

## ミルクテスト陰性を示したアメリカ腐蛆病 発生事例についての一考察

美濃口 直和・平井 祐子

腐蛆病はミツバチの蜂児が死亡する細菌性疾病で、家畜伝染病予防法第2条により家畜伝染病に唯一指定されている。腐蛆病は、さらに病原体の違いにより、アメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* によるアメリカ腐蛆病とヨーロッパ腐蛆病菌 *Melissococcus plutonius* によるヨーロッパ腐蛆病の2種類がある。アメリカ腐蛆病はアメリカ腐蛆病菌の芽胞が、食餌を通して若齢幼虫に経口感染することに起因し、経口感染した芽胞は、やがてミツバチ幼虫の中腸内で発芽し、中腸上皮細胞を経て体腔内で増殖することにより蛹期の虫体は死亡し、膠臭のあるチョコレート色を呈した粘調状に腐敗するのが臨床で大きな特徴である(片岡, 2006)。

腐蛆病の診断は、病性鑑定マニュアル(農林水産省畜産局, 2000)の中の腐蛆病検査チャートに基づいて実施する。検査手順は、始めに疫学調査や臨床検査(特徴的な膠臭, 死亡蛹は粘調性を帯びチョコレート色等)を行いアメリカ腐蛆病が疑われた場合、次にスケイル(腐蛆)を芽胞染色(ニグロシン染色等)して芽胞の有無を確認する。芽胞染色の結果、芽胞が確認された場合、スケイルを用いてミルクテスト(ア

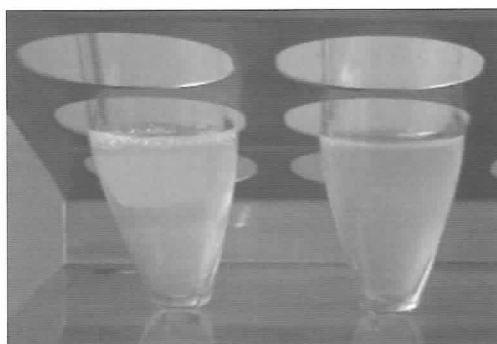


図1 ミルクテスト陰性事例  
0.5%スキムミルク中へスケイルを入れて(右側)、37°C, 20分間静置しても透明化しない(左は対照区)

メリカ腐蛆病菌が産生するタンパク分解酵素の有無を確認する試験で、タンパク分解酵素があれば0.5%スキムミルク水溶液は室温下20分以内で透明になる)を実施する。ミルクテストが陽性(スキムミルクが透明になる)の場合、細菌培養, さらにPCR検査(16S rRNAを増幅)を経てアメリカ腐蛆病と診断する。

2012年4月から2013年10月にかけて、愛知県西部家畜保健衛生所尾張支所管内で合計5例のアメリカ腐蛆病が発生し、そのうち4例でミルクテスト陰性が確認された(図1, 表1)。

表1 アメリカ腐蛆病発生事例の概要(2012年4月~2013年10月)

蜂場	市町	発生日	飼養 群数	発生 群数	腐蛆の状態 (スケイル)	芽胞 染色	ミルクテスト	
							20分(37°C)	1夜(室温)
A	瀬戸市	2012.4.24	6	5	粘稠性+ チョコレート色	+	- (0/5)	+ (2/5)
B	春日井市	2013.4.4	9	8	同上	+	- (0/4)	+ (2/4)
C	一宮市	2013.4.8	3	2	同上	+	- (0/4)	+ (3/4)
D	長久手市	2013.6.12	21	1	粘稠性+ チョコレート色・一部白色	+	- (0/4)	+ (2/5)
E	稲沢市	2013.9.30	8	1	粘稠性+ チョコレート色	+	+ (5/5)	

