

10 都内で発生した腐蛆病 2 事例

○綾部 文香 大山 知美

要約

2022 年度都内で腐蛆病 2 事例が発生したのでその概要を報告する。1 例目は、5 月、セイヨウミツバチ 2 群を飼養する飼養者から、1 群で腐蛆病を疑うと連絡を受け、病性鑑定を実施した。KSBHI 培地で 37°C、3 日間嫌気培養し、白色微小コロニーを確認した。分離菌 PCR 検査から *Melissococcus plutonius* (以下、「Mp」という。)と同定、ヨーロッパ腐蛆病と決定した。2 例目は、11 月、セイヨウミツバチ 4 群を飼養する飼養者から 2 群に異常がある旨連絡があり、立入検査を実施したところ巣房に褐色粘性物の貯留を確認したため、アメリカ腐蛆病を疑い病性鑑定を実施した。ミルクテスト陽性、血液寒天培地で 37°C、2 日炭酸ガス培養でコロニーを分離した。PCR 検査から *Paenibacillus larvae* (以下、「P1」という。)の ERIC I 型と II 型の 2 種類の菌を同定、アメリカ腐蛆病と決定した。発生した 2 群で分離菌の遺伝子型が異なったことから、4 群全ての巣箱、成虫、巣ひ、はちみつから P1 遺伝子の検出を試みた。発症群からは遺伝子が検出されたが、非発症群からは検出できなかった。発生状況から、導入時に巣箱や成虫に付着した由来の異なる菌が、飼養管理失宜によって同時期に発症したと推測した。さらに、腐蛆病菌マルチプレックス PCR 試薬を用いて、2010 年以降の都内分離菌株 10 株の遺伝子型検索を実施した。P1 では、ERIC I 型と II 型が検出されたが、II 型が近年増加傾向。Mp は全て典型株であった。

腐蛆病は蜜蜂の幼虫に感染する細菌性疾病で、家畜伝染病予防法で家畜伝染病に定められ P1 によるアメリカ腐蛆病と Mp によるヨーロッパ腐蛆病の 2 つの疾病がある。アメリカ腐蛆病は有蓋蜂児が死亡し、特徴的な膠臭があり、死亡蜂児は粘稠性のある糸を引く。ヨーロッパ腐蛆病は無蓋蜂児が死亡し、発酵臭や酸臭があり、死亡蜂児は粘稠性がなく水様性である。2022 年度都内では 2 件の腐蛆病発生があったので、その概要と追加で行った検査について報告する。

材料及び方法

材料は立入検査及び病性鑑定時に採取した死亡蜂児等を病性鑑定マニュアルに基づき、ミルクテスト、直接鏡検、細菌培養、遺伝子検査を行った (表 1)。

表 1 材料及び方法

	死亡蜂児	成虫*	飼養器材*	はちみつ*
ミルクテスト	+	NT	NT	NT
直接鏡検				
グラム染色	+	NT	NT	NT
芽胞染色	+	NT	NT	NT
細菌培養				
血液寒天培地	+	+	+	+
KSBHI培地	+	+	+	+
遺伝子検査	+	+	+	+

※: 2 例目のみ実施 NT: 未検査

P1 は、血液寒天培地を用いて 37°C で 2~4 日、炭酸ガス培養を実施した。Mp は、KSBHI 寒天培地を用いて 37°C、3~5 日、嫌気培養を実施した。遺伝子検査は、1 例目の死亡蜂児は DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN、東京)、2 例目のはちみつはヨーネ・ピュアスピン (ファスマック、神奈川)、それ以外の材料は全て InstaGene DNA 精製マトリ

ックス (BIO RAD、東京) を用いて、DNA を抽出した。1 例目の死亡蜂児は P1 の 16SrRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 法^{1) 2)} 及び Mp の 16SrRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 法³⁾、1 例目の分離菌は Arai らの Duplex PCR 法⁴⁾ により典型株と非典型株を識別した。2 例目及び過去の分離菌は全て腐蛆病菌マルチプレックス PCR⁵⁾ により実施した。

