

◀国内情報▶

養蜂の安定生産と環境微生物 —機能と実用化—

宮崎大学農学部
前田 昌調

動物と環境との接点（インターフェイス）における微生物の機能は、生産環境の質的良否をあらわす主要な要素となっている。事実、病害菌と善玉菌とは、ともに動物生産環境や腸内等に生息、相互作用をへて、動物の生残、成長等に様々な影響をおよぼしている。本研究においては、病原菌を抑制する機能を保持する有用微生物を養蜂環境に適応し、腐蝕病、チョーク病を防除するとともに、蜂群の増大効果を得た。さらに、使用した有用細菌は、ウイルス抑制および動物のストレス軽減効果をあらわすことも判明した。本稿では、このような有用細菌の特徴と実用化プロセスについて述べる。

1. はじめに

パリの街角、エッフェル塔のみえるビルの屋上で蜜蜂が飼育され、ハチミツを採っている光景を見て、旅行者にとっても、この街のイメージがブランドのあふれる華やかなスポットから、より身近な、親しみのある、静かな場所へ変わったように感じる。蜜蜂は、人のこころを穏やかにする魅力を持っており、家庭のしずかな朝食風景を連想させる。

ハチミツは、長い歴史のなかで健康食品として、また高級嗜好品として人々に重用されてきており、日本のみならず、西欧、イスラム圏や中華民族圏においても、人気のある食品となっている。しかし、日本で食用とされるハチミツの約95%が外国産であり、時として残留薬剤が検出されるといった情報は、上記の平和な風景と相反するものとなるが、蜜蜂の病気の規模は年々拡大し、薬剤の使用頻度も増加している。また、果実などの生産で使用する農薬は蜜蜂を弱らせ、蜂の活力が低下するといわれている。

蜜蜂の疾病のなかで、おおきな被害が生じて

いる腐蝕病菌（ヨーロッパ腐蝕病 *Melissococcus plutonius*、アメリカ腐蝕病 *Paenibacillus larvae*）に原因する腐蝕病は、成蜂が本菌を飲み込み、蜂児に与えることにより、蜂幼虫において発症し大量死にいたる。この疾病は、法定家畜伝染病であり、発生蜂群は法律により焼却処分しなければならない。疾病への予防対策では、抗生物質が使用されているが、この薬剤が成蜂を経由してハチミツに混入するおそれがあり、ハチミツのブランド性を損なうものと危惧されている。さらに、薬剤の効力の低下も指摘されている。

また、真菌 *Ascosphaera apis* に原因するチョーク病は、3～5日齢の蜂幼虫に高率に感染して、大量死をひきおこすが、真菌には抗生物質の効果がないなど、本疾病に対する有効な対処方法は少ない。

さらに、近年、蜂群崩壊症候群（CCD: Colony Collapse Disorder）といわれる、蜂が集団で消失してしまう事態がおき、ダニやダニに由来するウイルス、あるいは他の神経性ウイルスが疑われているが、有効な対策は見つかっていない。

このような状況を克服する一つの手段として、環境微生物の使用がある。環境中の微生物が蜜

MAEDA Masachika

〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1

蜂にとって良好な状態にあるときには、群れの活力が増し、免疫力が向上、そして、環境中の善玉菌の拮抗力により、病原菌が抑制・排除される。

昔より、疾病防除には環境微生物が使われてきた。例えば、施肥は、野菜など植物の成長を助けるとともに、病気の発生を抑制する。すなわち、施肥をした野菜では、病原菌を投与しても、疾病の発症が抑えられるとした報告があり、この効果は、堆肥中の微生物が、その拮抗作用によって病原菌の増殖を抑制したためと考えられている。このように、微生物同士には相互作用があり、この作用のなかで拮抗作用、すなわち微生物が他の微生物を抑制する機能は、人間が利用できる有効な病原菌防除手段となる。

しかし、上記の施肥のような疾病防除方法は、堆肥中の微生物組成が定まっていないので、効果が安定しない。そのため、種組成の明らかな、既知の微生物を投与する方法があり、この方法は生物学的防除、生物防除、あるいはバイオコントロールとよばれる。

