

【お問い合わせ】

一般社団法人
日本養蜂協会

〒104-0033
東京都中央区新川二丁目6-16
馬事畜産会館6階

TEL 03-3297-5645
FAX 03-3297-5646

<http://www.beekeeping.or.jp>

養蜂技術指導手引書 II

平成27年度産地収益力増強支援事業
養蜂等振興推進事業(全国推進事業)

ミツバチの感染症
ヨーロッパ腐蛆病

一般社団法人 日本養蜂協会

ミツバチの感染症
ヨーロッパ腐蛆病

高松大輔
芳山三喜雄
荒井理恵

目次

ヨーロッパ腐蛆病とは	4
発症過程	6
疫学	8
ヨーロッパ腐蛆病菌の歴史と特徴	10
発生状況	12
診断	14
治療と予防	18
最後に	19

ヨーロッパ腐蛆病とは

Point

- **ヨーロッパ腐蛆病は幼虫の細菌感染症であり、法定伝染病に指定されている。**
- **4～5日齢の幼虫が死亡することが多い。**
- **死亡幼虫は乳白色～褐色の水っぽい、時に酸臭を発する腐蛆となる。**

ヨーロッパ腐蛆病は、ヨーロッパ腐蛆病菌(*Melissococcus plutonius*)によって引き起こされるミツバチの幼虫の細菌感染症である*14。家畜伝染病予防法では、アメリカ腐蛆病と共に「腐蛆病」として法定伝染病(家畜伝染病)に指定されている。ヨーロッパ腐蛆病の発症時期はアメリカ腐蛆病より早く、巣房に蓋がされる前の4～5日齢の幼虫が死亡することが多い^[表1]が、蓋がされた後に死亡することもある。また、症状が軽い場合、蛹になり、さらに成虫にまでなる場合もある。

死亡幼虫は巣房内で無秩序に横たわり、乳酸菌などの二次感染菌の影響で変性・分解され、張りがなくなり、乳白色～褐色の水っぽい、時に酸臭を発する腐蛆となる^[図1C]。しかし、アメリカ腐蛆病で死亡した個体とは異なり、腐蛆には粘稠性はなく、糸を引くことはない。腐敗前の死亡幼虫を解剖するとチョコレートの粉様の白い凝集物が中腸内に観察される。通常、腐蛆は育児蜂によって巣から排除されるが、排除されない場合は、最終的に乾燥した鱗片状の死体となる。しかし、アメリカ腐蛆病によって形成される鱗片状の死体とは異なり、巣房から容易に剥がすことができる。感染が蜂群内に広がると、巣脾はたくさんの無蓋の巣房が有蓋の巣房と混ざり合う状態になる^[図1AB]。

表1 ヨーロッパ腐蛆病とアメリカ腐蛆病の比較

	ヨーロッパ腐蛆病	アメリカ腐蛆病
主な症状	4～5日齢の無蓋幼虫が死亡 腐蛆は水っぽい	有蓋幼虫が死亡 腐蛆は粘稠性
におい	酸臭、魚が腐敗した臭い (一様ではない)	膠臭、納豆臭
原因菌	ヨーロッパ腐蛆病菌 <i>Melissococcus plutonius</i>	アメリカ腐蛆病菌 <i>Paenibacillus larvae</i>
菌の形	数珠状に連なる紡錘形の球菌	細長い桿状の菌
芽胞形成能	なし	あり

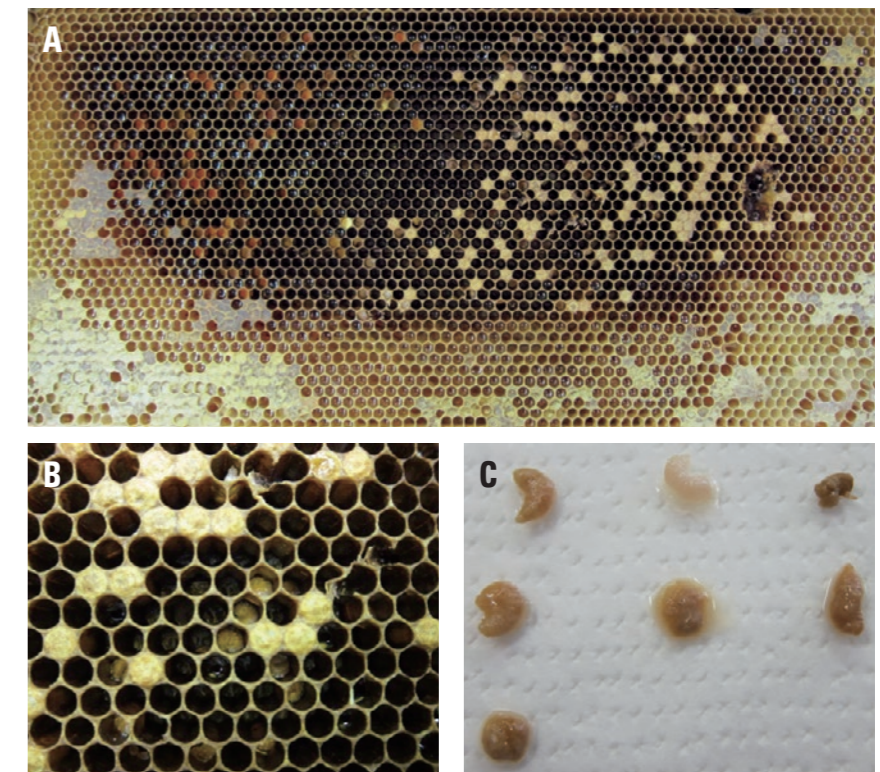


図1 ヨーロッパ腐蛆病発症蜂群の巣脾(A-B)と腐蛆(C)

発症過程

Point

- ヨーロッパ腐蛆病は幼虫の腸管感染症である。
- 幼虫の死因は、ヨーロッパ腐蛆病菌が腸内で餌の栄養分を横取りすることによる餓死とも考えられているが、発症メカニズムには不明な点も多い。

ヨーロッパ腐蛆病は、ミツバチの幼虫の腸管感染症であり、幼虫はヨーロッパ腐蛆病菌に汚染された餌を食べることによって感染する。幼虫の最も重要な仕事は「食べて大きくなること」である。そのため、幼虫の体内でもっとも大きな容積を占めるのが、食物の消化吸収の場となる巨大な消化器官(中腸と後腸)である【図2A】。幼虫に食べられたヨーロッパ腐蛆病菌は、病気の発症過程を通じて主に中腸に留まって増殖するのが本病の特徴である。

中腸の表層には、中腸上皮細胞が並んでいるが、幼虫によって食べられた餌は直接中腸上皮細胞に接触しているわけではなく、餌と中腸上皮細胞の間には「囲食膜(いしょくまく)」と呼ばれる層が存在する【図2A】。囲食膜はキチンやムチン様タンパク質などから構成されており、腸管の表面を物理的・化学的・刺激や病原体の侵入から保護する役割を持つ。また、囲食膜は食物の効率的な消化吸収にも役立っており、昆虫の幼虫の正常な発育に必要な組織と考えられている。

