

## 14 埼玉県における過去 5 年間の腐蛆病発生動向と分離菌の遺伝子型別成績

中央家畜保健衛生所

○中井 悠華・石原 径佳

### I はじめに

腐蛆病は蜜蜂の疾病の中で唯一、家畜伝染病に指定されており、アメリカ腐蛆病 (American foulbrood; AFB) とヨーロッパ腐蛆病 (European foulbrood; EFB) という 2 つの疾病を含む。両者はそれぞれアメリカ腐蛆病菌 (*Paenibacillus larvae*)、ヨーロッパ腐蛆病菌 (*Melissococcus plutonius*) という全く異なる性質をもつ細菌によって引き起こされ、発症時期や症状も大きく異なる<sup>1)</sup>。しかし、発生状況報告の集計では両者が区別されておらず、国内での詳細な発生状況は把握できていないのが現状である。

AFB 及び EFB は、古くから知られている疾病であるにもかかわらず、病原体そのものに関する情報が乏しかったが、近年では菌性状や分子疫学解析などの腐蛆病菌に関する研究が着実に進展している。特に、遺伝子型は菌性状や病原性の違いと相関することが報告されており<sup>2,3)</sup>、重要な疫学情報となるため、今回、県内で分離された腐蛆病菌について初めて遺伝子型別を実施した。併せて、養蜂家への指導に役立てるため、県内での過去 5 年間の腐蛆病発生状況や各事例の動向及び蜜蜂飼育届出状況をまとめた。

### II 県内の発生状況及び発生事例

#### 1 発生状況

本県では毎年、蜜蜂飼育届が提出された全戸を対象として、巣箱の形状が検査可能な限り、腐蛆病検査を実施し、衛生管理指導を行ってきた。しかし、平成 10 年以降、本県では腐蛆病がほぼ毎年発生しており、過去 5 年間での発生はすべてセイヨウミツバチで計 19 戸 27 群であった(表 1)。特に、平成 24 年には EFB、平成 28 年には AFB の発生が増加した。

表 1 埼玉県及び全国における腐蛆病発生状況

埼玉県		H24	H25	H26	H27	H28 (10月現在)	計
腐蛆病検査実施	戸数	265	360	351	404	316	1696
	群数	7653	11010	11706	10159	5632	46160
アメリカ腐蛆病 (AFB)	戸数	0	0	1	1	6	8
	群数	0	0	1	1	12	14
ヨーロッパ腐蛆病 (EFB)	戸数	7	1	2	0	1	11
	群数	9	1	2	0	1	13
計	戸数	7	1	3	1	7	19
	群数	9	1	3	1	13	27
参考：全国 <sup>4)</sup>		H24	H25	H26	H27	H28 (10月現在)	計
腐蛆病	県数	13	18	13	16	11	71
	戸数	42	49	57	59	43	250
	群数	127	230	168	130	89	744

## 2 県内における AFB の発生状況

過去 5 年間における AFB の発生事例をまとめた (表 2)。発生地域に偏りはないが、飼養群数が 10 群未満の養蜂家が 8 戸中 7 戸であった。その中で、ミルクテストが陰性になる事例が 3 戸で認められた。また、ミロサマイシンを主成分とする AFB 予防薬 (アピテン; アリスタヘルスアンドニュートリションサイエンス株式会社) を発生前年の秋に使用していたにもかかわらず、AFB が発生した事例が 1 戸あった。さらに、病性鑑定マニュアル<sup>5)</sup>に基づき、発生群 1 群につき 1 株ずつ細菌学的検査を行ったところ、コロニーに色素沈着が認められたものが 3 戸 7 株であった。

