

学 術

ヨーロッパ腐蛆病菌の最近の知見と新たな検出法の開発

高 松 大 輔

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域

1. はじめに

ミツバチはハチミツ、蜜蝋、ローヤルゼリーといった蜂産品生産の目的だけではなく、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ある。実際にミツバチの花粉媒介によって、日本では3000億円、アメリカでは146億ドルを上回る経済効果がもたらされているという試算もある^{1,2)}。従って、健全な農業を守り、安定した食糧生産を行っていくためには、ミツバチの健康を脅かす要因について十分な調査・研究を行っていくことが必要である。ミツバチの健康を脅かす要因としては、農薬、環境ストレス、栄養失調やそれらを原因とする免疫不全、スズメバチなどの外敵など、多くのものを挙げることが出来る。これらに加え、ミツバチに感染し、時に蜂群の崩壊を引き起こすこともある病原体も重要な脅威の一つである。ミツバチも私たち人間や多くの動物と同様に、細菌、ウイルス、原虫、真菌、ダニなど、様々な病原体に感染する。そして、これらのミツバチの病原体の多くが世界中に拡散しており³⁾、養蜂業に様々な影響を与えている。

現在、日本の家畜伝染病予防法では、「腐蛆病」が法定伝染病に、「バロア病」、「チョーク病」、「アカリング二症」、「ノゼマ病」が届出伝染病に指定されている。このうち、細菌感染症である腐蛆病には、全く異なる病原細菌によって引き起こされるアメリカ腐蛆病とヨーロッパ腐蛆病という2つの疾病が含まれている。アメリカ腐蛆病は、孵化後間もない幼虫にアメリカ腐蛆病菌 (*Paenibacillus larvae*) の芽

胞が経口感染することによって引き起こされる。発症までには時間がかかり、幼虫の巣房に蓋がされた後に発症・死亡することが多い。死亡幼虫は*P. larvae*が作る蛋白質分解酵素の働きで分解され、粘稠性で茶褐色の膠臭を発する腐蛆となる。一方、ヨーロッパ腐蛆病は、若齢の幼虫にヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) が経口感染することによって起こる感染症である。発症はアメリカ腐蛆病より早く、巣房に蓋が掛けられる前の幼虫が死亡することが多い。死亡幼虫は、乳酸菌などの二次感染菌の影響で分解され、水っぽい、時に酸臭を発する腐蛆となる。

これら腐蛆病のうち、アメリカ腐蛆病の研究は、これまでも比較的盛んに行われてきたが、ヨーロッパ腐蛆病の研究はあまり進んでいなかった。特に、原因菌であるヨーロッパ腐蛆病菌は、約一世紀前からその存在が確認されていたにもかかわらず、その特性については、現在もお不明な点が多い。ヨーロッパ腐蛆病に関する研究の多くがハチの専門家(昆虫学者)によるものであり、細菌学の視点からの研究が乏しかったことも研究の遅れに影響を与えていたと考えられる。著者らのグループは、これまで知られていた性状とは異なる性状を示す*M. plutonius*株を発見したことを契機に、ここ数年、本菌の研究を進めてきた。また、近年、海外の複数のグループからもヨーロッパ腐蛆病菌に関係する論文が活発に発表されはじめ、俄にヨーロッパ腐蛆病の研究が進展しつつある。そこで本稿では、*M. plutonius*の歴史やこれまで開発されてきた*M.*

*plutonius*の検出法を振り返るとともに、本菌に関する最近の見解や著者らのグループが開発した新たな *M. plutonius* 検出法について紹介したい。

2. ヨーロッパ腐蛆病菌の歴史と特性

腐蛆病は、発症した蜂群から腐敗臭が発せられる病気として、18世紀からその存在は知られていたが、当初はアメリカ腐蛆病とヨーロッパ腐蛆病が「幼虫が腐る同一の病気」として認識されていた。その後、アメリカの微生物学者Whiteにより、1906年にアメリカ腐蛆病菌の分離培養について⁴⁾、さらに1912年に顕微鏡下で観察されたヨーロッパ腐蛆病菌について報告されたことによって⁵⁾、腐蛆病には異なる病原体が関与する2つの病気が含まれることが認識されるようになった。しかし、Whiteによるヨーロッパ腐蛆病菌の培養は成功しなかったため、1957年にBaileyが培養法を確立するまで⁶⁾、その細菌学的特性は長らく未知であった。発見当初は*Bacillus pluton*と、1957年のBaileyの報告では*Streptococcus pluton*と呼ばれていたヨーロッパ腐蛆病菌は、1982年にBaileyとCollinsによって新属新菌種*Melissococcus pluton*として再分類され⁷⁾、1998年に種名が*Melissococcus plutonius*に修正されて⁸⁾、現在に至っている。