中腸内に到達したヨーロッパ腐蛆病菌は、まず、この囲食膜の表層に局在する。そこで幼虫が食べた餌を栄養分にして爆発的に増えていき、やがて、本来は食べた餌で満たされるはずの中腸内を菌が埋め尽くしてしまう【図2B-C】。ヨーロッパ腐蛆病発症幼虫を解剖したときに見られる中腸内の白い凝集物はこの菌塊である。時間の経過とともに、中腸上皮細胞を守っている囲食膜は変性・消失していき、菌が直接、中腸上皮細胞に接する部分も見られるようになる。さらに病状が進むと、中腸上皮細胞の変性も見られるようになる。死亡したと考えられる幼虫では、崩壊した中腸上皮細胞層から腸管外に漏れ出した菌が血体腔(体内の組織や器官の間の空間)にも観察されるようになる【図2E】。また、一部の菌はマルピーギ管(脊椎動物の腎臓に相当する器官)の中にも観察されるが、中腸以外で観察される菌の数は多くない。本病では、ヨーロッパ腐蛆病菌は基本的に中腸内でのみ増殖すると考えられており、ヨーロッパ腐蛆病菌やその他の二次感染菌が血体腔に侵入する前に幼虫が死亡していると考えられている。

幼虫の直接の死因はまだ不明な点が多いが、腸内で増殖した菌が、幼虫が食べた餌の栄養分を横取りして消費してしまうため、幼虫が餓死しているともいわれている。この餓死説については検証の余地が残されているが、後述するように、幼虫の栄養状態の悪化は本病の発症や症状の重症化に影響しているようである。

アメリカ腐蛆病の場合は、アメリカ腐蛆病菌自身が産生するタンパク質分解酵素が死亡した幼虫の腐敗に関与していると考えられているが、ヨーロッパ腐蛆病の場合は、幼虫の死後に感染した二次感染菌(腐敗菌)が幼虫の腐敗に関与しているといわれている。代表的な二次感染菌としては、*Enterococcus faecalis*、*Paenibacillus alvei*、*Brevibacillus laterosporus*などが知られている。これら腐敗菌の中には、乳酸発酵をするいわゆる乳酸菌の仲間も含まれており、そのような菌が感染して優勢になると、幼虫の死体からたくさんの酸が産生され、酸臭が漂うようになる。

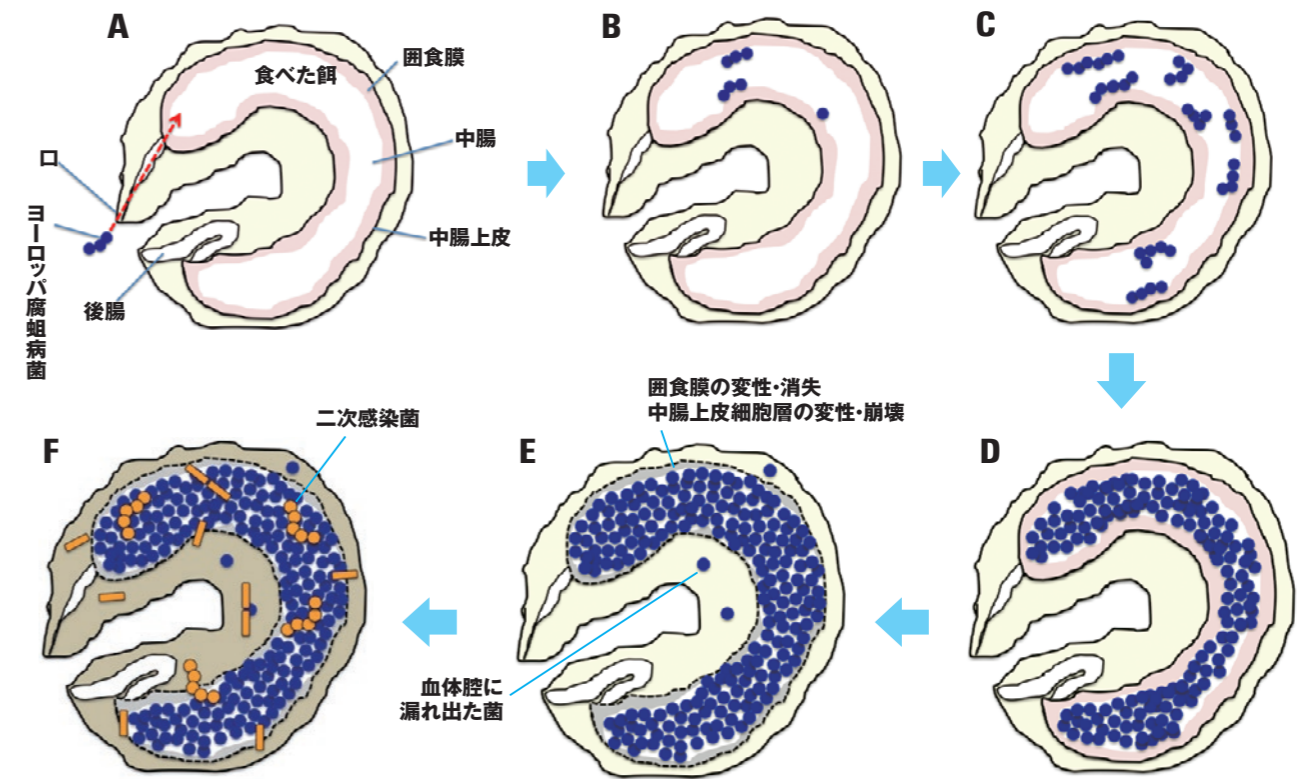


図2 ヨーロッパ腐蛆病の発症過程

- A ヨーロッパ腐蛆病菌に汚染された餌を食べて感染。
- B-D 菌は中腸の囲食膜表層で増殖し、中腸内を埋め尽くす。
- E 囲食膜は変性・消失し、菌が中腸上皮細胞に接する部分も見られるようになる。中腸上皮細胞も変性・崩壊し、死亡する。中腸から漏れ出した菌が血体腔にも観察されるが、数は多くない。
- F 死亡幼虫が二次感染菌の影響で腐敗する。

血体腔: 昆虫などの開放血管系を持つ生物の組織・器官の間の空間。血液(血リンパ)で満たされている。

疫学

Point

ヨーロッパ腐蛆病の発症と重症化には、病原体の毒性や感染菌量だけでなく、蜂群内の育児蜂と幼虫の数のバランスや餌の量なども影響する。

ヨーロッパ腐蛆病の場合、幼虫がヨーロッパ腐蛆病菌に感染していたとしても、必ずしも典型的な症状を示すわけではない。幼虫は日齢にかかわらずヨーロッパ腐蛆病菌に感受性を示すが、成長した幼虫ほど感染による影響を受けにくい*7。また、幼虫が摂取する菌量が多いほど死亡率が高くなる傾向もある*21。近年、異なる遺伝子型の菌株は蜂群への病原性も異なることが示唆されており*10、感染しているヨーロッパ腐蛆病菌株のタイプによって個々の幼虫への影響も異なる可能性がある。

