

アメリカ腐蛆病の防除に有効な薬物

吐 山 豊 秋 (畜産生物科学安全研究所)

アメリカ腐蛆病 (American foulbrood) は蜜蜂の蜂児 (brood) の疾病で、原因菌の腐蛆病菌 *Paenibacillus larvae* (basonym: *Bacillus larvae*) が1~2日齢の幼虫に感染して死亡させ、さらに生き残った蛹を腐蛆に変える疾病で、法定伝染病に指定されている。重度の感染では蜂群が短い期間に全滅するので、多くの国では発生した場合蜂群と巣箱のすべてを焼却することを法的に規定している。

巣箱が病原菌に汚染されてから重度感染に至るまでに、かなりの時間がかかる。蜂群を汚染した病原菌の芽胞は小規模の感染を繰り返して巣箱の中で徐々に増殖し、拡散していく。ひとたび重度感染が起きると、巣箱内に数百の腐蛆が形成され、急速に蜂児の全滅へと進行する。汚染から重度感染までには、2~3年はかかると報告されている。

蜜蜂は冬になると活動を一時休止する。つまり、腐蛆病の発生過程には1~2回の越冬期を経過する。このために、越冬期に有効な消毒薬や防除薬を用いれば、重度感染の発生を予防し、または遅延させることが可能であると考えられている。

腐蛆病防除薬を検索する初期の研究では腐蛆病菌に対するMICの低い抗菌性薬を、野外で発生した腐蛆病に使用して有効性を調べたようであるが、1970年頃にオキシテトラサイクリンの有効性が報告されてからは、この薬物が世界的な汎用薬になっており、輸入品や国内産のハチミツにときに検出される抗生物質残留の原因になっている。

(財) 畜産生物科学安全研究所 (畜安研) では農畜産業振興事業団の助成を受けて、腐蛆病の防除

に有効な消毒薬や防除薬を探索する事業 (平成5~8年度) を実施した。この事業では、腐蛆病に対する防除効果が高く、しかも食品になるハチミツにはなるべく残留しない薬物とその使用法を探索することを目標として試験計画を立てた。

防除薬探索の試験計画

①日本国内で発生し、腐蛆病と診断された感染蜂群の腐蛆から菌分離を行ない、また分離菌を入手して、それらの菌株を同定をする。

② *P. larvae* に対するMICとMBCを調べる。

③蜂群に投与した薬物が、腐蛆病のターゲットである幼虫に有効濃度で分布する薬物を求める。

④巣箱内での腐蛆病の発症過程を細かく観察することは困難である。したがって、*in vitro* で蜂児を育成し、腐蛆病を発症させる試験系を開発すると便利である。

⑤この事業における試験では腐蛆病菌の環境への拡散を完全に防止することが求められた。したがって、蜂群を閉鎖系に閉じこめて腐蛆病に感染させる試験系の開発が必要である。

⑥腐蛆病菌の汚染形態から考えて、地上に散布のできる芽胞消毒薬が必要である。

⑦実用化の点では、動物用医薬品の飼料・飲水添加剤として、すでに承認されている薬物が便利である。

1. *P. larvae* の薬剤感受性

畜安研では農水省畜産局衛生課の助力を得て、国内に新たに発生した蜜蜂腐蛆病からの分離菌を

2 動物抗菌会報 (1998)

各県の家畜保健衛生所から送付していただいた。現在、収集数は47株に達している。Bergeyのマニュアルに従って同定試験を実施したところ、収集したすべての株が *Paenibacillus larvae* であった。

腐蛆病菌の薬剤感受性

収集された47株の *P. larvae* の薬剤感受性を調べた。使用した薬物は、次の条件を考慮して選択した。①動物用医薬品の飼料添加剤か飲水添加剤として承認されている抗菌性薬物。②主としてグラム陽性菌に働く薬物。主としてグラム陰性菌に働く薬物は代表薬だけを選択した。③膜透過性の貧弱な薬物(アミノ配糖体など)は除外した。

結果を表1に纏めた。ペニシリン系のアンピシ

リン、マクロライド系のミロサマイシン、リンコサミド系のリンコマイシンに低いMICが観察された。

低MIC抗菌性物質の殺菌性

47株の *P. larvae* に対するアンピシリン、ミロサマイシン、リンコマイシンの最小殺菌濃度を調べた結果を表2に示す。ミロサマイシンに強い殺菌作用が認められた。

P. larvae に対するミロサマイシンとアンピシリンの接触時間と致死率の関係を調べると、ミロサマイシンは2時間の接触で生菌数を数十分の一にする様な急速な致死効果を示した。この速さはアンピシリンよりかなり速い。一般にはマクロライド系抗生物質の殺菌速度はペニシリン系より遅

表1 *P. larvae* に対する抗菌性物質のMIC

抗菌性物質	MIC ($\mu\text{g/ml}$)										
	$\leq .013$.025	.05	.1	.2	.39	.78	1.56	3.13	6.25 \leq	
ペニシリン											
アンピシリン (ABPC)	11	30	5	1							
アモキシシリン (AMPC)			2	44	1						
テトラサイクリン											
オキシテトラサイクリン (OTC)				8	3	7	27	2			
クロルテトラサイクリン (CTC)			3	8	4	13	18	1			
ドキシサイクリン (DOXY)	1	11	4	30	1						
マクロライド											
エリスロマイシン (EM)			8	37	2						
ジョサマイシン (JM)				18	23	6					
スピラマイシン (SPM)					4	30	12	1			
ミロサマイシン (MRM)	4	17	26								
オレアンドマイシン (OL)					10	18	19				
クタサマイシン (LM)			2	14	20	11					
タイロシン (TS)			7	32	8						
酢酸イソ吉草酸タイロシン (AIV-TS)			2	5	20	20					
その他の抗生物質											
リンコマイシン (LCM)	8	10	26	3							
チアムリン (TML)				2	11	32	2				
ノボピオシン (NB)						1	5	38	3		
ホスホマイシン (FOM)											47
合成抗菌薬											
チアンフェニコール (TP)							1	3	28	14	
フロルフェニコール (FFC)					4	3	13	25	2		
エンロフロキサシン (ERFX)					13	16	18				
スルファジアジン (SDZ)								2	2	43	
トリメトプリム (TMP)					3	7	4	1	2	30	