BaileyとCollinsの報告によると、*M. plutonius*はグラム陽性無芽胞性非運動性の槍先状レンサ球菌で(図1)、その発育には嫌気または微好気性の環境と二酸化炭素の存在が必要であると記載されている⁷⁾。さらに、培地中のNa/K比が1未満、即ちナトリウム濃度よりカリウム濃度の方が高い条件が発育に必要であると記載されている⁷⁾。そのため、*M. plutonius*の分離培養には一定濃度以上のカリウム塩を添加した培地で嫌気培養することが推奨されており、「病性鑑定マニュアル」においても第3版までは、本菌は「Na:K比<1で発育(BHI寒天での発育(-), 0.15M KH₂PO₄加BHI寒天での発育(+))」と記載されている。イギリス、ブラジル、インドのミツバチから例外的な株が数株分離されていたものの⁹⁻¹²⁾、異なる地域で分離された株が、形態学、生理学、抗原学および遺伝学的に均一な性状

を示したため¹³⁾、本菌は多様性の少ない菌種であると長年考えられてきた。

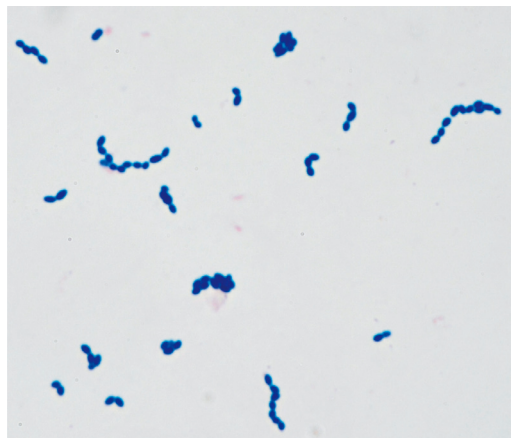


図1 *M. plutonius*のグラム染色像

3. ヨーロッパ腐蛆病菌の多様性

ところが近年、ヨーロッパ腐蛆病を疑う蜂児から、形態学的には*M. plutonius*を疑うものの、その発育にカリウム塩添加を必要としない菌株が分離される症例が日本各地で複数確認された^{14,15)}。16S rRNA遺伝子配列の比較やDNA-DNAハイブリダイゼーションによるゲノムDNAの類似性の比較を行った結果、これらの菌株も分類学的には*M. plutonius*であることが確認され^{14,15)}、さらに、感染実験によって、ミツバチの幼虫に強い病原性を示すことも確認された(図2)¹⁵⁾。しかし、これまで知られていた典型的な性状の*M. plutonius*株(典型株)とこれら非典型

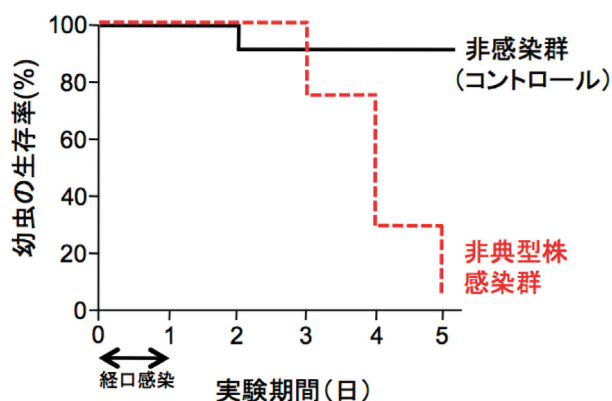


図2 *M. plutonius*非典型株のミツバチ幼虫に対する病原性

孵化後24時間以内の幼虫に、人工餌を混ぜた *M. plutonius*非典型株(DAT561)を24時間経口感染させた。幼虫は、保湿箱の中で35℃で飼育し、毎日、給餌と観察を行った。