蜂群レベルでのヨーロッパ腐蛆病の発症や重症化の程度には、巣を汚染している菌株のタイプや菌量の違いだけでなく、餌不足などのストレスの程度も関係する。幼虫の餌不足は、花粉などの不足によるものだけでなく、幼虫と育児蜂の数の不均衡によっても起こる。ヨーロッパ腐蛆病は流蜜期に多発する傾向にある。この時期は幼虫、成蜂ともに蜂群内の個体数が増加するが、蜜集めに駆り出される成蜂の割合も増えるため、相対的に育児蜂の負担が増える。その結果、個々の幼虫への給餌量が減るため、腸内でのヨーロッパ腐蛆病菌による横取りが幼虫の栄養状態や健康状態に大きく影響し、病状が悪化すると考えられている^[図3]。

異常を示した幼虫は、通常、育児蜂によって巣から排除される。悪天候などにより野外で採蜜ができなくなり、一時的に巣内の育児蜂の数が増えると、幼虫への世話が行き届くようになり、症状が目立たなくなることがある。しかし、幼虫内では菌が蓄積され続けるため、採蜜が再開して育児蜂の数が再び減少すると、症状が悪化し、典型的なヨーロッパ腐蛆病の症状を示すようになる。一方、重症化の結果、死亡して排除される幼虫が増えると、蜂群を汚染しているヨーロッパ腐蛆病菌の量は減ることになる。さらに、幼虫が食べられる餌の量も増えるため、栄養状態が改善し、症状が緩和される。このように、菌の毒力や感染菌量に加え、蜂群内の蜂の数とバランスや給餌量も本病の病状に影響する。従って、育児蜂の数や給餌量が安定すると症状が改善されることが多い。

上記のように、感染幼虫は、感染菌量や給餌量の程度によって病状が異なり、結果として下記の4つの経過のいずれかを辿る^[図3]。

- ① 巣房に蓋がされる前に発症し、死亡する前に巣から排除される。
- ② 巣房に蓋がされる前に発症・死亡し、巣から排除される。

高	菌株の毒力	低
多	感染菌量	少
多	幼虫の数	少
少	育児蜂の数	多
少	餌の量	多

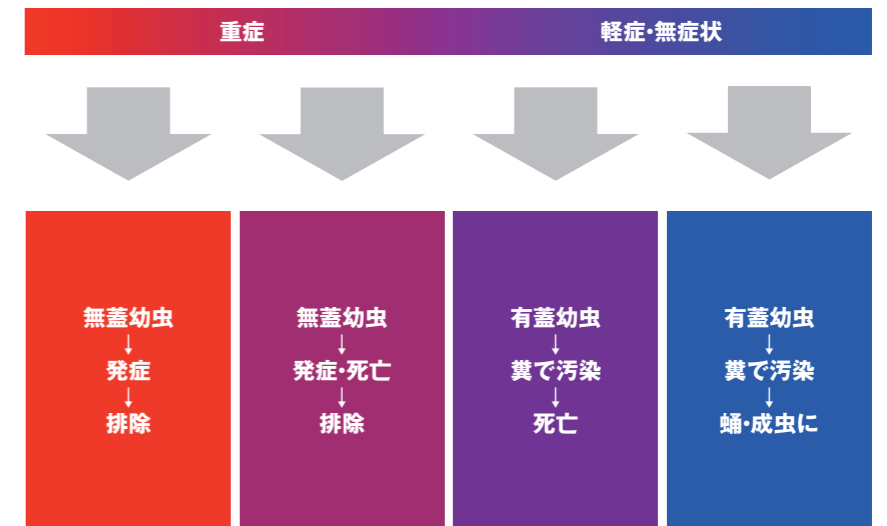


図3 ヨーロッパ腐蛆病の発症・重症化に影響を及ぼす要因と感染幼虫が辿る経過

- ③ 巣房に蓋がされた後に蛹になれないまま死亡する。
 - ④ 蛹になり、時に成虫にまでなる。
- ①と②の場合では、菌が幼虫の体内に閉じ込められたまま巣から排除されるが、③と④の場合では、幼虫がヨーロッパ腐蛆病菌を大量に含んだ糞を排泄し、巣を汚染することになる。

ヨーロッパ腐蛆病菌に汚染された蜂群では成蜂も保菌している場合が多い。特に、幼虫のいる巣房の近くで働いている働き蜂は、巣の入り口付近の蜂よりも保菌率が高い*23。ヨーロッパ腐蛆病菌を保菌する働き蜂は、蜂群内で病原体を拡散させるだけでなく、他の蜂群や養蜂場に病原体を運ぶこともある*9,20。また、ハチミツがヨーロッパ腐蛆病菌に汚染されていることもあり*18,20、盗蜜によって病原体が拡散する経路も考えられる。

Enterococcus faecalis や *Paenibacillus alvei* といった二次感染菌がヨーロッパ腐蛆病の病状に影響を及ぼしている可能性も示唆されているが、二次感染菌の役割については不明な点が多い。二次感染菌の影響については、今後のさらなる研究が必要である。

ヨーロッパ腐蛆病菌の歴史と特徴

Point

- **ヨーロッパ腐蛆病菌は100年以上前から知られている病原体である。**
- **ヨーロッパ腐蛆病菌は株間で多様性があり、菌株によって病原性も異なると考えられている。**

ミツバチの腐蛆病は「発症した蜂群から腐敗臭が発せられる病気」として古く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は区別されていなかった。しかし、20世紀初頭にアメリカの昆虫学者Whiteによって、2つの異なる病原体(アメリカ腐蛆病菌とヨーロッパ腐蛆病菌)の存在が確認されたことで^{[表2]^{*}29,30}、本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、ヨーロッパ腐蛆病菌の発見は顕微鏡下での観察結果を基にしており、White自身は本菌を培養することはできなかった。そのため、1957年にBaileyによって培養法が確立されるまで^{*5}、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^{*8}、1998年に菌種名が*Melissococcus plutonius*に修正されて^{*28}、現在に至っている^[表2]。

ヨーロッパ腐蛆病菌は、連鎖する(数珠状に連なる)紡錘形の球菌で^[図4]、運動性はない。アメリカ腐蛆病菌とは異なり芽胞は形成しない。しかし、ミツバチの体外でも比較的長期間生存できるため、ヨーロッパ腐蛆病が発生した養蜂場では翌年も再発しやすいといわれている。

菌の遺伝子情報を基にグループ分けをすると、世界各国で分離されるヨーロッパ腐蛆病菌株は3つのグループ(クローナルコンプレックス[CC] 3, CC12, CC13)に分かれることが明らかになっている。これらのグループのうち、特にCC12の菌は培養性状や生化学性状が一般的に知られているヨーロッパ腐蛆病菌の性状と大きく異なるため^{15ページ[表3]^{*}3}、非典型株と呼ばれることもある。また、イギリスで行われた大規模な疫学調査の結果、野外では、CC3のグループの菌が他のグループの菌より蜂群に大きな被害を与えているという調査結果が得られている^{*10}。即ち、異なるグループのヨーロッパ腐蛆病菌株は、蜂群に対する病原性も異なり、養蜂業に与える経済的被害も異なる可能性がある。日本にも、これら3つのグループの株が存在しているが^{*25}、各グループの株によるヨーロッパ腐蛆病の発生頻度や被害の程度などについては調査がされておらず、十分な情報は無い。

