

136 腐 蛆 病 [法]

担当	検 査 チ ャ ー ト
家畜保健衛生所	<div style="text-align: center;"> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-bottom: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">(1) 疫学調査</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px;">(2) 臨床検査</div> </div> <div style="margin-left: 150px;"> ↓ <small>(乾燥腐蛆、 新鮮な死亡蜂児)</small> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 150px;">(3) 簡易細菌検査</div> <div style="margin-left: 100px;"> ↓ <small><直接鏡検></small> </div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 150px;">(4) ミルクテスト</div> </div>
病性鑑定施設	<div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 150px;">(5) 細菌培養試験</div> <div style="margin-left: 100px;"> ↓ <small><分離培養></small> </div> <div style="border: 1px dashed black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 150px;">(6) 細菌性状分析</div> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: 150px;">(7) P C R</div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> ↓ (+) </div> <div style="text-align: center;"> ↓ (-) </div> </div> </div>
判定・結果	<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> ↓ (+) </div> <div style="text-align: center;"> ↓ (-) </div> </div>
最終判定	臨床症状を呈する蜂群の腐蛆または蜂児を用いた病原体検出試験(細菌培養試験あるいはPCR)で判定が(+)となった場合は本病とする。
その他	PCR法の種類によっては、非特異増幅がみられる場合もある。特に、予想されるサイズと思われる増幅産物以外にも非特異増幅がみられた場合、細菌培養試験成績と併せて病原体検出の最終判定を行う必要がある。

○ 病原体:アメリカ腐蛆病 *Paenibacillus larvae*

ヨーロッパ腐蛆病 *Melissococcus plutonius*

(1) 疫学調査

- ① 近くで本病が発生
- ② 以前に同一農家もしくは同一蜂場で本病が発生
- ③ 新しく蜂群を導入
- ④ 出所不明の蜂蜜を給餌用として使用
- ⑤ 他蜂場と器具を共通に使用
- ⑥ 消毒していない古い巣箱、巣脾を使用

(2) 臨床検査

<アメリカ腐蛆病>

- ① 有蓋蜂児が死亡
- ② 特徴的な膠臭
- ③ 死亡蜂児は粘稠性を帯び2~3cmの糸を引き褐色~チョコレート~黒色へと変化
- ④ 死亡蜂児は巣房の下面に固着、乾燥(乾燥腐蛆(スケイル))
- ⑤ 巣脾の産卵圏が不規則で有蓋房の中に無蓋房が点在

<ヨーロッパ腐蛆病>

- ① 無蓋蜂児が死亡
- ② 発酵臭、酸臭
- ③ 死亡蜂児は粘稠性はなく、虫体内部は水様で透明~汚白色~灰褐色へと変化
- ④ 死亡蜂児は不定形で巣房の側壁または底部にみられる。

(3) 簡易細菌検査(直接鏡検)

<アメリカ腐蛆病>

乾燥した腐蛆(スケイル)を2.5%ニグロシンまたは墨汁で混和乾燥して鏡検するか、パイファー染色によって鏡検し、多数ある芽胞を確認する。

<ヨーロッパ腐蛆病>

新鮮な死亡蜂児をスライドガラス上で解体すると、チョークの粉様の中腸内容物を見ることができる。中腸内容物または死亡蜂児の乳剤をスライドガラス上に薄く塗抹後、グラム染色し、多数のグラム陽性紡錘形連鎖球菌を確認する。腐敗が進んだ蜂児に

は、様々な細菌が二次感染しているため、直接鏡検の材料には適さない。

(4) ミルクテスト

<アメリカ腐蛆病>

0.5%のスキムミルク液1~2mlに腐蛆(スケイル)1匹分を加え、静かに振盪した後10分~20分静置する。

P. larvae の出す蛋白分解酵素作用で、スキムミルク液は透明化する。なお、1%スキムミルク液を用い37℃に保温する方法でも構わない。ただし、*P. larvae* が存在していても、必ずしも陽性とはならないので注意

(5) 細菌培養試験(分離培養)

<アメリカ腐蛆病>

- ① 腐蛆を使用し、J寒天培地またはコロンビア血液寒天培地を用いて37℃で2~4日炭酸ガス(5%)培養をする。
- ② 半透明の円型(約1~3mm)集落を形成する。

<ヨーロッパ腐蛆病>

- ① Baileyの培地あるいはKSBHI培地を用いて腐蛆から分離培養を行う。35~37℃、5~20%CO₂条件下で、3~5日間嫌気培養をする。
- ② 白色の小集落を形成する。