この生物防除に使用する善玉菌は、以下のような条件を備えることが望ましい。

- ① 病原菌を抑制する。
- ② 生産の対象となる動物に害作用を及ぼさない。
- ③ 環境に悪影響を及ぼさない（具体的には、植物などの成長を阻害しない）。
- ④ ②③に加えて、さらに動物・植物の成長促進効果をあらわす。
- ⑤ ①に加えて、病原菌のなかでも細菌だけではなく、ウイルス、真菌（カビ）も抑制する。
- ⑥ 飼育動物の免疫向上効果（これは、ストレス軽減効果も意味する）を保持する。

このように環境微生物は、動物や植物の飼育・栽培において重要な働きを行う。本稿では、養蜂群の安定飼育に効果のある環境微生物（善玉菌）の探索、その機能の確認、実用化過程における効力の発現、さらに、生菌の安全性試験を兼ねた家畜・野菜への投与試験について話題を提供する。

2. シュウドモナス菌 MS-1 株の特徴

本菌は、淡水環境から単離された菌株であり、以下のような特徴をもつ。

1) 形状

桿菌、長さ：1～3ミクロン、運動性：有り、胞子形成：無し、グラム染色：陰性、OFテスト：—

2) 生育程度

1～2日程度培養で数mmのコロニーを形成する、色：薄茶色、光沢：特になし、表面：平滑、拡散性色素：無し、pH：4.0(-), 5.0(+), 5.6(+), 8.6(+), 9.0(+), 10.0(+) 温度：中温性7～45℃、NaCl：0～4%

3) 16SrRNAの解析

核酸の抽出を行った後、エタノール沈殿により核酸を回収し、16SrRNA に特異的なユニバーサルプライマー2種を用いて増幅をおこない、スピнкаラムを用いて精製を行った。精製したPCR増幅産物について、シークエンサーにより塩基配列の解析を行った後、ジーンバンクのデータベースよりオンライン検索を行った。その結果、本菌に該当する記載菌株がないため、*Pseudomonas* 菌 MS-1 株とした。

3. シュウドモナス菌 MS-1 株の病原細菌の増殖抑制能

シュウドモナス菌 MS-1 株が病原性細菌の増殖を抑制する能力を有することを以下のように確認した。寒天培地にあらかじめ塗抹した2本の上記菌株のスミアの間に、サルモネラ病菌 *Salmonella infantis*、立枯病菌 *Ralstonia solanacearum* を移植して 25℃下にて 10 日間培養、その後のスミアの間の病原菌のコロニーの大きさを、病原菌のみを対照区として培養した場合のコロニーの大きさと比較した。その結果、サルモネラ、立枯病菌の増殖が抑制され、阻害

率は、それぞれ73, 75%であった。なお、阻害率は、対照区培地上の病原菌のコロニーの横幅の大きさ(W)と試験区同菌のコロニーの同大きさ(w)とについて、 $\{1-(w/W)\} \times 100$ で表したものである。さらに、上記のシュウドモナス菌MS-1株が、チョーク病菌(*Ascosphaera apis*)の増殖を抑制する能力を有することも、同様の方法で確認した(阻害率:80%)。

4. 腐蛆病菌による蜜蜂への攻撃試験とシュウドモナス菌MS-1株の疾病防除効果

閉鎖系飼育室内に3つの網室を設置し、各網室内に蜜蜂の1蜂群(約9,000匹/群)ずつの合計3蜂群を導入し、飼育した。3蜂群中1蜂群にはMS-1株を巣箱内に噴霧投与し(投与群I)、別の1蜂群にはMS-1株を蜂の餌である砂糖液に混合して投与した(投与群II)。残りの1蜂群は攻撃対照群とし、MS-1株は投与していない。MS-1株投与期間途中に3蜂群全てに対して腐蛆病菌で攻撃し、攻撃後5週までの腐蛆疾病発症の有無及び蜂群の状態(飼料摂取量、幼虫数、蜂児圏の状態及び成蜂の活動状態等)について観察した。この結果、飼料の摂取量では、3群において相異はなかった。そして、腐蛆病原菌の攻撃後は、軽度で一時的な蜂児圏の乱れが3蜂群において共通して認められ、その数は若干減少したが、腐蛆病はMS-1株投与群では発症が認められず、対照群では発症した。すなわち、有用細菌を投与した2蜂群においては、腐蛆病発症はみられなかった。

