

## 15 ヨーロッパ腐蛆病菌の特性を利用した分離手技の検討

中央家畜保健衛生所

○中井 悠華・石原 径佳

### I はじめに

平成 29 年 5 月、定期検査でヨーロッパ腐蛆病 (European Foulbrood :EFB) を疑う蜂群を確認し、病性鑑定を実施した。しかし、細菌分離培養では二次感染菌である腸球菌が優位に発育したため、EFB 菌は分離されなかった。そこで、検体である腐蛆を用いて塗抹標本を作製し、一定期間乾燥させた後、分離培養を実施する方法<sup>1)</sup>を利用したところ、EFB 菌が純培養状に分離され、当該蜂群を EFB と診断することができた。

本事例を踏まえ、検体の乾燥期間の短縮を目的とした検証試験及び EFB 菌がローヤルゼリーに抵抗性を有する特性<sup>2)</sup>を踏まえた検証試験を実施した。試験結果から、二次感染菌を抑制し、EFB の迅速・的確な診断に有用な知見が得られたため、その概要を報告する。

### II 埼玉県の腐蛆病検査体制

本県では「埼玉県腐蛆病に係る検査等実施指針」(県指針)を策定し、蜜蜂飼育届を提出した全戸を対象として、巣箱の形状が検査可能な限り、家畜伝染病予防法第五条に基づく腐蛆病の定期検査を実施し、衛生管理指導を行っている。県指針における検査の流れを図 1 に示した。家畜防疫員が臨床検査において異常を認めた場合、飼養者に自主的なまん延防止対策を依頼するとともに、補助的検査として、直接塗抹標本の観察やミルクテスト、腐蛆から抽出した DNA を用いた PCR 検査を実施する。さらに、確定検査として細菌分離培養を実施し、原因菌が分離されたものを腐蛆病と確定診断している。

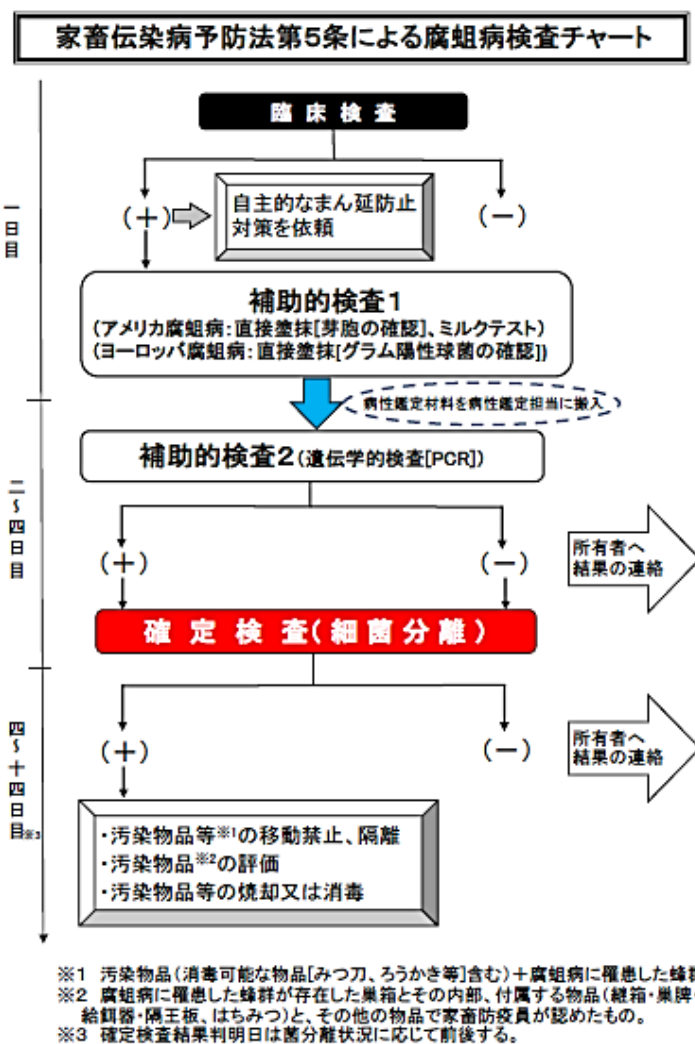


図 1 県指針における腐蛆病検査チャート

### III EFB とは<sup>3)</sup>

EFB はアメリカ腐蛆病とともに腐蛆病として法定伝染病に指定されている。EFB を発症すると、約 4～5 日齢の無蓋蜂児が多数死亡し、乳白色～褐色、水様、時に酸臭を発する腐蛆となる。原因菌である EFB 菌 (*Melissococcus plutonius*) は芽胞非形成のグラム陽性紡錘形球菌である。EFB 菌は従来から一般的に知られている典型株と、培養性状や生化学性状が異なる非典型株が存在することが明らかとなっている。また、菌の遺伝情報を基に分類すると、3つのグループ(クローナルコンプレックス[CC]3、CC12、CC13)に分けることができ、CC3及びCC13は典型株、CC12は非典型株に属する。

