

岐阜県南西部の養蜂場における
蜂病ウイルスの感染状況と対策に関する研究

2021 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科
(岐阜大学)

北 村 夕 子

岐阜県南西部の養蜂場における
蜂病ウイルスの感染状況と対策に関する研究

北 村 夕 子

目次

略語一覧	1
緒言	2
図表	9
第一章 岐阜県南西部の飼育セイヨウミツバチにおける 蜂病ウイルスの分布	11
1. 序論	12
2. 材料及び方法	14
2. 1. セイヨウミツバチ検体の収集	14
2. 2. 女王蜂の導入歴及び代用花粉の使用についての聞き取り調査	14
2. 3. DWV プライマーの作製	14
2. 3. 1. DWV プライマーの設計	14
2. 3. 2. 設計した DWV プライマーの特異性及び感度の確認	15
2. 4. 蜂病ウイルスの検出	15
2. 4. 1. 乳剤の作製	15
2. 4. 2. RNA の抽出	16
2. 4. 3. cDNA の合成	16
2. 4. 4. 8 種類の蜂病ウイルスの PCR	16
2. 5. PCR 増幅産物のシーケンス解析	17
2. 6. 分子系統学的解析	18
2. 7. BQCV, IAPV 及び DWV 陽性群におけるウイルス保有状況の解析	18

2. 8. 統計解析	18
2. 9. アクセション番号	19
2. 10. 倫理的配慮	19
3. 結果	20
3. 1. 蜂病ウイルス遺伝子の検出	20
3. 2. 女王蜂の導入歴及び代用花粉の使用歴とウイルス検出結果の比較	20
3. 3. BQCV の分子系統学的解析	21
3. 4. IAPV の分子系統学的解析	21
3. 5. LSV の分子系統学的解析	22
3. 6. DWV の分子系統学的解析	22
3. 7. BQCV, IAPV 及び DWV 陽性群におけるウイルス保有状況の解析	23
4. 考察	24
図表	31

第二章 養蜂場に生息する野生節足動物における

蜂病ウイルスの分布 41

1. 序論	42
2. 材料及び方法	44
2. 1. セイヨウミツバチ及び野生節足動物検体の収集	44
2. 2. 乳剤の作製	44
2. 3. RNA の抽出	44
2. 4. cDNA の合成	44
2. 5. 8 種類の蜂病ウイルスの PCR 及び PCR 増幅産物のシーケンス解析	45
2. 6. 分子系統学的解析	45

2. 7. 統計学的解析	45
2. 8. アクセション番号	45
2. 9. 倫理的配慮	45
3. 結果	46
3. 1. 調査蜂場で捕獲された野生節足動物の種	46
3. 2. 蜂病ウイルス遺伝子の検出	46
3. 3. IAPV の分子系統学的解析	46
3. 4. DWV の分子系統学的解析	47
3. 5. LSV の分子系統学的解析	47
4. 考察	48
図表	51
第三章 一養蜂場における蜂病ウイルスの分布	56
1. 序論	57
2. 材料及び方法	59
2. 1. セイヨウミツバチの収集	59
2. 2. 養蜂場内の蜂群配置図の作成	59
2. 3. 各蜂群と隣接蜂群との巣門角度差及び巣門距離の測定	59
2. 4. 蜂病ウイルスの検出	60
2. 4. 1. 乳剤の作製	60
2. 4. 2. RNA の抽出	60
2. 4. 3. cDNA の合成	60
2. 4. 4. 8 種類の蜂病ウイルスの PCR	60
2. 5. IAPV 陽性群におけるウイルス保有状況の解析	60
2. 5. 1. 個体からの IAPV, LSV 及び BQCV の検出	60

2. 5. 2. IAPV のシーケンス解析	60
2. 5. 3. IAPV の分子系統学的解析	61
2. 6. 統計学的解析	61
2. 7. アクセッション番号	61
3. 結果	62
3. 1. 蜂病ウイルス遺伝子の検出	62
3. 2. 養蜂場内における全蜂群及び陽性蜂群の配置	62
3. 3. 陽性蜂群とその隣接蜂群との位置関係と隣接蜂群でのウイルス検出状況	62
3. 4. LSV, BQCV 及び IAPV 陽性蜂群におけるウイルス保有状況の解析	63
3. 5. 養蜂場内に分布する IAPV の分子系統学的解析	64
3. 6. IAPV の各クレードに属する遺伝子の陽性率及び養蜂場内の分布	64
4. 考察	65
図表	68
結論	80
図表	83
謝辞	86
引用文献	87

