

蜜蜂と微生物

前田 昌調^{1,*}

¹ バイオプロジェクト株式会社

(2016年11月5日受付; 2016年12月1日受理)

Honey bee and Microorganisms

Masachika Maeda^{1,*}

¹ Bioproject Company Limited.

(Received 5 November 2016; Accepted 1 December 2016)

要旨: 環境中には多くの微生物群が分布し、その中に病原菌や善玉菌が生息して絶えず代謝、増殖を行っている。そして、これらは相互に作用を及ぼし、病原菌が優勢となれば疾病の危険性が増し、善玉菌が優位であれば共生する動物などの代謝増進、成長促進効果があらわれる。ここで、疾病防除のために抗生物質などの薬剤を多用した場合には微生物のバランスが変わり、他の疾病が発症する状況を呈す。筆者らは、養蜂環境における微生物バランスを良好に維持することを目的として、病原菌抑制および代謝増進作用をあらわす有用（善玉）菌に関する研究を行ってきた。本稿では、病原菌、有用菌の生態における両者の相互作用、有用菌のプロバイオティクスおよびバイオコントロール製剤としての機能などについて、研究結果を基にして報告する。

キーワード: バイオコントロール, 抗菌作用, 抗ウイルス作用, 生物防除, 疾病防除, 農薬分解.

はじめに

自然界には、様々な微生物が分布し、その数は1gの土壌や1ccの河川水で数百万の計測値となる。動植物の体内や体表面にも生息する微生物群集においては、病原菌が旺盛に増殖していれば疾病の発症する頻度が高くなり、善玉菌が活動していれば宿主の代謝増進や成長促進効果があらわれるように、微生物は動物、植物の生存や成長に影響を及ぼしている。自然界では、これらの病原（悪玉）菌や有用（善玉）菌の他に、低活性菌、いわゆる活力は弱いが多い、微生物全体の大部分をしめる菌群がある。これらは目立たないが、自然界の有機物や汚染物質を長い時間をかけて分解し、あるいは、菌体自身が栄養物として植物、動物の成長、代謝維持等に役立っている。一方、河川下流、汽水域あるいは農地、家畜飼育地域などでは、生産活動にともなう施肥や飼料などの栄養物添加量が多いため、活発に活動する菌群が分布する。

自然界で多様な働きをあらわす微生物群のなかで、特に直接的かつ日常的に人間と関わる微生物には病原

菌（悪玉菌）があり、家畜・野菜・果実などの生産に大きな被害を与え、人間の生存にもかかわっている。このために、これらの悪玉菌をどのようにして排除・殺滅するかの方法が工夫されつづけ、その代表例としては、養豚、養鶏飼料、仔牛用ミルクには、毎日抗生物質を添加するような状況がある。

一方、近年善玉菌の効用が再認識されるようになり、例えば第2の神経中枢といわれる腸管において、腸内細菌は免疫増強、ストレス軽減などの重要な役割を担っている。また、善玉菌の重要な役割の一つとして、病原菌に対する拮抗作用、すなわち病原菌を排除・殺滅する働きがある。この微生物作用は、農業 (Kerr 1972)、水産養殖 (Maeda & Liao 1972; Nogami & Maeda 1972) や家畜飼育 (江上・前田 2012) における疾病防除に採用され、本方法を生物防除、バイオコントロールという。

この生物防除（以降、バイオコントロールという）の発展の背景には、抗生物質などの日常的使用による微生物排除、殺滅の施策がなされるなかでも家畜等の

*前田 昌調 Masachika Maeda (info@bioproject.co.jp)

バイオプロジェクト株式会社 Bioproject Company Limited

〒880-0947 宮崎県宮崎市薫る坂二丁目 12-3 2-12-3, Kaorusaka, Miyazaki city, Miyazaki, 880-0947 JAPAN