的な性状の株（非典型株）の間では、カリウム塩の要求性だけでなく、酸素存在下での発育、 β グルコシダーゼ活性、エスクリンの加水分解能、L-アラビノース、D-セロビオース、サリシンからの酸産生能など様々な性状に違いが見られた（表1）^{14,15)}。

このように性状が大きく異なる典型株と非典型株について、パルスフィールドゲル電気泳動でその類縁関係を比較した結果、典型株と非典型株のゲノムDNAは、全く異なる制限酵素切断パターンを示すことが明らかになった（図3）¹⁵⁾。即ち、非典型株が発見されたのはごく最近であるが、非典型株は典型株から近年になって分化した一派生体などではなく、両者は遠い昔に共通の祖先から分化し、それぞれ異なる進化の道筋を辿ってきた株であることが示唆された。

表1 *M. plutonius* 典型株と非典型株の主な性状の違い^a

性状	典型株	非典型株
Medium 1 (Bailey 培地) ^b での発育	嫌気 + または + ^c	+
5% CO ₂	- または + ^c	+
好気	-	+
Medium 6 ^c での発育	嫌気 -	+ ^c または +
5% CO ₂	-	-
好気	-	-
KSBHI 寒天培地 ^d での発育	嫌気 +	+
5% CO ₂	- ^c , + ^c または +	+
好気	-	+
BHI 寒天培地 での発育	嫌気 -	+ ^c
5% CO ₂	-	+ ^c または +
好気	-	-
β -グルコシダーゼ活性	-	+
エスクリン加水分解	-	+
L-アラビノースからの酸産生	-	+
D-セロビオースからの酸産生	-	+
サリシンからの酸産生	-	+

^a 発育性状は 37°C 1 週間培養の結果。-: 発育なし, +^c: 弱く発育, +: 発育, +^c: 旺盛に発育。生化学性状は、+となっている項目でも、株によって活性が弱い場合がある。

^b 酵母エキス(1%), ブドウ糖 (1%), 可溶性デンプン(1%), KH₂PO₄ (1.36%), 寒天 (1.5%), pH6.6

^c Medium 1 の KH₂PO₄ を NaH₂PO₄ に置き換えた培地

^d BHI 寒天培地に KH₂PO₄ (終濃度 2.04%) と可溶性デンプン(終濃度 1%)を添加

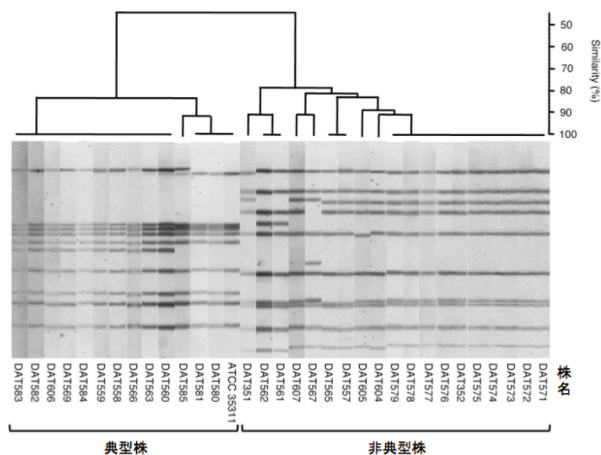


図3 制限酵素SmaIで切断した*M. plutonius*ゲノムDNAのパルスフィールドゲル電気泳動像

さらに、2013年にイギリスの研究グループによって、4つの遺伝子領域の塩基配列の違いを利用して*M. plutonius*株を型別するModified Multilocus Sequence Typing (Modified MLST) 法が開発され、世界各国で分離された株の型別が行われた^{16,17)}。その結果、*M. plutonius*株は、大きく3つのグループ (Clonal complex [CC] 3, CC12, CC13) に分かれることが明らかになった^{16,17)}。さらに、著者らも、これまでに日本で分離された*M. plutonius* 85株をModified MLST法で型別したところ、①日本分離株も、CC3、CC12、CC13のいずれかのグループに属すること、②典型株は全てCC3またはCC13に属し、非典型株は全てCC12に属すること、③非典型株が属するCC12には、イギリス、アメリカ、オランダ、ブラジルで分離された株の一部も含まれることが確認された（図4）¹⁸⁾。イギリスの研究グループの報告は、分離株を遺伝的に型別しただけであり、その他の性状解析は行っていない。しかし、この結果は、非典型株が日本固有のものではなく、世界中に存在していることを示唆している。

