

蜜蜂のチョーク病に関する研究

馬 淵 貞 三

2000

# 蜜蜂のチョーク病に関する研究

馬淵 貞三

2000

# 目 次

I	緒 言	1
II	材料と方法	9
1	蜜蜂のチョーク病自然発生例の検索法	
1)	発生調査	9
2)	病理組織学的検査	9
3)	病原学的検査	9
2	<u>Ascosphaera apis</u> の分離検査法	
1)	蜂 児	10
2)	蜂 蜜	10
3)	花 粉	10
3	<u>Ascosphaera apis</u> の病原性検査法	
1)	病像の出現検索	10
2)	接種真菌の回収試験法	11
4	<u>Ascosphaera apis</u> に対する抗菌剤の <u>in vitro</u> 殺菌効果試験法	
1)	消毒剤	11
2)	防黴剤	11
3)	殺菌性ガス	12
5	チョーク病の防除試験法	
1)	<u>Ascosphaera apis</u> 感染巣脾における薬剤の 防除効果試験法	12
(1)	消毒剤	12
(2)	防黴剤	12
(3)	殺菌性ガス	13
2)	自然発生チョーク病罹患巣脾における薬剤の 防除効果と残留試験法	13



(1)	消毒剤	13
(2)	殺菌性ガス	13
(3)	残留性試験法	14

### Ⅲ 成 績

#### 1 蜜蜂チョーク病の自然発生例について

1)	発生状況	15
2)	病理組織学的所見	17
3)	病原学的所見	17

#### 2 Ascosphaera apis の分布状況

1)	蜂児	19
2)	蜂蜜	19
3)	花粉	19

#### 3 Ascosphaera apis の病原性

1)	病像の出現率	20
2)	接種真菌の回収率	20

#### 4 Ascosphaera apis に対する抗菌剤の in vitro 殺菌効果

1)	消毒剤	21
2)	防黴剤	21
3)	殺菌性ガス	21

#### 5 チョーク病の防除法

##### 1.) Ascosphaera apis 感染巣脾における薬剤の 殺菌効果

(1)	消毒剤(逆性石鹼)	22
(2)	防黴剤(プロピオン酸ナトリウム)	22
(3)	殺菌性ガス(エチレンオキサイドガス)	22

##### 2) 自然発生チョーク病罹患巣脾における薬剤の

防除効果と残留性	22
----------	----



( 1 )	消毒剤	2 3
( 2 )	殺菌性ガス	2 3
( 3 )	薬剤の残留性	2 3
IV	考察	2 5
V	総括と結論	3 6
VI	謝辞	4 1
VII	参考文献	4 2
VIII	英文抄録	5 7

付図： Fig. 1～24

付表： Table 1～15

## I 緒 言

蜜蜂のチョーク病 chalk (brood) disease はチョークブルード chalkbrood と呼ばれ、蜜蜂の蜂児（幼虫・蛹）が Ascosphaera apis（Ascomycota 子囊菌門，不整子囊菌類 plectomycetes, Ascosphaera 科の菌糸型真菌）によっておこす感染症であって死亡幼虫の白墨状ミイラ化が特徴とされている。養蜂上では特に Apis mellifera セイヨウミツバチの幼虫感染が重要である。

この蜂児の白色ミイラ化する疾病は、1913年ドイツの Maassen [100] により” Kalk Brut [白墨病] ”として最初に報告され、1916年に本症の原因真菌は Pericystis apis と命名された [101]。Claussen [43] はカビ着生蜂巣に由来する真菌の生活史について詳細に検討し、多核性の生殖器官は造精器が受精管を造卵器に伸長して受精し、この受精造卵器を synascus と呼称した。この造精器と造卵器による有性生殖が確認されたことから本真菌が子囊菌門の菌種 Pericystis apis と提唱されたことに支持を与えた。

英国の Betts [34] は蜂巣の真菌の Pericystis alvei を調査し、1919年 Chalkbrood の真菌をさらに検査した結果、Pericystis alvei ではなかったと報告した。その後、Pericystis apis に対する詳細な真菌学的観察が実施され、フランスでは Varitchak が [147, 148]，スイスで Maurizio が1934年，1935年，オーストリアで Prokschl [124] が1953年に報告した。Maurizio [110, 111] は Pericystis apis の孢子球に大型と小型があり両者はお互いに交配しないとし、Prokschl もこの2型を研究し、大型のものを異種類とする可能性を認めたが結局同一種類の2変種とした。

アメリカの Spltoir と Olive [137] は本真菌について再検討を試み、孢子球中の孢子は発芽して雌性あるいは雄性の菌糸となり、両菌糸間には Claussen [43] の指摘するような形態学的重要な形態学的な差異は認められず、両者を対にして培養すると、雌菌糸よりは造精器系を生ずるが、雄菌糸は何らの器官も造らなかったとし、本真菌を Ascosphaera apis（以下 A. apis）と命名した。Skou [135] は Ascosphaera 属をさらに研究し、大型種を A. major と独立させ、小型種は従来のも A. apis のまま継続することにし、Thorstensen [144] もこの菌種を顕微鏡学的に研究している。

現在では、世界各地でチョーク病の散発が見られ、その対応策について研

究されつつある [72, 81, 94, 95, 96]。さらに飼養改善, ハイブリッド等による抗病性の研究, 女王蜂の選択, 抗菌製剤の開発, 抗真菌剤の合成, 他疾病との合併症対策等も検討されつつあるが, 決め手となる防除法はなかなか見つからないのが現状である [128, 130, 140]。

わが国では宇田川ら [145] がカナダ産の輸入蜂蜜および秋田県産の蜂蜜から, また山崎 [153] が蜂蜜中の菌類分布について調査した際, 鳥取県および秋田県下で採取した蜂蜜の中から, それぞれ *A. apis* を分離した報告があるが, 蜜蜂のチョーク病の発生報告はなかった。

この他, 蜜蜂の感染症としては, アメリカ腐疽病 [14, 20, 30, 74, 75, 76, 121, 122], ヨーロッパ腐疽病 [19, 152], サックブルード [26, 27, 29], ノゼマ病 [15, 16, 17, 82, 132], アカリン病 [18], ウイルス性やその他の麻痺病 [4, 21, 22, 23, 28, 88], ミツバチヘギイタダニ [71, 84, 93], 下痢やその他の感染症 [2, 36, 46, 64, 92, 100, 101, 123] などの報告もある。また, 農薬や花粉中毒などが報告されている。これらに対する防除策についても検討されているが, 毎年必ずどこかで発生がみられ養蜂家を悩ましている。中でも腐疽病は伝染力が強く, わが国では家畜伝染病予防法 [121] により法定伝染病に指定され, 陽性群はすべて焼却処分されているが, アメリカ合衆国 [42, 64] では各種のガスや抗生物質の応用や抗病品種の交配による強力蜂群の作出がなされている。

渡辺&渡辺 [149] の記載によれば, 蜜蜂と人間とのかかわりは古く, 蜜蜂は2千万年~1千万年前から社会性蜂類として登場し蜂蜜の生産が始まった。

人類の登場はその数百万年後であって, この時期から蜂蜜を食用に供してきたもののようである。現代における養蜂が趣味の段階から養蜂業として独立専門化できたのは, 1853年 Lorendo L. Langstroth が養蜂の基礎となる巣箱を作製し, この巣箱と養蜂業について発表したことによるものであり, 近代養蜂の始まりといっても過言ではない。現在では世界各地で大規模な養蜂が実施されているが, これには彼の卓越した観察力, 洞察力, 器具機材の発明の寄与するところが大きい。今日でも巣箱に彼の名前が残っていることからそれが窺える。

ここで養蜂の発達史について若干振り返って確認しておきたい。蜜蜂はA



rthropoda 属節足動物門, Insecta 昆虫類, Apocrita 細腰類, Apis ミツバチ属に分類される有針類で3種群に大別される。すなわち, ヨーロッパ種群; A. mellifera など, アジア種群; A. cerana, A. florea, A. dorsata など, アフリカ種群; A. fasciata などが代表的である。

蜂の種類 [1, 35, 38, 41, 55, 69, 149] は約10万種あるといわれており, その中で高度な社会生活を営む蜜蜂は蜂の中で最高の進化の段階である。

蜜蜂には大きく分けて3種あり, インド, 中国, 日本, 朝鮮, シベリア等東南アジアに広く分布している東洋種 Apis indica(cerana) が第①で穏和で勤勉な性格が特徴で小柄であり, 第②には北はエジプトから南はケープタウンまでに分布しているアフリカ種でエジプト蜂 Apis fasciata とアフリカ大陸蜂 Apis adanson 等の亜種があるがいずれも凶暴性で分封性も激しく集蜜力も少なく実利的には余りかえりみられない種類である。第③には北はスカンジナビア半島から南はイタリア半島に至るヨーロッパ種 Apis mellifera で, これにはイタリアン Italian, カーニオラン Carniolan, コーカシアン Caucasian, 欧州黒蜂 European darkbees の4亜種があり, その他色々な蜂群が研究, 報告されている [55, 70, 77, 85, 89, 90, 98, 108]。また, 刺さない蜜蜂 [97] の研究, 調査がインドでされたが採蜜量も少なく経済性が無いとしている。アフリカでは Apis mellifera の亜種である Andansonii of Apis mellifera が大部分で1956年にはブラジルへ導入され, 現在も南アメリカの半数を占めている。

アジアではヨーロッパ種とはやや異なり, インドでよく知られていた Apis indica で蜂そのものもやや小さく, 巣房や巣脾も小さいのが特徴であった。 Apis cerana の数種の中からは北進し東方アジア, さらに日本やロシア(ソ連)にまでも広がった。各地域においてヨーロッパ種は在来種の蜂群を打ち負かし, 取って変わるのが多く, 増殖力が強くそのため, 中国や日本でもヨーロッパ種が主流を占める様になってきたが, 明治時代には飼いにくい日本の蜂を改良するために種蜂を外国から輸入されたこともこれに拍車をかけた [70, 77, 85, 87, 89, 90, 91, 92, 97]。 現在では Apis cerana と Apis indica は多くの学者たちの研究により同族 (synonymous) とされている。

この蜜蜂は「蜂蜜」を生産することから家畜（飼育動物）の一つに挙げられ、現在では欧米主要国をはじめスペイン [10]，モロッコ [70]，ギリシア [55]，トルコ共和国 [35]，インド [49]，台湾 [84]，ブラジル [90]，ボリビア [89] など北極や南極を除く世界各地で飼養され滋養強壮に供与されている。また，異常気象により十分な農作物の確保ができなかった凶作時には蜂蜜が救命食物となったことも事実である。

蜜蜂の最初の記録は [149]，7,000 B.C. の東スペインにおける洞窟の壁に自然蜂巢から採蜜を描写したものである。当時の原始時代には蜂の巣のある木を斧で切り取ってそのまま置いたり，巣別れした蜂が水瓶の中に巣造りしたものをそのまま利用していた。養蜂が開始されたのは，森林地帯ではなく暑い乾燥地帯の中東で瓶を横にしてその中で飼養していた (5,000 B.C.)。その後，底に蓋を付けて蜂蜜を採り易くした陶器製のものやエジプトでは藁を編んで籠を作り，これを伏せて飼養する方法も考案されている (3,000~2,000 B.C.)。

ヨーロッパでも巣箱（巣ビン）の機能性が検討されはじめ，蜂を風，雨，暑さ，寒さから守るため，材料として木，木の樹皮，粘土が使われはじめ，さらに泥や牛の糞を混ぜて漆喰で塗り固める方法も考案された。風雨を防ぐための屋根などもつくられた。

蜜を採る時には蜂群を熱湯にいれて蜂を殺してからが一般的であった。蜂を扱う時に刺されることが大変問題であったが，エジプトで蜂が煙りやスモークを嫌う事がわかり，これの応用で毎日の管理は大変楽になった。現在でも，エジプトの神殿などの壁画に，蜂を追い出すために巣の入った水ガメに煙りを吹きかけているところや，蜂蜜を瓶にいれ封印している場面 [6] などが残されている。エジプトのピラミッドから発掘されたもので，2,000年の歳月を経ても，変化がなかったものは蜂蜜と蜂蜜に漬けられていたミイラだけであったとされている [149]。

中世には，蜂を扱う人のために防護服，ネット，帽子が作られ，蜂を殺すためには硫黄ガスの薫蒸が日常的に使われる様になった。しかしながら，当時は採蜜量も少なく，すべての人が蜂蜜を食することはできなく王様や上流の階級の人にかぎられていた。欧米の教会では蜂蜜よりもロウソクをつくる

ための蜜蝋を得るために養蜂が推奨された。現在でもヨーロッパでは養蜂自体が国家の保護下にあり、ドイツ、オランダ、ベルギー等では栃の木や菩提樹等の蜜源樹が植えられている。

蜜蜂の基礎的な研究がされたのは1,500から1,851 A.Dで女王蜂が発見され子育成や蜜を集め、働蜂や雄蜂が各々仕事を分担し、各コロニーが一定の理想的な社会生活をしているのがわかった。[5,6,7,10,11,35,68,113,120,139,149,151] また、女王蜂が不慮の事故で不在となった場合、雌である働蜂が産卵し、新女王蜂をつくることは後に判明した。つまり、女王蜂が雌で卵巣があり、産卵者であり、働蜂も雌で女王が不在になった様な緊急事態時には産卵することなどが判明したのは17世紀であった[54]。

雄蜂が交配の時のみ重要で、普段には分担された仕事が無いと判明したのもあとになってからであった[83,126,139,150]。

蜜蜂は社会性昆虫でその個体単独では生活できない。1匹の女王蜂を中心に何万という蜜蜂が群をなし1つのグループとして活動し生活していることも判った。女王蜂、働蜂、雄蜂の3つの異なる蜜蜂がいて、それぞれが分担して、産卵、育児、集蜜、子孫の繁栄のための交尾を行っているのが判った。また、女王蜂がフェロモンという1種のホルモンを放出し、これにより他の蜜蜂を統率していることが後に判明した。

蜂を殺さないで蜜を採る様々な方法が研究され、巣箱が作られた。そして、蜂が巣を作り安いように巣箱の中には数枚の巣脾(Comb)が入れられる様になつた。[3,35]つまり、巣箱(Langstroth式)には巣脾が9から10枚はいり、各巣脾の下部は女王幼虫用巣房、中央部は蜂児領域、その上部は花粉領域、さらにその上部が蜜領域である。

蜜領域の蜂蜜は昼間、働蜂が集めたものは糖濃度が低い夜に濃縮され蜜蓋をして貯蔵される。集蜜する時には蜜蓋を蜜刀で切り、分離器で遠心したものを通して、良質な蜂蜜となる。

我が国で蜜蜂が採蜜用に飼養されたのは、延喜3年(903)である[126,127]。しかしながら、当時の飼養蜂群[149]はいわゆる東洋種であった。現在のような近代養蜂は明治10年(1911)に西洋種(ゴールデン イタリア種)の輸入開始されたことから盛んになった。昭和年代では10~15年が最盛期で飼



養戸数は52,000戸，飼養蜂群数は211,000群と報告されている。その後，1945年には11万群数と半減し，1953年には23,000戸，飼養群数は14万群まで減少した。1997年当初における蜜蜂飼養者数は6,261戸，蜂群は199,846群と農林水産省の会議資料に記載されている。これは1980年前後に11,000戸，32万群であった盛期から除々にさらに減少している状況である。

蜂蜜の生産量は年産3,138トンであり，蜂蜜の年間消費量は44,622トンであり，その90%以上が海外からの輸入ものである。国産蜂蜜はレンゲが一番人気が高いが，最近九州地方でのアルファルファタコゾウムシという甲虫がレンゲに被害をもたらし，さらにレンゲ蜜の生産量が減少し生産量の確保が難しい現況にある。花はどの地域においても一度に開花することではなく，桜の開花前線が月によって移動するように，花の流蜜期においても時間的なズレが生じる。このためこれを利用した蜜蜂の飼養方法が考案され実施されている。

当時においては最近のように花を求めて九州から北海道まで県外を移動するのを大転飼（現在は転飼），同一県内のみで標高差を利用して花を追いかける転飼する養蜂家を小転飼，定飼（現在も定飼）はその名のとおりに移動はせず，自宅の庭先等で1年中飼養するもの3種の飼養形態別分類をしていた。

日本の養蜂は明治10年にアメリカから西洋蜜蜂が輸入されてから，従来の日本蜜蜂に取って変わり，西洋蜜蜂普及時代（種蜂熱時代）[45, 48, 87, 126, 127]，蜂群輸出時代（対中国輸出），砂糖不足時期の蜂蜜黄金時代，ローヤルゼリーブーム，自然食品（健康食品）及びポリネーションブーム[8, 32, 78, 106, 107, 109, 129, 146]，といくつかの好況時代を経過してきているが，その間には多くの関係者のたゆまない努力があった。

なかでも花粉交配利用いわゆるポリネーションはアメリカやヨーロッパでは牧草や各種の観賞花の受粉（送粉）のために古くから[8, 32, 109]行なわれていたが，わが国でも苺やキュウリ等で受粉の効果が認識されはじめ，今ではビニールハウスでトマト等野菜等を栽培する農家でも多く使用されるようになってきた。さらにその効果があるといわれるマルハナバチの応用までも考え，外国から輸入したという報告も最近多くなってきたが，従来の西洋ミツバチと同様管理には十分留意することが大切である[105, 106, 107, 109,

126,127]。また、輸入したマルハナバチが日本の在来種と交配し日本の生態系を変えろという危惧から、純国産のマルハナバチを使用する方向に現在はいくつかある。

さらには、最近、国立予防衛生研究所の松野ウイルス研究室長ら[104]が「プロポリスに含まれる殺癌細胞物質の単離・精製」について1991年の日本癌学会で発表され、さらに1992年には同学会で「プロポリスの抗腫瘍作用」が発表されマスコミ等で大きく取り上げられた。もともと、プロポリス（蜜蜂が樹液を吸い唾液と混ぜ合わせて作ったヤニ）が殺ガン作用があるという結果は外国では認められ薬品として認可されているところもある。

しかしながら、近年[127]、わが国における蜂蜜の消費量は輸入自由化後の20年間で約4倍増加し、平成2年度には約7.5万トンとなってきた。その中で国産蜂蜜は10%以下で、殆どが諸外国の輸入蜂蜜に依存しており、世界各地での蜂病予防のために使用される動物用医薬品の使用状況も完全掌握は不可能で、オキシテトラサイクリンをはじめ各種の抗菌剤が厚生省のモニタリング調査で検出されており、新たな問題となりつつあり、吐山ら[74,75,76]により腐蝕病に効果が高く、蜂蜜への残留性の少ない薬剤として、ミロサマイシンが著効であったとしている。

国内蜜源については平地においては4～6月には、なたね、れんげ、みかんが多く、北海道では5月から、クローバー、なたね、にせあかしあ、とちのき、しなのきなどが多く、はぎ、そばなどが続き、長い採蜜期間となることから、現在も転飼が多くされている。

蜜蜂のチョーク病に関して、わが国における発生実態及び病性経過所見等の掌握は必ずしも十分とはいえない状態にあるが、本病は1997（平成9）年の「家畜伝染病予防法の改正」で新たに「届出伝染病」に追加指定されるに至った。蜂蜜の需要増加と相まって輸入品の増加並びに検疫業務の必要性から本病の研究が望まれていた。

著者は、家畜衛生の業務遂行上において本病の自然発生例に遭遇し、本病防遏のための衛生指針を策定する上で必要となる基礎的事項について研究する機会を得た。

本論文は蜜蜂のチョーク病に関して次の5項目：1）本病の自然発生例所

見, 2) A. apis の分布状況, 3) 分離 A. apis の病原性, 4) A. apis に対する抗菌剤の in vitro 殺菌効果, 5) 本病の野外防除法について研究・検討したものであり, ここにその概要を報告する。



## II 材料と方法

### 1 蜜蜂のチョーク病自然発生例の検索法

#### 1) 発生調査

1979年3月鹿児島県から岐阜県岐阜市内へ転飼してきた1養蜂家の100群中の3群にミイラ化した蜂児が多数認められた。これらは、いままで経験したアメリカ腐疽病やヨーロッパ腐疽病とは異なっていたことから近隣の養蜂家を緊急巡回し同様な症状を確認した8戸の養蜂家の蜂群合計773群を調査材料とした。更に岐阜県は養蜂の発祥の地とも言われ、養蜂の歴史のある本県で多くの専業養蜂家や蜂蜜加工業者が多いことから県下の発生状況を迅速的確に確認するため、県内の231戸(8,064群)の養蜂家にアンケート調査を返信用切手を添付して実施した。

アンケートの調査内容は住所氏名、蜂群の異常の発生日、転飼か定飼か、前蜂場、ポリネーションの有無、王乳(ローヤルゼリー)採取の有無、蜂の蜂児(子)採取の有無を調査した。

#### 2) 病理組織学的検査

検査は青木[13]の方法に準じ、白色ミイラ蜂児や黒色ミイラ蜂児及び対照として健康な蜂児を5%ホルマリン水で1週間固定後水洗し、アルコールで脱水後、常法により包埋し薄切し、一般的なヘマトキシレン・エオジン染色と真菌検査[72]に有用な過ヨウ素酸シッフ法(PAS染色)により鏡検し組織学的に検査した。

