

# 日 生 研 報

第70巻 第2号(通巻631号) 2024年(令和6年)4月

## 挨拶・巻頭言

バランス、その徒然なるままに！  
..... 山手丈至 (2)

## レビュー

養蜂業で使用されている抗生物質と  
腐蝕病菌の薬剤耐性機構  
..... 高松大輔 (3)

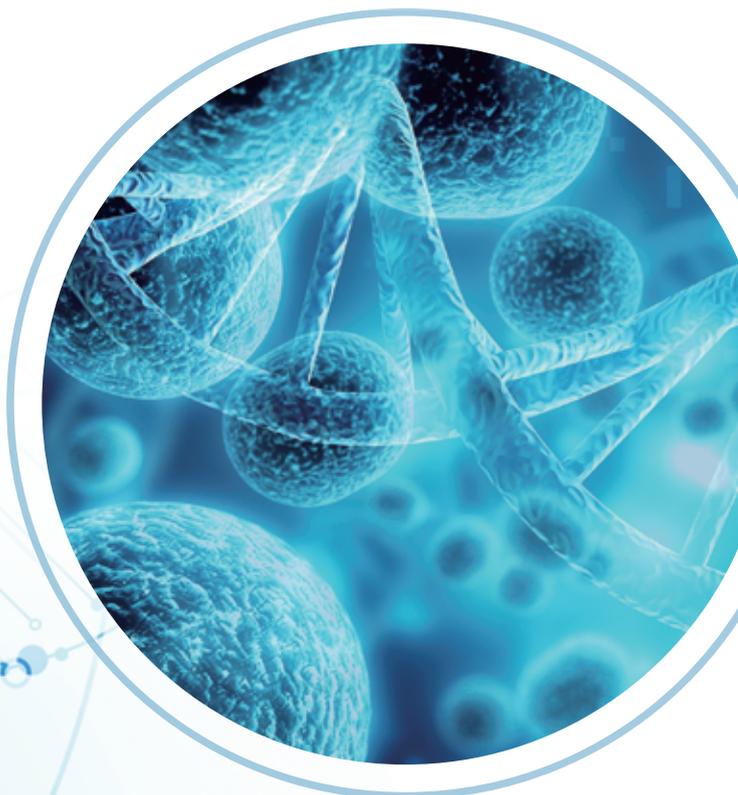
アフリカ豚熱の血清診断法  
—p11.5 ELISAの開発—  
..... 渡邊瑞季 (12)

## 記録

学会発表演題 ..... (20)

## おしらせ

編集後記 ..... (20)



## バランス、その徒然なるままに！

山手丈至

食物連鎖は生命誕生後脈々と築かれてきた見事なまでの生態系のバランスといえる。環境の汚染・破壊、そして、残念ながら今も続くウクライナ戦争やあちこちで絶えない民族間の紛争など、バランスを欠く人間のエゴは地球規模での生態系を壊しつつある。地道ではあるが、SDGsの目標に向け個々人の意識の持ち方や取り組みが重要となる。インバランスを断ち切る叡智の結集が求められる。

「山路を登りながら、こう考えた。智に働けば角が立つ。情に棹させば流される。意地を通せば窮屈だ。とかくに人の世は住みにくい。」夏目漱石の著書「草枕」の冒頭文である。人生哲学が込められている。古希が近づく私にとってこの意味するところは、拙い人生経験ではあるが、それとなく分かる。「知性」「感情」「意志」という3つの精神、それらのバランス感覚を保つことの重要性が説かれている。では、どのように生きればよいのだろうか。「……住みにくいと悟った時、詩が生れて、画（え）が出来る。人の世を作ったものは神でもなければ鬼でもない。矢張り向う三軒両隣りにちらちらする唯（ただ）の人である。」と続く。芸術や文学、そして人とのつながりや何気ない会話が、豊かな潤いのある人生を作りだすと解釈できる。このような創造力や想像力は、人類が進化の過程で発達させた大脳新皮質が司る。人が人らしい所以である。

転じて、私たち多細胞生物は、細胞個々の相互のコミュニケーションにより、体内外からの攪乱作用（ストレス）を受けても最小限の影響に留め、健全な生理的状态を保つバランス機能が備わっている。これが「ホメオスタシス（恒常性）」である。私見ではあるが「知性」「感情」「意志」は、それぞれ恒常性に係わる「自律神経」「内分泌」「免疫」と置き換えることが出来るかもしれない。この3つのシステムの司令塔が「脳機能」である。ユニークな創造力を生み出し、他人を思う想像力を育む原動力は、恒常的な精神活動による思惟力に依拠すると考える。あながち外れていないと思う。

しかし、私たちの生体機構において時にバランスの乱れが生じることがある。最近高校生を対象にした公開講座を依頼され、生物の多様な生命現象の「おもしろさ」について話すとともに、私が専門とする獣医学、特に病理学とからめて、病の成り立ちについて解説した。細胞負荷によりタンパク質の立体構造が壊れると小胞体ストレスが生じアポトーシスが誘導されたり、時にアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症と関連すること。また、肝機能障害では黄疸や肝性脳症が、そして慢性腎臓病では尿毒症、線維性骨異栄養症や転移性石灰沈着症が生じるなど。その際、聴講していた生徒さんは背筋を伸ばし、前を向き、眼が輝きはじめた。「病」のメカニズムを知ることは生物の授業がより魅力的に映るようだ。

「正常から異常の、異常から正常のメカニズム」を解明すること。そこに生命を科学する醍醐味がある。すなわち、生物学は、生体イベントである「生老病死」の機序を明らかにし、生命現象の原理・原則をみつけ、有用な活用方法を探究する学術領域と捉えることができる。本研究所の定款第3条には「当法人は、生物科学特に動物の生理及び病理についての研究調査を行うとともに、それらに応用した動物用医薬品等の研究を行い、学術の振興及び畜産の発達並びに公衆衛生の進歩に寄与することを目的とする。」とある。まさに、生物学の神髄である「基礎から応用、そしてワクチン開発を通じた社会貢献」が一つのバランス軸として明確に謳われている。

生命はまだまだ不可思議に満ち溢れている。「生態学的バランスとは？」自問しながらあるべき未来の地球を創りだして欲しい。John Lennon の「imagine」を口ずさみながら……。若い研究者の意欲に期待したい。

（評議員）

## レビュー

養蜂業で使用されている抗生物質と  
腐蛆病菌の薬剤耐性機構たかまつだいすけ  
高松大輔 (農研機構動物衛生研究部門 動物感染症研究領域)

## はじめに

ミツバチはハチミツ採取の目的だけではなく、多くの果物や作物の受粉に利用されている世界の農業を支える重要な生物資源の一つである。従って、健康な蜂群を維持し、健全な農業を守っていくためには、ミツバチの健康を脅かす一つ一つの要因について十分な調査・研究を行っていく必要がある。ミツバチは、産卵を専門とする1匹の女王蜂、数千から数万匹の働き蜂、そして繁殖の季節にだけ出現する雄蜂で1つのコロニー（蜂群）を形成している。女王蜂に産み落とされた卵から孵化した幼虫は、働き蜂に育てられて3週間程度で成虫になる。成虫となった働き蜂は、初めは巣の中で、掃除、育児、巣作り、ハチミツの貯蔵などの仕事を行い、その後、巣の外に出て餌を集める。すなわち、ミツバチの社会構造は、巣の内側から外側に蜂が溢れ出す構造になっている。巣の外には捕食者をはじめ様々な危険があり、餌集めの途中に命を落とす蜂も多い。しかし、女王蜂の産卵が活発な蜂群では、毎日たくさんの新しい幼虫が生まれ、たくさんの働き蜂が羽化して働き手が補充されるので、蜂群にとっては大きな

ダメージにはならない。一方、蜂群の維持に必要な幼虫が大量に死んでしまうと、産卵以外の全ての仕事を担う働き蜂の供給が途絶えてしまい、蜂群は一気に弱体化する。すなわち、幼虫や蛹などの蜂児の健康に悪影響を与える要因は、蜂群全体の重大な健康リスクとなる。

ミツバチの健康を脅かす要因には様々なものがあるが、感染症も大きな問題の一つである。特に、蜂児に感染死を引き起こし、蜂群崩壊の引き金にもなる細菌感染症「腐蛆病」は、最も重要な病気の一つであり、家畜伝染病予防法で家畜伝染病に指定されている。死んだ幼虫や蛹が腐るという共通の症状のため、まとめて腐蛆病と呼ばれているが、この病気にはアメリカ腐蛆病菌 (*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という2つの感染症が含まれている。いずれも細菌感染症であるため、そのコントロールに抗生物質が使用される場合があるが、ハチミツへの残留の懸念に加え、海外では薬剤耐性腐蛆病菌の出現も問題になっている。例えば、アメリカでは、オキシテトラサイクリン (OTC)、タイロシン (TS)、リンコマ

表1 国内外で養蜂に使用されている主な抗生物質

抗生物質	対象 疾病 <sup>a</sup>	使われている ／使われていた主な国	備考
マクロライド系	ミロサマイシン	AFB 日本	1999年に承認。現在は販売中止。 日本で本剤に耐性を示す <i>M. plutonius</i> 株の存在が確認されている [8]。
	タイロシン	AFB, EFB アメリカ、カナダ、日本	日本では2017年9月に承認（対象疾病はAFBのみ）。 北米で本剤に耐性を示す <i>P. larvae</i> 株の存在が確認されている [3]。
リンコサミド系	リンコマイシン	AFB アメリカ、カナダ	北米で本剤に耐性を示す <i>P. larvae</i> 株の存在が確認されている [3]。
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	AFB, EFB イギリス、アメリカ、カナダ、インド、アルゼンチン、スロバキア、オーストラリア	複数の国で本剤に耐性を示す <i>P. larvae</i> 株の存在が確認されている [1-3, 9]。

<sup>a</sup>AFB, アメリカ腐蛆病、EFB, ヨーロッパ腐蛆病

イシン (LCM) がアメリカ腐蝕病のコントロールに使用されているが (表 1)、いずれの薬剤に対する耐性 *P. larvae* 株もすでに検出されている [1-4]。

