

養蜂環境における腐蛆病菌浸潤の実態調査

筑後家畜保健衛生所 ○笠 正二郎、寺迫 美知子、野見山 享
中央家畜保健衛生所 印丸 美紀

1 はじめに

腐蛆病はミツバチの家畜伝染病で、アメリカ腐蛆病とヨーロッパ腐蛆病の2種があり、アメリカ腐蛆病の病原菌はアメリカ腐蛆病菌 (*Paenibacillus larvae* 以下、P1)、ヨーロッパ腐蛆病はヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius* 以下、Mp) が原因菌である。それぞれ遺伝子型および表現型で区別でき、P1はERIC (enterobacterial repetitive intergenetic consensus) I~V型に区分され^[2, 4, 5]、日本ではERIC I型およびERIC II型が分離確認されている。また、Mpは培養系の異なる典型株と

非典型株の2つの表現型に区分できる^[7]。さらに、P1はERIC I型がERIC II型より蜂群への影響が大きい、幼虫への病原性はERIC II型がERIC I型より強い^[4]。Mpでは非典型株であるCC (clonal complex) 12が幼虫病原性は高い^[8]。このほかに、死亡蜂児の粘稠性、ミルクテストによる反応などそれぞれが異なる (表1)。2005年は全国で80戸、300群程度が発生していたが、その後、発生数は年々減少し、近年では20戸、100群以下の発生で推移している (図1)。この傾向から日本における腐蛆病発生は収束傾向にあるかのようにも思える。しかし、岡本らは全国の市販ハチミツを調査し、その94%から腐蛆病菌のDNAが検出されたと報告^[1]した。このことは腐蛆病の発生状況と異なり、実態が乖離しているかのように思える。そこで、管内の養蜂環境における腐蛆病菌の浸潤状況を調査した。加えて、養蜂環境における腐蛆病菌の検索を行う

表1 腐蛆病の種類と特徴

	アメリカ腐蛆病	ヨーロッパ腐蛆病
病原菌	アメリカ腐蛆病菌 <i>Paenibacillus larvae</i>	ヨーロッパ腐蛆病菌 <i>Melissococcus plutonius</i>
菌の特徴	芽胞形成グラム陽性桿菌	グラム陽性連鎖球菌
菌の型別	遺伝子型:ERIC I~V型 日本ではERIC I型とII型が分離されている	表現型:典型株及び非典型株 (典型株:CC3, CC13 非典型株:CC12)
蜂群への影響	ERIC I型 > ERIC II型 幼虫病原性:ERIC II型 > ERIC I型	CC3 > CC12 > CC13 幼虫病原性:CC12 > CC3, CC13
蜂児の状態と臭気	有蓋の状態に死亡蜂児が観察される	無蓋の状態に死亡蜂児が観察される
死亡蜂児の粘稠性	陽性	陰性
ミルクテスト反応	陽性(反応しないこともある)	陰性

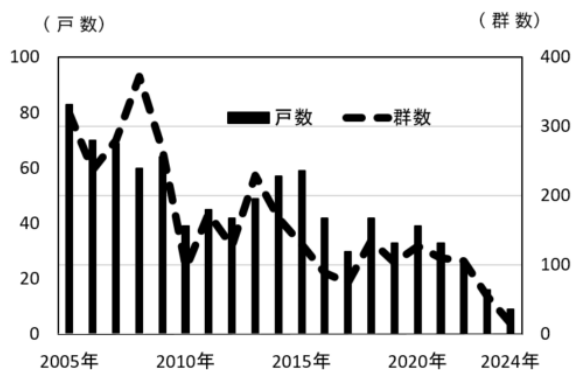


図1 全国の腐蛆病発生状況 (農林水産省統計)



図2 検体収集



図3 検体および供試量

上で、簡便で、精度の高い検査法を検討した。

2 材料および方法

(1) 検体処理

調査は2024年5月～2025年8月の管内の養蜂農家の腐蛆病検査時に行い、腐蛆が確認されないセイヨウミツバチおよびニホンミツバチ巣箱内外の死亡成蜂、ハチミツ、巣屑などを検体とした。収集はセイヨウミツバチ飼養農家で管内8市町の29戸、84検体を集め、ニホンミツバチ飼養農家からは管内5市の27戸、66検体を収集した(図2)。収集した検体は腐蛆病菌遺伝子の抽出まで-80℃で凍結保存した。