注: SDZの濃度は表示の10倍

表2 ABPC, MRM, LCMの*P. larvae*に対するMBCs

Drug	MBCs ($\mu\text{g/ml}$)								
	<.20	.39	.78	1.6	3.1	6.3	13	25	50
ABPC			1	5	4	8	21	8	
MRM	11	9	3	8	11	5			
LCM					3	1	12	20	11

いと言われているが、この結果は逆になっている。但し、他のグラム陽性菌に対するミロサマイシンの殺菌とか、腐蛆病菌に対するエリスロマイシンの殺菌の速度はアンピシリンより遅い。

2. 蜜蜂と巣箱における薬剤動態

腐蛆病菌に対して感染感受性を持つ蜂児は孵化してから2日目までの幼虫で、この期間は育児蜂が分泌するゼリーしか摂取しない。そして菌の増殖が盛んになる4日齢以後の幼虫も花粉入りゼリーを給与される。したがって、幼虫への分布濃度を高くするにはゼリー中の薬物濃度を高くすれば良い。

蜂群への薬物投与では薬物を餌か蔗糖液に混ぜて成虫に摂取させるが、成虫の餌は花粉と少量のハチミツである。吸収の場である胃(中腸)内のpHは6程度であるので、中性付近で非解離型が多くなる物質であれば、吸収性が高いと予想できる。さらに、ゼリー腺から分泌されるゼリーは弱酸性であるから塩基性物質ならイオン捕捉によってゼリー中の濃度が高くなると推定できる。

つまり、中性のpHで非解離型の存在する分配係数の高い塩基性薬物を、蜜蜂成虫に経口摂取させれば幼虫への高い分布が期待できる。また、ゼリーや虫の体内における安定性が良いことも必要である。

この項の試験では、蜂群に薬物を投与した時、薬物がどの様に分布するかを調べた。

使用薬剤

MICの低い薬物から酸性物質のアンピシリンと塩基性物質のミロサマイシンを選択した。また食用青色1号(ブリリアントブルー)は四級アンモニウムであるから膜透過性がゼロ(非吸収性)

で、抗菌力も認められないので、物質の移動マーカーとして用いた。

分析法と検体内安定性

アンピシリンとミロサマイシンの分析には、検体をクリンアップして微生物定量法にかけける方法を用いた。感度はアンピシリンで10ppb, ミロサマイシンで10~50ppb(前処理の程度によって異なる)であった。

アンピシリンをハチミツに添加して安定性を調べると、1週間で50%程度が分解する。ローヤルゼリーに添加すると、1~数時間(試料によってばらつく)に50%が不活化された。従って、この試験結果ではアンピシリンの幼虫への移行性は低くなるのではないかと予想した。

ミロサマイシンはハチミツ中でも、ローヤルゼリー中でも安定であった。

薬剤の投与方法

蜂群に薬剤を投与方法を比較検討した。

蔗糖液添加:この方法では花蜜の代用になる蔗糖液に薬物を低濃度に溶解して大量に投与することができる。蔗糖液は蜜囊(食道膨大部)に貯められて吐き出されるので、薬物はハチミツ中に移行し、蜜蜂成虫・蜂児など巣箱内に広く分布させることができる。しかしハチミツ中の濃度が高くなるために、残留が長く続く可能性が高い。ブリリアントブルーを蔗糖液に添加して1日間投与した結果は以上の予測を裏付けていた。

ペースト添加(代用花粉飼料):この方法では市販の蜜蜂用飼料や花粉を薬物添加蔗糖液で練ってペーストを作成して平皿に入れ、巣脾の上に置く。ペーストは蜂が餌として摂取するために胃に送られて消化吸収される。従ってゼリーや幼虫に分布させる目的には最も合理的な投与方法である。また、この投与方法によってハチミツへの分布を低く抑えることができる。

ブリリアントブルーをペーストに添加して1日間投与して巣脾内の巣房と幼虫を調べた結果では、一部の巣房と幼虫だけに分布する。連続投与すると4日目にはほとんどの巣房と幼虫に分布する。従って、ペースト添加投与では4日以上連続投与が必要条件になる。