#### 3) 病原学的検査

分離培養には5%緬羊血液加ハートインフュージョン寒天培地、卵黄寒天培地、サブロー寒天培地、ツアペックドックス寒天培地を使用し、分離真菌の生物学的性状検査にあたってはマルツエキストラクト寒天培地、M40Y寒天培地、オートミール麦芽寒天培地、ウエイツマン寒天培地を用いた。真菌用培地としては既報の文献によった[2, 12, 28, 31, 37, 39, 46]。

真菌の発育[25]は培養温度に左右され易いことから発育温度の検査には、分離真菌をM40Y寒天斜面培地に植え、5℃、10℃、25℃、37℃の4温度とし、各温度で3日間に培養し発育の有無を確認した。

分離真菌の病原性確認にはD D系の30日齢のマウスに、 $1 \times 10^4$  ,  $1 \times 10^5$  ,  $1 \times 10^6$  ,  $1 \times 10^7$  ,  $1 \times 10^8$  / mLの孢子混濁液（滅菌生理食塩水に浮遊）を0.1m Lずつ腹腔内に接種し病原性を確認した。

## 2 Ascosphaera apis の分離検査法

### 1) 蜂児

管内64戸の養蜂家の蜂群320群各々4～5日齢の5蜂児を無菌的にピンセットで滅菌スピッツに採材し、M40Yブイヨンで37℃で3日間増菌培養後、M40Y寒天培地に植えて10日間真菌の発育の有無を検査した。湿度を高くして真菌の発育と孢子形成を容易にするため、各シャーレに滅菌蒸留水を浸したガーゼを入れ、ビニール袋の中に納め輪ゴムで口を縛り培養を実施した。

### 2) 蜂蜜

管内64戸の養蜂家の蜂群320群から各々5か所から蜂蜜を採取し、M40Yブイヨンで37℃で3日間増菌培養後、M40Y寒天培地に植えて10日間培養し真菌の発育の有無を検査した。

### 3) 花粉

管内64戸の養蜂家の蜂群320群各々5花粉を採取し、M40Yブイヨンにより37℃で3日間増菌培養後、M40Y寒天培地に植えて10日間培養し真菌の発育の有無を検査した。

## 3 Ascosphaera apis の病原性検査法

### 1) 病像の出現検索

分離した真菌の病原性を確認するために再現試験を実施した。使用真菌は当所で分離した Ascosphaera apis MS7911株を用いた。M40Y寒天培地で25℃で1週間培養し、十分孢子を形成させた後、0.01%ラウリル硫酸ナトリウム生理的食塩水で洗浄しハーベスト後、ガラスウールで濾過して菌体成分を除去後、滅菌した0.5%蜂蜜添加生理食塩水へ浮遊し、ヘモサイトメーターで孢子濃度を測定し、4℃に保存し試験に供した。

試験に供した蜂群の試験区はT-1, T-2, T-3の3群、対照区は1群で、これらの4蜂群は前以て細菌・真菌検査[14, 39, 52, 72, 74, 121]を実施し、

チョーク病・アメリカ腐疽病及びヨーロッパ腐疽病等陰性の健康群を用いた。

試験区の T-1, T-2, T-3 には孢子濃度  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^9$  / mL の三段階を用い、各々巣脾片面あたり 50 mL ずつ電動スプレーヤーを使って噴霧し、その後 5 日間毎日臨床的に観察した。

## 2) 接種真菌の回収試験法

試験区 T-1, T-2, T-3, 対照区 C-1 の各蜂群 5 ヶ所よりミイラ蜂児を採材し、M40Y 寒天平板培地の中央に植えそのシャーレをビニール袋にいれ乾燥を防ぐため、滅菌湿潤したガーゼを同封し、真菌の発育の有無を 2 週間観察した。5 ヶ所の検査で 1 ヶ所以上から真菌を分離した場合を陽性とした。

# 4 Ascosphaera apis に対する抗菌剤の in vitro 殺菌効果試験法

## 1) 消毒剤

Ascosphaera apis 分離菌株 MS7911 株を M40Y 寒天培地（ルー瓶）に植え 25°C で 1 週間培養後ハーベストして  $3 \times 10^7$  / mL の孢子混濁液を作製し、逆性石鹼、両性石鹼、ヨード剤（各薬剤 1 剤ずつ）を各々 50 倍、100 倍、200 倍、400 倍、800 倍、1,600 倍、3,200 倍、6,400 倍まで希釈し、各々 20°C のウォーターバスの中で、2.5 分、5 分、10 分、15 分作用させた。分離培地は M40Y 寒天培地を用い消毒薬検査指針 [12, 86] に準じ発育の有無により殺菌効果を判定した。

## 2) 防黴剤

人体用の抗真菌剤 [52, 115] はあるが副作用の多い報告もあり、また動物用のものは少ないため、厚生省で食品添加が許されている防黴剤 [138] 15 品目中の 14 品目、安息香酸、安息香酸ナトリウム、ジフェニル、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、デヒドロ酢酸、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸イソブチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸ブチル、パラオキシ安息香酸プロピル、プロピオン酸カルシウム、プロピオン酸ナトリウム (PNa) を 10~0.04 mg / mL になるように M40Y 寒天培地に添加し、最少発育阻止濃度 (M.I.C) を求めた [86]。

使用菌株は Ascosphaera apis 分離菌株 MS7911 株で M40Y 寒天培地で



培養し、 $3 \times 10^7 / \text{m L}$ の孢子混濁液を塗布し $20^\circ\text{C}$ 、24時間作用後判定した。

### 3) 殺菌性ガス

使用菌株は Ascosphaera apis 分離菌株9株で M40Y 寒天培地で $25^\circ\text{C}$  1週間培養したものをホルムアルデヒドガスとエチレンオキシドの2種のガスに作用させ試験した。

#### ア) ホルムアルデヒド (FA) ガス

FA ガスは $1 \text{ m}^3$  あたり、ホルマリン40m L、過マンガン酸カリウム40gを用い、ビニールテントの中で $22^\circ\text{C}$ で試験した。作用時間は0.5, 1, 24時間とした。方法については、農林水産省の法に基づき実施した[121]。

#### イ) エチレンオキシド (EO) ガス

各検体を、真菌等に効果があると報告[42,118]されているエチレンオキシドガス滅菌器に入れ、排気し10% EO ガスで置換し、 $30^\circ\text{C}$ で、0.5, 1, 24時間作用させた。

## 5 チョーク病の防除試験法

### 1) Ascosphaera apis 感染巣脾における薬剤の防除効果試験法

$1.1 \times 10^9 / \text{m L}$ の Ascosphaera apis MS7911株の孢子混濁液を作製し、1蜂群の1巣脾片面あたり50m Lずつ全巣脾にスプレーし、白色ミイラ蜂児が認められた後に、下記薬剤試験を実施し、各々の巣箱に戻して観察し、その症状は毎日写真に撮って記録した。

使用蜂群は消毒薬、防黴剤、対照群（無処置）各1群ずつの蜂群で巣脾は各々9枚の群を使用した。

#### (1) 消毒剤（逆性石炭）

白色ミイラ蜂児が認められた3日目に逆性石炭の800倍溶液を巣脾片面あたり100m Lずつ電動スプレーヤーを使って巣脾全体に均等に噴霧し、白色ミイラ蜂児の増減を毎日観察し写真を撮って記録した。

#### (2) 防黴剤

逆性石炭と同様に人工的にチョーク病に感染させ白色ミイラ蜂児が見られた蜂群に0.5%の PNa [138] を電動スプレーヤーを使って巣脾片面あたり100m Lずつ噴霧し、毎日白色及び黒色ミイラ蜂児の数を測定した。

### (3) 殺菌性ガス

巣脾18枚を用い、Ascosphaera apisMS7911株の孢子混濁液( $3 \times 10^8$  / mL)を巣脾片面あたり10mLずつ均等にスプレーし、48時間25℃の孵卵器で培養定着後、一枚の巣脾から9×15cmの大きさのものを2枚ずつ合計36枚作製し、滅菌ビニールバックにヒートシール(熱着)し、EOガス殺菌装置を用いて試験した。EOガス試験材料は蜂群へ戻す試験は実施しなかった。これは巣脾に付着させた A. apis の殺菌効果を知るための理由による。

EOガス[118]は $C_2H_4O-10wt\%$ 、 $CO_2-90wt\%$ の混合ガス Capox-10を使用した。

#### 2) 自然発生チョーク病罹患巣脾における薬剤の防除効果と残留試験法

9蜂場から集めたチョーク病感染巣脾を9×15cmの大きさに、加温した滅菌スパーテルで切断したものを210枚作製した。巣脾は蜜蝋でできており、ピース作製は大変容易であった。その内21枚を対照とした。

##### (1) 消毒剤(逆性石鹼)

前述の切断巣脾を逆性石鹼液の100倍、200倍、400倍、800倍、1,600倍希釈溶液(各500mL)に浸漬し、24時間作用後、巣脾を取り出し、各巣脾5ヵ所より滅菌綿棒で採材し、M40Y寒天培地に植え発育の有無を検査し殺菌効果を確認した。対照は蒸留水の500mL中に浸漬し同様にM40Y寒天培地で A. apis の分離培養を実施した。

##### (2) 殺菌性ガス

###### ア) ホルムアルデヒド(FA)ガス

チョーク病汚染巣脾をビニールテントに入れ、前述のホルムアルデヒドガスを0.5, 1, 2, 24時間暴露させ、その後巣脾一枚あたり5ヵ所から滅菌綿棒で採材し、M40Y寒天培地に植え分離培養を行ない発育の見られなかったものを殺菌効果有りとした。

###### イ) エチレンオキシサイド(EO)ガス

チョーク病汚染巣脾(9×15cm)の27巣脾に10%EOガスを使つて、0.5, 1, 24時間暴露させ、その後、巣脾1枚あたり5ヵ所から滅菌綿棒で採材し、M40Y寒天培地で分離培養を行なつた。

### (3) 残留試験法

蜂蜜の中に薬物が残留すると食品衛生上問題があることから、逆性石鹼とPNaについて毎日採蜜し検討した。FAガス及びEOガスについては冬場に空巣脾を消毒殺菌することを前提に試験したので残留試験については実施しなかった。防除試験に供した蜂群より毎日採材した蜂蜜中の逆性石鹼とプロピオン酸(PNa)について毎日採蜜して検討した。

逆性石鹼の残留については常法により比色法で実施した[119]。

PNaについてはガスクロマトグラフ法[138]で下記により試験した。蜂蜜50gを3Lの蒸留フラスコに入れ、水1,000mL, NaCl 180g, 10%  $H_3PO_4$  溶液10mLおよびシリコン樹脂(消泡剤としてアンチホルムAFエマルジョン)1滴を加えて水蒸気蒸留を実施した。500mLメスフラスコに1% NaOH 溶液20mLを入れ上気留液を採取し、正確に500mLとした。留液1.0mLをイオン交換樹脂(Dowex50, X8)カラムに入れ、溶出液にクロトン酸標準溶液1.0mLを入れて、10mLのメスフラスコに受け、全量を10.0mLとして試験溶液とした。この2mLをガスクロマトグラフに注入し、プロピオン酸量を測定した。

ガスクロマトグラフィーの設定条件は、機器として島津GC6A型、ガスクロマトグラフ水素イオン化検出器(FID)を使った。カラムはガラスカラムで径3mm長さ2mで充填剤として、Chromosorb 101, 試料注入口温度は230°C, 検出器の温度は230°C, カラム槽温度は200°C, キャリアガスは $N_2$  40mL/min, 水素ガス 40mL/min, 空気800mL/min. とし、ガスクロの検出限界は25ppmで実施した。

### Ⅲ 成 績

#### 1 蜜蜂チョーク病の自然発生例について

##### 1) 発生状況

発生があった養蜂家は常時100から150群を飼養している中堅の專業養蜂家で、毎年冬場に花の多い鹿児島県へ蜂群の発育、増大を目的として移動養蜂いわゆる転飼をしていた。岐阜県から移動する時には50群であったが現地で花の開化も良好であったため蜂群が約2倍になっていた。しかしながら、1979年3月フェリーボート及びトラックで転飼してきた蜂群100群の内3群に白色や黒色のミイラ蜂児が巣脾や巣門の入り口に多数認められた。巣門に集蜜してくる働蜂の数もまばらで、産卵領域には健康蜂児は少なくミイラ蜂児が多数認められた。また、ミイラ蜂児は微かな発酵臭が認められ硬さはスポンジ様で色は白色や黒色を呈し、中には黒褐色でミイラ化しており (Fig. 1, 2, 3), 巣門の入り口にはミイラ蜂児が山積していた。

転飼は岐阜県の渡辺〔149〕により考えられたもので、九州から北海道まで花の開化に合わせて時期をずらして移動して飼育するもので、冬場は九州へ夏場は北海道へ移動することにより常に花の蜜や花粉を十分に採り蜂数も増加し、蜂群も移動前には1箱で9枚しかなかった巣脾が移動後には2段箱の18枚まで拡大し、れんげ等岐阜での開花時期（4から5月）前に戻ってくると4万から8万匹の増大した蜂群で採蜜すると良質の蜂蜜を多量に収穫できるからである。これは従来の一定の場所で飼育する定飼養蜂は一年の一時期しか採蜜できないのに比べ効果的で回転率も高くなり專業養蜂家の殆どが実施しているのが現状である。しかしながら、転飼は蜂にとって極めてストレス状態を招くことは良く知られており、今ほど自動車が多くなかった時代には専ら鉄道の貨車が用いられ、駅についた時には蒸れにより全滅したり半数以上が死亡していた事も多く見られた〔149〕。

ここ数年来はトラックで移動することが一般的になったとは言うものの、輸送業者は蜂群を一般の商品運搬と同様に考え、決められた時間までに目的地まで運ぶことを考えるのが普通であり、一晩で九州から岐阜まで移動することは一般的であった。今回の移動も自動車やトラック等で行なわれ、3群はいずれも働蜂は元気がなかったと養蜂家は述べていた。発生群の内1群では女王蜂の周囲に数十匹の蜂群を認めるのみで、蜂勢（蜂の勢い）は脆弱であった。他の2群でも巣箱の蓋を開けても、飛翔する働蜂は僅かであった。他の97群では3万から4万匹の働蜂が勢い良く動きまわるのがみられた。

罹患群では9枚の巣脾のいたるところに、ミイラ蜂児が認められ、詳細に観察してみると、白色ミイラ化した蜂児が巣房一杯に脹らんだ状態で固着し、これらを巣房からとりだしてみると、白色蜂児に微かに黒点がみられるもの、蜂児全体が黒色化したもの、黒褐色のものも認められた。殆どの異常蜂児は働蜂に多く見られたが、中には働蜂には異常はないものの、巣脾の端の雄蜂がひどく白色ミイラ化や黒い物も認められた。

過去にこのような疾病の発生はなく、実態調査のため、県内各養蜂家へ立ち入り調査を1979年に実施した。その結果、一市二郡40戸中9戸でも発生がみられ、その9戸についてみると、群発生率は3%～80.3%（3群/100群～126群/157群）と各養蜂家で差異がみられ平均の発生率は36.6%であった。1養蜂家では定飼で他には移動したことがなかったが、残りの8戸では県外各地に転飼していた。転飼前の蜂場は鹿児島、北海道共に4戸であった。地域と発生率には有意差がなかった（Table 1）。

1980年1月に岐阜県内の発生状況を把握するために231戸の養蜂家で実施したアンケート調査による県内の発生状況では5ヵ所のいずれの地域でも発生が見られた。平均気温が高い岐阜地域では45.1%（1,140群/2,530群）と高く、寒い飛騨地域では18.4%（275/1,495）と低く危険率1%の危険率で有意差を認めた。他の地域間には有意差はなかった

(Table2)。いずれの養蜂家でも発生群では蜂群が弱体化しており、巢門の入り口には数個から数十匹のミイラ化した蜂児が多数みられ働蜂数の減少が顕著であった。ミイラ蜂児は白や黒色、褐色、まだらのものも認められた。

## 2) 病理組織学的所見

HE染色では、死んだ蜂児はエオジンに染まるクチクラの網状構造を示し、全身のクチクラ層内、細目間隙及び蜂児の周囲に多数の真菌が認められた。菌糸は棒状でいずれも隔壁がみられ、内部にヘマトキシリンに染まる微細顆粒が見られた。Y字状に分岐した菌糸も散見された。全体が白色ミイラ化したものでは菌糸のみであった。全体が黒色ミイラ化したものでは胞子が見られた。胞子は球形ないし亜球形を呈し、菌糸の先に付着してバチ状になったもの、あるいは遊離したのが見られた。また蜂児の周囲を多数の真菌が層をなして囲み、クチクラの表層に侵入している像が見られた〔13〕。

真菌の重度の侵襲を受けているにもかかわらず、蜂児の生体反応像は認められなかった。PAS染色では、蜂児のクチクラ層及び真菌が紫赤色に染め出された。マルピーギ小体は認められなかった。ミイラ蜂児体内に分岐した菌糸やバチ状にミイラ蜂児のクチクラ層に侵入している真菌が多数認められた。総合的にみてみると蜂体全体が菌糸に置き換わっているのが確認できた (Fig. 4, 5)。この真菌は生物及び死物寄生体の二面性があることがわかった。

## 3) 病原学的所見

発生の確認された前述の9戸のミイラ蜂児について、5%綿羊血液寒天培地及び卵黄寒天培地では3週間好気及び嫌気培養したが、アメリカ腐疽病菌等の細菌はいずれも分離されなかった (Table 3)。

蜂児を使ってアメリカ腐疽病の早期診断のための蜂児のミルクテストも実施したがいずれも透明化は見られず陰性であった〔14〕。

サブロー寒天培地、ツアベックドックス寒天培地による真菌培養検査



では白色綿毛状の真菌が培養3日目より発育した。発育した真菌は白色で裏面も白色ではのかな発酵臭が認められ、培養日数が増加するとシャーレ一杯に広がった。培養して3日目からシャーレの蓋を取ると甘酸っぱい香りを放っていた。各種培地での発育性では、サブロー寒天での孢子形成能が悪く、培地での発育速度、孢子形成能は M40Y 寒天培地が一番優れていた。白色の雄の菌糸とやや淡い白色の雌菌糸をシャーレの左右の端に植えこむとその中央で有性生殖が行なわれ孢子も容易に形成された (Fig. 6)。

発育温度の試験では10℃, 25℃, 37℃で発育が認められたものの5℃ではまったく発育が見られなかった。一般に真菌は低い温度を好むのが多いが本真菌は幅広い発育温度が特徴であった。

分離真菌は純培養し各々菌株番号をつけ生物学的性状を検査したところ (Table 4), グラム染色では陽性で、いずれも菌糸には隔壁があり、薄壁性の子嚢果 (孢子嚢) や子嚢 (孢子球) が見られた。子嚢果は表在性から潜在性で培地上に散在したり、密生するのがみられ、色は暗褐色から黒色で形は球形から亜球形で直径は35から100  $\mu$  m で数個から多数の子嚢を含み、成熟すると壁が不規則に割れた。壁はやや半透明で薄く、2層からなり外層は無色、ゼラチン質で内層は淡いオリーブ褐色、キチン化し連続するのが見られた。子嚢は球形から亜球形で直径は8から20  $\mu$  m であった。子嚢孢子は無色で1細胞、形は楕円形から多少腎臓形を呈し3から2  $\mu$  m の大きさであった。一方、無性的に形成される厚膜孢子や分生子は確認されなかった (Fig. 7, 8, 9, 10)。

マウスに対する病原性試験では $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  孢子の腹腔内接種ではどの濃度においても病原性は確認されなかった。

これらの性状から Ascosphaera apis と同定した (Table 4)。

## 2 Ascosphaera apis の分布状況

64戸のうち蜂児で16戸（25.0%），蜂蜜で10戸（15.6%），花粉で13戸（20.3%），合計39戸の養蜂家で白色ミイラ化した蜂児が認められた（Table 5）。

### 1）蜂児

Ascosphaera apis は検査した64戸320群中，16戸の蜂児80群（25.0%）が分離陽性で蜂児からの分離率が一番高く，蜂児と蜂蜜及び花粉からの分離率には有意差が認められた（ $P \leq 0.05$ ）。

蜂児の16戸の内2戸ではミイラ蜂児から A. apis と共に Aspergillus も分離された。このミイラ蜂児はやや青みを帯びた黒色でやや堅くピンセットで強く摘むと石の粉の様に粉碎された。

Aspergillus は Stone brood [2, 20] の原因真菌であり，この症例はチョーク病と Stone brood の混合感染例であり，今まで我が国では報告がなく，今後はさらに調査する必要がある。

### 2）蜂蜜

64戸320群中10戸16群（5.0%）から A. apis が分離された。分離された蜂蜜とされない蜂蜜では肉眼的には区別が見られなかった。しかしながら，濃厚感染蜂群では蜂勢が弱体化しているため貯蔵されている蜂蜜の量は少なかった。濃厚感染群では働蜂，女王蜂も雄蜂も動きにシャープさが欠けていた。

### 3）花粉

64戸320群中3戸15群（4.7%）から A. apis が分離された。花粉の種類はレンゲが多かったが他には菜種，セイタカアワダチソウ等の雑花粉が認められた。腐疽病の場合，花粉に芽胞が $10^3 / \text{mg}$ 程度に付着いるとそれを吸収した蜂がその花粉を持ちかえると腐疽病の発症を示すといわれており，チョーク病でも類似の現象がおこるのではないかと思われたが，今回の試験では花粉中のチョーク病の原因真菌の定量はしていないので，今後さらに検討する必要がある。

