

氏 名 (本 籍)	馬 淵 貞 三 (岐阜県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	乙第381号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	蜜蜂のチョーク病に関する研究
論文審査委員	(主査) 田 淵 清
	(副査) 野 村 靖 夫
	原 元 宣
	木 内 明 男

論 文 内 容 の 要 旨

蜜蜂のチョーク病 chalk (brood) disease はチョークブルード chalk-brood 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最も重要である。

この蜂児の白色ミイラ化する疾病については、1913年にドイツの 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伸長し造卵器に受精して受精造卵器 synascus となることを明らかにした。そして、この有性生殖を確認したことから本菌を子囊菌門の菌種 *Pericystis apis* と提唱することを支持した。その後、Spltoir と Olive (1955) は本菌に関する詳細な真菌学的観察をおこなって本菌を再分類し、*Ascosphaera apis* (以下 *A. apis*) と命名した。

現在では、世界各地でチョーク病の発生が散発し、その対応策について種々研究されている。そして飼養改善、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。

わが国では宇田川らがカナダ産の輸入蜜蜂および秋田県産蜜蜂から、また山崎が蜜蜂中の菌類分布について調査した際に鳥取県および秋田県下で採取した蜜蜂中から、それぞれ *A. apis* を分離した報告があるが、蜜蜂チョーク病の発生報告は未だなかった。

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および病性経過所見等の掌握は必ずしも十分とは言い難い状態にあるが、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。蜜蜂の需要増加と相まって輸入品の増加なら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検討・研究したものであり、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。蜂児は白色および黒色暗褐色でミイラ化しており巣脾の中および巣門の入り口に多数認められた。女王蜂周辺には少数の働蜂しか見られず、蜂勢は弱体化していた。

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の内にPAS染色で赤く染まる多数の真菌を認め、菌糸は棒状、有隔壁性でY字状に分岐した菌糸も存在し、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、その菌糸および子嚢果（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強く、M40Y寒天培地による1週間培養にて薄膜性の子嚢果（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* であると最終的に同定された。

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年前後の年は夏期に30°C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。ミイラ蜂児が確認さ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。

蜜蜂では64戸320群中10戸16群（5.0%）から *A. apis* が分離され、花粉では64戸中3戸（4.7%）に *A. apis* 陽性であった。

3. *Ascosphaera apis* の病原性

本菌の病原性は、健康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 、 10^5 / mL（50mL / 巣脾片面）と濃くなるほど発病率は高く、それぞれ40.0%、55.0%、93.0%の陽性結果であった。

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では白色ミイラ蜂児から *A. apis* がいずれもほぼ純培養状に検出された。

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

A. apis に対する薬剤の殺菌効果は、各薬剤希釈液に本菌の胞子を20°Cで2.5、5、10、15分間作用させた後、M40Y培地にて培養し真菌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15分間の処理で殺菌効果を認めた。

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

殺菌性ガスのホルムアルデヒド(FA)ガス(Formalin 40mL / m³、22°C)、エチレンオキシド(EO)

ガス（10%、30℃）ともに0.5、1時間の作用時間では十分な効果を認めなかったが、24時間では100%の殺菌効果を示した。

5. チョーク病の防除法

A. *apis* の人工感染（孢子 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日目にミイラ蜂児が完全になくなり十分な効果が認められた。また、0.5% PNa 液（100mL / 感染巣脾片面）の噴霧でも8日目には完全な防除効果を認めた。そして、この両薬剤試験巣脾を戻した巣箱における成蜂、蜂児、卵いずれにも薬剤の副作用は認められなかった。

この試験蜜蜂群から毎日採取した蜂蜜における残留試験の結果では、逆性石鹼は3日目まで残留（1.4ppm）を認めたが、4日目以降では検出限界以下となったことから野外での応用が示唆された。また、PNa は1日目の残留量5,250ppm が2日目以降では検出限界（25ppm）以下となった。

EO ガスの殺菌効果は、A. *apis* の人工感染（孢子 3×10^8 / 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%殺菌効果は、作用温度20℃のもとEO ガス濃度2～3%以上での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時間作用群、5%濃度では2時間作用群に確認された。

自然感染巣脾に対する防除試験は、感染巣脾（wax）をサイズ9×15cmに切断して被験消毒液に24時間浸漬した後、M40Y寒天培地にて培養し真菌の生死を判定した。その結果、逆性石鹼の100倍、200倍、400倍、800倍希釈液では100%の殺菌・防除効果を認めたが、1,600倍希釈液は無効であった。ヨード剤では1,600倍希釈液でも防除効果が認められたが残香性強く実用不適と判断した。

殺菌性ガスについては、FA ガス（前掲法）での22℃・24時間暴露により88.9%（8 / 9）、EO ガス（前掲法）での30℃・24時間暴露により100%（9 / 9）の効果が認められた。

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の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、わ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。そして、本病防退のための対応策について検討した結果、逆性石鹼、両性石鹼に防除効果を認め、防黴剤ではPNaが有望であった。また、空巣脾の消毒法としてはFA ガス、EO ガスによる殺菌が効果的であることが推定された。

論文審査の結果の要旨

蜜蜂のチョーク病は子嚢菌門の *Ascosphaera apis* による真菌性感染症であり罹患蜂児（幼虫・蛹）の感染死、白墨状ミイラ化が特徴とされている。養蜂上では特にセイヨウミツバチ *Apis mellifera* の幼虫感染が問題であり、その対策については種々研究されているものの未だ有効な防除法が確立できていない現状である。

