

## ミツバチアメリカ腐蛆病の試験管内感染実験

迫川 朋子・片岡 重明・片岡 敦子  
中島 千絵・吐山 豊秋

セイヨウミツバチ *Apis mellifera* L. を用いる養蜂家にとって、*Paenibacillus larvae* (旧名: *Bacillus larvae*) と名付けられた芽胞形成菌によって引き起こされるアメリカ腐蛆病は、従来多大な経済的損失をもたらしてきた。そのため、この病気の詳細を調べるために行った野外での巣箱を用いた感染実験に関して、多くの報告がなされている。しかしながら、それらの報告では、一部矛盾した結果を示している。その原因は、それらの研究者達が指摘しているように、働き蜂による巣房からの死んだ幼虫のすばやい除去(共食いによる)といわれている、Woodrow, 1942) や、蜂群の生理的状態の季節的変動や、実験中の人工的作業による蜂間の分業のハーモニーの破壊 (Kitaoka et al., 1959) 等であろうと推察される。言い換えれば、その様な環境下の実験で、再現性のある結果を得ることは難しいと考えられる。

一方、現在までに、一部の養蜂学者達が、ミツバチ幼虫の女王蜂への試験管内での育成方法の研究を進めてきた (Smith, 1959; Shuel et al., 1978; Rembold, 1981; 吉田ら, 1984)。この研究の第一段階は、試験管内での幼虫の育成であるが、生殖能力をもつ女王蜂の羽化を目的とするために、手技は複雑なものとなっている。

今回の実験では、*P. larvae* をミツバチの1日令幼虫に感染させる、試験管内でのアメリカ腐蛆病感染実験系の確立を試みた。そのため、今までの女王蜂への試験管内での育成方法をできるだけ簡素化することにより、感染実験の結果に再現性をもたせ、高い幼虫生存率を得るようにした。また、1日令の幼虫と、2日令や3日

令の幼虫のアメリカ腐蛆病に対する感染率を比べ、従来の知見と比較検討してみた。

### 方法

#### 供試ミツバチとその育成方法

今回の実験のミツバチ幼虫は、当研究所内の養蜂場で飼育している蜂群の働き蜂の幼虫を使用した。幼虫は、1回に40~100匹を使用前に巣箱から採取し、野外へのアメリカ腐蛆病の汚染を防ぐため、一次的に滅菌シャーレ内に入れた生ローヤルゼリー上に移した。

幼虫用の餌は、21% (wt/vol) 凍結乾燥ローヤルゼリーを混ぜた9% (wt/vol) ショ糖液とした。これは、生ローヤルゼリーを等張のショ糖液でおよそ1.5倍に希釈したことになる。

幼虫は5匹ずつ、幼虫用の餌0.6mlを入れた直径3cmの滅菌したミニシャーレ内に浮かした。シャーレはインキュベーターに入れ温度34°C、湿度98%に維持した。生存幼虫は、6日目まで24時間ごとに新しい餌に交換した。6日令以上の幼虫は、蛹化の始まりである脱糞を個体ごとに確認するため、個々に試験管に移し育成した。これらの作業は、無菌的に行った。

#### 供試菌株と感染方法

今回使用した *P. larvae* の株は、国内でアメリカ腐蛆病を発症した巣箱内の腐蛆から分離したものである。この分離株を、J-寒天培地を用いて、5%CO<sub>2</sub>、37°C下で14日間培養し、約80%の芽胞形成率を得て、芽胞を集め、約3×10<sup>7</sup> spore/mlの濃度になるよう生理食塩水で浮遊液を作り、-80°Cで使用時まで保存した。

