

養蜂巣箱におけるアメリカ腐蛆病菌の 放射線殺菌について

高橋 富男, 片岡 敦子, 上川 昌利,
西本 進, 大田垣 文雄

アメリカ腐蛆病 (American Foulbrood: AFB) は, ミツバチの感染症, 非感染症を含めた病気の中で最も重要な病気である。病原性と芽胞形成性を持つ菌 *Paenibacillus larvae* が原因で, 一度巣箱や蜂群が汚染されると根絶は困難とされてきた。蔓延しやすく, 蜂場内の全蜂群が全滅することも稀ではない。孵化 2 日以内の若い幼虫が感染し, 有蓋巣房内の幼虫や蛹が死亡する (図 1 上中)。アメリカ腐蛆病は, わが国では家畜法定伝染病に指定されているため, 罹病した養蜂巣箱は焼却廃棄処分することになっている (図 1 下)。

世界的には沈静傾向にあるものの, 近年アルゼンチンで大流行となった。ニュージーランドでは 1970 年前半と 1989 年に流行した (Van Eaton, 2000)。

蜂病には他に, ヨーロッパ腐蛆病やチョーク病がある。後者に罹病した蜂児は, 白色または黒緑色をしたミイラ状になって死亡し, 蜂群の巣門前や巣房内にミイラ化した個体が散見されることがある。病原体は真菌 (カビ) の 1 種のハチノスカビ *Ascosphaera apis* である。胞子を形成し, 芽胞ほどではないが, 熱や化学薬品などに対して抵抗力が強い。梅雨時期, 蜂群内に蜜や花粉が不足しているときなどに多発する傾向がある。

アメリカ腐蛆病対策の現状

1) エチレンオキシド (EOG)

カボックスといわれる EOG 殺菌装置により, 医療用具のガス滅菌と同様に殺菌する。この装置は, 1970 年代に補助金を受けて各県に設置したものであり, 大分老朽化していること

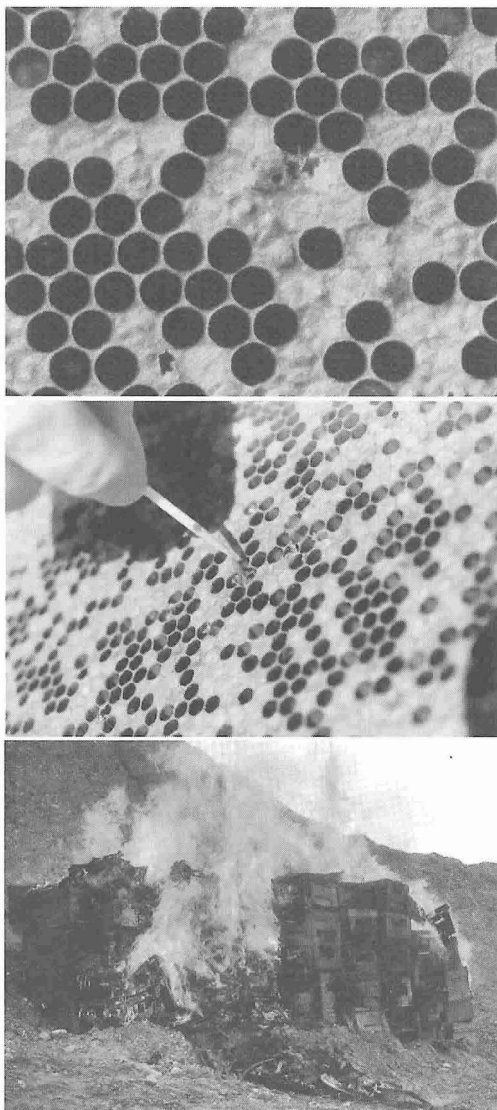


図 1 アメリカ腐蛆病に感染した巣脾上の蜂児の状態 (上), 糸を引く感染した蛹 (中), アメリカ腐蛆病罹患群の焼却処分

(社) 日本養蜂はちみつ協会, 1992. ミツバチの飼養管理とその衛生対策—腐蛆病を中心として—, (社) 日本養蜂はちみつ協会, 61 pp. より。

と、作業環境などの点で問題視されつつあること、装置メーカーが製作したがないこと、PRTR法 (Pollutant Release and Transfer Registers) の施行による EOG の使用が難しくなってきたこと、芽胞菌に対して効力が不十分であることなどが指摘されている。現状では、1箱当たり 300 円程度の殺菌費用がかかっている。

