

【原 著】 産業動物

北海道渡島管内で発生したヨーロッパ腐蛆病の
病性と防疫対応

繁在家 輝子¹⁾ 齊藤 真里子²⁾ 加藤 千絵子³⁾ 内田 兼司¹⁾
多田 規子¹⁾ 早川 潤⁴⁾

- 1) 北海道渡島家畜保健衛生所 (〒041-0824 函館市西桔梗町555-13)
- 2) 北海道日高家畜保健衛生所 (〒056-0003 日高郡新ひだか町静内旭町2丁目88-5)
- 3) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-6)
- 4) 北海道網走家畜保健衛生所 (〒090-0008 北見市大正323-5)

要 約

平成29年5月、渡島管内の1定飼蜂場のセイヨウミツバチ14群のうち1群で、蜂児の活力低下および死亡増加がみられた。死亡蜂児乳剤の細菌遺伝子検索の結果、ヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) 特異遺伝子が検出され、培養検査で同菌が分離されたことからヨーロッパ腐蛆病と診断した。分離菌の *multilocus sequence typing* (MLST) 法による遺伝子型別では、道外で最も多く検出されているST12を示した。早期発見および的確な防疫対応により、現在まで再発は認められていない。今後、衛生管理の徹底による本病の予防啓発および飼養環境調査が必要である。

キーワード：ミツバチ、ヨーロッパ腐蛆病、*Melissococcus plutonius*、MLST

-----北獣会誌 64, 33~37 (2020)

腐蛆病はミツバチの幼虫に感染死を起こす細菌による疾病の総称で、アメリカ腐蛆病菌 (*Paenibacillus larvae* ; *P. larvae*) によるアメリカ腐蛆病およびヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius* ; *M. plutonius*) によるヨーロッパ腐蛆病(本病)があり、家畜伝染病予防法(法)において家畜伝染病に指定されている。北海道内における腐蛆病は、昭和30年代は毎年1,000群以上の発生があったが、平成20年以降は2~3年おきに1群ないし2群の発生がみられる程度に減少している [平成30年家畜衛生事業成績書、北海道農政畜産振興課]。今回、導入から約1カ月の1群において本病が確認されたので、その発生概要と防疫対応を報告する。

発 生 概 要

平成29年5月25日、渡島管内の1定飼蜂場において、同年4月下旬に岐阜県から導入した採蜜用のセイヨウミツバチ9群のうち1群に、蜂児の活力消失および黒色化

がみられるとの通報があり、同日、法第51条に基づき立入検査を行った。

立入検査時、同蜂場では14群(1群は越冬群、9群は4月に岐阜県A業者から、4群は5月に岐阜県B業者から導入)が飼育(定飼)されていた。

臨床検査では、通報のあった1群を含む2群(4月導入および5月導入の各1群)の巣箱入口付近に、成蜂の死体が他群より多く確認された(写真1)。また、通報のあった1群には、乳白色~茶褐色で融解~水様を呈する死亡蜂児(腐蛆)が確認された。腐蛆に粘稠性はみられず、また、有蓋房の配列および蜂勢にも異状はみられなかった(写真2)。

なお、4月導入群は、4月17日付けで岐阜県の腐蛆病検査陰性証明書が発行されていた。また、通報のあった日の前日には、4月導入の9群のうち6群に継箱が設置されていた(写真3)。

連絡責任者：繁在家 輝子 北海道渡島家畜保健衛生所

〒041-0824 函館市西桔梗町555-13

TEL : 0138-49-5444 (内線2740) FAX : 0138-49-5446 E-mail : hanzaike.teruko@pref.hokkaido.lg.jp