検体は、死亡成蜂は2～4頭、ハチミツは滅菌綿棒(軸長15cm、直径4.5mm、紙軸)で巣房蜜を採取し、蜜蟻や巣屑等は約200mgを秤量して供試した(図3)。

検体の乳剤化および濾液回収は、フィルター付きの手もみ式簡易破碎容器(フィンガーマッシャー SARSTEDT社)に検体および滅菌蒸留水1mLを入れ、手もみ破碎し、フィルターで濾過し、濾液を回収した。回収時にフィルターの目詰まりにより回収量が不十分な場合は、フィルターキャップを少し緩め、フ

ィルターと容器の間から押し出る液を回収した。

P1は芽胞形成菌であるため、DNA抽出には市販のDNA回収用抽出キット(ヨーネ・ピュアスピン ファスマック社)を用いた。フィルター濾過した回収液500μLを材料として岡本らの方法^[3]で回収および精製した。

(2) 遺伝子検査

DNAの増幅は、岡本らが開発したマルチプレックスPCR法^[2]に基づいて、P1共通、P1-ERIC I型、P1-ERIC II型、Mp-典型、Mp-非典型の5セットのプライマーを用いて実施した(図4)。

3 結果

(1) セイヨウミツバチ

管内のセイヨウミツバチ農家29戸の44.8%(13/29戸)から腐蛆病菌が検出された。また、P1は27.6%(8/29戸)、強病原性のERIC II型は5戸から検出された。Mpは24.1%(7/29戸)、幼虫毒性の強い非典型は4戸から検出された(図5)。セイヨウミツバチの84検体のうちP1は17.9%(15/84検体)が検出され、そのうち80.0%(12/15検体)は強病原性のERIC II型であった。さらに、Mpは11.9%(10/84検体)から検出さ

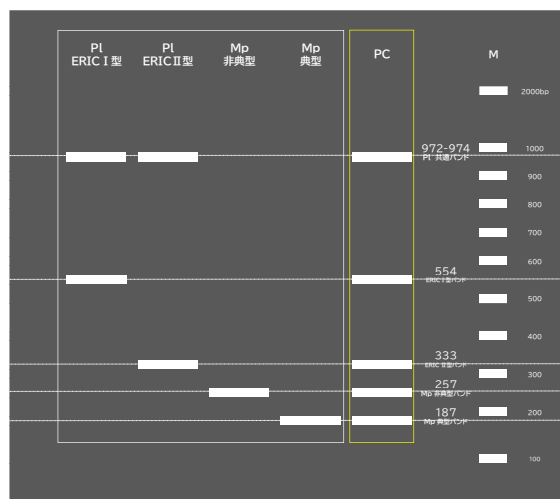


図4 マルチプレックスPCRの概要

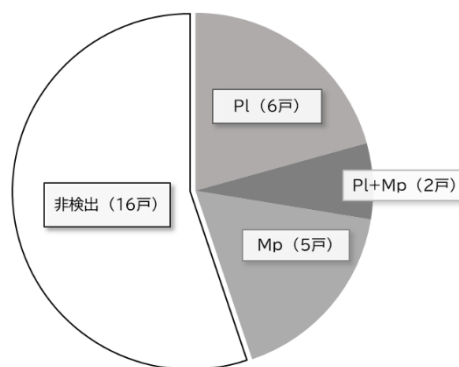


図5 セイヨウミツバチ飼養農家の腐蛆病菌浸潤

表2 セイヨウミツバチ飼養環境における腐蛆病菌

P1 (15 検体)			Mp (10 検体)		
ERIC I型	ERIC II型	両方	典型	非典型	両方
3	11	1	5	1	4

れ、その50.0% (5/10 検体) からは幼虫毒性の強い非典型が検出された (表2)。

(2) ニホンミツバチ

管内のニホンミツバチ農家27戸の11.1% (3/27 戸) から腐蛆病菌が検出され、1戸からはP1 およびMp の両種の菌が検出された (図6)。また、総66 検体の6.1% (4/66 検体) から腐蛆病菌が検出され、P1 は2 検体から検出され、いずれもERIC I 型であった。さらに、Mp も2 検体から検出され、うち1 検体からは非典型と典型の両方の型が検出された (表3)。

(3) 養蜂環境の腐蛆病菌検出

養蜂環境から採取した各種検体からの腐蛆病菌の検出率は、セイヨウミツバチでは死亡成蜂から29.3% (12/41 検体)、ハチミツから26.9% (7/26 検体) と比較的高率に検出された。しかし、ニホンミツバチでは腐蛆病菌は巣屑からのみ検出され、12.9% (4/31 検体) であった。また、セイヨウミツバチで高率に検出された死亡成蜂からは検出されなかった (表4)。