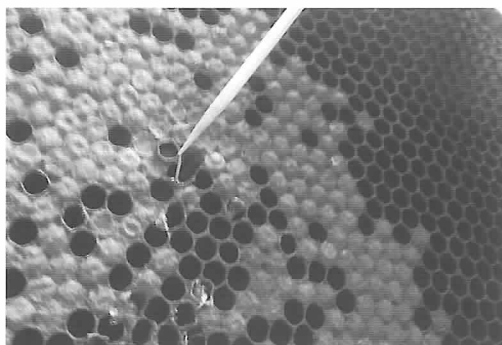


図2 チョコレート色で粘調性を帯びた死亡蜂児

ミルクテスト陰性を示した4例のアメリカ腐蝕病は、ミルクテスト陽性を示す通常のアメリカ腐蝕病同様に、蜂児はいずれもチョコレート色を呈し粘調性を帯びていた(図2)。また、芽胞染色においてもすべてより芽胞が確認された(図3)。

今回、ミルクテスト陰性の原因を調べるため、ミルクテスト陰性および陽性事例からそれぞれ分離されたアメリカ腐蝕病菌のタンパク分解酵素産性能に差があるか明らかにすることを目的に、試験Ⅰ(アメリカ腐蝕病菌のタンパク分解性能およびタンパク分解酵素産性能試験)および試験Ⅱ(アメリカ腐蝕病菌の16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析)の2つの試験を実施したので、以下の結果について紹介する。

### 試験材料と方法

#### 試験Ⅰ(タンパク分解性能およびタンパク分解酵素産性能試験)

##### 1 供試菌株

試験Ⅰでは、ミルクテスト陰性を示したアメリカ腐蝕病発生事例から分離されたアメリカ腐蝕病菌(A株とC株)およびミルクテスト陽性

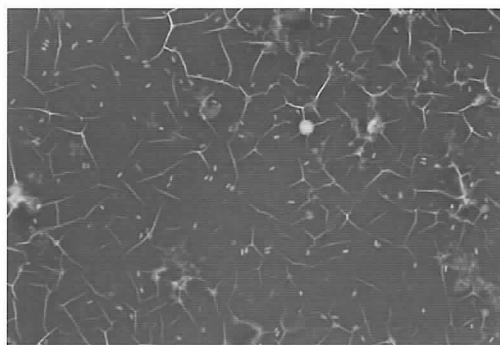


図3 アメリカ腐蝕病菌の芽胞(ニグロシン染色×1000)

を示したアメリカ腐蝕病発生事例から分離されたアメリカ腐蝕病菌(E株)の計3菌株の植物型と芽胞型を用いた。植物型は、37℃下J培地にて4日間炭酸ガス培養したもので(図4)、芽胞型は、37℃下ブドウ糖を除いたJ培地にて8日間炭酸ガス培養したものとした(図5)。

## 2 試験方法

タンパク分解性能およびタンパク分解酵素産性能を調べるため、カゼイン分解能テストとゼラチン液化テストを実施した。

### (1) カゼイン分解能テスト

カゼイン分解能を調べるため0.5%スキムミルク水溶液を用いた方法とOIE(国際獣疫事務局)マニュアルに準じた方法(OIE, 2008)の2つの方法で実施した。

0.5%スキムミルク水溶液を用いる方法は、0.5%スキムミルク水溶液1mL中に供試菌をマクファーランド(McFarland)2(McF2)レベルに接種し、37℃下で溶液が完全に透明になるまでの時間を比較した。

OIEマニュアルに準じた方法は、供試菌を



図4 J培地にて37℃,4日間培養したときのアメリカ腐蝕病菌の植物型(左からA株, C株, E株)いずれもグラム陽性桿菌で形状的な差は認められなかった(グラム染色×1000)



図5 芽胞形成用の培地（ブドウ糖を除いたJ培地）で37℃、8日間培養したアメリカ腐蛆病菌  
ミルクテスト陽性のE株（右）では芽胞（白点状）が多く確認されたが、ミルクテスト  
陰性のA株（左）およびC株（中）では、芽胞が著しく少なかった（ニグロシン染色×1000）