蔗糖粉末添加(dust dosing):粉砂糖や上白糖

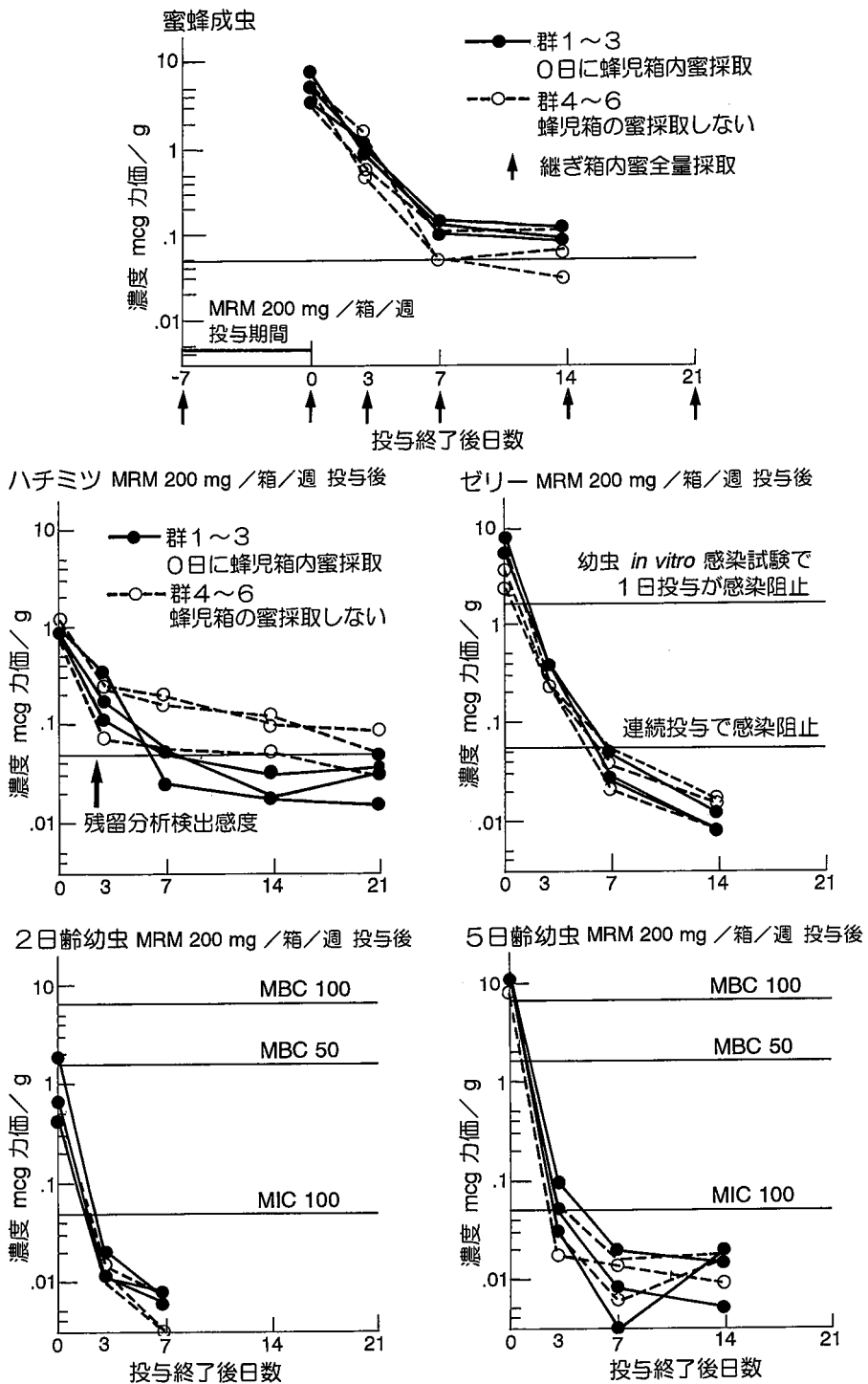


図 ミロサマイシン7日間連続投与後の巣箱内分布

に薬物粉末を混合し、巣脾の上に蒔くか平皿に入れて巣脾の上に置く。OTCの投与方法として用いられている投与方法である。

ブリリアントブルーの粉末を混合して1日間投与して巣脾内の巣房と幼虫を調べた結果では、一部の巣房と幼虫だけに分布した。

フライトルーム内に閉鎖された蜂群に蔗糖粉末を1日間投与し、翌日に床を調べたところ、投与した蔗糖の40～60%が床から回収された。蜂は投与された砂糖粉末の一部は摂取するようであるが、かなりの部分を異物として掃除の対象にするらしい。

また巣脾の上部に蒔いた粉砂糖が蜂に無視されたこともあった。

検体の採取

成蜂：蜂児箱から0, 3日, その後1週ごと。

ハチミツ：継ぎ箱内のミツの全量を絞り, その一部を検体とした。0日, 3日, その後1週ごと。

ローヤルゼリー：採材時点ごとに継ぎ箱から全量を採取した。0日, 3日, その後1週ごと。

2日齢・5日齢幼虫：蜂児箱から。0, 3日, その後1週ごとに必要数を採取した。

アンピシリンの単回投与試験

夏期の蜂群に対してアンピシリン100 mg/巣箱を蔗糖水またはペーストに添加して1日間投与し, 翌日から検体採取を開始した。

ゼリーと2日齢幼虫では0日の一部の検体に0.1 ppm以下のアンピシリンが検出されただけであった。アンピシリンは2日齢の幼虫に移行しないので腐蛆病の防除効果を期待することは困難であると思われた。

ミロサマイシンの連続投与試験

1日間投与の予備試験の結果から1週間の連続投与試験の計画を立てた。

夏期の6蜂群に対してミロサマイシン30 mg/巣箱/日をペーストに添加して蜂児箱巣脾の上に置いて7日間投与し, 翌日から検体採取を開始した。3群(A)については薬物投与終了。

時に蜂児箱巣脾のハチミツを軽く絞り, 他の3群(B)はそのままとした。

図に示した様にハチミツ中の濃度は低く, 特に蜂児箱のミツを絞った群では7日後に検出限界以

下の濃度になった。

ゼリーと幼虫への移行濃度はいずれも高かった。感染試験の結果で決めた実用最高用量はこの試験に用いた用量の半分であるが, 十分に有効性が確保できると考えられた。

3. 蜂児の *in vitro* 育成と腐蛆病感染試験

腐蛆病の巣箱内感染では腐蛆病菌の野外拡散を防止することが困難である。また巣箱内では感染した幼虫を内勤蜂が除去するために病勢の判定が難しい。特に腐蛆になった後に堅い鱗状(scale)になって巣房壁にへばりつくことがあり, 発見が難しくなる。(内勤蜂はこのscaleを房壁と共に採食して巣箱外に排泄する。欠けた房壁は新しく分泌した蠟で巣房を再構築するといわれている。)