一方、国内では、16 員環マクロライドであるミロサマイシン (MRM) がアメリカ腐蝕病の予防薬として 1999 年に承認され、アピテンという商品名で販売されていた。しかし、アピテンが販売中止になったため、代わりに同じ 16 員環のマクロライドである TS が 2017 年 9 月に承認され、現在、唯一の承認アメリカ腐蝕病予防薬として使われている (表 1)。このように日本では、1999 年以降 20 年以上も養蜂にマクロライドが使用されてきたことになるが、国内の腐蝕病菌株の中にこれらの薬剤に耐性を示す株が存在するののかについては、著者らが腐蝕病研究に取り組むまではほとんど調べられていなかった。本稿では、著者らの薬剤感受性調査結果を紹介するとともに、腐蝕病菌の薬剤耐性機構や耐性化リスクについて、研究データを紹介しながら考察したい。

#### 国内で分離される腐蝕病菌株の遺伝子型とマクロライドに対する感受性

いずれの腐蝕病菌も菌株間で遺伝的な多様性がみられ、遺伝子型別でいくつかのグループに分けられている。2023 年 9 月現在、*P. larvae* 株は ERIC 型別という遺伝子型別法で I 型~V 型に、Multilocus sequence typing (MLST) で 48 種類の sequence type (ST) に分けられており、日本では、ERIC 型別では I 型と II 型、MLST では ST2、ST10、ST11、ST15、ST18、ST24 に型別される株が分離されている [5]。一方、*M. plutonius* 株には、2023 年 9 月現在、MLST で 40 種類以上の ST が報告されている。これらの ST は、さらに 3 つのグループ (CC3, CC12, CC13) に大別することができるが、日本ではいずれのグループの株も分離されている [6]。

一般的に、抗生物質を使用すれば、薬剤耐性菌の出現は避けられない。実際に海外では、薬剤耐性 *P. larvae* 株が複数の国で確認されている。一方、MRM がアメリカ腐蝕病予防薬として承認される前に日本で行われた *P. larvae* 株の薬剤感受性調査によると、1987 年~1994 年の間に分離された供試株 28 株は全て、MRM と TS のいずれにも高い感受性を示していた (最小発育阻止濃度 [MIC] はそれぞれ

れ、 $\leq 0.05 \mu\text{g}/\text{mL}$  及び  $\leq 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) [7]。しかし、MRM 承認以降は、同様の調査は全く行われておらず、予防薬使用による *P. larvae* への影響は不明であった。MRM も TS も、日本ではアメリカ腐蝕病の予防薬として承認されているが、予防薬として症状のない蜂群に薬を使用した場合、そこにたまたま居合わせた *M. plutonius* も薬に暴露されることになる。したがって、アメリカ腐蝕病予防薬が標的でない *M. plutonius* へも何らかの影響を与える可能性があるが、日本では *M. plutonius* 株の薬剤感受性についても調査が行われていなかった。

そこで著者らは、1993 年から 2017 年の間に日本各地で分離された *P. larvae* 100 株と 1982 年以前から 2016 年までの間に分離された *M. plutonius* 79 株 (国内分離株 77 株とイギリス及びパラグアイ由来株 [各 1 株]) を用いて、MRM と TS に対する薬剤感受性試験を行った [5, 8]。その結果、供試した全ての *P. larvae* 株はいずれの薬剤にも高い感受性を示し (MIC:  $\leq 0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、耐性株は確認されなかった (図 1) [5]。調査時点で既に 20 年近くマクロライド系の薬剤が使用されていたにもかかわらず、耐性株がいなかった事実は少々驚きではあったが、養蜂関係者にとっては良いニュースであった。一方、*M. plutonius* も全ての株が TS には高い感受性を示したが (MIC:  $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ )、半数以上の国内分離株は MRM への感受性が低下しており (MIC: 16-64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、耐性株とみなされた (図 1) [8]。

#### *M. plutonius* の MRM 耐性化機構

マクロライド系抗生物質は、細菌のリボソーム 50S サブユニットの構成要素である 23S rRNA に結合し、タンパク質の合成を阻害して抗菌作用を示す。これに対して細菌は、「薬剤の細胞外への排出」、「薬剤の分解・修飾による不活性化」、「リボソームを構成するタンパク質や 23S rRNA の変異もしくは 23S rRNA のメチル化による構造変化による薬剤の結合阻害」などの手段を使い、マクロライドに対する耐性を獲得する (図 2A)。

著者らは、日本の *M. plutonius* 株における MRM 耐性メカニズムを解明するため、耐性株と感受性株のゲノムの詳細な比較を行った。その結果、23S rRNA の 748 番目のグアニンをメチル化する酵素の

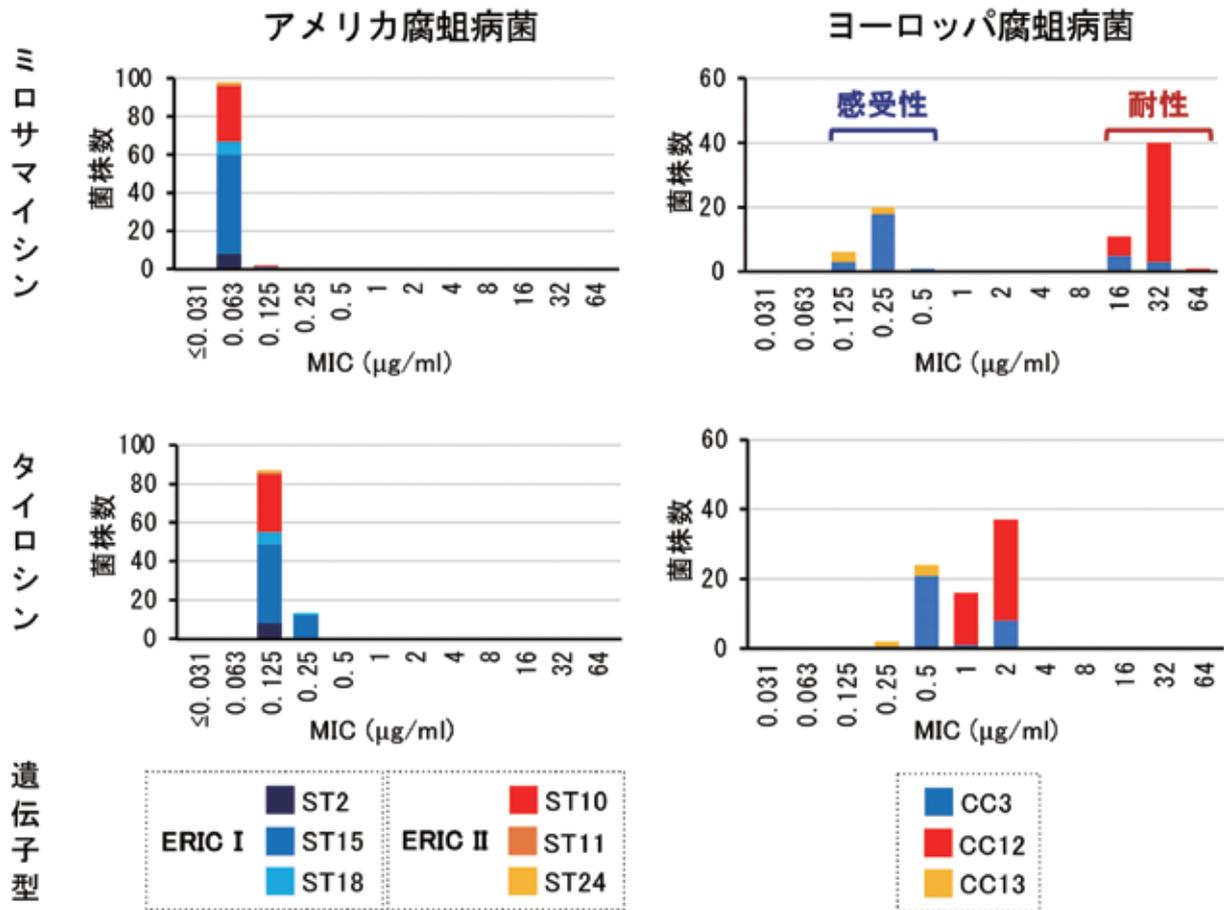


図1 *P. larvae* 株 (100 株) と *M. plutonius* 株 (79 株) の MRM と TS に対する感受性。横軸は各薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ])、縦軸はその濃度で発育が阻止された菌株の数を示す。*P. larvae* 株は全て国内分離株。*M. plutonius* 株にはイギリス由来株 (1 株) とパラグアイ由来株 (1 株) も含まれるが、両株はともにいずれの薬剤にも感受性を示した。一方、*M. plutonius* の国内分離株では、MRM に対して耐性を示す株が確認された。

遺伝子 (*rlmA<sup>H</sup>*) が、耐性株では正常なのに対し、感受性株では1塩基の挿入によるフレームシフトによって偽遺伝子になっていることを発見した (図2B)。さらに、MRM 耐性 *M. plutonius* 株 (MIC, 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) から *rlmA<sup>H</sup>* 遺伝子を欠失させた結果、欠失株が MRM 感受性 (MIC, 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) に変化したことから、*M. plutonius* における MRM への耐性には、RlmA<sup>H</sup> による 23S rRNA のメチル化が関与していることが明らかになった [8]。

MRM 感受性株では *rlmA<sup>H</sup>* は点変異でその機能を失ってはいたが、著者らが調べた、またはゲノム配列が公開されている全ての *M. plutonius* 株は、分離国にかかわらず *rlmA<sup>H</sup>* 遺伝子を有していた [8]。このような普遍的な *rlmA<sup>H</sup>* の保有は、*M. plutonius* の祖先がもともと MRM に耐性であったことを示唆している (図3)。しかし、興味深いことに、調査した全ての海外株の *rlmA<sup>H</sup>* は、今回発見されたも

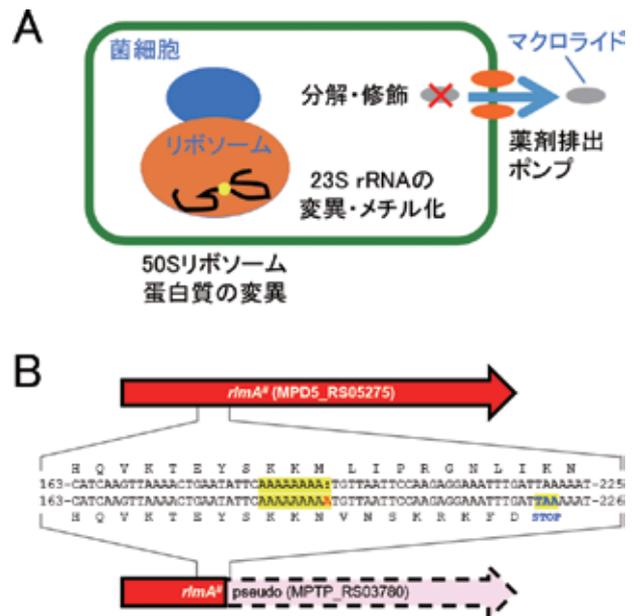


図2 マクロライド系抗生物質に対する主な耐性機構 (A) と MRM 感受性 *M. plutonius* 株に見られたメチル基転移酵素遺伝子の変異 (B)