OIE マニュアルに記してある方法で作成した培地（寒天 20 g/L および酵母エキス 10 g/L を加えた培地）を作成し、121℃ 15 分間蒸気滅菌する。滅菌後温度が冷めた同培地 70 mL 中に無脂肪牛乳 30 mL と濾過滅菌した 0.1% チアミン水溶液 1.5 mL を加えて作成）上に 1 µg 接種し、37℃ 下で接種周囲が完全に透明になるまでの時間を比較した。なお、試験はいずれも 3 反復で実施した。

## (2) ゼラチン液化テスト

供試菌 1 µg をニュートリエントゼラチン培地上に接種し、22℃ 下で接種周囲が完全に透明になるまでの時間を比較した。なお、試験はいずれも反復なしで実施した。

## 試験 II (16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析)

### 1 供試菌株

供試菌は、試験 I と同じ 3 つの菌株を用いた。

### 2 試験方法

供試菌の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、EzTaon-e を用いて各菌株の基準株の 16S

rRNA 遺伝子配列との相同性解析を実施した。さらに、Sequencher ver 4.8 および ClustalW を用いて 3 菌株塩基配列の比較解析を行った。

## 試験の結果

### 試験 I (タンパク分解性能および

#### タンパク分解酵素産性能試験)

#### 1 供試菌の芽胞形成度合い

試験に供試した芽胞型は、いずれも芽胞形成用培地（ブドウ糖を除いた J 培地）に J 培地にて 37℃ 炭酸ガス下で 3 日間培養した植物型を接種し、接種後同じく 37℃ 炭酸ガス下で 8 日間培養したものをを用いたが、ミルクテスト陰性事例から分離された A 株および C 株は、ミルクテスト陽性事例から分離された E 株と比べて芽胞型が明らかに少なかった（図 5）。

#### 2 カゼイン分解能テスト

ミルクテスト陰性を示したアメリカ腐蛆病菌（A 株と C 株）およびミルクテスト陽性を示したアメリカ腐蛆病菌（E 株）植物型が、0.5%

表 2 アメリカ腐蛆病菌植物型が 0.5% スキムミルク水溶液を透明化するまでの経時変化

菌株	反応時間 (hr), 37℃														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A (-)	×	×	×	×	×	△	△	△	△	△	△	○			
	×	×	×	△	△	△	△	△	△	○	○	○			
	×	×	×	△	△	△	△	○	○	○	○				
C (-)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△	△	△	○	○
	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△	△	○	○	○
	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	△	△	△	△	○
E (+)	×	×	△	△	△	△	△	○	○	○	○				
	×	×	△	△	△	△	△	○	○	○	○				
	×	×	×	×	△	△	△	△	△	△	○				

×変化なし，△半透明，○透明

試験年月日：2013.11.14，供試菌株：アメリカ腐蛆病菌（A, C, E 株）植物型，接種菌量：McF2

表3 アメリカ腐蛆病菌芽胞型が0.5%スキムミルク水溶液を透明化するまでの経時変化

菌株	反応時間 (hr), 37°C													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
A	×	×	×	×	×	×	×	×	△	○	●			
(-)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	○			
C	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	○	
(-)	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△	○	○
E	×	×	×	×	△	△	○	●						
(+)	×	×	×	△	△	△	△	○						

×変化なし, △半透明, ○透明

試験年月日: 2013.11.29, 供試菌株: アメリカ腐蛆病菌 (A, C, E 株) 芽胞型, 接種菌量: McF2

スキムミルク水溶液中のカゼインを分解し, スキムミルク水溶液を透明化するまでの経時的な変化を表2に示した. 結果, 3菌株中E株が最も早く透明化し, 次にA株, 最後はC株の順となった. 次にA株, C株およびE株芽胞型のカゼインの分解の経時変化を, 植物型の場合と同様に0.5%スキムミルク水溶液を用いて調

べた(表3). 結果, 芽胞型においても植物型同様な傾向で, E株が最も早く透明化し, 次にA株, 最後はC株の順となった. さらに, 型別(植物型と芽胞型)間でカゼインの分解を比較したところ, いずれの菌株においても芽胞型が植物型と比べて早く分解する傾向であった(表3).

