

## 第 2 部

## 肺炎罹患牛から分離された *Prevotella heparinolytica*

東部家畜保健衛生所 ○土屋可奈 大町雅則

### 【はじめに】

*Prevotella heparinolytica* はグラム陰性桿菌の嫌気性菌で、以前は *Bacteroides* 属に分類されていたが、現在は *Prevotella* 属に再分類されている。

ヒト等では口腔細菌として知られており、ウマでは下気道感染の主要な原因であることが報告されている。

一方、*Prevotella* 属菌の牛からの分離報告は少なく、肺炎罹患牛からの分離報告はない。今回肺炎罹患牛から *P. heparinolytica* が分離されたため、概要を報告する。

### 【発生概要】

患畜は 24 ヶ月齢、ホルスタイン種のメスで、令和 2 年 11 月 20 日の分娩直後から食欲不振、発熱を呈し、治療するも食欲廃絶となった。25 日には発咳、肺音異常を呈し、27 日には呼吸困難及び下顎、胸垂、前肢の浮腫が確認され、12 月 1 日に死亡したため病性鑑定を実施した。

治療時には、セファゾリンを 4 日間投与後、エンロフロキサシンを 3 日間、その後、アンピシリンを 3 日間投与していた。

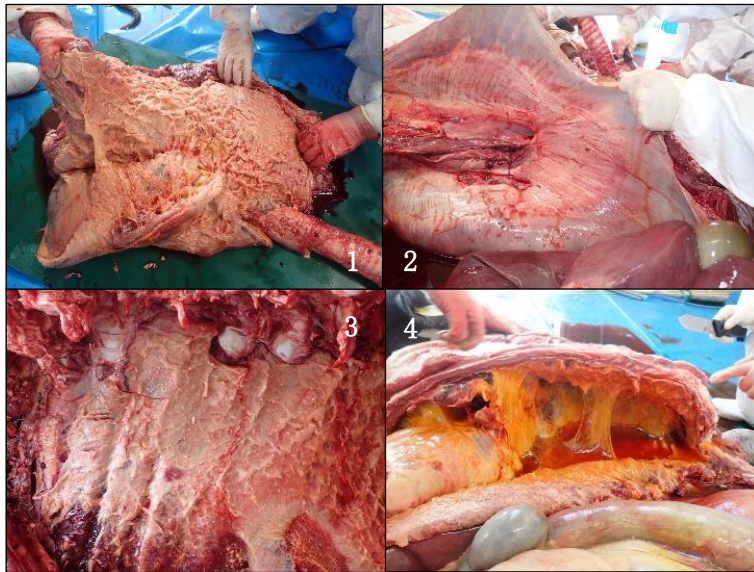
### 【剖検所見】

外貌は下顎から胸垂にかけての浮腫が顕著であり、前肢にも浮腫が確認された。胸腔内は線維素および血様胸水が多量に貯留していた（図 1）。肺は線維素により胸腔及び横隔膜と強固に癒着し、前葉は肝変化および黒色化・硬化していた。後葉は含気するが、一部で気嚢を形成、内部には血餅も認められた（図 2）。横隔膜の胸腔側は線維素に被覆されていたが、腹腔側に損傷等の異常は認められなかった（図 3）。



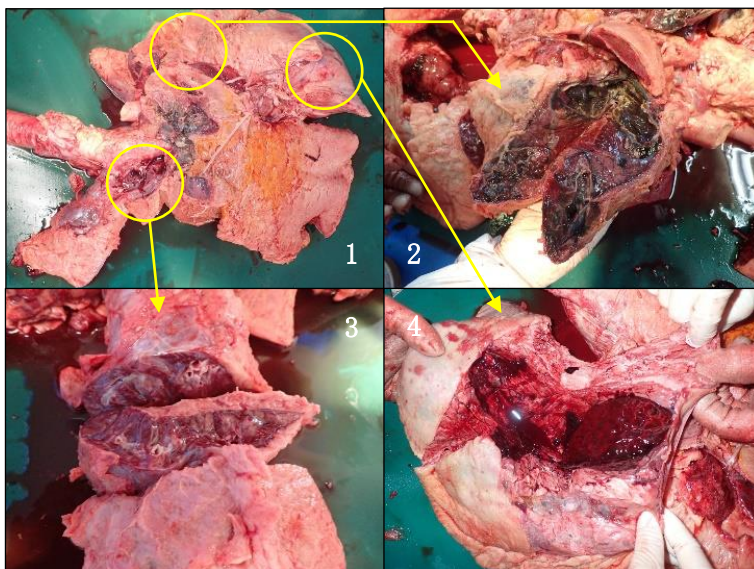
- 1: 全体
- 2: 下顎の浮腫（矢頭）
- 3: 線維素析出
- 4: 胸水貯留

図 1. 剖検所見



- 1:横隔膜（胸腔側）
- 2:横隔膜（腹腔側）
- 3:線維素析出
- 4:癒着

図 2. 剖検所見



- 1:肺全体
- 2:左前葉前部の黒色化・硬化
- 3:右前葉の肝変化
- 4:左後葉の気嚢

図 3. 剖検所見

### 【材料及び方法】

材料：分離培養には脳及び主要臓器、胸水、気管気管支リンパ節を用いた。方法の

②～④については嫌気培養で分離された *P. heparinolytica* 3 株を用いた。

方法：

#### ①分離培養

常法及び嫌気培養を実施し、菌種同定には 16S rRNA シーケンス解析を用いた。同時に市販の簡易同定キットに供し、正確な菌種同定が可能か確認した。

#### ②薬剤感受性試験

Etest を使用し、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。菌液はブルセラ液体培地を用いて McFarland3 に調整し、試験にはブルセラ血液寒天培地を使用した。薬剤は嫌気性菌の判定基準があるペニシリン、セフォキシチン、テトラサイクリンの 3 剤を選択した。

### ③ βラクタマーゼの検出

セフィナーゼディスクに添付の説明書のとおり実施し、ディスクを赤変させた株を陽性と判定した。

### ④ βラクタマーゼをコードする *cfxA/cfxA2* 遺伝子の検出

Journal of Antimicrobial Chemotherapy(2003) 51, 1293-1296 に記載の方法で実施した。アニーリング温度のみ 53°Cに変更し、802bp にバンドが確認された検体を陽性と判定した。

### ⑤組織免疫染色

*Histophilus somni*、*Mannheimia haemolytica* (血清型 1, 2, 6)、*Mannheimia varigena*、*Fusobacterium necrophorum* について肺の組織免疫染色を実施した。

## 【検査結果】

### ①分離培養

臓器をスライドガラスにスタンプ後、グラム染色して鏡検したところ、胸水及び肺後葉からグラム陰性小桿菌が確認された。肺癒着部はグラム陽性桿菌、陰性桿菌が混在していた。

好気培養及び 5%CO<sub>2</sub> 培養では、肺癒着部から大腸菌及び *Trueperella pyogenes* が、胸水から *T. pyogenes* のみが分離され、肺後葉からの菌分離はなかった。直接スタンプ標本において、グラム陰性小桿菌が確認されていたが、該当する菌が分離されなかったことから、嫌気培養を実施した。

嫌気培養では、肺後葉、胸水、気管気管支リンパ節からグラム陰性小桿菌が均一に分離され、16S シーケンス解析の結果、*P. heparinolytica* と同定された。

市販の簡易同定キットでは、全株が *Bacteroides uniformis* 99.9% (コード : 56756200) と同定され、16S シーケンス解析とは異なる結果であった (図 4)。

