

ミルクテスト陰性を示したアメリカ腐蛆病

県中央家畜保健衛生所

小菅 千恵子 前田 卓也

はじめに

腐蛆病は蜜蜂の蜂児が感染する伝染性の細菌性疾病で、家畜伝染病予防法により家畜伝染病に指定されている。病原体は2種類あり、芽胞を形成する *Paenibacillus larvae* (以下、*P. larvae*) によるアメリカ腐蛆病と、*Melisococcus plutonius*によるヨーロッパ腐蛆病がある。腐蛆病の検査・診断は、病性鑑定指針¹⁾に基づき行っている。臨床検査で特徴的な所見により腐蛆病が疑われた場合、蜂場でも実施可能な検査法であるミルクテストを初期診断として行い、陽性ではアメリカ腐蛆病を、陰性ではヨーロッパ腐蛆病を疑い、各々に適した選択培地を用いた細菌分離を行う検査チャートが示されている。確定診断は、分離菌を用いた性状検査によるが、日数がかかるため、菌の同定に利用できるとされているPCR検査により、当所では早期に診断している(図1)。

【病性鑑定指針に基づき検査・診断】

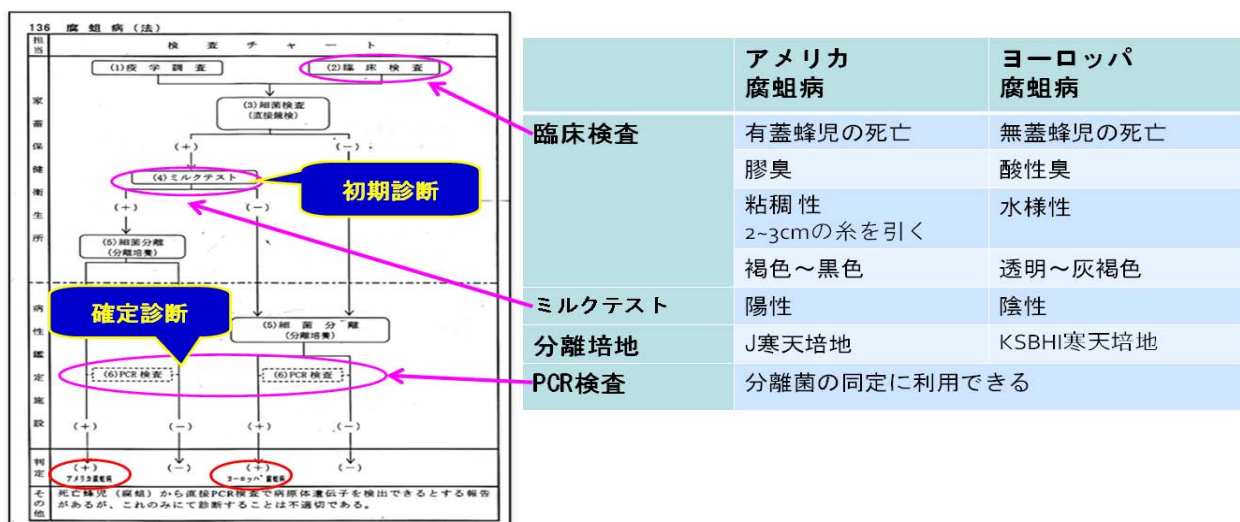


図1 腐蛆病の検査法

今回、県内で初めて、腐蛆を用いたミルクテストでは陰性であったが分離菌のPCR検査で*P. larvae*特異遺伝子を確認しアメリカ腐蛆病と診断した症例に遭遇した。そこで、今後の腐蛆病診断に向け、初期診断に用いているミルクテスト及び確定診断に用いているPCR検査の有用性について検討し、併せて、本県周辺の1都7県で腐蛆病の確定診断時に用いている検査法などについて調査を行った。

症例概要

平成24年10月、4群を飼養している1蜂場より、蜂児の異常がみられるとの連絡を受け、検診を実施した。2群において、産卵圏の乱れ、酸性臭、有蓋・無蓋蜂児の死亡、白色から褐色の死蛆を認めた。2群ともに、蜂場及び検査室で実施したミルクテストは陰性であり、臨床所見とミルクテストの結果から、ヨーロッパ腐蛆病が疑われたが、J寒天培地上の分離菌についてPCR検査を実施したところ、*P. larvae*特異遺伝子を確認され、アメリカ腐蛆病と診断した。