また, 同様にOIE法マニュアルに準じた方法

表4 アメリカ腐蛆病菌植物型のOIEマニュアルに準じた方法における経時変化

菌株	反応時間 (hr), 37°C					
	6	12	24	30	48	72
A (-)	×	×	△	○		
C (-)	×	×	△	△	△	○
E (+)	×	×	△	○		

×変化なし, △半透明, ○透明

試験年月日: 2013.11.14, 供試菌株: アメリカ腐蛆病菌 (A, C, E 株) 植物型, 接種菌量: 1 μL

表5 アメリカ腐蛆病菌芽胞型のOIEマニュアルに準じた方法における経時変化

菌株	反応時間 (hr), 37°C					
	6	12	24	30	48	72
A (-)	×	×	○			
C (-)	×	×	△	△	○	
E (+)	×	△	○			

×変化なし, △半透明, ○透明

試験年月日: 2013.11.21, 供試菌株: アメリカ腐蛆病菌 (A, C, E 株) 芽胞型, 接種菌量: 1 μL

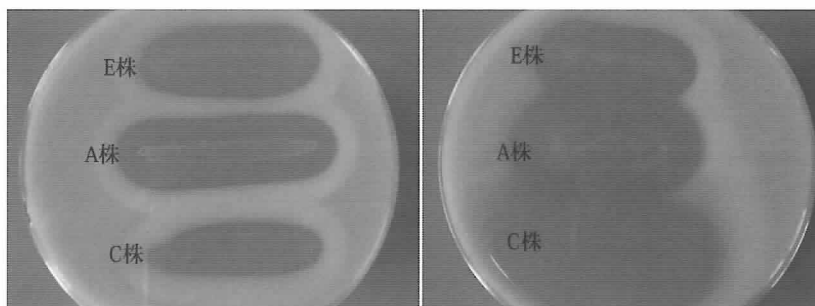


図6 アメリカ腐蛆病菌のOIEマニュアル法での試験結果(左:植物型, 右:芽胞型) 供試したすべての菌株の植物型および芽胞型のいずれでも培地が透明化したことから, カゼイン分解能を有することが確認された

表6 アメリカ腐蛆病菌植物型がゼラチンを液化するまでの経時変化

菌株	反応時間 (hr), 37°C					
	24	48	72	96	104	120
A (-)	×	×	×	×	○	○
C (-)	×	×	×	×	×	○
E (+)	○					

×変化なし, ○液化

試験年月日: 2013.11.14, 供試菌株: アメリカ腐蛆病菌 (A, C, E 株) 植物型, 接種菌量: 1  $\mu$ L

表7 アメリカ腐蛆病菌芽胞型がゼラチンを液化するまでの経時変化

菌株	反応時間 (hr), 37°C					
	24	48	72	96	104	120
A (-)	×	○				
C (-)	×	×	×	×	○	
E (+)	○					

×変化なし, ○液化

試験年月日: 2013.11.21, 供試菌株: アメリカ腐蛆病菌 (A, C, E 株) 植物型, 接種菌量: 1  $\mu$ L



図7 アメリカ腐蛆病菌のゼラチン液化試験の結果 (左: 植物型, 右: 芽胞型)  
供試したすべての菌株の植物型および芽胞型のいずれでも培地が  
透明化したことから, ゼラチン分解能を有することが確認された

で, ミルクテスト陰性を示した A 株と C 株およびミルクテスト陽性を示した E 株の植物型と芽胞型がチアミンを添加したミルク培地中のカゼインを分解し透明化するまでの経時変化を表 4, 5 および図 6 にまとめた. 結果, ミルク培地を透明化するのに要した時間は植物型および芽胞型いずれにおいても, E 株と A 株が最も早く透明化し, 次に C 株の順となった.

### 3 ゼラチン液化テスト

ゼラチン液化テストの結果を表 6, 7 および図 7 に示した. 結果, ニュートリエントゼラチン培地を液化するのに要した時間は植物型および芽胞型いずれにおいても, 0.5% スキムミルクを用いた時とほぼ同様な結果で, E 株が最も早く液化し, 次に A 株, 最後は C 株の順となった.