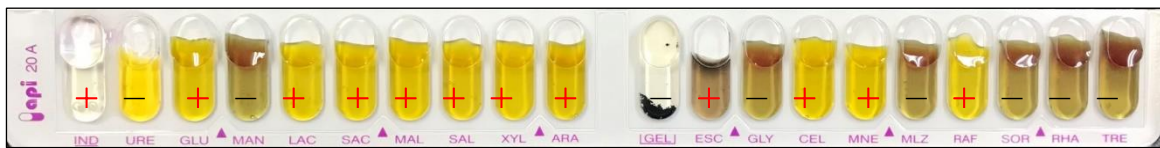


図 4. 簡易同定キット結果

### ②薬剤感受性試験

*P. heparinolytica* 3 株ともペニシリン耐性を示した。テトラサイクリンには中間から耐性を示し、セフォキシチンには感受性を示した (表 1)。



表 1：薬剤感受性試験結果

	判定基準			MIC ( $\mu$ g/ml)			
	感受性	中間	耐性	1	2	3	
ペニシリン	$\leq 0.5$	1	$\geq 2$	>32	>32	>32	1：肺由来株
セフォキシチン	$\leq 16$	32	$\geq 64$	16	12	6	2：胸水由来株
テトラサイクリン	$\leq 4$	8	$\geq 16$	16	8	8	3：リンパ節由来株

③  $\beta$  ラクタマーゼの検出

セフィナーゼディスクを用いて検査した結果、全株がディスクを赤変させ、 $\beta$  ラクタマーゼを産生していることが確認された (図 5)。

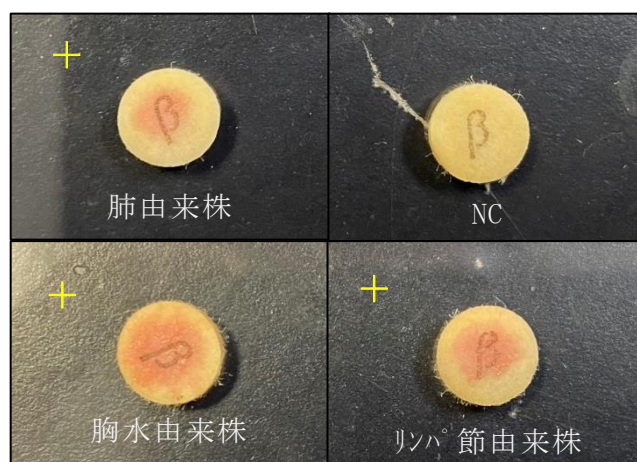


図 5.  $\beta$  ラクタマーゼの検出

④ cfxA/cfx2A 遺伝子の検出

3 株とも 802bp にバンドが確認され、 $\beta$  ラクタマーゼをコードする cfxA/cfx2A 遺伝子を保有していることが確認された (図 6)。

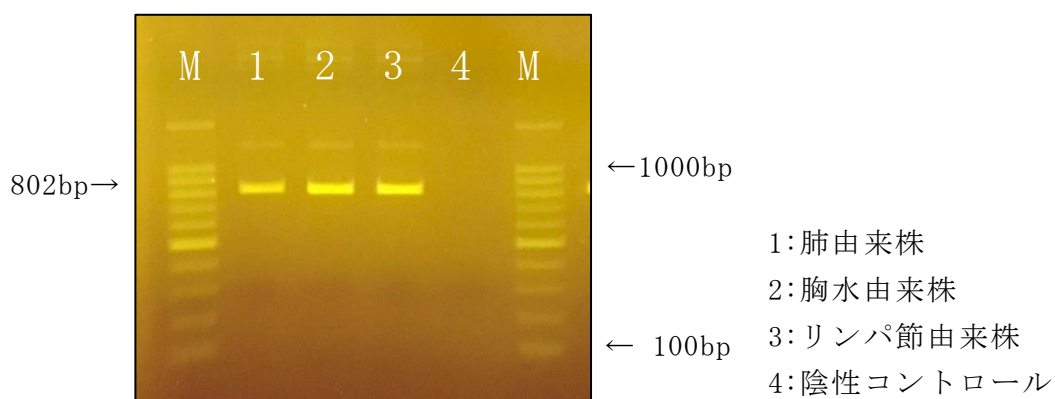


図 6. cfxA/cfx2A 遺伝子の検出

#### ⑤組織免疫染色

*F. necrophorum*のみが陽性であり、*H. somni*、*M. haemolytica*（血清型 1, 2, 6）及び *M. varigena* については陰性であった。

#### 【考察】

今回、*P. heparinolytica* 以外の病原体は検出されなかったが、肺の組織免疫染色において *F. necrophorum* が陽性であったことから、肺炎の主原因は *F. necrophorum* であると考えられた。

*P. heparinolytica* は二次的に侵入し、増殖したと考えられたが、ヒトやウマでは本菌が肺炎の原因であるとの報告もあることから、今回の病変に本菌が関与している可能性もある。

本菌が牛において肺炎に関与するかは解明されていないが、今回の分離株がペニシリン耐性を示し、テトラサイクリンにも耐性傾向を示したことから、治療を検討する際には抗菌剤の選択に注意が必要である。

*P. heparinolytica* の牛からの分離報告は少なく、病原性等のさらなるデータの蓄積が望まれる。

## 剖検で炭疽が疑われた牛の悪性水腫事例

東部家畜保健衛生所 ○池永直浩 大町雅則 他

### 【はじめに】

炭疽は致死率の高い人獣共通感染症であり、敗血症で急死した家畜では鼻腔や肛門等、天然孔からの出血及び血液の凝固不全や脾臓の腫大等が認められる。令和2年3月、肥育農場で突然死し鼻腔や肛門からの出血が見られた牛の剖検中に脾臓の腫大及びタール状化が認められ、臓器スタンプによる直接鏡検の結果、炭疽を否定できなかったため剖検を中止し、後に悪性水腫と診断した事例に遭遇したので、その概要について報告する。

### 【発生概要】

令和元年10月に県外の育成牧場から8か月齢で肥育農場に導入された去勢の交雑種が、異状なく順調に生育していたが、令和2年3月の朝、瀕死の横臥状態で発見され、死亡した。そのため、家畜保健衛生所に病性鑑定依頼があり、死後約2時間で家畜保健衛生所に搬入され剖検が開始された。死亡直後に獣医師が確認した死体の状況としては、左側横臥で、死体周囲には苦悶で足をばたつかせるなどの痕跡は見られず、両鼻腔より泡沫状の鮮血が流出していたとのことであった(図-1)。

剖検では、鼻腔や口腔内、肛門からの出血が認められ、ガスの貯留による腹囲の膨満は認められなかった。外傷は確認した限りでは見当たらなかった(図-2)。剥皮すると、左側腹部の一部で30×18cm程の皮下気腫が認められた。腹腔内は血様腹水が少量貯留し、大網は充血し、腹壁側、胃と接する側ともに血液が少量付着していた(図-3)。

四肢の剥離時や剥皮時に血液の凝固は見られなかった。脾臓の被膜内は細かく泡立った気腫が全域にわたって見られ、中央部を中心として両端に向かって腫大が進行しているように見え、凹凸も見られた。割面からは、脾臓の組織が暗黒色タール状に流れ出てきた(図-4, 5)。この時点で炭疽を視野に入れる必要性があると考え、脾臓の塗抹標本の直接鏡検を細菌検査担当に依頼し、結果が出るまでの間剖検を継続した。