疾病がおさまらず拡大している状況、そして、農薬に耐性を示す害虫の増加など、いわゆる悪循環の形成・規模拡大がある。養蜂においても、抗生物質などの薬剤を用いるが、これは、後述のように疾病の発生拡大の一因となり、さらに蜂群崩壊症候群に至ることも危惧される。

この生態的悪循環を防止するためには、自然界の微生物群が保持する特徴的な機能を利用したバイオコントロールが有効と考えられる。本稿では、ミツバチをとりまく微生物の生態的特徴を明らかにするなかで、善玉微生物で病害菌を抑制・排除するバイオコントロール方法を用いた養蜂の安定生産について、研究結果を基にして述べる。

ミツバチをとりまく病原菌

養蜂現場には様々な微生物が生息し（柴田・中村 2005）、その中でミツバチの疾病に関わる菌には、代表例として（アメリカ、ヨーロッパ）腐蛆病菌、チョーク病菌、そして蜂群崩壊症候群（CCD）の原因の一つとされるウイルスがある。腐蛆病菌は細菌、チョーク病菌は真菌（カビ）であり、これらとウイルスとの3者の性質はそれぞれ異なる。特に、養蜂生産において考慮すべき大きな差違は、抗生物質に対する反応性にある（表1）。

表1. 抗生物質の各微生物への抑制効果.

微生物の種類	抗生物質の抑制効果
ふそ病菌	+
チョーク病菌	-
ウイルス	-

抗生物質は、主として細菌の細胞壁部分の合成を阻害する薬剤であるため、総じて（黄色ブドウ球菌に代表される院内感染菌のように抗生物質耐性菌はあるが）細菌の増殖を抑制する。そして細菌の種類は多いので、ある抗生物質で効果がない場合には、他を選択することになる。一方、真菌は、細菌にみられる細胞壁物質を持たないため、抗生物質の効果はおよばない。同様の理由で、ウイルスに対しても抗生物質の効果は、例外を除いて、あらわれない。

従って、カビ、ウイルスは抗生物質の存在下においても増殖することができる。自然界や動・植物からカビやウイルスを採取（分離）する場合に培養法を用いるが、使用する培地には抗生物質を添加する。こうす

ると、細菌が培地中で増殖しないため、カビ、ウイルスがより集中的に増殖することになる。ここで、カビには栄養分を補強した寒天培地、また、ウイルスには主として動物細胞を使用することにより、それぞれの培地においてこれらの微生物がふえることになる。

これを実験例としてあらわすと、図1に示したように、ペニシリン、細菌、そしてウイルスを混合して培養すると、ウイルスが増殖する。しかし、ペニシリンを添加していない培地、すなわち細菌とウイルスのみの混合液では、ウイルスは増殖しない。これは、細菌がふえると、ウイルスのふえ方が劣る、あるいはふえないという結果をしめしており、事実、自然界には抗ウイルス作用をあらわす細菌が多く生息する（前田 2011）。養蜂環境においても同様の現象があり、抗生物質を使用するとチョーク病菌をふくむカビ群やウイルスのより増殖する度合いが増す。

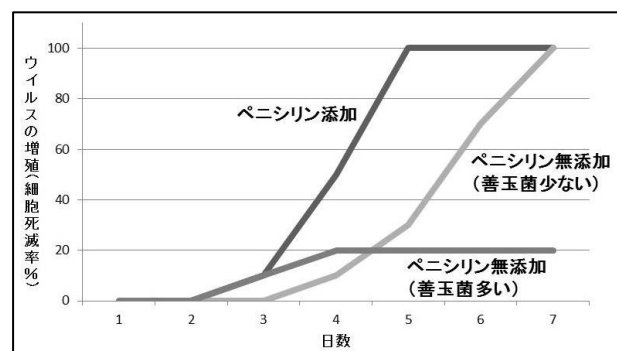


図1. 抗生物質存在下でのウイルスの増殖. 神経壊死症ウイルス、抗生物質ペニシリン、さらにウイルス感染を抑える細菌の培養液上澄の3者を混合した場合、ウイルスは増殖した。一方、ペニシリンを除いた反応系では、ウイルスの増殖は抑制された。

