

腐蛆病予防薬のミツバチ生産物への移行と残留

星野 夏生, 中村 純

養蜂種セイヨウミツバチ *Apis mellifera* L. にとって最も重要な疾病で、養蜂において、現在も深刻な被害をもたらしているアメリカ腐蛆病 American foulbrood (以下腐蛆病) は、その病原菌であるアメリカ腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* という芽胞形成性の桿菌が、ミツバチの蜂児に感染して敗血症を生じて死亡させ、腐蛆を形成する細菌感染症である。腐蛆病は日本ではヨーロッパ腐蛆病とともに法定家畜伝染病に指定 (1955 年) されており、重度感染が発生すれば蜂群と巣箱のすべてを焼却することと法的に規定されている。腐蛆病の発生件数は世界的に減少傾向にあり、また日本でも飼育届を出している蜂群については家畜保健衛生所による定期的な検査が行われているなど、防疫対策が講じられているが、日本国内での発生は後を絶たない (図 1)。

腐蛆病予防薬としては、海外では 1960 年代から利用されるようになったテトラサイクリン系抗生物質であるオキシテトラサイクリン (oxytetracycline, OTC) が世界的に広く使用

されてきたが、一方で投薬糖液による投与後の抗生物質のハチミツ中への残留が問題となってきた (Gilliam and Argauer, 1979; Lehnert and Shimanuki, 1981; Matsuka and Nakamura, 1990)。

オキシテトラサイクリンの使用については、残留による生産物汚染のみならず、耐性菌の増加や常用によるミツバチ自体の抵抗性の低下といった養蜂上の問題が実際発生しており、また抗生物質の残留したハチミツを食品として摂取した場合のアレルギーや菌交代症の発生など様々な公衆衛生上の問題の可能性が指摘されている (中村・松香, 1993)。日本ではテトラサイクリン系抗生物質の使用は認可されていなかったが、過去に行われた厚生省 (現厚生労働省) による都道府県および政令指定都市を対象に実施した畜水産物食品モニタリング検査結果で、他の畜産動物用の製剤が流用された結果と思われる、オキシテトラサイクリンやクロルテトラサイクリン (chlortetracycline, CTC) がハチミツ中に残留していることが明らかとなり、国内のハチミツ市場にも大きな打撃を与えた。

「みつばち用アピテン」の認可

日本ではミツバチが動物用医薬品の使用にかかわる畜産動物に指定されながら、いっさいの抗生物質の指定がない、事実上の薬剤使用禁止の状態が続いてきた。しかし腐蛆病による養蜂経営上の損失を考えると、養蜂家にとっては予防薬の必要性は高く、残留性の低い、すなわち食品衛生上安全で、かつ予防効果の高い製剤の使用の認可が望まれていた。

こうした養蜂家の要望をふまえ、農畜産業振

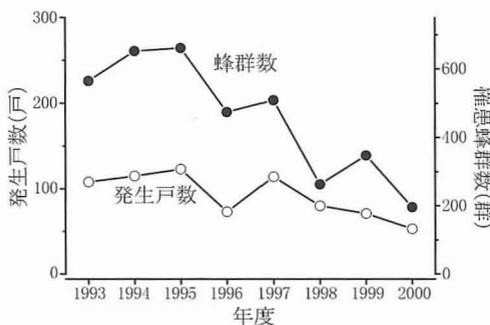


図 1 日本での腐蛆病発生の最近の推移 (全国) 罹患蜂群数は減少傾向にあるが、発生戸数はどちらかという横ばい状態となっている (資料: 農林水産省畜産局)。

興事業団は、「はちみつ抗菌剤残留防止事業」を計画し、(財)畜産生物科学安全研究所を中心に腐蛆病の防除に有効な消毒剤や防除薬の検索を実施した(平成5~9年度実施)。この事業では、腐蛆病への予防効果が高く、しかも食品となるハチミツに残留しない薬物を検索することが目的となり、マクロライド系のミロサマイシン(mirosamicin, MRM)が最も有用な薬物として選択された(吐山, 1997)。