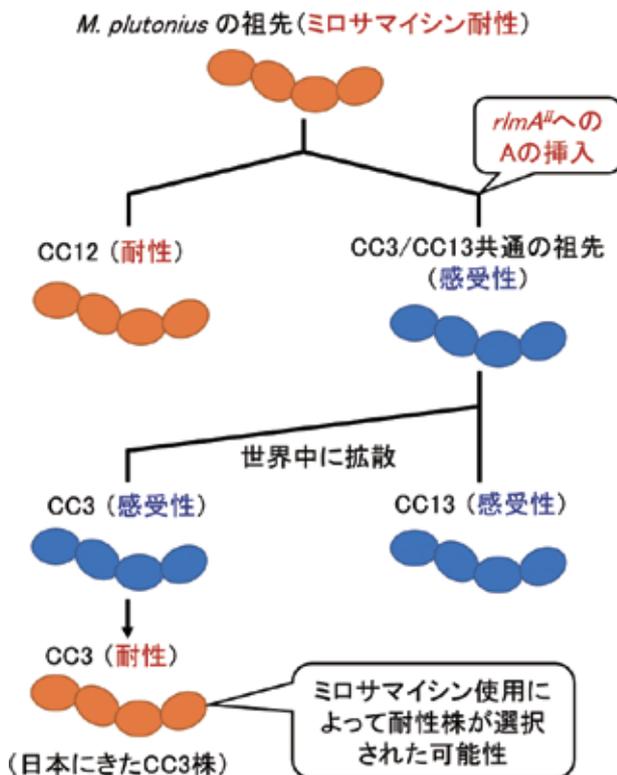


図3 *M. plutonius* 株の多様化とその過程で起こったMRM への感受性の変化に関する仮説

のと同じ塩基挿入によって破壊されていた。これらの海外株はCC3またはCC13に属し、日本のMRM 感受性株も全てCC3またはCC13に属する。一方、調査したCC12株は全てMRM 耐性であった。*M. plutonius* の3つのグループのうち、CC3とCC13の株は互いに近縁であるのに対し、CC12の株は遺伝的にも表現型的にもCC3やCC13の株とは異なる[6]。分離国を問わず、CC3及びCC13株で $rimA^{II}$ に同一の点変異が存在することは、この変異がCC3株とCC13株の共通祖先で起こり、その後、その子孫がこの変異を伴ったまま世界中に広がったことを示唆している(図3)。一方、CC12株は、MRM 耐性の表現型を祖先から受け継いだまま維持し続けていると思われる(図3)。

我々の知る限り、MRM は日本でのみ養蜂に使用されていた。調査株数は限られているものの、CC3の中でMRM 耐性株(すなわち、正常な $rimA^{II}$ を持つ株)は日本でのみ見つかっている。MRM はアメリカ腐蝕病に対する薬剤であり、*M. plutonius* は標的病原体ではない。しかし、このマクロライドは予防薬として使用されていたため、临床上健康な蜂群にたまたまいた*M. plutonius* が薬に暴露されていた可能性がある。日本のCC3株にはMRM 耐性株

とMRM 感受性株が存在するが(図1)、MRM 耐性株はすべてMRM が予防薬として承認された後に分離された株である[8]。従って、アメリカ腐蝕病予防薬としてのMRM の使用は、日本の*M. plutonius* 株の薬剤感受性に影響を与えた可能性がある(図3)。

### *P. larvae* の OTC 耐性機構

著者らの調査では、日本では幸いTS 耐性*P. larvae* 株は見つからなかったが、北米では、これまでに使われてきたOTC、TS、LCM のいずれの薬剤に対しても耐性*P. larvae* 株が見つかる[3]。また、海外で最も広く使われてきたOTC に対しては、北米以外でも耐性株が検出されている[1, 9]。では、*P. larvae* はどのようなメカニズムで薬剤耐性を獲得したのだろうか? TS と LCM に関しては、まだその耐性機構は明らかにされていないが、OTC 耐性*P. larvae* 株に関してはテトラサイクリン系薬剤を排出するポンプの遺伝子( $tet(L)/tet(K)$ )を乗せた小型のプラスミドを獲得することによって耐性化していることが明らかになっている[10-13]。そして興味深いことに、このプラスミド上の耐性遺伝子と同じ $tet(L)$ や $tet(K)$ をハチミツ中に混入する腐蝕病菌ではない細菌が保有していたという報告もされている[14]。ハチミツは無菌のものではなく、多様な生きて菌が含まれている。そして著者らも実際に、ハチミツ中の菌からテトラサイクリン耐性遺伝子を持つ小型のプラスミドを見つけている[15]。

*P. larvae* は、環境中では芽胞の状態で眠っているが、ミツバチの幼虫に経口的に摂取されると中腸内で発芽して栄養型の菌が腸内を埋め尽くすほど増殖する。ミツバチの幼虫は自分で餌を獲れないため、育児係の働き蜂(育児蜂)に餌を与えられて育つ。働き蜂になる幼虫は、最初は育児蜂が分泌するミルク(ローヤル/ワーカーゼリー)を与えられるが、3日目以降はハチミツや花粉も与えられて育つ。そのため、*P. larvae* は幼虫の腸内でハチミツ中の菌と出会う可能性があり、おそらくそこで耐性遺伝子に乗せたプラスミドを受け取り、OTC 耐性を獲得したと思われる。

**P. larvae の TS 耐性化リスク**

上述の OTC 耐性化メカニズムの仮説が正しいとすると、同じようなメカニズムで TS 耐性 *P. larvae*

株が出現する可能性が考えられる。では、本当にそんなことが起こりうるのか？国産ハチミツの中には、*P. larvae* を TS 耐性化させる可能性のあるマクロライド耐性遺伝子を持った菌は存在するのだろうか？

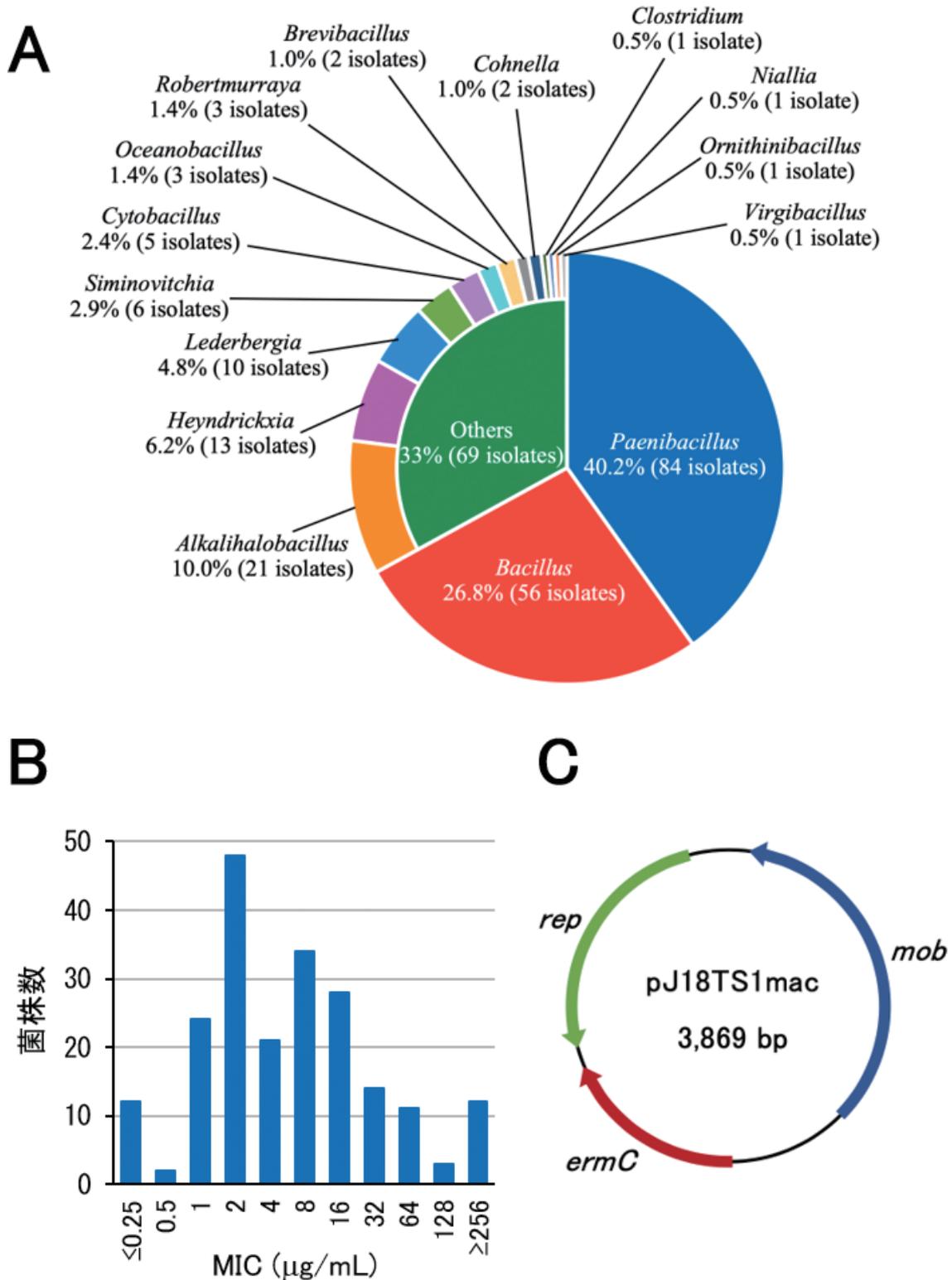


図4 国産ハチミツ由来菌株の種類と性状。(A) 48 ロットの国産ハチミツから分離された計 209 株の細菌の分類。(B) 国産ハチミツ由来菌 209 株の TS 感受性。横軸は TS の最小発育阻止濃度 (MIC [ $\mu\text{g/mL}$ ])、縦軸はその濃度で発育が阻止されたハチミツ由来菌株の数を示す。(C) 国産ハチミツ由来 *Oceanobacillus oncorhynchi* subsp. *incaldanensis* J18TS1 株に見つかったマクロライド耐性プラスミド pJ18TS1mac の構造。構造と保有遺伝子から、可動性プラスミドと考えられる。