巣内での感染感受性の高い1日齢の幼虫を試験管内で育成し, 腐蛆病菌を感染させ, 発症させることができれば感染進行過程の詳細を観察することができ, かつ薬物の有効性のスクリーニングにも用いることができる。このような目的で *in vitro* での蜂児育成を試みた。

玉川大学ミツバチ科学研究施設では女王蜂の室内育成法を開発中である。我々は, 同研究所の指導を受けてこの試験を開始したので, 用いた方法は玉川大学の方法に準じている。

in vitro 育成幼虫の腐蛆病菌感受性

当所で飼育しているセイヨウミツバチの正常群から, 1, 2, 3日齢の幼虫を採取した。1反復約10匹とし, 6日齢までは直径3 cmのシャーレ内で, 7日齢以後は個々の脱糞を確認できるように試験管内に移虫し, 恒温湿器内で飼育した。飼育中の温度は一貫して34°Cに維持し, 湿度は幼虫期は98%, 脱糞を確認した成熟幼虫を濾紙製の蛹化皿に移虫した後は82%に維持し, 蛹化後は76%に変えた。

幼虫飼育用飼料：市販の生ローヤルゼリーを凍結乾燥した粉末を21%, 蔗糖を9%含有するように水と混合した餌(pH 4.6)を用いた。幼虫は24時間ごとに新しいシャーレに移虫し, 餌を交換した。

in vitro で育成した幼虫の成長は巣房内より多

少とも遅く、脱糞は7, 8日目に観察された。

感染用餌: 腐蛆病菌の芽胞濃度を0 (蒸留水), 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 spore/mlとした菌液の0.3 mlと, 42%凍結乾燥ローヤルゼリーを含有する9%蔗糖液を等量混合した餌を1シャーレに用いた。

感染方法: 供試幼虫を感染用餌の上に24時間暴露した。24時間後からは通常の餌に変えた。幼虫あたりの接種芽胞数は1~3日齢幼虫の移虫後の1日体重増加の平均値を芽胞暴露中の摂餌量と見なして推定した(この期の幼虫は脱糞しない)。

観察項目: 毎日、幼虫の生死を確認し、死亡した幼虫に関しては110 mlの生食水でホモジナイズし、その10 mlをスライドに塗沫染色し鏡検して細菌の有無と菌量概略値を調べ、50 mlを適当に希釈してJ-寒天培地で菌数を数えた。また、コロニーの形状と性状から腐蛆病菌を同定した。脱糞確認後に生存する幼虫(蛹)は死亡例に準じて細菌学的に検索した。

試験結果

1日齢幼虫の*in vitro*感染試験結果を表3に示した。芽胞非接種の対照, 10^2 接種, 10^3 接種, 10^4 接種では, 7日齢幼虫の生存率, 脱糞の確認数(%)が菌量に依存して低下した。逆に, 死亡幼虫からの細菌の検出率, 腐蛆病菌の検出率は接種した菌量に依存して上昇した。特に, 10^3 接種および 10^4 接

種においては, 対照と比較検定して明かな有意差が認められた(Scheffé法では明らかな差だけが検出される)。

また1幼虫当たりの検出菌量は接種した菌量とは無関係であった。

10^2 接種や 10^3 接種では1幼虫当たりの摂取芽胞数推定値が非常に少ないにもかかわらず, 腐蛆病菌の検出率が中程度の値を示した。これは, 芽胞や幼虫が軽いので, 餌のローヤルゼリー中で芽胞および幼虫が浮いて, 幼虫にとって芽胞を摂取しやすい状態にあったことがうかがわれた。

(参考) 関連物質の比重(測定法:浮遊法)

腐蛆病菌芽胞の比重

乾燥芽胞 1.005 (蔗糖液1.04%に相当)

湿潤芽胞 1.022 (蔗糖液6.25%に相当)

ローヤルゼリーの比重 1.3~1.5

蛆・卵の比重 <1.0

ローヤルゼリー2倍希釈液 1.1

2~3日齢幼虫の*in vitro*感染試験

2日齢の幼虫を移虫し接種した結果, 非接種の対照, 10^2 接種, 10^3 接種, 10^4 接種では, 1日齢幼虫に接種した場合と同様に7日齢幼虫の生存率および脱糞の確認率が感染菌量に依存して低下し, 死亡幼虫からの腐蛆病菌の検出率は上昇した。しかし, 1日齢幼虫と2日齢幼虫の感染結果を統計的に比較してみると, 2日齢幼虫の腐蛆病菌に対する感受性は1日齢より有意に低かつ

表3 1日令幼虫の*in vitro*感染試験

感染菌株: <i>Paenibacillus larvae</i> GIFU-1				
感染方法: シャーレに芽胞液または蒸留水0.3ml+9%蔗糖42%乾燥王乳0.3ml, 1日暴露				
餌中芽胞濃度	0	10^2	10^3	10^4
推定芽胞摂取数/幼虫	0	0.13	1.3	13
反復回数	10	8	11	9
試供幼虫数	106	82	110	95
4日生存数 (%)	80/106 (75)	36/82 (44)	31/110 (28*)	17/95 (18*)
7日生存数 (%)	71/106 (68)	35/82 (43)	18/110 (16*)	2/95 (2*)
脱糞確認数 (%)	51/106 (40)	23/82 (28)	11/110 (10*)	1/95 (1*)
細菌検出数 (%)	0	15/82 (18)	62/110 (56*)	75/95 (79*)
腐蛆病菌検出数 (%)	0	14/82 (17)	62/110 (56*)	74/95 (78*)
菌数/幼虫 (中央値)	0	7.7×10^2	1.0×10^4	1.7×10^3