以上のことから、蜂群における有用細菌MS-1株による腐蛆病の疾病防除の効力が示唆された(図1)。

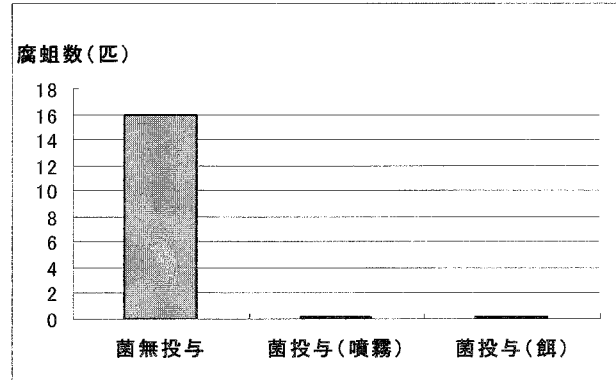


図1 シュウドモナス菌MS-1株の投与、無投与下における蜜蜂への腐蛆病菌攻撃試験

5. シュウドモナス菌MS-1株のウイルス感染抑制能

自然界では、ウイルスの感染を抑制したり、あるいはウイルスを分解したりする細菌が多く分布している。このような自然界において、抗生物質を使用するとウイルスを抑えている細菌(抗ウイルス細菌)が殺滅されてしまう。一方、大半の抗生物質に対しては、ウイルスは抵抗性を保持している。この結果、ウイルスは、その阻害要因が少なくなった部分、よりよく感染、増殖を行うことになる。

養蜂においても、抗生物質の使用により、病原細菌は殺滅されが、一方、ウイルスの増殖が促進されることになり、ウイルス病が流行する可能性が高くなる。同様の事象は、豚、鶏、ウシおよび養殖魚において、すでに長年にわたって起こっている。そこで、本研究では、有用細菌MS-1株における、ウイルス抑制能について検定した。

なお、ウイルスの不活化は、その多くがウイルス外皮の分解、損傷に起因するものであるため、本実験の結果は、蜜蜂の疾病原因ウイルスを含む多くのウイルスの不活化を示唆するものといえる。

まず、マスノスケ細胞の培養系において、上記MS-1株の培養上澄液が造血器壊死症の原因ウイルスである伝染性造血器壊死症ウイルスの感染作用を抑制するか否かについて検定した。

作用抑制効果はマスノスケ細胞の変性効果 (CPE) を抑止する度合いを指標として判定した。すなわち、マスノスケ細胞を、1 mLの液体培地 (10%ウシ血清成分, 0.075%NaHCO₃, 100 IU/mLペニシリン, 100 μg/mLストレプトマイシン, 1.6%Tris-HCl(pH 7.8) 含有) 中で25°Cにて培養し、その培養系に、伝染性造血器壊死症ウイルス培養液(0.1 ml)および上記シュウドモナス属細菌MS-1株の培養上清液 (0.1 mL) を加えた。対照実験として、前記培養系に伝染性造血器壊死症ウイルスの培養液のみ (0.1 mL) を添加した。ここで、上記シュウドモナス属細菌の培養上清液とは、当該細菌をソイトン培地中で3日間25°Cで培養した後に遠沈 (4000rpm)して菌体を沈澱させ、上澄を0.22 μmのフィルターでろ過して得られた濾液を指す。また伝染性造血器壊死症ウイルスの培養液とは、同様の上記培養液およびマスノスケ細胞を用いて伝染性造血器壊死症ウイルスを増殖させた後、0.45 μmのフィルターで濾過して得られた濾液を指す。