これらの疑問に答えるため、著者らは 53 ロットの市販の国産ハチミツを材料にして、低濃度 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の TS を添加した培地を用いてハチミツ中の TS 低感受性菌の分離を試みた。その結果、53 ロット中 48 ロットのハチミツから合計 209 株の多様な (腐蝕病ではない) 芽胞形成細菌が分離された (図 4A)。これらの分離株のほとんどは、国内の *P. larvae* 株 (図 1) より TS への感受性が低く、中には TS の MIC が 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上という高度に TS 耐性化した菌もみられた (図 4B) [15]。これらの TS 耐性ハチミツ由来菌がどのような耐性メカニズムを有しているのかを明らかにするため、代表株 50 株のゲノム解析をした結果、すべての株がマクロライド耐性遺伝子と予想される遺伝子を 1~7 個保有していた [15]。

*P. larvae* 株が TS 耐性化する可能性を考えると、特に危険なマクロライド耐性遺伝子は、プラスミド、バクテリオファージ、ICE (integrative and conjugative element) などのある菌細胞から別の菌細胞へ伝達する可能性のある可動性遺伝因子 (mobile genetic elements [MGEs]) 上にある遺伝子である。そこで、ゲノム解析で見つかったマクロライド耐性遺伝子の中に MGEs 上に位置している遺伝子がないか検索した結果、ICE 上にある遺伝子が 2 つ (*IsaB* と *oleC*)、プラスミド上にある遺伝子が 2 つ (*ermL-ermB* と *ermC*) 見つかった (表 2) (注: *ermL* は耐性遺伝子である *ermB* の発現誘導に関わる遺伝子) [15]。これらの遺伝子を PCR で増幅し、発現ベクターにクローニングして、*P. larvae* 株に導入すると、*ermL-ermB* の導入では *P. larvae* 株の TS 感受性が若干低下し (TS の MIC : 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$

[導入前]  $\rightarrow$  1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [導入後])、*ermC* の導入では大きく低下した (TS の MIC : 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [導入前]  $\rightarrow$  8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [導入後])。さらに、*ermC* が乗っているプラスミド pJ18TS1mac (図 4C) を丸ごと *P. larvae* に導入すると、TS への感受性がさらに低下した (TS の MIC : 0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [導入前]  $\rightarrow$  16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [導入後]) (表 2) [15]。

日本では、成虫 1 万匹あたり 50 mg の TS を粉糖に混ぜ、1 週間間隔で計 3 回、巣脾の上からふりかけることによって蜂群に予防薬を投与する。しかし、Bernal ら [16] や Reynaldi ら [17] の実験では、日本での用量と同程度またはそれ以上の TS を蜂群に与えても、幼虫体内での TS 濃度は最大でも 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度までしか上昇しなかった。この結果は、もし、*P. larvae* が他の菌から *ermC* を獲得してしまった場合、少なくとも日本の用法用量では TS で幼虫内の *P. larvae* の増殖を抑えることができなくなることを示唆している。さらに、著者らが見つけた *ermC* を保有するプラスミド pJ18TS1mac は、*mob* 遺伝子を持つことから可動性プラスミドと考えられる (図 4C)。可動性プラスミドは、接合伝達で他の菌に水平伝播できる MGEs が菌細胞内に共存していると、その MGEs の力を借りて一緒に他の菌に伝播していく可能性があるプラスミドである。したがって、もし幼虫の腸内で *P. larvae* と pJ18TS1mac を保有する菌が出会ったら、TS 耐性 *P. larvae* 株が生まれる可能性も否定できない。

#### 国産ハチミツにおける腐蝕病菌とマクロライド耐性遺伝子の混入率

上述の研究結果から、*P. larvae* がマクロライド耐

表 2 国産ハチミツから検出された可動性遺伝因子 (MGEs) 上に存在していたマクロライド耐性遺伝子

遺伝子名	MGEs	耐性遺伝子を保有していた菌	<i>P. larvae</i> に導入した時の影響
<i>IsaB</i>	ICE <sup>a</sup>	<i>Paenibacillus cineris</i> J43TS9	<i>P. larvae</i> の TS 感受性には影響しない [15]
<i>oleC</i>	ICE <sup>a</sup>	<i>Paenibacillus cineris</i> J43TS9	未解析
<i>ermL-ermB</i>	プラスミド pJ45TS6	<i>Paenibacillus</i> sp. J45TS6	<i>P. larvae</i> の TS 感受性を若干低下させる (TS の MIC : 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [導入前] $\rightarrow$ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [ <i>ermL-ermB</i> のみ導入後]) [15]
<i>ermC</i>	プラスミド pJ18TS1mac	<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i> subsp. <i>incaldanensis</i> J18TS1	<i>P. larvae</i> の TS 感受性を大幅に低下させる (TS の MIC : 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [導入前] $\rightarrow$ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [ <i>ermC</i> のみ導入後]、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [pJ18TS1mac 導入後]) [15]

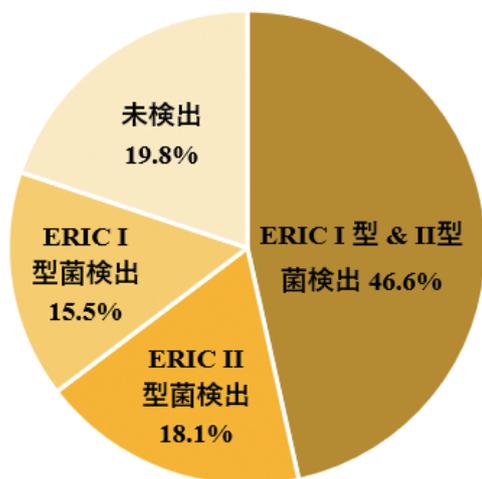
<sup>a</sup>ICE, integrative and conjugative element

性遺伝子を保有する菌と共存している環境下では、TS 耐性 *P. larvae* 株が生まれる可能性が高まると予想される。しかし、国産ハチミツ由来菌のゲノム解析では、*P. larvae* の TS 感受性を低下させた *ermC* や *ermB* はそれぞれ 1 株の菌からしか見つからない [15]。では、実際に日本の養蜂場では、*P. larvae* とマクロライド耐性遺伝子（特に *ermC* と *ermB*）はどれくらいの割合で分布しているのだからか？

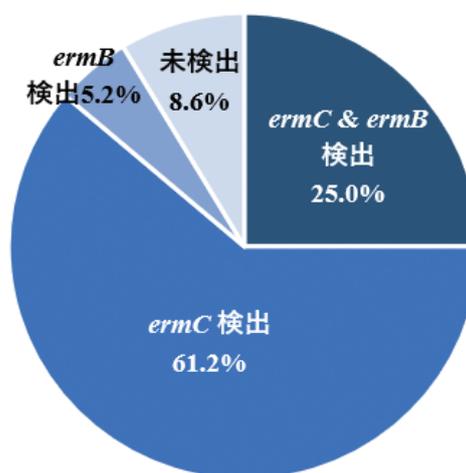
うか？

養蜂場では、腐蛆病が発生する数年前にはハチミツに腐蛆病菌が混入していると言われている [18]。したがって、ハチミツは養蜂場の腐蛆病菌汚染状況を調査する材料として適していると考えられる。そこで著者らは、ハチミツから腐蛆病菌を直接検出できるマルチプレックス PCR [19] と *ermC* と *ermB* を検出できるリアルタイム PCR [20] を開発し、

### アメリカ腐蛆病菌



### 耐性遺伝子



### アメリカ腐蛆病菌 + 耐性遺伝子

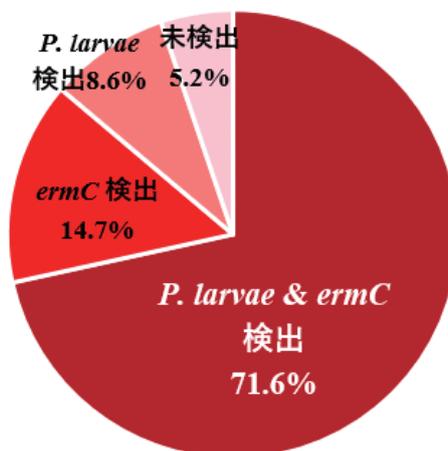


図 5 国産ハチミツ 116 ロットにおける *P. larvae* とマクロライド耐性遺伝子の検出率

116 ロットの市販の国産ハチミツを用いて *P. larvae* とマクロライド耐性遺伝子の混入率を調査した。その結果、驚くべきことに、80.2% のハチミツから *P. larvae* が検出され、*ermC* と *ermB* もそれぞれ 86.2% と 30.2% のハチミツから検出された (図 5)。さらに、71.6% のハチミツでは *P. larvae* と *ermC* の両者が共存していた (図 5) [19, 20]。市販のハチミツのほとんどは、複数の蜂群の蜜を混ぜたバルクのハチミツだと考えられる。したがって、個々の蜂群を個別に調べた場合は、*P. larvae* と *ermC* の検出率は本調査結果より低くなる可能性がある。しかし、本調査で得られた *P. larvae* と *ermC* の高い陽性率は、国内の養蜂場にはすでに腐蛆病菌と *ermC* を保有する菌が広く分布しており、いつ TS 耐性 *P. larvae* 株が出現しても不思議ではない状況にあることを示唆している。

#### おわりに

国内で腐蛆病予防に使用できる承認薬は TS のみである。したがって、もし国内で TS 耐性 *P. larvae* 株が蔓延するようなことになれば、腐蛆病の予防手段を 1 つ失うことになる。幸い日本では、TS 耐性 *P. larvae* 株は確認されていないが、唯一の承認予防薬を長く有効に使うためには、抗生物質のより一層の慎重利用が重要になる。Tian らは、抗生物質を使用し続けた蜂場のミツバチの腸内細菌からは、抗生物質を使用していない蜂場のハチの腸内細菌からよりも多くの薬剤耐性遺伝子が検出される (即ち、抗生物質を長期的に使うほど、ミツバチの腸内に薬剤耐性遺伝子が蓄積される) と報告している [21]。おそらく、抗生物質を使えば、ハチの腸内だけでなくハチミツの中などミツバチの生息環境中にも薬剤耐性遺伝子が蓄積されると思われる。このような環境下では、*P. larvae* 株が耐性遺伝子を獲得する可能性が高まると予想されるため、普段から不要な抗生物質はできるだけ使用しないことが TS 耐性 *P. larvae* 株を出現させないためには重要である。上述の腐蛆病菌検出用マルチプレックス PCR を用いれば、少量 (5 mL 程度) のハチミツを材料に蜂群または蜂場の腐蛆病菌汚染を調査することができるため、本検査法を予防薬投与の必要性を判断する目的にも活用していただきたい。尚、本マルチプレク