有用善玉菌の機能

(1) 腐蛆病菌、チョーク病菌、ウイルスをおさえる有用細菌

養蜂環境には、自然界と同様に、悪玉菌と善玉菌が分布しており、これらの相互作用（戦い）において善玉菌が悪玉菌を抑えて優勢となっていれば、微生物による疾病の発症頻度は非常に低くなる（前田 2005）。

筆者らは、（一社）日本養蜂協会および同協会の養蜂家の協力を得て、ミツバチ善玉菌の研究を行ってきた。そのなかで、ミツバチ巣箱、蜂の体内外、野外の水飲み場などから多くの細菌を採取して、まず、アメリカ腐蛆病菌を抑制するか否かの検定を行い、腐蛆病

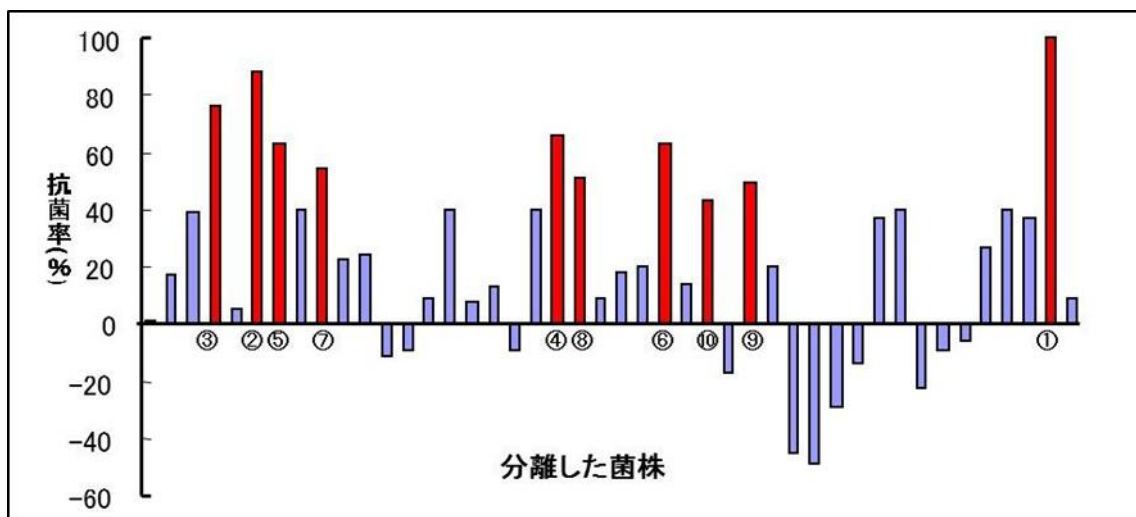


図2. 善玉細菌による腐蛆病菌の増殖抑制. 蜜蜂の巣箱、蜂体および蜂の水飲み場より採取した細菌株による腐蛆病菌 (*Paenibacillus larvae*) の増殖抑制能を測定し、抑制率 50%以上の細菌株に①から⑩までの番号を付した。

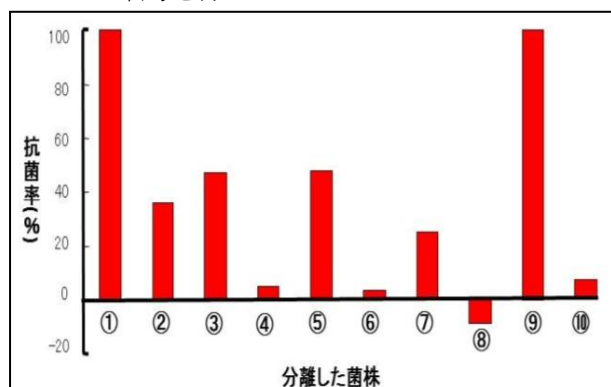


図3. 分離した細菌株によるチョーク病菌 (*Ascospaera apis*) の増殖抑制. 図2において高い抗腐蛆病菌活性をあらわした 10 株について抗チョーク病菌活性を測定した。