EFB は、ミツバチの蜂児の腸管感染症であり、蜂児は EFB 菌に汚染された餌を食べることによって感染する。蜂児の中腸内で EFB 菌が爆発的に増殖し、やがて中腸組織が変性・崩壊し、蜂児が死亡する。また、蜂児の死後に感染した二次感染菌が腐敗に関与しており、この二次感染菌の代表例として、*Enterococcus faecalis* や *Paenibacillus alvei* などが知られている。

#### IV EFB 発生事例

##### 1 発生概要

平成 29 年 5 月 16 日、腐蛆病の定期検査を実施したところ、有蓋蜂児がまばらで、無蓋蜂児の死亡が散見されるセイヨウミツバチの蜂群を 1 群確認した。EFB を疑い、県指針及び病性鑑定指針<sup>4)</sup>に基づき対応した。なお、飼養者は発症群以外にも 1 群飼養しており、同じ飼養場所で他 3 戸の飼養者が蜂群を飼養していたが、これらの群に異常は認められなかった。

##### 2 検査材料

3～5 匹の腐蛆をスピッツ管にプールしたものを検査材料として供試した。

##### 3 補助的検査

検査材料を用いて、塗抹標本を作製し、常法に従いグラム染色を行い、直接鏡検を実施した。また、検査材料からインスタジーンマトリックス (Bio-Rad 社) を用いて DNA を抽出し、典型株と非典型株を識別可能な EFB 菌特異的 DuplexPCR<sup>5)</sup>を行った。

##### 4 細菌分離培養検査

病性鑑定指針には、EFB 菌の分離方法として、「Bailey の培地あるいは KSBHI 培地を用いて、腐蛆から分離培養を行う。35～37℃、5～20%CO<sub>2</sub>条件下で、3～5 日間嫌気培養をする。」と記載がある<sup>4)</sup>。本事例では KSBHI 培地を用いて 37℃ 5 日間嫌気培養を実施した。また、分離菌については、グラム染色による形態観察、EFB 菌特異的 Duplex PCR、簡易同定キットであるアピストレップ 20 (シスメックス・ビオメリュー社) により生化学性状の確認を実施した。

##### 5 各検査結果及び対応

補助的検査の結果、塗抹標本の直接鏡検においてグラム陽性球菌が多数確認され、EFB 菌特異的 Duplex PCR において典型株の特異遺伝子が検出された。以上の結果を現地家保より飼養者へ連絡し、この時点で当該蜂群は自衛処分された。

EFB 菌は KSBHI 培地で嫌気培養した場合、37℃で数日培養後、正円・白色・半透明・表面が滑らかな直径約 1mm のコロニーを形成するが<sup>6)</sup>、本事例における細菌分離培養では、24 時間後に、EFB 菌よりも大きなコロニーが発育した。当該菌はグラム陽性球菌だが、EFB 菌特異的 DuplexPCR で典型・非典型ともに陰性であり、簡易同定キットで *Enterococcus faecalis* (腸球菌の一種) と同定された。この後、培養時間を延長したが、二次感染菌である腸球菌が優位に発育したため、EFB 菌は分離されなかった。

##### 6 分離手技の検討及び結果

OIE マニュアル<sup>1)</sup>に「乾燥した塗抹標本は、EFB 菌の生存能力に影響を与えずに、数週間後にほとんどの二次感染菌を排除する」との記載があることから、検体を前処理する分離手技を検討した。

まず、滅菌ガラスシャーレの中に入れた、滅菌スライドガラスの上に検体を塗抹し(図 2)、室温約 20～35℃の検査室内に放置した。OIE マニュアルにおける「数週間」の具

体的日数が不明であったため、乾燥期間は余裕をもって1ヶ月に設定した。1ヶ月後、滅菌生理食塩水を塗抹部分に数滴垂らし、再懸濁させた後、KSBHI培地で37℃3日間嫌気培養を実施した。

その結果、純培養状に EFB 菌様のコロニーが発育し、分離菌については EFB 菌特異的 DuplexPCR で典型株の特異遺伝子を確認した。また、Multilocus Sequence Typing (MLST) 法<sup>7)</sup>による遺伝子解析を実施した結果、分離菌は遺伝子型 CC3・ST3に分類された。EFB 菌が分離されたことを受け、当該事例を腐蛆病と確定診断した。

