れて塗布する。これを各条に規定する温度で各条に規定する期間培養し、出現した集落数を数え、平均集落数を求める。

$$\text{試料 1 g 中の生菌数} = \frac{\text{平均集落数} \times \text{希釈倍率} \times 500}{\text{試料採取量 (g)}}$$

希釈倍率：10 倍希釈法による希釈倍数