2) 薬剤投与

米国では、オキシテトラサイクリン (OTC) の投与を食品医薬局 FDA が承認している。抗生物質に該当するため、採蜜期に入る 6 週間前に投与中止が条件とされている。

日本ではミロサマイシン含有の粉末製剤が、99 年に使用が許可され、三鷹製薬 (株) から「みつばち用アピテン」の商品名で販売されている。しかしながら米国と同様に、食用ハチミツ生産前 14 日間は使用禁止とされている。これは、幼虫および蛹中の桿菌に対しては効果的であるが、芽胞には効果がないといわれている (吐山, 1997)。

なお、業界では、薬剤の影響を除去するために、最初の貯蜜分はすべて除去廃棄することになっている。

3) ガンマ線殺菌

オーストラリア Steritech 社が商用で養蜂巣箱の殺菌処理を実施しているとの情報あり、直接ヒアリングした結果、15kGy 照射によりアメリカ腐蛆病、ヨーロッパ腐蛆病、その他の蜂病菌も死滅するため、定期的に照射処理 (年 1 回) することにより、ハチミツの収量が照射処理しないものと比較して 10% 以上増えるとの見解が同国の養蜂協会からだされている。

当然のことながら、照射時は蜂も蜜もすべて空にした状態で照射することになる。したがって、食品照射には該当するものではない。

同社の照射料金は、\$ 15/3 箱セットとなっており、それほど高い料金ではない (4)。

日本国内では、一部照射施設等で試験をしたことはあるが、商用照射利用の実績はない。

放射線殺菌実用化にむけた試験研究

1) 役割分担

アメリカ腐蛆病菌の調製と評価は、(財) 畜産生物科学安全研究所が行った。放射線照射試験実施のうち、電子線照射は日本電子照射サービス (株) 関西センターで、ガンマ線照射は日本照射サービス (株) 東海センターで、それぞれ実施した。試験用の養蜂巣箱、器材の準備は、

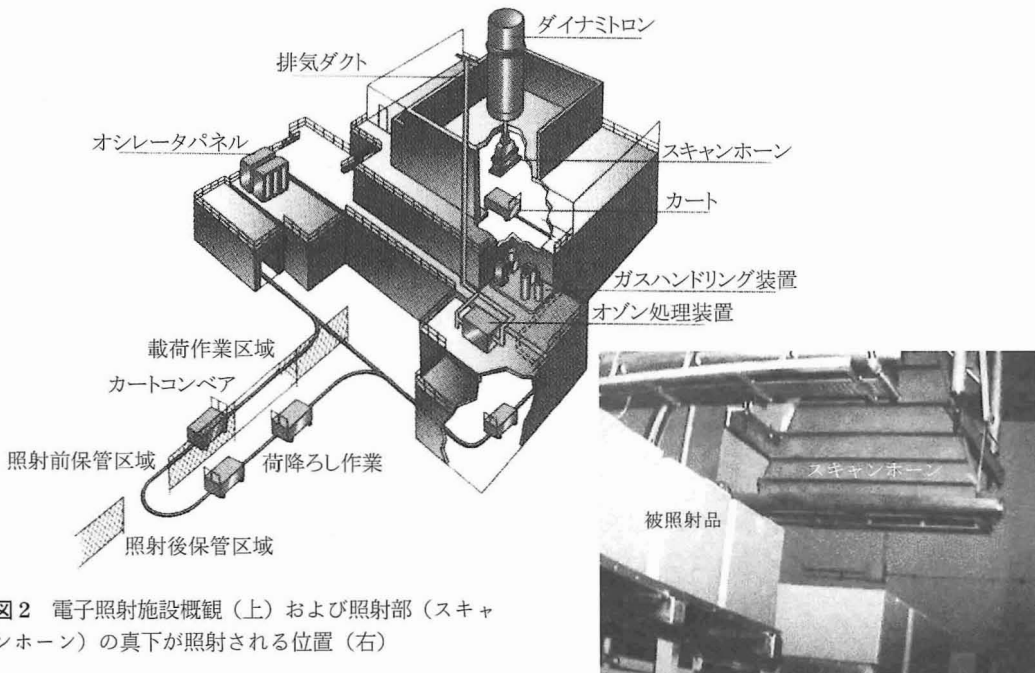


図 2 電子照射施設概観 (上) および照射部 (スキャンホーン) の真下が照射される位置 (右)