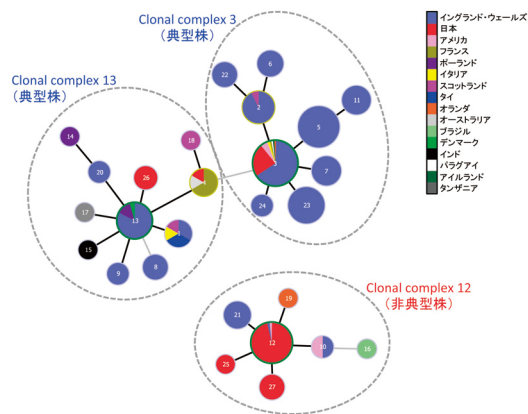


図4 MLST型別結果に基づく*M. plutonius*株の類縁関係

*M. plutonius*では、*argE*, *galK*, *gbpB*, *purR*の4遺伝子がMLSTに利用されている。各遺伝子は1塩基でも差異があれば異なる配列として認識され、異なるallele番号を付けて整理される。各株は上記4遺伝子のallele番号の並びでパターン化され、それぞれのパターン（プロファイル）に1つのSequence Type (ST) 番号が付与される。さらに型別結果をgoeBURST解析（参考文献30, 31）することにより、遺伝学的に近縁な株の集団 (clonal complex) にグループ分けすることが出来る。図中では、各STは1つの円で表され、各円は、そのSTに型別された株の由来とその割合を示す円グラフになっている。4遺伝子のうち、1遺伝子のみで配列が異なっていたST同士は黒い線で結ばれ、2遺伝子で配列が異なっていたST同士は灰色の線で結ばれている。

4. ヨーロッパ腐蛆病菌の検出法と問題点

野外でのヨーロッパ腐蛆病診断は、ミツバチの巣脾を目視で検査し、異常な幼虫の存在を確認することによって行われる。しかし、他の原因で死亡した幼虫もヨーロッパ腐蛆病発症幼虫と似た死後変化を辿ることがある。また、幼虫の死亡時期が遅れ、アメリカ腐蛆病のような症状を示すこともある。従って、多くの症例では、感染幼虫からの*M. plutonius*の検出が確定診断のために必要となる。

*M. plutonius*の検出法として国内で一般的に用いられている方法は、分離培養法とPCR法である。特に、病気を引き起こしている株そのものを手に入れる必要がある場合には、分離培養は必須である。しかし、*M. plutonius*は発育速度が比較的遅い菌であることから、原因菌の分離・同定には時間がかかる。また、分離頻度には検査担当者の熟練度も影響する。一方、PCR法は、簡便・迅速に*M. plutonius*を検出・同定できるのが特徴である。これまでに、16S rRNA遺伝子を標的とした*M. plutonius*特異的PCR法¹⁹⁾ およびhemi-nested PCR法^{20,21)} が報告されており、診断にも利用されている。しかし、これらのPCR法は、*M. plutonius*以外の菌種から非特異産物が増幅されることがあり²²⁾、特異性に関して問題が残る。特に、hemi-nested PCR法では、ヨーロッパ腐蛆病の代表的な二次感染菌である*Enterococcus faecalis*を*M. plutonius*と同定してしまう恐れがあるため²²⁾、診断や調査に用いる際には特に注意が必要である。また、これらのPCR法は、典型株と非典型株のどちらも検出できるものの、両タイプを識別することは出来ない(図5)²²⁾。*M. plutonius*の遺伝子検出法としては、*sodA*遺伝子を標的としたリアルタイムPCR法²³⁾ やcell wall-associated protease遺伝子を標的とした金ナノ微粒子による遺伝子検出法 (AuNPs-based assay)²⁴⁾ も開発されている。しかし、これらの方法はまだ普及はしておらず、また、16S rRNA遺伝子を標的としたPCR法と同様に、典型株と非典型株を識別することは出来ないと考えられる²²⁾。

PCR以外の検出法として、*M. plutonius*に特異的な抗体²⁵⁾を利用して感染幼虫内の菌を直接検出するキット (<http://www.vita-europe.com/products/efb-diagnostic->

test-kit/) が、いくつかの国で販売されており、診断に利用されている。本キットの最大の利点は野外で検査可能な点であり、養蜂場で診断を下し、直ちに適切な処置を施すことも可能である。しかし、本キットで*M. plutonius*を検出するためには、幼虫内に一定量以上の菌が存在する必要があると、さらに、非典型株の検出には適さないという欠点もある(図6)²⁶⁾。