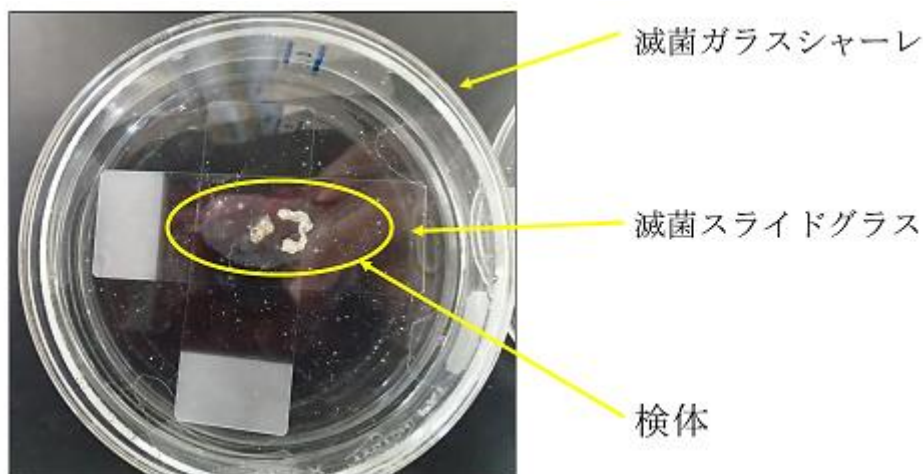


図2 乾燥塗抹標本の作製

## V EFB 菌の特性を利用した分離手技の検証試験

検体の乾燥が二次感染菌の発育の抑制に有効であることが判明したが、この結果を踏まえ、さらに2つの検証試験を計画した。なお、この分離手技の検証試験においても、「IV EFB 発生事例」と同じ検体を使用した。検体量を確保するため、適宜滅菌生理食塩水を加えた。

### 1 検証試験の概要

まず、より迅速な確定診断を行うため、乾燥期間を短縮することを目的として、1つ目の検証試験を実施した。また、二次感染菌の発育を抑え、EFB 菌を選択的に発育させる方法を模索した。高松らの最新の研究<sup>2)</sup>では「ローヤルゼリーは、腸球菌を含む様々な菌に対して強い抗菌活性を示すが、EFB 菌はその抗菌活性に抵抗性を有する。特に CC3 タイプがローヤルゼリーに最も抵抗性を示す」ことが明らかとなっており、これを応用して、ローヤルゼリーを用いて前処理し、分離培養を行う2つ目の検証試験を実施した。

### 2 乾燥期間の短縮

「IV EFB 発生事例の6 分離手技の検討と結果」と同じ方法で、乾燥期間のみを1・3・7・10・14・21日に変更し、分離培養を実施した。

### 3 ローヤルゼリーを用いた前処理

1.5ml のチューブに検体と KSBHI プロスを等量混合し、各設定濃度（0・6.25・12.5・25・50・75%）の生ローヤルゼリー（山田養蜂場）を加え、37℃24 時間感作させる前処理を実施し、混合液を KSBHI 培地に塗り広げた。一面に菌が発育したため、一部を掻き取り、新しい KSBHI 培地へ継代した。さらに、各濃度 3 コロニーずつを釣菌・継代し、分離菌については EFB 菌特異的 Duplex PCR で EFB 菌であることを確認した。なお、ローヤルゼリーのみを検体と同様に前処理した後、KSBHI 培地で培養を行い、

元のローヤルゼリー中に EFB 菌が含まれていないことを確認した。

### 4 検証試験結果

乾燥期間短縮のための試験では、乾燥期間 1 日目までは、腸球菌様菌が優位に発育したが、3 日目には、腸球菌様菌は減少し、EFB 菌の発育が認められた。さらに、7 日目以降では、腸球菌様菌はほとんど発育せず、EFB 菌が純培養状に発育した。（表 1 及び図 3）

表 1 各乾燥期間における EFB 菌・腸球菌様菌の発育状況

乾燥期間	EFB菌の発育	腸球菌様菌の発育
0 日	—	+++
1 日	—	+++
3 日	+	++
7 日	+++	—
10 日	+++	+
14 日	+++	+
21 日	+++	—