### 3 Ascosphaera apis の病原性

#### 1) 病像の出現率

感染後1日目ではどの群も異常は認められず、T-1では5日目から、T-2では4日目から、T-3では3日目から白色蜂児を認めたが、対照では異常が認められなかった (Table 6, Fig. 11, 12)。

胞子濃度が $10^3$  /m L,  $10^4$  /m L,  $10^9$  /m Lと濃くなるに従い発病率は40/100(40.0%)から55/100(55%)93/100(93%)と増加して、胞子濃度と発病率には相関がみられた ( $P \leq 0.05$ )(Table 6)。

白色蜂児の変化を見てみると、初期には白色綿毛状の菌糸が認められ、さらに数日すると体の1/3程度が菌糸で覆われた。全体が白色ミイラ化したものでは黒色の胞子が形成されはじめ、やがて蜂児全体が黒色化した。

感受性は4から5日齢の蜂児までに認められた。チョーク病の再現は、4から5日齢の蜂児に認められたが、3日齢以前のは、死亡融解か、成蜂による除去のためかチョーク病の発生は確認されなかった (Fig. 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19)。

$10^3$  /m Lの胞子接種群では極度な蜂群の変化は少なかったが、 $10^4$ ,  $10^9$ と噴霧真菌濃度が濃くなるに従い働蜂数の減少が顕著であった。

対照群においてはいずれも異常がみられなかった。

#### 2) 接種真菌の回収率

白色のソフト化した蜂児30検体(各群10検体ずつ)、白色ミイラ化した蜂児30検体、黒色乃至黒褐色ミイラ蜂児30検体いずれからも、白色綿毛状の真菌が分離され (Fig. 20)、胞子形成も認められ (Fig. 21, 22)、すべて A. apis と同定され、蜂児30検体/30検体、白色ミイラ蜂児30検体/30検体、黒色乃至黒褐色ミイラ蜂児30検体/30検体といずれの検体からも100%の回収率であった。

対照群からは A. apis は分離されなかった。

#### 4 Ascosphaera apis に対する抗菌剤の in vitro 殺菌効果

##### 1) 消毒剤

殺菌効果を消毒薬の希釈濃度と作用時間で検討した結果、薬剤と対照間には有意差が見られたが ( $P \leq 0.01$ ), 6,400倍希釈液ではいずれの消毒薬においても殺菌効果は認められなかった (Table 7)。逆性石鹼では50倍から200倍希釈液ではどの作用時間でもすべて殺菌効果があった。1,600倍で有効であった。両性石鹼でも50倍から200倍液では逆性石鹼と同様に有効であり, 800倍液10分間の作用で殺菌効果を示した。ヨード剤では3,200倍液15分間作用でも殺菌効果があった。

##### 2) 防黴剤

防黴剤14種 (Table 8) につき, 分離菌株と対照の Aspergillus flavus について MIC を検討した結果, 分離菌の A. apis はどの薬剤に対しても MIC が0.04~1.25mg/m Lの低濃度で殺菌効果が認められた。

なお, 対照の Aspergillus flavus は MIC が10mg/m L以上と高かったのに比べ A. apis は0.04から1.25と低い MIC 値であった。

##### 3) 殺菌性ガス

###### ア) ホルムアルデヒド (FA) ガス

A. apis GM7982株は FA ガスの1時間でも強い殺菌効果を示し, 24時間作用では全株とも5検体中5検体とも殺菌効果を示し, 株間には有意差は認められなかった (Table 9)。

###### イ) エチレンオキシサイド (EO) ガス

いずれの菌株においても0.5, 1時間では殺菌効果が認められなかったが, 24時間では9株とも殺菌効果が確認された。。株間に有意差は認められなかった (Table 10)。

## 5 チョーク病の防除法

### 1) *Ascosphaera apis* 染巣脾における薬剤の防除効果

#### (1) 消毒剤（逆性石鹼）

ミイラ蜂児は消毒薬により軟化し、その数は49から47、40と除々に減少し、成蜂によって取り出された蜂児が巣門の入口に多数認められ、8日目には全部消失した。病巣の拡大も認められず、女王蜂による再産卵も認められた。対照群でも若干の自然減少が認められたが、試験群と対照群には有意差を認めた ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 23)。

蜂に対する副作用は成蜂、蜂児、卵いずれにおいても見られなかった。

また、蜂勢の減少も認められなかった。消毒前には元気がなかった働蜂も消毒後には威勢よく飛び回り採蜜するのが認められた。

#### (2) 防黴剤（プロピオン酸ナトリウム : PNa）

ミイラ蜂児の数は PNa 噴霧後除々に減少し、逆性石鹼噴霧と同様に8日目にはミイラ蜂児は見られなくなった (Fig. 24)。

蜂児や成蜂にも何ら副作用は認められなかった。蜂勢は次第に回復し、綺麗に清掃された巣房に女王蜂が多数再産卵するのが認められた。

対照群にも徐々に減少がみられたが最後までミイラ蜂児が認められ、両群に有意差が認められた ( $P \leq 0.05$ )。

防黴剤は比較的安全性が高いと思われていたが、なかには蜂に対して副作用を示したものが2剤、安息香酸とソルビン酸で働蜂の麻痺、飛翔不能、死亡、等がみられた。

#### (3) 殺菌性ガス（エチレンオキサイドガス : EO）

EO ガスの試験では作用温度20℃で100%の殺菌効果があったのは EO ガス濃度2%で6時間及び24時間作用群、3%濃度では6, 18, 24時間であった。7%では1, 2, 3時間では5検体中4検体の80.0%の殺菌効果が認められた (Table 11)。

作用温度30℃では、ガス濃度1, 2, 3%で6, 18, 24時間、ガス濃度5%では2, 3時間、7%では1, 2, 3時間が5検体中5検体の100%の殺菌効果を示し

た (Table 11)。

2) 自然発生チョーク病罹患巣脾における薬剤の防除効果と残留性

### (1) 消毒薬

チョーク病罹患巣脾 9 検体ずつについて試験した結果、逆性石鹼では希釈倍率100倍、200倍、400倍、800倍では9 検体中9 検体 (100%) に殺菌効果が認められたが、1,600倍では9 検体中9 検体とも真菌の発育があり無効果であった (Table 12)。

両性石鹼では希釈倍率100倍、200倍、400倍液では9 検体中9 検体に100%の効果であったが、800倍液では9 検体中8 検体 (88.9%) に殺菌効果であり、1,600倍では9 検体とも効果が認められなかった (Table 12)。

ヨード剤では希釈倍率100～1,600倍液まで9 検体/9 検体 (100%) に殺菌効果が認められた。

しかし、ヨード剤は残香性が強く、巣脾に用いられている止め金、針金の腐食も認められ、蜂蜜にも香りが移行することから実用に適さないと考えられた (Table 12)。

### (2) 殺菌性ガス

#### ア) ホルムアルデヒド (FA) ガス

作用時間が0.5及び1 時間では9 検体中9 検体とも無効であったが24時間では9 検体中8 検体 (88.9%) に殺菌効果を示した。蜂に対する病原性は認められなかった (Table 13)。

#### イ) エチレンオキサイドガス

EO ガスも FA ガスも同様、0.5及び1 時間では9 検体とも殺菌効果が認められなかったが、24時間では9 検体中9 検体に (100%) の殺菌効果を示し、十分野外に応用できるものと考えられた (Table 13)。

### (3) 薬剤の残留性

蜂蜜中の薬残留性については逆性石鹼と PNa の防除試験群について検討した。

逆性石鹼の試験では、1 日目には415m Lの容量で重量が523 gの蜂



蜜が収穫でき、残留濃度は2.6ppmであったが、2日目以降では1.2ppm, 1.4ppmと残留が認められたものの4日目以降では検出限界以下となり、野外応用性が示唆された（Table 14）。

PNaでは、1日目は5,250ppmと高濃度に検出されたものの、2日目以降は検出限界以下となったことから、本薬剤は野外においてより応用可能であることが推測された（Table 15）。

#### IV 考 察

異常のあった蜂群は、1979年3月にトラックで花の終わった鹿児島県より蜜蜂の蜂群を岐阜県内へ転飼してきた100群中の3群で白色や黒色の白墨様のミイラ蜂児が多数認められた。蜂群は勢いが無く微かな発酵臭が認められ、蜜蜂の法定伝染病〔121〕であるアメリカ腐蛆病、ヨーロッパ腐蛆病を検査したがすべて陰性であった。それらの検体から Ascosphaera apis を分離同定し、わが国において初めてチョーク病の発生を確認した。わが国では宇田川ら〔143〕が1974年に秋田県産の蜂蜜及びカナダ産の輸入蜂蜜から A. apis を分離しておりいずれ本菌による蜜蜂の疾病の発生が予察されていたが、今回の例が本邦での初発となった。これらについては、馬淵ら〔53, 79, 96, 102, 103〕のチョーク病の発生報告等がある。

一方、ドイツでは Maassen が1913年〔100〕に Kalk Brut（白墨病）として白色ミイラ蜂児を確認報告した後蔓延し、ドイツ国内で Claussen〔43〕は1912年にも確認しその後、ヨーロッパ全土に広がった。英国の Betts では1919年〔34〕、フランスの Varitchak は1932年、1933年に〔147, 148〕、スイスで Maurizio が1934年〔110〕 Pericystis apis の感染症について述べ、1935年〔111〕ミイラ蜂児について詳細に述べている。つまり、蜂児の白色のものは感染初期に多く、古い感染例では黒色のものが多かったと報告している。発生原因としては、餌に本菌がはいっていた、女王蜂の移入、餌場での感染が疑われたが、結局不明であったと報告している。

オーストリアでは Prokschl〔124〕が1953年に同様の疾病報告をした後、世界各地からチョーク病の類似疾病が報告された。アメリカ合衆国では Stutevant が1923年、1949年、Burnside 1930年〔39〕に本病について調査したがはっきりしなかったとしており、Spiltoir 1955年〔136〕 A. apis の生活史について述べており、Shimanuki は1967年〔131〕蜂病全般について研究し、Chalk brood の調査も行ったがいずれもアメリカ

国内には発生がなかったと報告していた。Anna [12] もこの病気はヨーロッパだけの特有の疾病であると思われていたと述べている。しかし、Baker と Torchio [31] は1968年に北アメリカのウタの群居しない蜂巢 (Solitary bee nest) から *A. apis* を初めて分離した。

これらはハキリバチ (Leaf-cutter bee, *Megachile inermis* Prov.) と地蜂 (Soil nesting bee, *Anthophora pacifica* Cress,) の巣で、この中の蜂児の糞からこの真菌を分離した。しかし、巣の中には両方とも蛹前の幼虫がいたが感染はしておらず元気に生きていた。従ってベクターであろうと想像するとともに他の蜂種でもその可能性もあるかもしれないとした。

その後、アメリカやカナダの研究者により Chalk brood に対する関心が向けられ、カリフォルニアで Thomas と Luce が1968年 [143] , ミネソタとノースダコタで1969年 Shimanuki [133] により、モンタナは1971年に Graham により、コロンビアは1971年、Gochner は1976年 [65] により発生報告がなされるようになった。Diana [47] は北アメリカでチョーク病の広がり状況や疫学アンケート調査等を実施した。1971年6月にテキサスからネブラスカへ転飼した900群の内10から15%ミイラ蜂児が認められたと報告している。1972年 Hitchcock は [80, 81] 本病のアメリカでの蔓延状況の迅速さとその早期対応策の必要性を述べている。アメリカでも移動養蜂いわゆる転飼は蜂にとってストレスになりやすく移動時の蒸し暑い気温が発病誘因の一つとして考えられたという報告 [25] もある。これは岐阜県での発生例と類似していた。また、女王蜂の新規導入が原因で発生がみられたという報告 [81] もあった。つまり全く健康であった群に他州から購入した女王蜂を導入したところ、数週間して白色ミイラ蜂児が見られたと報告している。また、チョーク病については女王蜂、働蜂、雄蜂どれにも感受性があったとしている。

1979年前後は日本国内が異常天候で30℃近い日が続いたことも要因と考えられる。また最近、気象疫学が盛んに使われ、天候と人や動物の病気の発現には気象がある程度関連性するとしている。つまり狭い箱の

中で長時間トラックで運ばれると蜂群の温度は上昇し、ストレスを受け弱体化し、日和見感染的に真菌症等の感染症になり易いということで人における幼児や高齢者に通常病原性を示さない大腸菌や急性肺炎が認められるのと同様であった。

弱体蜂児の形状は岐阜県での発生と同じように白色化が大部分でスポンジの様な堅さのものや完全に乾燥ミイラ化したもの、黒や褐色の斑点のあるものが見られた。ミイラ蜂児は成虫になる以前に感染するため、頭部、胸部、腹部の区別は無く下顎腺などの組織も見られず、蜂児の切断面を顕微鏡で観察すると多数の菌糸や子嚢胞子の固まりが見られ、蜂児全体が真菌に置換されていた。斑点は Skou [135] の報告のように子嚢胞子が形成され古くなった蜂児にのみ認められた。感染した蜂児は4日齢のものが多かったが、シール（蜂児が蓋をされたもの）やされる前やシールされた蜂児、それ以後のものにも見られた [50,56]。1967年にはマディソン地区で本病の発生が確認されている [116]。

蜂のライフサイクル [11,49,73,112,113,114,149] については文献により多少の差異はあるが、西洋蜜蜂 *Apis mellifera* の場合、つぎのような日数を経過して成蜂となる。女王蜂は産卵されてから卵期（3日）、幼虫期（6日）で8日目に蓋がシールされ、蛹期7日間（延べ16日）後王台から羽化する。働蜂は卵期（3日）、幼虫期（6日）、蛹期（12日）で8日目にシールされ21日で羽化する。雄蜂は卵期（3日）、幼虫期（6日）、蛹期（15日）で8日目にシールされ24日で羽化するのが通常である。働蜂も女王蜂も雌で初期に給餌される餌（ローヤルゼリー）の有無により分化するとされている。働蜂が人に刺す針は産卵管が進化したものと報告されている。

チョーク病の蜂児は取り出した巣脾の端の方や有蓋蜂児の外周辺に多くみられるが、これは中心部には働蜂がいて一定の温度を保っているが周辺では温度が下がり、真菌の発育しやすい温度になっていることと、雄蜂は巣脾の端や働蜂蜂児の周囲等条件の悪い所に産み付けられること

が多いこと、さらには働蜂よりも大きい蜂児（蛆）であること、さらには雄蜂は未受精卵から孵化したもので染色体も他が  $2n$  に対し  $n$  であり蜜胃や集蜜器官の発達も悪く基本的に弱く、羽化期間が一番長い事などから感染の機会も多くどの報告でも [47, 100, 116] 雄蜂が一番感受性が高いとされている。チョーク病を多くの蜂群から早期に診断するには、各群の雄蜂蜂児の巣房を次々と検査すれば診断が可能と考えられた。

Gilliam [57] は、*A. apis* が働蜂、雄蜂いずれにも感染を有するとしているが、女王蜂のミイラ化したものは無く感受性は不明であるとしている。ミイラ化した蜂児の体色は白、黒、時には灰色と変化がみられるがこれはこの菌の生活史によるものであるとしている。つまり、成長期である菌糸体に感染した蜂児は白いミイラになる。逆に接合（有性生殖）すると子実体の内部に黒い胞子が形成されるため、これに感染されると黒ないし黒褐色のミイラになる。感染群の掃除蜂により運び出されたミイラが巣門付近の飛行板、巣箱の底板や巣房の中で見られるのが特徴であるとしている。蜜蜂のミイラ蜂児等の清掃能力や抗病性には蜂種によって差があり、Brother Adam [38]、Cale ら [40, 41] は蜂群は自家育成で閉鎖集団となるため遺伝的にホモになり劣性遺伝子の影響がでてきて、次第に集蜜力や抗病性が落ちるのでハイブリッド種が強いという報告もある。

1979年4月の岐阜県の管内の立入検査時のチョーク病の発生率は14.0%であったが、その後のアンケート調査では38.6%の汚染が確認された。

Diana [47] は北アメリカの56の州にアンケートを実施しその内39の州で陽性の報告があり、14の州では陰性であった。12州では1974年よりも1975年から1975年に発生がみられ、養蜂家の中で重大な経済的打撃を受けているというのが大部分であったが、蜜蜂の飼養に影響なく脅威ではないという報告もあった。

冬を越した蜂群 (Overwintered colonies) に感染が多く認められ、これは花の少ない時期に貯蔵した蜜を細々と食した蜂群の蜂も減少し、

蜂群の気温を保つため蜂球をつくり湿度が高くなり、カビの発育しやすい条件になりやすいと考えられ、蜂病予防のためにテトラサイクリン等の抗生剤を投与される場合も多かった。しかしながら、冬場や気温の低い時期には産卵はしないため、群に感染はみられない。そして、春や早夏に一斉産卵が開始されると次々と蜂児に感染し発病するものと考えられた。

Gilliam [57] はアメリカ合衆国でのチョーク病の起源について検討し、2つの可能性を指摘している。1つは以前から存在していたがさほど重要視していなかったと考える説である。しかしながら、微生物学者や蜂場検疫官が蜜蜂の病気について何年も前から調査しており、もし以前から存在していたとしたら必ず観察しているはずであると報告している。同様にミイラ化現象を起こすストーンブルード病と混同していたのではないかと考えられるが、他の在来説をとる人は、最近になって急に広がり被害も顕著になったと考えている。そうであれば、病原菌が突然変異を起こしたか、蜂のある系統が急に感受性が高くなったのかのどちらかである。ちなみに、アメリカ合衆国の *A. apis* は世界の他の系統と異なっているという報告もある。米国ではチョーク病の病原菌が野性の蜂に以前から存在していた可能性があるが、何分にもこれらの蜂の微生物相の研究が殆どないため、これらの蜂が蜜蜂病原菌の保菌媒体であったと立証する術もない。

もう1つの見解はこの菌が恐らく輸入花粉[99]に混入して、最近になってからはいつてきたとするものである。また、蜂の様々な病気を防除するため、特にノゼマ病[142]やバチルス病やアメリカ腐蛆病[14, 67]対策のために広く使われている抗生物質が蜂の腸内の正常な微生物相を混乱させ、その結果、チョーク病が増殖蔓延したというものである。また、蜂を閉じこめたり、飢えさしたり飢えて他の蜂群の蜂蜜を盗りにいく盗蜂[125]をさせたりすると、アブノーマルな状態のために感染性が高まる傾向にあり、ストレスと高温、高湿で蜜が充分生産されないこ



ととの相関関係も考えられると Taber [139], Thomas ら [143] が報告している。その最たるものはトラック等による輸送や急に女王蜂を交替させたり、環境の悪い蜂場へ移動したこと等によることが考えられる。日本国内でも、我々 [53, 102, 103] が発生報告をし、検査培養法を公表した後、チョーク病の発生が全国各地の養蜂地帯のある県で次々と確認されるようになってきた。

世界の各地域 [60, 61] では細菌・原虫感染症の予防治療薬としてアムホテリシンB, フマジリン, オキシテトラサイクリン, ストレプトマイシン, エリスロマイシン, テトラサイクリン等がシロップ等で乱用された報告も数多くあり [12, 17, 24, 30, 36, 44, 51, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 66, 95, 115, 117, 142], これも誘因効果の可能性が示唆された。

Elbe [50] や Ericsson [51] は本真菌に対して抗真菌剤等色々な薬剤を試したが、完全に撲滅できるものはなかったとしている。他の研究者も同様であったと報告している [140]。

今回、*A. apis* の防除に使ったプロピオン酸ナトリウムは効果的であって病巣の拡大は無く、蜂群に対しても安全性を確認したので野外応用性が高いと考えられた。1977年に Samsinakova [128] は抗真菌剤でのインビトロの研究を実施しているが薬剤によってバラツキがあったとし一番可能性のあったプロポリスについてもその効果ははっきりせず、特効薬的な薬剤はなかったとしている。またこの調査研究では蜂に対する安全性が研究されていなかった。

白色や黒色ミイラ蜂児より分離した本真菌は生存性の強い糖要求度の高い好稠菌であった。M40Y 寒天培地での発育が良く、はじめに白色綿毛状の菌糸が発育し、1～2週間で暗褐色から黒色の子嚢果の形成が見られた。成熟すると中に数個から数十個の子嚢（胞子球）が形成され、その胞子球の中には楕円形から多少腎臓形の子嚢胞子を多数認め、割れて飛び出すのも認められた。菌糸には隔壁がみとめられ、雄の株と雌の株を対にして培養するとその中央に子嚢果の形成が認められた。

培養したシャーレでは特有の微かな発酵臭を呈し、培養温度は25℃から37℃と幅広くこれらは Maassen ex Claussen, Spiltoir et Olive や田淵ら [137, 141] の記載している A. apis の性状と一致した。本菌の発育温度が幅広いことは自然界で生き残るには最適でこのため蔓延定着が多いと推察された。この真菌はハチミツや巣脾の中で長く生き15年間存在したという報告 [143] もあり、土壌中では数年間生きている特徴があり、世界各地でこの病気が絶えない原因の一つとも考えられた。