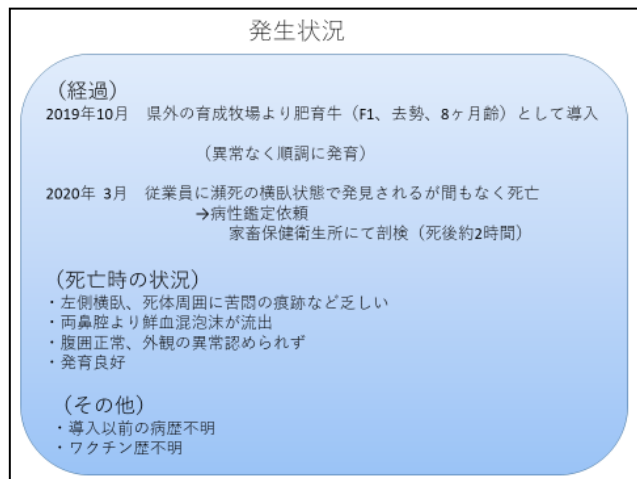


図-1



図-2

腎臓を覆う腹膜内は赤色血様液が貯留しており、腎臓は煮肉様に褪色し、組織は脆弱化していた。肝臓は褪色し、腎臓も褪色し脆弱であった。回腸の漿膜面の血管重度にうっ血し、盲腸はガスが貯留し粘膜部位で出血が認められ、その他の腸は粘膜面黒色であった（図-6）。肺は水腫様で臓器内に赤色透明水貯留しており、心臓は心嚢水が貯留し褪色していた。気管は暗赤色血様液が貯留していた（図-7）。剖検がここまで進行したところで、大型桿菌が確認されたという結果が伝えられ炭疽を否定できないと判断し剖検を中止した。この時点までに採材したものを検査材料とし、直ちに死体の焼却・解剖室及びその周囲の消毒を実施した。

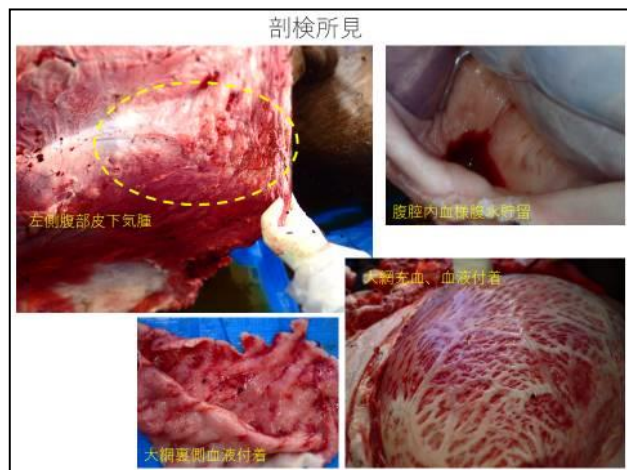


図-3

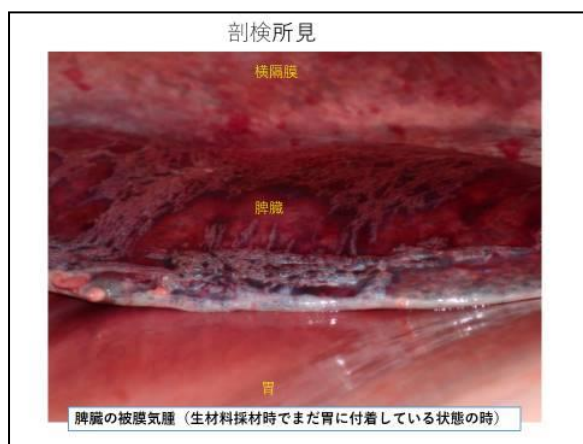


図-4

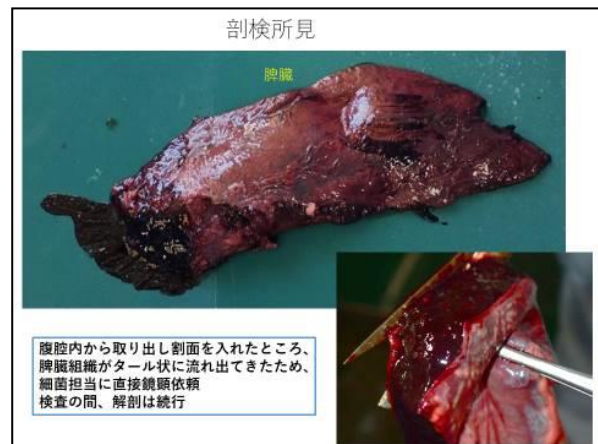


図-5

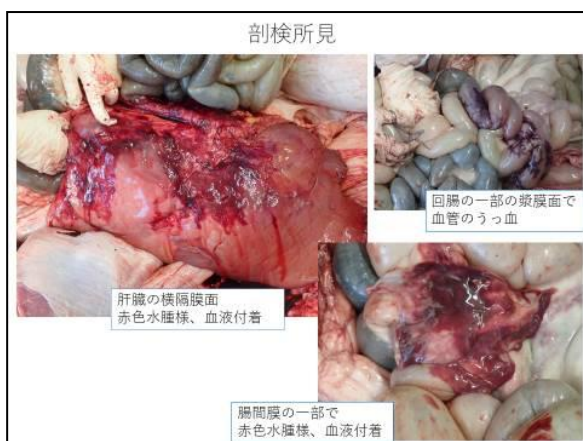


図-6

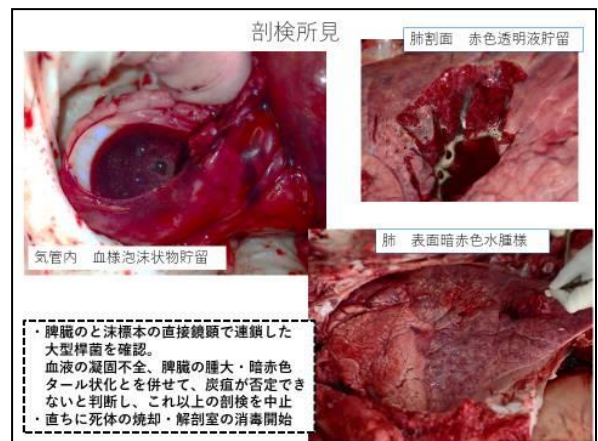


図-7

### 【材料・方法・結果】

炭疽菌の検査として、脾臓乳剤によるアスコリー反応及び PCR を実施し陰性を確認



した(図-8)。その他の細菌検査として、脾臓、肝臓、腎臓、心臓、肺、胸水、腹水、大網、皮下気腫の直下の筋肉を材料として図-9で示した①~⑤の5種類の分離培養を行った。①~④については臓器のスタンプ、⑤については臓器約1gの乳剤により行った。分離された菌の同定はPCRにより行った。また、悪性水腫菌のPCR検査として各臓器の0.025gを材料として *Clostridium septicum*、*Clostridium novyi*、*Clostridium chauvoei* の特異遺伝子の検出を試みた。結果、*Clostridium septicum* 及び *Clostridium novyi* type B, D が分離または特異遺伝子が検出された(図-9)。

病理検査として、主要5臓器についてHE染色を実施した。脾臓の腫大部位では、被膜を含めてび慢性に全域が壊死し核が消失していた(図-10)。脾臓の腫大があまり進行していない脾端部でもほぼ全域にわたり壊死し空胞も散見されたが、一部の白脾髄でリンパ球が集塊で残存しており、赤脾髄にも核が消失していない細胞が散見された(図-11)。肝臓は被膜を含めてび慢性に全域が壊死し、大小不同の空胞も散見された(図-12)。腎臓は糸球体、尿細管が変性し構造は崩壊していた。脾臓、肝臓、腎臓の全域で大桿菌が確認された。肺は肺胸膜・中隔が重度に水腫を起こし、細気管支上皮が消失していた。肺胞腔内には線維素が貯留し、血管内には炎症細胞が浸潤していた(図-13)。