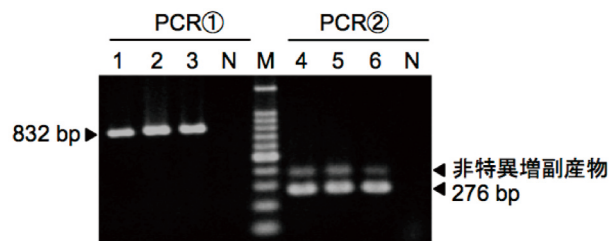


図5 既報の*M. plutonius*特異的PCRの結果

1 および 4 : 典型株、2 および 5 : 非典型株、3 および 6 : 典型株+非典型株、N : 陰性コントロール、M : 100 bpラダー。PCR① : 16S rRNA遺伝子を標的としたPCR (参考文献19)、PCR② : 16S rRNA遺伝子を標的としたhemi-nested PCR (参考文献20,21)。既報のPCR法では*M. plutonius*の典型株と非典型株のいずれも検出可能だが、両者を区別することはできない。

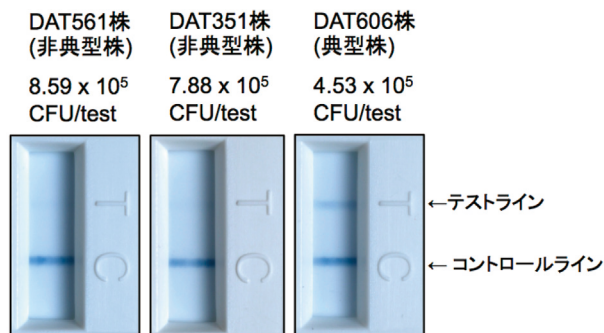


図6 *M. plutonius*検出キットによる典型株および非典型株の検出

5. 新たなヨーロッパ腐蛆病菌遺伝子検出法

多様性のみられた*M. plutonius*株の中でも、特に典型株と非典型株の間では各種性状が大きく異なり¹⁵⁾、その性状の違いが幼虫への病原性の違いにも影響を与えている可能性もある。従って、今後、より有効なヨーロッパ腐蛆病対策を考える上で、野外の各症例の原因となっている*M. plutonius*株のタイ

プを識別し、本病の疫学情報を蓄積することが重要となる。しかし、性状の違いを基にした株の型別には長い時間と多大な労力を要する。一方、PCR法をはじめとする上述の分子生物学的検出法は、迅速に *M. plutonius* を検出できるものの、典型株と非典型株を識別することはできない。そこで、我々は、典型株と非典型株を簡便・迅速に検出し、かつ識別するための新たな duplex PCR法を開発した²²⁾。

この方法では、*M. plutonius* のゲノム情報^{27,28)} を基に、典型株を検出するための標的遺伝子として Na⁺/H⁺ antiporter 遺伝子を、非典型株を検出するための標的遺伝子として Fur family transcriptional regulator 遺伝子を選択し、それぞれ 187bp および 424bp の増幅産物が得られるようにプライマーセットが設計されている²²⁾。本法では、典型株特異的 PCR と非典型株特異的 PCR を 1 つの反応液中で行うため、サンプル中に典型株の DNA のみが存在した場合は 187bp の産物のみが、非典型株の DNA のみが存在した場合は 424bp の産物のみが増幅され、両タイプの DNA が混在していた場合は両方のサイズの産物が増幅される (図 7 A)²²⁾。