推定芽胞摂取数: 1日の体重増加量を摂餌量として算出。統計: 非母数データとしてKruskal-Wallis法で比較し, Scheffé法で対照群と各接種群を比較検定した。*: $p < 0.01$ で有意差。

た。3日齢の幼虫では 10^6 添加飼料で接種しても腐蛆病菌が検出された幼虫は認められなかった。

以上の結果から、*in vitro* に移植した幼虫に腐蛆病菌芽胞を感染させる試験系が可能である。また、感染感受性は1日齢が高く、2日齢が低い。3日齢ではほとんど感受性がない。

in vitro 感染とミロサマイシンの効果

前項の試験では蛹への変態までで試験を打ち切っていた。しかし腐蛆病発症過程を追求するためには蛹段階の育成も必要であるから、この項の試験では羽化まで追求した。我々の現段階の技術では脱糞までの育成率は70~90%、羽化までの生存率は40%程度である。

表4 *in vitro* 感染幼虫に対するミロサマイシン (MRM) 単回投与

1日齢幼虫に芽胞 2.5×10^4 /ml と MRM を添加したゼリーを1日間投与。翌日から正常ゼリー。使用菌株: *P. larvae*, 幼虫あたりの推定芽胞摂取量33

幼虫総数 (反復)	20 (2)	35 (4)	40 (4)	20 (4)	40 (4)	40 (4)	40 (4)
芽胞濃度	0	0	2.5×10^4	2.5×10^4	2.5×10^4	2.5×10^4	2.5×10^4
-----幼虫あたり推定芽胞摂取数=33-----							
MRM ppm	0	2.5	2.5	1.5	0.75	0.25	0
7日生存数 (%)	19 (96)	30 (85)	38 (95)	20 (100)	29 (73)	20 (50)	18 (45)
死亡数	1	5	2	0	11	20	22
感染数 (%)	0	0	0	0	7 (18)	16 (40)	17 (43)
菌数/幼虫					$>10^5$	$>10^5$	$>10^5$
脱糞確認数 (%)	19 (95)	30 (86)	38 (95)	20 (100)	29 (73)	20 (50)	18 (45)

推定芽胞摂取数: 1日の体重増加量を摂餌量として算出。

菌数/幼虫は蜂児あたりの菌数 (CFU) の幾何平均値

表5 *in vitro* 感染幼虫に対するミロサマイシン (MRM) 連続投与

1日齢幼虫に芽胞 2.5×10^4 /ml と MRM 添加ゼリーを1日間投与。翌日から MRM 添加ゼリー。

使用菌株: *P. larvae*, 幼虫あたりの推定摂取量33

幼虫総数 (反復)	30 (3)	30 (3)	20 (2)	50 (5)	60 (6)	81 (8)	70 (7)	20 (2)	20 (2)	70 (7)
芽胞濃度	0	2.5×10^4	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃	〃
-----幼虫あたり推定芽胞摂取数=33-----										
MRM ppb	500	500	250	125	62.5	30	15	7.25	2.75	0
7日生存数 (%)	25 (83)	25 (83)	16 (80)	47 (94)	49 (82)	63 (78)	49 (70)	5 (25)	4 (20)	12 (17)
死亡数	5	5	4	3	11	18	21	15	16	58
感染数 (%)	0	0	0	0	0	12 (15)	18 (26)	15 (75)	16 (80)	58 (83)
菌量/幼虫						$>10^5$	$>10^5$	$>10^5$	$>10^5$	$>10^5$
脱糞確認数 (%)	22 (73)	24 (80)	16 (80)	46 (92)	49 (82)	62 (77)	49 (70)	5 (25)	4 (20)	20 (29)
蛹感染数				1		4	6	3	1	6
感染蜂児数 (%)				1 (2)		17 (21)	24 (34)	18 (90)	17 (85)	64 (91)

推定芽胞摂取数: 1日の体重増加量を摂餌量として算出。幼虫あたり菌数 (CFU) は幾何平均値

予備試験の結果、この試験に使用した菌株で十分な感染率を得るためには、ゼリー中の芽胞濃度 2.5×10^4 spore/ml が適切であった。

ミロサマイシン単回投与試験

ローヤルゼリーに腐蛆病菌芽胞 2.5×10^4 spore/ml とミロサマイシンを添加してシャーレに入れ、1日齢幼虫を移虫して育成した。第2日目からは芽胞・薬物の無添加飼料を連日与えた。

試験結果を表4に纏めた。ゼリー中濃度が0.75 ppm 以上では感染抑制効果がみられ、1.5 ppm 以上では発症が認められなかった。このことは幼虫内で殺菌作用を発揮したことを意味する。

ミロサマイシン連続投与試験

ローヤルゼリーに腐蛆病菌芽胞 2.5×10^4 spore/ml とミロサマイシンを添加してシャーレに入れ、1日齢幼虫を移虫して育成した。第2日目からは薬物添加飼料を連日与えた。その他の方法は前項に準ずる。

試験結果を表5に纏めた。ゼリー中濃度 15 ppb 以上で発症予防効果を示し、60 ppb を越える濃度ではほぼ完全に発症を抑制した。125 ppb 群の一例に発症が認められたが、率にすると 60 ppb 以上の群の 1% 以下の範囲である。

