

ミツバチおよびマルハナバチにおける微胞子虫の浸潤状況

平成 25 年 5 月 24 日受付

高橋 純 一^{1,2)}

竹内 実^{1,2)}

松本 耕三^{1,2)}

野村 哲郎^{1,2)}

¹⁾ 京都産業大学総合生命科学部

²⁾ 京都産業大学ミツバチ産業科学研究センター

要 旨

微胞子虫の寄生により発症するノゼマ病は、ミツバチやマルハナバチのコロニーが死滅する重篤な病気である。国内に生息しているミツバチおよびマルハナバチに寄生する微胞子虫の浸潤状況を PCR 診断法により検出し、シーケンス解析により同定を行った。セイヨウミツバチ、ニホンミツバチ、セイヨウオオマルハナバチの 3 種において、*Nosema apis* と *N. bombi* の寄生がそれぞれ確認された。セイヨウオオマルハナバチは、採集した全地域の個体から *N. bombi* が検出された。rRNA のシーケンス解析からは、国内でミツバチに寄生している *N. apis* は、病原性の低い系統であることが示唆された。

キーワード：ミツバチ、マルハナバチ、微胞子虫、*Nosema apis*、*Nosema bombi*

1. はじめに

ミツバチは、膜翅目ミツバチ科ミツバチ属 (*Apis*) に分類されるハナバチ類の総称で、世界に 9 種が分布している [1]。日本では、在来種のニホンミツバチ *A. cerana japonica* と、明治時代に養蜂種として輸入されたセイヨウミツバチ *A. mellifera* の 2 種が、蜂蜜をはじめとする食料生産や農作物の花粉交配に利用されている。花粉交配を目的として、ミツバチの他に同じミツバチ科のマルハナバチ属 (*Bombus*) に分類されるマルハナバチ類が、ミツバチが利用できない条件下で利用されている。日本には、在来のマルハナバチが 14 種と、外来種のマルハナバチが 1 種生息しているが [2]、そのうち在来種のクロマルハナバチ *B. ignitus* と、外来種のセイヨウ

オオマルハナバチ *B. terrestris* の2種が、ミツバチが訪花しないトマト等の受粉昆虫として利用されている。しかし、2006年頃から世界各地でミツバチおよびマルハナバチのコロニーが、大量死する現象が報告され、農業および生態系保全上の問題となっている。大量死の原因については諸説あるが、その1つとして、微胞子虫類の寄生による可能性が指摘されている [3]。

微胞子虫 (Microsporidia) は、動物の細胞内に寄生する単細胞真核生物で、これまでに1000種以上が、昆虫類、甲殻類、魚類、哺乳類などに寄生することが知られている [1,4]。微胞子虫類は、分類学的に原生動物であると考えられていたが、最近の分子系統解析の結果によると、接合菌と近縁な菌類に属する可能性が示唆されている [5]。微胞子虫類に寄生されると、宿主は、寿命の短命化や繁殖能力の低下を示すことから、農業や漁業分野では深刻な影響を及ぼす病原性微生物として認識されている。日本では、古くからセイヨウミツバチに寄生する *Nosem apis* は、セイヨウミツバチのコロニーに寄生すると、成虫の働き蜂や幼虫が致死性の症状を呈することから、家畜伝染病予防法上の監視伝染病 (届出伝染病) のノゼマ病に指定されている。ミツバチのノゼマ病の薬剤として、抗生物質のフマギリンが海外では使用され一定の効果が得られている。日本では、フマギリンは動物用医薬品として認可されていないため使用することができないため、現状は防除が難しい状態である。また、ノゼマに寄生された個体は、形態的变化を示さないことから外観上から判断することは困難である。現在は、成虫の糞便の顕微鏡検査による胞子の観察、またはPCR法による遺伝子診断が必要である [1,3]。したがって、養蜂従事者が、現場でノゼマ病を判定することは難しく、実際に国内で飼養されているミツバチのコロニーにどの程度 *N. apis* が浸潤しているのか不明である。また、マルハナバチ類には、同じノゼマ属 (*Nosema*) の *N. bombi* が寄生することが知られている [4]。日本では、農作物の受粉用に輸入されたセイヨウオオマルハナバチのコロニーから本種に寄生された個体が見つかる [6]。北海道でトマトハウスの受粉用昆虫として持ち込まれたセイヨウオオマルハナバチの一部の個体が、ハウスから逃げ出し、北海道全域に帰化したことから特定外来種に指定されている。このセイヨウオオマルハナバチに随伴して持ち込まれた *N. bombi* が、在来マルハナバチへ水平感染することが危惧されているが、在来マルハナバチにおける *N. bombi* の浸潤状況については不明である。カナダやアメリカ北部では、*N. bombi* の寄生により野生マルハナバチ類が死亡し、多くの種が絶滅の危機に瀕していることが報告されている [7]。