### 試験 II (16S rRNA 遺伝子塩基配列の解析)

3 菌株 (A 株, C 株 および E 株) の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解析した結果, ① 3 菌株は, すべてアメリカ腐蛆病菌の基準株の配列と 99.9% 以上の相同性であった. ② A 株および C 株の塩基配列は, 100% 一致した. ③ E 株と A および C 株間では, 4 か所の塩基で相違が確認された (表 8).

### 考 察

ミルクテスト陰性事例から分離されたアメリカ腐蛆病菌 (A 株と C 株) およびミルクテスト陽性事例から分離されたアメリカ腐蛆病菌 (E 株) のタンパク分解酵素産性能を試験 I で比較したが, タンパク分解酵素産性能は, 菌株の種類により差 (E 株 > A 株 > C 株) があること, さらに, 植物型と芽胞型という菌の型別の違いによって大きな差 (芽胞型 > 植物型) があるこ

表8 アメリカ腐蛆病菌 (A, C, E 株) における 16S rRNA 遺伝子の塩基配列

A&C	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC	T	TTCCG	60
E	GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC	Y	TTCCG	60
A&C	GAGACGCCAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCG			120
E	GAGACGCCAGGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACCG			120
A&C	GGATAACTTGGCGAAACGTGAGCTAATACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTC			180
E	GGATAACTTGGCGAAACGTGAGCTAATACCGGATAGCTGGTTTCTTCGCATGAAGAAGTC			180
A&C	ATGAAAGACGGGGCAACCTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTA			240
E	ATGAAAGACGGGGCAACCTGTCACTTACAGATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTA			240
A&C	GGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACT			300
E	GGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACT			300
A&C	GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG			360
E	GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGG			360
A&C	ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCT			420
E	ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCT			420
A&E	GTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAAGA			480
E	GTTGCCAAGGAAGAACGGCCAGGGGAGTAACTGCCCTGGAGTGACGGTACTTGAGAAGA			480
A&C	AAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCG			540
E	AAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCG			540
A&C	GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCGGG			600
E	GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCGGG			600
A&C	CTCAACCCCGTTTCGCACTGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGAATT			660
E	CTCAACCCCGTTTCGCACTGAAACTGGGAGACTTGAGTGTAGGAGAGGAAAGTGAATT			660
A&C	CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGCACTTT			720
E	CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGCACTTT			720
A&C	CTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT			780
E	CTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT			780
A&C	GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCC			840
E	GGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTAGGGGTTTCGATACCCTTGGTGCC			840
A&C	GAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG			900
E	GAAGTTAACACAGTAAGCATTCCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGG			900
A&C	AATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGA			960
E	AATTGACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGA			960
A&C	ACCTTACCAGGCCTTGACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGACAGACTTTTCTTCCGGGGA			1020
E	ACCTTACCAGGCCTTGACATCCCTCTGACCGGTTTAGAGAYAGAYCTTTTCTTCCGGGGA			1020
A&C	CAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGT			1080
E	CAGAGGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGT			1080
A&E	CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGGTGGGCACTCTAAGA			1140
E	CCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCACGCAGAGGTGGGCACTCTAAGA			1140
A&C	TGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT			1200
E	TGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT			1200
A&C	GGCCTGGGCTACACACGTAATAATGGTTCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGG			1260
E	GGCCTGGGCTACACACGTAATAATGGTTCGGTACAACGGGAAGCGAAGGAGCGATCCGG			1260
A&C	AGCCAATCCTCAAAGCCGATCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG			1320
E	AGCCAATCCTCAAAGCCGATCTCAGTTCCGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAG			1320
A&C	TCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA			1380
E	TCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTA			1380
A&C	CACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAG			1440
E	CACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTACAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAG			1440
A&C	CGGAAGGTGC			1510
E	CGGAAGGTGC			1510