またペースト状飼料に添加して投与することで、病気予防と生産物の安全性確保の両面が期待できると考えられ、1999年10月、ミロサマイシンを含有する粉末製剤は、わが国初のミツバチ専用の動物用医薬品「みつばち用アピテン(以下アピテン)」として認可を受け(川島, 2000)、腐蛆病防除の新しい薬剤として利用され始めたが、今後ミロサマイシン製剤をそのままシヨ糖液に添加して投与するなど、誤用による生産物汚染事故が発生する可能性も懸念される。

そのため本研究では、アピテンを正しく利用した場合と、ミロサマイシンをシヨ糖液に混合して投与した場合のハチミツ中への薬剤の移行と残留を比較検討した。

ハチミツへの移行・残留試験

主実験では、野外で蜂群を用い、ミロサマイシンを、アピテンおよび投薬糖液によって投与した後、それぞれのハチミツを採取し、薬剤の移行・残留様式、残留期間を明らかにした。またこれとは別に室内で18週間の長期安定性試験を行って、ミロサマイシンがハチミツ中に移行した後の分解性についても検討を加えた。

表1 高速液体クロマトグラフィによる分析条件

ポンプ: L-7100 (日立)
検出器 (DAD): L-7455 (日立)
使用カラム: Mightysil RP-18, $\phi 4 \times 150$ mm (関東化学)
カラム温度: 40°C
溶出溶媒: NaH ₂ PO ₄ /H ₂ O/CH ₃ CN/CH ₃ OH =6.81:480:190:80
溶出速度: 1.0 mL/min
検出波長: 219 nm
試料注入量: 20 μ L

1) ミロサマイシンの分析法

検体中のミロサマイシンは表1に示す設定で高速液体クロマトグラフィを用いて分析した(ミロサマイシンは分解過程の中間産物にも抗菌性があるため、高速液体クロマトグラフィの方がバイオアッセイよりも力価換算では感度が下がる可能性がある)。ハチミツからの抽出にはオキシテトラサイクリンで有効だった Sep-PakC18 カートリッジ (Waters) を使用し、ここでの結果もその方法にしたがっているが、後に OasisMCX (Waters) カートリッジを用いた方が抽出効率がよいことが判明したので、抽出方法については双方を比較して表2に示した。

2) アピテンおよび投薬糖液による投与試験

実際に野外蜂群へのアピテン(ペースト)および投薬糖液投与によって、ハチミツ中への移行および残留を確認した。アピテンは使用基準に基づき調製し、投薬糖液は50%シヨ糖液250gにアピテン1トレイ分と等量になるようミロサマイシン原体75mgを添加して調製した。試験は春、夏、秋期投与試験の3回行った。

表2 ハチミツ中のミロサマイシンの抽出方法

カートリッジ	SepPakC18	OasisMCX
試料調整	ハチミツ 2g を 0.1N 塩酸で 10mL に希釈	ハチミツ 2g を 0.05N 塩酸で 10mL に希釈
前処理	80%MeOH/0.1N 塩酸=5: 10	100%MeOH/H ₂ O=2: 1
試料負荷量	10mL (とも洗いを含む)	15mL (とも洗いを含む)
洗浄	0.1N 塩酸 \times 20mL	1 回目: 0.1N 塩酸 \times 2mL 2 回目: 100%MeOH \times 2mL
溶出	80%MeOH \times 1mL	5%NH ₄ OH-MeOH \times 1mL
定量限界*	0.01 μ g/g	0.005 μ g/g