本研究では、ミツバチに寄生し、コロニー大量死の原因病原体の可能性のある *N. apis* と、マルハナバチに寄生し、個体数を減少させている可能性のある *N. bombi* の2種が、国内においてどの程度浸潤しているのか不明であるため、PCR診断法とシーケンス解析により寄生状況および系統について調査した。

2. 材料及び方法

1. 供試虫

本研究では、国内のミツバチおよびマルハナバチにおける *N. apis* および *N. bombi* の寄生状況を調べるため、在来種で広域分布種のニホンミツバチ、エゾオオマルハナバチ *B. hypocrita sapporoensis*、オオマルハナバチ *B. h. hypocrita* と、農業分野の生物資材として利用されている外来種のセイヨウミツバチおよびセイヨウオオマルハナバチを対象種とした。捕獲は、2010年から2013年にかけて訪花中の個体を捕虫網により女王蜂または働き蜂を採集した。採集した個体は、PCR法を利用して寄生の有無を判別するため、採集後、直ちに99%エタノールの液浸標本とし、DNA抽出実験まで冷蔵保存した。

解析に使用したニホンミツバチは、青森県横浜町、岩手県盛岡市、福島県福島市、埼玉県久喜市、東京都町田市、新潟県上越市、京都府京都市、滋賀県大津市、広島県広島市、福岡県小倉市、鹿児島県鹿児島市、長崎県対馬市から各20個体ずつ採集し、合計240個体を使用した。セイヨウミツバチは、北海道札幌市、岩手県盛岡市、福島県福島市、埼玉県久喜市、東京都町田市、新潟県上越市、京都府京都市、滋賀県大津市、兵庫県尼崎市、広島県広島市、福岡県小倉市、鹿児島県鹿児島市から各20個体ずつ採集し、合計240個体を使用した。オオマルハナバチは、長野県諏訪市および長野市で採集した40個体を使用した。エゾオオマルハナバチは、北海道札幌市、釧路市、浜中町、根室市、中標津町、利尻島から各10個体ずつ採集し、合計60個体を使用した。セイヨウオオマルハナバチは、北海道札幌市、帯広市、釧路市、浜中町、根室市、中標津町から各20個体ずつ採集し、合計120個体を使用した。

2. サンプル DNA の調整と PCR 診断

成虫の腹部を解剖用ハサミで開腹し、腸および卵巣組織を摘出し、それを試料としてDNAの抽出を行った。これらの試料はDNeasy blood & Tissue kit (QIAGEN)を使用した。抽出の方法は、キットに添付されているプロトコールに従った。DNA抽出溶液は、PCR実験に使用するまで-20°Cで保存した。

N. apis および *N. bombi* の検出には、PCR診断用に開発されたSSU rRNAプライマーを使用した。コントロールとして、ミツバチおよびマルハナバチの核DNAのlong wave rhodopsin (*LWRh*) 領域を増幅するプライマーを使用した [5,8,9]。実験に使用したプライマーの配列は表1に示した。