蜂児、蜂蜜、花粉からの A. apis の分離状況は、各々15.6%、20.3%、25.6%であり、一見健康と見られる蜂児からも分離された。これらのことから、一度 A. apis に感染した蜂児があると餌である蜂蜜、花粉も汚染され、働蜂は蜂蜜と花粉を練ったものを給与されることから、蜂群全体が次々と汚染されることが推察された。

また、冬場に輸入花粉を給餌飼料として与えることも良く行なわれているが、外国産の花粉に A. apis が混入していた [153] とする報告もあり、注意する必要があると思われるので、健康な自家産の蜂蜜か砂糖の給餌が最良である。

腐蛆病罹患蜂群について、東 [14] によれば蜜蜂が花で採蜜する場合、花には菌は $10^3$ 個以上汚染され、他の蜂がその花で採蜜すると感染するという報告もある。

蜂はレンゲ等の一斉の開化時期には同じ花畑へ集中的に訪花する習性があり、このため、そこで水平感染が起こる可能性も示唆された。これを裏づけるかのように、まったく転飼しない養蜂家でも発生がしばしば認められていた。が、必ず数キロ離れた所に他の発生農場が確認された。それと、蜂場は何十年と同じ場所で飼養されることから、一度発生すると蔓延化し易いと推察された。

A. apis の孢子混濁液を健康な蜂群に噴霧し、野外と同様のチョーク

病を再現させることに世界で初めて成功した。病変の程度は噴霧する孢子濃度が濃いほど重度で孢子濃度と病変の濃度は比例関係が認められ正の相関が認められた。

Dejong と Morse [47] , Gilliam [56] は蜂群によって人工的に感染することは容易ではなく、非常な困難を伴うと報告している。しかし、著者は試験で *A. apis* の孢子混濁液に0.5%の蜂蜜を加えることで巣脾への噴霧定着が容易であることを発見し、感染が容易に成立した。耐病性の蜂の品種の改良と農業の寄与について多く研究されているが、その作出は容易ではなく集蜜力の少ない野生蜂との交配も無理ではないかと思われた [1, 4, 5, 7, 8, 32, 37, 38, 40, 49, 54, 68, 70, 73, 77, 97, 107, 109] 。

消毒薬の殺菌効果試験では、逆性石鹼1,600倍で15分間、両性石鹼では800倍10分間、ヨード剤では3,200倍15分間で効果が認められた。しかし、ヨード剤では蜂蜜への残留性及び金属の腐食性等の点から野外応用には適さないと考えられた。

FA ガスは養鶏場、孵卵場等で鶏舎、孵卵器、管理育成器具を安価に消毒する方法として効果的であり、広く利用されており、今回の試験にも応用した。殺菌性ガスの1つであるエチレンオキシドガス（以下EO ガス）は1859年 Wartz によって初めて発見されたが、その効果については殺虫、微生物の殺菌について多数報告されていた [118, 130] 。

特に EO ガスは強力な殺菌、殺虫力があり、特に細菌の芽胞についても、著しい殺菌作用が報告されており、米国ではアメリカ腐蝕病についての対応策として取り上げられている [131, 133] 。

EO ガスの問題点としては、爆発の危険性である。炭酸ガスを混合することにより操作が容易となり、Capox10として医療器具の殺菌に応用されつつあることから、今回の疾病対策の1つとして基礎並びに応用試験を実施した。

今回、筆者は、*A. apis* 噴霧巣脾のEO ガスによる殺菌について検討

した結果、20℃ではEOガス濃度が3%で6時間、2%で24時間で完全に殺菌された。30℃では、1%で6時間、0.5%で24時間のガス処理で完全に殺菌された。なお、5%では2時間、7%では1時間で完全に殺菌され、野外では30℃による殺菌が効果的と思われた。

EOガスは1959年にWartzにより初めて発見されたが、Cotton [45]らにより殺虫効果が認められ、SchraderとBossert [130]ら、Kirby [91]ら、我が国では長野 [118] によって殺菌剤としての効果が明かにされるにおよんで、ガス薫蒸剤あるいは殺菌剤としての利用の道が開かれた。EOガスは強力な殺菌殺虫力 [134] があり、特に細菌の芽胞に対し、比較的低温での殺菌効果があり、炭疽菌の芽胞汚染が疑われる輸入骨粉の消毒 [118] 等への応用がされ、従来の蒸圧殺菌に置き換わった。

蜜蜂の腐疽病は芽胞を形成する Paenibacillus larvae [74] によっておきる疾病であるがこれらを殺菌するため、Michael [114]、Cantwell [42]、長野 [118] らによりEOガスの応用が効果的であるという報告がなされ、アメリカ、フランス、旧ソ連、カナダ等でも研究が進められ、いずれも良好な成果をおさめている。今回の試験で A. apis に対しても充分応用が可能なことが確認された。

逆性石鹼及びPNaによる防除試験では、ミイラ蜂児は各薬剤噴霧後、毎日減少し、1週間でほとんど消失し、病巣の拡大もなく、再産卵も認められ、野外で十分効果を期待できるものと考えられた。ヨーロッパでは [128] 0.5%チモール、Fesia-form, amphotericin B 及び250ppmのbenomylを砂糖に溶かし与えたり、thiabendazolを巣の上枠に置き10日間で5回与える方法、ルーマニアではmycocidinをスプレーする方法や物理的に蜂箱の温度を上げる方法等が挙げられているが、完全撲滅はできなかったと報告している。Anna [12] らは A. apis に対する in vitro での効果的な抗真菌剤を検討し、Ajatin, Formalin, Salicylic acid, Last-anox, Nitrofungin, Nystatin (Mycostatin), Praben, Propolis, Allylthiocyanate が有効であったと報告している [12, 24, 58, 59, 60, 61, 62, 63,

65, 66, 111]。

わが国では[115]抗真菌剤として *Mystatin*, *Fungizone*, *Empecid* 等が人体用医薬品としては許可されているが、人に腎臓障害や膀胱炎などを起こす副作用があり、健康食品と呼ばれる蜂蜜を生産する蜂群には応用は適当ではなく、日本の消費者も安全性に対して大変関心も高くいつも食品や畜産物中の抗菌剤の残留がマスコミで大きくとりあげられ、このため商品がまったく売れない事態をおこしたこともあった[119, 138]。

蜜蜂は貯蜜巣脾内で一旦貯蔵されるが、水分濃度が高くこれはそのままでは永久貯蔵できない。そこで蜜蜂は夜中に貯蔵蜜を採蜜し、羽と蜂群熱で糖度を高めるのが常である。しかし、蜜嚢の下には蜜胃があって通常はバリアがあるが抗生剤や逆性石鹼などはこの胃のなかで消化酵素等で消化無毒化されるといわれている。このバリアは元気な強群の蜂には強力に作用するが、弱群では十分ではないとしている。

チョーク病が多発している原因として考えられることは、1) 以前から真菌そのものは存在していたが、蜜蜂の抗病性が低下したため多発した。2) 花粉（特に輸入花粉等）中に *A. apis* が存在していて広がった[41]。3) 蜜蜂の各種疾病予防のために使用された抗生物質、サルファ剤、副腎皮質ホルモンB剤等が、蜂の腸内の正常な微生物叢を混乱させ、その結果、外から侵入してきた *A. apis* が定着増殖した[24, 33, 44, 51, 117, 120]。4) 土壌中に *A. apis* が存在し、土壌を介して蜂が媒介し広まったなどがあげられる。古谷[53]によればこの真菌は土壌中に存在していても不思議で無いとしている。5) 蜜蜂はプロポリス[104]を生産するが、これは蜜蜂が巣を守るために樹液（フラボノイドなど）と唾液（パロチン）を混ぜ合わせて作った薬効のある天然物質でエジプト時代から防腐作用のあることからミイラ製作等に利用されてきた。しかし、チョーク病発生群は弱勢で働蜂が少なくプロポリスが十分生産されなかったか、されても良質でないため、野外からの菌、真菌を

防ぐ程の殺菌力が減少したのではないかと思われる。6) 1978年以前から異常天候が叫ばれ、環境汚染、環境破壊、レンゲをはじめとする蜜源植物の減少も誘因と考えられる。

チョーク病の防除薬剤として選定した薬剤の残留試験の結果、逆性石鹼では4日目、PNaでは2日目に検出限界以下になり、その間残留が認められるので、採蜜時期においては本薬剤を使用することは、食品衛生上好ましくなく休薬期間が必要と考えられた[119,138]。休薬期間は法律上規定はないが2週間ほどは自家用に用い、その後家畜保健衛生所等で残留検査をしてもらった後出荷がのぞましいと思われる。

チョーク病防遏のための重点事項としては、1) 蜂場の選定にあたっては、乾燥した通気の良い場所に設置し、川原などの湿地場所を避け真菌が増殖しやすいような条件をつくらないこと。2) 給餌にあたっては、A. apisの汚染が考えられる輸入蜂蜜を避け、自家産の良質な蜂蜜か砂糖液を与えること。3) 空巢脾、巣箱、分離器、給餌器、ツール、蜜刀などは逆性石鹼、ホルムアルデヒドガス、EOガスで定期的に消毒を実施すること。4) ミイラ蜂児が認められた蜂群は、800倍の逆性石鹼、あるいは0.5% PNa液で、月3回消毒すること。5) 弱群は他の健康な蜂群を導入し強群になるように務め、蜜蜂本来の自然清掃能力を増加させることなどである。

岐阜県下のチョーク病の発生率は1979年では37%、1980年では30%、1981年では18%、1982年では3.8%と漸次低下し、1983年にはゼロとなった。このように指導等の効果があらわれつつあるが、さらに清浄化維持のための検討を加える必要がある。

## V 総括と結論

蜜蜂のチョーク病 chalk(brood) disease はチョークブルード chalkbrood と呼ばれ、蜜蜂の蜂児（幼虫・蛹）が Ascosphaera apis（Ascomycota 子囊菌門，不整子囊菌類 Plectomycetes, Ascosphaeraceae 科の菌糸型真菌）によっておこす感染症であって死亡幼虫の白墨状ミイラ化が特徴とされている。養蜂上では特に Apis mellifera セイヨウミツバチの幼虫感染が重要である。

この蜂児の白色ミイラ化する疾病は、1913年ドイツの Maassen により” Kalk Brut [白墨病]”として最初に報告され、1916年に本症の原因真菌は Pericystis apis と命名された。Claussen はカビ着生蜂巢に由来する真菌の生活史について詳細に検討し、多核性の生殖器官は造精器が受精管を造卵器に伸長して受精し、この受精造卵器を synascus と呼称した。この造精器と造卵器による有性生殖が確認されたことから本真菌が子囊菌門の菌種 Pericystis apis と提唱されたことに支持を与えた。その後、Pericystis apis に対する詳細な真菌学的観察が実施され、Spltoir と Olive は本真菌を Ascosphaera apis（以下 A. apis）と再分類・命名した。

現在では、世界各地で Chalk brood の散発が見られ、その対応策について研究されつつある。さらには、飼養改善、ハイブリッド等による抗病性の研究、抗菌製剤、女王蜂の選択、抗真菌剤の合成、他疾病との合併症対策等も検討されつつあるが決め手となる物質はなかなか見つからないのが現状である。

わが国では宇田川らがカナダ産の輸入蜂蜜および秋田県産の蜂蜜から、また山崎が蜂蜜中の菌類分布について調査した際、鳥取県および秋田県下で採取した蜂蜜中の菌類分布について調査した際、鳥取県および秋田県下で採取した蜂蜜の中からそれぞれ、A. apis を分離した報告があるが、蜜蜂の発生報告はなかった。



このように、蜜蜂のチョーク病に関して、わが国における発生実態及び病性経過所見等の掌握は必ずしも十分とはいえない状態にあるが、本病は1997（平成9）年の「家畜伝染病予防法の改正」で新たに「届出伝染病」に追加指定されるに至った。蜂蜜の需要増加と相まって輸入品の増加並びに検疫業務の必要性から本病の研究が望まれていた。

著者は、家畜衛生の業務遂行上において本病の自然発生例に遭遇し、本病防遏のための衛生指針を策定する上で必要となる基礎的事項について研究する機会を得た。

本論文は蜜蜂のチョーク病に関して次の5項目：1) 本病の自然発生例所見，2) A. apis の分布状況，3) 分離 A. apis の病原性，4) A. apis に対する抗菌剤の in vitro 殺菌効果，5) 本病の野外防除法について研究・検討したものであり，ここにその概要を報告する。

## 1 蜜蜂チョーク病の自然発生例について

チョーク病の自然発生例は，1979年3月に九州から岐阜県内に移動してきた蜂群：100群中3群に異常な蜜蜂の蜂児が認められた。蜂児は白色，黒色暗褐色でミイラ化しており巣脾の中及び巣門の入り口に多数認められた。蜂勢は弱体化し，女王蜂周辺には少ない働蜂しか見られなかった。

チョーク病の病理組織学的所見では，ミイラ蜂児のクチクラ層内にPAS染色で赤く染まる多数の真菌を認め，菌糸は棒状で有隔壁性でY字状に分岐した菌糸も認められ，子嚢果（胞子嚢）の形成も確認された。

チョーク病の病原学的検査では，血液寒天培地，卵黄寒天培地にて細菌は分離されなかったが，真菌培地で培養3日目より，白色綿毛状の真菌が発育し，その菌糸及び子嚢果（胞子嚢）の形態学的所見から A. apis が推定された。

分離真菌は糖要求性が高く，M40Y 寒天培地で約 1 週間培養すると薄膜状の子嚢果（胞子嚢），球状の子嚢（胞子球），楕円形の子嚢胞子を造り，形態学的に子嚢菌類に分類される A. apis と最終的に同定した。

本症例はわが国初のチョーク病の自然発生例であるが、本症発生が確認された1979年前後の年は夏に30℃以上の気温が全国的に続いたことも、本真菌症の発生に関与したのではないかと推察された。

## 2 Ascosphaera apis の分布状況

本菌の分布については，養蜂家飼養中の蜜蜂蜂児，蜂蜜，花粉について検討した。その結果，蜂児では64戸中16戸（25.0%）の養蜂家の蜂群に白色ミイラ蜂児が認められ，A. apis は320群中80群（25.0%）から分離された。ミイラ蜂児のみられた蜂群では一見健康と思われる蜂児からも本真菌が分離された。

蜂蜜では64戸320群中10戸16群（5.0%）から，A. apis が分離され，花粉での分離率は64戸中3戸（4.7%）で陽性であった。

## 3 Ascosphaera apis の病原性

本菌の病原性は，健常蜂児に胞子液を噴霧して感染状況を観察した。病像の出現率は胞子濃度が， $10^3$ ， $10^4$ ， $10^9$  /m L（50m L / 巢脾）と濃くなるほど高く，それぞれ40.0%，55.0%，93.0%の発病率であった。

蜂児の感受性は，4～5日齢までが高いが，3日齢以前の幼虫は死亡融解，成蜂による除去のためチョーク病の発生は確認されなかった。

人工感染試験での接種真菌の回収率は白色ミイラ蜂児からA. apis がいずれもほぼ純粹状に回収できた。

#### 4 抗菌剤の *Ascosphaera apis* に対する *in vitro* の殺菌効果

*A. apis* に対する薬剤の殺菌効果は、各薬剤の希釈液に本菌の胞子を2.5, 5, 10, 15分間20℃で作用させた後、M40Y培地にて培養し真菌の発育の有無で判定した。その結果消毒剤では逆性石鹼で1,600倍希釈液で15分間、両性石鹼では800倍希釈液10分間、ヨード剤では3,200倍希釈液で15分間の処理で殺菌効果を認めた。

防黴剤14種中、ではプロピオン酸ナトリウム(PNa)のMICは0.04~1.25mg/mLと比較的低濃度であった。

殺菌性ガスのホルムアルデヒドガス(FA:40mL/立方メートル, 22℃), エチレンオキシドガス(EO:10%, 30℃)ともに0.5, 1時間の作用時間では十分な殺菌効果を認めなかったが、24時間では100%の殺菌効果であった。

#### 5 チョーク病の防除法

*A. apis* の人工感染(胞子 $10^9$ /mL, 50mL/巣脾片面)3日後の巣脾に対する薬剤の殺菌・防除効果は、逆性石鹼(800倍希釈液100mL/感染巣脾片面による噴霧で8日目には完全にミイラ蜂児がなくなり効果が認められた。

また、PNa(0.5%液100mL/感染巣脾片面)の噴霧でも8日目に完全な防除効果を認めた。そして、両薬剤による副作用は成蜂、蜂児、卵いずれにも認められなかった。試験蜜蜂群から採取した蜂蜜における薬剤残留試験では、逆性石鹼は3日まで残留(1.4ppm)していたが4日目以降で検出限界以下となり、野外での応用が示唆された。PNaは1日目の残留量5,250ppmが2日目以降には検出限界(25ppm)以下であった。

EOガスの殺菌効果は、*A. apis* の人工感染(胞子 $3 \times 10^8$ /mL, 10mL/巣脾片面, 25℃48時間培養定着)後の巣脾につき検討した。その結果、100%の殺菌効果は、作用温度20℃でEOガス濃度2~3%以

上で6時間作用群に認められ、作用温度30℃ではガス濃度1～3%で6時間、5%で2時間であった。

自然感染巣脾に対する防除試験は、感染巣脾をサイズ9×15cmに切断し被消毒薬に24時間浸漬した後、M40Y寒天培地にて培養し真菌の生死を確認した。その結果、逆性石鹼では100倍、200倍、400倍、800倍希釈液では100%の防除効果が認められたが、1,600倍希釈液では無効であった。

ヨード剤では1,600倍希釈液でも殺菌効果が認められたが、残香性が強く実用不適として判断した。殺菌性ガスの効果は、FAガス（前掲）22℃・24時間暴露で88.9%（8/9）、EOガスが30℃・24時間暴露で100%（9/9）であった。

1979年3月九州から岐阜県内へ移動してきた蜂群100群中3群に白色や黒色のミイラ蜂児を認めた。病原学的検査では真菌用培地で白色綿毛状糸状真菌を分離して2週間培養後に子嚢果、子嚢、子嚢胞子の形成が認められ、我が国で初めてチョーク病の発生を確認した。

分離真菌を使って健康蜂群に人工感染させることにも成功した。対応策を検討した結果、逆性石鹼、両性石鹼の効果を確認し、防黴剤ではP Naが有効であった。空巣脾の消毒法としてはFAガス、EOガスによる殺菌法が有効であった。

なお本病は家畜伝染病予防法の改正で届出伝染病に指定されたため、類似疾病が出たら早期に家畜保健衛生所へ届け、家畜防疫員の指示に従うようにしなければならない。

## VI 謝 辞

本研究にあたっては、岐阜家畜保健衛生所の広瀬 勇一 元所長，北進 元病性鑑定課長、園部 修 元微生物係長（現西濃家畜保健衛生所長），さらに終始ご助言ご指導願った麻布大学微生物学第一研究室田淵清 教授，池田輝雄助教授の方々に深甚なる謝意を表します。

また，論文をご校閲願った麻布大学の病理学第一研究室の野村靖夫教授，微生物学第二研究室の原元宣教授，微生物学第一研究室の木内明男助教授に感謝の意を表します。

## VII 参考文献

- 1) Abushady, A. Z. 1975. Races of bees, pp. 11-20. In: The hive and the honey bee. (Grout, R. A. ed). Dadant & Sons, Hamilton, Ill.
- 2) Ainsworth, G. C. 1971. Dictionary of the fungi. 6th ed. Commonwealth Mycol. Inst., Surrey, England.
- 3) Alber, M. 1956. The size of comb cells as a racial characteristic. X V I Intern. Beekeeping Congr. Vienna Apic. Abstr. 241/56.
- 4) Alekseenko, F. M. & Kolomeits, A. Ju. 1967. A study of the virus paralysis of bees in the Ukraine. X X I Intern. Beekeep. Congr. Prelim. Sci. Meet.
- 5) Allen, T., Cameron, S., McGinley, R., & Heinrich, B. 1978. The role of workers and new queens in the ergonomics of a bumblebee colony. J. Kans. Entomol. Soc. 51:329-342.
- 6) Alley, H. 1883. The beekeeper's handy book: twentytwo year's experience in queen-rearing. Salem Press, Salem, Mass.
- 7) Alpatov, V. W. 1929. Biometrical studies on variation and races of the honey bee. Quart. Rev. Biol. 4:1-58.
- 8) Alpatov, V. W. 1948. The strains of the honey Bee and their contribute in in agriculture. Moscow. (In Russian.)
- 9) Anderson, L. D. & Atkins, E. L. 1967 Toxicity of pesticides to honey bees in the field. Apimondia, X X I Intern. apicult. Congr. pp. 194-199.

