

# 山梨県内定飼養蜂家における蜂場土壌からの アメリカ腐蛆病菌遺伝子検出

牛山市忠・二宮 歌子

アメリカ腐蛆病は、孵化してから24～48時間のミツバチの幼虫が、一匹あたり約8.49個のアメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* の芽胞に感染した場合、50%の確率で発症するといわれている疾病であり、孵化してから53時間以降（孵化後2日以降）の幼虫では、芽胞を摂取してもアメリカ腐蛆病を発症しない(OIE, 2008)。しかし、アメリカ腐蛆病はいったん発症すると、巣板全体に感染が広がり、さらに他の巣箱にも広がる伝染力の強い疾病であることから、国際的には国際獣疫事務局(OIE)の主要疾病リスト(旧リストB)に登載され、日本では1955年に家畜伝染病予防法という家畜伝染病に指定されており、発症の予防を図ることがミツバチ飼養における重要課題となっている。

アメリカ腐蛆病の原因菌であるアメリカ腐蛆病菌については、ミツバチ、ハチミツ、蜂ろう、巣箱などからの分離報告はあるが(畜産草地研究所, 2010; Ryba et al., 2009; Lindström et al., 2008)、蜂場の土壌については菌が存在することは知られているものの、近年は検出報告がない。

今回、土壌からのアメリカ腐蛆病菌の芽胞について遺伝子検査による検出を行ったところ、今後の防疫に重要な結果を得ることができた、その概要を報告する。

## 材料および方法

2010年(平成22年)9月から2011年(同23年)9月にかけて、山梨県内の定飼養蜂家の巣門付近の表層土壌から採取した土64検体(60戸分)を材料とし、採取した土をよく混合した後約0.5gをISOIL for Beads Beating DNA

抽出キット(ニッポンジーン)を用いて、以下のプロトコールにしたがってDNA抽出を行った(図1)。

土壌サンプル(0.2～0.5g)を  
Beads tubeに入れる

- ← 950  $\mu$ L Lysis Solution BB
- ← 50  $\mu$ L Lysis Solution 20S
  - Beads Beat (4～6 m/秒間  
または4,200～6,800 rpm, 30～45秒間)
  - 遠心 (12,000  $\times$  g, 1分間, 室温)
  - 上清 600  $\mu$ L を新しいチューブに移す
- ← 400  $\mu$ L Purification Solution
  - 十分に混合する
- ← 600  $\mu$ L クロロホルム
  - ボルテックス (15秒間)
  - 遠心 (12,000  $\times$  g, 15分間, 室温)
  - 水層 800  $\mu$ L を新しいチューブに移す
- ← 800  $\mu$ L Precipitation Solution
  - 十分に混合する
  - 遠心 (20,000  $\times$  g, 15分間, 4 $^{\circ}$ C)
  - 上清を捨てる
- ← 1 mL Wash Solution
  - 数回転倒混和
  - 遠心 (20,000  $\times$  g, 10分間, 4 $^{\circ}$ C)
  - 上清を捨てる
- ← 1 mL 70% エタノール
- ← 2  $\mu$ L Ethachinmate
  - ボルテックス
  - 遠心 (20,000  $\times$  g, 5分間, 4 $^{\circ}$ C)
  - 上清を捨てる
  - 風乾
- ← 100  $\mu$ L TE (pH 8.0)

↓  
DNA 溶液



図1 ISOIL for Beads Beating による DNA 抽出  
蜂場で採取した土壌をチューブに入れて実験室に持ち帰り、ビーズ入りチューブに移して粉碎処理

表1 PCR 反応試薬の調製

蒸留水	7
2× PCR buffer	25
dNTPs	10
PrimerF (10 pmol/μL)	1.5
PrimerR(10 pmol/μL)	1.5
DNAPolymerase	1
Template DNA	4
合計	50

単位 (μL)

抽出した DNA について、Martínez et al. (2010) の報告に基づき 16SrRNA をターゲットとした PCR を実施した。使用したプライマーは以下の通りである。

PL2-fw 5'-CGGGAGACGCCAGGTTAG-3'

PL2-Rev 5'-TTCTTCCTTGGCAACAGAGC-3'

反応試薬は、KOD-FX（東洋紡）を使用して調整し（表 1）、反応条件は予備変成 94℃（2 分間）の後、変成 98℃（10 秒間）、アニーリング 58℃（30 秒間）、伸張 68℃（1 分間）を 30 サイクル実施して、目的配列の増幅を行った（図 3）。

対照として、県内で分離保存されていた *P. larvae* 菌を約 1 か月、J 培地で培養後に室温に放置して芽胞形成を確認し、土壌 1 g に対し 1 cfu/g、10 cfu/g、100 cfu/g（cfu はコロニー形成単位）を混ぜたものを、陽性対照として用いた。また、当所家畜保健衛生所の庭土を陰性対照として用いた。

陰性対照では増幅産物が確認されなかったが、陽性対照を PCR 実施したところ 378 bp 付

近に増幅産物が認められた。その増幅産物について、独立行政法人 動物衛生研究所にシーケンスを依頼したところ、*P. larvae* DSM7030（基準株）の 16SrRNA と 100% 相同性が確認されたため、378 bp 付近にバンドの認められる検体について陽性と判定することとした。