発生の概要及び検査結果

1 1 例目の概要

5 月 23 日、飼養者から腐蛆病を疑うとのことで病性鑑定依頼があり、翌日、立入検査を実施した。飼養者は、20 年ほど養蜂をしており、ブルーベリーのポリネーションのため、定期的にセイヨウミツバチを導入していた。現在、2 群を飼養しているが 3 月に導入した群で、巣蓋にピンホールがあり蜂児の死亡が見られたが、死亡蜂児は糸を引く様子はなく、従来群に異常は認められなかった (図 1)。

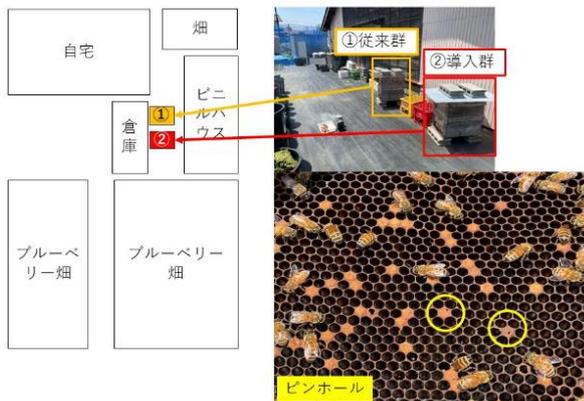


図 1 飼養状況 (1 例目)

立入検査後、採材した検体の培養を開始し、分離菌の性状及び PCR 検査から Mp と同定、5 月 30 日ヨーロッパ腐蛆病の発生と決定した。発症蜂群は、6 月 6 日に汚染物品として当所で焼却を実施した。未発症 1 群は引き続き飼養することとなっ

たので、異常がないことを確認、その後も家畜防疫対策要綱に基づく反復検査で異常のないことを確認した。今回のヨーロッパ腐蛆病の発生を受けて、都内蜜蜂飼養者に情報提供した (図 2)。



図 2 都内みつばち飼養者への情報提供

2 1 例目の検査結果 (表 2)

(1) 死亡蜂児検査

死亡蜂児に稠性はなく、水様性であった。ミルクテストは陰性、直接塗抹鏡検でグラム陽性の紡錘形レンサ球菌を確認した。

表 2 目検査結果 (1 例目)

	発生群	非発生群
ミルクテスト	1	2
直接鏡検	—	—
グラム染色	+	—
芽胞染色	+	—
細菌培養検査		
血液寒天培地	—	—
KSBHI 培地	+	+
遺伝子検査		
検体直接 PCR	+ Mp	NT
分離菌 PCR	+ Mp (典型)	+ Mp (典型)

Mp: *Melissococcus Plutonius* NT: 未検査

(2) 細菌分離検査

血液寒天培地では菌の発育はみられなかったが、KSBHI 培地に微小な白色コロニーが発育し、グラム染色でグラム陽性の特徴的な紡錘形レンサ球菌分離菌が観察された (図 3)。

(3) 遺伝子検査

蜂児から直接抽出した遺伝子では Mp 遺伝子が

検出された。分離菌から Mp 典型株遺伝子が検出された (図 3)。なお、未発生群からも Mp を分離したが、蜂群に症状がなかったため、発生としなかった。

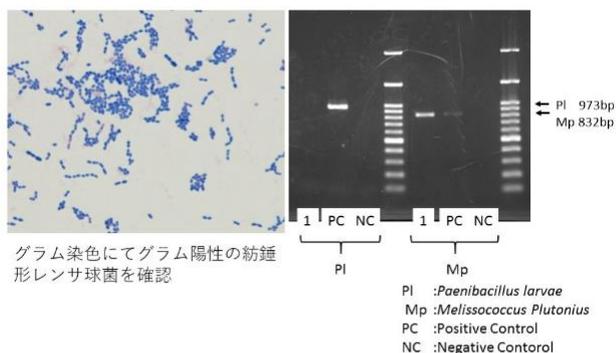


図 3 グラム染色像と電気泳動像 (1 例目)