上記の菌体培養上清液を添加した後のCPEを経時的に測定した。CPEが低いということは、すなわちウイルスの増殖が抑制されていることを意味する。結果を表1に示すとおり、シュウドモナス菌 MS-1株の培養上清を添加した場合に、伝染性造血器壊死症ウイルスの増殖が抑制された (表1)。

表1 シュウドモナス菌 MS-1株によるウイルスの不活化

	伝染性造血器壊死症ウイルス
対照区	10 ^{5.7} TCID ₅₀ /25μl
MS-1株区	10 ^{1.5} TCID ₅₀ /25μl

6. シュウドモナス菌MS-1株によるチョーク病の防除

蜂群を8巣箱にわけ、MS-1株の液体培養液希釈液(1/10倍に希釈)を蜂の巣に噴霧し、チョーク病の発生状況を2ヶ月にわたり観察した。その結果、MS-1株を噴霧した巣箱では、チョーク病の発症が抑制された (図2)。なお、図2の蜂蛆数の値は、各実験区4箱の発症蛆数を平均した値で表した。

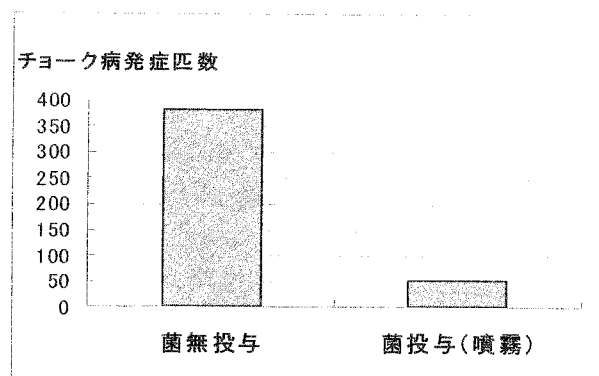


図2 シュウドモナス菌MS-1株の投与、無投与下における蜜蜂チョーク病の発症匹数

7. シュウドモナス菌 MS-1株の蜜蜂に対する成長促進効果

上記の、高い抗菌力を保持するMS-1株について、その培養菌液を餌・水に混合してミツバチに投与し、ミツバチの成体に及ぼす影響を検定した。

実験期間は約2ヶ月で、実験場所は宮崎県綾町および同県小林市に設定し、菌の投与は1日おきに、蜜蜂の内検は毎日行った。この投与試験の結果、6カ所に設定した菌株投与区において、餌や水の摂取量に多少の違いが見られたが、対照区と比較し、全ての菌株投与実験区において蜜蜂の健康度には問題のないことが判明し、また、蜂数の増加する傾向がみられた (図3)。なお、図3の蜂数増加率は、巣框 (すわく) 1枚あたりの平均値として表した。

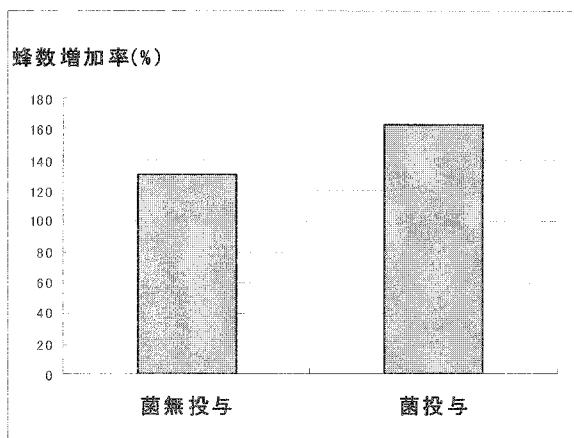


図3 シュウドモナス菌MS-1株の給与および無給与下における蜜蜂数の増加

8. シュウドモナス菌MS-1株による養鶏の成長促進効果

生後8日齢の鶏ひな（名古屋コーチン）を、各々の1区に10羽（約80g/羽）飼育し、13日までの6日間の菌株投与試験を行った。各区の構成は、生菌添加（配合飼料に5%）および生菌無添加である。また、基礎飼料としては、抗菌性添加物無混合の飼料を採用した。この結果、MS-1株の投与で、若鶏の増体重量の向上することがわかった（図4）。