わが国では、輸入蜜蜂および本邦産蜜蜂などからの A. *apis* の分離報告例があるものの蜜蜂チョーク病の自然発生例の報告はない。本病は1979（平成9）の「家畜伝染病予防法の改正」で新たに「届出伝染病」に追加指定されたが、蜜蜂の需要増加と相まって輸入品の増加なら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ついて、1)その自然発生例所見、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関して検討・研究したものである。その概要は下記のとおりである。

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。感染死蜂児は白色または黒褐色でミイラ化し、巣脾内、特に巢門近辺に多数認められ、蜂勢は弱体化していた。

病理組織学的所見ではミイラ蜂児のクチクラ層の内にPAS染色で赤く染まる多数の真菌を認め、菌糸は棒状、有隔壁性でY字状に分岐した菌糸も存在し、子嚢果（胞子嚢）の形成も確認された。

病原学的検査では、病原細菌の分離培養は陰性であったが、真菌培地での培養3日目より白色綿毛状の有隔壁性真菌が生育しこの分離真菌は糖要求性強く、M40Y寒天培地による1週間培養にて薄膜性の子嚢果（胞子嚢）、球状の子嚢（胞子球）、楕円形の子嚢胞子を形成し、最終的に子嚢菌門の *A. apis* と同定された。

本症例はわが国初のチョーク病の自然発生例である。

2. *Ascosphaera apis* の分布状況

本菌の分布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320群中16戸80群（25.0%）に白色ミイラ蜂児が認められ *A. apis* が分離された。ミイラ蜂児が確認さ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。

蜜蜂では64戸320群中10戸16群（5.0%）から *A. apis* が分離され、花粉では64戸中3戸（4.7%）から *A. apis* が検出された。

3. *Ascosphaera apis* の病原性

本菌の病原性は健康蜂児に胞子液を噴霧して感染状況が観察された。病像出現率は、胞子濃度が 10^3 、 10^4 、 10^9 / mL (50mL / 巣脾片面) と濃くなるほど高く、それぞれ40.0%、55.0%、93.0%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発生は確認されなかった。

人工感染試験における接種真菌 *A. apis* の回収は白色ミイラ蜂児からいずれもほぼ純培養状に検出された。

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

A. apis に対する薬剤の殺菌効果は、各薬剤希釈液に本菌の胞子を20℃で2.5、5、10、15分間作用させた後、M40Y培地にて培養し真菌生育の有無で判定した。その結果、完全な殺菌効果は逆性石鹼（1,600倍希釈液15分間）、両性石鹼（800倍希釈液10分間）、ヨード剤（3,200倍希釈液15分間）処理で認められた。

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

殺菌性ガスのホルムアルデヒド (FA) ガス (Formalin 40mL / m³、22℃)、エチレンオキシド (EO) ガス (10%、30℃) とともに24時間処理で100%の殺菌効果を示した。

5. チョーク病の防除法

A. *apis* の人工感染（孢子 10^8 / 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日目に十分な効果が認められ、また、0.5% PNa 液（100mL / 感染巣脾片面）の噴霧でも8日目には完全な防除効果を認めた。そして、この両薬剤試験巣脾を戻した巣箱における成蜂、蜂児、卵いづれにも薬剤の副作用は認められなかった。

この試験巣箱蜜蜂群について連日採蜜し、この蜂蜜中の薬剤残留量を測定した結果、逆性石鹼は3日目まで残留（1.4ppm）を認めたが4日目以降では検出限界以下となり、野外での応用が示唆された。また、PNa は1日目の残留量5,250ppm が2日目以降では検出限界（25ppm）以下であった。

EO ガスの殺菌効果は、A. *apis* の人工感染（孢子 3×10^8 / mL、10mL / 巣脾片面、25°C48時間培養定着）後の巣脾につき検討した。その結果、100%殺菌効果は、作用温度20°C・EO ガス濃度2～3%以上の6時間作用試験区に認められ、作用温度30°C・ガス濃度1～3%での6時間作用試験区、5%濃度2時間作用試験区に確認された。

自然感染巣脾（wax）をサイズ9×15cmに切断して被験消毒液に24時間浸漬した後、M40Y寒天培地にて培養し真菌発育の有無で判定した。その結果、逆性石鹼の100～800倍希釈液では100%の殺菌・防除効果を認めた。ヨード剤では1,600倍希釈液でも防除効果が認められたが残香性強く実用不適と判断された。

殺菌性ガスについては、FA ガス（前掲法）での22°C・24時間暴露により88.9%（8 / 9）、EO ガス（前掲法）での30°C・24時間暴露により100%（9 / 9）の効果が認められた。

著者は本研究によって、蜜蜂チョーク病の自然感染例の病像所見ならびに病原学的診断法を明らかにし、分離真菌 A. *apis* を用いた健康蜂児への人工感染に成功した。そして本菌に対する殺菌剤について *in vitro* ならびに *in vivo* 試験結果から、本病防遏のための消毒剤として逆性石鹼、両性石鹼に防除効果を認め、防黴剤ではPNaが有望であり、また、空巣脾の消毒法としてはEO ガスおよびFA ガスの燻蒸処理が効果的であることを明らかにした。

本研究は病原微生物学ならびに予防獣医学上に寄与するところ大であり、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績であると評価する。