

ミツバチの病原体ヨーロッパ腐蛆病菌の 迅速・正確な検出法の開発

SATテクノロジー・ショーケース2016

■ はじめに

ミツバチは多くの作物の受粉に利用されている農業を陰で支える重要な昆虫です。従って、ミツバチの健康を守ること、健全な農業を守っていくことにつながります。

ヨーロッパ腐蛆病は家畜伝染病予防法で法定伝染病に指定されているミツバチの幼虫の重要な細菌感染症です。本病の診断には、発症した幼虫から原因菌であるヨーロッパ腐蛆病菌を検出することが必要ですが、一般的に行われている培養法による菌の検出は時間がかかりすぎるという欠点があります。この欠点を克服するために、幼虫からヨーロッパ腐蛆病菌そのものではなく、菌の遺伝子を検出することによってより短い時間で診断を行う方法も開発されています。しかし、これまで報告された方法は特異性に問題があり、ミツバチの飼育環境中にいる他の菌をヨーロッパ腐蛆病菌と誤って検出してしまう危険性もありました。

本研究では、ヨーロッパ腐蛆病の診断に関する諸問題を解決するために、迅速かつ既報の方法よりも正確にヨーロッパ腐蛆病菌の遺伝子を検出できるPCR法を開発しました。

■ 活動内容

1. Duplex PCR法の設計

ヨーロッパ腐蛆病菌株は遺伝子型の違いによって3つのグループ(CC3, CC12, CC13)に分けることができ、CC12の菌株は他のグループの菌株と大きく性状が異なることがわかってきました。そこで、病気の診断と同時に各症例の疫学的な情報も得られるように、1つの反応の中でCC12の株とCC3/CC13の株を別々に検出できるDuplex PCR法を設計しました。最適化した条件で本PCR法を試みたところ、ヨーロッパ腐蛆病菌からはCC12株またはCC3/CC13株に特異的な増幅産物のみが得られました。

2. 特異性の確認

これまでに報告されていたPCR法では、死亡した幼虫に二次感染する腸球菌も誤って検出してしまう場合があります。一方、本PCR法では、腸球菌を含むヨーロッパ腐蛆病菌以外の菌(約30菌種)からは、遺伝子の増幅は全く認められませんでした。従って、特異性の極めて高い検出法であるといえます。

3. 感度の確認

本PCR法では、1反応あたり50コピー程度の染色体DNAがあればヨーロッパ腐蛆病菌の検出が可能であるこ

とがわかりました。

4. 幼虫からのヨーロッパ腐蛆病菌遺伝子の検出

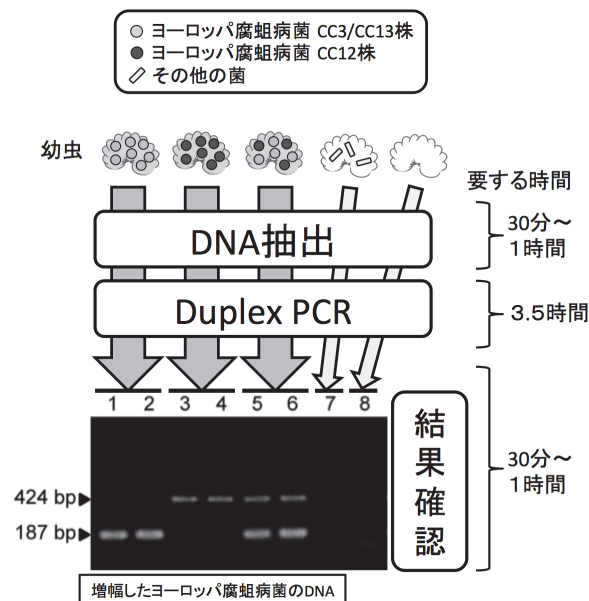
本PCR法では、ヨーロッパ腐蛆病を発症した幼虫から抽出したDNAを用いて、幼虫内のヨーロッパ腐蛆病菌を直接検出することもできることがわかりました。菌を分離培養する必要がないため、検査時間を大幅に短縮できます。

■ 関連情報等

関連論文

[1] Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, Onishi H, Osaki M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Takamatsu D. PLOS ONE. 82012) 7, e33708.

[2] Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D. 2014. J. Vet. Med. Sci. (2014) 76, 491-498.



ヨーロッパ腐蛆病菌遺伝子検出法の概要と
検査に要する時間

代表発表者 高松 大輔 (たかまつ だいすけ)
所 属 国立研究開発法人 農研機構
動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域
問合せ先 〒305-0856 つくば市観音台3-1-5
TEL: 029-838-7754 FAX: 029-838-7754
p1013dt@affrc.go.jp

■キーワード: (1)ミツバチ
(2)ヨーロッパ腐蛆病
(3)PCR法