なお、他に、養鶏について3ヶ月/年、養豚について4ヶ月/年の試験を3年にかけて行ったが、同様の増体重量効果が現れ、また、養豚については飼料効率の向上効果もみられた。

9. シュウドモナス菌MS-1株による仔牛の下痢症状抑止効果

仔牛では、ロタウイルスによる下痢が発生し、食物の消化が進まないため、成長の著しく遅滞する弊害が生じている。そこで、ミルク500mlに100mlのシュウドモナス菌MS-1株培養液を混合して仔牛に投与した。すなわち、仔牛30頭（黒毛和牛、生後約30日）を3群にわけ、第1群には、シュウドモナス菌MS-1株を無投与、第2群

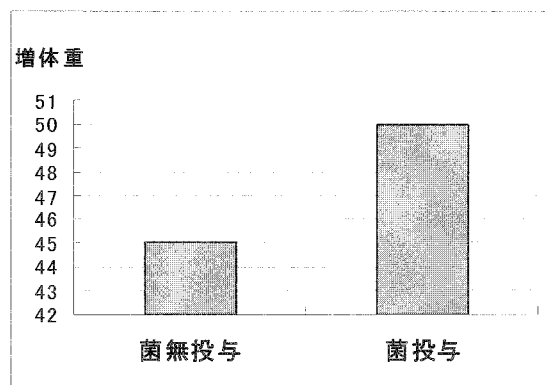


図4 シュウドモナス菌MS-1株の給与および無給与下における若鶏 (g/羽)の増体重量効果

には1回投与し、第3群には2回投与の実証試験を行った。この結果、シュウドモナス菌MS-1株を投与した仔牛では、下痢症状が改善された（図5）。

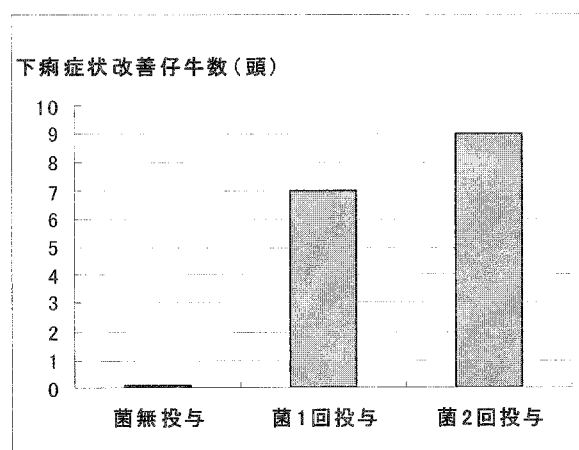


図5 シュウドモナス菌MS-1株の給与および無給与下における仔牛の下痢症状改善の効果

10. シュウドモナス菌MS-1株によるピーマンの栽培試験

ピーマンの苗120本（平均の主茎長は10.8cm）を、60本ずつの2群に分けて植栽した。次に、シュウドモナス菌MS-1株を10倍に希釈し、等量の焼土壌に混合、その25gを第1群のピーマン60

本について、各苗の根圏に施用し、一方、第2群の60本については菌株の施用を行わなかった。そして、このピーマンについて、4週間後の成長を測定した(図6)。この結果、MS-1株を投与するとピーマンの成長が促進されることがわかった。