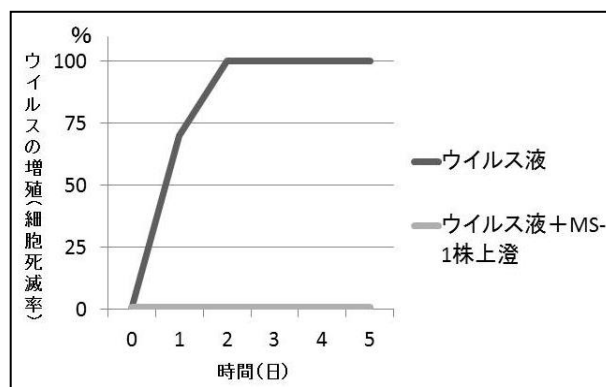


図4. 細菌 MS-1 株によるウイルス感染能の抑制. MS-1 株は、神経壊死症ウイルスや鶏インフルエンザウイルスを不活化した。

加した (図5)。

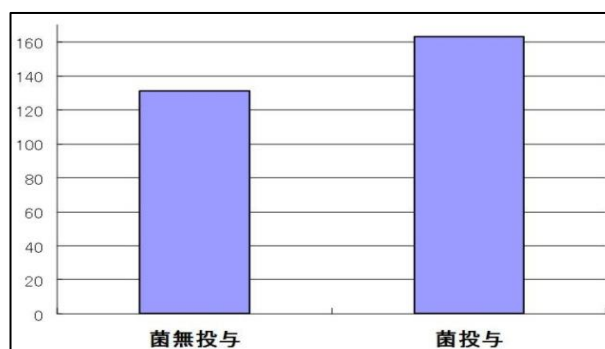


図5. 細菌 MS-1 株の給与による蜜蜂の蜂群増大. 蜂の増加率は、巣ワク 1 枚あたりの平均値としてあらわした。縦軸は蜂群増加率 (%) を示している。

増殖を強く抑制する有用菌 10 株を選択した (図2)。

つぎに、この 10 株について、チョーク病菌を抑える能力を検定し、シュウドモナス属菌 MS-1 株を選定した (図3)。なお、この MS-1 株は、ヨーロッパ腐蛆病菌の増殖も抑制した。さらに、代表的なウイルス (鶏インフルエンザウイルス、神経壊死症ウイルスなど) の感染・増殖能を強く抑制することもわかった (図4)。

そして、この菌株を、糖蜜液や飲み水に混合してミツバチに給与し、ミツバチの増減をしらべた。すなわち、実験期間は約2ヶ月で、実験場所を宮崎県綾町 (英養蜂場) および小林市 (中川養蜂場) に設定し、菌の給与を1日おきに行った。この給与試験の結果、6カ所に設定した菌株給与区において、蜂による餌や水の摂取量に多少の違いが見られたが、生菌を給与しない対象区と比較して、全ての菌給与区において蜜蜂は増

次に、実際にこの有用菌、シュウドモナス属 MS-1 株が蜜蜂の腐蛆病を防除するか否かの試験を、(財)畜産生物科学安全研究所において実施した。すなわち、蜜蜂群を 3 グループに分け、1 群には MS-1 株の希釈液を噴霧、他の 1 群には砂糖液に混合して投与した。また、残りの 1 群には MS-1 株を与えていない。次に、すべての蜂群に腐蛆病菌を噴霧することによって蜜蜂を攻撃したところ、MS-1 株を投与した 2 区の蜂群では腐蛆病は発症しなかった。一方、生菌を投与しない実験区では発病した (図 6)。