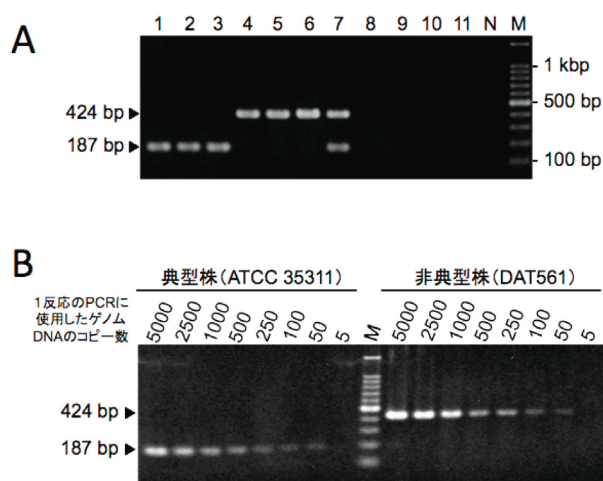


図 7 Duplex PCR法による *M. plutonius* 典型株・非典型株の検出と感度

(A) 1～3: 典型株、4～6: 非典型株、7: 典型株 + 非典型株、8: アメリカ腐蛆病菌、9: *Paenibacillus alvei*、10: *Brevibacillus laterosporus*、11: *Enterococcus faecalis*、N: 陰性コントロール、M: 100bp ラダー。本 duplex PCR 法では、*M. plutonius* 典型株・非典型株のいずれも検出可能であり、両者は増副産物の大きさで明確に区別できる。

(B) 本 Duplex PCR 法では典型株・非典型株のいずれも PCR 反応液中に 50 コピー程度のゲノム DNA が存在すれば検出できる。M: 100bp ラダー。

最適条件下で様々な菌種の DNA を使って試験した結果、供試した全ての *M. plutonius* 株では典型株または非典型株に特異的な増幅産物のみが得られた²²⁾。一方、*E. faecalis* を含む *M. plutonius* 以外の菌種では、いかなる非特異増幅産物も認められなかった²²⁾。また、本法では典型株・非典型株ともに 1 反応あたり 50 コピーの染色体 DNA があれば検出可能であり (図 7 B)²²⁾、ヨーロッパ腐蛆病発症幼虫から抽出した DNA を用いて、幼虫内の *M. plutonius* を直接検出することも可能であった²²⁾。上記のように、本 duplex PCR 法では、16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法で問題となる二次感染菌からの非特異増幅もみられなかったため、*M. plutonius* 株のタイプを識別するだけでなく、より正確なヨーロッパ腐蛆病診断を行う上でも極めて有用な方法であることが示唆された。

6. おわりに

ここ数年の研究の進展により、*M. plutonius* が今まで考えられていたより多様性に富む菌種であることが明らかとなった。また、非典型株が日本固有のものではなく、世界中に存在している可能性も示唆された。ミツバチは国際的な取引が盛んな昆虫である。異なるタイプの株がもともとどの地域で生じたのか、その由来は不明であるが、ミツバチの流通と共に世界中に広がっていった可能性が考えられる。また、*M. plutonius* は、養蜂に一般的に用いられているセイヨウミツバチだけでなく、トウヨウミツバチやヒマラヤオオミツバチなどの土着のミツバチからも分離されている^{11, 18, 29)}。異なるミツバチ種間での *M. plutonius* の伝播の有無については今後の研究が必要であるが、ミツバチの取引に伴う病原体の拡散は、地域の生態系にも影響を及ぼす可能性を秘めている。従って、ヨーロッパ腐蛆病の疫学と *M. plutonius* の生態をより正しく理解し、その情報をより有効なヨーロッパ腐蛆病対策に繋げるためには、国境を越えた広範な疫学調査が必要になってくるであろう。本稿で紹介した知見や遺伝子検出法が、そのような調査や検査現場でのより正確な診断に役立つことになれば幸いである。

7. 謝 辞

山口県環境保健センターの富永 潔先生、埼玉県中央家畜保健衛生所の荒井理恵先生、国立国際医療研究センター研究所の秋山 徹先生、帯広畜産大学の奥村香世先生をはじめ、本稿で紹介した研究にご参画・ご協力いただきました諸先生方に深謝いたします。