表2-1 ヨーロッパ腐蛆病菌の発見と分類の歴史

1912年	Whiteによりヨーロッパ腐蛆病の原因菌候補として <i>Bacillus pluton</i> という菌種名で報告される(顕微鏡下での観察結果を基にしており、培養には成功していない) ^{*30}
1957年	Baileyにより培養法が確立され、菌の詳細な性状が報告される。菌種名が、 <i>Streptococcus pluton</i> に改名される。 ^{*5}
1982年	BaileyとCollinsによって再分類され、新属新菌種となる。それに伴い、菌種名が、 <i>Melissococcus pluton</i> に変更される。 ^{*8}
1998年	菌種名が、 <i>Melissococcus plutonius</i> に微修正される。 ^{*28} 現在に至る。

表2-2 アメリカ腐蛆病菌の発見と分類の歴史

1906年	Whiteによりアメリカ腐蛆病を発症した幼虫から分離培養された菌が、 <i>Bacillus larvae</i> として報告される。 ^{*29}
1950年	KatznelsonによりPowdery scale病を発症した幼虫から分離培養された菌が、 <i>Bacillus pulvificiens</i> として報告される。 ^{*19}
1993年	<i>B. larvae</i> と <i>B. pulvificiens</i> が、 <i>Paenibacillus</i> 属に再分類され、それぞれ、 <i>Paenibacillus larvae</i> と <i>Paenibacillus pulvificiens</i> に改名される。 ^{*4}
1996年	アメリカ腐蛆病の原因菌として分離された <i>P. larvae</i> と、Powdery scale病の原因菌として分離された <i>P. pulvificiens</i> が、同じ菌種であることが明らかになる。これら2つの菌種は2つの亜種として再分類され、それぞれ、 <i>Paenibacillus larvae subsp. larvae</i> と <i>Paenibacillus larvae subsp. pulvificiens</i> と改名される。 ^{*17}
2006年	2つの亜種が撤廃され、菌種名が <i>Paenibacillus larvae</i> に統一される。 ^{*15} 現在に至る。

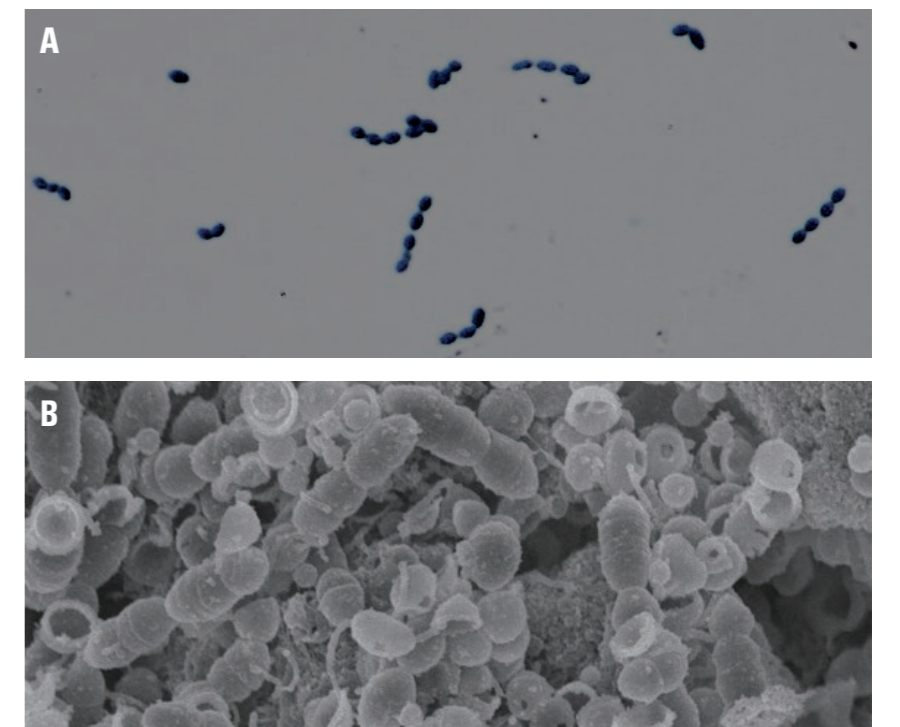


図4 ヨーロッパ腐蛆病菌の形態

- A グラム染色像。培地に発育した菌をスライドガラス上で染色し、光学顕微鏡で観察。なお、感染幼虫の直接鏡検でも同様の像が観察される。
- B 幼虫の腸内に感染した菌を電子顕微鏡で観察。

発生状況

Point

- ヨーロッパ腐蛆病は日本を含む世界中の国々で発生しているが、日本での正確な発生件数は統計が取られていない。
- ヨーロッパ腐蛆病は多様なミツバチ種で発生する。

ヨーロッパ腐蛆病は、ニュージーランドなどの一部の国を除き、養蜂が行われている多くの国で発生が認められている^{[65]*13}。農林水産省がまとめている監視伝染病発生年報によると、毎年、日本でも、40～80戸で計100～400群程度の腐蛆病の発生が報告されている。しかし、この数字には、アメリカ腐蛆病とヨーロッパ腐蛆病の両疾病が含まれている。また、確定診断がされないまま自主的に処分されている腐蛆病を疑う蜂群も存在すると考えられる。従って、日本におけるヨーロッパ腐蛆病の正確な発生件数はわかっていない。

原因菌のヨーロッパ腐蛆病菌は、比較的幅広い種のミツバチに感染し、病気を引き起こすことができると考えられる。実際、本病は、養蜂に一般的に用いられているセイヨウミツバチ(*Apis mellifera*^[66])に加えて、中国やインドのトウヨウミツバチ(*Apis cerana*^[66])、ネパールのヒマラヤオオミツバチ(*Apis laboriosa*^[66])でも発生が確認されている*1, 6, 11, 22, 31。また、近年、タイのコミツバチ(*Apis florea*^[66])の幼虫の腸内からもヨーロッパ腐蛆病菌の遺伝子が検出されている*24。これらの報告は、ヨーロッパ腐蛆病菌には幅広いミツバチ種に感染できる能力があることを示唆している。なお、現在のところ、ヨーロッパ腐蛆病に対して抵抗性を示すセイヨウミツバチの系統は知られていない。

日本では、1980年代から全国的に散発的な発生が認められており、2013年には初めてニホンミツバチ(*Apis cerana japonica*^[66])での症例も確認された*25。本症例で確認された死亡幼虫も粘稠性のない、水っぽい状態に腐敗・変性しており、セイヨウミツバチでみられる典型的なヨーロッパ腐蛆病の腐蛆に類似した状態であった^[66]。