材料と方法

1 検査材料

検査材料は本症例からの分離菌2株：菌株No.1～2（各群1株）と、比較のため、他県で分離されたミルクテスト陰性検体からの分離菌2株：菌株No.3～4（2007年、2009年分離の各1株）、県内で分離されたミルクテスト陽性検体からの分離菌2株：菌株No.5～6（2001年分離）の、いずれもアメリカ腐蛆病と診断した症例からの分離菌6株を用いた。

2 検査方法

(1) ミルクテストの有用性について

ミルクテストは*P. larvae*の出す蛋白分解酵素を利用した検査であることから（図2）、蛋白分解酵素の有無をみる3種類（①通常実施している範囲での各条件を組み合わせたミルクテスト、②ゼラチンテスト、③カゼインテスト）の検査を実施した（図3）。

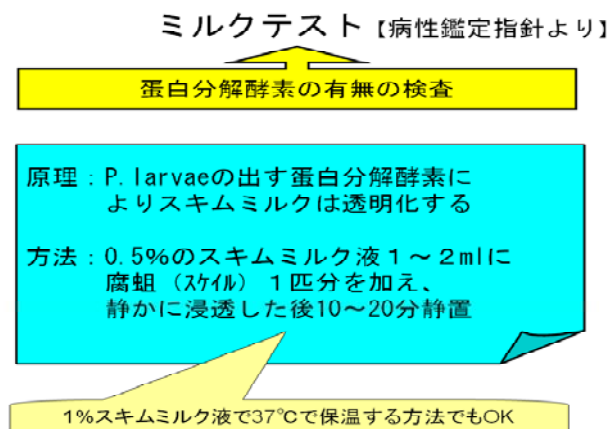


図2 ミルクテストの原理と方法

さらに、*P. larvae*は芽胞を形成することから菌相の違いによる反応をみるため一部条件を追加し、供試する際の菌株の培養日数を1日又は5日とした。併せて反応時間をOvernightに変更し追加検査を行った。

(2) PCR検査の有用性について

*P. larvae*の16SrRNAを標的としたプライマーを用い、既報に基づき*P. larvae*の

PCR検査^{2) 3)}を実施した。その後、16SrRNA遺伝子の塩基配列を決定し、EzTaxonによる相同性解析を行った。

① ミルクテスト

設定条件		
スキムミルクの材料	培地用	市販用
スキムミルク濃度	0.5%	1.0%
溶解方法	加温 (100°C)	オートクレーブ (115°C)
反応温度	室温 (25°C)	37°C
反応時間	10分	20分

② ゼラチンテスト

ニュートリエントゼラチン平板培地
22°C 14日培養

③ カゼインテスト【01E7-17#記載】

37°C 5日培養

ゼラチン
動物のコラーゲン由来の蛋白質

カゼイン
牛乳由来の蛋白質

図3 蛋白分解酵素をみる検査法

3 調査方法

アンケート形式により、本県周辺の1都7県（東京都、茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、山梨県、静岡県）の家畜保健衛生所及び家畜衛生研究所に依頼し、3項目（①ミルクテスト陰性でアメリカ腐蛆病と診断した症例の有無、②ミルクテストの実施方法：スキムミルクの濃度・溶解方法、反応温度、反応時間など、③腐蛆病と確定診断する検査法）について調査を行った。

成 績

1 検査成績

(1) ミルクテストの有用性について

各菌株を用いて実施したところ、供試6株はすべて透明化を認めず、陰性であった（表1）。

表1 菌を用いたミルクテストの検査成績

スキムミルク	設定条件																									
	培地用												市販用													
	0.5%						1.0%						0.5%						1.0%							
濃度	0.5%						1.0%						0.5%						1.0%							
溶解	加温			オートクレーブ			加温			オートクレーブ			加温			オートクレーブ			加温			オートクレーブ				
温度	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C	室温	37°C
時間	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分	10分	20分
結果	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