(6) 細菌性状分析

<アメリカ腐蛆病>

P. larvae: カゼイン水解(+)、カタラーゼ(-または弱陽性)、ゼラチン(+)、澱粉水解(-)、糖からの酸生成: グルコース(+)、トレハロース(+)、アラビノース(-)、キシロース(-)

糖からの酸産生能は、J培地から寒天およびブドウ糖を除いたものを基礎培地として試験を行う。

<ヨーロッパ腐蛆病>

*M. plutonius*には世界各国でヨーロッパ腐蛆病症例から一般的に分離され、古くから知られる典型

的な性状を示す株(典型株)と、典型株とは性状が大きく異なる株(非典型株)が存在するが、PCRではどちらも陽性となる^{1), 6)}。

典型株: 紡錘形連鎖球菌、嫌気性ないし微好気性、グルコース(+)、フルクトース(+)、D マンノース(+)、L アラビノース(-)、D セロビオース(-)、サリシン(-)、エスクリンの加水分解(-)、βグルコシダーゼ(-)、Na/K比<1で発育(BHI寒天での発育(-)、KSBHI寒天での発育(+))

非典型株: 紡錘形連鎖球菌、嫌気ないし微好気条件を好むが、Na/K比<1の培地では好気条件でも発育可能、グルコース(+)、フルクトース(+)、D マンノース(+)、L アラビノース(+)、D セロビオース(+)、サリシン(+)、エスクリンの加水分解(+)、βグルコシダーゼ(+)、Na/K比に関係なく発育(BHI寒天での発育(+)、KSBHI寒天での発育(+))

糖からの酸産生能は、Baileyの培地からグルコースを除き、寒天濃度を0.2%にした培地を基礎培地として試験を行う。酸産生能の強さは株により差があるため、+と記載されている項目でも、きわめて弱い陽性しか示さない株も存在する。

(7) P C R

<アメリカ腐蛆病>

アメリカ腐蛆病菌 *P. larvae* の検出、同定は16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたPCR^{2), 3), 4)}が利用できる。死亡蜂児からも検査可能とされている^{2), 4)}。診断にあたっては各種検査成績と併せて判断する。

<ヨーロッパ腐蛆病>

ヨーロッパ腐蛆病菌 *M. plutonius* の検出、同定は16S rRNA 遺伝子をターゲットとしたPCR⁵⁾とNa⁺/H⁺ antiporter 遺伝子およびFur family transcriptional regulator 遺伝子をターゲットとしたDuplex PCR⁶⁾が利用できる。死亡蜂児から直接検出することもできる。診断にあたっては各種検査成績と併せて判断する。なお、Duplex PCRでは、典型株と非典型株を識別することができる。

その他:

(分離培地)

① J培地の組成

トリプトン	0.5g
酵母エキス	1.5g
リン酸水素二カリウム(K ₂ HPO ₄)	0.3g
ブドウ糖	*
寒天	1.5g
蒸留水	100ml
pH 7.3~7.5	

* 滅菌後無菌的に0.2%になるように加える。

② Bailey培地の組成

酵母エキス	1g
ブドウ糖	1g
可溶性澱粉	1g
寒天	1.5g
リン酸二水素カリウム(KH ₂ PO ₄)	1.36g
蒸留水	100ml
5M KOHでpH 6.6に調整	

115℃、10分、高圧滅菌

③ KSBHI培地

BHI培地	3.7g
リン酸二水素カリウム(KH ₂ PO ₄)	2.04g
可溶性澱粉	1g
寒天	1.5g
蒸留水	100ml

(参考文献)

- ・(社)日本養蜂はちみつ協会: ミツバチの飼養管理とその衛生対策. (1992).
- ・(社)日本養蜂はちみつ協会: みつばちの疾病とその予防衛生対策. (2001).
- 1) Arai, R. et al.: PLoS One. 7, e33708 (2012).
- 2) 小林弘明: 日獣会誌 58, 461-465 (2005).
- 3) Govan, V.A., et al.: Appl. Environ. Microbiol. 65, 2243-2245 (1999).
- 4) Dobbelaere, W., et al.: Apidologie. 32, 363-370 (2001).
- 5) Govan, V.A., et al.: Appl. Environ. Microbiol. 64, 1983-1985 (1998).
- 6) Arai, R. et al.: J. Vet. Med. Sci. 76, 491-498 (2014).