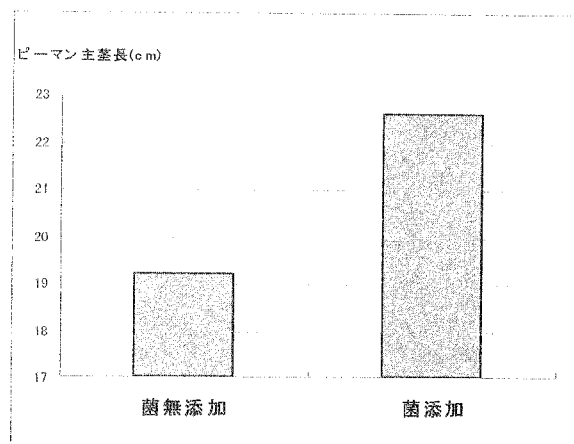


図6 シュウドモナス菌MS-1株の添加および無添加におけるピーマンの成長効果

1.1. シュウドモナス菌MS-1株による魚類ハタの共食い抑制効果

高級魚であるハタの養殖は、東南アジアを中心に世界で急速に拡大しているが、孵化後2ヶ月ほどから共食い症状をあらわし、その数の大幅な低減を余儀なくされている。本研究では、MS-1株を配合飼料に混合して、ハタに投与した場合に、MS-1株無添加の対照区の魚と比較して、好中球数などの増加にみられる免疫向上効果があらわれた。また、大きさ約4cmのハタ稚魚群にMS-1株を投与したところ、ストレス症状の発現とされる「共食い」の頻度が大幅に減少した(表2)。

表2 シュウドモナス菌MS-1株による魚類(ハタ)の共食い抑制効果

	生残率 (%)
対照区	52%
MS-1株区	94%

考察

1. 微生物は排除できるか

微生物を排除しようとする考え方は、恒常的に抗菌剤を添加した飼料で飼育している家畜の場合だけではなく、魚類養殖の現場にもある。以前より(そして現在でも)、養殖水を無菌状態にする努力が尽くされてきた。通常、紫外線やオゾン発生装置の中に養殖水を通すことによって、微生物を殺滅する。または、微細なフィルターを通すことによって、微生物をフィルター上に捕集し、水中から除去する。しかし、これらの装置を通過した水が魚のすむ水槽に入ると、水槽の壁から、給与する餌から、そして空気から微生物が供給されるため、水中の微生物数は殺菌前と同等となる。そして、殺菌した水は、微生物数が少なく、かつ、これまで微生物を支えてきた栄養があるので、あらたな微生物はより勢いよく増加する(Maeda, 2004)。

「より勢いよく増加する」との表現のなかに、微生物同士の牽制効果(拮抗作用、あるいは栄養塩などの競合)が示されている。殺菌前の水には、多くの微生物が生息しているので、これらが牽制して、新規の微生物はなかなか参入できない。しかし、人間が殺菌した水では、古参微生物がいない(干渉しない)ので、新規の微生物はより増えることになる(前田, 2005)。

また、養殖水に抗生物質を投与した場合でも、当初、水中の細菌数は減少するが、その数は数日で復元する。一方、永続的に効果のある抗菌剤(塩素剤など)を使用して、微生物をふえないようにすることもできるが、このような水では魚は住めない。

2. 抗生物質を使うとウイルスが増える

1) 自然界のウイルスの数

自然界では、ウイルスの数が予想外に多いことがわかり、科学者にも衝撃をあたえたのは最近のことである。これまでのウイルスの計数は、寒天培地や動物細胞を使用した培養方法でおこなってきたが、この方法での、海水、淡水中のウイルス数は、数10個/mlほどの値である。しかし、1980年代のおわりに、電子顕微鏡で海水や河川水を直接に観察する方法が採用されたことにより、ウイルス数は、1 ml当り数万から数億個あることがわかった (Berghら, 1989)。

そして、この自然界に存在する大量のウイルスが、除去されるのか、されないのかに関心が集まり、また、家畜での免疫不全ウイルス病 (養豚)、ロタウイルス下痢症 (肉乳牛)、または、鶏インフルエンザウイルス病などが多発する現状において、自然界におけるウイルスの存亡のメカニズムが問われるようになった。

