

ニホンミツバチから単離された 抗アメリカ腐蛆病菌

芳山 三喜雄

アメリカ腐蛆病は、蜂病のなかでも特に甚大な被害を与える感染症であり、国際獣疫事務局 (OIE) リスト B 疾病に指定され、日本では 1955 年に家畜法定伝染病に指定されている。アメリカ腐蛆病の病原体は、グラム陽性の有芽胞桿菌であるアメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* であり、芽胞がミツバチの若齢幼虫に経口感染し、中腸上皮細胞を経て、幼虫体腔内で増殖することで蜂児を死に至らしめる。病状としては、有蓋蜂児が茶褐色の粘性状に腐敗し、膠臭がする場合もある。

日本では、アメリカ腐蛆病への対処法としては、抗生物質であるアピテン (ミロサマイシン製剤) が動物医薬品として唯一登録され利用されているが、海外では広く利用されてきたテトラサイクリン系抗生物質への薬剤耐性菌の出現が問題になっている (Evans, 2003; Miyagi, et al., 2000)。また、ハチミツやローヤルゼリー等のミツバチ産物への抗生物質の混入・残留など安全性の問題も懸念されており、新たな防除法の開発が期待されている。

ニホンミツバチ *Apis cerana japonica* (図 1) は日本各地に分布する日本在来種であり、明治以降に欧米から導入されたセイヨウミツバチ *Apis mellifera* とは別種である。穏和であり刺さないという習性や、アメリカ腐蛆病や寄生ダニなどの害虫に強いという特徴がある (Peng et al., 1987; Chen et al., 2000)。

そこで本研究では、アメリカ腐蛆病に強いニホンミツバチにおいて、腐蛆病菌の感染部位である消化管内の微生物に着目し、抗アメリカ腐蛆病菌活性をもつ腸内微生物の単離を試みた。

まず、各発達段階におけるニホンミツバチの



図 1 アメリカ腐蛆病に強いとされるニホンミツバチ

消化管内微生物相を把握するため、消化管組織の切片を作成し、グラム染色後、顕微鏡下での観察を行った (図 2)。若齢幼虫の場合は図 2 の A, B に示したように、消化管内に微生物の存在は明確には観察されなかった。しかし、終齢幼虫や、成虫 (外勤蜂) の消化管内には、グラム陰性およびグラム陽性菌が大量に存在していることが明らかになった (図 2C, D, E, F)。次に、ニホンミツバチの消化管内の微生物を網羅的に単離・培養するため、解剖後、消化管内容物を寒天培地上に塗布して、35℃で一晩培養した。培養されたコロニーは、PCR 法により 16SrRNA 遺伝子を増幅して、DNA 配列を決定した。遺伝子解析では、表 1 で示したように多種多様な菌類が単離され、合計で 35 種類のコロニーが得られた。例えば、ファーミキューテス Firmicutes 門では、枯草菌 *B. subtilis* をはじめとしたバチルス *Bacillus* 属や、スタフィロコッカス *Staphylococcus* 属が多く単離された。また、抗生物質を生産する放線菌の仲間を含むアクチノバクテリア Actinobacteria 門の近縁種など、グラム陽性菌からグラム陰性菌まで幅広い種類の微生物が含まれていた。