表 2 過去 5 年間のアメリカ腐蛆病の発生状況

分離年	市町村	飼養群数	発生群数	分離株数	ミルクテストの結果	アピテン使用の有無	コロニー色素沈着性
H26	白岡市	9群	1群	1株	陽性	不明	-
H27	三郷市	2群	1群	1株	陰性	不明	+
H28	蓮田市	15群	5群	5株	3検体陽性 1検体弱陽性 1検体陰性	有 (H27秋)	+
	富士見市	6群	1群	1株	陽性	無	+
	横瀬町	5群	1群	1株	陽性	無	-
	熊谷市	4群	1群	1株	陽性	無	-
	飯能市	2群	2群	2株	陽性	無	-
	行田市	6群	2群	2株	陰性	無	-

## 3 県内における EFB の発生状況

過去 5 年間における EFB の発生事例をまとめた (表 3)。発生が認められた養蜂家のうち、飼養群数が 10 群未満の養蜂家が 11 戸中 6 戸であった。病性鑑定マニュアル<sup>5)</sup>に基づき、細菌学的検査を実施した結果、分離菌は計 19 株となり、5 戸 6 群で典型株及び非典型株の混合感染が認められた。

表 3 過去 5 年間のヨーロッパ腐蛆病の発生状況

分離年	市町村	飼養群数	発生群数	分離株数	典型株/非典型株
H24	さいたま市	2群	1群	1株	典型
	春日部市	6群	1群	1株	典型
		4群	1群	2株	典型及び非典型
	蓮田市	4群	1群	2株	典型及び非典型
	小鹿野町	20群	2群	4株	典型及び非典型
	八潮市	2群	1群	2株	典型及び非典型
H25	上尾市	10群	2群	2株	非典型
		9群	1群	1株	典型
H26	さいたま市	15群	1群	1株	非典型
		18群	1群	1株	典型
H28	富士見市	50群	1群	2株	典型及び非典型

### III 分離菌の遺伝子型別

#### 1 材料及び方法

##### i) 供試菌株

過去 5 年間に腐蛆病発生蜂群から分離した、アメリカ腐蛆病菌 14 株、ヨーロッパ腐蛆病菌 19 株を供試した。

##### ii) 遺伝子型別方法

アメリカ腐蛆病菌は Generesch らの方法<sup>2)</sup>に従い ERIC 型別を、Morrissey らの方法<sup>6)</sup>に従い MLST 型別を実施した。なお、ERIC 型別は、I から IV 型に分類することができるが、近年、III・IV 型株の分離例はない。また、ほとんどの ERIC II 型株は培地上で色素の産生性が認められ、蜂児に対する病原性も強いと言われているが、群に対する病原性は ERIC I 型株の方が強いと推察されている。一方、MLST 型別は 21 タイプが報告されているが、国内で確認されているのは Sequence Type (ST) 2・10・15・18 のみである。ERIC 型別と MLST 型別には相関性があると言われており、ST2・15・18 は ERIC I 型、ST10 は ERIC II 型に分類される。

ヨーロッパ腐蛆病菌は Haynes らの方法<sup>7)</sup>に従い MLST 型別を実施した。なお、ヨーロッパ腐蛆病菌の MLST 型別によって得られた ST は、遺伝子の配列の類似性によって Clonal Complex (CC) と呼ばれる 3 つのグループ (CC3・12・13) に大別することができる<sup>3,8)</sup>。例えば、ST3 や ST29 は CC3 に、ST12 や ST25 は CC12 に、ST4 や ST26 は CC13 に属する。典型株は、CC3 と CC13 に分類され、非典型株は CC12 に分類される。異なる CC 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<sup>9)</sup>。

#### 2 成績

##### i) アメリカ腐蛆病菌

遺伝子型別成績を図 1 にまとめた。得られた結果は以下のとおりである。

- ① 遺伝子型はいずれも国内で既に分離が確認されているタイプであった。
- ② 遺伝子型に地域的な偏りは認められなかった。
- ③ 一度に 2 群以上摘発された場合は、全て同じ遺伝子型だった。
- ④ 同じ年に分離された株の中にも複数タイプが含まれていた。
- ⑤ コロニーに色素沈着性が認められた株は全て ERIC II 型に分類された。