感染のために、1日令の幼虫を4グループに

表1 ミツバチ 1日令幼虫のアメリカ腐蛆病試験管内感染

感染芽胞数 / 餌 1m	0	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
供試幼虫数	106	82	110	95
摂取芽胞数推定値 / 幼虫 1匹	0	0.13	1.3	13
4日令時生存数 (%)	86 (81)	36 (44) ***	35 (32) ***	17 (18) ***
7日令時生存数 (%)	71 (67)	35 (43) ***	18 (16) ***	2 (2) ***
脱糞数 (%)	51 (48)	23 (28) **	11 (10) ***	1 (1) ***
<i>P. larvae</i> 検出数 (%)	0 (0)	14 (17) ***	62 (56) ***	74 (78) ***
<i>P. larvae</i> 以外の菌の検出数 (%)	0 (0)	1 (1)	0 (0)	1 (1)
<i>P. larvae</i> 生菌数の幾何平均 / 匹	—	7.7x10 <sup>2</sup>	1.1x10 <sup>4</sup>	1.7x10 <sup>3</sup>
<i>P. larvae</i> 生菌数の範囲 / 匹	—	2.0x10 <sup>2</sup> ~6.0x10 <sup>3</sup>	1.0x10 <sup>2</sup> ~6.4x10 <sup>6</sup>	1.8x10 <sup>2</sup> ~4.7x10 <sup>6</sup>

0 (対照) グループと有意差有り (\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ )

分け、*P. larvae* の芽胞を混ぜた餌上に移し、24時間だけ感染させた。餌中の最終的な芽胞濃度は、それぞれ0 (対照)、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup> spores/ml となるように調製した。育成期間中に死んだ幼虫と、脱糞後殺処分した幼虫は、滅菌生理食塩水でホモジナイズし、段階10倍希釈を行った。各希釈液をJ-寒天培地で、5%CO<sub>2</sub>、37℃下で48時間以上培養し、*P. larvae* であることを同定し、幼虫1匹当たりの生菌数を算出した。また、*P. larvae* 以外の菌の汚染状況も調べた。

2日令の幼虫は5グループに分け、0 (対照)、10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup> spores/ml の芽胞濃度の餌で24時間感染させた。また、3日令の幼虫は2グループに分け、0 (対照)、10<sup>6</sup> spores/ml の芽胞濃度の餌で感染させ、1日令と同様に観察を行った。

### 統計解析

今回の実験の目的が感染実験系の確立であることから、結果に客観性をもたせるために、統計解析を行った。1日令幼虫の感染実験の各データは $\chi^2$ 検定を用いて、対照グループと比較した。2日令幼虫の感染実験の各データは $\chi^2$ 検定を用いて、1日令の同じ芽胞濃度の餌で感染させたグループのデータと比較した。

## 結果

### 1日令幼虫の感染実験

1日令幼虫の感染実験の結果を表1に示した。感染させた全てのグループで、幼虫の4日令時と7日令時の生存率と脱糞率が、対照グループと比べて低下し、*P. larvae* の検出率が増

加した ( $P < 0.01$ )。これらの変化の程度は、感染させた芽胞の数に依存した。育成期間中に死んだ幼虫内の*P. larvae* の生菌数は、同じグループ内でもバラツキが大きかったので、グループごとの生菌数の幾何平均は、感染させた芽胞数に依存する傾向を示さなかった。また、幼虫の死亡時期も、感染させた芽胞数に依存していなかった。ただし、試験管内で育成した幼虫は、野外で飼われている幼虫のほとんどが6日令で脱糞する (Crane, 1990; Morse, 1990) のに比べて遅く、多くは7日令に行われ、時折8日令に、希には11日令で観察された。

*P. larvae* 以外の細菌は、実験に使った393匹の幼虫のうち2匹から検出された。

### 2日令および3日令幼虫の感染実験

2日令幼虫の感染実験の結果は、表2にまとめられた。感染させた全てのグループで、幼虫の7日令時の生存率と脱糞率が、対照グループと比べて低下し、*P. larvae* の検出率が増加した。感染させた幼虫の多くが5日令時に死んだため、4日令時の生存率は、感染グループと対照グループで有意な差は認められなかった。

1日令幼虫への感染実験での感染させた芽胞数が同じグループ同志でデータを比較したところ、10<sup>3</sup> および 10<sup>4</sup> spores/ml 感染させたグループにおける7日令時の生存率と、10<sup>4</sup> spores/ml 感染させたグループの*P. larvae* の検出率は統計的に有意な差を示した ( $P < 0.05$ )。つまり、1日令の幼虫は2日令の幼虫より*P. larvae* に対する感染の感受性が高かった。また、*P. larvae* 以外の細菌は、実験に使用した314匹の幼虫のうち8匹から検出された。

