

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06426

研究課題名（和文）ミツバチノゼマ病の新たな病原体Nosema sp.の種と病原性、国内分布の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the species, pathogenicity and distribution of new Nosema pathogen of nosemosis in honeybee

研究代表者

板垣 匡（Itagaki, Tadashi）

岩手大学・農学部・嘱託教授

研究者番号：80203074

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：家畜伝染病予防法に指定されているミツバチ・ノゼマ病は獣医学的に重要な疾病であるにもかかわらず、研究・解明は進んでいない。本研究により東北地方におけるノゼマ病の病原体が、指定されているNosema apisではなく、N. ceranaeおよびNosema sp.であることを明らかにしたことは本病の防遏対策を講じる上で極めて重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家畜伝染病予防法に指定されているミツバチ・ノゼマ病は獣医学的に重要な疾病であるにもかかわらず、同じ家畜である牛や豚などの家畜動物の感染症に比べて研究・解明は進んでいない。本研究により東北地方におけるノゼマ病の病原体が、指定されているNosema apisではなく、N. ceranaeおよびNosema sp.であることを明らかにしたことは本病の防遏対策を講じる上で極めて重要であり、学術的意義や社会的意義が大いにありと認められる。

研究成果の概要（英文）：Honeybee nosemosis was designated in 1997 as a Monitored Infectious Disease by the Act on Domestic Animal Infectious Diseases Control published by the Minister of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, and is a very crucial disease for Veterinary Medicine. However, the elucidation of the disease remains insufficient. This study clarified that the pathogen is not Nosema apis but Nosema ceranae and Nosema sp. in Tohoku district. The elucidation is very important for the disease prevention.

研究分野：獣医寄生虫学

キーワード：Nosema ceranae Nosema sp. ニホンミツバチ セイヨウミツバチ ノゼマ病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

日本における養蜂は乳・肉牛や豚に次いで飼養戸数が多い重要な畜産業である(農林水産省畜産統計平成30年10月)。ノゼマ病はミツバチの感染症であり、成蜂(働き蜂、女王蜂、雄蜂)に下痢などを引き起こすとともに働き蜂の寿命が短縮されることで養蜂群全体が弱体化し蜂コロニーが崩壊することが知られる。本病の病原体は、微孢子虫類ノゼマ科の *Nosema apis* および *N. ceranae*、最近新種として記載された *N. neumani* の3種である。日本では、ノゼマ病は1997年に家畜伝染病予防法の届け出伝染病に指定されて監視体制が強化されたが、病原種の浸潤状況は十分解明されていない。申請者らは、東北地方(青森、秋田、岩手、宮城、山形、福島)のミツバチ類(ニホンミツバチ、セイヨウミツバチ)におけるノゼマ科微孢子虫の感染状況を2018年4月から調査している。その結果、これまでノゼマ病の主要な病原体と考えられていた *Nosema apis* はミツバチ類から全く検出されず、*N. ceranae* がニホンミツバチの2.8%、セイヨウミツバチの21.9%から検出され、東北地方では *N. ceranae* がノゼマ病の病原体として広く浸潤していることを明らかにした(高島・板垣2019a; 高島・板垣2019b)。さらにリボソーム小サブユニット(SSU)RNA遺伝子の解析によって、*N. apis* や *N. ceranae*、*N. neumani* の3種とは別種と考えられる *Nosema sp.* をミツバチ類から新たに発見した。*Nosema sp.* は、ニホンミツバチの20.8%、セイヨウミツバチの0.9%で検出されたことから、東北地方の特にニホンミツバチにおけるノゼマ病の主要な原因種である可能性が高い(高島・板垣2019b)。ミツバチ類から既存の3種とは異なる *Nosema sp.* が検出されたのは、日本のみならず世界でも初めてであり、その種やミツバチに対する病原性、国内での分布状況などは全く不明であり、その解明が望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、第一に、東北地方におけるミツバチ類の寄生虫感染症(*Nosema sp.*を含む)の汚染状況を明らかにすること、第二に、*Nosema sp.* を分子学的および形態学的に同定すること(あるいは新種として原記載すること)、第三に、*Nosema sp.* のミツバチ類に対する病原性を解明すること、である。前述のとおり、*N. apis*、*N. ceranae*、*N. neumani* の3種とは異なる *Nosema* 属がミツバチ類(*Apis* 属)から発見されたのは世界初であり、*Nosema sp.* がノゼマ病の新たな病原体であるかを解明する本研究は、学術的にも十分な独自性および独創性を有するばかりでなく、本病の防遏対策を講じる上でも不可欠かつ喫緊の研究課題と考えられる。