PCRは、1サンプルあたり全量20 µlで行った。反応液の組成はTakara Ex Taqポリメラーゼ (5 units/µl) を0.1 µl使用し、添付の100 µMの2.5 mM dNTP mixを1.6 µl、10X緩衝液を2 µl、100 µMの各プライマーを0.02 µl、鋳型DNA溶液 (約50 ng/µl) を3 µl加えて、滅菌水で20 µlとした。PCR反応は、プログラムサーマルサイクラー (TaKaRa) を用いた。*N. apis* および *N. bombi* のプラ

イマーは、94 °C で 30 秒、50 °C で 30 秒、72 °C で 1 分間のサイクルを 35 回繰り返した後、72 °C で 5 分間の伸長反応を行った。*LWRh* は、94 °C で 1 分間、46 °C で 1 分間、72 °C で 1 分間のサイクルを 35 回繰り返した後、72 °C で 5 分間の伸長反応を行った。ノゼマ判定の陽性コントロールには、名古屋大学の門脇准教授から提供された *N. apis* に感染したセイヨウミツバチから抽出した DNA サンプルを使用した。

増幅した DNA は、アガロースゲル電気泳動法で分離してエチジウムプロマイド溶液 (0.5 µg/ml) で染色し、UV 照射下で増幅を確認した。陽性を示した DNA サンプルは、シーケンス解析まで - 20 °C で保存した。

表 1. PCR 診断法およびシーケンス解析で使ったプライマー

名前	遺伝子	配列 (5' to 3')	PCR サイズ (bp)
Napis-SSU-Jf1	rRNA smal	CCATGCATGTCTTTGACGTACTATG	325
Napis-SSU-Jr2	subunit (SSU)	GCTCACATACGTTTAAAATG	
Nbombi-SSU-Jf1	rRNA smal	CCATGCATGTTTTGAAGATTATTAT	323
Nbombi-SSU-Jr1	subunit (SSU)	CATATATTTTTAAAATATGAAACAATAA	
LWRhF	long wave	AATTGCTATTAYGARACNTGGGT	700
LWRhr	rhodopsin (LWRh)	ATATGGAGTCCANGCCATRAACCA	
HG4F	12S rRNA - 23S	GCGGCTTAATTTGACTCAAC	750
HG4R	rRNA	CGCCGAATTAAACTGAGTTG	
ITS-f2	rRNA internal transcribe spacer	GATATAAGTCGTAACATGGTTGCT	114-122
ITS-r2	region	CATCGTTATGGTATCCTATTGATC	

3. シーケンス解析

PCR 診断法により *N. apis* および *N. bombi* に陽性反応を示したサンプルのうち、宿主ごとに各地域から 1 個体を選択し、その DNA をもとにシーケンス解析を行った。解析した遺伝子領域は、16S rDNA と 23S rDNA 間の internal transcribed spacer (ITS) 領域を含んだ部分配列を使用した。実験に使用したプライマーの配列は、表 1 に示した。PCR 条件は、前述と同じとした。PCR 産物を ExoSAP-IT (GE ヘルスケアサイエンス) で精製後、BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いた。サイクルシーケンスの条件は、キットに添付されているプロトコールに従った。反応サンプルは、ジェネテックアナライザー 3500 (アプライドバイオシステムズ) により塩基配列を決定し、GenBank (DDBJ) を利用した BLAST の相同性検索によって遺伝子型の解析を行った。

3. 結果

2種ミツバチから採集した480個体を対象としたPCR診断法の結果、*N. apis*に陽性を示したサンプルは、30個体確認された。結果は表2に示した。12地域のうち4地域（東京都、滋賀県、福岡県、鹿児島県）のニホンミツバチから*N. apis*が検出された。調査したニホンミツバチ全体における*N. apis*感染率は、2.1%（5/240）であった。セイヨウミツバチは、12地域のうち10地域（北海道、岩手県、福島県、東京都、滋賀県、京都府、兵庫県、広島県、福岡県、鹿児島県）で*N. apis*が検出された。最も寄生率が高かったのは、北海道の20%（4/20）で、少なかったのは鹿児島県の5%（1/20）であった。調査したセイヨウミツバチ全体における*N. apis*感染率は、8.8%（25/240）であった。