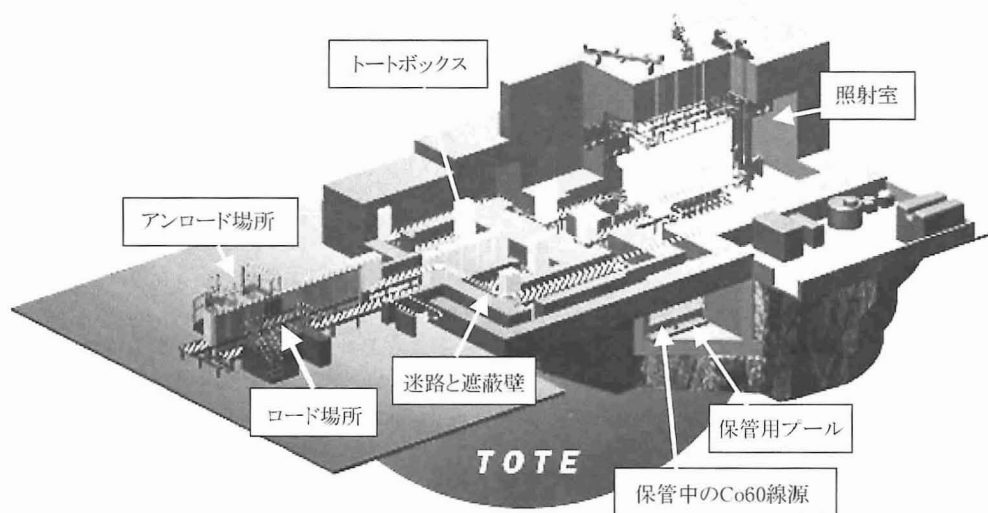


図3 ガンマ線照射装置（日本照射サービス（株）東海センター）

（社）日本養蜂はちみつ協会および和歌山県紀北保健衛生所が担当した。上記の全体計画の推進および調整は日本照射サービス（株）および関西電力（株）が担当した。

2) 照射設備

a. 電子線（Electron Beam, EB）照射（図2）

型式：ダイナミトロン型電子線加速器
 製作：Radiation Dynamics, Inc.（米国）
 加速電圧：5MeV（500万電子ボルト）
 出力：150 kW
 搬送方式：カートコンベア（横150cm×奥行き100cm）両面照射のため要反転作業

b. ガンマ線（ γ 線）照射（図3）

型式：JS10000HD（コバルト60による）
 製作：カナダ MDS Nordion
 許容線源量：300万Ci（キュリー）
 搬送方式：アルミ製トートボックス
 （内寸法：幅80cm×奥行き51.5cm×高さ153cm）

3) 試験のステップ

試験は供試料の準備の都合もあって、1998～2000年度まで3年間にまたがって実施した。

◎ステップ1 電子線透過性試験

電子線の透過性確認試験を実施。養蜂巣箱サンプルは和歌山県紀北保健衛生所から手配していただいた使用済みのものである。照射は、巣脾に対して、垂直方向（巣箱側面から）と平行方向（真上から）の2方向から実施した（図4）。