写真1. 発生巣箱
入口付近に成蜂の死体がめだつ

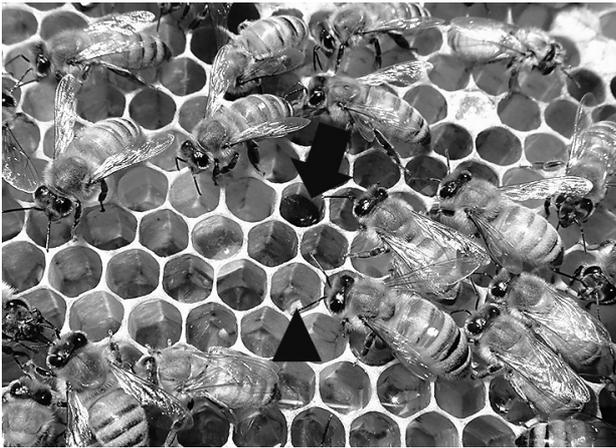


写真2. 死亡蜂児
矢印：茶褐色融解死亡蜂児、矢頭：水様死亡蜂児



写真3. 蜂場
矢印：発生巣箱、通報前日に継箱設置

病性鑑定

材料と方法

(1) ミルクテスト

0.5%のスkimミルク液2 mlに腐蛆1匹を加え、静かに振とう後、10~20分静置してskimミルク液の透明化を観察した。

(2) 直接鏡検

茶褐色を呈し融解した腐蛆を滅菌生理食塩水で10%乳剤にした材料をスライドガラスに薄く塗布し、グラム染色を実施した。

(3) 細菌学的検査

1) 分離培養

腐蛆乳剤3検体(茶褐色融解腐蛆:2検体、白色水様腐蛆:1検体)を材料とし、5%ヒツジ血液寒天培地(日本バクテンディッキンソン、東京)およびKSBHI寒天培地(BHI培地(日水製薬、東京)を用いて自作)^[1]を用いて、37℃5%CO₂下で、前者は3日間、後者は5日間培養した。

2) PCR検査

腐蛆乳剤3検体および細菌分離培養で発育した白色コロニーについて、前者はQIAamp DNA Mini Kit(キアゲン、東京)で、後者はインスタジーン(バイオラッド、東京)でDNAを抽出後、*P. larvae* 16S rRNA遺伝子および*M. plutonius* 16S rRNA遺伝子をターゲットとしたPCR法^[2-4]により実施した。*M. plutonius*については、分子疫学的見地からDuplex PCR法^[5]により、典型株および非典型株の識別を行った。

3) 遺伝子型別検査

分離された*M. plutonius*3株の、multilocus sequence typing (MLST)法については、Haynesらの方法^[6]により、各株の*argE*、*galK*、*gpbB*および*purR*遺伝子領域の塩基配列を決定し、MLSTデータベース(<http://pubmlst.org/mplutonius/>)に登録されている配列を照合することによりSequence Type (ST)を決定した。

4) 分離菌の生化学性状検査

分離された*M. plutonius*の生化学性状は、Api20A(ピオメリュー・ジャパン、東京)により性状検査を行い、過去の報告^[1]と比較した。

結 果

(1) ミルクテスト

skimミルク溶液の透明性に変化はなく陰性であった。

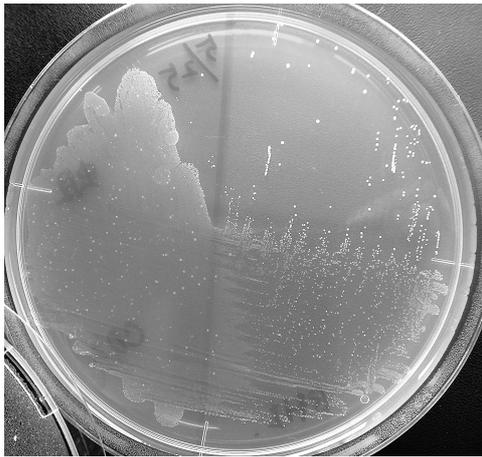


写真4. 死亡蜂児から分離された白色小コロニー
KSBHI寒天培地

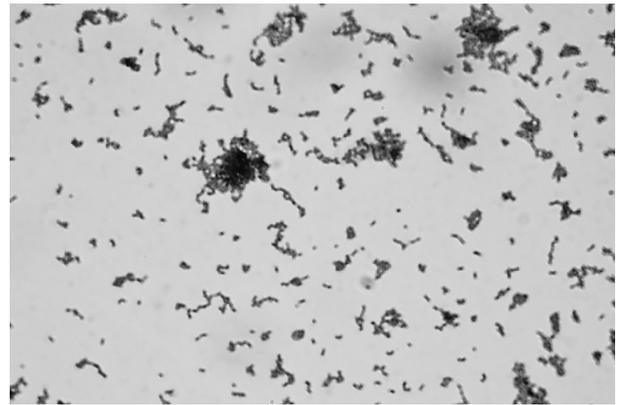


写真5. 白色小コロニーのグラム染色像 (1000倍)

腐蛆乳剤3検体の遺伝子検査では、*M. plutonius* 特異遺伝子が検出され、典型株、非典型株いずれも陽性であった。*P. larvae* 特異遺伝子は陰性であった。