ス PCR に必要なプライマーと陽性コントロール及び詳細な検査マニュアルは、農林水産省の令和 4 年度戦略的監視・診断体制整備推進委託事業を利用して病性鑑定を担当する家畜保健衛生所を中心に全ての都道府県に配布済みである。

#### 謝辞

本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構において行われました。動物衛生研究部門の岡本真理子研究員をはじめとする研究に関わった全ての皆様に深く感謝申し上げます。本研究は、農林水産省の「安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業 (動物用抗菌剤の使用によるリスクを低減するための研究開発)」(JPJ008617.17935699) による助成を受けて行われました。また、腐蛆病菌検出用マルチプレックス PCR に必要な試薬とマニュアルの家畜保健衛生所等への配布は、農林水産省の令和 4 年度戦略的監視・診断体制整備推進委託事業による助成を受けて行われました。ここに謹んで感謝申し上げます。

#### 引用文献

1. Miyagi, T., Peng, C. Y. S., Chuang, R. Y., Mussen, E. C., Spivak, M. S. and Doi, R. H. 2000. Verification of oxy-tetracycline-resistant American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae* in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* **75**: 95-96.
2. Evans, J. D. 2003. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **83**: 46-50.
3. Krongdang, S., Evans, J. D., Pettis, J. S. and Chantawannakul, P. 2017. Multilocus sequence typing, biochemical and antibiotic resistance characterizations reveal diversity of North American strains of the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS One* **12**: e0176831.
4. Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F. and Herman, L. 2012. Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology* **158**: 1-11.

5. Ueno, Y., Yoshida, E., Misumi, W., Watando, E., Suzuki, K., Hirai, Y., Okura, M., Osaki, M., Katsuda, K. and Takamatsu D. 2018. Population structure and antimicrobial susceptibility of *Paenibacillus larvae* isolates from American foulbrood cases in *Apis mellifera* in Japan. *Environmental Microbiology Reports* **10** : 210–216.
6. Takamatsu, D. 2023. Atypical *Melissococcus plutonius* strains : their characteristics, virulence, epidemiology, and mysteries. *The Journal of Veterinary Medical Science* **85** : 880–894.
7. Okayama, A., Sakogawa, T., Nakajima, C. and Hayama, T. 1996. Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus larvae* originated from American foulbrood of honeybee in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science* **58** : 439–441.
8. Takamatsu, D., Yoshida, E., Watando, E., Ueno, Y., Kusumoto, M., Okura, M., Osaki, M. and Katsuda, K. 2018. A frameshift mutation in the rRNA large subunit methyltransferase gene *rlmA<sup>II</sup>* determines the susceptibility of a honey bee pathogen *Melissococcus plutonius* to mirosamicin. *Environmental Microbiology* **20** : 4431–4443.
9. Alippi, A. M. 2000. Is Terramycin R losing its effectiveness against AFB? The Argentinian experience. *Bee Biz* **11** : 27–29.
10. Alippi, A. M., López, A. C., Reynaldi, F. J., Grasso, D. H. and Aguilar, O. M. 2007. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American Foulbrood (AFB) disease in honeybees. *Veterinary Microbiology* **125** : 290–303.
11. Alippi, A. M., León, I. E. and López, A. C. 2014. Tetracycline-resistance encoding plasmids from *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease, isolated from commercial honeys. *International Microbiology* **17** : 49–61.
12. Murray, K. D. and Aronstein, K. A. 2006. Oxytetracycline-resistance in the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae* is encoded on novel plasmid pMA67. *Journal of Apicultural Research* **45** : 207–214.
13. Murray, K. D., Aronstein, K. A. and de León, J. H. 2007. Analysis of pMA67, a predicted rolling-circle replicating, mobilizable, tetracycline-resistance plasmid from the honey bee pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Plasmid* **58** : 89–100.
14. López, A. C., de Ortúzar, R. V. M. and Alippi, A. M. 2008. Tetracycline and oxytetracycline resistance determinants detected in *Bacillus cereus* strains isolated from honey samples. *Revista Argentina de Microbiología* **40** : 231–236.
15. Okamoto, M., Kumagai, M., Kanamori, H. and Takamatsu, D. 2021. Antimicrobial resistance genes in bacteria isolated from Japanese honey, and their potential for conferring macrolide and lincosamide resistance in the American foulbrood pathogen *Paenibacillus larvae*. *Frontiers in Microbiology* **12** : 667096.
16. Bernal, J., Martín, M. T., Toribio, L., Martín-Hernández, R., Higes, M., Bernal, J. L. and Nozal, M. J. 2011. Determination of tylosins A, B, C and D in bee larvae by liquid chromatography coupled to ion trap-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **879** : 1596–1604.
17. Reynaldi, F., Albo, G., Avellaneda, E. and Rule, R. 2017. Evaluation of kinetic behaviour of two preparations of tylosin administered in beehives for American foulbrood control. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* **20** : 264–270.
18. von der Ohe, W. 2003. Control of American foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms. *APIACTA*. <http://www.fiitea.org/foundation/files/2003/Von%20der%20Ohe.pdf>
19. Okamoto, M., Furuya, H., Sugimoto, I., Kusumoto, M. and Takamatsu, D. 2022. A novel multiplex PCR assay to detect and distinguish between different types of *Paenibacillus larvae* and *Melissococcus plutonius*, and a survey of foulbrood pathogen contamination in Japanese honey. *The Journal of Veterinary Medical Science* **84** : 390–399.
20. Okamoto, M., Furuya, H., Sugimoto, I. and Takamatsu, D. 2022. Detection of macrolide resistance genes, *ermC* and *ermB*, in Japanese honey using real-time PCR assays. *The Journal of Veterinary Medical Science* **84** : 1453–1456.
21. Tian, B., Fadhil, N. H., Powell, J. E., Kwong, W. K. and Moran N. A. 2012. Long-term exposure to antibi-

otics has caused accumulation of resistance determinants in the gut microbiota of honeybees. mBio

3 : e00377-12.

## レビュー

# アフリカ豚熱の血清診断法 —p11.5 ELISA の開発—

わたなべみずき  
渡邊瑞季

## はじめに

アフリカ豚熱 (ASF) は、国際獣疫事務局 (WOAH) のリスト疾病であるウイルス性疾患で、豚を含むイノシシ科動物が罹患する海外悪性伝染病である。豚が ASF ウイルス (ASFV) に感染すると、ほとんどの場合は甚急性ないしは急性の経過をたどる。病因となる ASFV は、正 20 面体の巨大な 2 本鎖 DNA ウイルスで、節足動物によって媒介される唯一の DNA アルボウイルス (arthropod-borne virus) である。

1921 年、Montgomery によってケニア及びウガンダで ASF の発生が初めて報告され [1, 3]、ASF は長らくアフリカ土着の風土病として知られてきた。しかし、2007 年に黒海東岸のジョージアで ASF が突如発生し、その後コーカサス、ロシアから中央ヨーロッパを中心に拡大した。さらに、2018 年には中国でアジア初となる ASF の発生が確認された後、アジアでは日本、台湾及びスリランカを除く全ての国で、その発生が報告された (2024 年 1 月現在。なお、ブルネイは非養豚国であるため除外)。ASF は養豚産業並びに食料の持続的な供給に対する重大な脅威となっており、例えば、世界の豚肉生産のおよそ半分を占める中国では、2018 年の ASF 発生後、1 年間で豚の飼養頭数が 41% 減少した [5]。

本病が世界の養豚産業にとって脅威である理由として、有効で安全なワクチンが未開発であることが挙げられる。ASFV の複雑な粒子構造、分類学的な特性及び遺伝子型の多様性等がワクチン開発の障害

となっている。現在、一部の国で ASF ワクチンの使用が開始されてはいるものの、その有効性及び安全性は十分とは言い難い。ASF のまん延を防ぐには、早期発見、サーベイランスの徹底と強化、疫学調査、豚の追跡、感染家畜の駆除、水際対策、バイオセキュリティ対策及び家畜の移動規制といった防疫措置の厳格な実施と遵守が不可欠である [4]。日本では現時点で ASF の発生は確認されていないが、上述のとおり、アジアのほとんどの国で ASF の侵入とまん延が見られ、国内への ASF 侵入は目の前まで迫っている。本稿では万一の ASF の国内への侵入に備えて、本病の診断法について概説し、我々が開発した ASFV p11.5 タンパク質を抗原とする新たな ASFV 血清間接 ELISA についても紹介する。

## ASF の病態

強毒型の ASFV によって引き起こされる臨床症状は、発熱 (41~42℃)、食欲不振、沈鬱、呼吸困難、皮膚の充血及び突然死であり、感染した個体は 1 週間程度でほぼ全頭が死に至る。上記の臨床所見に加え、解剖時に脾臓や腸間膜リンパ節等に重度の暗赤色化や腫大が認められる場合には、ASF 感染が強く疑われる。一方、甚急性の経過をたどった場合には、明瞭な徴候を伴わず死亡することがあるため、予断を持たずに検査を実施する必要がある。甚急性例では剖検所見も明瞭でない場合があり、診断にはウイルス学的検査が必須である。弱毒型の ASFV や非病原性型の ASFV も存在し、その病原性に依じて、

様々な程度で皮膚の多巣性壊死、関節炎、成長遅延、体重減少、呼吸困難及び流産等の多様な病態を引き起こす [7]。また、豚に対するウイルスの病原性に関わらず、アフリカ固有のイノシシ科動物では本病は不顕性に推移することが知られており、動物における病態の形成にはウイルス側の要因（病原性）に加えて、宿主側の要因が関与する。

ASF の臨床症状は豚熱（CSF）に酷似しており、農場で豚群に発熱、沈鬱及び食欲不振を伴う致死率の高い伝染病の発生を認めた場合には、ASF と CSF の両方の可能性が示唆される。両者は臨床症状による鑑別は難しいため、適切な検査機関で両疾病を対象としたウイルス学的検査を実施する必要がある [13]。