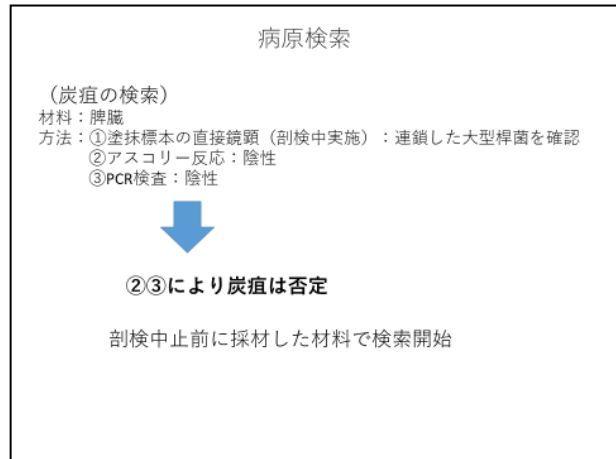


図-8

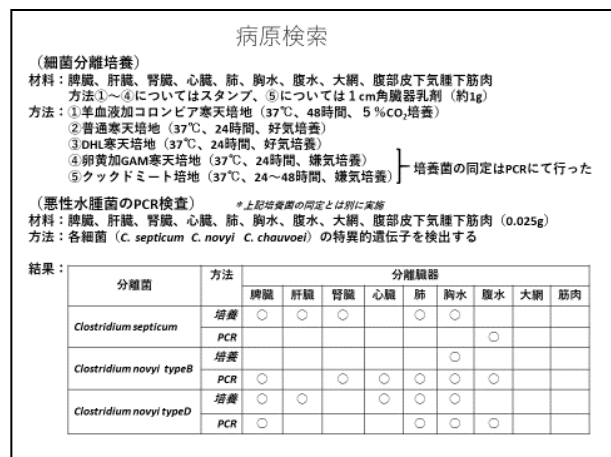


図-9

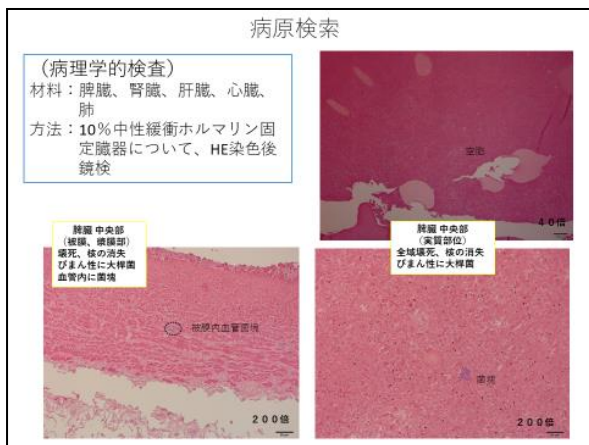


図-10

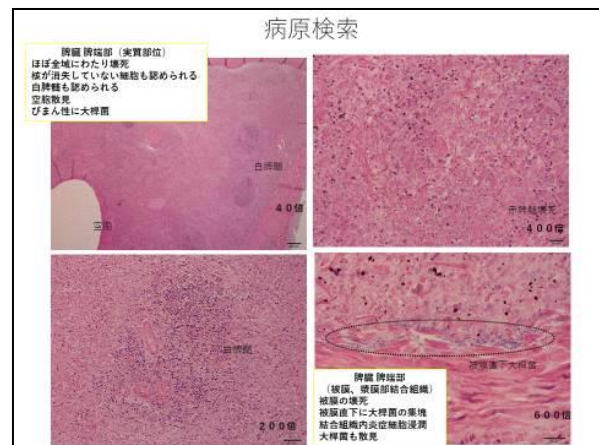


図-11

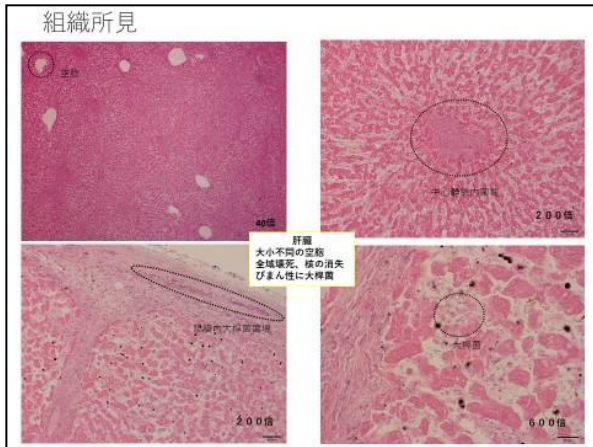


図-12

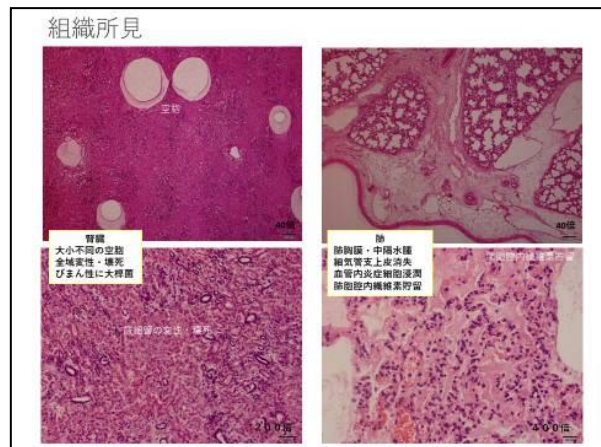


図-13

以上の結果から、創傷は確認できなかったが *Clostridium septicum*、*Clostridium novyi* による悪性水腫と診断した。

【まとめ】

炭疽は *Bacillus anthracis* の感染によって起こる致死率の高い伝染性疾患で、牛や馬で感受性が高く、豚や人にも感染する人獣共通感染症である。炭疽菌は土壌菌であり、芽胞を形成し長期間にわたり生存するため、罹患した家畜の解剖時には菌の飛散による汚染の広がりを防ぐ必要がある。そのため、国が出している病性鑑定指針では、直接鏡検で炭疽が疑われる場合、剖検は必要最小限にとどめるようにすることと記載されている。また炭疽菌の敗血症で急死した家畜は、剖検時に脾臓の腫大が多くの場合認められており、天然孔からの出血や血液の凝固不全も認められるがどちらも必発ではない。当所における病性鑑定では、剖検前に死亡家畜の天然孔からの出血や、またそれが凝固していなかった場合でも、剖検前の血液の直接鏡検は未実施であった。その理由として、山梨県では炭疽は少なくとも記録が確認できる昭和40年以降50年以上にわたって発生がな

結果と考察

(結果)  
 ・アスコリー反応、PCR検査により炭疽は否定  
 ・*C. septicum* 及び *C. novyi* による悪性水腫と診断

(考察)  
 ・脾臓の腫大、タール状化の原因  
 →①、②の複合要因  
 ①局所感染による毒血症ではなく、**菌が全身に拡がった敗血症の病態であった**  
 ②今回分離菌の産生毒素の中に、炭疽菌でも産生される**浮腫性、致死性毒素**が含まれている  
 ・血液凝固不全の原因  
 (炭疽) 毒素ではなく、**炭疽菌細胞壁ペプチドグリカンによる播種性血管内凝固症候群 (DIC) (悪性水腫) 溶血性毒素によるDIC**

C. novyiのタイプ別産生毒素			C. septicumの産生毒素			B. anthracisの産生毒素		
毒素の種類	毒素の作用	Cereul. chape	毒素の種類	毒素の作用		毒素の種類	毒素の作用	
Alpha	壊死性、解毒性、浮腫性	++	Alpha	壊死性、解毒性、溶血性	-	PA	凝固膜への付着性	-
Beta	レシキン溶解性、壊死性、解毒性、溶血性	+	Beta	チオケリチンエステラーゼ	-	CP	(凝固因子)	浮腫性
Gamma	レシキン溶解性、壊死性、溶血性	-	Gamma	ヒアルロニダーゼ、浮腫性	-	LF	(凝固因子)	壊死性
Delta	腸管内不安定な溶血素	-	Delta	腸管内不安定な溶血素	-			
Epsilon	腸管分解	-		ノイキニダーゼ	-			
Zeta	溶血性	+			-			
Eta	トリギンサシキ酵素	+			-			
Theta	腸管分解酵素	?			-			