ノゼマ病を含むミツバチの感染症は、獣医学的に重要な疾病であるにもかかわらず、同じ家畜である牛や豚などの家畜動物の感染症に比べて研究・解明は進んでいない。本研究は国内の獣医学関連研究者にミツバチ感染症の研究を開始するきっかけと刺激を与えられる研究課題であると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 2018年3月から2019年6月に東北地方6県の養蜂場、野生巣および野生花からミツバチ類を採集した。家畜伝染病予防法に指定されているアカリンドニ(*Acarapis woody*)およびバロアダニ(*Varroa destructor*)の解析には、ニホンミツバチでは8養蜂場18コロニーからの386個体、6野生巣からの89個体、15地点の野生花からの109個体を解析に用い、セイヨウミツバチでは2養蜂場2コロニーからの40個体、13地点からの130個体をそれぞれ解析に用いた。*Nosema*

種の解析には、ニホンミツバチでは8養蜂場からの311個体、6野生巣からの89個体、15地点の野生花からの109個体を解析に用い、セイヨウミツバチでは2養蜂場2コロニーからの40個体、13地点からの115個体をそれぞれ解析に用いた。ミツバチ類の体表および気管を実体顕微鏡で観察することで、それぞれバロアダニおよびアカリダニを検出した。検出されたダニ類はゲータ液で虫体を透過して形態学的に観察するとともにアカリダニについてはHigh Pure PCR Template Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) を用いて全DNAを抽出し、ミトコンドリアCO1遺伝子のDNA(1638bp)をPCR増幅して塩基配列を解読し分子学的に解析した。

(2) Nosematidae属の検出には、まずsmall subunit (SSU) rDNA (およそ240 bp)をターゲットとしたNosematidae科特異的PCR増幅によりNosematidae科DNAが確認されたサンプルについて*N. apis*と*N. ceranae*を識別できるmultiplexPCRを行うことで両種を同定した。さらに*N. ceranae*または*Nosema* sp.が検出されたサンプルについてSSUに加えてlarge subunit (LSU) rDNAおよびinternal transcribed spacer(ITS)の全長DNAをPCR増幅、その塩基配列を解読した。ミツバチ属寄生の*N. apis*と*N. ceranae*、*N. neumani*に加えて遺伝学的に近縁な*Nosema*属種(*N. thomsoni*など)のGenBank登録配列とともに分子系統解析することによって*Nosema* sp.を分子学的に同定した。

(3) 青森県の1養蜂場の1コロニーから得たニホンミツバチ50匹を感染実験に用いた。そのうちの10匹はNosematidae科に感染していないことを検証するためにNosematidae科特異的PCR増幅に供し、陰性を確認した。感染実験に用いた*Nosema*属の孢子(spore)は岩手大学内の野生花に飛来したセイヨウミツバチから分離し、走査型電子顕微鏡(TEM)による観察により孢子の壁が電子密度の高いexosporeと電子輝度のendosporeで構成され、21-23個のpolar filament coilおよび二重核を有することから、*N. ceranae*の孢子と確認された。ニホンミツバチ20匹孢子125,000個を経口的に暴露させ、残りの20匹は非投与対照とした。感染2日後の剖検により直腸内容物に多数のsporeが確認されたミツバチ1匹についてsporeの形態を電子顕微鏡(TEM)で観察するとともに、中腸組織切片のHE染色像を観察した。