### ASF の診断法

WOAH マニュアルにおいて、ASFV の抗原若しくはウイルス遺伝子の検出方法としては赤血球吸着試験（HAD）、蛍光抗体法、コンベンショナル PCR 法及びリアルタイム PCR 法が、血清学的診断法としては ELISA、間接蛍光抗体法及びウェスタンブロット法が挙げられる。他の疾患と同様に 100% の感度と特異性を備えた検査法は存在しないため、有効性が確認されている複数の検査で得られた成績に加え、疫学情報、流行シナリオ及び臨床症状から得られた情報等を組み合わせて確定診断をする必要がある。そのため、流行するウイルス株の性状及び伝播経路等に関する最新の知識の収集をしておくことは、本病の正確な診断にとって不可欠である [4]。

前項でも述べたように、ASF 急性例では感染から死亡までの期間が短く、抗体価の上昇が見られることは稀であるため、診断はウイルス遺伝子の検出に重点が置かれる。急性又は亜急性の臨床経過をたどる感染動物では高レベルのウイルス血症が長期間認められることから、PCR はサーベイランスのための基本的な診断ツールとしても有用である。一方、慢性又は不顕性感染の動物の診断では、PCR の結果だけでなく、ELISA 等の血清学的検査が重要な役割を果たす。

もちろん、検体からウイルスを分離することも、ASF の確定診断をするための重要な手がかりとなる。ASFV 陽性検体に由来する乳剤等を豚の初代マ

クロファージやマクロファージ由来の細胞株等に接種するとウイルスが感染し、細胞内での複製及び増殖過程を経て、細胞変性効果を示す [8]。また、例外はあるものの、多くのウイルス株では赤血球の存在下で豚由来のマクロファージに感染すると赤血球を吸着してロゼッタを形成する、いわゆる HAD が認められ、これを指標にしてウイルスを分離同定することも可能である。ただし、野生イノシシ等の検体では、遺伝子検査で陽性と判定された場合であっても、環境中ですでにウイルスが不活化しており、ウイルス分離が困難な例も少なくない。ASF の特徴と疾病の動態から、疫学的状況をリアルタイムに把握するためには、診断施設における抗原（ウイルス遺伝子及びウイルスそのもの）検出と抗体検出を並行して進めることが不可欠である。

### ASF 診断における血清学的検査の役割

血清学的検査は、その簡便さや比較的安価であること等から、様々な疾病の診断に広く用いられている検査方法である。現在、世界的に流行している ASF は強毒型であり、感染した豚は抗体が産生される前に死亡する例がほとんどである。したがって血清学的検査が診断目的で使用されることは少なく、専ら清浄性確認を目的とするサーベイランスに利用される。しかし、中国等では弱毒株の存在が確認されており [10]、弱毒株感染地域においては、抗体の消長は流行動態の把握に重要である。弱毒株に感染した動物の多くは感染耐過し、長期間抗体陽性を持続する。サーベイランスの際にこのような抗体陽性の個体が検出された場合、現在進行中、又は過去のアウトブレイクを明らかにすることができる [9]。さらに、感染耐過豚の抗体陽転までの期間が明らかとなった場合、農場へのウイルスの侵入時期を特定したり、当該農場との疫学的につながりのある農場（疫学関連農場）を推定したりすることが可能となるため、血清学的検査は適切なまん延防止対策に不可欠な情報を提供しうるものと期待される [4]。また、ベトナム等で使用が開始された弱毒生 ASF ワクチン（日本国内では使用されていない）のサーベイランスにおいても、抗体検査は重要と言える。

これまで血清学的診断のために、ASFV p72、p62 及び p32 タンパク質の混合物を用いた間接 ELISA



図1 p11.5 ELISA の反応模式図

(ID Screen African Swine Fever Indirect ELISA, IDvet、フランス)、又は p30 タンパク質 (SVANOVIR ASFV-Ab、INDICAL、スウェーデン)、p72 タンパク質を用いたブロック ELISA (INGEZIM PPA COMPAC、Ingenasa、スペイン)、p32 タンパク質を用いた競合 ELISA (ID Screen African Swine Fever Competition、IDvet、フランス) 等、異なる標的抗原を用いた血清 ELISA が世界中で市販されている。

#### ASFV p11.5 タンパク質を抗原とする新たな ASFV 血清間接 ELISA の開発

この度、我々が新たに開発した ASFV 血清間接 ELISA について、以下に紹介する。ELISA の開発にあたり、市販されている ASFV ELISA (上述) より高感度なシステムの構築を目的とし、従来とは異なる抗原を使用した。ELISA 抗原に適したタンパ

ク質を同定するため、高病原性 ASFV genotype II の AQS-C-1-22 株 (AQS 株) に対するマウスモノクローナル抗体 (mAbs) を作製した [6]。同様に高病原性の ASFV genotype II の Georgia 2007/1 株の予測オープンリーディングフレーム (ORF) 192 個をそれぞれ個別に発現する遺伝子発現ベクターのパネルを用いて、作製したマウス mAbs をスクリーニングすることにより、それぞれの mAbs が検出する抗原を同定した。その結果、ASFV A137R 遺伝子がコードするタンパク質である p11.5 は、強い抗原性を有するウイルスタンパク質であることが明らかとなった。先行研究により、p11.5 は ASFV の *in vitro* 複製途中で最も発現量の高いタンパク質であることが報告されており [2]、血清学的診断において理想的な標的抗原となる可能性が示唆された。そこで、我々は p11.5 を用いる新たな間接 ELISA 系を構築し、血清診断法としての適合性を検討するとともに、反応系の最適化を試みた (図 1)。

#### p11.5 タンパク質の作製

ASFV Georgia 2007/1 株の p11.5/A137R 遺伝子をクローニングして、p11.5 配列を単一、2 反復、若しくは 3 反復で挿入した 3 種類の発現プラスミド (p11.5×1, p11.5×2, p11.5×3) を構築した (図 2)。これらのプラスミドを大腸菌にそれぞれ形質転換した後、タンパク質を発現させた。得られたタンパク質を精製した後、SDS-PAGE で分画し、クマシーブリリアントブルー及びウェスタンブロット法によ

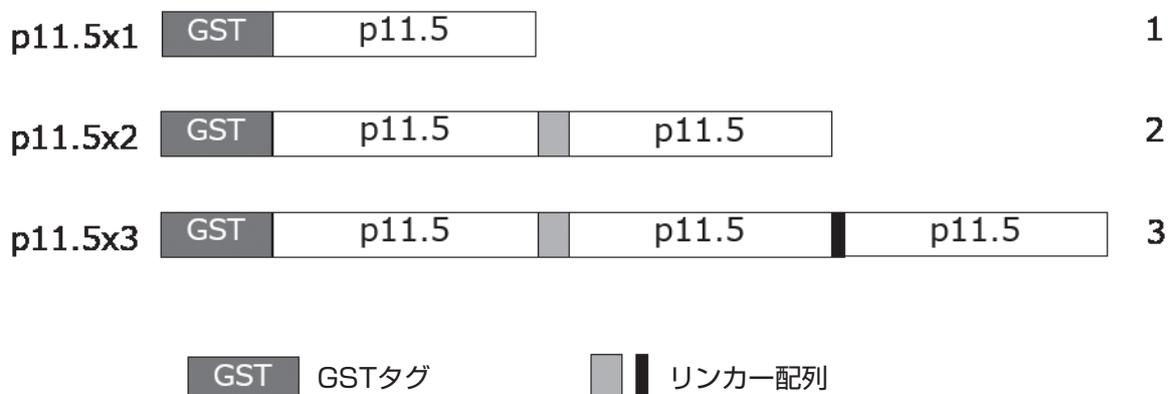


図2 作製した p11.5 候補抗原の構造

各タンパク質は、精製のために N 末端に GST タグを付加している。

1 行目, p11.5×1; 2 行目, p11.5×2; 3 行目, p11.5×3

p11.5×2, p11.5×3 については複数の p11.5 をリンカー配列を介してタンデムに連結している。

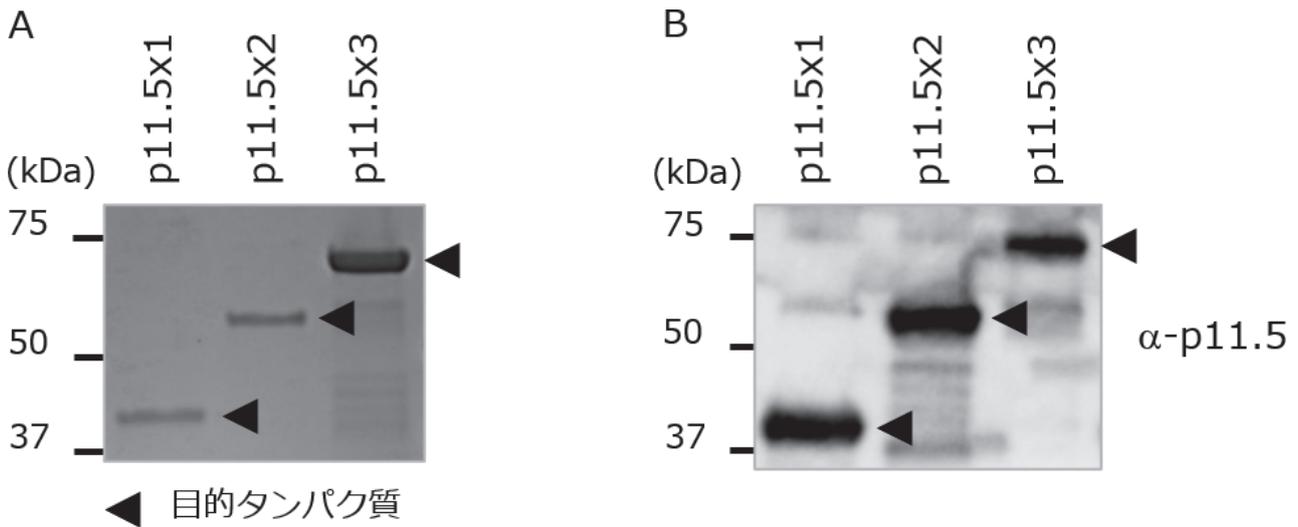


図3 p11.5×1、p11.5×2、p11.5×3 タンパク質の作製  
 それぞれのタンパク質を大腸菌で発現させ、可溶化後、GSTrap カラムを用いてアフィニティー精製した。  
 A. 溶出画分の半量を SDS-PAGE で展開し、クマシーブリリアントブルーで染色した  
 B. 残り半量を SDS-PAGE で展開した後、抗 p11.5 抗体でウェスタンブロットを行った。