- 10) Anderson, R. H. 1961. The development of egg laying workers in the Capehoney bee. X V I I I Intern. Beek-keeping Congr. Madrid.
- 11) Anderson, J. 1931. How long does a bee live. Bee World. 12:25.
- 12) Anna Samscinakova, Sylva Kalalova, & Haragsim O. 1977. Effect of some antimycotics and disinfectants on the A. apis fungus in vitro. pp. 225-232. Zeitschrift für angewandte Entomologie.
- 13) 青木 清. 1957. 昆虫病理学. p. 493. 技報堂, 東京.
- 14) 東 量三. 1967. 蜜蜂の腐疽病, pp. 594-604. 家畜伝染病の診断, (農林省家畜衛生試験場技術者集談会編)
- 15) Bailey, L. 1953. The transmission of nozema disease. Bee World. 34:171-172.
- 16) Bailey, L. 1955. The infection of the ventriculus of the adult honeybee by Nozema apis (Zander). Parasitol. 45:86-94.
- 17) Bailey, L. 1957. Comb fumigation for Nozema disease. Am. Bee J. 97:4-26.
- 18) Bailey, L. 1958. The epidemiology of the infestation of the honey bee. Apis mellifera L., by the mite Acarapis woodi Rennie and the mortality of infested bees. Parasitol. 48:493-506.
- 19) Bailey, L. 1961. European foulbrood. Am. Bee J. 101:89-92.
- 20) Bailey, L. 1963a. Infectious Diseases of the Honeybee. p. 176. Land Books Ltd., London.
- 21) Bailey, L. 1963b. The occurrence of chronic and acute

- bee paralysis viuses in bees outside Britain. J. Invert. Pathol. 7:167-169.
- 22) Bailey, L. 1965a. Bee diseases and pests. Rep. Rothamsted Exp. Stn. for 1964. pp. 200-201.
- 23) Bailey, L. 1965b. Paralysis of the honey bee Apis mellifera Linnaeus. J. Invert. Pathol. 7:132-140.
- 24) Bailey, L. 1965c. The effect of erythromycin on Streptococcus pluton (White). J. Apicult. Res. 4:101-103.
- 25) Bailey, L. 1967. The effect of temperature on the pathogenicity of the fungus, Ascosphaera apis for larvae of the honey bee, Apis mellifera. Proc. Int. Colloq. Insect Pathol. Microb. Control. (Wageningen, 1966). pp. 162-167.
- 26) Bailey, L. 1967a. Acute bee paralysis virus in adult honey bees injected with sacbrood virus. Virol. 33:368.
- 27) Bailey, L. 1967b. Bee diseases and pests. Rpt. Rothamsted Exp. Stn. for 1967. pp. 215-218.
- 28) Bailey, L. 1967d. The incidence of virus disease in the honey bee. Ann. Appl. Biol. 60:43-48.
- 29) Bailey, L. & Fernando E. F. W. 1972. Effects of sacbrood virus on adult honeybees. Ann. Appl. Biol. 72:27-35.
- 30) Bailey, L. & Lee D. C. 1962. Bacillus larvae: its cultivation in vitro and its growth in vivo. J. Gen. Microbiol. 29:711-717.
- 31) Baker, G. M. & Torchio, P. F. 1968. New records of Ascosphaera apis from north America. Mycologia. 60:189-190.



- 32) Baker, H. G. 1963. Evolutionary mechanisms in pollination biology. *Science* 139:877-883.
- 33) Baker, H. G. & Hurd, Jr. P. D. 1968. Intrafloral ecology. *Ann. Rev. Entomol.* 13:385-414.
- 34) Betts, A. D. 1919. Fungous diseases of bees. *Bee World*. 1:132.
- 35) Bodenheimer, F. S. 1941. Studies on the Honey Bee and Beekeeping in Turkey. Ankara.
- 36) Borhert A. 1966. Die Krankheiten und Schallinge der Honigbien. S. Hitzal Verlag. Leipzig. pp. 201-206.
- 37) Bornus, L. 1972. Results of the comparative evaluation of hybrids between several races of bees. *Bulletin Scientifique de l'Apimondia*. pp. 121-123.
- 38) Brother A. 1966. In search of the best strains of P. D. bees. Ehrenwirth, Munich.
- 39) Burnside, C. E. 1930. Fungus diseases of the honeybee. *Techn. Bull. U. S. D. A.* 149:42.
- 40) Cale, G. H., Sr. & Gowen, J. W. 1956. Heterosis in the honey bee *Apis mellifera* L. *Genetics* 41:292-293.
- 41) Cale, G. H. Sr. 1957. How the new hybrids affects management. *Am. Bee J.* 97:48.
- 42) Cantwell, G. E., Lehnet, T & Travers, R. S. 1975. USDA research on ethylene oxide fumigation for control of disease and pests of the honey Bee. *Am. Bee J.* 115:95-97.
- 43) Claussen, P. 1921. *Arbeiten Biol. Reichs anst. Landforstw.* 10:467-521.

- 44) Corner, J. & Gochnauer, T.A. 1971. The persistence of tetracycline activity in medicated syrup stored by wintering honey bee colonies. *J. Apicult. Res.* 10:67-71.
- 45) Cotton, R. T. & Roark, C. 1928. The honeybee. *Indust. Eng. Chem.* 20:805.
- 46) Dade, H. A. 1975. The laboratory diagnosis of honeybee disease. *Monographs of the Quekett microscopical club* 4: 648-649.
- 47) Diana, M. M., & Wilson, W. T. 1976. The spread of chalk brood in the north america honey bee, *Apis mellifera*. *Am. Bee J.* 12:570-573.
- 48) Dejong, D. & Morse, R. A. 1976. chalk brood infection. *N. Y. Food. Life Sci.* 9:12-14.
- 49) Deodikar, G. B. C. V. Thakar, C. V., & Pushpan. Shaw. 1969. Cytogenetic studies indian honey bees, 1. Somatic chromosome complement in *Apis indica* and its bearing on evolution and phylogeny. *Proc. Indian Acad. Sci.* 49: 194-206.
- 50) Elbe, H. & Weide, W. 1964. Die Bekämpfung von *Pericystis apis*. *Apicult. Abstr.* 15:72.
- 51) Ericsson, H. M. 1917. Antibiotic sensitivity testing. *Acta path. microbiol. scand. suppl.* p. 217.
- 52) 福島 孝吉. 1979, 真菌症, pp.85-87. 今日の治療指針. 1979年版, (石山俊次, 日野原重明, 阿部正和編), 医学書院, 東京.
- 53) 古谷 航平, 高鳥 浩介, 園部 修, 馬淵 貞三. 1981. 日本国内に発生したミツバチの Chalk brood disease, 日菌報. 22:127-133.

- 54) Fyfe, W. 1964. Abnormalities and diseases of the queen honey bee. *Ann. Rev. Entomol.* 9:207-224.
- 55) Georgiannas, P. 1957. The Greek bee. *Am. Bee J.* 97:314.
- 56) Gerard, M. Thomas, Allen Luce, 1972. An Epizootic of Chalk Brood, A. apis Olive and Spiltoir in the Honey bee, Apis mellifera L. in California. *Am. Bee J.* 12:88-90.
- 57) Gillian M. 1980. Control of Chalkbrood disease of honey bee, Apis mellifera L. difficulties and possibilities. *Honeybee Science.* 1:159-162.
- 58) Glinski, Z., Wolski, T., Chmielewski, M. 1988. *In vitro* studies on the antifungal activity of an extract of the seeds of Archangelica officinalis Hoffm. against Ascosphaera apis. *Medycyna Weterynaryjna.* 44:552-556.
- 59) Glinski, Z. 1978. Wrazilwosc szczepow A. apis na preparaty przeciwnozybnicze ze szczegolnym uwzglednieniem antybiotkow polifunginowych. *Biul. VI Zjazdu PTNW, wroclaw.* p.670.
- 60) Glinski, Z. 1978. Toksycznosc ostraipodostra antybiotkow polifunginowych i amfoterycyny B dla pszczol i czerwiu. *Biul. VI Zjazdu PT NW, Wroclaw.* p.672.
- 61) Glinski, Z. 1978. Badania nad aktywnoscia preparatow polifunginowych w miodziei syropie cukrowym. *Biul. VI Zjazdu PTNW, Wroclaw.* p.673.
- 62) Glinski, Z., Chmielewski, M. 1981. Antifungal activity of certain polyene antibiotics against A. apis the causative agent of chalk brood. *Annales Universitatis Mariae Curie Sklodowska.* 34:1-7.

- 63) Glinski, Z. 1986. Control of chalkbrood of bees with the choline salt of N-gulco-sylpoly fungin (Ascocidin-Polfa). Veterinarni Medicina, 31:442-448.
- 64) Gochnauer, T.A. 1963. Disease and enemies of the honey bee. p.555. Dadans and Sons, Hamilton Ill..
- 65) Gochnauer, T.A., & Hughes, S.J. 1976. Detection of Ascosphaera apis in honey bee larvae (Hymenoptera: Apidae) from eastern Canada. Can. Entomologist 108:985-988.
- 66) Gochnauer, T.A. Boch R., & V.J. Margets. 1979. Inhibition of Ascosphaera apis by citral and geraniol. J. Invertebrate Pathology. 34:57-61.
- 67) Gordon, R., Haynes, W.C. & Pang, C.H.N. 1973. The genus Bacillus. U.S.D.A. Handbook. p.427.
- 68) Grould, J., Henerey, L.M., & Macleod, M.C. 1970. Communication of direction by the honeybee. Science 169:544-554.
- 69) Guy, R.D. 1972. Commercial beekeeping with African bees. Bee World. 53:14-22 & 159-166.
- 70) Haccour, P. 1960. Investigations on the Sahara bee in Morocco. C.R. Soc. Sci. Nat. Maroc. 6:96-98.
- 71) 原 伸也, 岩掘 剛彦, 小栗 諭, 伊東 長生, 1986. ミツバチヘギイタダニがミツバチに及ぼす影響, 畜産の研究. 40:72-74.
- 72) 長谷川 篤彦. 1978. 病原真菌の分類. 日獣会誌. 31:699-707.
- 73) Hammann, E. 1957. Which takes the initiative in the

virgin queens fligh.the queen or the workers. Insect-  
es Sociaux 4:91-106.

- 74)吐山 豊秋.1977.アメリカ腐蛆病の防除に有効な薬剤の検索  
.日獣会誌.50:429-437
- 75)吐山 豊秋.1977.蜜蜂アメリカ腐蛆病の防除薬(1).蜜蜂の飼育  
と生物学. 獣畜新報.50:1001-1004.
- 76)吐山 豊秋.1998.蜜蜂アメリカ腐蛆病の防除薬(2).蜜蜂アメリ  
カ腐蛆病の防除. 獣畜新報.51:15-18.
- 77)Henriksen, C.&Hammer, O. 1957. An experiment in bre-  
eding long-tongued bees. Nord. Bitidskr. 9:11-19.
- 78)Hikosaka O. 1994. Fundamantal research about honey  
products. Animal husbandry 48:34-36.
- 79)広瀬 勇一, 北 進, 園部 修, 馬淵 貞三, 後藤 新平,  
浅野 淳. 1980. 岐阜県下で確認された蜜蜂のChalk brood,  
日獣会誌. 3:77-80.
- 80)Hitchcock, J, D. 1972. Chalk brood disease of honey  
bees: A review. Amer. Bee J. 112:300-301.
- 81)Hitchcock, J, D., & Christen, M. 1972. Occurence of  
Chalk brood (Ascosphaera apis) in Honey bees in the  
United States. Mycologia. 64:1193-1198.
- 82)James, Kwei An. & Kai-kuang Ho. 1980. Studies on noze-  
ma disease of honeybee. Honeybee Science, 1:157-158.
- 83)Jaycox, E. R. 1961. The effects of various foods and  
temperatures on sexual maturity of the drone honey  
bee (Apis mellifera). Ann. Entomol. Soc. Am. 54:519-523.
- 84)Kai-kuang, Ho. & James, Kwei An. 1980. Effects of Gubitol  
and its application methods on honeybee mite (Varroa

- jacobsoni Oudemans) in Taiwan. Honey-bee Science, 1:155-156.
- 85) Kapil, R. P. 1971. A hive for the Indian honey bee. Ap-iacta. 6:107-109.
- 86) 家畜の耐性菌研究会, 1976. 家畜由来の細菌に対する抗生物質等の薬剤最小発育阻止濃度測定法について, 日獣会誌. 29:90-92.
- 87) Karl, von Frisch. 1971. Bees, Their Vision, Chemical Senses, and Language. Revised Edition. 伊藤智夫訳. 1992. ミツバチの不思議. pp. 107-191. 法政大学出版局. 東京.
- 88) Katznelson, H. & C. A. Jamieson, C. A. 1952. Antibiotics and other chemotherapeutic agents in the control of bee diseases. Sci. Agricult. 32:219-225
- 89) Kempff M. N. 1973. African (Brazilian) bee report published in Bolivia. Am. Bee J. 113:344.
- 90) Kerr, W. E. 1957. Introduction of African bees to Brazil. Brazil Apic. 3:211-213.
- 91) Kirby, G. W., Afkin, L. & Frey, C. N., 1936. Food Indust., 8:450-451, 470&480.
- 92) Kleine, G. 1960. The Characteristics of three races of bees: the Italian. Am. Bee J. 100:177.
- 93) Koeniger, N., Ritter, W., & Rutter, F. 1980. Varroa jacobsoni and its control in the FRG. Honeybee Science, 1:151-154.
- 94) Kowalska, M. 1984. Badania nad własnymi ciwosciami morfologicznymi i hodowlanymi A. apis. Pol. Arch. Wet. 23:87.
- 95) Kowalska, M. 1984. Wrazliwosc "in vitro" Ascosphae apis na emioterapeutyki. Polskie Archiwum Wetery naryjne. 24.

:165-172.

- 96) 小林 義雄. 1959. デイボードアスクス, シナクス及びエンドミセス目に就いて. Nagaoa 6:59-87.
- 97) Lindauer, M. 1957. Communication among the honeybees and stingless bees of India. Bee World. 38:3-14&34-39.
- 98) Louveaux, J. 1969. Ecotype in honeybees. Proc. X X II Intern. Beekeeping Congr. Munich. pp. 499-501.
- 99) Luganskii, S. N., & Pavlov, I. B. 1988. Viability of the agent of Ascospheosis of flower pollen and bee bread. Veterinaria. Moscow. USSR, 12:25-28.
- 100) Maassen, A. 1913. Weitere Mitteilungen über die seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen. Mitt. Kaiserl. Biol. Anst. Land-Forstw. 14:48-58.
- 101) Maassen, A. 1916. Bienenkrankheiten. Mitt. Kaiserl. Biol. Anst. Land Forstw. 16:51-58.
- 102) 馬淵 貞三, 園部 修, 北 進, 広瀬 勇一, 1981. 蜜蜂のチョークブルードとその対策, 畜産の研究. 35:43-46.
- 103) 馬淵 貞三, 園部 修, 北 進, 川瀬 則雄, 木村 広, 井上 市郎, 東 量三. 1982. Ascosphaera apis の胞子に対するエチレンオキシサイドガスの殺菌作用, 日獣会誌 35:32-34.
- 104) 松野 哲也. 1992. プロポリスに含まれる生理活性物質「抗ガン物質の探索を中心に」. ミツバチ科学. 13:49-54.
- 105) Macior, L. W. 1970. The pollination ecology of Pedicularis in Colorado. Am. J. Bot. 57:716-728.

- 106)Macior,L.W. 1973. The pollination ecology of Pedicularis on Mount Rainier.Am.J.Bot.60:863-871.
- 107)Macswain,J.W.,Raven,P.H.& Thorp.R.W.1973.Comparative behavior of bees and Onagraceae.IV.Clarkia bees of the western United States.Univ.Calif.Publ. Entomol.70:1-80.
- 108)Mcgregor,S.E., Alcorn,S.M.,Kurtz,E.B.Jr.&Butler,G.D.Jr. 1959. Bee visit to Saguaro flowers.J.Econ.Entomol.52,10 02-1004.
- 109)Manning,A.1956.Some aspects of the foraging behavior of bumble bees.Behavior,9:164-201.
- 110)Maurizo,A. 1934. Die Kalk Brut( Pericystis Mykose) der Bienen. Arch.Bienen,Kunde,15:165-193.
- 111)Maurizo,A.1935.Beitrag zur Kenntis der Pilzglora im Bienens tockeim Bienemstocke. I .Der Pericystis infection der Bienemlar ven.Ber.Schweiz. Botan. Ges.2:133-156.
- 112)Menzel,R.,J.Erber,and T.Masuhr. 1974. Learning and memory in the honeybee.In:Experimental analysis of insect behavior.Browne.L.B.ed.,Springer Verlag. New York.
- 113)Michener,C.D. 1974. The social behavior of the bees.Cambridge,Belknap Press of Harvard University press.
- 114)Michner,C.O. 1972. Final Report.Committee on the African Honey Bee Div.of Biol.and Agr.N.R.C., National Acad.Sci.Washington.D.C.



- 115)水島 裕, 宮本 昭正, 1985. 抗真菌剤, pp.46-50.  
今日の治療薬, 南江堂, 東京.
- 116)Moeller, F.E. 1976. Chalk brood research hat Madis-  
on, Wisconsin. Am.Bee J.116:84. .
- 117)Mohr, J., Mc Kown B., & Muchmore H. 1971. Susceptibil-  
ity of Aspergillus to steroids, amphotericin B and  
nystatin. Am.Rev.resp.Did.103:238.
- 118)長野 整一他. 1977. Bacillus larvaeの芽胞に対するエチ  
レンオキサイドガスの殺菌作用について. 日獣会誌.30:  
554-558.
- 119)中沢 裕之, 藤田 昌彦, 堀江 正一, 竹葉 和江. 19  
92. 畜水産食品中の抗菌物質などの残留問題. 畜産の  
研究.47:135-139.
- 120)Nelson. J.A., Sturtevant A.P. & B.Linebrrg. 1924.  
Growth and feeding of honeybee larvae.p.222.U.S.D.A.  
Bull..
- 121)農林水産省畜産局衛生課監修. 1984. 家畜伝染病予防法  
関係法規集. pp.2-5.文永堂. 東京.
- 122)尾形 学、坂崎 利一. 1970. 真菌, アメリカ腐疽菌,  
家畜微生物学.pp.189-191&230.東京, 朝倉書店.
- 123)Poltev, V.I.& Grobov.O.F. 1967. Rickettsiosis of  
bees Pchelovoclstvo.8:27. (in Russian).
- 124)Prokschl, H. 1953. Beitr gezur Kenntnis der Entwick-  
lungsgeschichte von Percystis apis..Arch.Microbiol.  
18:198-209.
- 125)Roger A.M.1978.honey bee pests predator and diseases.  
pp.79-99.Conell University press.

- 126) 酒井 哲夫, 1992. ミツバチのはなし, pp.10-194. 技報堂出版. 東京.
- 127) 酒井 哲夫, 1993. ミツバチー多彩な利用の可能性, 畜産の研究. 47:213-218.
- 128) Samsinakova, A., Kalalova, S. & Haragsim, O., 1977. Effects of some antimycotics and disinfectants on the Ascosphaera apis fungus in vitro. Z. Angew. Entomol. 84:225-232.
- 129) Schuette, H. A., & Huenink, D. J. 1937. Mineral constituents of honey. II Phosphorus calcium, and magnesium. Food. Res:529-538.
- 130) Schrader, H., and Bossert, E. 1936. Fumigant Composition, U. S., Patent. 2037, 439.
- 131) Shimanuki, H. 1973. Brood diseases of honey bees, pp.86-92. In S. E. McGregor et al. Beekeeping in the United States. Agric. Res. Serv. U. S. D. A., Agric. Handb. 33. 335.
- 132) Shimanuki, H., Lehnert, T. & Knox, D. 1973. Transmission of nosema disease from infected honey bee workers to queens in mating nuclei. J. Econ. Entomol. 66:777-778.
- 133) Shimanuki, H. 1980. Control of American foulbrood disease. Honeybee Science. 1:163-166.
- 134) 清水 明, 長野 整一. 1971. 畜産分野での新薫蒸消毒剤E0ガスの応用方法. (1) 畜産の研究. 25:64-76.
- 135) Skou, J. P. 1972. Ascosphaerales. Friesia 10:1-24.
- 136) Spiltoir, C. F. 1955. Life cycle of A. apis (Pericystis apis). Amer. J. Bee. Bot. 42:501-508.
- 137) Spiltoir, C. F., & Olive, L. S. 1955. A reclassifica-

- tion of the genus Pericystis Betts. Mycolpgia 47:238-244.
- 138) 食品添加物, 農薬残留基準一覧表. 1977. 食品衛生誌. 18: 23-51.
- 139) Taber, S., & Poole, H. K. 1974. Rearing and mating queen and drone honey bees in winter. Ame. Bee J. 114:18.
- 140) Taber, S., Sackett, R. & Mills, J. 1975. A possible control of chalk brood disease Am. Bee J. 115:20.
- 141) 田淵 清, 池田 輝雄. 1992. X V III Ascosphaera 属. p. 145. 獣医真菌学, 5版. 啓明出版, 東京.
- 142) Thienpont, D., Cutsem, J. Van., Cauteren, H. Van. & Marsboom, R. 1981. The Biological and Toxicological Properties of Imazalil. Arzneim. Forsch. Drug. Res. 31:309-315.
- 143) Thomas, G. M. & Luce, A. 1972. An epizootic of chalk brood, A. apis (Maassen and Clausseen). Olive and Spiltoir in the honey bee Apis mellifica L. in California. Am. Bee J. 112:88.
- 144) Thorstensen, K. 1976. Kalkyngel, en so ppsykdom hos bier. Bitidningen. 75:16-21.
- 145) Udagawa, S. & Horie, Y. 1974. Notes on some Japanese Ascomycetes X II. Trans. Mycol. Soc. Japan 15:105-111.
- 146) Vansell, G. H. 1942. Factors affecting the usefulness of honeybees in pollination. p. 650. U. S. D. A. Circ.
- 147) Varitchak, B. 1932. Levolution nucleaire chez le Pericystis apis. C. r. hebd. Sanc Acad. Sci. Fr. 194:300-302.
- 148) Varitchak, B. 1933. Deuxieme contribution. 1, Etude du developpement des Ascomycetes. Le Botaniste. 25:343

- 149) 渡辺 寛, 渡辺 孝. 1991. 近代養蜂, 4 版, 日本養蜂振興振興会, 大洋社, 岐阜市.
- 150) Washington, R. J. 1967. Drones. Am. Bee J. 107:7-9.
- 151) 山本 格也. 1955. 蜜蜂の腐疽病—わが国の養蜂業と腐疽病—. 日獣会誌. 8:153-158.
- 152) 山本 敏弘, 大田 震三, 1989 Melissococcus pluton が確認されたヨーロッパ腐疽病の発生, 日獣会誌. 42:249-254.
- 153) 山崎 幹夫, 堀江 義一, 宇田川 俊一, 越後多嘉志, 君 政子. 1975. はちみつ中の菌類分布について. 食衛誌. 16:1-6.