*表1の高速液体クロマトグラフィ分析による

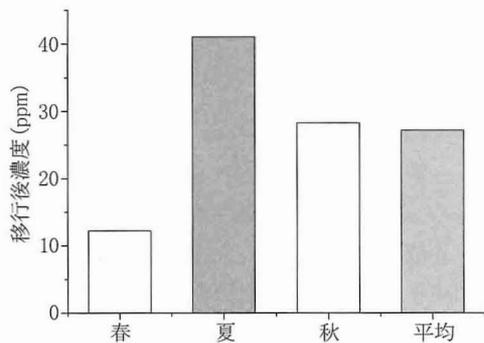


図2 投薬糖液によるミロサマイシンの貯蜜への移行（投与後2または3日目の移行後濃度）
流蜜量の多い春は、夏に比べて急速な薬剤の希釈が起こるものと考えられる。アピテンによる投与では季節を問わずまったく貯蜜への移行が観察されなかった。

夏期および秋期投与試験ではアピテンおよび投薬糖液中にミロサマイシンに加えてオキシテトラサイクリン 75mg を添加した。

①ミロサマイシンの貯蜜への移行

アピテンおよび投薬糖液中のミロサマイシン濃度は 300ppm (75mg/飼料投与単位) で、投与直後の貯蜜中の初期濃度（移行後濃度）は図3のようになった。ミロサマイシンの移行は投薬糖液投与のみでみられ、アピテン投与ではすべて定量限界 0.01ppm ($\mu\text{g/g}$) 以下であった。投薬糖液投与による移行後濃度は平均で投与濃度の約 10% 程度であったが、この濃度には季節により変動が見られた。

Matsuka and Nakamura (1990) はオキシテトラサイクリン 220 ppm の投薬糖液投与（オキシテトラサイクリンとして投薬量は 440 mg/群）を行った場合、投与2日後の移行後濃度の平均は 80ppm を超えたと報告しているが、これは投与濃度に対して約 28% にあたる。今回の実験では、投薬量が少なく（ミロサマイシンとして 75mg/群、オキシテトラサイクリンの 17% 量）、同等の貯蜜があればさらに低い濃度になることが予想されたが実際には予想よりも高濃度であった。これは、薬剤の巣箱内での希釈に関して、薬剤の分解性、投与時期、その時々貯蜜量や天候による短期の入蜜量、蜂

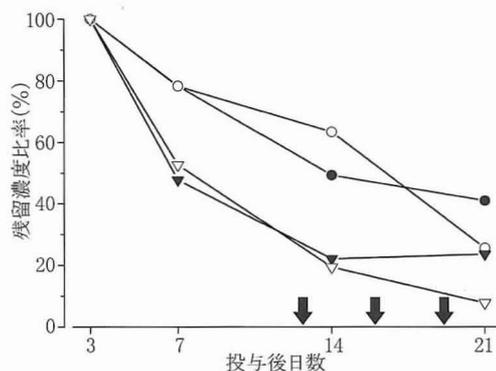


図3 流蜜による希釈を想定した場合の残留濃度の推移

●ミロサマイシンを投薬糖液で投与、○同、流蜜を想定した追加糖液給餌×3回、▼オキシテトラサイクリンを投薬糖液で投与、▽同、流蜜を想定した追加糖液給餌×3回、矢印は糖液給餌のタイミングを示す。抗生物質は各処理区と同じサンプルから抽出。

群の状態、貯蜜サンプルの採取方法やなどが複雑に影響を与えるためと考えられる。特に後述するように、ミロサマイシンがオキシテトラサイクリンとはちがひ、安定性の極めて高い薬剤であることが、無視できない要因となっていよう。

②ミロサマイシンの残留

アピテン投与後、実験期間を通じて貯蜜中のミロサマイシン残留は検出限界以下であった。一方、投薬糖液による投与では、移行後の残留は長期にわたって見られた。春期投与試験では、投与後3日目の移行濃度 12.2ppm から試