表2. ミツバチにおける *Nosema apis* の寄生状況

地域	種類	
	ニホンミツバチ	セイヨウミツバチ
北海道札幌市	-	20% (4/20)
青森県横浜町	0% (0/20)	-
岩手県盛岡市	0% (0/20)	10% (2/20)
福島県福島市	0% (0/20)	10% (2/20)
埼玉県久喜市	0% (0/20)	0% (0/20)
東京都町田市	5% (1/20)	10% (2/20)
新潟県上越市	0% (0/20)	0% (0/20)
京都府京都市	0% (0/20)	10% (2/20)
滋賀県大津市	10% (2/20)	10% (2/20)
兵庫県尼崎市	-	10% (2/20)
広島県広島市	0% (0/20)	10% (2/20)
福岡県小倉市	5% (1/20)	10% (2/20)
鹿児島県鹿児島市	5% (1/20)	5% (1/20)
長崎県対馬市	0% (0/20)	-
合計	2.1% (5/240)	8.8% (25/240)

括弧内は分析した個体数のうち寄生が確認された個体数を示している

3種のマルハナバチから220個体をPCR診断法により解析したところ、*N. bombi*に陽性を示

したサンプルは、セイヨウオオマルハナバチのみであった。オオマルハナバチおよびエゾオオマルハナバチからは、*N. bombi* のバンドは検出されなかった。これらの結果は表3にまとめて示した。セイヨウオオマルハナバチは、採集した全地域の個体から *N. bombi* が検出された。調査したセイヨウオオマルハナバチ全体における *N. bombi* の感染率は、7.5% (9 / 120) であった。また、コントロールとして利用した *LWRh* は、すべての DNA サンプルで増幅が確認された。

表3. マルハナバチにおける *Nosema bombi* の寄生状況

地域	種類		
	セイヨウオオマルハナバチ	エゾオオマルハナバチ	オオマルハナバチ
北海道 札幌市	10% (2/20)	0% (0/10)	-
帯広市	5% (1/20)	-	-
釧路市	10% (2/20)	0% (0/10)	-
浜中町	5% (1/20)	0% (0/10)	-
根室市	5% (1/20)	0% (0/10)	-
中標津町	10% (2/20)	0% (0/10)	-
利尻島	-	0% (0/10)	-
長野県 諏訪市	-	-	0% (0/20)
長野市	-	-	0% (0/20)
合計	7.5% (9/120)	0% (0/60)	0% (0/40)

括弧内は分析した個体数のうち寄生が確認された個体数を示している

シーケンス解析の結果、ミツバチ2種で陽性だった14個体のサンプルから740塩基を決定することができた。この配列をBLAST検索したところ、イギリスのセイヨウミツバチから単離された *N. apis* のうち Na2 タイプの遺伝子型 (Accession No. JX213655) と100%一致した。

セイヨウオオマルハナバチは、6個体からそれぞれ118塩基を決定することができた。この配列を同じようにBLAST検索したところ、イギリスのセイヨウオオマルハナバチから単離された *N. bombi* のうち D3 タイプの遺伝子型 (DQ267533) と100%一致した。

4. 考 察

今回初めて国内における在来種および農業分野で生物資材として利用されているミツバチおよびマルハナバチ類の微胞子虫の浸潤状況をPCR診断法で、系統の同定をシーケンス解析により明らかにすることができた。これまで国内のセイヨウミツバチでは、ノゼマ病の原因であ