条件を一部変更し、各菌株ごとに、芽胞を認めない植物型（培養1日）と芽胞を多数認める芽胞型（培養5日）を用い（写真1）、反応時間overnightで検査した結果、いずれも培養1日の菌株を用いた検体は透明となり陽性と判断、培養5日の検体は透明化を認めず陰性と判断した。

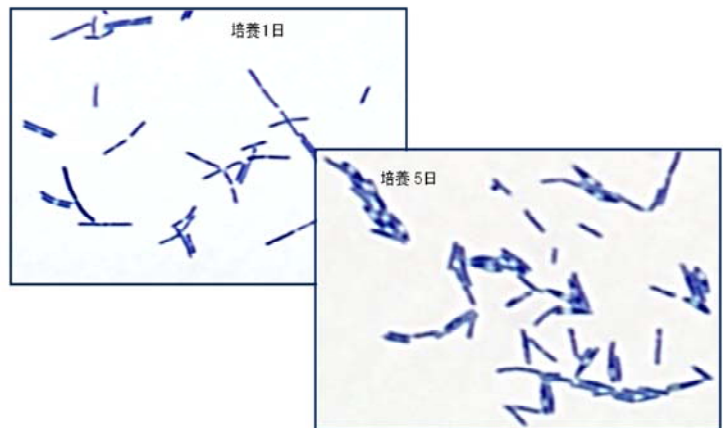
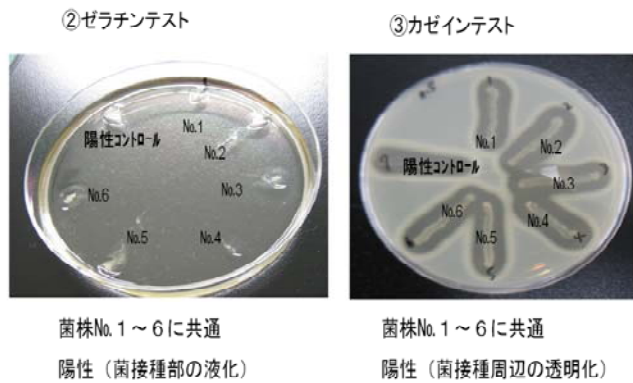


写真1 *P. larvae*の菌相

ゼラチンテスト及びカゼインテストは、供試6株すべてで陽性であった（写真2）。

(2) PCR検査の有用性について

本症例2株を含む6株すべてで973bpに*P. larvae*特異遺伝子を確認した（写真3）。その後、本症例2株について、16SrRNA遺伝子の部分塩基配列（1,510bp）を決定し、株間での相同性を調べた結果、互いに100%一致した。さらに、EzTaxonを用いて各菌種の基準株との遺伝子配列を比較した結果、*P. larvae*の基準株の配列と最も高い相同性（99.933%）を示した。



菌株No.1～6に共通
陽性（菌接種部の液化）

菌株No.1～6に共通
陽性（菌接種周辺の透明化）

写真2 ゼラチン・カゼインテスト

2 調査成績

1都7県（計8か所）での調査から、ミルクテスト陰性でアメリカ腐蛆病と診断した症例が2か所であった。ミルクテストの実施方法は、スキムミルク濃度は0.5%、反応温度は室温、反応時間は20分、またスキムミルクは加温して作成するという方法が多く実施されており、ほぼ病性鑑定指針に準じていた。

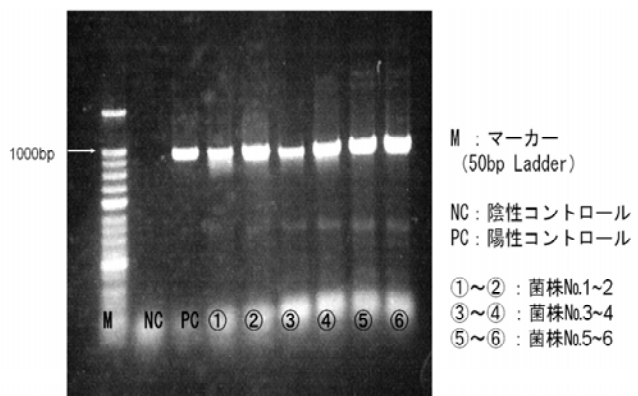
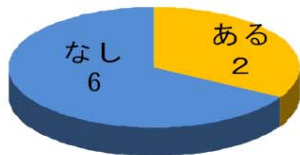