表2 ミツバチ 2日令幼虫のアメリカ腐蛆病試験管内感染

感染芽胞数 / 餌 1ml	0	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
供試幼虫数	60	62	61	63	95
摂取芽胞数推定値 / 幼虫 1匹	0	0.36	3.6	36	360
4日令時生存数 (%)	52 (87)	48 (77)	52 (85)	38 (60)	57 (84)
7日令時生存数 (%)	48 (80)	32 (52)	19 (31) *	8 (13) *	7 (10)
脱糞数 (%)	19 (32)	15 (24)	11 (18) *	6 (10) *	4 (6)
<i>P. larvae</i> 検出数 (%)	0 (0)	5 (8)	30 (49)	34 (54) *	44 (65)
<i>P. larvae</i> 以外の菌の検出数 (%)	2 (3)	3 (5)	2 (3)	1 (2)	0 (0)
<i>P. larvae</i> 生菌数の幾何平均 / 匹	—	3.6x10 <sup>3</sup>	2.4x10 <sup>3</sup>	1.2x10 <sup>4</sup>	3.4x10 <sup>3</sup>
<i>P. larvae</i> 生菌数の範囲 / 匹	—	1.2x10 <sup>2</sup> ~4.6x10 <sup>5</sup>	1.2x10 <sup>2</sup> ~1.5x10 <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>2</sup> ~4.8x10 <sup>5</sup>	2.0x10 <sup>2</sup> ~6.8x10 <sup>4</sup>

1日令幼虫への感染実験で、感染させた芽胞数が同じグループと有意差有り (\* :  $P < 0.05$ )

3日令幼虫の感染実験の結果は表3にまとめた様に、対照グループより感染させたグループの方が7日令時の生存率は低かったが、感染させた幼虫からも全く *P. larvae* は検出されなかった。また、*P. larvae* 以外の細菌が、対照グループの幼虫の10%、感染させたグループの15%で検出された。

### まとめ

表1, 2に示したように、試験管内での感染実験によるアメリカ腐蛆病の発症は明らかである。育成条件において、野外と試験管内とではいくらか差はあるが、この疾病の研究のために、試験管内の感染実験は可能でと考えられた。

1日令の幼虫は2日令の幼虫より *P. larvae* に対する感染に対する感受性が高く、3日令の幼虫は *P. larvae* に対する感受性がなかった。これは、Bailey and Lee (1962) が、野外の巣箱の個々の巣房内のゼリー中に芽胞を注入させた方法で行った感染試験と、同様の結果となった。さらに、今回の感染実験では、感染率は餌中の芽胞数に依存していた。しかし、野外の感染実験においては、Woodrow (1942) や Hoage and Rothenbuhler (1966) は、死亡率や細菌の検出率は摂取させた芽胞数に依存した結果を報告しているが、Kitaoka et al. (1959) の報告では一部その傾向のないものだった。

今回の実験では、野外の巣脾から幼虫を採取

したので、*P. larvae* 以外の細菌による汚染もみられた。表1に示した様に、1日令の幼虫を使用した実験では、使用した幼虫の1%以下の汚染であり、巣脾から採取した幼虫の日令が進むに連れ、汚染率も増加した。したがって、1日令の幼虫を使えば、簡易的な無菌操作で、十分に汚染を最少限に抑えることができ、試験結果に影響を及ぼさないものと考えられた。

これまでの、個々の巣房内のゼリー中に芽胞を注入させる感染実験では、注入させた芽胞数が報告されている。今回の実験でも、1幼虫当たりが摂取した芽胞数を、それぞれの感染させたグループの餌中の芽胞の濃度と、育成開始後24時間の体重増加量の平均とから算出した(表1, 2)。その結果、10<sup>2</sup> spores/ml 感染させたグループの1幼虫当たりの摂取した芽胞数は、0.026個と非常に低かった。しかし、このグループの死んだ幼虫からの *P. larvae* の検出率は17%もあった。この原因は、蔗糖液を使って