り、目的タンパク質の存在を確認した (図3)。

**間接 ELISA における標的抗原としての p11.5 タンパク質の評価**

精製した上記3種類の p11.5 タンパク質について、ELISA 用の標的抗原としての有用性を評価した。その結果、p11.5 を3反復で連結した p11.5×3 タンパク質の検出感度が最も高く、標的抗原として適していたことから (図4)、p11.5×3 タンパク質を抗原として ELISA 系の構築を試みた (以下、本稿では「p11.5 ELISA」と記す)。

**p11.5 ELISA の最適化と精度の検証**

p11.5 ELISA 系における反応条件を最適化するため、1次血清 (弱毒型 ASFV 実験感染豚由来血清) 及び2次抗体のボックスタイトレーションにより、最適条件を設定した。設定した反応条件に従い、166頭の豚由来血清 (非感染群90頭及びASFV 実験感染群76頭) を p11.5 ELISA で測定し、得られた OD 値をもとに ROC 曲線下面積 (AUC) が最大となる判定の閾値を決定した。その結果、AUC = 0.991 [95% 信頼区間 (CI) = 0.982 - 0.999] となり、OD 値の閾値を 0.368 とした場合に最も “高精度”

であることが示された (図5)。今後、OD 値による閾値を一般化する必要はあるが、市販 ELISA との比較から、相対感度及び相対特異度が共に高く、また、再現性も十分に高いことが示された (データは

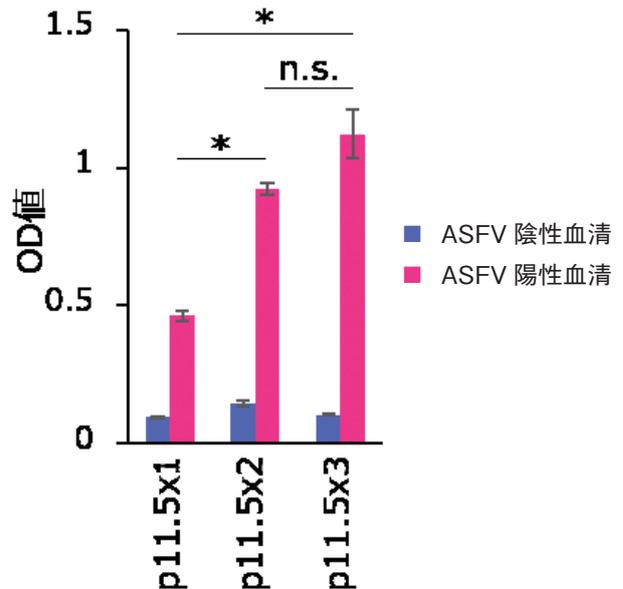


図4 3種類の抗原候補タンパク質を標的抗原とした ELISA の OD450 値の比較  
 ■, ASFV 陽性血清サンプル; ■, ASFV 陰性血清サンプル。抗原タンパク質は 5 µg/mL の濃度で固相化した。血清サンプル及び二次抗体は、それぞれ 1:20 及び 1:5000 で希釈して使用した。各データは3回の独立した実験の平均±標準誤差で示した。\*, P < 0.01 (Tukey の検定); n.s., 有意でない。

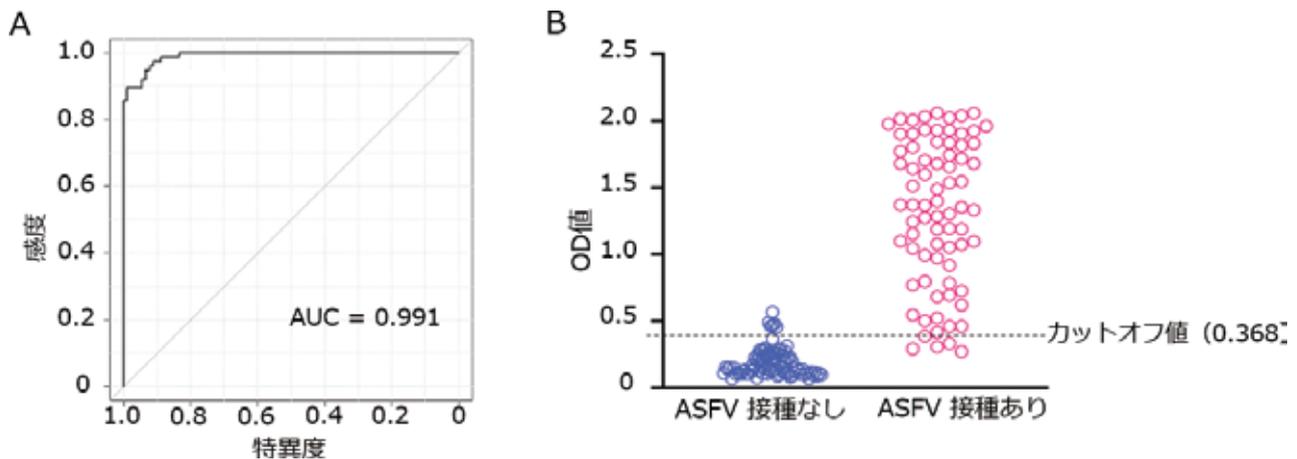


図5 p11.5 ELISAの精度の検証

A. p11.5 ELISAと市販ELISAを用いて合計166頭の豚に由来する血清(ASFV未接種群90頭、ASFV接種群76頭)中のASFV特異抗体を検出した。

p11.5 ELISAのROC曲線下面積(AUC)をROC解析によって求めた(AUC=0.991; 95%信頼区間=0.982-0.999)。

B. カットオフ値を0.368に定めた場合、破線より上が陽性、下が陰性と判定されることを示す。

省略)。

#### ASFV感染動物における特異抗体検出時期の検討

様々なASFV株を感染させた豚(LWD)やイノシシから経時的に血清を採取し、ASFV特異的な抗体の検出時期(陽転時期)を市販ELISAとp11.5 ELISAで比較した。図6にウイルス接種スケジュール及び市販ELISAとp11.5 ELISAでそれぞれ初めて抗体が検出できた接種後日数を示した。それぞれのグループで初めて抗体陽性となる接種後日数の平均を算出したところ、ASFV genotype Iを接種したGroup 1及び2では、いずれのELISAでも全頭でASFV抗体が検出されたが、市販ELISAに比べて、p11.5 ELISAはより早期に抗体を検出した。ASFV genotype IIを接種した実験感染豚群(Group 3及び4)では、最終的なASFV抗体の検出の有無は、いずれのELISAでも同様の結果となったが、市販ELISAに比べて、p11.5 ELISAはより早期に抗体を検出した。ASFV genotype Xを接種した実験感染豚及びイノシシ群(Group 5)では、市販ELISAでは検出できなかった血清中のASFV特異抗体もp11.5 ELISAでは検出することができた。

#### p11.5 ELISAのまとめ

p11.5タンパク質をコードするA137R遺伝子では、ORFの塩基配列並びにアミノ酸配列が様々な遺伝子型のウイルス株間でよく保存されており、高い免疫原性(抗体誘導能)を示すことから、遺伝子型横断的なASFの血清診断において理想的な抗原であると推測される。上述のとおり、本研究で構築したp11.5 ELISAは、ASFV感染動物の早期かつ信頼性の高い摘発が可能だけでなく、複数の遺伝子型のASFV株に対する抗体を検出できることが明らかにされた。p11.5 ELISAは、弱毒株によるASFの血清診断法への活用だけでなく、野外サーベイランスのツールとしても有望である。さらにASFワクチンが使用されるような場面においては、免疫状態のモニタリングにおいても有用性が期待できるだろう。p11.5 ELISAに関する報告の詳細は、原著論文を参照されたい[11]。

#### おわりに

現在、ASFに対する十分な有効性と安全性を示すワクチンや治療法が確立されておらず、その防疫は水際検疫、農場におけるバイオセキュリティ対策の徹底及び感染動物の迅速な摘発淘汰が中心である。本稿では主に血清診断法としてのp11.5 ELISAについて言及したが、ASFの診断法にはこれ以外にも