Doctoral dissertation

## Study on the Chalk(brood) Disease in Honeybees

Summary

2000

Teizo MABUCHI

Chalk(brood) disease in honeybees, otherwise called chalk-brood, is an infectious disease caused by *Ascosphaera apis* (Ascomycota, Plectomycetes, Ascosphaeraceae). It infects honeybee broods(larvae and pupae), and white chalk-like mummification of dead larvae is its characteristics. In beekeeping, the incidence of *Apis mellifera* larvae infections is the major issue.

In 1913, Maassen of Germany first reported this white mummification disease of larvae as "Kalk Brut." Then, in 1916 the causative fungus was named *Pericystis apis*. Claussen conducted detailed study in lifecycle of fungus originated from fungus-infected beebroods. He elucidated that the multinucleated reproductive organ synascus is formed by antheridium developing fertilization tube stretched to ascogonium and fertilizes. Identifying this sexual reproduction, he supported the classification of this fungus to *Pericystis apis* of Ascomycota. Later, detailed mycological observation of this fungus was conducted by Spltoir and Olive (in 1955), and they reclassified and named this fungus *Ascosphaera apis*(*A. apis*).

Currently, sporadic incidences of chalk disease are reported world wide, and the various studies on the control measure are

being conducted. Improvement on beekeeping technique, production of hybrid species for disease resistance, selection of queen, development of microbicidal drug, synthesis of fungicide, and preventing complication with other disease are investigated. However, no decisive method of prevention is yet to be found.

In Japan, Udagawa et al. reported findings of *A. apis* in imported honey from Canada and honey produced in Akita prefecture. Another reports of isolating *A. apis* from honey, collected in Tottori and Akita prefectures, were made by Yamazaki when studying microorganism distribution in honey. Despite these findings, no incidence of chalk disease of honeybee was reported.

Thus, the research in chalk disease of honeybee in actual state of incidence and observation on the course of disease in Japan was far from being sufficient. However, chalk disease is added to the list of "reported communicable diseases" by 1997 "Amendment on infectious disease prevention act of domesticated animals" in Japan. The investigation was needed on this disease as the market demand and import of honey increase, and quarantine operation was required.

The author found the natural incidence of chalk disease through animal hygiene practice, and had opportunities to conduct basic research needed to establish the hygiene guidelines for the prevention of this disease.

This thesis is composed of five sections: 1) Findings of naturally occurred chalk disease, 2) Distribution status of *A. apis*, 3) Pathogenicity of isolated *A. apis*, 4) *In vitro* fungicidal effect of microbicidal drug on *A. apis*, 5) Investigation and research on *A. apis* field prevention. Their outlines are reported as following.

# 1. Naturally Occurred Incidence of Honeybee Chalk(brood) Disease.

On March 1979, three colonies out of 100 bee colonies transported from Kyushu Island to Gifu prefecture was found to contain abnormal honeybee larvae, which was a case of natural chalk disease incidence. Larvae were colored white, black, and dark brown, and were mummified. The numbers of such larvae were found in brood cells in the combs and hive entrance. The hives strength was weakened, and only few worker bees were found around the queen.

In histopathological observation of the disease, from the cuticular layer of mummified larvae, large number of fungus was identified by the red color using PAS staining. Rod-shaped and septate hyphae are sometimes branching in Y shape. Formations of ascomata(cleistothecia) are also observed.

In pathogenic examination of chalk disease, no bacterium was isolated by either blood agar medium or egg yolk agar medium. However, on fungus media, white cotton-like fungal growth was identified from the third day of culture, and from its morphological observation of its hyphae and ascomata(cysts), it is presumed to be *A. apis*.

The isolated fungus has high sugar demand, and after 1-week culture on M40Y agar medium, thin membranous ascomata(cleistothecial cyst), spherically shaped asci(spore ball), and oval shaped ascospore were formed. Thus it was finally classified morphologically as *A. apis* in Ascomycota.

This is the first reported case of naturally occurred chalk (brood) disease. Around the year of 1979, summer time temperature was continuously above 30°C throughout Japan, and it is speculated that such weather may have contributed to the

incidence of this mycosis.

## 2. Distribution Status of *Ascosphaera apis*.

The distribution of this fungus was investigated in honey-bee larvae kept by beekeeper, honey, and pollen. As the result, 16(25.0%) out of 64 beekeepers had identifiable white mummified larvae. *A. apis* were isolated from 80 colonies(25.0%) out of 320. This fungus was isolated from seemingly healthy larvae in the honeybee colonies identified with mummified larvae.

*A. apis* were isolated from honey produced by 16 colonies(5.0%) of 10 keepers out of 320 colonies of 64 keepers. From pollen, the isolated rate was 3 positive cases(4.7%) out of 64 keepers.

## 3. Pathogenicity of Isolated *Ascosphaera apis*.

Pathogenicity of this fungus was investigated by spraying spore solution to healthy larvae and observed for the infection status. Symptoms' rate of appearance increased in positive correlation to the spore concentration. When the spore concentration(sprayed 50mL / a comb-side) was  $10^3$ /mL, the incidence rate was 40.0%;  $10^4$ /mL, 55.0%; and  $10^9$ /mL, 93.0%.

The larvae have high sensitivity to the disease up to 4~5-day old. However, the larvae infected before 3-day old were either liquefied when dead or removed by adult bee, so the incidence of chalk disease was not identified.

The rate of collection of inoculated fungus was complete in artificial infection testing, and *A. apis* was collected from white mummified larvae as in the pure culture.



#### 4. *In Vitro* Fungicidal Effect of Antimicrobial Drugs on *Ascosphaera apis*.

In order to test for fungicidal effect on *A. apis*, each diluted preparation were brought into contact to *A. apis* spore for 2.5, 5, 10, and 15 minutes at 20°C, then cultured in M40Y medium. Observation was made for the growth of fungus, and evaluated with the presence and absence of growth. As the result, among the antiseptic, invert soap had fungicidal effect at 15 minutes contact of 1,600 x dilution, amphoteric soap at 10 minutes of 800 x dilution, and iodine preparation at 15 minutes of 3,200 x dilution.

Among 14 fungicides, sodium propionic acid(PNa) had MIC of 0.04~1.25 mg / mL, which was relatively low in concentration.

Microbiocidal gas, formaldehyde(FA:formalin 40 mL / m<sup>3</sup>, 22 °C) and ethylene oxide gas(EO: 10%, 30°C) did not show sufficient microbicidal effect at 0.5 and 1 hour contact, but 100% fungicidal effect was observed in 24 hours contact.

#### 5. Prevention of Chalk Disease

Antiseptic and erradicative effects of drugs were tested on artificially infected combs in frame, which was prepared three days prior to test with *A. apis* spore solution(50 mL of 10<sup>9</sup> spores / mL solution per one side of comb). After 8 days from spraying invert soap(800 x dilution, 100 mL per one side of infected comb), occurrence of mummified larva was completely lost, and the procedure was recognized as effective. Also, PNa(0.5% solution, 100 mL per one side of infected comb) was found to be completely effective in prevention after 8 days of drug spraying. No side effect was observed for both drugs in adult bees, larvae, and eggs.

In residual drug testing on honey collected from test honey-bee group, residual invert soap(1.4 ppm) was detected up to 3 days

from spraying, but fell below detection limit on 4th day, suggesting the possibility of application to field use. Residual amount of PNa was 5,250 ppm on first day, but fell below detection limit(25 ppm) on second day and after.

Fungicidal effect of EO gas was investigated on *A. apis* artificially infected comb( $3 \times 10^8$ / mL spores, 10 mL per one side of comb, and 48 hours culture in contact at 25°C). As the result, 100% fungicidal effect was observed in contact temperature at 20 °C and over 6 hours contact to EO gas concentration of over 2~3%. At 30°C, it was 6 hours contact to 1~3%, and 2 hours contact to 5%.

Eradication test for naturally infected combs are conducted on 9×15 cm cutting of infected comb submerged in testing antiseptic solution for 24 hours, and culture in M40Y agar medium to test for the survival of fungi. As the result, 100% eradication effect was observed in 100, 200, 400, and 800 x dilutions, but 1,600 x dilution was not effective. Iodine preparation was effective at 1,600 x dilution, but the residual odor was too strong and determined unsuitable for actual use. The effect of microbiocidal gas was 88.9%(8/9) for FA gas(previously mentioned) for 24 hours exposure at 24°C, and 100%(9/9) for EO gas for 24 hours exposure at 30°C.

On March 1979, three colonies out of 100 honeybee colonies transported from Kyushu Island to Gifu prefecture was found to contain mummified larvae of white or black color. In pathogenicity test, white cotton-like isolate of thread shaped fungus was obtained on fungal medium. And after two weeks of culture, formations of ascoma(cleistothecium), ascus(spore ball) and ascospore were identified, and it was the first identified chalk disease

in Japan.

Using the isolated fungus, the artificial infection of healthy honeybee colony was successfully conducted. As the result of investigating for the control measure, invert soap and amphoteric soap were found to be effective, and among the fungicides, PNa was effective. Also as the preventive measure for empty comb, disinfecting by FA gas and EO gas were effective.

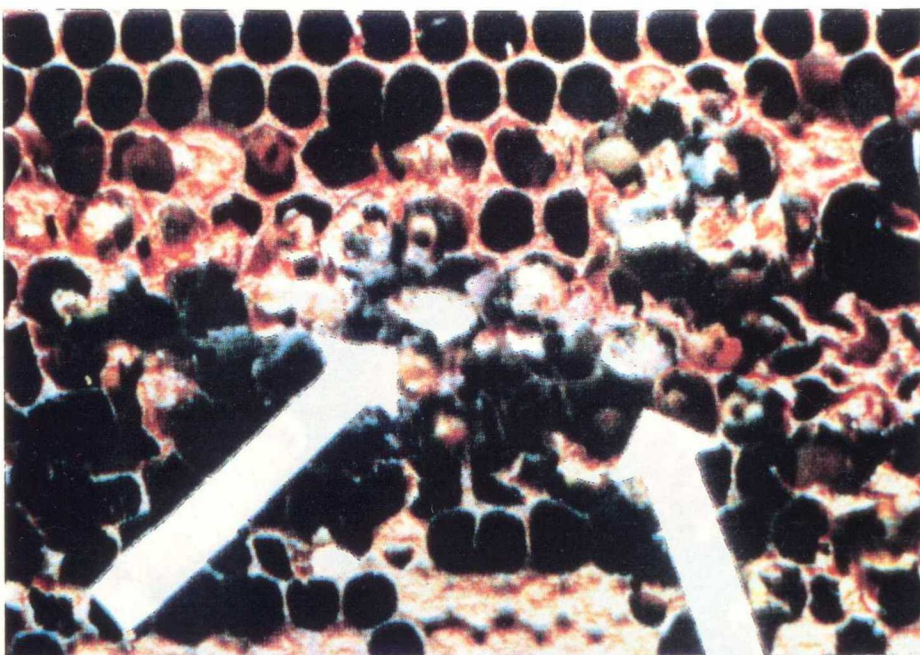


Fig. 1. Honeybee(*Apis mellifera* group) broods in unsealed and sealed cells of a comb, killed by chalk (brood) disease owing to *Ascosphaera apis* infection.



Fig. 2. Healthy pupae(upper row) of honeybee broods (*Apis mellifera* group) and diseased pupae or larvae affected with chalk(brood) disease(lower row).





Fig. 3. The dead larvae covered with whitish mycelia of the fungus, subsequently become mummified in shrunken and chalk-like in appearance. The colour of dead larvae changed gradually to grey or light brown and finally dark brown or almost black following the formation of fungal fruiting bodies.(upper scale size:1 mm).

Fig. 5. Hyphae invaded into the cuticular layer of the mummified brood. (X400, PAS stain)

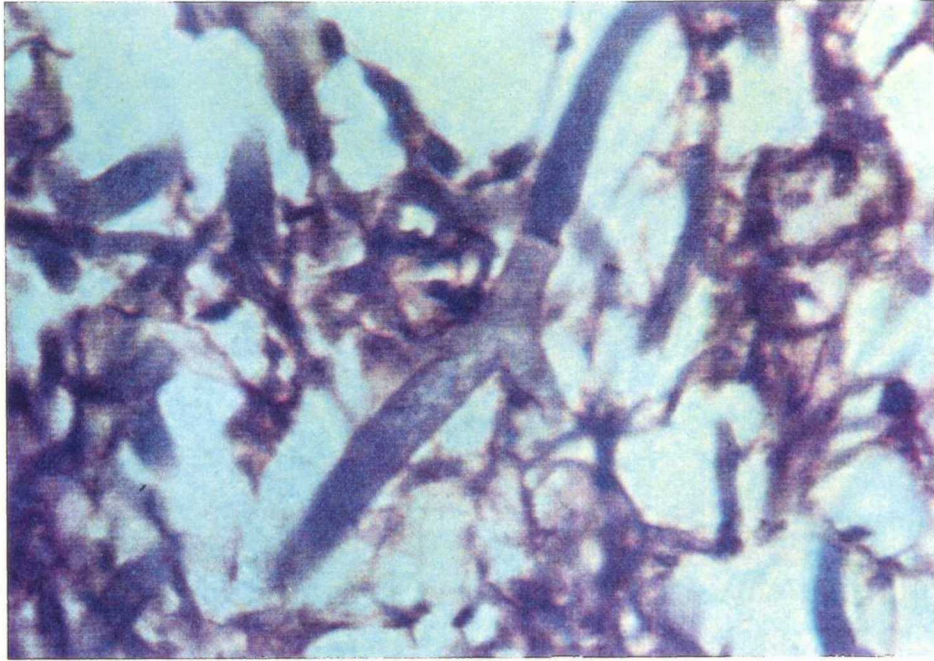


Fig. 4. The Y-shape branched mycelia, septated hyphae in the mummified brood. ( $\times 400$ , PAS stain).

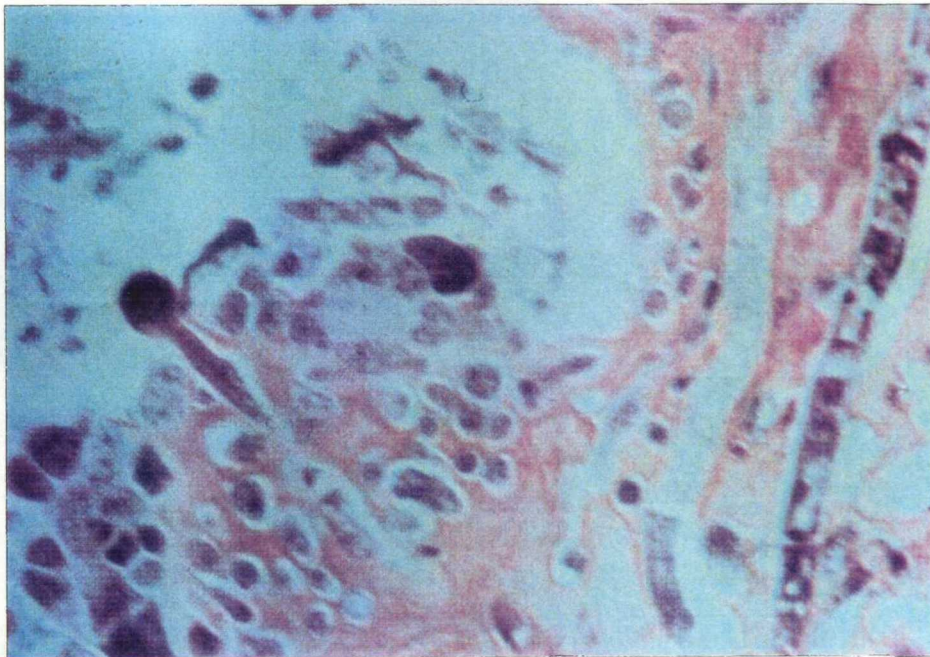


Fig. 5. Hyphae invaded into the cuticular layer of the mummified brood. ( $\times 400$ , PAS stain).



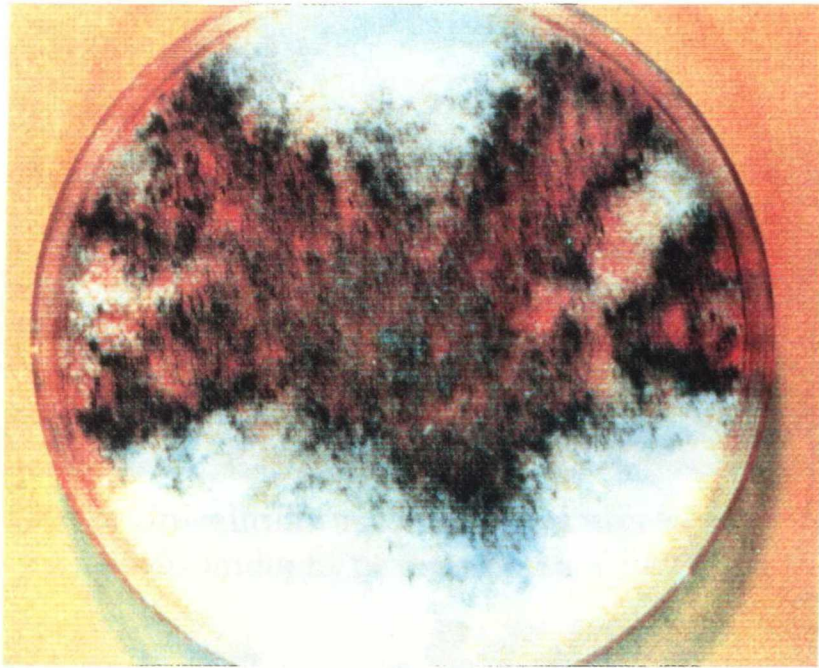


Fig. 6. Cultural findings of *Ascosphaera apis* isolated from the diseased larva, on M40Y agar at 25°C for 7 days.

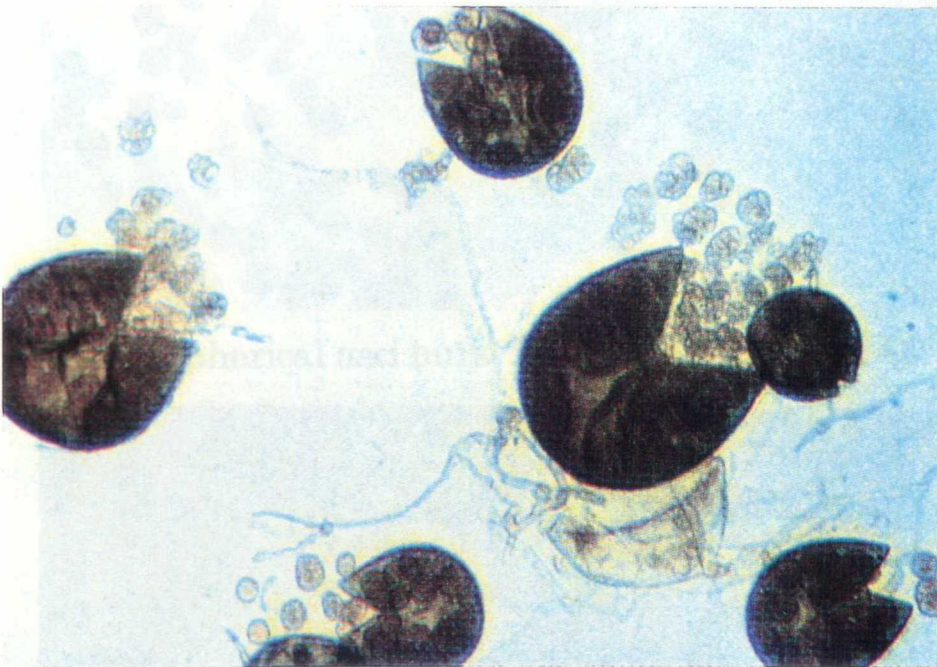


Fig. 7. Matured and burst ascomata(cysts as the cleistothecia) and asci(spore balls) of *Ascosphaera apis*. ( $\times 100$ ).