## 結果

蜂場土壌 67 検体中 20 検体で、PCR の結果、378 bp の明瞭な増幅産物が確認された（陽性率 30%、図 2）。また、陽性対照では 10 cfu/g、100 cfu/g の芽胞液で 378 bp 増幅産物が確認されたが、1 cfu/g では増幅産物が確認されなかったことから、土壌からの検出限界を 10 cfu/g 以上とした（図 3）。

## まとめ

ISOIL for Beads Beating DNA 抽出キット（ニッポンジーン）を用いて、土壌からアメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* 菌 DNA を検出する



図2 PCR 検査の結果  
今回は合計 67 検体の 30% がアメリカ腐蛆病陽性となった。

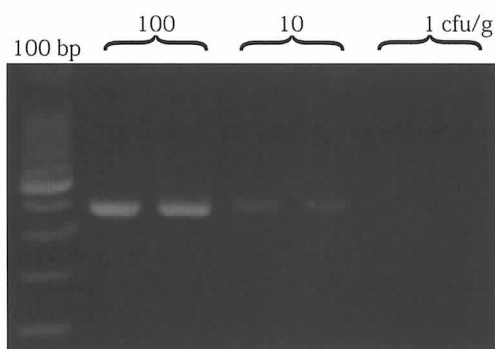


図3 陽性対照による検出限界  
芽胞液 10 cfu/g までは明瞭なバンドが  
得られ、1 cfu/g では不明瞭となった。

ことができた。県内定飼養蜂家の蜂場巣門付近の土壌より、67 検体中 20 検体（陽性率 30%）でアメリカ腐蛆病菌の特異遺伝子を検出することができ、PCR の検出限界は、芽胞 10 cfu/g 以上であった。

今回の検査においては、巣箱の巣門付近の土壌のみを検査対象としたが、今回の検査だけでも 30% の陽性率であったことより、さらに巣箱周辺を検査した場合、蜂場の土壌におけるアメリカ腐蛆病菌の芽胞の検出率は増加することが推測される。

早春期や雨後、貯蜜糖度が高くなった巣内では、幼虫の餌を作るための水が不足するため働き蜂が盛んに水を採集する。通常、水採集行動は比較的巣から近いところで行われ、蜂場表土に雨水がたまった場所でも水の採集が行われる可能性が高い。このとき、蜂場の土壌がアメリカ腐蛆病菌の芽胞に汚染されていると、水採集に伴って芽胞が巣に持ち込まれ、幼虫に与える餌に混入することからアメリカ腐蛆病の発症のリスクは大きくなることが予想される。芽胞については、土壌のような有機物を含んだ状態で消毒薬を使用してもほとんど効果がないため、土壌の表層を除去することや、蜂場を定期的に移動するなどの方法が効果的と考えられる。

今後はこのような検出情報を集積することにより、土壌の芽胞による汚染が疾病リスクを高めているとの認識のもと、アメリカ腐蛆病の発症予防について養蜂家に周知していくことが重要と考えられる。

## 謝辞

今回の発表にあたり様々な点からご指導ご鞭撻等をいただいた（独）動物衛生研究所の高松大輔先生、玉川大学ミツバチ科学研究センターの中村純先生に深謝したい。

（牛山：〒 406-0034 山梨県笛吹市石和町唐柏 1000-1 山梨県東部家畜保健衛生所、二宮：山梨県〒 407-0024 韮崎市本町 3-5-24 山梨県西部家畜保健衛生所）

## 参考文献

- Lindström, A., S. Korpela and I. Fries. 2008. J. Invertebr. Pathol. 99: 82-86.
- Martínez, J. V. Simon, B. Gonzalez and P. Conget. 2010. Lett. Appl. Microbiol. 50: 603-610.
- 畜産草地研究所. 2010. ミツバチ不足に関する調査研究報告書. <http://www.nilgs.affrc.go.jp/result/honeybee/hokoku.pdf>.
- OIE. 2008. Terrestrial Manual 6th Ed, 2008. OIE, Paris. 1343 pp.
- Ryba, S., D. Titera, M. Haklova and P. Stopk. 2009. Vet. Microbiol. 139:193-196.

KAZUTADA USHIYAMA and UTAKO NINOMIYA\*. Detection of *Paenibacillus larvae* DNA from soil samples collected in apiaries in Yamanashi Prefecture. *Honeybee Science* (2014) 29(1/2): 41-43. Eastern Livestock Hygiene Service Center, Yamanashi Prefecture. 1000-1, Karakashiwa, Isawa-cho, Fuefuki-shi, Yamanashi Prefecture, 406-0034 Japan, \*Western Livestock Hygiene Service Center, Yamanashi Prefecture. 3-5-24, Hon-cho, Nirasaki-shi, Yamanashi Prefecture, 407-0024 Japan.

Spores of American foul brood (*Paenibacillus larvae*) have been detected from soil samples collected from apiaries in Yamanashi Prefecture by DNA fingerprinting method based on PCR. The detection limit is at 10 cfu/g in 1 g soil sample, and in the present study 20 of 67 soil samples (30%) were positive to *P. larvae*.

Spores of *P. larvae* in apiary soil can be brought back to hives through water collection by honeybees, and it raises the risk of infection to American foul brood. The pasteurization of soil is not very effective, there must be a measure as if the relocation of apiaries to prevent the future infection.