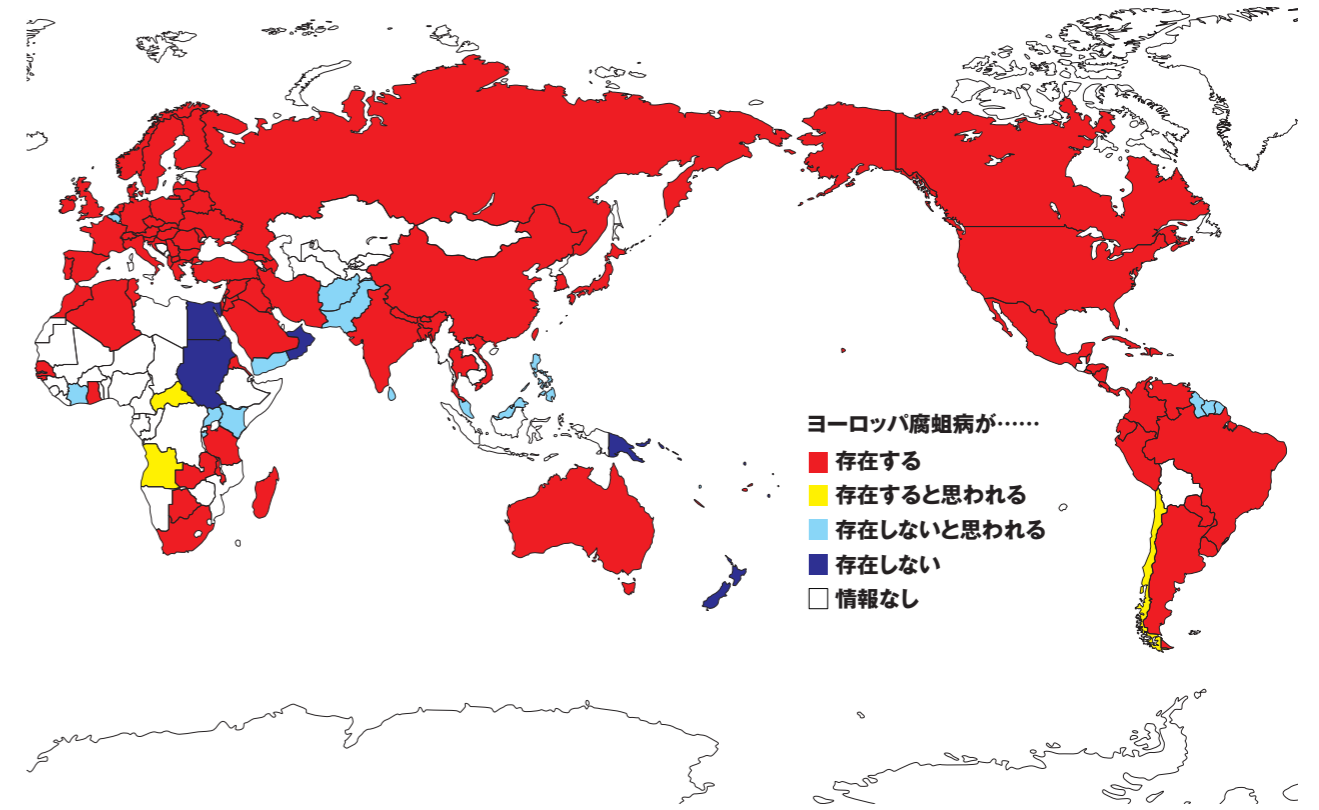


図5 ヨーロッパ腐蛆病の世界分布(本図は、EllisとMunnによる蜂病の分布に関する総説^{*13}に記載された情報を基に作製した)

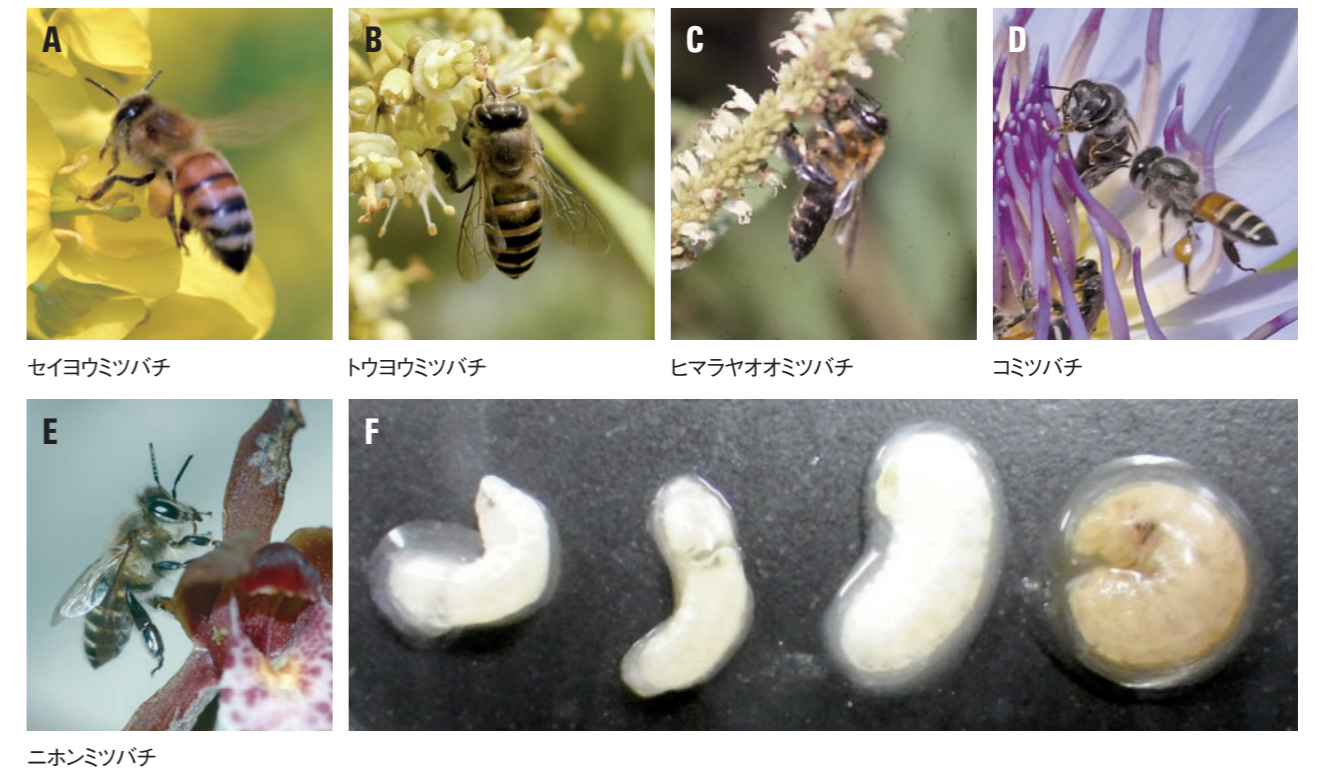


図6 ヨーロッパ腐蛆病の発症例(A,B,C,E)および保菌例(D)が報告されているミツバチ種とヨーロッパ腐蛆病で死亡したニホンミツバチの腐蛆(F) / 提供: F 香川県東部家畜保健衛生所

診断

Point

- **ヨーロッパ腐蛆病の診断は目視だけでは難しい。確定診断には、病原体の検出が必要である。**
- **疑わしい場合は、最寄りの家畜保健衛生所に連絡を!**

野外でのヨーロッパ腐蛆病の診断は、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、必ずしも特徴的なにおい(酸臭)がするわけではなく、幼虫の死亡時期が遅れ、アメリカ腐蛆病のように巣房に蓋がされた後に死亡することもある。従って、多くの症例では確定診断のために、腐蛆や巣脾などの検体を持ち帰り、検査室においてヨーロッパ腐蛆病菌を検出する必要がある。本項では、国内で一般的に行われている分離培養法とポリメラーゼ連鎖反応法(PCR法)を中心にヨーロッパ腐蛆病菌の検出法について解説する。