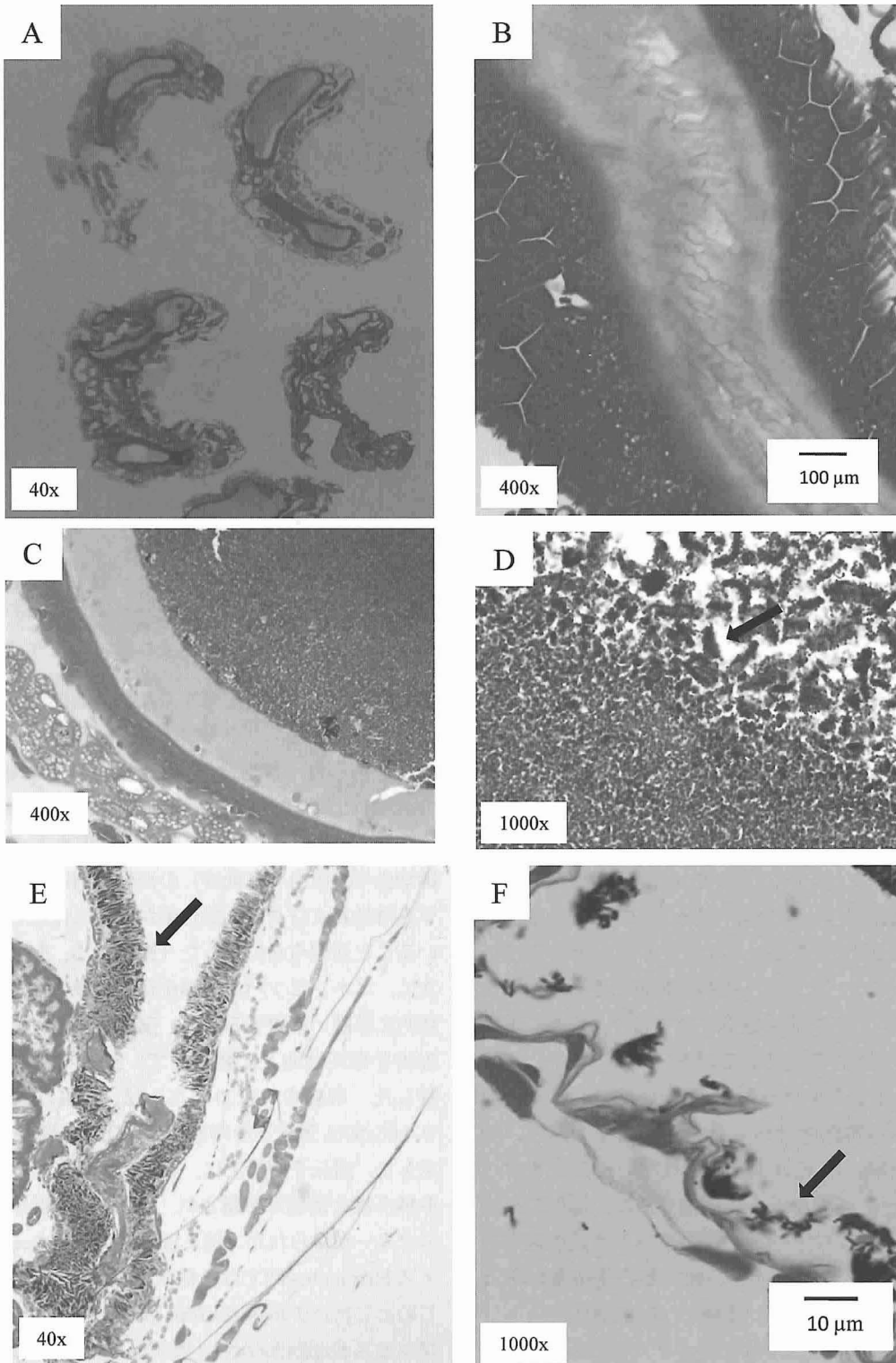


図2 ニホンミツバチの消化管切片の顕微鏡写真

1 齢幼虫の消化管切片 (A, B) には微生物は観察されないが, 4 齢幼虫の消化管切片 (C, D) には多くの微生物が観察される. 外勤蜂 (E, F) の消化管内にも同様に大量の微生物が存在していることがわかる. 矢印はグラム染色された微生物を示す.