3 2 例目の概要

11 月 17 日、飼養者から 4 群中 2 群に 2 週間前から異常があり、巣房内に綿棒を入れ、引き出してみると茶色の糸を引くとのことで、アメリカ腐蛆病を疑う病性鑑定依頼があり、11 月 22 日に立入検査を実施した。ビルの屋上でセイヨウミツバチを飼養しており、以前はもっと多く飼養していたようで、現在は使用していない巣箱も多数おかれていた。飼養者は、養蜂は初心者で、この場所でそれまで蜜蜂を飼っていたベテランの飼養者に習いながら、世話をしていた。



図 4 飼養状況 (2 例目)

図 4 のとおり、手前から巣箱①から④とした。巣箱①と④に異常があり、蜜蜂の数が少なく、蜂群の勢いが見られなかった。巣房の蓋は全体的に黒ずんでおり、蓋が凹んでいるものや、ピンホールが散見された。巣房内に綿棒を入れ、引き出してみると茶色の糸を引く様子が観察された。分離された分離菌の性状及び PCR 検査から P1 と同定し、11 月 25 日にアメリカ腐蛆病の発生を決定した。飼養者は発生した 2 群のほか、健康群の焼却処分を希望したため、4 群全ての巣箱を引き取り、飼養場所の消毒を実施した。発症群のうち 1 群について手当金の希望があったため、12 月 2 日に手当金交付のための評価をし、12 月 5 日に汚染物品等を焼却した。

4 2 例目の検査結果 (表 3)

(1) 死亡蜂児の検査

症状のあった巣箱①と巣箱④はミルクテスト陽性で、直接塗抹鏡検でグラム陽性大桿菌と芽胞を確認した。

表 3 検査結果 (2 例目)

	巣箱①	巣箱②	巣箱③	巣箱④
ミルクテスト	+	-	-	+
直接鏡検				
グラム染色	+	-	-	+
芽胞染色	+	-	-	+
細菌培養検査				
血液寒天培地	+	-	-	+
KSBHI培地	+	-	-	+
遺伝子検査				
検体直接PCR	+ PI(ERIC II)	NT	NT	+ PI(ERIC I)
分離菌PCR	+ PI(ERIC II)	NT	NT	+ PI(ERIC I)

PI: *Paenibacillus larvae* NT:未検査

(2) 細菌分離検査

血液寒天培地には、巣箱①からはオレンジ色、巣箱④からは白色のコロニーが発育した。どちらもグラム陽性桿菌が観察されたが、菌の形状は巣箱①よりも巣箱④のほうが細長かった (図 5)。

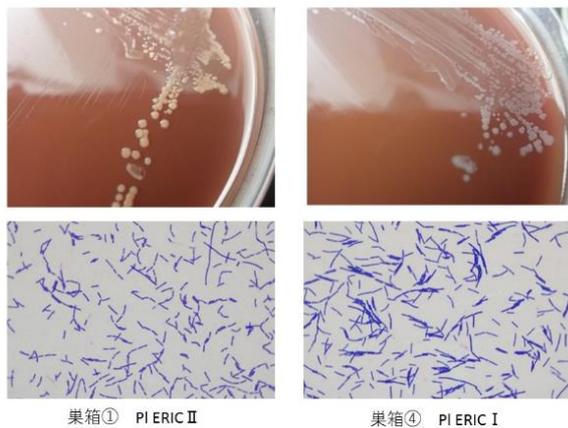


図5 分離菌とグラム染色像（2例目）

(3) 遺伝子検査

スワブから抽出した遺伝子から、巣箱①は P1 (ERIC II 型)、巣箱④は P1 (ERIC I 型) が検出された。分離菌の遺伝子は、巣箱①は P1 (ERIC II 型)、巣箱④は P1 (ERIC I 型) が検出された (図6)。