結果は予想通り、垂直方向からの透過度はかなり低下するが、平行方向からは問題なく透過することが判明した。

透過率の差異発生原因として、使用済みで蜜の除去が不十分なこと、また電子線が湿潤状態では透過しにくいこともあって、垂直方向で透

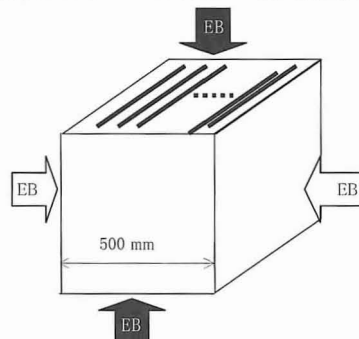


図4 養蜂巣箱の照射方向

白矢印は巣脾に対して垂直方向の、黒矢印は巣脾に対して平行の照射方向となる。EB=電子線



図5 カート上に固定されたアメリカ腐蛆病菌入りのサンプル

過率の低下を来したものと判断できる。

いずれにしても、養蜂巣箱の電子線の透過は可能であることが確認された。

◎ステップ2 アメリカ腐蛆病菌死滅の必要線量確認トレース

ガンマ線で10~20kGy照射した場合に完全にアメリカ腐蛆病の死滅が確認されており(Gosselin and Charbonneau, 1990), これを参考に, 電子線の場合はどうなるかトレース的な試験を実施した。

(1) 照射方法

シャーレ中に入れた菌を, カートコンベア上に載せて(図5), 狙いの線量が, 0.2kGy (実測値0.16~0.19kGy), 0.6 (0.56~0.62), 1.0 (0.94~1.04), 5 (5.2~6.5), 10 (10.3~12.4), 15 (14.9~18.6) の6水準となるよう照射線量を選定した。

(2) 菌調製方法と評価方法

1993年から1995年までの間に日本国内で

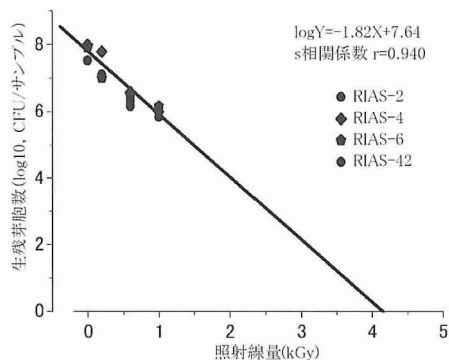


図6 電子線照射線量とアメリカ腐蛆病菌生乾芽胞数の関係(芽胞数多)

発生したアメリカ腐蛆病罹病蜂群より分離した4菌株(RIAS-2, 4, 6および42)を用いた。各菌株は芽胞形成のためにJ培地(1)に接種して37°C, 5%炭酸ガス存在下で2週間培養した。培地上の発育集落を掻き取って滅菌生理食塩水に約 10^8 芽胞(個)/mLの濃度で浮遊させ, その1mLを面積約16cm²の滅菌濾紙にしみ込ませ, 室温下で十分に乾燥させたものを1紙片ずつポリスチレン製のシャーレに入れ, 照射用サンプルとした。サンプルは照射線量ごとに3つずつ同じものを準備した。

照射後, 濾紙片を滅菌ハサミおよびピンセットを用いて細分し, 1サンプル当たり5mLの滅菌生理食塩水を加えて約2分間激しく振とうし, 1晩静置した。その後さらに約2分間激しく振とうし, 80°C, 20分間の加熱処理したものを生乾芽胞数測定用原液とした。原液を滅菌生理食塩水を用いて 10^0 ~ 10^5 までの範囲で10倍段階希釈し, 各希釈液の0.2mLを2枚の

表1 電子線照射後のアメリカ腐蛆病菌芽胞の生残数および生残率

菌株番号	照射線量 (kGy)						
	0	0.2	0.6	1	5	10	15
RIAS-2	2.9×10 ⁷ (100.0)	1.0×10 ⁷ (34.5)	1.4×10 ⁶ (4.8)	6.4×10 ⁵ (2.2)	0* (0)	0* (0)	0* (0)
RIAS-4	9.5×10 ⁷ (100.0)	5.8×10 ⁷ (61.1)	3.9×10 ⁶ (4.1)	1.0×10 ⁶ (1.1)	0* (0)	0* (0)	0* (0)
RIAS-6	6.9×10 ⁷ (100.0)	9.2×10 ⁶ (13.3)	3.1×10 ⁶ (4.5)	1.2×10 ⁶ (1.7)	0* (0)	0* (0)	0* (0)
RIAS-42	7.5×10 ⁷ (100.0)	1.2×10 ⁷ (16.0)	2.0×10 ⁶ (2.7)	8.5×10 ⁵ (1.1)	0* (0)	0* (0)	0* (0)

照射線量0kGyは, 非照射サンプルを意味する

上段は生残数(個/mL), 下段は非照射を100としたときの生残率(%)を示す

*非照射サンプルの芽胞数との間に有意差あり(P<0.05)