4. フライトルーム内の腐蛆病感染試験

過去の腐蛆病感染試験

これまでに多くの研究者によって巣箱内感染試験が実施されている。そのすべてが屋内や中庭に置いた巣箱での試験であるが、外勤蜂は野外で活動できる様な条件での試験である。感染法としては、①砂糖水または人工飼料に腐蛆病菌芽胞を混ぜて与え、巣箱全体を汚染する方法か、②1～2日齢の幼虫の居る巣房に少量 ($1.5 \mu\text{l}$) の芽胞液を注入する方法を用いている。

畜安研における事業の試験では腐蛆病菌の環境への汚染を完全に防止することが求められた。このために除菌フィルター付き排気装置を装備した恒温動物室内にフライトルーム（網室）を置き、その内部に小型蜂群を閉じ込めて飼育する試験系を作成して感染試験に供した。また一試験が終了するごとに消毒業者に酸化エチレンによる飼育室

消毒を依頼した。但し消毒業者の使用濃度は3%で、完全滅菌はできない可能性があったので、グルタラール散布を併用した。

フライトルームの小型蜂群飼育

蜂の飼育室は 38 m^2 の広さで、前室と後室を付属させた。換気は all fresh 方式で、microbe proof フィルターを付けた排気装置を通じて排気させた。室内は 25°C 、湿度 70% に維持した。この飼育室に、 $2 \text{ m} \times 2 \text{ m} \times 2 \text{ m}$ のアルミ枠網室をフライトルームとして3室を置いた。

当研究所で飼育している蜂群や外部から購入した蜂群をフライトルーム内で飼育すると攻撃的になるために巣脾面の観察が困難であった。(株)アピから入手した蜂群は比較的温順な性格であったので、同社から5枚巣脾蜂群を購入して用いた。

既に蜂群が形成された小型の5枚巣脾巣箱をフライトルームに1個ずつ入れて、10週間にわたって蜂群を観察した。代用花蜜として蔗糖水を、飼料として花粉または蜜蜂用配合飼料をペーストとして与えた。

飼料摂取量、産卵率、育児数などの蜂群活性は3～5週目が最も活発であった。5週後は次第に活性が低下した。夏期、冬期、春期に3回の試験を実施したが、その成績は類似した。

結論として、このフライトルーム内の試験では5週間以内の試験に最も適しているが、観察項目を選択すれば10週間近くまで使用できる。

in situ 接種法とミロサマイシンの効果

過去に実施された腐蛆病感染試験では、蜂児箱の巣脾を抜き取って、育児圏の1日齢幼虫のいる巣房にマイクロピペットで少量の芽胞を注入する方法が用いられている。ここではこの方法を *in situ* 接種法と呼んでおく。

予備試験：3蜂群で感染の予備試験を実施した。各巣箱では4～6面の巣脾面で育児が進行していたので、巣脾面ごとに接種芽胞数を変えて適切な接種量を求めた。

接種後5週間の観察の結果を要約すると、①50 spores/cell 以上の接種ではその巣脾面での育児が停止する。②それ以下の接種量では1週後から若齢幼虫数が低下するが、3週後から回復してくる。③低接種群で死亡した幼虫からの腐蛆病菌検

出率は50%以下である。④腐蛆は接種14日以後に観察される。従って接種巣房の第2～3代目の幼虫であるらしい。⑤使用した蜂群の一つは育児が非常に不活発で弱々しかった。この蜂群では少数の芽胞の接種によっても育児を停止した。

この試験の結果から、①育児の活発な蜂群だけを使用すること、②接種芽胞量は20 spores/cell程度にすると良いと結論した。

本試験(第一回)：MRMはペーストに添加して

与え、摂餌量を測定して薬物摂取量を計算した。試験結果を表6-1に示した。無投薬群には多数の腐蛆が発生したが、投薬群には腐蛆病の発生を疑わせる兆候が認められなかった。

蜂児数は薬物投与群で2～3週目から減少した。この試験では蜂群をフライトルームに導入してから馴化を兼ねてペースト摂取量を調査し、薬物投与してから芽胞を接種しているため、表の第1週はルーム内への導入後の第4週目に相当す

表 6-1 フライトルーム内における腐蛆病菌 *in situ* 接種とミロサマイシンの効果 (第一回)

フライトルームに5巣脾蜂群を導入し、2週間で馴化・ペースト摂取量調査、3週目に投薬、4週目に菌接種。使用菌株：*P. larvae*、投薬最終日の翌日から連続3日間、1日齢幼虫の巣房に芽胞を混合した5%蔗糖水を1.5 μ l ずつ注入。

MRM 投薬量 ペースト添加8日間連続	無投薬群	29.3mg/箱/8日 平均3.7mg/箱/日	86.3mg/箱/8日 平均10.8mg/箱/日
接種芽胞数：20/幼虫	接種幼虫数 250 芽胞総数 5000	接種幼虫数 230 芽胞総数 4600	接種幼虫数 100 芽胞総数 2000
1週 卵数, 蜂児数	2019, 2247	2035, 5958	994, 234
腐蛆発見数	5	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(1) 1 (100)		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(1) 1 (100)		
2週 卵数, 蜂児数	2428, 3712	1637, 2874	1510, 708
腐蛆発見数	14	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(5) 5 (100)		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(5) 1 (20)		
3週 卵数, 蜂児数	1418, 3123	1798, 1297	1203, 2124
腐蛆発見数	19	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(0)		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(19) 4 (21)		
4週 卵数, 蜂児数	2196, 1693	1268, 498	840, 1080
腐蛆発見数	21	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(0)		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(7) 2 (29)		
5週 卵数, 蜂児数	1412, 1481	976, 173	938, 7341
腐蛆発見数	16	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(16) 12 (75)		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(16) 5 (31)		
6週 卵数, 蜂児数	842, 764	541, 132	697, 476
腐蛆発見数	8	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(8) 8 (100)		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(8) 4 (50)		
7週 卵数, 蜂児数	800, 209	646, 86	389, 260
腐蛆発見数	21	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(21) 16 (86)		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(21) 18 (85)		