表3 ミツバチ 3日令幼虫の腐蛆病試験管内感染

感染芽胞数 / 餌 1ml	0	10 <sup>6</sup>
供試幼虫数	40	40
摂取芽胞数推定値 / 幼虫 1匹	0	15000
4日令時生存数 (%)	39 (98)	39 (98)
7日令時生存数 (%)	38 (95)	26 (65)
脱糞数 (%)	28 (70)	18 (45)
<i>P. larvae</i> 検出数 (%)	0 (0)	0 (0)
<i>P. larvae</i> 以外の菌の検出数 (%)	4 (10)	6 (15)

行った浮遊法によると、幼虫 (1.00) および芽胞 (1.022) の両方の比重は餌 (1.1) の比重より低いため、餌中で幼虫および芽胞の両方が表面に浮いて、接触しやすい状態にあったためではないかと考えられた。

したがって、今回のデータは、試験管内でのミツバチ幼虫に対するアメリカ腐蛆病の感染実験は、今後、その病気の機序や予防および治療薬の効果等を調べたりする上で有用であることが示唆された。また、別の試験では、1日令の幼虫が成蜂に羽化するまで育成させる過程を含んだ実験も行っており、アメリカ腐蛆病に関する研究を進めていきたいと考えている。

### 謝辞

本研究は日本畜産振興事業団の助成によるものである。また、技術的な指導をして下さった玉川大学吉田忠晴先生に深く感謝いたします。

(〒229-1132 相模原市橋本台 3-7-11

財団法人 畜産生物科学安全研究所)

### 引用文献

- 東 量三. 1992. ミツバチ科学 13: 97-110.
- Bailey, L. and D. C. Lee. 1962. J. General Microbiol. 29: 711-717
- Crane, E. 1990. Bees and beekeeping. Heine-mann Nowned. p.62.
- Hoage, T. R. and Rothenbuhler WC. 1966. J. Econ. Entomol. 59: 42-45.
- Kitaoka, S., A. Yajima and R. Azuma. 1959. Nat. Inst. Anim. Health (Japan). Bulletin no. 37: 137-146.
- Morse, R. A. 1990. ABC and XYZ of bee culture. A. I. Root Co. p. 93 and p299.
- Rembold, H. and B. Lackner. 1981. J. Apic. Res. 20: 165-171.
- Shuel, R. W., S. E. Dixon and G. B. Kinoshita. 1978. J. Apic. Res. 17: 57-68.
- Smith, M. V. 1959. Cornell Univ. Agric. Exper. Stn. Mem. 356: 1-56.
- Weaver, N. 1974. J. Apic. Res. 13: 3-14.
- Woodrow, A. W. 1942. J. Econ. Entomol. 35: 892-895.
- 吉田忠晴, 佐々木正己, 大西隆男. 1984. 玉川大農研報 24: 43-52.
- SAKOGAWA, TOMOKO, SHIGEAKI KATAOKA, ATSUKO KATAOKA, CHIE NAKAJIMA and TOYOAKI HAYAMA. *In vitro* experimental infection of *Paenibacillus larvae*. *Honeybee Science* (1998) 19(4): 145-148. Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology, 3-7-11, Hashimoto-dai, Sagamihara, Kanagawa, 229-1132 Japan.

Day-old larvae of *Apis mellifera* in the field hives were transferred onto diluted royal jelly containing spores of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood (AFB), in a small culture dish, kept in an incubator and fed for 24 h. The larvae were transferred every day onto the fresh jelly without spore in a new dish until the beginning of the pupal stage. Mortalities of larvae by 4-day-old and 7-day-old and isolation rates of *P. larvae* in dead larvae increased in relation to the number of spores in the food. A lower susceptibility of 2-day-old than day-old larvae and no susceptibility of 3-day-old larvae to the infection were observed. The possibility of contamination by other bacteria than *P. larvae* seemed to increase with age when larvae were picked up from the combs. Using day-old larvae and the conventional aseptic procedures, *in vitro* experimental infection of AFB is possible.