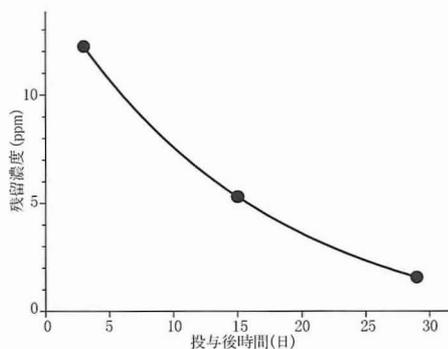


図4 春期投与試験での投薬糖液投与におけるミロサマイシンの移行後濃度

験終了時の29日目まで1.6ppmで残留していた(図4)。流蜜がなく残留濃度が高くなりやすい夏期投与試験では、流蜜期を想定して無薬の50%シヨ糖液1Lを追加投与した比較試験区を設けた。流蜜のない状態では、3週間後に17.6ppmであった残留濃度が、流蜜を想定した糖液給餌によって、その57%である10.0ppmにまで下がっていた。同時に投与したオキシテトラサイクリンは、流蜜のない状態では3週間後には7.5ppm、流蜜想定群では3.0ppmで40%程度の濃度となった。このことから薬剤残留は流蜜による希釈によって急速に低濃度化することが明らかとなった。

Matsuka and Nakamura (1990) はオキシテトラサイクリンを投薬糖液投与(投与濃度220ppm)した場合、貯蜜中への残留は投与後、2日目の52ppmから減少し、6週間後までに薬剤の大半は消失したとしているが、今回の結果から、ミロサマイシンはオキシテトラサイクリンよりも長期にわたって残留することが予想される。

3) ミロサマイシンの安定性

ミロサマイシンのハチミツ中での安定性を18週間の長期安定性試験により調べた。これは貯蜜に移行後のハチミツ中での分解傾向の指標として位置づけられる。

糖度78%以上のハチミツ(市販品)にミロサマイシンを100または250ppm($\mu\text{g/g}$)となるように添加し、全量を2gとしたものをスク

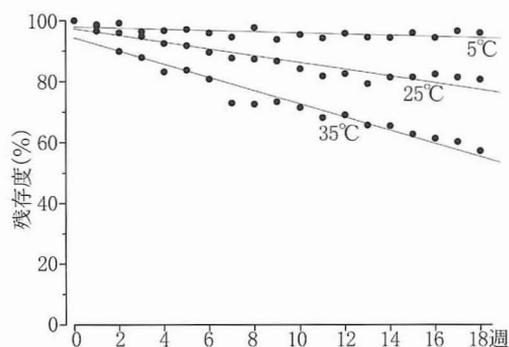


図5 ミロサマイシンのハチミツ中での安定性
18週間の失活傾向はオキシテトラサイクリンとは大きく異なり、温度の影響も小さい。

表3 ハチミツ中のミロサマイシンの半減期(週)

濃度(ppm)	5°C	25°C	35°C
100	336.1	51.6	22.5
250	277.5	59.7	21.6

リュー管に入れ、それぞれを冷蔵庫(5°C)、恒温室(25°C)、恒温器(35°C)に遮光して安置した。設置当日を0週とし、3日目のサンプル回収に続き、以降18週間分を回収し、分析まで-20°Cの冷凍庫で保存した。高速液体クロマトグラフィによる分析後、近似曲線から半減期を求め、各試験区におけるミロサマイシンの安定性を確認した。

その結果ミロサマイシンのハチミツ中の残存割合は、たとえば巣箱内温度(35°C)や室温(25°C)のような温度負荷でもミロサマイシン自体の安定性にはほとんど影響がないことがわかった(図5)。

図5の近似曲線から長期安定性試験におけるミロサマイシン半減期を求めた(表3)。半減期(2濃度区の平均)は冷蔵庫内温度で約6.4年、25°Cで約2.3年、35°Cで約5.5か月となった。

Kochansky et al. (1990) は30°Cにおける70%シヨ糖液中のオキシテトラサイクリンおよびタイロシンの半減期は、それぞれ7.6日、186日と報告しており、またGilliam and Argauer (1975) はオキシテトラサイクリンの急速な分解は温度によって加速すると述べている。このことから、ミロサマイシンは温度の影響を受けにくく、オキシテトラサイクリンやタイロシンよりも安定性のきわめて高い薬剤といえ、一度貯蜜に移行した場合、流蜜による希釈があっても、長期にわたって残留すると考えられた。