ヨーロッパ腐蛆病菌の検出法

顕微鏡による観察

感染幼虫内のヨーロッパ腐蛆病菌を顕微鏡下で直接確認する方法である。適当な容器に入れた腐蛆をエーゼなどで乳剤化後、清潔なスライドガラス上に薄く塗り広げ、塗抹標本を作製する。標本は風乾後、火炎固定・グラム染色を行い、光学顕微鏡で観察する。幼虫がヨーロッパ腐蛆病菌に感染している場合、青く(グラム陽性に)染まる紡錘形の菌体^[図4A]が観察される。観察される菌体の数は感染菌量により様々である。また、二次感染菌が存在している場合、グラム陽性桿菌(青く染まる長方形の菌体)やグラム陰性菌(赤く染まる菌体)が観察されることもある。なお、二次感染菌の一つである *Enterococcus faecalis* はヨーロッパ腐蛆病菌に似た形態を示し、両者を見分けることは難しいため、本法はあくまで補助診断法であることに注意する。

腐蛆からの菌の分離培養

病変部に潜む病原体を適当な培地を用いて培養し、分離する方法は、細菌感染症の確定診断を行うために最も一般的に行われている検査法の一つである。ヨーロッパ腐蛆病の場合、分離培養の材料には腐蛆を用いる。乳剤化した腐蛆を寒天培地に塗抹して35~37℃で培養を行う。ヨーロッパ腐蛆病菌のうち、CC3とCC13のグループの菌株(典型株)は、その発育に、
①嫌気性(酸素のない)または微好気性(酸素の薄い)の条件
②二酸化炭素
③ナトリウム濃度よりカリウム濃度の方が高い培地

表3 異なるグループのヨーロッパ腐蛆病菌の主な性状の相違

性状	グループ ^a			
	CC3	CC12	CC13	
カリウム濃度が高い	嫌気	+	+	+
培地での発育	好気	-	+	-
ナトリウム濃度が高い	嫌気	-	+	-
培地での発育	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-セロピオースからの酸産生	-	+	-	-
サリシンからの酸産生	-	+	-	-
蜂群への被害の大きさ ^b	CC3 ≥ CC12 ≥ CC13			

- a CC3とCC13の菌株は古くから知られているヨーロッパ腐蛆病菌の典型的な性状を示し、典型株と呼ばれることもある。一方、CC12の菌株は他のグループと大きく異なる性状を示し、非典型株と記載されることもある。なお、生化学性状は株によって完全に当てはまらない場合もある。
b イギリスでの調査結果^{*10}を基にしており、他の国でも同じことが当てはまるかは不明。

表4 ヨーロッパ腐蛆病菌の分離培養に用いられる培地の組成

Bailey培地 ^a		KSBHI培地 ^b	
酵母エキス	1 g	BHI培地	3.7 g
ブドウ糖	1 g	可溶性澱粉	1 g
可溶性澱粉	1 g	KH ₂ PO ₄	2.04 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g	寒天	1.5 g
寒天	1.5 g	蒸留水	100 ml
蒸留水	100 ml		

- a 5M KOHでpH6.6に調整し、115℃で10分、高圧滅菌後、滅菌シャーレに分注して作製する。
b 115-121℃で10-15分、高圧滅菌後、滅菌シャーレに分注して作製する。

が必要である^{[表3]*3}。CC12のグループの株も同様の条件で発育できるため、本菌の分離にはカリウム塩を添加した培地^[表4]を使用し、密閉容器の中で酸素吸収・炭酸ガス発生剤を用いて嫌気培養する。ヨーロッパ腐蛆病菌は円形の白い小さなコロニー^[図7]を形成するが、発育速度が比較的遅いため、コロニーが出現するまでに4日から1週間程度かかることもある。ヨーロッパ腐蛆病菌を疑うコロニーが出現した場合、よく単離されたコロニーを新しい培地に植え継ぎ、純粋培養する。純粋培養した菌をグラム染色し、グラム陽性の紡錘形レンサ球菌^[図4A]であることを確認した後、後述する遺伝子検出法(PCR法)によってヨーロッパ腐蛆病菌であることを確認する。

分離培養による病原体の検出は、その病気を引き起こしている菌株を手に入れ

ることができ、それを用いて疫学的な解析を行うことができる点が利点である。しかし、発育速度が遅いヨーロッパ腐蛆病菌の場合、検査結果が得られるまでに1~2週間の時間がかかってしまう。また、原因菌の分離頻度には検査担当者の熟練度が影響してしまうことも欠点の一つである。



図7 ヨーロッパ腐蛆病菌のコロニー
直径は通常、1-2mm以下で、円形の白く、艶のあるコロニーを形成する。CC12のグループの株は他の株よりやや大きいコロニーを作る傾向がある。

遺伝子検出法

肉眼で病原体を確認できる分離培養法は、最も説得力のある検査結果が得られる方法である。しかし、ヨーロッパ腐蛆病の場合、上述のように検査結果が得られるまでに時間がかかる。また、ヨーロッパ腐蛆病で死亡した幼虫内では、時間の経過とともに二次感染菌の数が増えるため、腐蛆からのヨーロッパ腐蛆病菌の分離培養が困難な場合もある。一方、近年の分子生物学の発展とともに、微量な検体から病原体に特徴的な遺伝子(DNAの塩基配列)を検出し、病原体の存在を証明する遺伝子検出法が様々な感染症に対して開発され、診断の現場で広く利用されている。

これまで様々な遺伝子検出法が開発されているが、もっとも一般的に用いられている方法が、PCR法である。PCR法は、生物が持つ巨大なDNA分子の中から自分が望んだ特定のDNA断片だけを選択的に増幅することができる方法である。PCR法は、

- ① 極めて微量な検体からDNAを増幅できる。
- ② DNAの増幅に要する時間が短い。

という特徴がある。検体を検査室に持ち込み、比較的高額な遺伝子増幅装置を用いる必要はあるものの、装置自体は家畜保健衛生所等にも普及しているため、病原体の検出には適した方法だといえる。

ヨーロッパ腐蛆病においても、これまでに複数種類のPCR法が開発されている^{*2,12,16}。中でも、2014年に報告された荒井らのDuplex PCR法^{*2}は、半日程度の時間で感染幼虫から直接ヨーロッパ腐蛆病菌を検出でき^(図8)、これまでのPCR法より正確な結果が得られる。また、各種性状が大きく異なるCC12のグループの菌株(非典型株)を他のグループの菌株と区別できるため^(図9)、本病をよりよく理解するために必要な菌株の疫学情報も同時に得られる。さらに、Duplex PCR法は、培養法で分離した菌がヨーロッパ腐蛆病菌であることを確認するためにも利用できる。これらの理由から、本PCR法はヨーロッパ腐蛆病の診断に極めて有用な検査法の一つとなっている。