る *N. apis* の寄生は報告されていたが、*N. apis* の浸潤状況に関する調査は行われていなかった。本調査により *N. apis* が、国内全域でセイヨウミツバチおよびニホンミツバチに寄生していることが初めてわかった。ただし、北海道から鹿児島まで特定の地域間で *N. apis* の寄生率に大きな差異があるような傾向は見られなかった。これまで国内では、ノゼマ病が原因でミツバチのコロニーが大量死を発症した報告例は見られていない。これはノゼマ病が発生していないというわけではなく、寄生個体を判定することが難しいためであると思われる。今回、PCR 診断法を利用して定量的に調査したところ、日本における *N. apis* の寄生率は、他国での結果と比較しても低い傾向であることがわかった [1,3]。さらに塩基配列の解析結果からは、今回決定した *N. apis* の遺伝子型は、大量死を引き起こすような強病原性型の遺伝子型ではなく、日和見感染の症状を示す病原性の弱いタイプであった [3]。これらのことから推測すると、国内で見られるノゼマ病は、病原性の弱い系統が主流である可能性が高いため、本種が原因でのミツバチのコロニー大量死の可能性は少ないと思われた。ただし、今回推定したミツバチにおける *N. apis* の寄生率は、訪花中の働き蜂によるものであるため、ミツバチコロニーへの影響や寄生率にどの程度関連性があるのかは不明である。今後は、養蜂場およびコロニーレベルでの寄生率および遺伝子型の分布状況を調べる必要がある。

本調査により、国内で帰化したセイヨウオオマルハナバチに *N. bombi* が寄生していることがはじめて確認された。今回、在来マルハナバチ類から *N. bombi* は検出されなかったが、その原因は、寄生率が低いことや解析した個体数が少ないことによると推測された。マルハナバチに寄生する *N. bombi* は、日本を除いたマルハナバチ類の分布域全域で確認されている [4]。今後、調査地域や解析個体数および種数を増やせば本種の寄生個体を発見する可能性は高いと思われる。本調査によるセイヨウオオマルハナバチの結果は、過去に日本に持ち込まれたセイヨウオオマルハナバチのコロニーから *N. bombi* 様の寄生が報告されているが、それを支持する結果となった [6]。花粉交配用に大量に海外から輸入されたセイヨウオオマルハナバチのコロニーから一部の女王蜂が逃げ出し、北海道において帰化が急速に進んでいる状況にある。既に地域によっては、セイヨウオオマルハナバチが優占種となっている所も数多く見られる [10]。今回単離された *N. bombi* のシーケンス解析の結果からは、イギリスのセイヨウオオマルハナバチに寄生していた *N. bombi* と同じ遺伝子型であることがわかった。在来マルハナバチ類で検出されなかったが、野生化したセイヨウオオマルハナバチの分布域全てで寄生が確認された。これらの結果を総合的に判断すると、国内で帰化したセイヨウオオマルハナバチに寄生している *N. bombi* の起源は、原産国の欧州から輸入されたセイヨウオオマルハナバチのコロニーに随伴して持ち込まれ、その後国内で逃げ出した個体に付随して寄生が拡大した可能性が高いと予測された。本調査では、在来のオオマルハナバチおよびエゾオオマルハナバチからは、*N. bombi* の寄生は確認されなかった。しかし、*N. bombi* は、マルハナバチ類での宿主範囲が広いことためセイヨウオオマルハナバチと同亜属である 2 種は、水平感染により伝播する可能性がある。国内で *N. bombi*

は、見つかっていないが、分布している可能性があると思われる。また、海外から持ち込まれた *N. bombi* 系統には、在来マルハナバチ類は抵抗性を持っていない可能性もあるため、今後も定期的に浸潤状況の調査とともに在来マルハナバチへの感染実験による影響を調べる必要があると思われる。

近年欧州およびアメリカ大陸では、ミツバチやマルハナバチの輸出入に伴う形でノゼマをはじめとする病原性微生物類が分布を広げていることが指摘されている [7]。本来分布していなかった地域に新たな病原性微生物が侵入すると、抵抗性を持たない在来生物に甚大な被害をもたらすことが過去に多数報告されている [1,4]。ミツバチやマルハナバチでも同様で、これまで存在しなかった病原体が侵入すると、それが大量死の原因になることも危惧されている [3,7,8]。実際に海外では、ミツバチやマルハナバチにおいて、外来のウイルスや寄生性ダニ類の浸潤による大量死が大きな問題となっている [3]。今回国内で見つかったミツバチのノゼマ病は、大量死を引き起こすような系統ではなかったが、非意図的に強病原性型のノゼマが侵入する可能性もある。実際に 2008 年には、オーストラリアからの輸入ミツバチから本種が検出されている。国内でノゼマ病による大量死を防ぐためにも、今後も継続してミツバチおよびマルハナバチ類における浸潤調査を行いながら、防御体制を構築していく必要がある。