4) 病気予防効果

幼虫への薬剤の到達性を調べた結果、幼虫体内からは、投与方法によらず0.5~1.5ppmの範囲で検出された。ミロサマイシンのP. larvaeに対する最小殺菌濃度MBCsは0.10~6.25($\mu\text{g/ml}$)である(吐山ら, 1998)。ここで用いた幼虫は人工王台中の女王蜂幼虫であるが、実際に腐蛆病に感染するのは働き蜂の幼虫であ



図6 投薬糖液とアピテンでミロサマイシンを投与した場合の薬剤経路の差

投薬糖液を摂取するのは外勤蜂や内勤蜂でも貯蔵係の働き蜂で幼虫との接点がない。アピテンを摂取するのは若齢蜂か育児蜂で、貯蜜との接点がない。

る。若齢幼虫は、ローヤルゼリーを介して幼虫に移行したミロサマイシンと同等の濃度で薬剤を摂取することになると考えられるので、本実験における幼虫のミロサマイシン移行後濃度は、腐蛆病を予防する上では十分な濃度に達していたと判断できる。さらに働き蜂の幼虫はその後期に花粉と蜜との混餌を与えられるが、その際アピテンのような飼料も食べることが考えられ、この場合はより高濃度でミロサマイシンを摂取することになるため、腸管内で発芽するアメリカ腐蛆病菌に対して示す抗菌性はより強いと考えられる。

また、図6に示すように、アピテンのように育児蜂が摂取する投与形態の場合、薬剤の多くがほぼ直接幼虫に到達する反面、貯蜜への移行のルートはほとんど遮断された形になる。一方で、投薬糖液投与の場合、薬剤を摂取するのは外勤蜂や、内勤蜂でも育児からはすでに手の離れた貯蜜係であるため、薬剤は基本的にはいったん貯蜜として巣房内に蓄えられる。これがその経路上で育児蜂にわたり、幼虫に達するため、薬剤の大半は貯蜜に残されたままになる。

どちらの投与方法でも、幼虫体内から十分な濃度のミロサマイシンが検出されたといっても、同時に貯蜜の汚染が起こるか起こらないかは重要な問題である。この点アピテンは、薬剤の動態が病気の予防に適しており、同時に貯蜜の汚染を防ぐことができる理想的な投与方法といえる。

まとめ

「みつばち用アピテン」の主成分である抗生物質ミロサマイシンについては、まずハチミツ中における安定性が高く、分解の早いオキシテトラサイクリンとは残留に関する性質が異なる薬剤であることを知る必要がある。ハチミツ中のミロサマイシンは、巣箱内温度である35℃においても、その半減期は約5.5か月で、これは1年の採蜜期間より長くなり、したがって一度巣箱内で貯蜜に残留した場合、少なくともその年は採蜜不能と考えるべきである。

実際に蜂群に投与した場合、残留濃度を下げる主要因は薬剤の分解と流蜜による希釈であるが、オキシテトラサイクリンと比較して、ミロサマイシンは薬剤の分解性が低いため、残留濃度の低下はごく遅いものになる。分解性の高いオキシテトラサイクリンでさえ生産物中の残留が問題となっているので、ミロサマイシンではなおさらであろう。これらのことから、ミロサマイシン使用にあたっては貯蜜中に残留させないことが第一の基本といえる。

投薬糖液投与の危険は残留だけの問題に限らない。Peng et al. (1992) はタイロシンを用いた実験において、液体給餌によって大量の抗生物質投与を行うことは、幼虫の死亡を引き起こし、幼虫の発育の遅れ、幼虫段階における早熟な色素形成の誘発につながると報告している。ミロサマイシンで同様の被害が発生するかどうかはわからないが、アピテンにおいては摂取時間を遅延(1週間)できるので、一度に大量の薬剤を与えることはなく、幼虫および蜂体への薬剤負荷が小さくて被害の危険性は小さいと考えられる。またアメリカ腐蛆病菌に対する抗菌性が高いため、製剤中に含む薬剤の量が少ない点も、残留やこうしたミツバチ自身への被害防止の観点から有利といえる。