KSBHI寒天培地に発育した分離菌52株からは、*M. plutonius* 非典型株遺伝子が検出された (写真6)。

(2) 直接鏡検

グラム陽性球桿菌が確認された。球桿菌の連鎖性はみられなかった。

(3) 細菌学的検査

1) 分離培養

5%ヒツジ血液寒天培地に有意菌の発育はみられなかった。KSBHI寒天培地には、白色小コロニーが発育し (写真4)、グラム染色で、グラム陽性紡錘形連鎖球桿菌が観察された (写真5)。

3) 遺伝子型別検査

試験に供した3株のMLSTは、各遺伝子の配列パターンが4-4-3-5のST12であった。

4) 生化学性状検査

分離菌の生化学性状は、表1に示した。グルコース、マンノース、アラビノース、サリシンに陽性を示したが、エスクリン、セロビオースは陰性であった。

2) PCR検査



写真6. 分離菌の泳動像
1~16: 菌株No.、P: 陽性対照、M: 100bpラダー

表1 分離菌の生化学性状

生化学性状	基準株* ATCC35311	典型株* BHI発育なし	非典型株* BHI発育あり	今回の分離菌
Catalase	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-
Hydrolysis of esculin	-	-	+	-
Production of acid from carbohydrate				
Glucose	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	+	+
D-Cellobiose	-	-	+	-
Salicin	-	-	+	+

* 参考文献1) Araiらの報告 (2012)

防疫対応

5月25日の立入検査において、現地で実施したミルクテストは陰性であったが、同テスト陰性を示すアメリカ腐蛆病が存在すること^[7]および本病の可能性もあったことから、飼養者に対し移動の自粛を要請した。

翌26日に、腐蛆乳剤抽出検体のPCR検査において*M. plutonius*特異遺伝子が検出されたため、飼養者には本病が強く疑われる旨を連絡し、再度、移動自粛を要請した。また、石狩家畜保健衛生所に依頼した確認検査においても、5月30日に*M. plutonius*特異遺伝子陽性の結果であったことから、同日、飼養者と協議し、異状の認められた群については、分離菌のPCR検査結果を待たずに自衛処分することとした。また、巣箱の設置場所は消石灰の散布により、巣箱・巣脾については火炎消毒が実施された。

細菌培養検査では、培養開始から5日後の5月30日に、グラム陽性紡錘形連鎖球菌がKSBHI寒天培地で分離され、石狩家畜保健衛生所に検査依頼したところ、6月2日、*M. plutonius*非典型株特異遺伝子陽性であったことから、同日をもって当該1群を腐蛆病に決定するとともに、法第23条第1項に基づき汚染物品(蜜刀、ブラシ等)の消毒を指示した。

自衛処分した以外の蜂群(13群)については、法第51条の規定に基づき、6月2日および6月16日に臨床検査を行い、異状が確認されなかったため、移動自粛要請を解除し一連の対策を終了した。

なお、法第32条に基づく移動制限については、①異常発見後、速やかに通報されていること、②当該所有者は他に蜂場を有していないこと、③半径3km内に蜂場がないことから実施しなかった。

考察およびまとめ

国内における本病の発生は、1980年代から関東・中部・東北・中国地方で散発的な発生が認められている^[1]が、北海道内においては、過去に本病の発生報告はなく、本事例は北海道内における初発報告である。

本病は、原因菌である*M. plutonius*に汚染された餌を幼虫が食べることによって引き起こされるミツバチ幼虫の致死性伝染病である。発症時期は4～5日齢の無蓋ステージで死亡することが多いが、まれに有蓋ステージに移行してから死亡する場合や、死亡せずに蛹や成虫に育つ軽症事例があり、成虫が保菌し他の蜂群や他の養蜂場に病原体を運ぶこともある^[9]。また、*M. plutonius*は、

*P. larvae*とは異なり芽胞は形成しないものの、ミツバチの体外でも比較的長期間生存できるため、翌年も再発しやすいといわれている^[9]。

今回の事例は、無蓋ステージで幼虫が死亡した典型例で、同居蜂群へのまん延および翌年以降の再発が懸念されたが、現在まで再発は認められていない。よって、本事例は、早期発見・早期通報がなされ、当所の指示に基づき適切に巣箱・巣脾および設置場所の消毒が行われたものと考えられる。

分離菌のMLSTは、国内で高頻度に検出される遺伝子型のひとつ^[10]であるST12と判明した。本病と決定した蜂群は、岐阜県が実施した腐蛆病検査において陰性との証明が添付されて導入されているが、腐蛆病検査は基本的に臨床的に異状がなければ細菌培養検査は行われないので、最も可能性のある侵入経路としては、導入巣箱への付着あるいは導入蜂の不顕性感染と推察する。