写真3 PCR検査成績

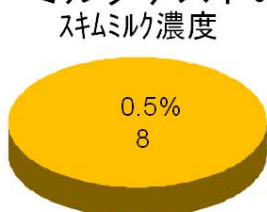
確定診断は、PCR検査による診断をするところが5か所、直接鏡検とミルクテストで診断するところが2か所、性状検査まで実施するが参考にPCR検査を実施するところが1か所という結果であった(図4)。

1. ミルクテスト陰性でアメリカ腐蛆病と診断した症例の有無



1都7県調査より
n:都県の数

2. ミルクテストの検査法



3. 確定診断の検査法



図4 各都県調査まとめ (腐蛆病査法など)

考 察

ミルクテストは、腐蛆病が疑われた際にアメリカ腐蛆病とヨーロッパ腐蛆病を分ける重要な検査に位置づけられ、本県でも腐蛆病検査時にはスキムミルク液を常備し、蜂場で実施している。今回、県内で初めて、臨床所見とミルクテスト陰性から当初ヨーロッパ腐蛆病を疑ったが最終的にアメリカ腐蛆病と診断した症例に遭遇し、確定診断の際に、ミルクテストの有用性に疑問を感じた。ミルクテストは*P. larvae*の強い蛋白分解酵素を利用した検査であるため、ミルクテスト陽性を示した腐蛆からの分離菌では、菌を用いたミルクテストでも陽性を示すものと考えられた。しかし、今回の検査成績からは、菌を用いたミルクテストはすべて陰性であり、ミルクテストの蛋白分解酵素の作用には菌以外にも何らかの要因が関与するのではないかと考えられた。一方、ミルクテスト陰性を示した腐蛆からの分離菌においてもゼラチンテスト及びカゼインテストにより蛋白分解酵素の保有が確認された。蛋白分解酵素は菌が植物型の時に産生されることが知られており⁴⁾、今回の結果からも、ミルクテストの反応時間を長く設定した中ではあるが、植物型及び芽胞型⁵⁾という菌相の違いが蛋白分解酵素の

作用に関与することが観察された。よって、本症例のように腐蛆を用いたミルクテストで陰性が示された要因の一つとして、供試時の菌相の違いによる事が考えられた。さらに、本県以外でもミルクテスト陰性でアメリカ腐蛆病と診断した症例があることも併せ、ミルクテスト陰性だけでは、アメリカ腐蛆病を否定することはできず、診断には注意が必要であると考えられた。

本県で確定診断に用いているPCR検査は、病性鑑定指針に記載されている16SrRNAを標的としたGovanらの方法を用い、分離菌の同定を目的として用いている。今回、供試したすべての株に特異遺伝子が確認され、さらに、16SrRNA遺伝子塩基配列解析によっても*P. larvae*基準株と高い相同性が得られ、PCR検査の有用性が再確認された。

各都県における調査から、確定診断時の検査法に違いがあることがわかった。アメリカ腐蛆病では予防が実施できるようになったものの依然として、毎年、腐蛆病の発生が報告されている。また、本県では趣味的な養蜂が多く、発生時には疾病及び防止策について詳細な説明を実施するものの十分な理解を得るのが難しい事例もある。そのため、否定・肯定を含めた確実な診断法として、安定した確実な結果が得られるPCR検査を今後も活用するべきと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、遺伝子解析の実施並びにご助言をいただいた独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域 高松大輔先生、野外分離株を分与していただいた埼玉県中央家畜保健衛生所、そしてアンケートにご協力いただいた1都7県の家畜保健衛生所及び家畜衛生研究所の職員の皆様に深謝します。

引用文献

- 1) 病性鑑定指針、平成20年6月2日付け20消安第880号農林水産省消費安全局長通知
- 2) Govan, V. A. et al. : Applied and Environmental Microbiology、65、2243-2245 (1999)
- 3) 小林弘明：日獣会誌、58号、461～465 (2005)
- 4) ミツバチの飼養管理とその衛生対策 ―腐蛆病を中心として― 社団法人 日本養蜂はちみつ協会 1992
- 5) みつばちの疾病とその予防衛生対策 社団法人 日本養蜂はちみつ協会 2001