表1 ニホンミツバチから単離された腸内微生物

菌株名	近縁種 GenBank (accession no.)	菌門	相同性 (%)
Acj 101	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. (AP008934)	Firmicutes	99
Acj 102	<i>Sphingomonas melonis</i> (AB334774)	Alphaproteobacteria	99
Acj 103	<i>Janthinobacterium</i> sp. (EF455530)	Betaproteobacteria	99
Acj 104	<i>Mesorhizobium</i> sp. (AB196496)	Alphaproteobacteria	100
Acj 105	<i>Escherichia coli</i> (CU928164)	Gammaproteobacteria	99
Acj 106	<i>Pseudomonas</i> sp. (AM411621)	Gammaproteobacteria	99
Acj 108	<i>Providencia alcalifaciens</i> (AY994312)	Gammaproteobacteria	99
Acj 110	<i>Kocuria</i> sp. (AY941087)	Actinobacteria	99
Acj 111	<i>Sphingomonas melonis</i> (AB334774)	Alphaproteobacteria	99
Acj 112	<i>Kocuria</i> sp. (AY941087)	Actinobacteria	99
Acj 114	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. (APO08934)	Firmicutes	99
Acj 115	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. (Z99104)	Firmicutes	99
Acj 117	<i>Tsukamurella tyrosinosolvans</i> (AY238514)	Actinobacteria	99
Acj 118	<i>Microbacterium</i> sp. (AY741722)	Actinobacteria	99
Acj 119	<i>Janthinobacterium</i> sp. (EF455530)	Betaproteobacteria	99
Acj 120	<i>Sphingomonas melonis</i> (AB334774)	Alphaproteobacteria	99
Acj 122	Enterobacteriaceae bacterium (EU029105)	Gammaproteobacteria	100
Acj 123	<i>Sphingomonas melonis</i> (AB334774)	Alphaproteobacteria	99
Acj 124	<i>Mesorhizobium</i> sp. (AB196496)	Alphaproteobacteria	100
Acj 201	Enterobacteriaceae bacterium (EU029105)	Gammaproteobacteria	100
Acj 202	<i>Sphingomonas melonis</i> (AB334774)	Alphaproteobacteria	99
Acj 204	Enterobacteriaceae bacterium (EU029105)	Gammaproteobacteria	100
Acj 205	<i>Erwinia tasmaniensis</i> (CU468135)	Gammaproteobacteria	99
Acj 208	Enterobacteriaceae bacterium (EU029105)	Gammaproteobacteria	99
Acj 209	<i>Bacillus cereus</i> (CP001186)	Firmicutes	99
Acj 210	<i>Sphingomonas melonis</i> (AB334774)	Alphaproteobacteria	99
Acj 211	<i>Erwinia tasmaniensis</i> (CU468135)	Gammaproteobacteria	99
Acj 212	<i>Escherichia coli</i> (EU723821)	Gammaproteobacteria	99
Acj 213	<i>Escherichia coli</i> (CU928164)	Gammaproteobacteria	99
Acj 214	<i>Bacillus subtilis</i> (AB201120)	Firmicutes	99
Acj 215	<i>Janthinobacterium</i> sp. (EF455530)	Betaproteobacteria	99
Acj 216	<i>Sphingomonas melonis</i> (AB334774)	Alphaproteobacteria	99
Acj 218	<i>Moraxella</i> sp. (AY162144)	Gammaproteobacteria	99
Acj 219	<i>Bacillus cereus</i> (CP001186)	Firmicutes	99
Acj 220	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> subsp. (AP008934)	Firmicutes	99

さらに、これら得られた微生物のうち、抗アメリカ腐蛆病菌活性をもつものを網羅的に探索した。あらかじめアメリカ腐蛆病菌を増殖させた寒天培地にニホンミツバチの消化管から単離・培養した微生物を共培養して、アメリカ腐蛆病菌に対する生育阻害活性を調べた(図3A)。例として、本研究で見出したAcj209の場合、寒天培地上の中央においた菌が、周辺のアメリカ腐蛆病菌の増殖を抑制していることがわかる。それに対して、何の活性をも示さないAcj215とBHI培養液のみの場合では阻止円の形成は観察されなかった。このように24時間後に形成された阻止円の直径を測定し、候補微生物のなかで特に強い抗アメリカ腐蛆病活性を

もつもの7株を示した。(図3B)。Acj209は3cm近い阻止円を形成した。これは抗生物質のテトラサイクリン(TC)10 μ g/mLとほぼ同程度の抗アメリカ腐蛆菌作用であった。

次に、得られた7種類の菌は他の細菌類と系統学的な比較解析を行った(図4)。Acj219とAcj209、Acj214とAcj115はそれぞれセレウス菌*B. cereus*と枯草菌*B. subtilis*に近いバチルス属に分類されることが判明した。この結果は、すでに報告されているセイヨウミツバチから得られた抗アメリカ腐蛆病菌の結果と一致した(Evans and Armstrong, 2006; Alippi and Reynaldi, 2006)。この結果から、異なるミツバチ種の消化管内に非常に似通った抗アメリカ

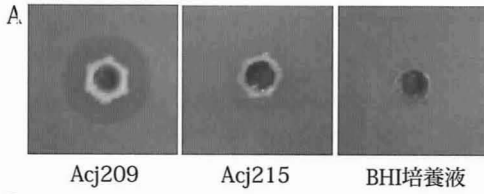
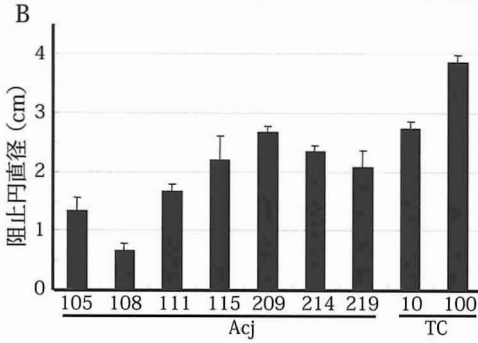


図3 ニホンミツバチから単離された微生物のアメリカ腐蛆病菌に対する増殖抑制効果



(A) Acj209 株と Acj215 株および BHI 培地のみの試験区を示した. Acj209 株のみで阻止円が形成されていることがわかる (中心の円の直径 0.7 cm).