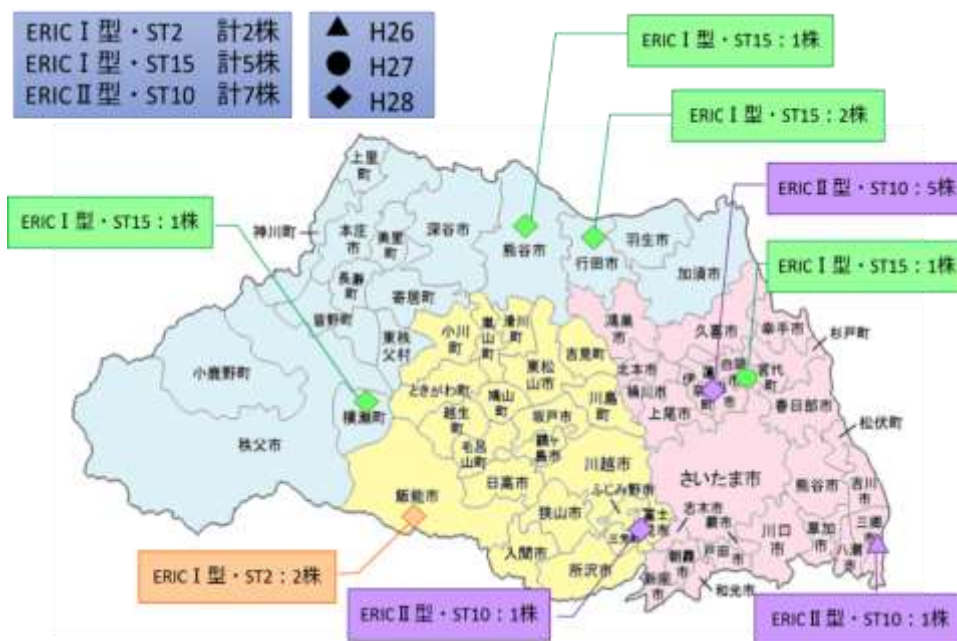


図1 アメリカ腐蛆病菌の遺伝子型別状況

ii) ヨーロッパ腐蛆病菌

遺伝子型別成績を図2にまとめた。得られた結果は以下のとおりである。

①平成28年に分離されたST34は新規STであり、ST12の派生体であった。

上記以外の遺伝子型はいずれも国内で既に分離が確認されているタイプであった。

②AFBと同様に遺伝子型に地域的な偏りは認められなかった。

③一度に2群以上摘発した場合は、同じ遺伝子型をもつ株が分離された。

④同年・同市で分離された事例でも異なる遺伝子型に分類されることがあった。

⑤過去5年間にCC13に属する株は分離されなかった。

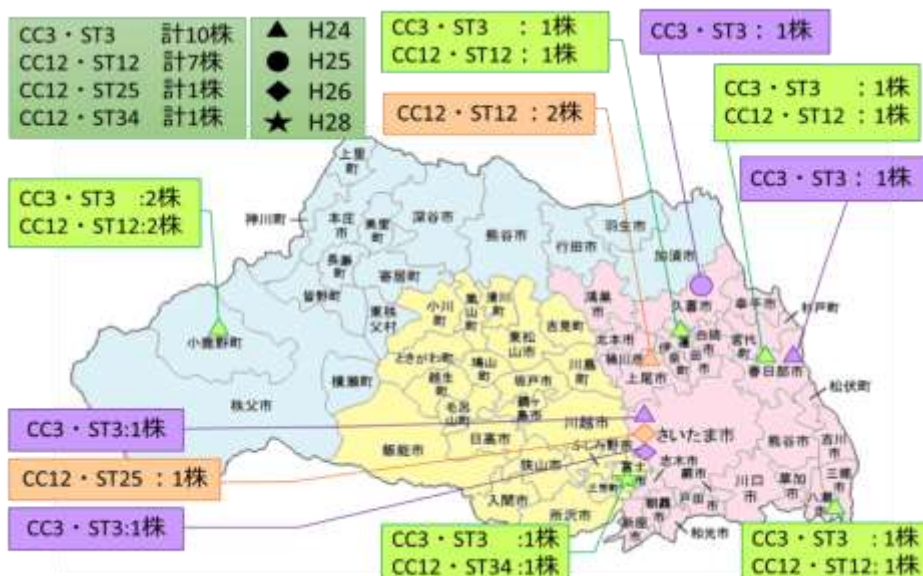




図 2 ヨーロッパ腐蛆病菌の遺伝子型別状況

IV 県内の蜜蜂飼育状況

図 3 は埼玉県における過去 5 年間の蜜蜂飼育届出戸数である。平成 25 年 1 月 1 日に養蜂振興法が改正され、届出義務の対象が、業として蜜蜂の飼育を行う者（養蜂業者）から蜜蜂の飼育を行う全ての者（一部例外あり）にまで対象が拡大された。これを受け、届出戸数は 65 戸増加し、うち 10 群未満を飼養する戸数は 43 戸の増加となった。また、その後も 10 群未満の飼養戸数は毎年増加している。