抗体を用いた菌の検出

日本の家畜保健衛生所等での確定診断には使用されていないが、海外のいくつかの国では、Vita Europe社が販売するヨーロッパ腐蛆病菌検出キット(<http://www.vita-europe.com/products/efb-diagnostic-test-kit/>)^{*27}が診断に利用されている。本キットでは、ヨーロッパ腐蛆病菌に特異的に結合する抗体を利用して感染幼虫内の菌を直接検出することができる。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、本キットの検出感度はPCR法より低く、ヨーロッパ腐蛆病菌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。さら

に、CC12の菌株の検出には適さないという欠点もある^{(図9)*26}。従って、本キットで陰性の結果が出てもヨーロッパ腐蛆病を否定することはできない点に注意する必要がある。

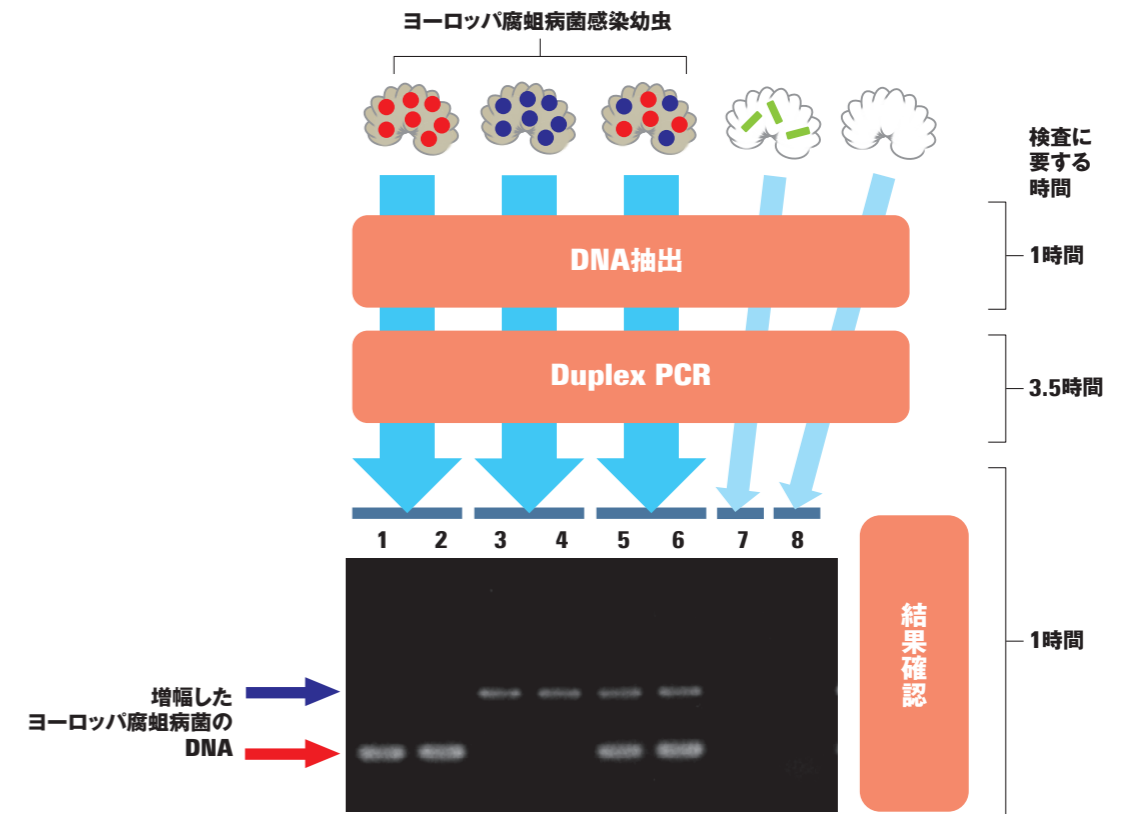


図8 ヨーロッパ腐蛆病菌の遺伝子検出法: 検査の流れと必要な時間
幼虫から抽出したDNAからヨーロッパ腐蛆病菌のDNA断片を増幅する。ヨーロッパ腐蛆病菌感染幼虫から増幅されたDNAは、電気泳動法によって確認できる。
● ヨーロッパ腐蛆病菌CC3, CC13グループ株
● ヨーロッパ腐蛆病菌CC12グループ株
■ その他の菌

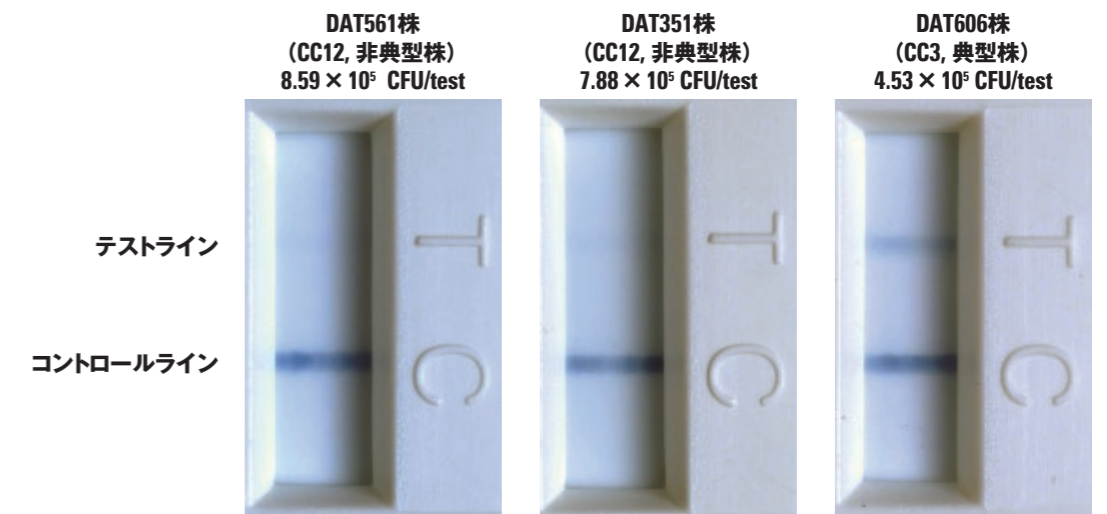


図9 キットによるヨーロッパ腐蛆病菌の検出
サンプル中にヨーロッパ腐蛆病菌が存在すると、テストラインに青い線が現れる。本キットではCC12の菌株(非典型株)は検出されにくいいため、結果の判定には注意が必要である。

治療と予防

Point

- 発症蜂群は治療せず、焼却処分する。
- 日本では承認されたヨーロッパ腐蝕病予防薬はない。
- 予防には一般的な衛生対策が重要。

ヨーロッパ腐蝕病が発生した場合、日本では治療は行わず、蜂群を焼却処分する。海外では、国によって発生した場合の対策が異なる。いくつかの国では抗生物質であるオキシテトラサイクリンが治療に使われることもあるが、薬によって症状を抑えて感染幼虫を生き長らえさせてしまうと、育児蜂が感染幼虫を巣から排除しなくなり、結果的に巣内の汚染が長期化することもある。

日本では、アメリカ腐蝕病の予防薬として抗生物質ミノサマイシンを有効薬剤として含む「ミツバチ用アピテン」が使用されているが、ヨーロッパ腐蝕病菌は株によってミノサマイシンに対して耐性を示すため、本剤によるヨーロッパ腐蝕病の予防効果は限定的と考えられる。現在のところ日本では、ヨーロッパ腐蝕病の予防薬として承認されている薬剤はない。