参考文献

- Morse RA, Calderone NW. (2000). The value of honey bees as pollinators of U.S. crops in 2000. *Bee Culture*, 128, 1-15.
- 日本養蜂はちみつ協会 (1999). ポリネーター利用実態調査報告書.
- Ellis JD, Munn PA. (2005) The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, 86, 88-101.
- White GF. (1906) The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. USDA, Bureau of Entomology, Technical Series, 14, 1-50.
- White GF. (1912) The cause of European foulbrood. US Department of Agriculture Bureau of Entomology circular no. 157. US Department of Agriculture, Washington, DC.
- Bailey L. (1957) The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. *J Gen Microbiol*, 17, 39-48.
- Bailey L, Collins MD. (1982) Reclassification of '*Streptococcus pluton*' (White) in a new genus *Melissococcus*, as *Melissococcus pluton* nom. rev.; comb. nov. *J Appl Bacteriol*, 53, 215-217.
- Truper HG, de Clari L. (1998) Taxonomic note : erratum and correction of further specific epithets formed as substantives (nouns) in apposition. *Int J Syst Bacteriol*, 48, 615.
- Allen MF, Ball BV. (1993) The cultural characteristics and serological relationships of isolates of *Melissococcus pluton*. *J Apic Res*, 32, 80-88.
- Bailey L, Gibbs AJ. (1962) Cultural characters of *Streptococcus pluton* and its differentiation from associated enterococci. *J Gen Microbiol*, 28, 385-391.
- Bailey L. (1974) An unusual type of *Streptococcus pluton* from the eastern hive bee. *J Invertebr Pathol*, 23, 246-247.
- Bailey L. (1984) A strain of *Melissococcus pluton* cultivable on chemically defined media. *FEMS Microbiol Lett*, 25, 139-141.
- Forsgren E. (2010) European foulbrood in honey bees. *J Invertebr Pathol* 103, S5-S9.
- 富永 潔. (1997) 山口県で発生したヨーロッパ腐蛆病の細菌学的考察. 畜産の研究. 51, 63-69.
- Arai R, Tominaga K, Wu M, et al. (2012) Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. *PLoS ONE*, 7, e33708.
- Haynes E, Helgason T, Young JPW, et al. (2013) 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, 525-529.
- Budge GE, Shirley MDF, Jones B, et al. (2014) Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. *The ISME J. advance online publication*, <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2014.20>.
- Takamatsu D, Morinishi K, Arai R, et al. (2014) Typing of *Melissococcus plutonius* isolated from European and Japanese honeybees suggests spread of sequence types across borders and between different *Apis* species. *Vet Microbiol*, 171, 221-226.
- Govan VA, Brözel V, Allsopp MH, et al. (1998) A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. *Appl Environ Microbiol*, 64, 1983-1985.
- Djordjevic SP, Noone K, Smith L, et al. (1998) Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *J Apic Res*, 37, 165-174.
- McKee BA, Djordjevic SP, Goodman RD, et al. (2003) The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. *Apidologie*, 34, 19-27.
- Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, et al. (2014) Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. *J Vet Med Sci*, 76, 491-498.
- Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, et al. (2008) Infection rate based on quantitative real-time PCR of *Melissococcus plutonius*, the causal agent of European foulbrood, in honeybee colonies before and after apiary sanitation. *Apidologie*, 39, 362-371.
- Saleh M, Soliman H, Sorum H, et al. (2012) A novel gold nanoparticles-based assay for rapid detection of *Melissococcus plutonius*, the causative agent of European foulbrood. *Vet Rec*, 171, 400.
- Tomkies V, Flint J, Johnson G, et al. (2009) Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. *Apidologie*, 40, 63-72.
- Takamatsu D, Okura M, Yoshiyama M, et al. (2012) Detection of atypical *Melissococcus plutonius* in honeybees. *Vet Rec*, 171, 630.
- Okumura K, Arai R, Okura M, et al. (2011) Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* ATCC 35311. *J Bacteriol*, 193, 4029-4030.
- Okumura K, Arai R, Okura M, et al. (2012) Complete genome sequence of *Melissococcus plutonius* DAT561, a strain that shows an unusual growth profile and is representative of an endemic cluster in Japan. *J Bacteriol*, 194, 3014.
- Allen MF, Ball BV, Underwood BA. (1990) An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*. *J Invertebr Pathol*, 55, 439-440.
- Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, et al. (2009) Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinformatics* 10, 152.
- Francisco AP, Vaz C, Monteiro PT, et al. (2012) PHYLOViZ : phylogenetic inference and data visualization for sequence based typing methods. *BMC Bioinformatics* 13, 87.

著者略歴

高松大輔氏

1998年 北海道大学獣医学部卒業

同年 農林水産省家畜衛生試験場（現 動物衛生研究所）に入所し、現在に至る

2002～2005年

長期在外派遣研究（カリフォルニア大学サンフランシスコ校）

現在の役職

細菌・寄生虫研究領域・主任研究員
研究テーマ

豚レンサ球菌症、ヨーロッパ腐蛆病等、グラム陽性細菌による家畜の感染症の発病機構の解明および診断法の開発