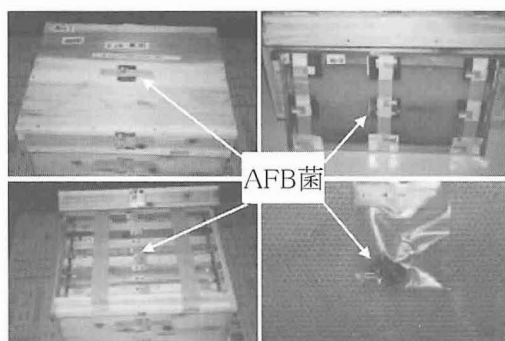


図7 養蜂巣箱の内外の菌サンプルと線量計の設置位置

J培地上に0.1mLずつ滴下して塗り広げ、37℃、5%炭酸ガス存在下で3日間培養して培地上の発育集落数を測定した。2枚の平均値からそのサンプル中の生残芽胞数を算出し、さらに3サンプルの平均値を求めて各菌株の各線量における生残芽胞数とした。

各菌株の照射サンプル中の生残芽胞数及び生残率（照射サンプル中生残芽胞数／非照射サンプル中生残芽胞数×100の計算式より算出）を表1に示し、照射サンプルと非照射サンプル間の生残芽胞数比較及び菌株間の生残率比較を行った。また、生残芽胞数と照射線量の関係について回帰分析を行い、導かれた回帰直線及び回帰方程式（図6）から生残芽胞数がほぼ0になる照射線量を推定した。

(3) 試験結果

国内発生別の4菌株を用いたが、結果は表1および図6に示すように、菌株による差異はみられず、いずれも5kGy程度の照射ですべて死滅することが分かった。

◎ステップ3 実際の養蜂巣箱内の線量分布とアメリカ腐蝕病の死滅確認（使用済み養蜂巣箱を含む）

電子線とガンマ線で、線量分布試験およびアメリカ腐蝕病死滅確認試験を実施した。

(1) 照射方法

菌は巣脾表面部分と蜜中に入れたものの2種類を各養蜂巣箱の表面や内部に配置させて、線量分布確認と線量対比生存率把握を実施した。

図7にはそれぞれの養蜂巣箱の表面および内部に設置した菌および線量計（照射線量測定用）の様子を示した。また、図8は試料を電子線照射用カートコンベアに乗せた状態である。

透過率の関係から、電子線の場合は原則として両面方向からの照射となるため、照射後反転してさらにもう1回（合計2回）照射することになる。

ガンマ線の場合は、それぞれの養蜂巣箱を図3にあるトートボックスに積載することで反転作業はない。

(2) 菌調製方法

RIAS-No.4の芽胞を滅菌生理食塩液に 2×10^8 個の濃度で浮遊させた芽胞液を用いた。70℃、1時間加熱し、冷ましたハチミツ4.5mLと芽胞浮遊液0.5mLをポリプロピレン製のチューブに入れ、軽く振って混和したものを蜜中サンプルとした。また、使用済みで*P.larvae*が検出されないことを確認した巣脾から約 1cm^3 の薄片を切り出し、同芽胞液0.5mLを塗布した後、室温下で3日間乾燥させ、ポリエチレン製の小袋にいれたものを巣脾表面サンプルとした。

(3) 確認方法

蜜中サンプル5gに滅菌精製水5mLを加えてよく混和したものを80℃、20分間の加熱し、滅菌生理食塩水を用いて $10^0 \sim 10^6$ までの範囲で10倍段階希釈し、各希釈液の2mLを1mLずつ2枚のJ培地上に滴下して塗り広げ、