・網掛けは相違のあった箇所

・R は A または G, Y は C または T

とが明らかとなった。これらの結果から、ミルクテスト陰性の原因のひとつは、何らかの原因によりスケール中のアメリカ腐蛆病菌の型別割合（菌相）が、植物型が多く芽胞型が少なかったことに起因していると考えられた。

小菅ら（2013）は、ミルクテスト陰性の要因の一つとして、植物型および芽胞型という菌相の違いがタンパク分解酵素の作用に関与することから、供試時の菌相の違いによると報告しており、今回実施した試験Ⅰの結果で得られた結論と同じであった。しかし、小菅ら（2013）の試験結果と異なった点も一か所確認されている。小菅ら（2013）の報告では、培養5日目の芽胞型を用いたミルクテストでは、反応時間が一夜にもかかわらず透明化しなかったと報告している。今回著者らが実施した培養8日目の芽胞型を用いた0.5%スキムミルク水溶液の試験では、いずれも37℃下で接種後8から13時間以内にスキムミルク水溶液は透明化している。結果の違いについては、接種菌量、接種菌の芽胞形成度合い、反応時間などいろいろと異なる条件があることから、試験結果が異なった理由について不明である。

*Bacillus* 属および *Clostridium* 属などの桿菌は、外界の条件が悪化すると染色体を凝集し、リボゾームとタンパクの一部を濃縮して硬い被膜で覆う芽胞を形成する（見上、2006）。一般にタンパク分解酵素は、芽胞形成段階の一過程である皮層が形成される時に、皮層中のペプチド鎖を切断するために産生される（吉田ら、2007）。このことはアメリカ腐蛆病の原因菌であるアメリカ腐蛆病菌も同様で従来より芽胞の形成時にタンパク分解酵素を産生することは知られている。しかし、タンパク分解酵素の産生は芽胞の形成時のみではなく、増殖中の植物型においても産生量は少ないが確認されている（東ら、1992）。今回、試験ⅠでA株、C株およびE株の計3つの菌株の植物型と芽胞型のタンパク分解酵素産生能について調べたが、これまでの報告同様、いずれの菌株および菌型においてもタンパク分解酵素の産生が確認され、さらに、菌型で比べた場合、芽胞を形成してい

る芽胞型の方が発育中の植物型と比べてタンパク分解酵素の産生量が多い結果となった。

次に芽胞形成について、今回試験Ⅰで供試した芽胞型は、いずれも芽胞形成用培地（ブドウ糖を除いたJ培地）を37℃炭酸ガス下で8日間培養したものをを用いたが、ミルクテスト陰性事例から分離されたA株およびC株は、ミルクテスト陽性事例から分離されたE株と比べて芽胞型が明らかに少なく、芽胞形成が遅いと考えられた。原因は明らかではないが、芽胞形成が遅いことが、タンパク分解酵素の産生量に大きく影響し、結果的にミルクテスト陰性につながった可能性は否定できない。

一般的に植物型の細菌に芽胞が作られていく過程、すなわち芽胞形成は、細菌内にある芽胞形成の遺伝子群（*spo* 遺伝子）の働きによるもので、これら遺伝子の働きにより芽胞形成に特異的なタンパク質が逐次合成される（吉田ら、2007）。*spo* 遺伝子は、生育環境中の栄養分の枯渇または何らかの原因で細胞内のカタボライト（分解産物）の濃度が減少すると、それまで発現が抑えられていた *spo* 遺伝子が発現して芽胞形成が始まる（渡部、2012; 小林、1983）。また、*spo* 遺伝子の中で *spoO* 遺伝子に変異や欠損などが認められた場合、タンパク分解酵素の産生がないか低下する（小林、1983）。