2) 微生物によるウイルスの不活化

小児麻痺ウイルス (ポリオ) や、病原性腸内ウイルス (コクサッキー) など、これらのウイルスは、下水処理場から海岸に流れ込むため、とくに観光客の多いハワイの大学や衛生研究所において、ウイルスが自然界でどのような増減を繰り返すのかについて調べられた (Gerbaら, 1977)。一方、自然界でのウイルスを破壊する細菌の存在も報告され (Gundersenら, 1967)、これらの細菌が一定量に生息する場所では、ウイルスは短時間で、その活性 (感染能力) を失うことがわかった。

3) ウイルス不活化プロセス

ウイルスは、中心に遺伝子 (DNA, RNA) があり、その周りは薄い膜 (外皮) でおおわれている。この外皮は、タンパク質や脂質でできているので、ある種のタンパク質分解酵素や脂質分解酵素で破壊される。上記のウイルスを不活化する細菌は、これらの酵素を生産して、ウイルスの外皮に穴などをあけている。そして、ウ

イルスは外皮が損傷すると、その感染能力をほとんど失うため無害化する (Herrmann & Cliver, 1973)。その他に、海藻などにもウイルスを不活化する物質があるが、細菌は、生存している間は、ウイルス不活化物質を連続的に生産するため、その効力がより持続するものと考えられる。

4) 抗生物質の投与でウイルスがふえる

ウイルスを分解する自然細菌は、概して抗生物質などによって増殖能を失う。このため、抗生物質投与下では、ウイルスを抑圧していた細菌が減少することになり、ウイルスはより感染・増殖する機会を得て、その数を増す。ウイルス数が増大すれば、異種間の交雑の頻度が増し、新たなウイルスの出現の可能性が増すことになる。

5) 善玉菌の利用によるウイルスの排除

近年、薬剤や化学肥料が多く使われるようになり、自然界の善玉菌が減少し、その結果、ウイルス数が増大しているといわれている。このため、家畜でもウイルス病が多く発症しているが、このような場合に、ウイルスを殺滅する善玉菌の使用が効果的と考える。この善玉菌の使用では、長期間にわたって投与する方法があるが、比較的高濃度の生菌を、短期間に投与することで、家畜腸内に善玉菌の存在情報 (クオラムセンシング, Hornbyら, 2001; Nealsonら, 1970) を伝え、病原菌防除効果を得る方法もある。

謝 辞

本研究の遂行では、(社) 日本養蜂はちみつ協会 (日蜂協)、宮崎養蜂組合、同畜産協会のかたがたのご協力をいただいたので、ここに謝意を表す。また、本研究中に亡くなられた、日蜂協元理事・酒井哲夫氏および宮崎養蜂組合元組合長・英隆之氏のご協力に深謝する。なお、シェウドモナス菌 MS-1 株の投与下における蜜蜂に対する腐蝕病菌の攻撃試験は、(財) 畜産生物科学安全研究所において行った。

文 献

- 1) Bergh, Ø., K. Y. Borsheim, G. Bratbak, and M. Haldal (1989) : High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, 340, 467-468.
- 2) Gerba, C. P., S. M. Goyal, E. M. Smith, and J. L. Melnick (1977) : Distribution of viral and bacterial pathogens in a coastal canal community. *Mar. Pollut. Bull.*, 8, 279-282.
- 3) Gundersen, K., Å. Brandeberg, S. Magnusson, and E. Lycke (1967) : Characterization of a marine bacterium associated with virus inactivating capacity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 71, 281-286.
- 4) Herrmann, J. E. and D. O. Cliver (1973) : Degradation of coxsackievirus type A9 by proteolytic enzymes. *Infect. Immun.*, 7, 513-517.
- 5) Hornby, J. M., Jensen, E. C., Lisee, A. D., Tasto, J. J., Jahnke, B., Shoemaker, R., Dussault, P. and K. W. Nickerson (2001) : Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2982-2992.
- 6) Nealson, K. H., Platt, T. and J. W. Hastings (1970) : Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.*, 104, 313-322.
- 7) Meda, M. (2004) : Interactions of microorganisms and their use as biocontrol agents in aquaculture. *La Mer*, 42, 1-19.
- 8) 前田昌調 (2005), 水圏の環境微生物学. 講談社. 東京. pp. 204.