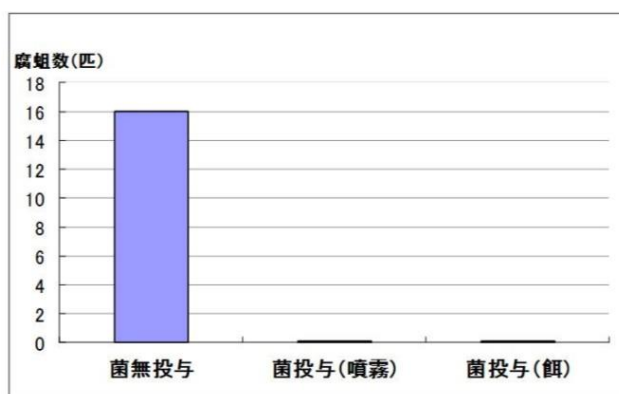


図 6. 腐蛆病菌による蜜蜂への攻撃試験. MS-1 株の投与により、腐蛆病菌は蜜蜂に感染しなかった。

また、チョーク病の防除試験は、谷口養蜂場 (宮崎県日南市) で、MS-1 株培養液の 1/10 希釈液を噴霧した巣箱と MS-1 株を使用しない巣箱とに分けて行った。その結果、MS-1 株の噴霧試験区ではチョーク病の発症は大幅に抑制された (図 7)。このように、善玉菌によって、これらの病原菌の感染が抑制され、蜂群の増加することが明らかになった。

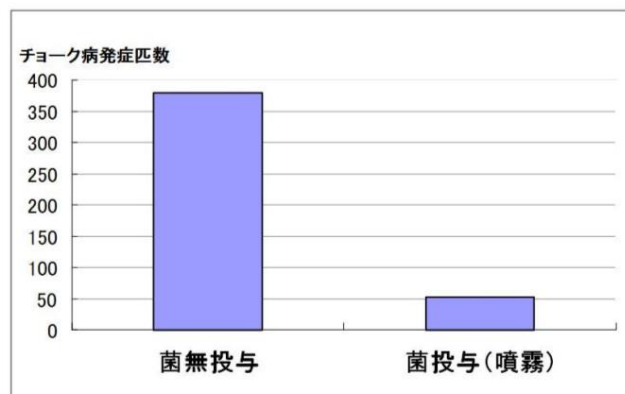


図 7. 細菌 MS-1 株によるチョーク病菌の感染防除。

(2) 有用菌は動物の免疫機能を増進する

腸内細菌が、人間や動物の健康に重要であることは再認識されており、腸内細菌の組成が良好な子供では、免疫力がつよく、またアレルギー症状をあらわす率の少ないことが判明している。また、人体の約 60% のリンパ球が集中する腸内において、腸内細菌が減少すると免疫機能が減退し、腸内細菌数・相が復元するとその機能も回復することがわかっている。このように免疫機能と腸内細菌との間には密接な関係がある。従って、保存料が添加されている (全てではないと思うが) 惣菜食品などを食べた場合には、腸内細菌に影響がでる。このため、ヨーロッパでは、腸内細菌虐待罪という言葉が、幼児虐待罪とおなじように使われている。同様に、抗生物質を使用した場合には、養蜂の免疫機能は減退するが、上記の養蜂の疾病防除に使用した MS-1 株は、免疫増進効果をあらわすことが判明している。

(3) 有用細菌は農薬を分解する

殺虫農薬クロチアニジン (ネオニコチノイド系薬剤、通称ダントツ) は、使用規模が拡大し、蜜蜂への被害が増大している。この薬剤は、養蜂などの有用昆虫への被害とともに小児の神経障害をひきおこすことも危惧されており、フランスをはじめ EU などにおいて使用自粛または禁止の措置がとられている。

クロチアニジン農薬は脊椎動物には影響が少ないとされており、実際に市販ダントツ液を 4,000 倍に希釈して魚類細胞 (EPC 細胞) に添加した場合には細胞は増殖した。しかし、500 倍希釈液では細胞は死滅した。そこで、この農薬 500 倍希釈液に有用細菌 MS-1 株を添加して 1 日培養し、次にこの液を用いて動物細胞を培養したところ、細胞は生存した (図 8)。この結果は、細菌 MS-1 株がダントツを分解し、その毒性が減少したことを示している。