今回、試験Ⅱでアメリカ腐蛆病菌同定の際に用いられる特異遺伝子である16S rRNA 遺伝子の塩基配列を確定し比較解析を行ったところ、ミルクテスト陰性事例から分離されたA株およびC株は、ミルクテスト陽性事例から分離されたE株と比べて4か所の塩基で相違が確認された。現在までにアメリカ腐蛆病菌の芽胞形成やタンパク分解酵素産生に係わる遺伝子については明らかにされていないため、4か所塩基の相違が芽胞形成の遅延やタンパク分解酵素産生量低下に関連しているかは不明である。

残された課題は大きく2つ考えられた。第1の課題は、一連の試験を通してミルクテスト陰性事例から分離されたアメリカ腐蛆病菌A株とC株の16S rRNA 遺伝子の塩基配列に確認された4か所の相違と芽胞形成の遅延やタンバ

ク分解酵素産生量低下との関連性を明らかにすることである。第2の課題は、アメリカ腐蛆病菌はJ培地上では半透明円形無色の集落を形成するが、ミルクテスト陰性事例から分離されたアメリカ腐蛆病菌 A 株および C 株の集落は、培養時間の経過とともに集落が赤色を呈した。このことから、これまでのアメリカ腐蛆病菌の生化学性状と比べて異なる性状があると考えられることから、生化学性状の詳細について明らかにすることである。

(愛知県西部家畜保健衛生所尾張支所

〒486-0851 愛知県春日井市篠木町 8-2673-5)

## 謝辞

遺伝子解析の実施ならびにご助言をいただいた。独立行政法人農業・食品産業総合研究機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域の高松大輔主任研究員に深謝する。

## 引用文献

- 東量三, 奥村隆史, 吉田忠晴, 児玉一美, 井上敦夫. 1992. ミツバチの飼養管理とその衛生対策—腐蛆病を中心に. 社団法人日本養蜂はちみつ協会, 東京, p. 4.
- 片岡敦子. 2006. 獣医感染症カラーアトラス第2版. 文永堂, 東京. pp. 180-181.
- 小林泰夫. 1983. 日本細菌学雑誌 38: 15-18.
- 小菅千恵子, 前田卓也. 2014. 獣医畜産新報 67: 109-112.
- 農林水産省畜産局. 2008. 病性鑑定マニュアル第3版. 全国家畜保健衛生業績発表会協賛会, 東京. pp. 380-382.
- OIE. 2008. OIE Terrestrial Manual. pp. 395-404.
- 渡部一仁. 2012. 防菌防黴誌 40: 535-545.
- 吉田眞. 2007. 戸田新細菌学改訂 33 版. 南山堂, 東京, pp. 55-59.

NAOKAZU MINOGUCHI and YUKO HIRAI. An examination of cases of American Foul Brood (AFB) that showed negative in the milk test. *Honeybee Science* (2014) 29 (1/2): 33-40. Owari Branch of Seive Livestock Hygiene Service Center, 8-2673-5, Shinogi-cho, Kasugai, Aichi, 486-0851 Japan.

From April, 2012 to October, 2013, a total of five cases of American Foul Brood (AFB) were reported; of them, four tested negative in the milk test. To clarify the cause of the negative milk test results, we investigated for any variations in the protease production of *Paenibacillus larvae* (A and C strains) which had been isolated from the negative milk test cases, and that of *P. larvae* (E strain), which had been isolated from the positive case, as well as the base sequence in the 16S rRNA gene. As the result, the following findings were observed: (1) Both the vegetative form and spore form in each strain had the ability to break down proteins such as casein and gelatin. (2) The protease production of vegetative and spore forms was at its highest in E strain, followed by A strain, and then C strain. (3) The protease production by form (vegetative or spore) in each strain was higher in the spore form than in the vegetative form. (4) Spore formation was conspicuously slower in A strain and C strain than in E strain. (5) The base sequence of the 16S rRNA gene in each strain showed 99.9% or higher homology to the type strain. (6) The base sequence of the 16S rRNA gene in A strain and C strain matched 100%; a difference was observed at four sites in the base between E strain and A strain or C strain.

From the above findings, it was inferred that the form-specific ratio of *P. larvae* inside the scale (more vegetative forms and fewer spore forms) had very likely contributed to the negative results of the milk test.