さらに、投薬糖液による投与では、蜂群の状態によらず投与した全量をミツバチが摂取してしまうが、アピテンでは蜂群の大きさなどにより、ミツバチ自身が総摂取量を調節でき、養蜂家が投薬期間終了後残ったアピテンを除去する

ことによって、過剰な投与を防ぐことができる点も、この製剤の有利な点といえるだろう。

投薬糖液投与の場合、養蜂家自身が薬剤を調製することになり、誤って高濃度で与えて薬害を引き起こしたり、逆に低濃度で長期間与えることによって、薬剤に対する耐性菌の増加を引き起こしたりしかねない。この点についても、製品化されたアピテンであれば誤用の危険を回避しやすくなっている。

ここまで述べてきたように、さまざまな観点から、ミロサマイシンの投薬糖液による投与法は不適切であり、パテ状のアピテンが、使用基準を遵守しながら使用する限りにおいて最も安全で合理的な投与法といえるだろう。もちろん、養蜂家自身が現在、病気予防のために最も重要と考えている蜂具類の消毒、蜂群の強勢化があってこそ、この薬剤の利用が効果を発揮するということも忘れてはならない。

謝辞

本研究で使用したミロサマイシンおよび「みつばち用アピテン」の入手に関しては、それぞれ三鷹製薬（株）ならびに日本配合飼料（株）のご協力をいただいた。

(〒194-8610 町田市玉川学園 6-1-1

玉川大学ミツバチ科学研究施設)

主な引用文献

- Gilliam, M. and R. J. Argauer. 1975. *J. Invert. Pathol.* 26: 383-386.
- Gilliam, M. and R. J. Argauer. 1979. *J. Apic. Res.* 18(3): 208-211.
- 吐山豊秋. 1997. 蜜蜂アメリカ腐蛆病の防除に有効な薬剤の検索. 財団法人 畜産生物科学研究所. 14 pp.
- 吐山豊秋. 1998. 獣医畜産新報 51(1): 15-18.
- 川島美生. ミツバチ科学 21(2):55-60.
- Kochansky, J., D. Knox and H. Shimanuki. 1990. *Apidologie* 30: 321-326.
- Lehnert, T. and H. Shimanuki. 1981. *Apidologie* 12: 133-136.
- Matsuka, M. and J. Nakamura. 1990. *J. Apic. Res.* 29: 112-117.
- 中村純, 松香光夫. 1993. ミツバチ科学 14(3): 97-104.
- Peng, Y. S. et al. 1996. *J. Invert. Pathol.* 67: 65-71.

NATSUKI HOSHINO, and JUN NAKAMURA. Transfer and residues of antibiotic to prevent American foulbrood in honeybee colonies. *Honeybee Science* (2002) 23 (2): 65-70. Honeybee Science Research Center, Tamagawa University, Machida Tokyo, 194-8610 Japan.

To prevent American foul brood (AFB) of honeybees, the medicated paste-premix "Apiten" containing antibiotic mirosoamaicin (MRM) has been approved in Japan in 1999. In this study, the stability of MRM in honey, profiles of dynamics of MRM on the different medication methods, Apiten paste and the medicated syrup, and the physical property of Apiten paste were investigated to appraise the safety on the honey production.

MRM was more stable than oxytetracycline (OTC), and at least 57% of MRM remained in honey for 18 weeks at 35°C. Medicated syrup transferred MRM to store honey at a significant level, 43 ppm as the highest concentration. Once MRM was in store honey, even after dilution with incoming nectar, its residues in honey extends longer because of its low degradation rate. On the other hand, Apiten transferred no or less to store honey, and larvae could receive sufficient amount of MRM through bee milk (royal jelly) or directly from Apiten mixed in larval food. The result shows Apiten has great advantage to meet the demands on both safety in production and efficacy to prevent diseases