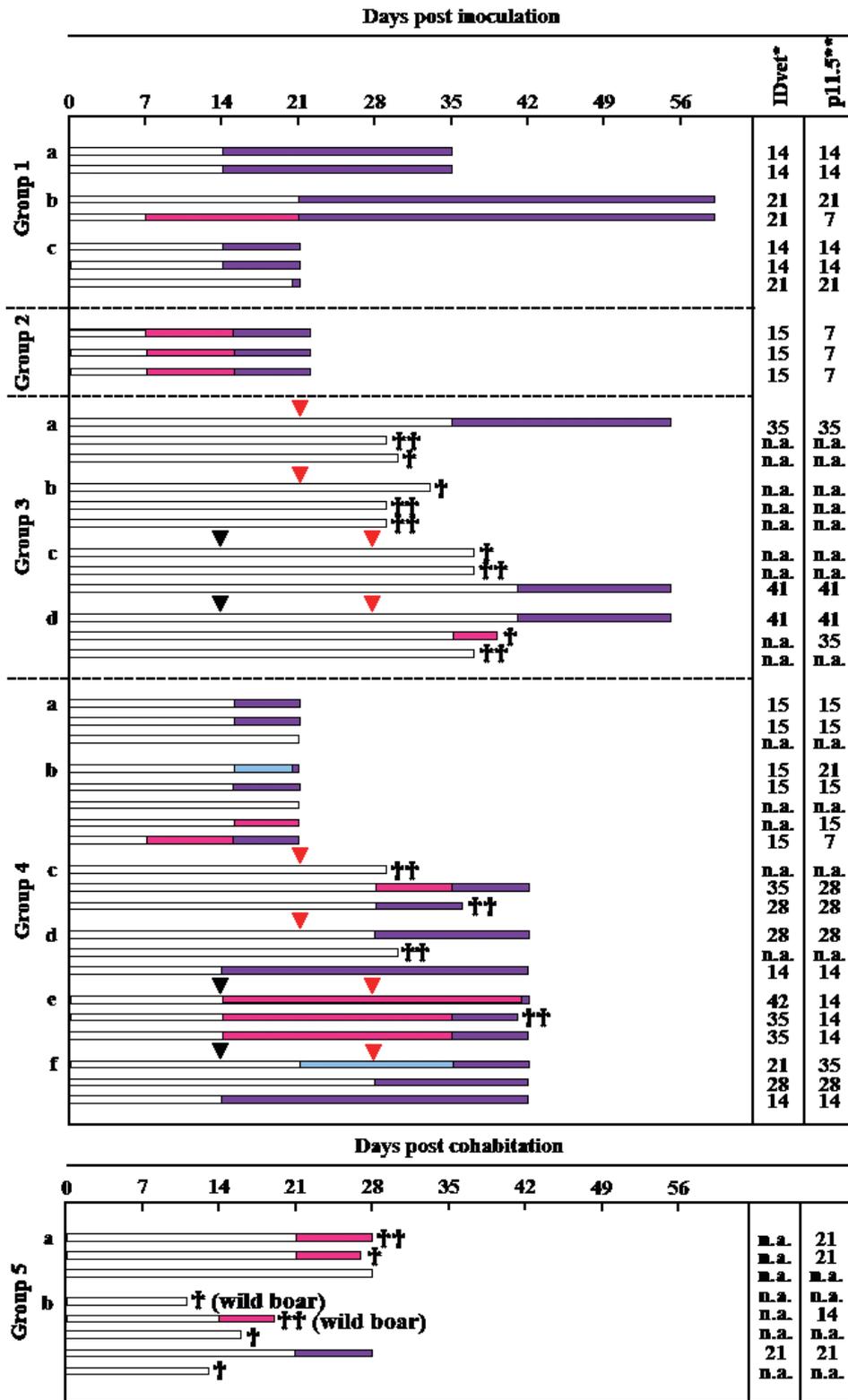


図6 ASFV接種後、市販ELISA及びp11.5ELISAを用いた際に最初に抗体が検出されるまでの日数の比較  
 Group 1, OUR T88/3株 (genotype I) を接種；Group 2, Lisbon60V株 (genotype I) を接種；Group 3, 弱毒化 AQS (AQS-C-1-22) 株と野生型 AQS 株 (genotype II) を接種；Group 4, Armenia 2007 ΔMGF 株と野生型 AQS 株 (genotype II) を接種；Group 5, Kenya05/Tk-1 株 (genotype X) 感染豚にイノシスを同居させた。血清サンプルは同居動物から採取した。同居試験では、ASFVを接種した動物は9～13日後に死亡し、血清サンプルが採取できなかったため、グラフから除外した。接種個体から非感染個体へのウイルス伝播の正確な時期は不明であったため、日数表記は豚への感染日を0日としている。グラフ中の各バーは1頭ずつを表す。白いバーは、血清中抗体がいずれのELISAでも陰性であった期間、水色のバーは、血清抗体が市販ELISAでのみ陽性であった期間、ピンク色のバーは、血清中抗体がp11.5ELISAでのみ陽性であった期間、紫色のバーは、血清中抗体がいずれのELISAでも陽性であった期間である。\*, 市販ELISA及び\*\*, p11.5ELISAでASFV抗体が初めて検出されるまでの時間を示す。黒矢印は弱毒型ASFVの追加接種、赤矢印は野生型AQS株の追加接種、n.a.は抗体なし。死亡した動物については、死亡までの時間†又はエンドポイントによる安楽殺††を示す。

様々な方法がある。これらの診断法の実施に当たっては、検査時点での ASF の発生及び流行状況を鑑みて、検査の優先順位を検討する必要がある。たとえば、ASF 未発生の日本で疑い事例が発生した場合には、コンベンショナル PCR やリアルタイム PCR によるウイルス遺伝子検出検査を最優先で実施し、併せてウイルス分離を進めるべきである。一方、発生国において流行が収束し、根絶に向けて清浄性を確認する際には、ELISA 等を用いた血清学的検査も併用し、弱毒株による潜在的な ASF の存在までも想定した調査を行う必要がある。

2018 年の中国での発生を皮切りに、アジアのほとんどの国で ASF が発生している状況にあって、日本は今のところ清浄性を維持している。この幸運は、我が国が置かれた地理的な要因や動物検疫における肉類の違法持ち込みの摘発強化といった努力の賜物であるが、それと同時に、新型コロナウイルス感染症の世界的パンデミックによるインバウンドの大幅な減少が影響した面も否めない。2023 年には、日本を含めて多くの国で新型コロナウイルス感染症に対する人流の規制が解除され、10 月には一か月間の訪日外客数が 2019 年同月を超えた [12]。このような統計データは、以前の日常が戻ってきていることを示す反面、ASF の侵入リスクの上昇を暗示するものでもあると言えよう。

現在、我が国では、産官学が連携して ASF 防除法及び診断法の開発に全力を挙げて取り組んでおり、本稿で紹介した p11.5 ELISA もその一環で開発されたものである。我が国で ASF の発生が起これぬことを祈りつつ、ASF 根絶を目指して引き続き ASFV 研究に邁進していきたい。

## 謝辞

本研究は農林水産省による安全な農畜水産物安定供給のための包括的レギュラトリーサイエンス研究推進委託事業「官民・国際連携による ASF ワクチン開発の加速化」において、農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門で実施したものであり、ご指導賜りました海外病研究拠点の皆様へ感謝いたします。また、永田宏次先生（東京大学大学院農学生命科学研究科食品生物構造学研究室）には研究材料をご提供いただきましたことを感謝いたします。

## 引用文献

1. Blome S., Franzke K. & Beer M. 2020. African swine fever—A review of current knowledge. *Virus Research.* **287** : 198099.
2. Cackett G., Matelska D., Sýkora M., Portugal R., Malecki M., Bähler J., Dixon L. & Werner F. 2020. The African Swine Fever Virus Transcriptome. *Journal of Virology.* **94** (9) : e00119–20.
3. Galindo I. & Alonso C. 2017. African Swine Fever Virus : A Review. *Viruses.* **9** (5) : E103.
4. Gallardo C., Fernández-Pinero J. & Arias M. 2019. African swine fever (ASF) diagnosis, an essential tool in the epidemiological investigation. *Virus Research.* **271** : 197676.
5. Juszkievicz M., Walczak M., Woźniakowski G. & Podgórska K. 2023. African Swine Fever : Transmission, Spread, and Control through Biosecurity and Disinfection, Including Polish Trends. *Viruses.* **15** (11) : 2275.
6. Kameyama K., Kitamura T., Okadera K., Ikezawa M., Masujin K. & Kokuho T. 2022. Usability of Immortalized Porcine Kidney Macrophage Cultures for the Isolation of ASFV without Affecting Virulence. *Viruses.* **14** (8) : 1794.
7. Li Z., Chen W., Qiu Z., Li Y., Fan J., Wu K., Li X., Zhao M., Ding H., Fan S. & Chen J. 2022. African Swine Fever Virus : A Review. *Life.* **12** (8) : 1255.
8. Masujin K., Kitamura T., Kameyama K. -ichiro, Okadera K., Nishi T., Takenouchi T., Kitani H. & Kokuho T. 2021. An immortalized porcine macrophage cell line competent for the isolation of African swine fever virus. *Scientific Reports.* **11** (1) : 4759.
9. OIE Terrestrial Animal Health Code. Chapter 15.1. Infection with African swine fever virus. 2022.
10. Sun E., Zhang Z., Wang Z., He X., Zhang X., Wang L., Wang W., Huang L., Xi F., Huangfu H., Tsegay G., Huo H., Sun J., Tian Z., Xia W., Yu X., Li F., Liu R., Guan Y., Zhao D. & Bu Z. 2021. Emergence and prevalence of naturally occurring lower virulent African swine fever viruses in domestic pigs in China in 2020. *Science China Life Sciences.* **64** (5) : 752–765.
11. Watanabe M., Kitamura T., Nagata K., Ikezawa M.,

Kameyama K., Masujin K. & Kokuho T. 2023. Development of a Novel Indirect ELISA for the Serological Diagnosis of African Swine Fever Using p11.5 Protein as a Target Antigen. *Pathogens*. **12** (6) : 774.

12. 日本政府観光局. 2023. 訪日外客統計月別推計値.

13. 農林水産省. 2020. アフリカ豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針.

(研究員)

## 学会発表演題 (2023年4月~2024年3月)

●第27回獣医病理診断研究会 **Veterinary Pathology Diagnostic Conference**

期 日: 2023年7月21日

開 催 地: リモート方式 (東京大学)

発表演題: VP-82 (初乳未摂取豚における *Streptococcus suis* 血清型2型感染症 (豚のレンサ球菌症))

○伊藤宗磨 (一般財団法人日本生物科学研究所)

● **Asian Pig Veterinary Society Congress 2023**

期 日: 2023年7月30日~2023年8月2日

開 催 地: Taipei International Convention Center (台湾)

発表演題: Comparison of Pathogenicity of Type-2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Isolated in Japan, which is the Same Genetic Cluster

○Ryosuke Takai<sup>1</sup>, Tetsuo Sato<sup>1</sup>, Shizuka Hayashi<sup>1</sup>, Soma Ito<sup>1</sup>, Kazumoto Shibuya<sup>1</sup>,  
Nobuyuki Tsutsumi<sup>1</sup>, Katsuaki Sugiura<sup>1</sup>, Chihiro Sasakawa<sup>1,2</sup>( <sup>1</sup>Nippon Institute for Biological Science, <sup>2</sup>Medical Mycology Research Center, Chiba University)

## ●第11回日本獣医病理学専門家協会合同学術集会 第64回獣医病理学研修会 (JCVP スライドフォーラム)

期 日: 2024年3月28日~2024年3月29日

開 催 地: 鹿児島県民交流センター

発表演題: ヤイトハタの皮膚および眼球

○伊藤宗磨 (一般財団法人日本生物科学研究所)

## 編集後記

春風が心地よく吹き抜ける季節がやって参りました。皆様におかれましてはいかがお過ごしでしょうか。今号は、令和5年度編集委員の最後の号となってしまいました。多大なご協力を賜りました関係者の皆様には、この場をお借りして厚く御礼申し上げます。さて、令和6年度は、編集委員長を高井亮輔が引き継ぎ、編集委員は河島奈悠と伊藤宗磨が担当いたします。

寒暖の差が激しいこともございますので、どうかご自愛ください。今後とも、引き続き日生研たよりをご愛読賜りますよう、よろしくお願い申し上げます (編集委員長)。



—— テーマは「生命の連鎖」——  
生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(年4回発行)  
(通巻631号) 令和6年3月25日印刷 令和6年4月1日発行(第70巻第2号)  
発行所 一般財団法人日本生物科学研究所  
〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1  
TEL: 0428(33)1520(経営企画部) FAX: 0428(31)6166  
URL: <https://nibs.or.jp>  
発行人 土屋耕太郎

編集室 委 員/河島奈悠(委員長)、高橋真理、高井亮輔  
事 務/経営企画部  
印刷所 株式会社 精興社  
(無断転載を禁ず)