—：発育なし、+：1～50コロニー、  
++：51～200コロニー、+++：201コロニー以上

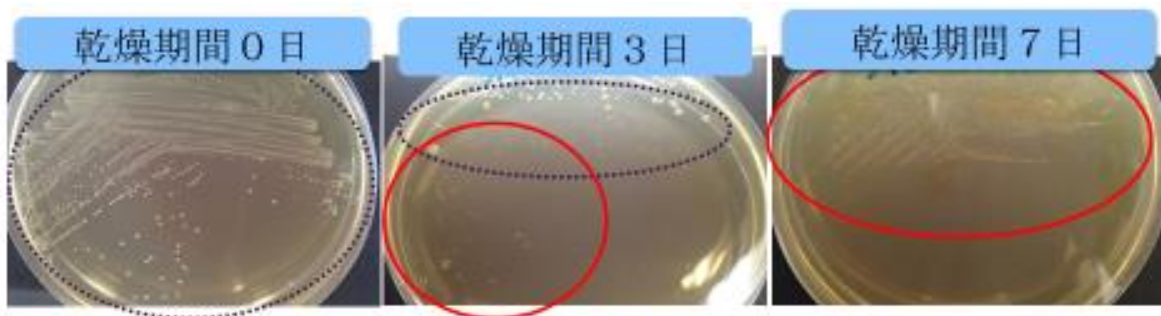


図 3 各乾燥期間における KSBHI 培地の様子  
点線枠：腸球菌様菌の発育、実線枠：EFB 菌の発育

一方、ローヤルゼリーを用いた前処理方法の試験では、ローヤルゼリー濃度 0-12.5%では腸球菌様菌が優位に発育したが、25%以上の濃度では EFB 菌が優位に発育した。(表 2) なお、高松らの研究<sup>2)</sup>では、ローヤルゼリーに対する *E. faecalis* の最小殺菌濃度 (MBC) は 6.25-12.5%と報告されている。

表 2 各濃度のローヤルゼリー処理後の EFB 菌・腸球菌様菌の発育状況

ローヤルゼリーの濃度	EFB 菌の発育	腸球菌様菌の発育
0%	—	+++
6.25%	—	+++
12.5%	—	+++
25%	+++	—
50%	+++	—
75%	+++	—

— : 発育なし、+ : 1~50コロニー、  
 ++ : 51~200コロニー、+++ : 201コロニー以上

## VI まとめと考察

平成 29 年 5 月、EFB を疑う事例において、通常の検査方法では二次感染菌が優位に発育し、原因菌が分離されない事例に遭遇した。腸球菌などの二次感染菌に汚染された検体には頻繁に遭遇するが、病性鑑定指針<sup>4)</sup>において、二次感染菌の抑制方法についてはこれまで特に記載がなかった。

今回、EFB 菌の特性を考慮して分離方法を検討した結果、検体を乾燥 3 日以上またはローヤルゼリー濃度 25%以上の条件下で前処理し、分離培養を実施する方法が二次感染菌の抑制に有効であることが判明した。ただし、今回使用した検体は、EFB 菌・腸球菌、両者の元の菌濃度については未確認である。また、異なる菌種が二次感染している場合や、他の遺伝子型の EFB 菌でも応用できるか否か、本法の有効性について更なる検証が必要と考えられた。

今後、現場で EFB を疑う事例に遭遇した際には、検体が二次感染菌に汚染されている場合を想定し、常法の細菌分離と併せて、安価で簡便な乾燥塗抹標本を作製しておくことで、これまでよりも迅速・的確な EFB の診断が可能になると考えられた。

## VII 謝辞

EFB 菌の遺伝子型別の実施及び試験計画に対する御助言を賜りました、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 高松大輔上級研究員に深謝いたします。

VIII 参考文献

- 1) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2017.  
Chapter2.2.3 EUROPEAN FOULBROOD OF Honey BEES (INFECTION OF HONEY BEES WITH *MELISSOCOCCUS PLUTONIUS*)
- 2) Takamatsu, D. et al. High-level resistance of *Melissococcus plutonius* clonal complex 3 strains to antimicrobial activity of royal jelly. Environ. Microbiol. Rep. 9 (5) .562～570 (2017)
- 3) 高松大輔ら：養蜂技術指導手引書Ⅱ ミツバチの感染症 ヨーロッパ腐蛆病、日本養蜂協会、4～11 (2015)
- 4) 農林水産省消費安全局監修：病性鑑定マニュアル第4版、全国家畜衛生職員会、438-440 (2015)
- 5) Rie, A. et al. Development of Duplex PCR Assay for Detection and Differentiation of Typical and Atypical *Melissococcus plutonius* strains. J Vet Med Sci. 76(4), 491～498 (2014)
- 6) 荒井理恵：ヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*)の多様性および新たな検出法に関する研究、岐阜大学機関リポジトリ 博士論文、15 (2014)
- 7) Haynes, E. et al. A typing scheme for the honeybee pathogen *Melissococcus plutonius* allows detection of disease transmission events and a study of the distribution of variants. Environ. Microbiol. Rep. 5 (4) , 525～529 (2013)