他の感染症と同様に、ヨーロッパ腐蝕病も養蜂作業を通じて人が拡散させてしまうこともある。従って、蜂場への病原体の侵入の可能性をできるだけ減らし、腐蝕病菌が侵入した場合の被害を最小限に抑えるためには、適切な方法での巣箱や養蜂器具の消毒など、一般的な衛生対策が重要となる。また、ミツバチが受けるストレス量が増えるとヨーロッパ腐蝕病が発症しやすくなるため、ミツバチにとって快適な飼育環境を作ることも本病の予防には有効である。

最後に

ヨーロッパ腐蝕病の研究はまだ十分に進んでおらず、その発症メカニズムや病原体の特性も不明な点が多い。本テキストは、現時点で報告されている情報や筆者らの研究成果を基に執筆したものである。従って、研究のさらなる進展によって、本稿に記載されていない新事実が明らかになり、新たな診断法や予防薬が開発される可能性もある。今後も本病に関する情報は更新され続けていくことを念頭に、本テキストをご利用いただきたいと思う。また、最新の情報が現場に届くように、我々も適切な情報発信を行っていきたいと考えている。

最後に、ヨーロッパ腐蝕病研究の遂行において多大なご協力いただきました家畜保健衛生所および共同研究機関の諸先生に深謝いたします。また、情報発信の機会を与えていただきました一般社団法人日本養蜂協会の関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

参考文献

- *1 — Allen MF, Ball BV, Underwood BA. 1990. An isolate of *Melissococcus pluton* from *Apis laboriosa*. J. Invertebr. Pathol. 55, 439–440.
- *2 — Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D. 2014. Development of duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains. J. Vet. Med. Sci. 76, 491–498.
- *3 — Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, Onishi H, Osaki M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Takamatsu D. 2012. Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical isolates. PLOS ONE. 7, e33708.
- *4 — Ash C, Priest FG, Collins MD. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Antonie Van Leeuwenhoek. 64, 253–260.
- *5 — Bailey L. 1957. The isolation and cultural characteristics of *Streptococcus pluton* and further observations on *Bacterium eurydice*. J. Gen. Microbiol. 17, 39–48.
- *6 — Bailey L. 1974. An unusual type of *Streptococcus pluton* from the Eastern hive bee. J. Invertebr. Pathol. 23, 246–247.
- *7 — Bailey L, Ball B. 1991. Honey bee pathology. Academic Press, London.
- *8 — 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.
- *9 — Belloy L, Imdorf A, Fries I, Forsgren E, Berthoud H, Kuhn R, Charriere JD. 2007. Spatial distribution of *Melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of European foulbrood. Apidologie. 38, 136–140.
- *10 — Budge GE, Shirley MDF, Jones B, Quill E, Tomkies V, Feil EJ, Brown MA, Haynes EG. 2014. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. The ISME J. 8, 1588–1597.
- *11 — Diwan VV, Kshirsagar KK, Ramana Rao AV, Raghunath D, Bhambure CS, Godbole SH. 1971. Occurrence of a new bacterial disease of Indian honeybees *Apis indica* F. Curr. Sci. 40, 196–197.
- *12 — Djordjevic SP, Noone K, Smith L, Hornitzky MAZ. 1998. Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. J. Apic. Res. 37, 165–174.
- *13 — Ellis JD, Munn PA. 2005. The worldwide health status of honey bees. Bee World. 86, 88–101.
- *14 — Forsgren E. 2010. European foulbrood in honey bees. J. Invertebr. Pathol. 103, S5–S9.
- *15 — Genersch E, Forsgren E, Pentikäinen J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwinski J, Fries I. 2006. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvifaciens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 501–511.
- *16 — Govan VA, Brözel V, Allsopp MH, Davison S. 1998. A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1983–1985.
- *17 — Heyndrickx M, Vandemeulebroecke K, Hoste B, Janssen P, Kersters K, de Vos P, Logan NA, Ali N, Berkeley RCW. 1996. Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White, 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. Int. J. Syst. Bacteriol. 46, 270–279.
- *18 — Hornitzky AZ, Smith L. 1998. Procedures for the culture of *Melissococcus pluton* from diseased brood and bulk honey samples. J. Apic. Res. 37, 293–294.
- *19 — Katznelson H. 1950. *Bacillus pulvifaciens* (n. sp.), an organism associated with powdery scale of honeybee larvae. J. Bacteriol. 59, 153–155.
- *20 — McKee BA, Djordjevic SP, Goodman RD, Hornitzky MAZ. 2003. The detection of *Melissococcus pluton* in honey bees (*Apis mellifera*) and their products using a hemi-nested PCR. Apidologie. 34, 19–27.
- *21 — McKee BA, Goodman RD, Hornitzky MAZ. 2004. The transmission of European foulbrood (*Melissococcus plutonius*) to artificially reared honey bee larvae (*Apis mellifera*). J. Apicult. Res. 43, 93–100.
- *22 — Rana BS, Rao KM, Chakravarty SK, Katna S. 2012. Characterization of *Melissococcus plutonius* causing European foulbrood disease in *Apis cerana* F. J. Apic. Res. 51, 306–311.
- *23 — Roetschi A, Berthoud H, Kuhn R, Imdorf A. 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.
- *24 — Saraithong P, Li Y, Saenphet K, Chen Z, Chantawannakul P. 2014.

-
- Bacterial community structure in *Apis florea* larvae analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene sequencing. Insect Sci. 印刷中 doi: 10.1111/1744-7917.12155.
- *25 — Takamatsu D, Morinishi K, Arai R, Sakamoto A, Okura M, Osaki M. 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.
- *26 — Takamatsu D, Okura M, Yoshiyama M, Wu M, Arai R, Morinaga Y. 2012. Detection of atypical *Melissococcus plutonius* in honeybees. Vet Rec. 171, 630.
- *27 — Tomkies V, Flint J, Johnson G, Waite R, Wilkins S, Danks C, Watkins M, Cuthbertson AGS, Carpana E, Marris G, Budge G, Brown MA. 2009. Development and validation of a novel field test kit for European foulbrood. Apidologie. 40, 63–72.
- *28 — 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.
- *29 — White GF. 1906. The bacteria of the apiary with special reference to bee disease. USDA, Bureau of Entomology, Technical Series. 14, 1–50.
- *30 — White GF. 1912. The cause of European foulbrood. US Department of Agriculture Bureau of Entomology circular no. 157. US Department of Agriculture, Washington, DC.
- *31 — Zhou T, Feng F, Dong B. 2000. Study on the pathogen of European foulbrood in the Chinese honey bee (*Apis cevana cevana* F). Acta Entomol. Sinica 43, 104–108.

養蜂技術指導手引書 II

ミツバチの感染症 ヨーロッパ腐蛆病

平成27年9月発行

発行所

一般社団法人 日本養蜂協会

〒104-0033 東京都中央区新川1丁目6-16 馬事畜産会館6階

著者

高松大輔

国立研究開発法人農業・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

芳山三喜雄

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所 家畜育種繁殖研究領域

荒井理恵

埼玉県農林部畜産安全課

【非売品】