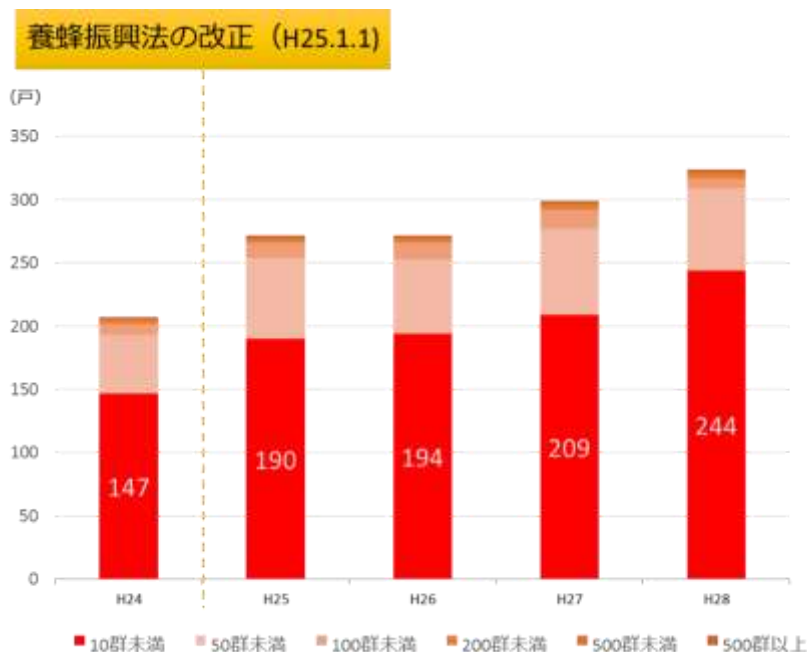


図 3 埼玉県における過去 5 年間の蜜蜂飼育届出戸数

V まとめと考察

埼玉県では、平成 24 年以降、毎年腐蛆病の発生があり、特に 10 群未満の飼養者での発生が多い傾向にあった。本県での腐蛆病の発生が増加した年に、全国的に同様の傾向は認められず、発生蜂群から分離した腐蛆病菌は地域的な偏りがなく、遺伝子型も多様であったことから、特定の新しいタイプの病原体が外部から侵入して、県内でまん延した可能性は低いと考察した。腐蛆病の感染経路は、土場や迷い蜂などの環境からの感染に加え、巣脾・巣箱や蜂具の使い回し等の人為的感染ルートも重要と言われている。平成 25 年以降、蜜蜂飼育届出数は 10 群未満を飼養する戸数が特に増加しており、趣味としての養蜂の普及が大きな要因と考えられた。近年、養蜂を気軽に始められる環境が整いつつあり、蜂群の流通は全国的なものとなっているため、病原体の拡散リスクが一層高まっている状況である。今回調査した各事例において、蜂場への病原体の侵入経路は多様であることが推察されたが、侵入経路の特定は困難であった。今後は発生蜂群の導入歴や移動歴等の情報もさらに追及していく必要がある。