(B) 7つの微生物株の阻止円の直径 (平均直径±標準偏差 cm) をグラフ化した. 抗生物質テトラサイクリン (TC) の効果を右端に示した. 数字は菌株名 (105 ~ 219) および TC 濃度 (μg/mL).

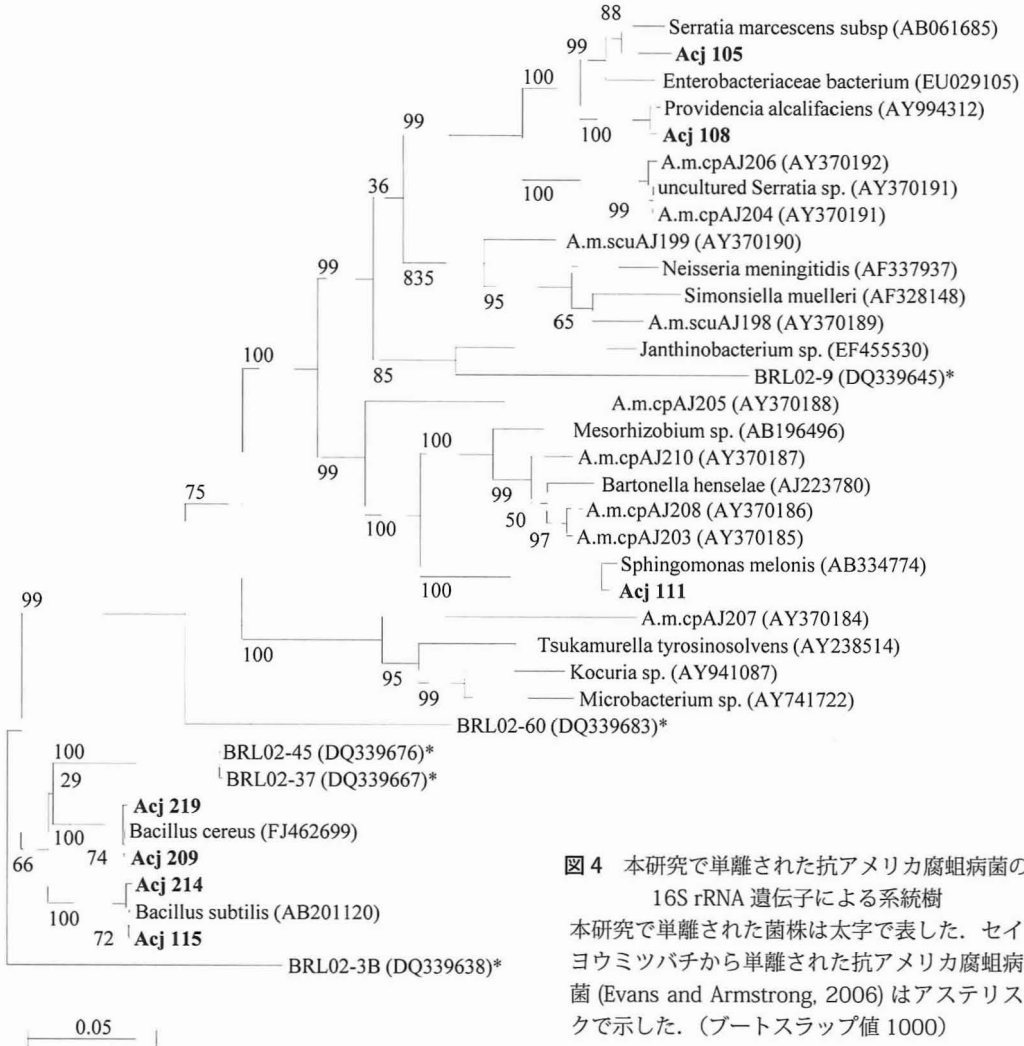


図4 本研究で単離された抗アメリカ腐蛆病菌の16S rDNA 遺伝子による系統樹
本研究で単離された菌株は太字で表した. セイヨウミツバチから単離された抗アメリカ腐蛆病菌 (Evans and Armstrong, 2006) はアステリクスで示した. (ブートストラップ値 1000)