++ 強産生 + 弱産生

B. anthracisの毒素以外の凝固因子  
 凝固因子 作用  
 凝固因子 PA DIC

図-14

まとめ

- ・剖検で脾腫が認められ、直接鏡頭で大型桿菌が確認されたため炭疽が否定できず剖検を中止したが、アスコリー反応、PCR検査により炭疽を否定
- ・*C. septicum* 及び *C. novyi* による悪性水腫と診断
- ・炭疽は、国内では平成12年に宮崎で発生しており依然として警戒すべき疾病ではある
- ・山梨県では50年以上発生の記録がなく、天然孔からの出血性疾患の発生原因になり得る可能性としてはかなり低い

今後、剖検前に天然孔からの出血が見られた場合  
**剖検前に血液からの直接鏡頭、アスコリー反応を実施**

図-15

く、天然孔からの出血や血液の凝固不全は、炭疽以外の出血性の肺炎や腸炎、溶血性疾患でも見られる所見であるためである。今後同様の症例が出た場合は、事前に炭疽を否定した上で剖検を実施していくこととした。

また、悪性水腫で脾臓の腫大やタール状化が起きたことについて考察した。一般的な悪性水腫は創傷感染により、感染局所で増殖した菌の毒素により皮下の蜂巢織炎や筋間結合組織の水腫を引き起こし毒血症により死亡する。全身性の敗血症に陥った場合には、菌は内臓に達し病変を形成する。今回の症例は、臓器からの菌の分離状況や各臓器の組織所見から敗血症を起こしていたと考えられた。また菌の性状について考えてみると、炭疽と今回分離された悪性水腫菌の産生する共通毒素として浮腫性及び致死性の毒素がある。炭疽の場合、これらの毒素の作用で組織や細胞の浮腫や壊死が起こり肉眼的に脾臓の腫大やタール状化が見られる。これらのことから、今回の悪性水腫は局所感染ではなく全身性の敗血症の病態を引き起こしていたこと、今回分離された悪性水腫菌が炭疽菌と同じ浮腫性、致死性毒素を産生するものであったこと、2つの要因により今回見られた脾臓の病変は生じたのではないかと考えられた。

次に炭疽及び悪性水腫の両疾病共に見られる血液凝固不全についてであるが、炭疽は、生体内で溶血性の毒素は産生しておらず、細胞壁ペプチドグリカンが生物の体内で播種性血管内凝固症候群（DIC）を誘発するため、凝固不全の病態が見られると考えられた。悪性水腫菌については、溶血性の毒素を産生していることから、それが DIC を引き起こし、凝固不全の病態を示すと考えられた。

#### （参考文献）

- 藪内英子（2003）：*Bacillus anthracis* と炭疽. 日本細菌学雑誌. 58(3), 505-548.
- Ping, Q., Yan, L. (2013) : *Bacillus anthracis* Cell Wall Peptidoglycan but Not Lethal or Edema Toxins Produces Changes Consistent With Disseminated Intravascular Coagulation in a Rat Model. The Journal of Infectious Diseases. 208(6), 978-989.
- Shihui, L., Mahtab, M. (2015) : *Bacillus anthracis* toxins. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. 361-376.
- Charles, L, H(1990) : Toxigenic Clostridia. Clinical Microbiology Reviews. 3(1), 66-98.

# 豚熱（CSF）ワクチン接種時期における子豚の移行抗体とその影響について

西部家畜保健衛生所 ○小林洋平・鷹野由紀 他

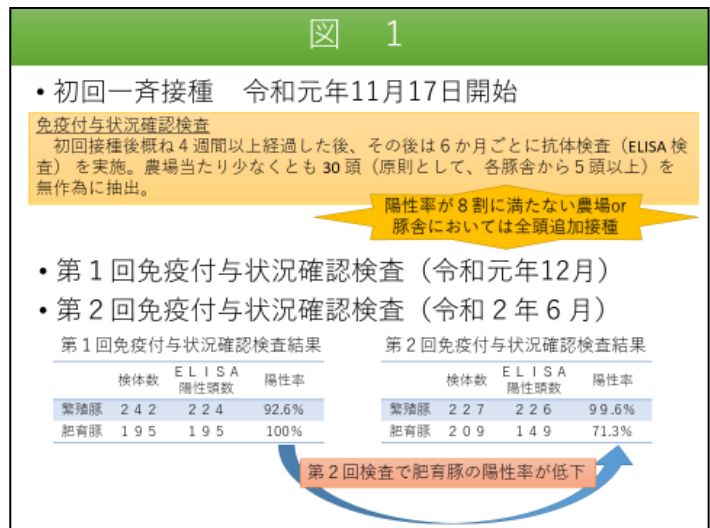
## 【経緯】

家畜伝染病予防法及び特定家畜伝染病防疫指針（以下、指針）に基づき、本県では令和元年 11 月 17 日より豚熱（CSF）ワクチン接種を開始。ワクチン接種後は指針により免疫付与状況確認検査を実施することが定められており、陽性率が 8 割に満たない場合、国と協議の上、追加接種を行うこととなっている。本県では令和元年 12 月に第 1 回、令和 2 年 6 月に第 2 回の免疫付与状況確認検査を実施したところ、第 2 回検査において肥育豚の免疫付与率が低く（1 回目：100%、2 回目：71.3%）、追加接種の対象となる事例が続発した（図 1）。

本現象は他県でも同様に報告されており、初回接種を受けた母豚から出生した肥育豚の移行抗体による影響が示唆されている。国からはワクチン接種県に対し「ワクチン接種適齢期確認のための調査」として協力依頼があり、管内 2 農場において調査を実施、結果について考察したので報告する。

## 【調査内容】

管内 2 農場（A 農場：一貫経営（母豚 120 頭規模）、B 農場：一貫経営（母豚 55 頭規模））を調査対象農場とし、分娩前母豚の抗体検査を実施、抗体価の異なる母豚 5 頭を選定。分娩後は初乳及び産子（1 腹あたり 5 頭以上）について 15 日齢から経時的に採血を実施、抗体検査を実施した。抗体検査は ELISA 法及び中和試験により実施した（図 2）。





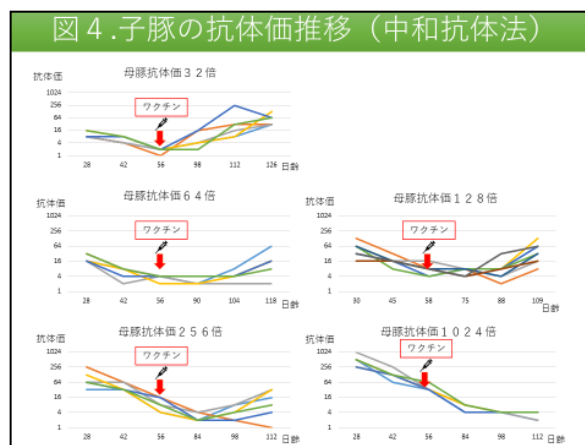
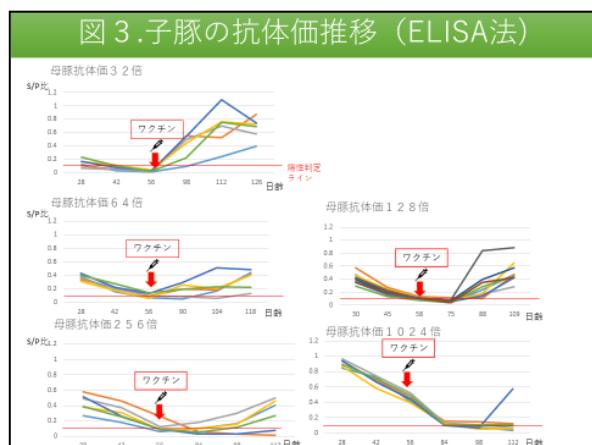
【結果】