次に、県内での腐蛆病発生事例について考察する。まず、ミルクテスト陰性を示す AFB、

の事例については、他県においても複数の事例が報告されている<sup>10,11)</sup>。小菅らの報告では、ミルクテスト陰性を示す事例から分離されたアメリカ腐蛆病菌も蛋白分解酵素を産生しており、栄養型か芽胞型かといった、菌相の違いが影響すると考察している<sup>10)</sup>。今回、ミルクテスト陰性を示した事例において、共通した遺伝子型等は認められず、菌相の違いについても検討していないため、原因は特定できなかったが、ミルクテスト陰性という結果だけでは、腐蛆病を否定できないことを再認識した。続いて、アピテンを使用していたにも関わらず、AFB が発生した事例について検討する。アピテンの製造元によると、投与適期は越冬明けの育児活動が活発になり始めた早春、及び越冬蜂の育児期である秋と示されており、用法・用量、休薬期間を守ることが前提となる。今回の事例では発生前年の秋にアピテンを使用していたが、早春には投薬していなかったため、AFB に対する予防効果が十分に得られなかった可能性がある。蜜蜂用の動物用医薬品の使用に関する指導についても、家畜保健衛生所から養蜂家へ改めて周知する必要があると考えられた。一方、EFB の事例では典型株・非典型株の混合感染が最も多く確認された。荒井らによれば、野外症例の多くが典型株・非典型株の混合感染例または典型株単独感染例であり、非典型株単独感染例は少数であったと報告されており<sup>12)</sup>、今回も同様の傾向であった。典型株・非典型株の全国的な分布状況や病原性の違いなど、更なる知見の集積が期待される。

今後も腐蛆病に関する事例・データを積み重ね、得られた最新の知見を精密検査・指導において役立てていくとともに、知識・経験に乏しく、病気を発生させるリスクが高い小規模な養蜂家を中心に、蜜蜂の飼養管理についての指導強化及び腐蛆病に対する知識の啓蒙に力を入れていく必要がある。

## VI 謝辞

腐蛆病菌の遺伝子型別を実施していただきました、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 高松大輔上級研究員に深謝いたします。

## VII 参考文献

- 1) 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）
- 2) Genersch et al. 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. (2006)
- 3) Budge GE et al. Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *Melissococcus plutonius*. The ISME Journal. 8:1588-1597(2014)
- 4) 農林水産省：監視伝染病発生年報（2012～2016）
- 5) 農林水産省消費安全局監修：病性鑑定マニュアル第4版、全国家畜衛生職員会、438-440（2015）

- 6) Morrissey et al. Biogeography of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood using a new multilocus sequence typing scheme. Environ. Microbiol. 17 : 1414-1424 (2015)
- 7) Haynes et al. 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)
- 8) Takamatsu D et al. 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)
- 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、日本養蜂協会 (2015)
- 10) 小菅千恵子、前田卓也：ミルクテスト陰性を示したアメリカ腐蛆病、獣医畜産新報、文永堂出版 67(2) : 109-112 (2014)
- 11) 美濃口直和、平井祐子：ミルクテスト陰性を示した腐蛆病発生事例についての一考察、ミツバチ科学、玉川大学ミツバチ科学研究所、29(1・2) : 33-40 (2014)
- 12) 荒井理恵：ヨーロッパ腐蛆病菌典型株・非典型株識別用 Duplex PCR 法の開発、調査研究報告書一家畜保健衛生業績発表集録、埼玉県農林部畜産安全課、54 : 83-90 (2012)