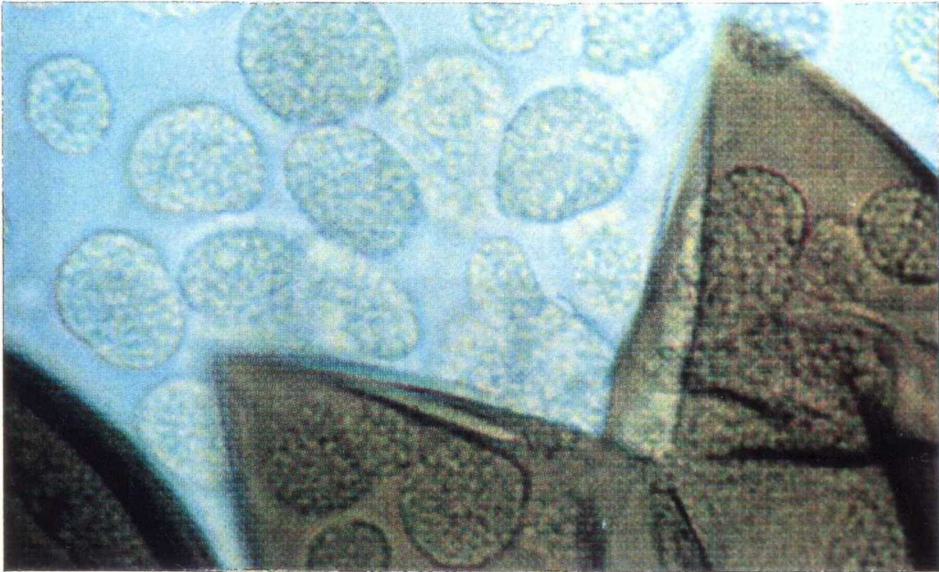


Fig. 8. Unicellular ascomata and asci replete with numerous endophytic ascospores. ( $\times 400$ ).

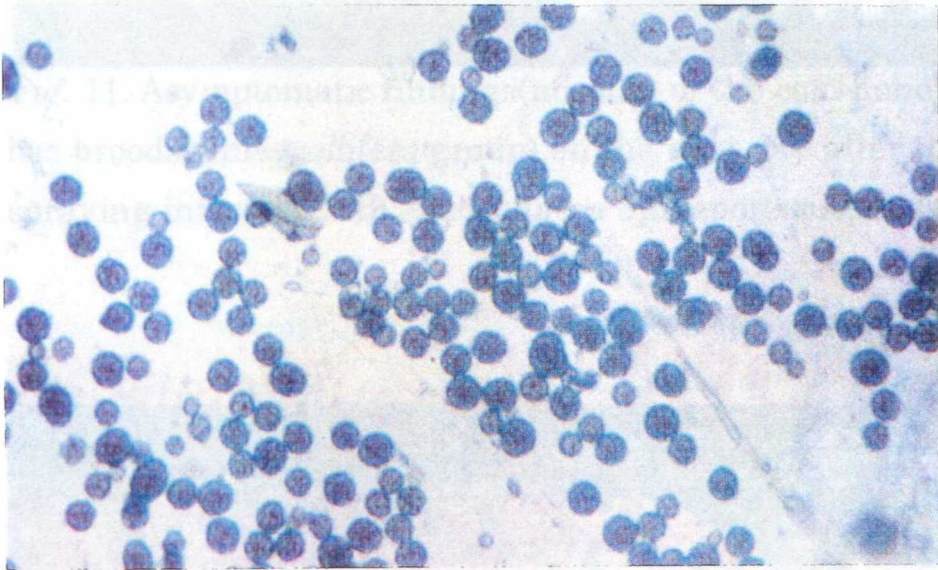


Fig. 9. Spherical asci burst from the ascomata. ( $\times 100$ ).

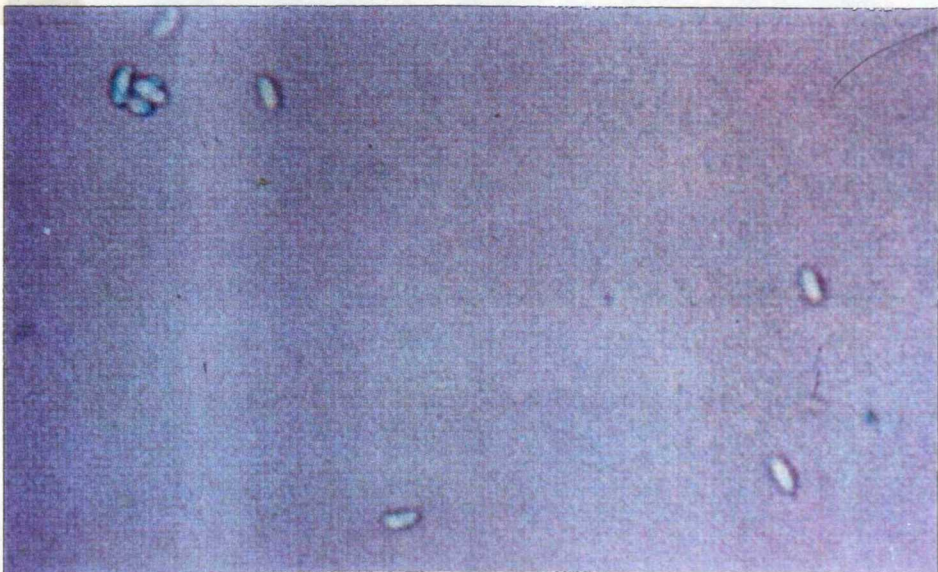


Fig. 10. Ellipsoidal ascospores burst from the asci. ( $\times 410$ )



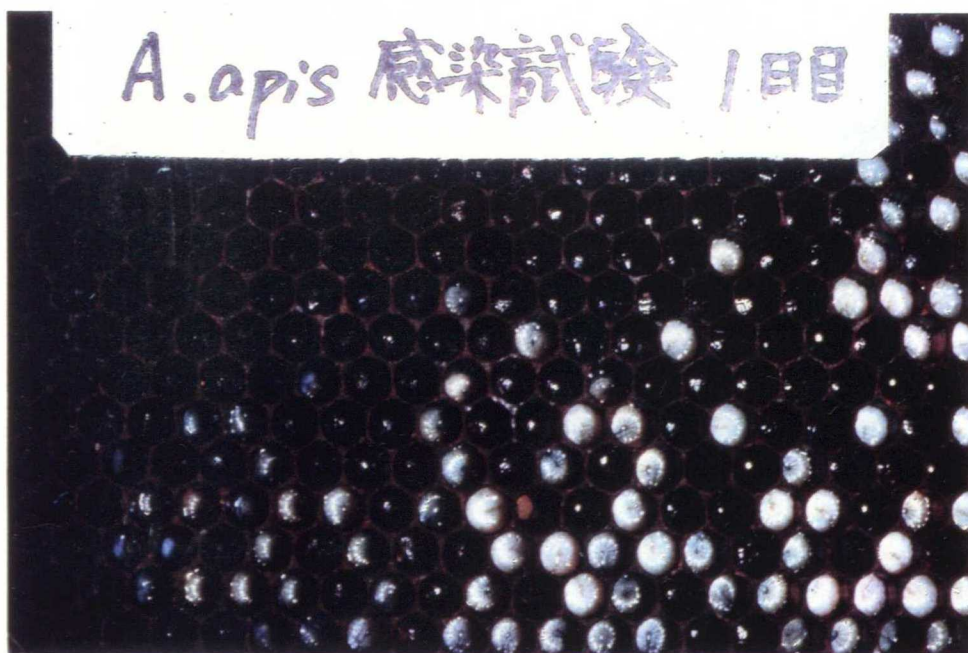


Fig. 11. Asymptomatic findings(normal) of the combhoney-  
bee broods(*Apis mellifera* group) on the next day after the  
spraying infection with *Ascospaera apis* spore suspension.

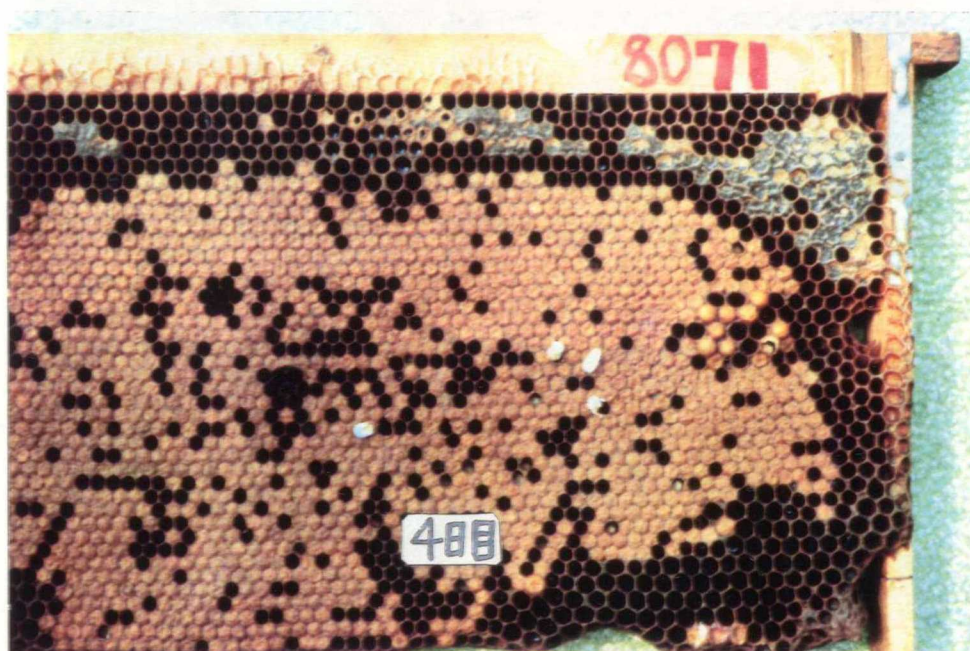


Fig. 12. White mummified larvae and the comb, on  
the 4th day after the *Ascospaera apis* infection.

Fig. 13. The sequential stage of the mummified larvae  
2nd or 3rd days after the *Ascospaera apis* infection.



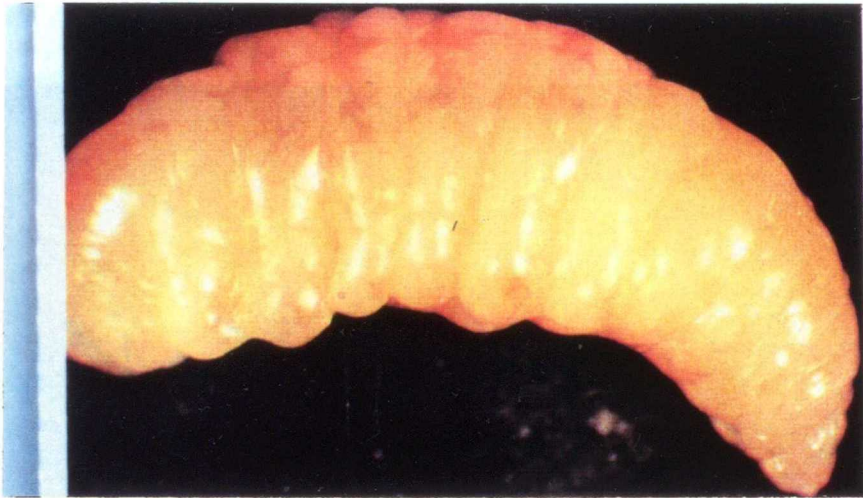


Fig. 13. Healthy larva at 6 days old, of honeybee (*Apis mellifera* group).

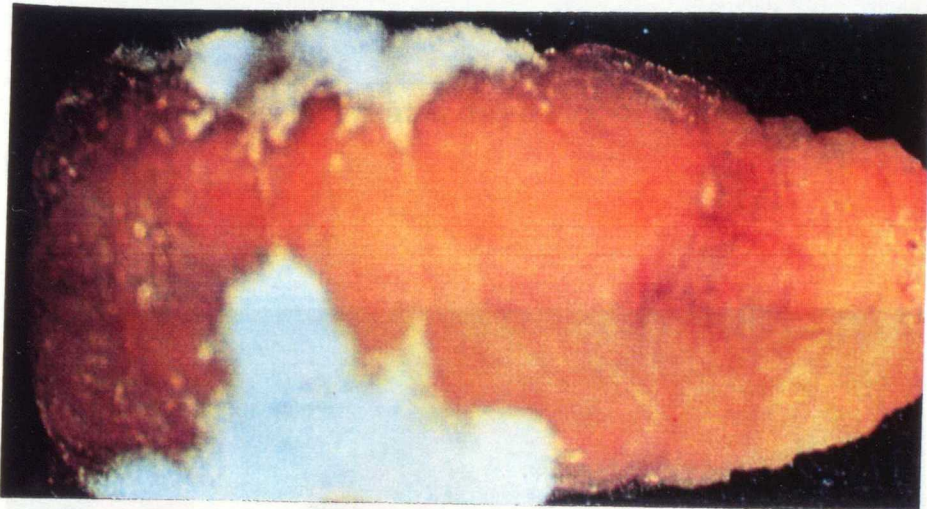


Fig. 14. The initial stage of the male larva infected with *Ascospaera apis*.

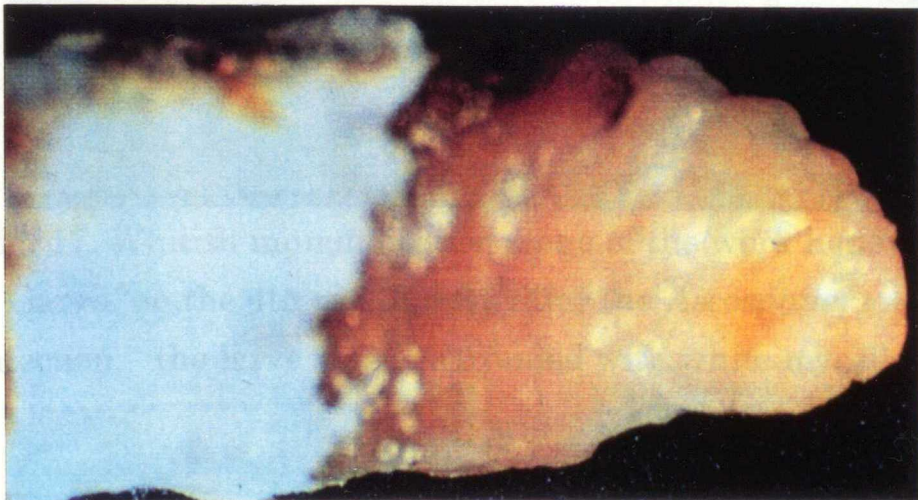


Fig. 15. The sequential stage of the male larva, on the 2nd or 3rd days after the *Ascospaera apis* infection.



Fig. 16. Healthy larva at 6 days old, of the work honey-  
bee(♀) larva.

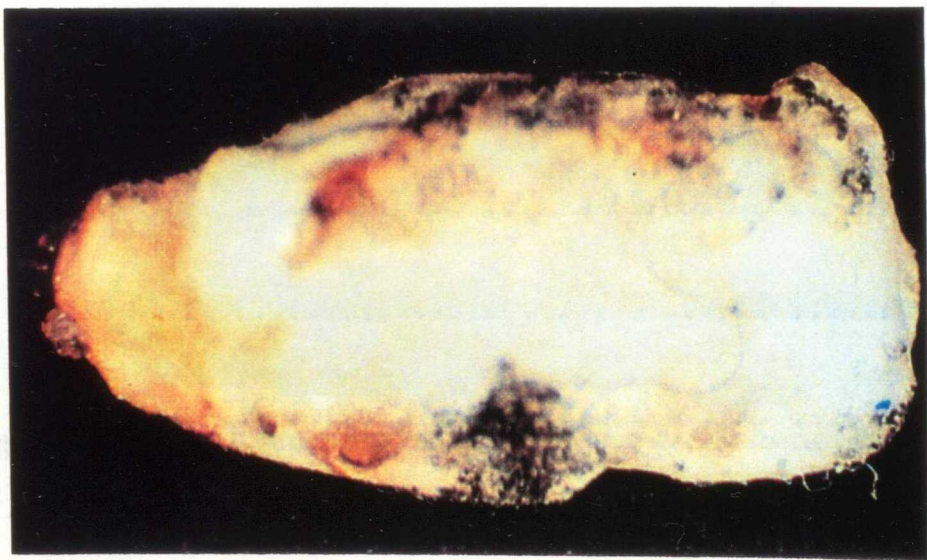


Fig. 17. Whitish mummification stage of the work honeybee  
(♀) larva, on the 4th or 5th days after the *Ascosphaera apis*  
infection, the larva was enshrouded with white mycelia.



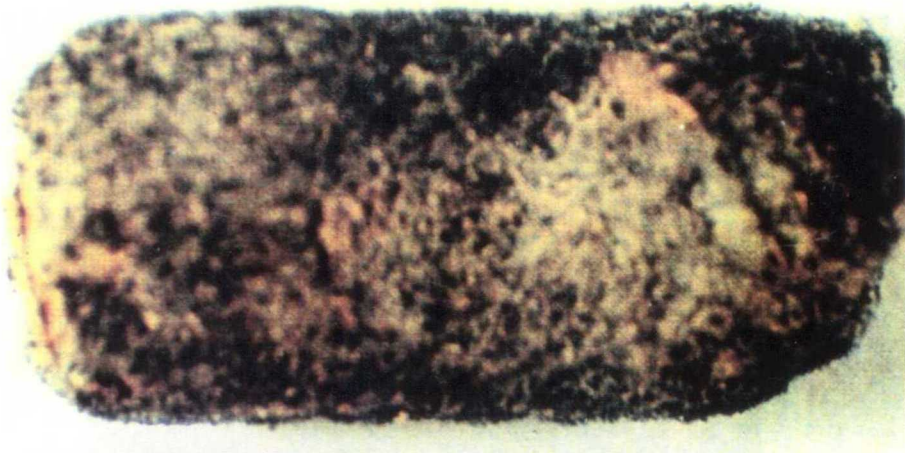


Fig. 18. Mummified stage of the work honeybee(♀) larva on the 7th day after the *Ascosphaera apis* infection, covered up with the fungal mycelia forming of numerous black ascomata.



Fig. 19. The dark mummified stage of the work honeybee (♀) larva.



Fig. 20. Reisolation of *Ascosphaera apis* from the comb broods infected with the fungus spores, culture on M40Y agar at 25°C for 7 days.

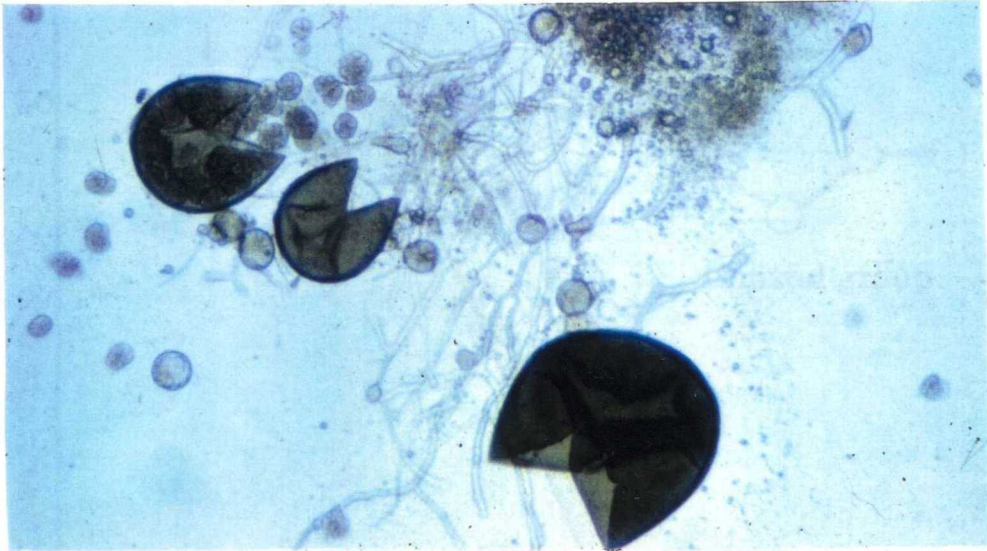


Fig. 21. The ascomata and asci of *Ascosphaera apis* reisolated from the work honeybee broods, experimentally infected with the fungus spores. ( $\times 100$ ).

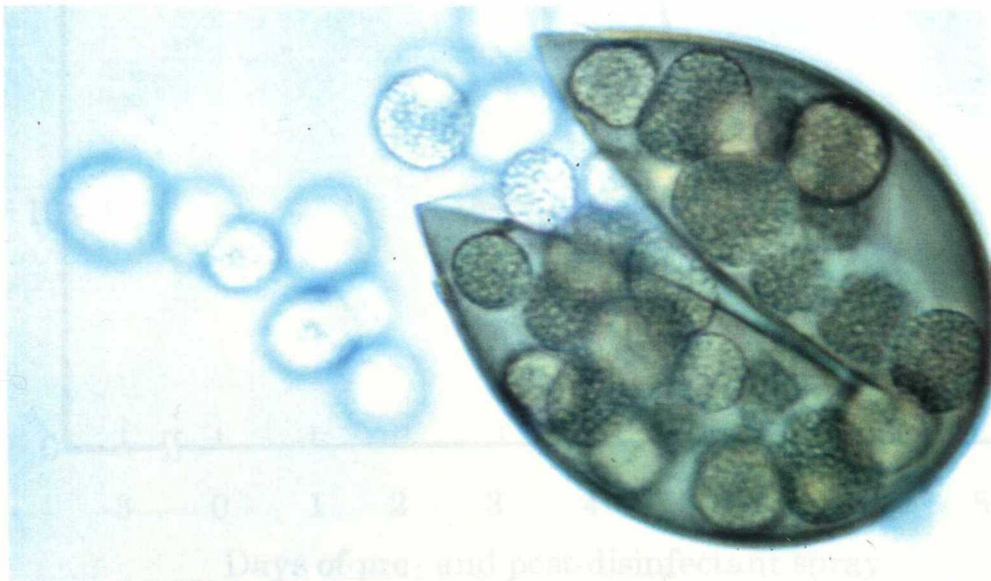


Fig. 22. The ascoma and spherical asci including numerous endospores. ( $\times 400$ ).