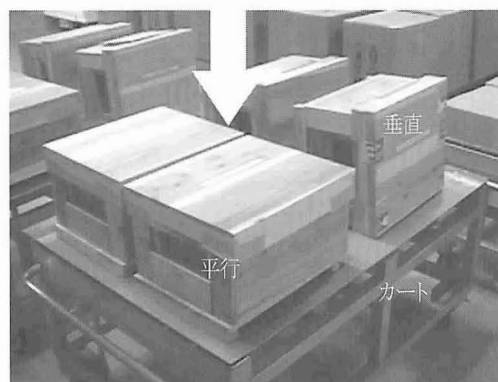


図8 カートの上に乗せられた巣箱。手前側が巣脾に平行な照射用、後側が巣脾に垂直な照射用の積載状態。白矢印は照射方向を示す。

表2 照射線量と線量分布測定結果

線源	狙い線量 (kGy)	設定表面線量 (kGy)	照射方向	最大 (kGy)	最小 (kGy)	最大/最小	付記
電子	5	15	水平	35.1	23.7	1.48	蜜中
電子	5	15	水平	25.7	20.3	1.27	
電子	10	30	水平	58.2	47.9	1.22	蜜中
電子	10	30	水平	60.5	48.6	1.25	
電子	5	15	垂直	24.2	7.1	3.41	蜜中
電子	5	15	垂直	26.9	9.9	2.72	
電子	10	30	垂直	54.6	19.0	2.87	蜜中
電子	10	30	垂直	48.8	18	2.71	
ガンマ	5	6	垂直	7.1	6.2	1.15	蜜中
ガンマ	5	6	垂直	7.0	6.1	1.15	
ガンマ	10	11	垂直	12.4	11.0	1.13	蜜中
ガンマ	10	11	垂直	12.5	10.9	1.15	

37°C, 5%炭酸ガス存在下で3日間培養して培地上の発育集落数を測定した。2枚の平均値からそのサンプル中の生残芽胞数を算出した。一方、巣脾表面サンプルは滅菌ハサミとピンセットを用いてなるべく細分し、1サンプル当たり5mLの滅菌生理食塩水を加えて室温下で1昼夜静置した後、80°C, 20分加熱し、以下蜜中サンプルと同様の操作で生残芽胞数を測定した。

(4) 結果

①透過性と線量分布

表2に示すように、透過性は、電子線の場合、照射方向が巣脾に対して垂直方向は平行方

向に比べて低いものの、通常の理化学器材照射の場合と変わらない状態であり、全く問題ない結果といえる。

表にあるように、電子線の場合は狙い値に比べて実際の表面線量は2~3倍高く設定した。

また、ガンマ線は10~20%アップ程度とした。

②アメリカ腐蛆病菌生存度確認

図9は照射線量と菌の生存率の結果を表わしたものである。蜜中だと透過性に左右されるため、電子線の場合は高めの線量設定が必要となるものの、双方とも10kGy程度の照射で生存率が極端に低下していることがわかった。電子線では照射方向により差異が生ずるため、巣脾と平行方向からの照射が好ましいといえる。

結果のまとめ

(1) 殺菌に必要な照射線量は、巣脾付着菌では5kGy、蜜中では10kGyであった。ただし、電子線ではバラツキがあり巣脾付着菌で15kGy、蜜中では照射方向によっては無理がある。この場合はガンマ線が望ましい。

(2) 電子線では照射方向によって線量分布(最大/最小)が異なるものの3倍程度におさまっている。ガンマ線では1.15倍と良好な分布値となった。

以上の結果から、放射線(電子線, ガンマ線とも)によるアメリカ腐蛆病殺菌は十分に可能であることが判明した。

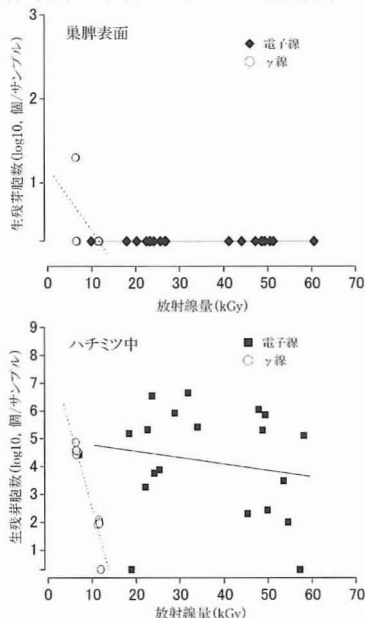


図9 照射線量とアメリカ腐蛆病菌の生存率との関係(上: 巣脾上, 下: ハチミツ中)