1. 母豚は中和抗体価 32～1024 倍の 6 頭を選定、各母豚の初乳中抗体価は血清抗体価と概ね相関する結果であった（表 1）。

表 1

選定母豚		母豚初乳		農場	品種
中和抗体価	S/P比	中和抗体価	S/P比		
32	0.680	128	0.513	A	Y
64	0.766	256	0.715	A	D
128	0.679	128	0.490	B	LW
256	0.933	2048	0.950	A	W
1024	1.192	2048	1.343	A	L

2. 子豚の検査結果については、図 3（ELISA 法）及び図 4（中和抗体法）で示すとおり、移行抗体価は母豚抗体価と相関が認められた。母豚抗体価 32 倍では、ワクチン接種日齢付近の 56 日齢ではすでに移行抗体は減少しており、ワクチン接種後 30 日で抗体価の上昇を確認した。母豚抗体価 64 倍、128 倍では 56 日齢では移行抗体が残存している個体を確認され、接種後 30 日ではまだ抗体の上昇が起きず、免疫付与に遅延が生じていると考えられた。母豚抗体価 256 倍、1024 倍ではワクチン接種日齢においても高い移行抗体価を保有しており、ワクチン接種後に抗体上昇が起こらない個体を確認された。

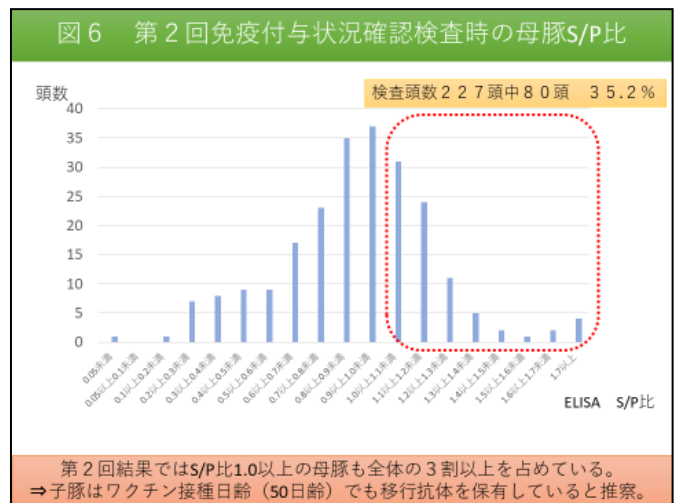
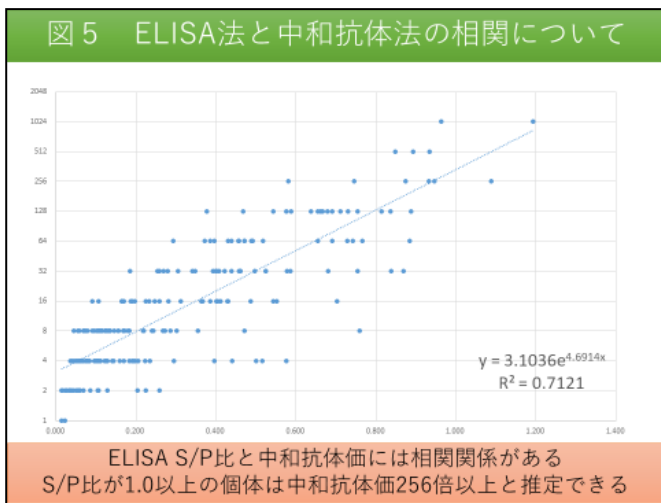


【考察】

子豚の移行抗体価は母豚抗体価に依存し、特に 256 倍以上の抗体価を保有する母豚の産子においては、ワクチン接種時においても高い抗体価を保有しており免疫付与の遅延が確認された。なお、今回 ELISA 法及び中和抗体法を実施したところ、両結果には相関関係が認められた（図 5）。この結果から、S/P 比 1.0 を超えるような個体は中和抗体価 256 倍以上と推定でき、第 2 回検査時の繁殖豚における S/P 比の分布は図 6

のとおりであり、免疫付与の遅延が懸念される中和抗体 256 倍以上の母豚は全体の 35.2%と推察された。しかしながら、母豚抗体価は広範囲に分布しており、接種時期の子豚は移行抗体が消失した群と残存している群が混在していると推察されることから、接種適期は一律ではなく全ての子豚に適切なワクチン接種をすることは困難と考えられる。ワクチン接種農場においても免疫を獲得していない個体が常にいることを想定し、飼養衛生管理を徹底することが今後も不可欠である。

なお、現時点で農場内に存在している母豚は、成豚になってから初回接種された個体であり、抗体価が高止まりしている傾向にある。今後更新していく母豚は子豚時にワクチン接種歴のある個体となるため、分娩時の抗体価や初乳中の抗体価が現在の母豚群より低値となる可能性もあることから、定期的に母豚の抗体価について確認し、子豚のワクチン接種適期を検討することが重要である。



## サックブルードウイルスの関与が疑われたニホンミツバチの子捨て現象事例

東部家畜保健衛生所 ○水谷直子 大町雅則

### 【はじめに】

サックブルードウイルス(SBV)はイフラウイルス科に属するプラス一本鎖 RNA ウィルスで、蜂児の頭部側に水がたまった透明な袋(サック)を形成することに由来する。SBV はミツバチに感染するが、トウヨウミツバチでの症状はセイヨウミツバチに比べて強く、蜂群を壊滅させることもある。国内では、トウヨウミツバチの亜種であるニホンミツバチから SBV が検出されており、子捨て現象(蜂児出し)の原因として関与が疑われている。しかし、ニホンミツバチでは、サックの形成は認められず、幼虫は透明感がなくなり白濁した状態となる[1]。今回、本病が疑われたニホンミツバチの子捨て現象事例に遭遇したので、その概要を報告する。

### 【発生概要】

令和2年10月1日、ニホンミツバチの飼養者から飼養している6群(No.1~6)中2群(No.2,4)について蜂児出しが見られる旨の通報があり、病性鑑定を実施した。2群からSBVの特異遺伝子が検出されたため、10月7日、現地確認したところ、通報時に症状のなかったNo.3で蜂児出しが認められた。また、通報時に症状のあったNo.4については幼虫が認められず成虫が激減していた。なお、症状のあった幼虫は、サックは認められず白濁していた。同日、同居群を含めた追加採材を行った。

### 【材料・方法】

#### 1 材料

##### (1) 通報時

ニホンミツバチ2群(No.2,4)の幼虫を材料とした。

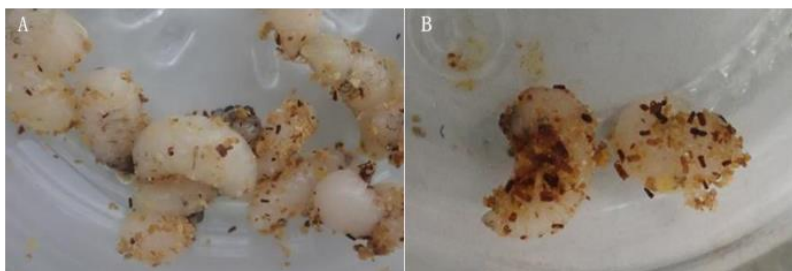


図1 死亡蜂児(A: No.2、B: No.4)