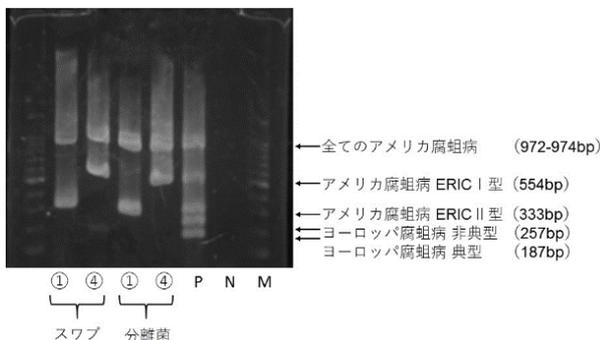


図6 電気泳動像（2例目）

5 2例目における発症群及び非発症群検査

飼養者からの聞き取りで、巣箱①、②、③はそれぞれ異なる県から導入し、④は3箱のうちどれかから分蜂した群であった。遺伝子型が異なることから、巣箱①と巣箱④の由来は異なると言えるので、巣箱④は巣箱②か巣箱③から分蜂したと推定した。今回、腐蛆病の発症した巣箱のほかに、未発症な巣箱も焼却処分するために、当所に持ち込まれたので、なぜ同じ蜂場で異なる遺伝子型の菌が分離されたのかを調べるために、巣箱①から巣箱④の蜂児以外の材料からも、菌分離を試みた。

巣箱①から巣箱④の巣箱、成虫、巣ひの拭い液とはちみつを採材した。すべての検体で細菌培養を実施したが、原因菌は分離されなかった。

次に同じ材料で遺伝子検査を実施したところ、非発症群からの遺伝子は検出できなかったが、発症群では、巣箱、成虫、はちみつからも、それぞれ蜂児と同じ遺伝子型の遺伝子が検出された (表4)。

表4 巣箱等のPCR検査

	巣箱① 発症	巣箱② 健康	巣箱③ 健康	巣箱④ 発症
巣箱	+ (ERIC II)	-	-	-
成虫	+ (ERIC II)	-	-	+ (ERIC I)
巣ひ	NT	-	-	NT
はちみつ	+ (ERIC II)	-	-	+ (ERIC I)
幼虫 (細菌培養)	+ (ERIC II)	-	-	+ (ERIC I)

過去に分離された菌の遺伝子型別

2010年以降に分離され保存されていた P1 及び Mp の遺伝子型別を行ったところ、2010年以降に分離された P1 の遺伝子型は、ERIC I 型と II 型であったが、近年 ERIC II 型が検出されている。2010年以降に分離された Mp の遺伝子型は、すべて典型株であった (表5)。

表5 P1、Mpの遺伝子型別

Paenibacillus larvae

発生年月	地域	発症群/飼養群	遺伝子型
2010年10月	八王子市	3群/17群	ERIC I
2015年6月	立川市	3群/3群	ERIC I
2017年8月	調布市	1群/6群	ERIC I
2019年5月	渋谷区*	1群/1群	ERIC II
2022年10月	葛飾区	2群/4群	ERIC I、ERIC II

Melissococcus Plutonius

発生年月	地域	発症群/飼養群	遺伝子型
2013年3月	八王子市	1群/34群	典型
2015年5月	調布市	3群/9群	典型
2018年5月	渋谷区*	1群/1群	典型
2018年9月	足立区	1群/2群	典型
2022年6月	葛飾区	1群/2群	典型

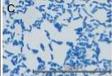
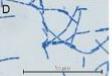
*2018年5月の渋谷区の事例は同一