今後検討課題

- 輸送手段および輸送費+殺菌コスト
- 照射場所汚染防止のための巣箱洗浄程度と梱包形態（養蜂用治具用具を含む）
- 照射時期と処理量，納期対応

謝辞

本試験を実施するにあたり，次の皆様に格別なご指導ご支援をいただいた。紙面を借りて深甚なる謝意を表したい。和歌山県農林水産部農林水産総務課市川昌平副課長，熊谷眞課長補佐，和歌山市紀北家畜保健衛生所石井鉄朗所長，鈴木源一氏所長，中西健治防疫課長，阪本康敬病性鑑定課長，城本克彦次長，(株)養蜂研究所井上敦夫代表取締役，(財)畜産生物科学安全研究所中村晃研究員（役職は当時のもの：順不同）。

(高橋：〒105-0004 港区新橋5-10-5 日本照射サービス(株)，片岡：〒229-1132 相模原市橋本台3-7-11 (財)畜産生物科学安全研究所，上川：〒101-0062 千代田区神田駿河台1-2 馬事畜産会館内(社)日本養蜂はちみつ協会，西本：〒595-0074 泉大津市小津島町5-3 日本電子照射サービス(株)，大田垣：〒530-8270 大阪市北区中之島3-3-22 関西電力(株))

引用文献

- Gosselin, P. and R. Charbonneau. 1990. Radiat. Phys. Chem. 35:292-295.
- 吐山豊秋. 1997. 蜜蜂における薬理学的研究, 日薬理誌 1.110:000-000.
- Van Eaton, C. 2000. ミツバチ科学 21(2): 61-67.
- TOMIO TAKAHASHI¹, ATSUKO KATAOKA², MASATOSHI KAMIKAWA³, SUSUMU NISHIMOTO⁴ and FUMIO OTAGAKI⁵. Sporicidal activity of radiation on *Paenibacillus* larvae in beehives. *Honeybee Science* (2001) 22 (4) : 181-187. 1) Japan Irradiation Service Co.,Ltd, 5-10-5 Shimbashi, Minato-ku, Tokyo 105-0004, Japan, 2) Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology, 3-7-11 Hashimoto-dai, Sagami-hara, Kanagawa 229-1132, Japan, 3) The Japan Beekeeping Association, 1-2 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, 4) JISCO-EB Co., Ltd, 5-3, Ozujima-cho,

Izumiohtsu-city, Osaka, 595-0074, Japan, 5) The Kansai Electric Power Co., Inc., 3-22, Nakanoshima, 3-chome, Kita-ku. Osaka, 530-8270, Japan

Paenibacillus larvae is the causative agent of American foulbrood (AFB), which is a serious infectious disease on honeybees, *Apis mellifera* L.. It is difficult to eradicate the AFB because *P. larvae* forms spores which are considered to be resistant to all antibiotics and some disinfectants. Therefore burning of hives and bees infected with AFB is the only legal option to control the disease. As a prevention of AFB, the use of ethylene oxide (EtO) vapor for gaseous sterilization is popular. But the use of EtO is considered to be limited their application with reference to high toxicity to human. Recently mirosamicin (MRM), an antibiotic, has been approved for the prevention of AFB in Japan. MRM effects on vegetative rods of *P. larvae* in larvae and pupae, but spores are resistant to MRM. In this study, sporicidal activities of electron beam (EB) and gamma rays against spores of *P. larvae* in beehives were examined to develop a new application for prevention of AFB.

First, two hives without bees and honey were irradiated by EB to examine a distribution of its dose in each hive. One of the hives was irradiated on both its top and its bottom, and another hive was irradiated both on its sides. The former showed better penetration than the latter.

Secondly, a difference in susceptibility to EB among some isolates of *P. larvae* was examined. Four isolates of *P. larvae* were chosen, and each isolate was cultured to give a sporulation. Spores of the isolates were adhered to some pieces of filter paper and were irradiated. All isolates were killed by irradiation of approximately 5kGy EB.

Finally, sporicidal activities of EB and gamma rays against spores of *P. larvae* in beehives were examined. Some pieces of comb contaminated with spores and some tubes filled with honey contaminated with spores were set in some hives. Each hive was irradiated by EB or gamma rays. No spore on surface combs survived after irradiation of 15kGy EB or 5kGy gamma rays. And no spore in honey survived after irradiation of 10kGy gamma rays.