##### (2) 追加採材時

全6群(No.1~6)の成虫、幼虫(No.4は成虫のみ)を採材した。通報時に症状のあったNo.2及びNo.4の他、新たにNo.3巣箱でも蜂児出しがみられた。No.4は、すでに成虫数が激減し、蜂群は消滅しかかっていた。飼養者によると、蜂児出し症状はこの群が最も強いとのことだった。また、巣門ふき取りスワブは重箱式巣箱の出入り口をふき取り材料とした。





図2 発症群巣箱 (A:農場巣箱、B:No. 2 巣箱前の死亡蜂児、C: No. 3 巣箱前地面の死亡蜂児、D・E: 発症群 (No. 4) 巣箱内部、F: 正常群 (No. 5) 巣箱内部)

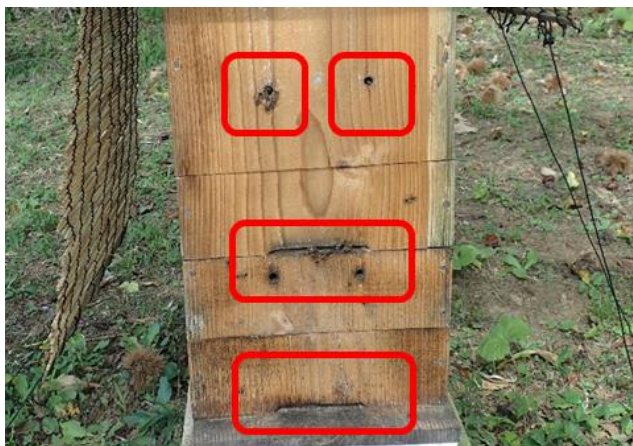


図3 スワブ採取した巣門部分



## 2 方法

### (1) SBV 及びその他各種ミツバチ疾病の遺伝子検査

幼虫及び成虫は各 3 匹をそれぞれすり潰し PBS(-)を用いて 10%乳剤を作製し、巣門ふき取りスワブは PBS(-)2.5ml に浸漬し懸濁した。10%乳剤及び懸濁液を 3000rpm、4℃、10 分間遠心後の上清を遺伝子検査に用いた。High pure viral Nucleic Acid Kit (Roche) を用いて抽出した核酸を検体とし、SBV に特異的な RT-PCR[2]を、2 種類のプライマーセットを用いて実施した。併せて、その他各種ウイルス病(チヂレバネウイルス (DWV)、急性麻痺病ウイルス (ABPV)、慢性麻痺病ウイルス (CBPV)、黒色女王蜂児病ウイルス (BQCV)、イスラエル急性麻痺病ウイルス (IAPV) 及びカシミール蜂ウイルス (KBV) [2])、ノゼマ症 (*N. Apis*, *N. cerana*) [3]、チョーク病 [4] 及びアカリンドニ症 [5] の遺伝子検査を実施した。使用したプライマーは表 1 のとおりで、PCR 産物は 2%アガロースゲル電気泳動によりバンドの有無を確認した。

表 1 各種ミツバチ疾病の遺伝子検査に使用したプライマー

疾病	プライマー配列	サイズ (bp)	出典	
SBV	SB1f 5' -ACCAACCGATTCTCAGTAG-3'	488	プライマー：[2] 条件：[3]	
	SB2r 5' -CCTTGGAAGCTGCTGTGTA-3'			
	SB14f 5' -AATGGTGCAGGTTGACTATGG-3'	597		
	SB15r 5' -TGATACAGAGCGGCTCGACA-3'			
DWV	F 5' -ATTGTGCCAGATTGGACTAC-3'	435	[3]	
	R 5' -AGATGCAATGGAGGATACAG-3'			
ABPV	F 5' -GTGCTATCTTGAATACTAC-3'	619		
	R 5' -AAGGYTTAGGTTCTACTACT-3'			
CBPV	F 5' -TGTCGAACTGAGGATCTTAC-3'	316		
	R 5' -GACCTGATTAACGACGTTAG-3'			
BQCV	F 5' -TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC-3'	701		
	R 5' -GCAACAAGAAGAAACGTAACCAC-3'			
IAPV	F 5' -CCAGCCGTGAAACATGTTCTTACC-3'	226		
	R 5' -ACATAGTTGCACGCCAATACGAGAAC-3'			
KBV	F 5' -ATGACGATGATGAGTTCAAG-3'	289		
	R 5' -AATTGCAAGACGCGCATC-3'			
ノゼマ症 ( <i>N. Apis</i> )	F 5' -CCATTGCCGGATAAGAGAGT-3'	401		[4]
	R 5' -CACGCATTGCTGCATTGAC-3'			
ノゼマ症 ( <i>N. cerana</i> )	F 5' -CGGATAAAAAGAGTCCGTTACC-3'	250		
	R 5' -TGAGCAGGGTTCTAGGGAT-3'			
チョーク病	F 5' -TGT CTG TGC GGC TAG GTG-3'	約500	[5]	
	R 5' -GAW CAC GAC GCC GTC ACT-3'			
アカリンドニ症	F 5' -TCTTCAATTTAATTATACGT-3'	220	[6]	
	R 5' -CAAAAATCAGAATAAATGTTGAAATA-3'			

### (2) マイナス鎖 RNA の検出

幼虫での SBV 増殖を確認するため、複製中間体であるマイナス鎖 RNA の RT-PCR[3] を、No. 2、No. 3 及び No. 4 の幼虫について実施した。マイナス鎖に特異的なプライマー (5' -AGCCTGCGCACCGTGGACCAACCGATTCTCAGTAG-3' )を用いて cDNA を合成した後、共通の A tag primer (5' -AGCCTGCGCACCGTGG-3' )及び、マイナス鎖検出に特異的なプライマー (5' -CCTTGGAAGCTGCTGTGTA-3) により PCR を実施し、2%アガロースゲル電気泳動により PCR 産物の有無を確認した。

### (3) シーケンス解析

SBV に特異的な 2 種類のプライマーセットを使用し RT-PCR により得られた PCR 産物について、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し、遺伝子解析ソフト MEGA7 を用い NJ 法により分子系統樹解析を実施した。なお、プライマー SB1f/2r セットは保存性が高く、SB14f/15r セットは、変異が多い配列領域である。

#### 【結果】

##### (1) 各種ミツバチ疾病の遺伝子検査

通報時及び追加採材時に得た検体のうち、蜂児出しが認められた No. 2, 3, 4 の幼虫、No. 3, 4 の成虫及び全 6 群の巣門拭き取りスワブで SBV の特異的遺伝子を検出した (表 2)。その他の疾病についての特異的遺伝子は検出されなかった。

表 2 サックブルードウイルスの遺伝子検査結果及び症状 (子捨て現象) の有無

蜂群	10/1依頼時		10/7追加採材時			
	症状	幼虫	症状	幼虫	成虫	巣門
No.1	なし	NT	なし	-	-	-
No.2	あり	+	あり	+	-	+(微量)
No.3	なし	NT	あり	+	+	+(微量)
No.4	あり	+	あり	NT	+(微量)	+(微量)
No.5	なし	NT	なし	-	-	-
No.6	なし	NT	なし	-	-	-