4. 研究成果

(1) バロアダニは全てのミツバチ類から検出されなかった。アカリダニは79個体のミツバチ類から検出され(検出率13.5%)、青森県はアカリダニの新分布地であることが確認された。アカリダニのCO1 DNA塩基配列から、日本各地およびUK由来のアカリダニは系統学的に極めて近縁であり、カリダニは最近150年の間に日本に侵入し、全国各地に拡散したと考えられた。

(2) Nosematidae科SSUrDNAは宮城県を除く5県のニホンミツバチの23.4%、セイヨウミツバチの22.6%から検出された。Nosematidae科陽性個体のうち、ニホンミツバチの11.8%とセイヨウミツバチの97.1%は分子系統解析によって*N. ceranae*であることが確認され、東北地方のミツバチ類では*N. ceranae*を含むNosematidae科微孢子虫の感染が広く蔓延することを初めて明らかにした。また、Nosematidae科陽性個体のうち、ニホンミツバチの88.2%とセイヨウミツバチ

の 2.9%は *Nosema* sp.感染であり、ニホンミツバチで *Nosema* sp.感染が多いことが示された。SSU-rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹では、*Nosema* sp.は *N. apis* および *N. ceranae* とはことなり、北アメリカの蛾や solitary bees から検出されている *N. thomsoni*、およびトルコのモンシロチョウから検出されている *N. pieriae* と同一の clade を形成した。

3. ニホンミツバチから検出された spore は卵形, $5 \times 2 \mu\text{m}$, *N. ceranae* の spore の形態的特徴を示した。また、組織学的に中腸上皮細胞に様々な発育段階の *Nosema* 虫体が観察され、中腸上皮細胞で *N. ceranae* が発育増殖していると考えられ、ニホンミツバチは *N. ceranae* の発育に好適な宿主であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tadashi Itagaki, Kei Hayashi, Yuma Ohari	4. 巻 -
2. 論文標題 The causative agents of fascioliasis in animals and humans: Parthenogenetic Fasciola in Asia and other regions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection, Genetics and Evolution	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.meegid.2022.105248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shunsuke Takashima, Yuma Ohari, Tadashi Itagaki	4. 巻 83
2. 論文標題 Prevalence of Nosema species infections in Apis cerana japonica and Apis mellifera honeybees in the Tohoku region of Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 102361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parint.2021.102361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Peru Gopal Biswas, Yuma Oharia, Uday Kumar Mohanta, Tadashi Itagaki	4. 巻 295
2. 論文標題 Development of a multiplex PCR method for discriminating between Heterakis gallinarum, H. beramporia, and H. indica parasites of poultry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary Parasitology	6. 最初と最後の頁 109463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vetpar.2021.109463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Peru Gopal Biswas, Yuma Oharia, Uday Kumar Mohanta, Tadashi Itagaki	4. 巻 83(4)
2. 論文標題 Molecular characterization of Ascaridia galli from Bangladesh and development of a PCR method for distinguishing A. galli from Heterakis spp.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 666 670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.20-0728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Peru Gopal Biswas, Yuma Oharia, Uday Kumar Mohanta, Tadashi Itagaki	4. 巻 83(2)
2. 論文標題 Development of conventional multiplex PCR method for discrimination between <i>Dispharynx nasuta</i> and <i>Cheilospirura hamulosa</i> (Nematoda: Acuariidae) parasitizing poultry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 226 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.20-0664	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shunsuke Takashima, Yuma Ohari, Tadashi Itagaki	4. 巻 75
2. 論文標題 The prevalence and molecular characterization of <i>Acarapis woodi</i> and <i>Varroa destructor</i> mites in honeybees in the Tohoku region of Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2020.102052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------