MRM：ミロサマイシン、卵数：1～3日齢卵、蜂児数：幼虫数+蛹数、週1回の計測概数値、腐蛆発見数：週1回の観察日に発見された数、MT：ミルクテスト、菌：腐蛆病菌検出

表 6-2 フライトルーム内における腐蛆病菌 *in situ* 接種とミロサマイシンの効果 (第二回)

フライトルームに5巣脾蜂群を導入し、2週間で馴化・ペースト摂取量調査、3週目に投薬、4週目に菌接種。使用菌株：*P. larvae*、投薬最終日の翌日から連続3日間、1日齢幼虫の巣房に芽胞を混合した5%蔗糖水を1.5 μ l ずつ注入。

MRM 投薬量 ペースト添加7日間連続	無投薬群	13.7mg/箱/8日 平均1.7mg/箱/日	45.7mg/箱/8日 平均5.7mg/箱/日
接種芽胞数：20/幼虫	接種幼虫数 240 芽胞総数 4800	接種幼虫数 240 芽胞総数 4800	接種幼虫数 240 芽胞総数 4800
1週 卵数, 蜂児数	571, 2064	1554, 1318	553, 1019
腐蛆発見数	9	2	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(3) 1 (33)	(2) 2 (100)	
菌：(試供数) 陽性 (%)	(3) 0		
2週 卵数, 蜂児数	1020, 1891	2126, 1230	231, 426
腐蛆発見数	2	3	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(2) 1 (50)	(0)	
菌：(試供数) 陽性 (%)	(2) 1 (50)	(0)	
3週 卵数, 蜂児数	1434, 1818	1005, 1004	430, 331
腐蛆発見数	1	0	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(1) 0		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(1) 0		
4週 卵数, 蜂児数	432, 1211	703, 416	218, 53
腐蛆発見数	0	3	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(3) 0		
菌：(試供数) 陽性 (%)	(3) 0		
5週 卵数, 蜂児数	947, 613	1318, 547	158, 25
腐蛆発見数	6	3	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(6) 5 (83)	(3) 2 (67)	
菌：(試供数) 陽性 (%)	(6) 1 (17)	(3) 0	
6週 卵数, 蜂児数	-----		
腐蛆発見数	30	26	0
MT：(試供数) 陽性 (%)	(30) 17 (57)	(26) 5 (19)	
菌：(試供数) 陽性 (%)	(30) 5 (17)	(26) 0	

MRM：ミロサマイシン、卵数：1～3日齢卵、蜂児数：幼虫数+蛹数、週2回の計測概数値の平均、腐蛆発見数：週1回の観察日に発見された数、MT：ミルクテスト、菌：腐蛆病菌検出

る。したがって、蜂児数が減少する時期に入っているので判断が難しいが、ミロサマイシンが閉鎖系における蜂児数減少を促進している可能性も否定できない。野外で実施された薬物動態試験では大量投与群でも蜂児数減少の兆候は見られなかった。

本試験 (第二回)：第一回試験よりMRMの用量を下げて同一の試験を実施した。試験結果は表6-2に纏めた。

低用量群 (15 mg/巣箱/8日) に腐蛆が発生したが腐蛆病菌は検出されなかった。

前回試験を含めて目立った点は、肉眼的に腐蛆

と判定された蜂児 (蛹前幼虫か蛹) の多くが腐蛆病菌検出で陰性であったり、ミルクテストで陰性であった現象である。我々はこの現象を次のように考えている。

我々が始めた *in vitro* 腐蛆病の病理学的研究のこれまでの成績によると、腐蛆病は次のように進行するらしい。幼虫の胃に入った芽胞は胃腺分泌物に囲まれて増殖し、十分な菌量に達してから胃壁刷子縁に付着して病変を起こす。菌が体腔内に入ることはなく、脱糞の時に中腸上皮が中腸内内容と共に糞として排泄される。従って中腸上皮のすべてが失われて死亡した蛆に菌が存在しないこ

とがあり得ると考えられる。

今後の試験では糞に囲まれて残る糞の菌検出が必要で、その成績によって腐蛆成立の機構が分かると期待している。

結論：以上の試験では何れも5枚巣脾群を用いている。野外では通常10枚巣脾が用いられるので、実用用量は60～100 mg/巣箱/週程度が適当であると考えている。

5. 腐蛆病菌芽胞に対する消毒薬の効果

抗菌性薬は細菌の分裂時だけに働くので、静止状態の菌や芽胞には無効である。腐蛆病菌はほとんどの場合に芽胞として存在するので、その消毒や予防には芽胞に有効な消毒薬が必要である。

腐蛆病芽胞を大量に含む死亡幼虫、腐蛆や幼虫の糞は掃除蜂によって食べられ、巣箱外に脱糞の形で捨てられる。したがって、腐蛆病防除の消毒には巣箱と巣箱周辺の消毒のために水溶液を噴霧できる消毒薬が必要である。

芽胞消毒薬検査法

細菌芽胞に対する消毒薬の検査法には二つの方法がある。

湿潤芽胞法：芽胞形成菌の培養液を長期培養すると、ほとんどの菌が芽胞化するので芽胞液とする。消毒薬の希釈液に芽胞液を加え、一定の接触時間後に十分に希釈して細菌培養液に加えて生死を判定する。