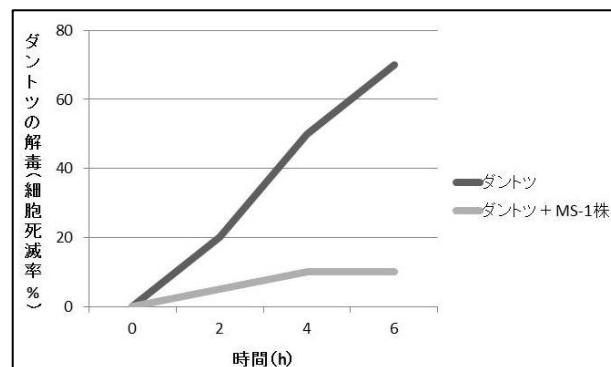


図 8. 細菌 MS-1 株による農薬ダントツの解毒。

病原菌はどこにもいるのか

腐蛆病などの疾病が発症した場合に、この病原菌は外部からきたのか、元来住み着いていたものかという疑問が生じる。宮崎県では、2010、2011年に口蹄疫、鶏インフルエンザ疾病が大規模に発生し、以降に、これらの病原ウイルスが持ち込まれないように、家畜農場の出入り口の消毒、そして養鶏場では野鳥進入防止ネットが設定されている。しかし、あれだけ大規模に拡散したウイルスが全て排除、消滅したかといえは疑問の残るところである。一方、家畜には毎日抗生物質を飼料に混合して給与している。これにより、上記のようにウイルスの増加する条件をつくりだしており、さらに家畜免疫機能が衰える、すなわち疾病に対する抵抗力が減退している。よって、この状況においては、ウイルスの侵入を防ぐよりは、抗生物質の給与をやめ、ウイルスが増えないようにすること、同時に家畜を丈夫にする方策をとるほうが現実的かつ効果的である。実際、EUでは家畜への抗生物質の毎日の給与を取りやめており、この10年間に口蹄疫は発症していない。なおEUでは抗生物質は治療用には使われていて、このような治療剤としての施行例は、予防として抗生剤を使用しなくても、すなわち飼料に毎日添加して給与しなくても、疾病防除は可能であることを示している。

腐蛆病菌、チョーク病菌については、これらの疾病が多くのある場所で発症する可能性のあることから、病原菌は現場に分布すると考えられる。そして、病原菌のつくる胞子は、加熱、乾燥、薬剤などの悪条件に対して抵抗でききる機能を保持し、適当な温度、水分があれば発芽する。しかし、人間の食中毒でも同じ事が言えるように、少数の病原菌細胞が発芽しても発病には至らない。病原菌が増殖すると、1cm³中に数百万の菌が増殖することも珍しくなく、こうした菌の増殖により疾病が発症することになる（但し、細菌毒素による中毒症状では、少ない菌数でも発症する）。

従って、腐蛆病菌の胞子が発芽してから疾病に至るまでには、発芽した細胞が増殖する必要があり、その増殖の条件には、適当な温度、水分、そして汚れなどに由来する栄養物の存在があげられる。さらに、腐蛆病菌が増殖するためには、敵対する（拮抗力の強い）善玉菌がいないこと、または、拮抗力が弱くても多数で場所を占有する通常菌群が生息しないことも必要条件となる。

細菌の生息場では、異なる細菌同士の拮抗作用、すなわちお互いに相手を牽制し、他を圧倒しようとする作用が働いている。また、拮抗作用の弱い菌が多く生息する場においても、「場の占有」があり、該当場所に空き（空席）がないと病原菌などが入り込みにくいと

いう現象がある。このように、有用菌の存在と疾病発症には、密接な関連がある。場の占有については、乳酸菌やバチルス菌、あるいは市販の土壌混合細菌などを散布することで効果を得ることができる。しかし、多数であることが必要であるため、効果の永続性は拮抗力の強い善玉菌と比較した場合には劣る。