考 察

1 例目は、ヨーロッパ腐蛆病の発生事例であるが、発症群からも非発症群からも MP が分離された。このことは、本病の発症が Mp は幼虫の腸内で餌を横取りして消費してしまうため幼虫が死亡するというメカニズムから、病原体側の要因だけでなく、餌の量、幼虫の数、育児蜂の数のバランスが、本病の発症に大きく影響していることを示している。

2 例目は、アメリカ腐蛆病の発生事例で、4 群中 2 群が発症し、それぞれの分離菌の P1 遺伝子型は異なった。今回、巣箱④が分蜂したと考えられる健康な巣箱②③から P1 遺伝子は検出されなかったが、発生状況から同一の菌株の感染が、蜂群間で広がったのではなく、導入時に巣箱に付着または成虫に不顕性感染していた菌が、飼養管理失宜によって同時期に発症したと考察した。飼養者が養蜂を初めて日が浅く、飼養管理に不慣れだったことも発症の一因となったと考える。また、P1 の ERIC I 型と II 型では、表 6 のような性状の違いがあるとされている⁶⁾。

表 6 PIの遺伝子型による性状

	ERIC I 型	ERIC II 型
コロニーの色	 白色	 オレンジ色
菌の形態	 短く太い	 長く連鎖
蜂児に対する病原性	LT ₁₀₀ : ~12日	LT ₁₀₀ : ~7日
群に対する病原性	大半の蜂児が蓋をされてから死亡するため、巣から除去されにくく、巣に芽胞がたくさん残る → 群の崩壊はERIC II よりも早い	多くの蜂児が蓋をされる前に発症するため、巣から除去され、巣に芽胞があまり残らない → 群の崩壊はERIC I よりも遅い

LT₁₀₀ : 実験感染幼虫が全滅するまでの日数

本事例では分離菌のコロニーの色と形態は、特徴的だったと思われた。P1 の群に対する病原性の強さは I 型のほうが II 型よりも強いと言われている⁷⁾ が、本事例では、遺伝子型の違いによる病原性の違いは確認できなかった。

1993 年から 2017 年に 17 都道府県で分離され

た P1、100 株を用いた調査では、ERIC II 型は 2005 年に初めて分離され、2010 年代に急速に増加している⁸⁾。当所で 2010 年以降に分離された P1 の遺伝子型は、ERIC I 型と II 型であったが、近年 ERIC II 型が検出されており、これは全国的な傾向と類似している。

今回の 2 事例から、アメリカ腐蛆病、ヨーロッパ腐蛆病、どちらについても、健康な蜂群にも病原体は存在するとの認識をもって、腐蛆病を発症させないような飼養管理をしていくことが重要と改めて確認された。

引用文献

- 1) Govan VA, Allsopp MH, Davison S : A PCR detection method for rapid identification of *Paenibacillus larvae*, Appl Environ Microbiol, 65, 2243-2245 (1999)
- 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 号、461-465 (2005)
- 3) Govan VA, Brozel V, ALLsopp MH, Davioson S : A PCR detection method for rapid identification of *Melissococcus pluton* in honeybee larvae, Appl Environ Microbiol 64, 1983-1985 (1998)
- 4) 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)
- 5) Okamoto M, Furuya H, Sugimoto I, Kusumoto M, Takamatu D : 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, J. Vet. Med. Sci. 84, 390-399(2022)

6) Hirai Y, Suzuki T, Inaba N, Minoguchi N, Takamatsu D, Existence of *Paenibacillus larvae* genotypes ERIC I-ST2, ERIC1-ST15 and ERIC II-ST10 in the western region of Aichi prefecture, Japan, JVMS, 78(7), 1195-1199 (2016)

7) 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)

8) Ueno Y, Toshida E, Misumi W, Watando E, Suzuki K, Hirai Y, Okura M, Osaki M, Katsuda K, Takamatsu D : Population structure and antimicrobial susceptibility of *Paenibacillus larvae* isolation from American foulbrood cases in *Apis mellifera* in Japan, Environmental Microbiology Reports, 10(2), 210-216(2018)