乾燥芽胞法：芽胞液に小型の綿糸や陶器を入れて芽胞を吸着させる。芽胞を吸着したキャリアを十分に乾燥し、消毒薬の希釈液と一定時間接触させた後に培養液に移し、十分に振とうしてから培養し、生死を判定する。

我が国では主として湿潤芽胞法だけが用いられているが、国際的には乾燥芽胞法が主流になっている。この試験では両法を用いた。

使用薬剤

ハロゲン系：次亜塩素酸ナトリウム（通常5%液として販売され、5倍以上に希釈して用いる）、ポピドンヨード〔通常10%（有効塩素1%）液として販売され、5倍以上に希釈して用いる〕。

アルデヒド系：グルタラール（グルタルアルデヒド、通常25%液として販売され、10倍以上に希釈して用いる。）

ビグアナイド系：グルコン酸クロルヘキシジン、ポリヘキサメチレンビグアニド。

四級アンモニウム系：塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム。

ガス消毒薬：酸化エチレン

試験結果

ハロゲン系、グルタラール、酸化エチレンだけが殺芽胞作用を示した。

グルタラールの接触時間殺菌曲線を調べると、湿潤芽胞に対してより乾燥芽胞に対して強い作用がみられているが、後者での芽胞濃度が低いことも一因であったかもしれない。何れにせよ、この消毒薬は実用濃度で有効であり、必要接触時間が短めで、濃度依存性が明確であるので有効であると判断した。

酸化エチレンは10%、6時間で完全滅菌した。文献的にも完全滅菌には8%が必要と報告されている。しかし室内滅菌では3%が実用濃度になっているので、問題が残るようである。

ハロゲン系は高濃度だけで有効で、必要接触時間が長めであり、濃度依存性が乏しかったので有効性が低いと判断した。

ハロゲン系消毒薬は酸化作用によって作用するので有機物の影響を受けやすい。（有機物は漂白される。）

グルタラールや酸化エチレンはアルキル化によって作用するので、酸化剤より有機物の影響を受けにくいと考えられる。

後記と謝辞

この事業に参画した畜安研の職員は、中島千絵、岡山敦子、迫川朋子、片岡重明、中村 晃である。

また、東（東京農大）、吉田・中村（玉川大）、奥村・天野・田村（農林省試験機関）の、井上（養蜂ハチミツ協会）、鈴木（日本配合飼料）の各氏と農水省畜産局の防疫担当官、神奈川県北相家保の係官に本研究検討委員会の委員をお願いした。

ここに謝意を呈する。

Drugs for Control of American Foulbrood of Honeybees

Toyoaki HAYAMA

Research Institute of Animal Science for Biochemistry and Toxicology, Sagami-hara,
Kanagawa, 229-11, Japan

This review describes summary of a research project to seek the effective drugs for control of American Foulbrood of honeybees.

(1) Lowest minimum inhibitory concentrations to *Paenibacillus larvae* (basonym: *Bacillus larvae*), the causative agent of American Foulbrood (AFB), were found in ampicillin (ABPC) and mirosamycin (MRM), a macrolide antibiotic for animal use. A strong and fast bacteriocidal action of MRM was found.

(2) Young larvae, the target of AFB, are fed only jelly which is acidic so that basic and lipophilic drugs in feed of adult bees may be delivered to larvae. Actually, MRM, a lipophilic and basic drug, in paste, an pollen substitute feed for bees, caused a high distribution of the drug in larvae. ABPC was poorly delivered to larvae.

(3) Effectiveness of MRM to prevent AFB was confirmed in an experimental AFB infection system using *in vitro* raised larvae.

(4) Effectiveness of MRM to prevent AFB was also confirmed in an experimental AFB infection system using small hives kept in the closed flight rooms.

(5) Glutaral was found to be effective to kill the spores of *P. larvae* rapidly and in relatively low concentrations. The disinfectant may be usable for sanitation of the ground of apiary by spraying.

MRM as a preventive and glutaral as a disinfectant were the most promising drugs.

討 論 (座長: 東 量三, 東京農業大学)

質問 (佐藤静夫, 全農科飼研)

in vitro の殺菌作用と静菌作用が比較的近いマクロライドとしてマイコプラズマ・ガリセプチカムの試験ではタイロシンがあったと存じます。*P. larvae* についてはいかがでしょうか。

答 (吐山豊秋)

タイロシンの *P. larvae* に対する抗菌力はミロサマイシンより弱い。しかし、開発における候補薬物ではある。

質問 (東 量三, 東京農大)

アメリカで OTC が 6 週間前には禁止することが決められているが、日本で薬剤を使用する場合、いつ頃が使用適期と考えられるか。

答 (吐山豊秋)

非採蜜期に使用するとして、採蜜期開始まで 1~2 週間の休業ですむ用法を考えている。

質問 (弘中佳則, 日本養蜂蜂蜜協会)

ペースト添加投与は何種類かの方法を使用されたのでしょうか。

答 (吐山豊秋)

フライトルームにおける蜜蜂の群勢を長くしようと考えて、市販されている配合飼料(日配)、花粉、代用花粉を用いたが、どれでも同じ様な結果であった。

発言 (東 量三)

蜜蜂の腐蛆病は法的に「家畜伝染病」の一つとされており、罹患群は焼却処分を受ける。抗生物質などで原因菌の発芽増殖を抑えるという手段はあくまでも予防のためという大義名文は崩せないであろう。抗菌剤の使用が公に許される状況になっても、厳守すべき休業期間を無視したりすると、消費者は容赦しないであろうから、これは当面する課題ではないが、将来、より業者の側の自覚が求められ、その意味での関係者による薬品使用のあり方の啓蒙活動が重要となろう。