##### (2) マイナス鎖 RNA の検出

No. 2、No. 3 及び No. 4 の全ての幼虫で、複製中間体であるマイナス鎖 RNA の遺伝子 (485bp) を確認した (図 4)。

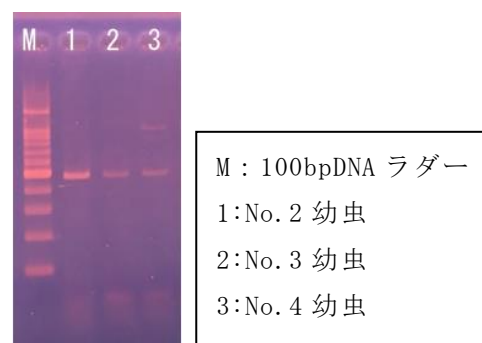


図 4 幼虫 (No. 2, 3, 4) における マイナス鎖 RNA の検出

##### (3) シーケンス解析

遺伝子解析の結果、2 種類のプライマーセットで増幅した特異遺伝子のいずれも、今回検出された SBV はトウヨウミツバチや過去に国内でニホンミツバチから検出されたものと近縁であった (図 5, 6)。

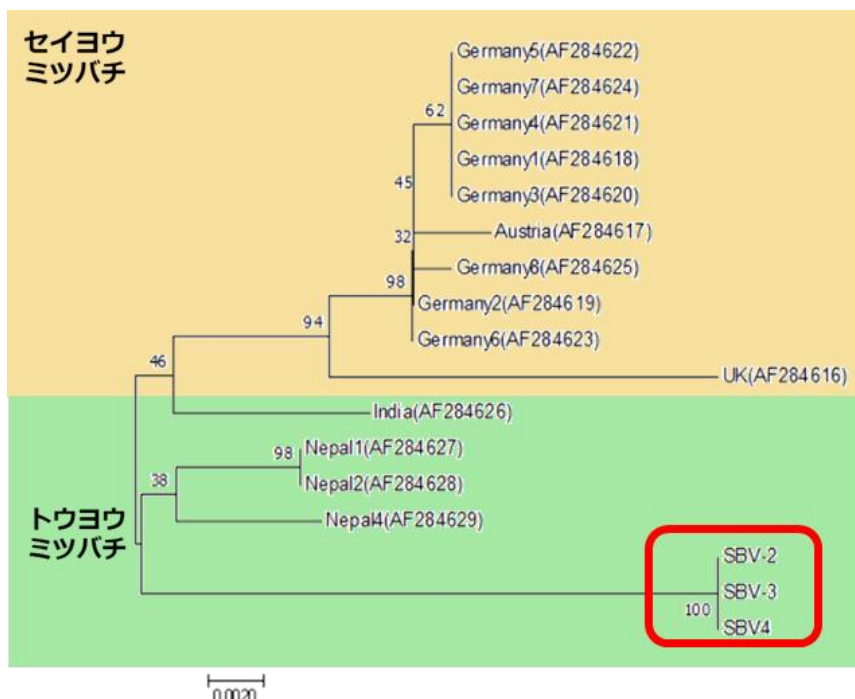


図5 プライマーSB1f/2rによる系統樹 (赤枠内は今回の株)

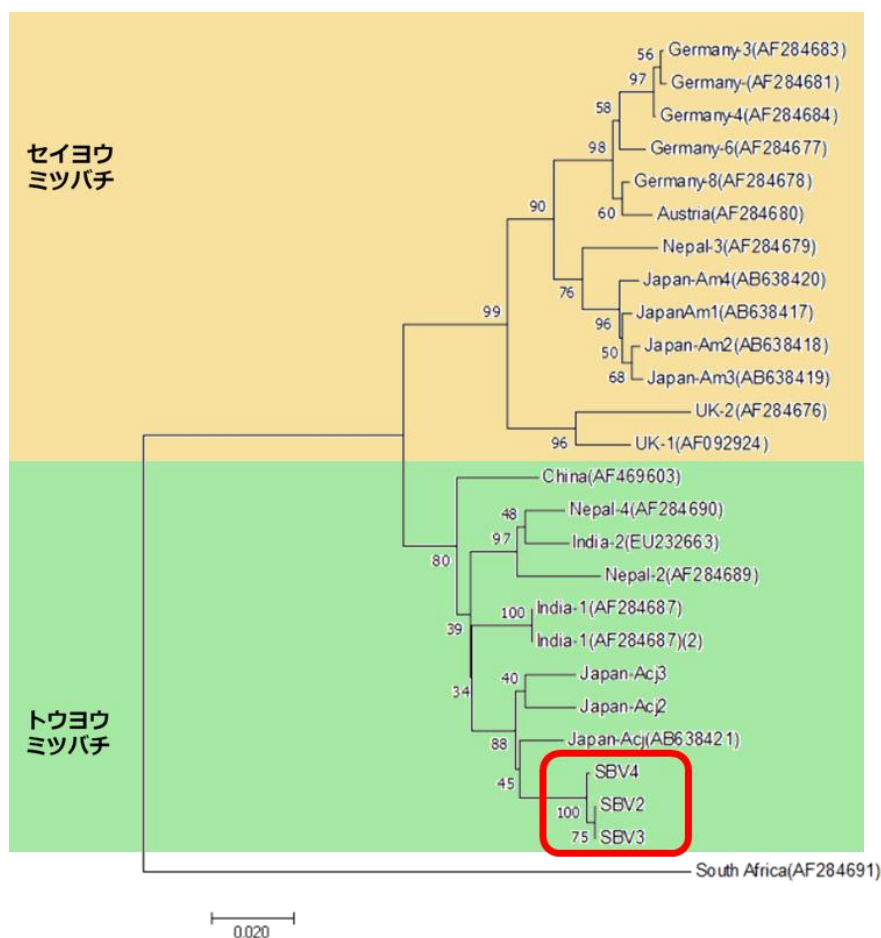


図6 プライマーSB14f/15rによる系統樹 (赤枠内は今回の株)

### 【まとめ及び考察】

今回、蜂児出し症状が認められた蜂群に共通して SBV の特異遺伝子が検出され、さらに、幼虫体内でマイナス鎖 RNA が検出されたことから、本事例の蜂児出しは SBV の関与が強く疑われた。マイナス鎖 RNA は、ウイルス感染時に生成される複製中間体であることから、検出された SBV は物理的な付着等ではなく、幼虫で感染・増殖していることが確認された。

しかし、蜂児出しは、当該ウイルスの他、餌不足やスムシの侵食、巣箱内温度の急上昇・低下等の単独あるいは複合要因によって起こることが知られている。今回、ウイルス以外のその他要因については検証できていないことから、確定診断には至らなかった。

また、SBV に特徴的な幼虫にサックを形成する症状については、過去のニホンミツバチでの SBV 検出事例と同様に、本事例でも認められず、幼虫は白濁しているのみだった。系統樹解析結果から、本事例の SBV はトウヨウミツバチやニホンミツバチから分離されたウイルスと近縁であり、セイヨウミツバチから分離されたものとは別のクラスターを形成していたことから、セイヨウミツバチとニホンミツバチに感染する SBV は遺伝的に異なり、病原性が異なる可能性が考えられた。

### 【参考文献】

[1]月刊現代農業 2010 年 12 月号

[2]Grabensteiner et al.:Sacbrood Virus of the Honeybee (*Apis mellifera*):Rapid Identification and Phylogenetic Analysis Using Reverse Transcription-PCR, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Jan. 2001, p. 93-104

[3]Kojima et al.:Infestation of Japanese Native Honey Bees by Tracheal Mite and Virus from Non-native European Honey Bees in Japan, Microb Ecol (2011a) 62:895-906

[4]Chen et al:Nosema cerenae is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the US, Journal of Invertebrate Pathology 97 (2008) 186-188

[5]R. R. James, J. S. Skinner.:PCR diagnostic methods for *Ascosphaera* infections in bees, Journal of Invertebrate Pathology 90 (2005) 98-103

[6]Kojima et al.:PCR-based detection of a tracheal mite of the honey bee *Acarapis woodi*, J. Invertebrate pathol 108:135-137 (2011b)