参考文献

- [1] Morse RA, Flottum K(1997)Honey Bee Pests, Predators, & Diseases. Third Edition. Root company, USA
- [2] 片山栄助 (2007) マルハナバチ—愛嬌者の知られざる生態. 北海道大学出版会. 札幌.
- [3] van Engelsdorp D, Cox Foster D, Ostiguy MFN, Hayes J(2006-01-05). "Colony Collapse Disorder Preliminary Report". Mid-Atlantic Apiculture Research and Extension Consortium(MAAREC)- CCD Working Group. p. 22. Retrieved 2007-04-24.
- [4] Schmid-hempel P(1998)Parasites in Social Insects. Princeton University press, New Jersey
- [5] Ironside JE(2013)Diversity and recombination of dispersed ribosomal DNA and protein coding genes in Microsporidia. PLOS ONE. 8(2):e55878-
- [6] 丹羽里美、岩野秀俊、浅田真一、セイヨウオオマルハナバチのコロニーから分離された *Nosema bombi* 様微胞子虫と日本産マルハナバチへの感染. 日本応用動物昆虫学会誌. 48(1): 60-64.
- [7] Cameron SA, Lozier JD, Strange JP, Koch JB, Cordes N, Solter LF, Griswold TL.(2011)Patterns of widespread decline in North American bumble bees. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108(2): 662-667.
- [8] Klee J, Tay WT, Paxton RJ.(2006)Specific and sensitive detection of *Nosema bombi*(Microsporidia: Nosematidae)in bumble bees(*Bombus* spp.; Hymenoptera: Apidae)by PCR of partial rRNA gene sequences. Journal of Invertebrate Pathology. 91:98-104.
- [9] Mardulyn,P, Cameron SA.(1999)The major opsin in bees(Insecta: Hymenoptera): A promising nuclear gene for higher level phylogenetics. Molecular Phylogenetic and Evolution. 12(2): 168-176.
- [10] 鷺谷いづみ (1998) 保全生態学からみたセイヨウオオマルハナバチの侵入問題 (<特集> 移入生物によ

る生態系の攪乱とその対策). 日本生態学会誌. 48(1):73-78.

謝辞

本研究は、平成 24 年度日本学術振興会科学研究費若手 B (課題番号 24780323) および基盤研究 B (課題番号 24380178)、平成 24 年度環境省環境研究総合推進費 (RFd-1202) および社団法人日本養蜂はちみつ協会による支援により行われた。

Prevalence of Microsporidia isolated from honeybee and bumblebees in Japan

Jun-ichi TAKAHASHI

Minoru TAKEUCHI

Kozo MATSUMOTO

Tetsuro NOMURA

Abstract

Nosema diseases caused by Microsporidia have specific negative effects on honeybees and bumblebees. Field caught honeybee and bumblebee females were examined for the presence of *N. apis* and *N. bombi*. Out of five species investigated, which represented three native and two alien species, amplified bands were detected from *Apis cerana*, *A. mellifera* and *Bombus terrestris* by diagnostic PCR with *Nosema*-specific primers. The *B. terrestris* infected by *N. bombi* was detected from all population. Microsporidia rRNA internal transcribe spacer region was amplified by PCR, cloned and sequenced from the total DNA of host tissues. Homology analysis demonstrated that the sequence belongs to an attenuated strain of *N. apis* in the honeybees.

Keywords: honeybee, bumblebee, Microsporidia, *Nosema apis*, *Nosema bombi*