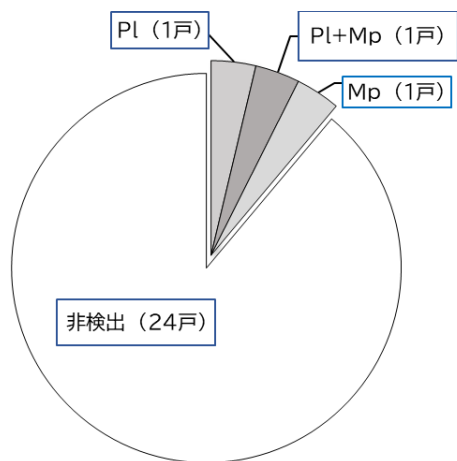


図6 ニホンミツバチ飼養農家の腐蛆病菌浸潤

表3 ニホンミツバチ飼養環境における腐蛆病菌

P1 (2検体)			Mp (2検体)		
ERIC I型	ERIC II型	両方	典型	非典型	両方
2	0	0	1	0	1

4 考察

本調査でははじめに検体量を決定して遺伝子抽出、PCR を実施し、目的の遺伝子を検出できたが、検体量が妥当であるかは考察しておらず、今後検証する必要がある。また、今回はP1 の分類でERICIII、IVおよびV型はPCR を実施していないため、P1 共通バンドが出ている検体ではこれらの株が混在する可能性があり、この場合はMLST (multilocus sequence typing scheme) 法^[5]など菌分離による判別が必要となる。本調査の結果、養蜂環境の検体からはP1 およびMp の両種の複数の菌株の存在が確認された。このことは養蜂環境に腐蛆病菌が潜在し、条件が揃えば腐蛆病が発生する危険性が示唆され、養蜂農家へは『発生リスクの注意喚起』と『発生予防の啓発』が必要であると考えられた。また、養蜂環境における腐蛆病菌検出には、セイヨウミツバチの場合は、死亡成蜂やハチミツを調査対象にし、ニホンミツバチでは巣屑が好ましいと示唆される。さらに、ニホンミツバチには比較的に腐蛆病菌が少ないことが判明した。これは、ニホンミツバチの成虫の消化管には抗アメリカ腐蛆病菌が存在すること^[9]、ほかにセイヨウミツバチと比較してニホンミツバチは免疫関連遺伝子を多く所有することが要因と思われる。検査の手技において、検体の乳剤化には市販のフィルター付き手もみ式粉碎容器が効率的であり、また、市販DNA抽出キットの利用で腐蛆病菌の遺伝子抽出が効率化した。今後は、

表4 ミツバチ飼養環境の腐蛆病菌検出率

ミツバチ	菌種	死亡成蜂	ハチミツ	巣屑	その他 (蜜蝋、蛆など)
セイヨウミツバチ	P1	22.0% (9/41)	15.4% (4/26)	11.1% (1/9)	13.3% (2/15)
	Mp	12.2% (5/41)	19.2% (5/26)	0% (0/9)	0% (0/15)
	計	29.3% (12/41)	26.9% (7/26)	11.1% (1/9)	13.3% (2/15)
ニホンミツバチ	P1	0% (0/34)	-	6.5% (2/31)	0% (0/1)
	Mp	0% (0/34)	-	6.5% (2/31)	0% (0/1)
	計	0% (0/34)	-	12.9% (4/31)	0% (0/1)

本結果を基に養蜂農家の衛生意識を高め、個別に指導するとともに、より簡易な採材法や検索方法を検討したい。

参考文献

- [1] 岡本真理子：畜産技術(2024年)9月号:56-59
- [2] Okamoto M. *et al.* 2022. J. Vet. Med. Sci. 84:390-399
- [3] 農研機構 【アメリカ腐蛆病菌およびヨーロッパ腐蛆病菌の検出および遺伝子型/表現型識別用マルチプレックスPCR実施マニュアル】 2022年10月
- [4] Honnes B. *et al.* 2020. International J. Med. Microbi. vol. 310(2020)1513994
- [5] Morrissey *et al.* :2015 Environ. Microbiol. 17:1414-1424
- [6] Okamoto. M. *et al.* 2022. J Vet Med Sci. (2022) 84 (11) : 1453-1456
- [7] Takamatsu D. *et al.* 2015. J. VetMed. Sci 78(1): 29-34
- [8] Haynes E. *et al.* 2013. Environ. Microbiol. Rep. 5: 525-529
- [9] 嘉山三喜雄：畜産技術 (2011年) 1月号:33-38