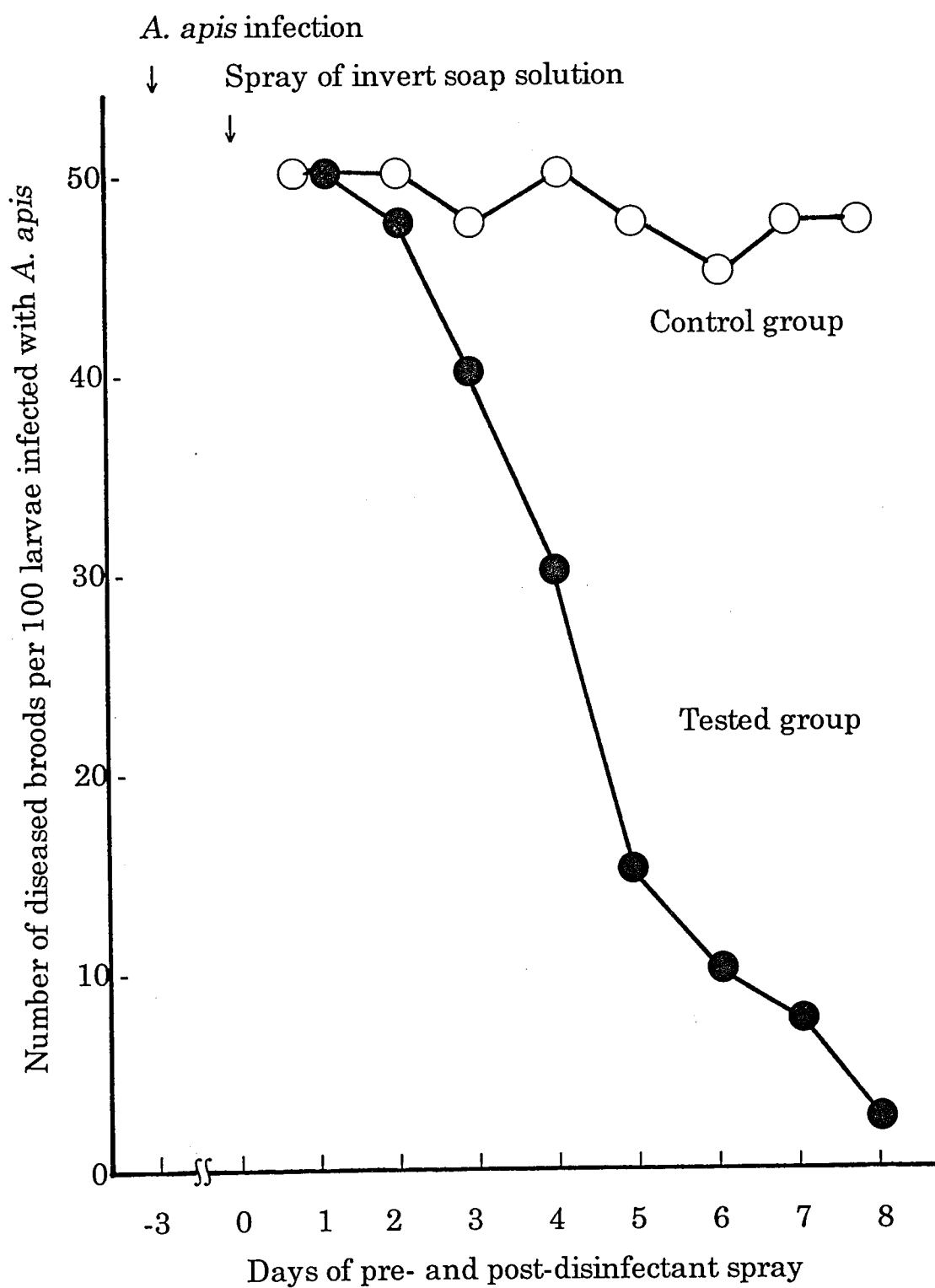


Fig. 23. Reduction of diseased honeybee broods by the spray with 100 mL aliquots of 800-fold cationic surfactant(invert soap) solution per a comb side, on the 3rd day after the *Ascosphaera apis* infection.

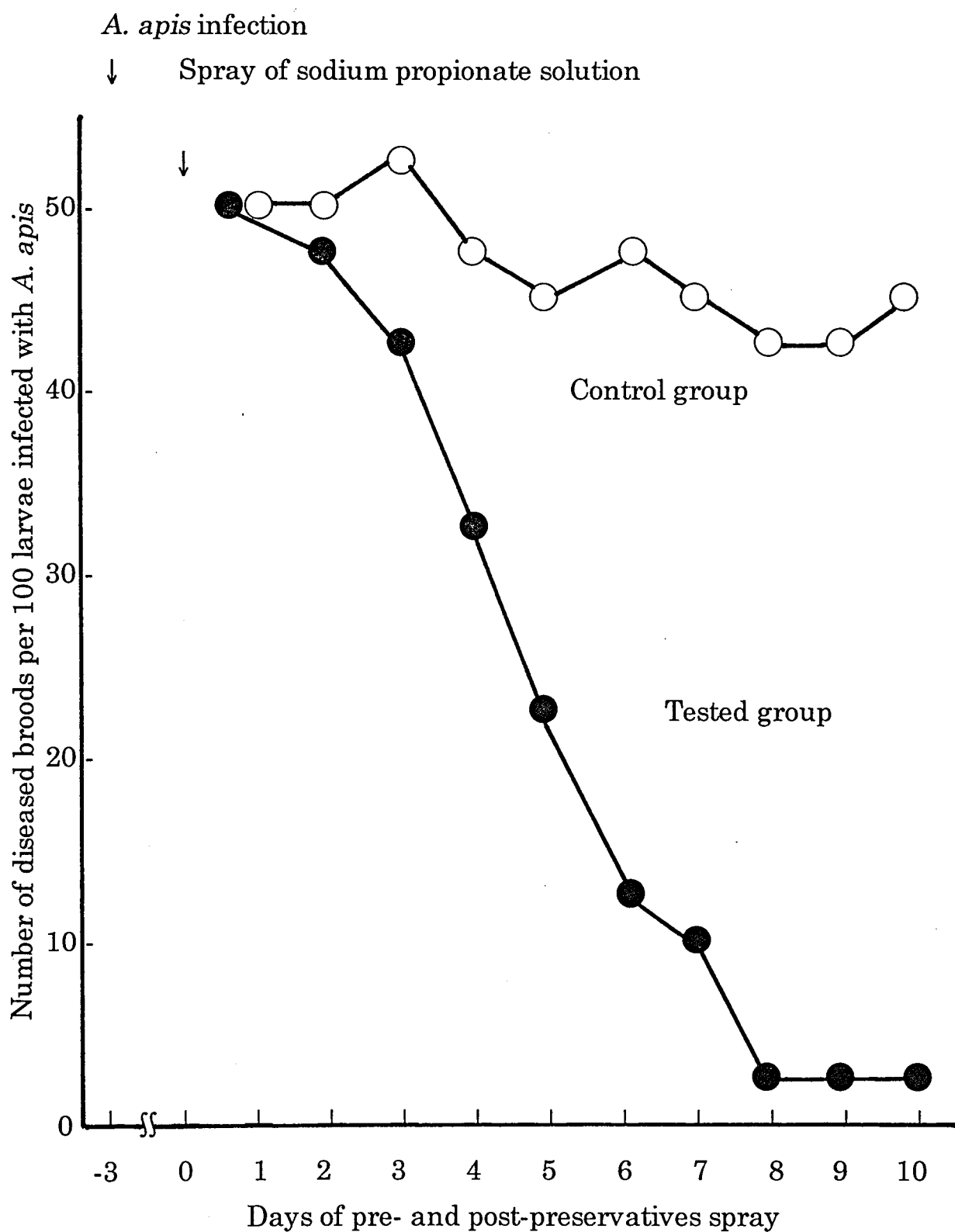


Fig. 24. Reduction of diseased honeybee broods by the spray with 100 mL aliquots of 0.5% preservatives (sodium propionate) solution per a comb side, on the 3rd day after the *Ascosphaera apis* infection.



Table 1. Outbreak of chalk(brood) disease in honeybee groups  
(*Apis mellifera* group) during 1979 in Gifu Prefecture.

No. of bee-keeper	Examined Area/date (County or City)(Month)	No. of bee group	No. of diseased group	Frequency (%)	Pre-keeping area of hive
1	Gifu City/ March	100	3	3.0	Kagoshima Pref.
2	Motosu / April	30	8	26.7	Motosu County
3	Hasima / April	65	14	21.5	Kagoshima Pref.
4	Hasima / April	55	21	38.2	Kagoshima Pref.
5	Hasima / April	50	7	14.0	Kagoshima Pref.
6	Gifu City/ April	107	13	12.1	Hokkaido
7	Gifu City/ April	157	126	80.3	Hokkaido
8	Gifu City/ April	168	70	41.7	Hokkaido
9	Gifu City/ April	41	21	51.2	Hokkaido
Total		773	283	36.6	

Table 2. Questionnaire survey on the outbreak of chalk(brood)  
disease in honeybee groups(*Apis mellifera* group)  
during 1980 in Gifu Prefecture.

Area examined	No. of beekeeper	No. of bee group	No. of diseased group	Frequency (%)
Gifu City	67	2,530	1,140	45.1
Seinou	59	2,595	1,097	42.3
Chunou	25	673	245	36.4
Tounou	33	771	211	27.4
Hida	47	1,495	275	18.4
Total	231	8,064	2,968	36.8

Table 3. Isolation of pathogenic fungi from the honeybee broods  
(*Apis mellifera* group) affected with chalk(brood) disease.

No. of specimen	Bacteria		Fungi		Colony finding	Strain isolated
	5% Sheep- blood agar	Egg-yolk agar	Sabouraud's agar	Czapek-Dox agar		
1	—	—	+	+	Growth of	MS7911
2	—	—	+	+	whitish	KM7922
3	—	—	+	+	filamentous	OM7931
4	—	—	+	+	colonies	MK7942
5	—	—	+	+	incubated	OS7952
6	—	—	+	+	at 25°C	MT7961
7	—	—	+	+	for 3 days	MH7974
8	—	—	+	+	on all	GM7982
9	—	—	+	+	strains	FM7998

Note: +; Growth of the fungus, —; No growth.

Table 4. Biological properties of nine fungi isolated from the honey-  
bee broods(*Apis mellifera* group) affected with chalk(brood) disease.

Morphology

Gram stain : Positive

Mycelium : Septated hyphae

Ascoma : Dark brownish unicellular cyst as the cleistothecium:  
35~100  $\mu$  m.

Ascus : Spherical spore ball with numerous ascospores  
8~20  $\mu$  m.

Ascospore : hyaline ellipsoidal unicellular spore:  
2.3~3.4 $\times$ 1.2~1.5  $\mu$  m.

Chlamydospore: Negative

Asexual conidium: Negative

Cultivation and spore formation

Different media :	Growth rate	Spore formation
Sabouraud' agar :	+	—
Czapek-Dox agar:	+	+
Malt extract agar:	+	+
M40Y agar :	+++	++
Oatmeal agar :	++	++
Weitzman agar :	++	++

Growth temperature: Growth rate for 3 days)

5 $^{\circ}$ C :	—
10 $^{\circ}$ C :	+
25 $^{\circ}$ C :	+
37 $^{\circ}$ C :	+

Survive test

5 $^{\circ}$ C :	> 9 months period
25 $^{\circ}$ C :	> 9 months period

Pathogenicity test in mice

Spore dose inoculated	No. of died animal / tested animal
1 $\times$ 10 <sup>4</sup>	0 / 5
1 $\times$ 10 <sup>5</sup>	0 / 5
1 $\times$ 10 <sup>6</sup>	0 / 5
1 $\times$ 10 <sup>7</sup>	0 / 5
1 $\times$ 10 <sup>8</sup>	0 / 5

Identification of the nine isolated fungi (MS7911, KM7922,  
OM7931, MK7942, OS7952, MT7961, MH7974, GM7982, FM7998) :

*Ascospaera apis*

Table 5. Distribution of *Ascosphaera apis* in honeybee broods, honey and pollen during 1980 in Gifu Prefecture Area.

No. of beekeeper and bee group	No. of <i>Ascosphaera apis</i> isolation(%)		
	Beebrood	honey	pollen
64 beekeepers	16 (25.0%)	10 (15.6%)	13(20.3%)
320 bee groups	80 (25.0%)	16 (5.0%)	15 (4.7%)

Table 6. Experimental infection in honeybee broods(*Apis mellifera* group) by the spraying inoculation with the spore suspension of *Ascosphaera apis* MS7911 strain.

Group of tested comb	Spore dose (spore/mL)	Spray dose (mL/ a comb)	Attack rate (%)
Test-1	$1 \times 10^3$	50	40.0
Test-2	$1 \times 10^4$	50	55.0
Test-3	$1 \times 10^5$	50	93.0
Control-1	0	50	0.0

Table 7. *in vitro* Fungicidal effects of disinfectants to *Ascosphaera apis* MS7911 strain at 20°C.

Disin- fectant	Time of action(min)	Dilution of disinfectants (1:x)							
		50	100	200	400	800	1,600	3,200	6,400
Cationic surfactant	2.5	—	—	—	+	+	+	+	+
	5.0	—	—	—	—	+	+	+	+
	10.0	—	—	—	—	—	+	+	+
	15.0	—	—	—	—	—	—	+	+
Ampholytic surfactant	2.5	—	—	—	+	+	+	+	+
	5.0	—	—	—	—	+	+	+	+
	10.0	—	—	—	—	—	+	+	+
	15.0	—	—	—	—	—	+	+	+
Povidone- iodine	2.5	—	—	—	+	+	+	+	+
	5.0	—	—	—	—	—	+	+	+
	10.0	—	—	—	—	—	+	+	+
	15.0	—	—	—	—	—	—	—	+
Control (Distilled water)	2.5	+	+	+	+	+	+	+	+
	5.0	+	+	+	+	+	+	+	+
	10.0	+	+	+	+	+	+	+	+
	15.0	+	+	+	+	+	+	+	+

Note: +; Growth of the inoculated fungus, —; No growth.

Table 8. *in vitro* Fungicidal effects of preservatives to *Ascosphaera apis* MS7911 strain and *Aspergillus flavus* Link strain at 20°C.

Preservatives	Minimum inhibitory concentration(MIC:mg/mL)	
	<i>Ascosphaera apis</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
Benzoic acid	0.04	1.25
Sodium benzoate	1.25	>10.00
Diphenyl	0.04	>10.00
Sorbic acid	0.04	1.25
Potassium sorbate	1.25	>10.00
Dehydroacetic acid	0.04	0.32
Sodium dehydroacetate	0.08	0.32
Isobutyl benzoate	0.04	5.00
Isopropyl benzoate	0.04	5.00
Ethyl benzoate	0.63	5.00
Butyl bennzoate	0.63	1.25
Propyl bennzoate	0.32	1.25
Calcium propionate	0.04	>10.00
Sodium propionate	0.32	>10.00

Table 9. *in vitro* Fungicidal effects of formaldehyde gas to  
the cultures of nine strains of *Ascosphaera apis*.

Strains tested	Time exposed to formaldehyde gas* at 22°C		
	30 min.	1 hour	24 hours
MS7911	+	+	—
KM7922	+	+	—
OM7931	+	+	—
MK7942	+	+	—
OS7952	+	+	—
MT7961	+	+	—
MH7974	+	+	—
GM7982	+	—	—
FM7998	+	+	—
Control	+	+	+

Notes: \*; Using formalin 40mL and potassium permanganate 40 g in the capacity 1 m<sup>3</sup> cabinet

+; Growth of the inoculated fungus, —; No growth.

Table 10. *in vitro* Fungicidal effects of ethylene oxide gas to  
the cultures of nine strains of *Ascosphaera apis*.

Strains tested	Time exposed to 10% ethylene oxide gas at 30°C		
	30 min.	1 hour	24 hours
MS7911	+	+	—
KM7922	+	+	—
OM7931	+	+	—
MK7942	+	+	—
OS7952	+	+	—
MT7961	+	+	—
MH7974	+	+	—
GM7982	+	+	—
FM7998	+	+	—
Control	+	+	+

Note: +; Growth of the inoculated fungus, —; No growth.



Table 11. Fungicidal effects of the ethylene oxide gas treatment for the honeybee combs\* sprayed with spore suspension of *Ascosphaera apis* MS7911 strain.

Temperature tested	Con. of EO gas(%)	Time exposed to EO gas (hour)					
		1	2	3	6	18	24
20°C	0.0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	0.5	NT	NT	NT	5/5	2/5	2/5
	1.0	NT	NT	NT	4/5	3/5	2/5
	2.0	NT	NT	NT	0/5	1/5	0/5
	3.0	NT	NT	NT	0/5	0/5	0/5
	5.0	1/5	3/5	1/5	NT	NT	NT
	7.0	1/5	1/5	1/5	NT	NT	NT
30°C	0.0	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	0.5	NT	NT	NT	4/5	1/5	0/5
	1.0	NT	NT	NT	0/5	0/5	0/5
	2.0	NT	NT	NT	0/5	0/5	0/5
	3.0	NT	NT	NT	0/5	0/5	0/5
	5.0	1/5	0/5	0/5	NT	NT	NT
	7.0	0/5	0/5	0/5	NT	NT	NT

Notes: \*; Incubated at 25°C for 48 hours after the spray with 10 mL aliquots of spore suspension( $3 \times 10^8$ /mL) per a comb side.

Data; No. of growth/No. of specimens for the fungus,

NT; Not tested.

Table 12. Fungicidal effects by 24 hours dip treatment into disinfectant solution with the comb blocks\* naturally affected with chalk(brood) disease.

Disinfectants	Dilution of disinfectants (1:x)					Remarks <sup>s</sup>
	100	200	400	800	1,600	
Invert soap	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9	No change in bees
Amphoteric soap	0/9	0/9	0/9	0/9	9/9	No change in bees
Povidone-iodine	0/9	0/9	0/9	1/9	9/9	No change in bees

Notes: \*; Comb wax blocks cut 9×15 cm in size.

<sup>s</sup>; Honeybees condition in the hives replaced originally the tested comb blocks.

Data; No. of growth / No. of comb-specimens for the fungus.

Table 13. Fungicidal effects of gas fumigation on the comb blocks\*  
naturally affected with chalk(brood) disease.

Gas	Tempera- ture tested	Time for gas fumigation		
		30 min.	1.0 hour	24.0 hours
Formalde- hyde <sup>s</sup>	22°C	9/9	9/9	1/9
Ethylene- oxide <sup>☆</sup>	30°C	9/9	9/9	0/9

Notes: \*; Comb wax blocks cut 9×15 cm in size.

<sup>s</sup>; Using formalin 40 mL and potassium permanganate 40g in a capacity 1 m<sup>3</sup> cabinet.

<sup>☆</sup>; 10% EO gas(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O 10wt% and CO<sub>2</sub> 90wt%).

Data; No. of growth / No. of comb-specimens for the fungus.

Table 14. Residue of cationic surfactant(invert soap) sprayed\*  
on the honeybee combs

Group of tested comb	Day after the spray	<u>Honey collected</u>		Drug residue in honey(wt ppm)
		dose(mL)	Weight(g)	
Test-4	1	415	523	2.6
	2	1,220	1,525	1.2
	3	420	550	1.4
	4	560	745	< DL <sup>s</sup>
	5	810	1,045	< DL
	6	720	1,008	< DL
	7	410	517	< DL
Control-2	1	640	877	< DL
	2	525	720	< DL

Notes: \*; Spray with 100 mL liquots of the 800-fold cationic  
surfactant solution per a comb side.

<sup>s</sup>; Below the detective limit of the colorimetric analysis.

Table 15. Residue of preservatives(sodium propionate) sprayed\*  
on the honeybee combs

Group of tested comb	Day after the spray	Honey collected dose(mL)	Weight(g)	Drug residue in honey(wt ppm)
Test-5	1	435	550	5,250
	2	620	780	< DL <sup>s</sup>
	3	425	560	< DL
	4	510	680	< DL
	5	790	1,020	< DL
	6	540	760	< DL
	7	380	480	< DL
Control-2	1	640	877	< DL
	2	525	720	< DL

Notes: \*; Spray with 100 mL liquots of 0.5% sodium propionate solution per a comb side.

<sup>s</sup>; Below the detective limit of the gas chromatography.