国外においてST12は、イギリスとアメリカで確認されている^[6,11]が、発生年における飼養者の渡航実績はなく、また、過去に両国から養蜂器具を輸入した実績もないことから、国外から侵入した可能性は疫学的に考えられない。なお、異状が確認された前日に、継箱を設置したことによる飼養環境の変化は、ミツバチにストレスを与え発症の誘因となったと考えられる。

従前、*M. plutonius*は株間の多様性が少ない菌種と考えられていたが、近年の分子疫学的研究により、典型株と非典型株では蜂群に与える被害の大きさが異なることが英国の大規模疫学調査で報告されており^[11]、両者を識別することは防疫上また疫学的にも重要となっている。

本事例においては、同一腐蛆から典型株および非典型株の両方の特異遺伝子が検出され、混合感染を示唆する結果が得られた一方で、KSBHI培地に発育したコロニー(52株)はすべて非典型株であった。Araiらは、非典型株しか発育しない場合でも遺伝子検査の結果から混合感染の可能性があると考察している^[5]が、我々は、遺伝子検査で検出された典型株は、死菌に反応したものと判断し、本事例は「非典型株によるヨーロッパ腐蛆病」と診断した。しかしながら、典型株の増幅がみられたことは、過去に幼虫あるいは幼虫周囲に同株が存在したことを示しており、両株の関連性の有無および生化学性状の既知報告^[1,7]との相違については、今後の研究課題である。

近年、北海道内では、都市型養蜂や趣味での飼育といった小規模養蜂家を含め飼養者は増加傾向にあるが、これら飼育者の中には、ミツバチが法の対象家畜であるとの

認識や、本腐蛆病を含む疾病の予防知識に乏しい者も少なくない。現在、国内において、アメリカ腐蛆病の予防薬は市販されているが、本病の予防薬として承認されている薬剤はないことから、現時点における本病の予防策は、適切な方法で巣箱や養蜂器具の消毒を行うなど一般的な飼養管理の励行のみであり、特に好発時期の春先^[9]は注意が必要である。

北海道外から蜂を導入する際や道外複数県を経由する転飼の場合には、巣箱や養蜂器具等を介して本病が侵入する可能性があることを、各飼養者に情報提供し本病の発生予防に努めるとともに、飼養環境中の *M. plutonius* 浸潤状況について検索を進める予定である。

稿を終えるにあたり、*M. plutonius* の MLST 型別判定を実施していただきました独立行政法人農業研究開発機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫領域 病原機能解析ユニット 高松大輔先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] Arai R, Tominaga K, Wu M, Okura M, Ito K, Okamura N, Onishi H, Osaki M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Takamatsu D: Diversity of *Melissococcus plutonius* from honeybee larvae in Japan and experimental reproduction of European foulbrood with cultured atypical Isolates, PLoS ONE 7, e33708 (2012)
- [2] 小林弘明: LAMP法によるアメリカ腐蛆病の補助的診断の実用性、日獣会誌、58、461-465 (2005)
- [3] Govan VA, Allsopp MH, Davison S: A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*, Appl Environ Microbiol, 65, 2243-2245 (1999)
- [4] Govan VA, Brözel V, Allsopp MH, Davison S: A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae, Appl Environ Microbiol, 64, 1983-1985 (1998)
- [5] Arai R, Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Morinaga Y, Wu M, Sugimura Y, Yoshiyama M, Okura M, Kirikae T, Takamatsu D: Development of Duplex PCR assay for detection and differentiation of typical and atypical *Melissococcus plutonius* strains, J Vet Med Sci, 76, 491-498 (2014)
- [6] Haynes E, Helgason T, Young JPW, Thwaites R, Budge GE: 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 (2013)
- [7] 岡元みさき、佐藤隆裕、松本敦子: 平成27年に千葉県で発生したヨーロッパ腐蛆病およびアメリカ腐蛆病、獣畜新報、70、770-774 (2017)
- [8] 高松大輔: 最新の家畜疾病情報 (VIII) 腐蛆病、日獣会誌、68、496-498 (2015)
- [9] 高松大輔、芳山三喜雄、荒井理恵: 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、一般社団法人日本養蜂協会、東京 (2015)
- [10] Takamatsu D, Morinishi K, Arai R, Sakamoto, Okura M, Osaki M: 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 (2014)
- [11] Budge GE, Shirley MDF, Jones B, Quill E, Tomkies V, Feil EJ, Brown MA, Haynes EG: Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*, ISME J, 8, 1588-1597 (2014)