腐蛆病菌が存在していることが示めされた。

養蜂業で広く使われているセイヨウミツバチの消化管には古くから多種多様な微生物の存在が知られていた (Gilliam, 1997; Gilliam et al., 1977). その中には、アメリカ腐蛆病への抗活性をもつものも報告されている (Evans and Armstrong, 2005; Evans and Armstrong, 2006). 今回、私たちは、日本在来種であるニホンミツバチから、多岐にわたる微生物種の単離・培養に成功し、アメリカ腐蛆病菌に抗活性のある菌株を単離した。このなかには、今までセイヨウミツバチでは報告がなかった微生物種も数多く見出された。この理由としては、ニホンミツバチとセイヨウミツバチの生息場所や食性・行動の相違が腸内微生物相の違いに反映していると考察される。

アメリカ腐蛆病菌は芽胞を形成するため、乾燥や低高温に強く (Matheson and Reid, 1992), 根絶の困難な蜂病である。発症した場合は家畜保健衛生所に届け出が義務付けられており、蜂群は焼却処分される。このようにアメリカ腐蛆病には未だ有効な対策が確立していないが、本研究で得られた抗アメリカ腐蛆病菌は、将来の微生物農薬としての応用利用が期待でき、抗生物質に頼らない安全なアメリカ腐蛆病の防御法の開発に貢献できると思われる。

ミツバチには、アメリカ腐蛆病以外にも無数の感染症が存在している。例えば届け出伝染病に指定されているチョーク病やノゼマ病などをはじめとした多くの蜂病病原体の感染組織は消化管であり、その感染部位における微生物の研究を進めていくことで、他の蜂病の防除法開発が期待できる。

謝辞

アメリカ腐蛆病菌 (RIAS No. P-1, RIAS No. P56) をご供試頂いた財団法人畜産生物科学安全研究所生物学研究部の片岡敦子様には深く御礼申し上げます。

(〒305-0901 茨城県つくば市池の台2)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所みつばちグループ)

引用文献

- Alippi, A. M. and F. J. Reynaldi. 2006. *J. Invertebr. Pathol.* 91: 141-146.
- Chen, Y. W., C. H. Wang, J. An and K. K. Ho. 2000. *J. Apic. Res.* 39: 169-175.
- Evans, J. D. 2003. *J. Invertebr. Pathol.* 83: 46-50.
- Evans, J. D. and T. N. Armstrong. 2005. *J. Apic. Res.* 44: 168-171.
- Evans, J. D. and T. N. Armstrong. 2006. *BMC Ecol.* 6: 4. <http://www.biomedcentral.com/1472-6785/6/4>.
- Gilliam, M., H. L. Morton, D. B. Prest, R. D. Martin and L. J. Wickerham. 1977. *J. Invertebr. Pathol.* 30: 50-54.
- Gilliam, M. 1997. *FEMS Microbiol. Lett.* 155: 1-10.
- Matheson, A. and M. Reid. 1992. *Am. Bee J.* 132: 399-402; 133: 471-475; 143: 534-547.
- Miyagi, T., C. Y. Peng, R. Y. Chuang, E. C. Mussen, M. C. Spivak and R. H. Doi. 2000. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 95-96.
- Peng, C. Y. S., Y. Fang, S. Xu and L. Ge. 1987. *J. Invertebr. Pathol.* 49: 54-60.

MIKIO YOSHIYAMA. Bacteria in the gut of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* and their antagonistic effect against *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. *Honeybee Science* (2010) 28(1): 39-43. Honeybee Research Group. Research team for Animal Breeding. National Institute of Livestock and Grassland Science. 2 Ikenodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0901 Japan.

We assessed the complexity of bacterial communities occurring in the digestive tract of the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica*, using histological and 16S rRNA gene sequence analyzes. Both Gram-positive and -negative bacteria were observed, and the number of gut bacteria was higher in old larvae compared with young larvae. A total of 35 clones were obtained by a culture-dependent method, and 16S rRNA gene sequence analysis revealed that the bacterial population in the gut of Japanese honeybee was diverse, including the phyla firmicutes, actinobacteria, and alpha-, beta-, and gammaproteobacteria. Further investigation by in vitro inhibition assays was carried out to determine the ability of an isolate to inhibit *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood. Out of 35 isolates, seven showed strong inhibitory activity against *P. larvae*. Most of the antagonistic bacteria belonged to *Bacillus* species, suggesting that the bacterial isolates obtained in this study appear to be potential candidates for the biological control of *P. larvae*.