さらに、注意すべきこととして、図2にあるように、蜜蜂飼育環境には腐蛆病菌の増殖を促進する細菌群が少なからず生息していることがあげられる。この図は、採取した細菌が腐蛆病菌を抑制するか否かの試験を行った結果であるが、プラス方向の棒グラフは、腐蛆病菌を抑制した度合いを示している。一方、X軸下方に伸びる（マイナス値）の棒グラフは、腐蛆病菌が抑制されず、かえってより増殖したことを示している。

プロバイオティクス、そしてバイオコントロールへ

プロバイオティクスとは、主として宿主動物の腸（消化管）内において、宿主の代謝増進や免疫の向上効果をあらわす微生物群を意味し、代表的な例としては、人間が摂取する乳酸菌、ビフィズス菌などがある。

これまでに、往々にして腸内細菌とは、腸内に常態的に生息している、固定されたグループからなる微生物群と考えられていたが、近年の研究において、動物が良しとする善玉菌を体外より積極的に受け入れることが明らかになった。これはデンジャーセオリーの研究によるもので、Matzinger (2002) によって報告された。すなわち、自己と非自己を識別して、非自己を拒絶する免疫機能において、腸においては、自らに有効と判断した微生物であれば、外部（非自己）の微生物であってもデンジャーではないと判断し、腸管免疫系は拒絶せずに受容するという内容である。このように、腸は外部より有用菌を常時受け入れており、この受容する菌は、乳酸菌に限定されるものではない。

ここで注意すべきは、人間にとって（培養しやすいので）扱いやすい種類として乳酸菌が重視されている点がある。すなわち、乳酸菌の培養では、pHが酸性側である6以下の培地を用い、さらに、他の細菌が利用しにくい糖（ラクトースなど）を栄養として採用するので、雑菌が増殖しにくいといった利点がある。しかし、乳酸菌の拮抗作用については、生育するpHが酸性側にあるように、他の細菌と生息する環境が異なるため、競合の度合いが少ない。これは拮抗活性の低いことを意味しており、実際に乳酸菌においては抗ウイルス、抗カビ効果は充分には期待できない。

バイオコントロールとは、有益生物によって悪害生物を抑制・排除する方法であり、養蜂においても拮抗

作用の強い善玉菌をバイオコントロール生菌として給与することにより、悪玉菌を制御・抑制（コントロール）することが可能となる。そして、このバイオコントロールに使用する有用細菌は、上記の病原菌を抑制、排除する効果と共に、プロバイオティクスとしての代謝・免疫向上効果を併せ持つ菌株であるため、養蜂の安定生産に資するものと期待される。

謝 辞

本稿にあるシュウドモナス属細菌 MS-1 株については、(一社)日本養蜂協会との共同・連携において、その機能を明らかにした。この過程では、日蜂協および同協会の養蜂家の方々、および宮崎大学農学部のご支援をいただいた。また、腐蛆病の防除実験は、(財)畜産生物科学安全研究所が実施した。ここに、ご協力いただいた方々に深謝する。

文 献

- 江上哲朗・前田昌調 (2012) 無薬飼料による養豚全頭飼育 —抗ウイルス微生物の利用— 畜産の研究. 66:263-266.
- Kerr A. (1972) Biological control of crown gall: seed inoculation. *J. Appl. Bacteriol.* 35:493-497.
- 前田昌調 (2005) 水圏の環境微生物学. 講談社. pp204. 東京.
- 前田昌調 (2011) ウイルスを抑える自然細菌. 畜産の研究. 65:703-706.
- Maeda M, Liao IC. (1992) Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture.* 21: 25-29.
- Matzinger, P. (2002) The danger model: A renewed sense of self. *Science*, 296:301-305.
- Nogami K, Maeda M. (1992) Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49: 2373-2376.
- 柴田麗美・中村純 (2005) ミツバチとプロバイオティクス. *ミツバチ科学.* 26:109-111.