略語一覧（アルファベット順）

- ABPV acute bee paralysis virus, 急性麻痺ウイルス
- BQCV black queen cell virus, 黒色女王蜂児病ウイルス
- CBPV chronic bee paralysis virus, 慢性麻痺ウイルス
- DWV deformed wing virus, チヂレバネウイルス
- IAPV Israeli acute paralysis virus, イスラエル急性麻痺ウイルス
- KBV Kashmir bee virus, カシミール蜂ウイルス
- LSV Lake Sinai virus, レイクシナイウイルス
- RdRp RNA-dependent RNA polymerase
- SBV sacbroodvirus, サックブルードウイルス
- UTR Untranslated region, 非翻訳領域

緒言

ミツバチは蜂蜜、ローヤルゼリー、蜜蝋を生産するだけでなく、花粉送粉者としても活用されている。世界では2007年に蜂蜜107万トンが生産され、その経済効果は12億5000万ドルと試算される [90]。日本では、2020年度に蜂蜜2,929トン、ローヤルゼリー2,991 kg、蜜蝋22,858 kgが生産され、これらの総生産額は約60億円に上る [61]。一方、世界の農作物の75%、野生の顕花植物の90%は、動物による花粉媒介に少なからず依存し [43]、ミツバチは野生であるか飼育下であるかに関わらず、世界の農作物の受粉を行うことで耕種農業に貢献している。ミツバチによる花粉媒介の経済的価値は、アメリカ合衆国において約150億ドルと試算される [47]。また、日本におけるミツバチによる花粉媒介は2013年時点で約1,000億円の経済効果をもたらすと推定されている [46]。このように、ミツバチは日本を含め世界中で食料生産において重要な役割を担っている。

近年、ミツバチの減少や死亡がアメリカ合衆国やヨーロッパ諸国、アジアで認められている [20, 90]。これまで、このようなミツバチの減少や死亡の原因として、病原体や寄生虫、気候、栄養、農薬が挙げられている [84]。この中でも蜂病ウイルスは、ミツバチの形態や生理、行動に影響を与え、蜂群を弱体化させる要因として考えられている [34]。Dainatらは、チヂレバネウイルス (deformed wing virus : DWV) の感染によりミツバチの寿命が短くなることを報告した [20]。また、イスラエル急性麻痺ウイルス (Israeli acute paralysis virus : IAPV) や急性麻痺ウイルス (acute bee paralysis virus : ABPV) は、アメリカ合衆国及びドイツでミツバチの減少との強い関連が示唆されている

[52]。ミツバチの減少や死亡の原因はいまだ特定されていないが、先行研究は蜂病ウイルスとの関連を強く示唆した [52]。

蜂病ウイルスは、現時点で少なくとも 30 種類が報告されている [7]。蜂病ウイルスの中でも、1 本鎖プラス鎖 RNA ウイルスに分類される黒色女王蜂児病ウイルス (black queen cell virus: BQCV), DWV, サックブルードウイルス (sacbroodvirus : SBV), ABPV, IAPV, カシミール蜂ウイルス (Kashmir bee virus : KBV), 慢性麻痺ウイルス (chronic bee paralysis virus : CBPV) の 7 種類は世界に広く分布することが報告されている [7, 22]。ミツバチは女王蜂, オス蜂, 働き蜂の 3 つのカーストに分けられ, その発育段階は主に卵, 幼虫, 成虫に分けられる。卵が孵化した後, ローヤルゼリーを与えられ続けたメスの幼虫 (女王蜂児) は成長して女王蜂となる [91]。BQCV は *Picornavirales* 目 *Dicistroviridae* 科 *Triatovirus* 属に属し, 女王蜂児が発症すると死に至る [92]。DWV は *Picornavirales* 目 *Iflaviridae* 科 *Iflavirus* 属に分類され, 成虫及び幼虫で発症し, 成虫では体の奇形や翅の変形, 寿命の短縮を引き起こし, 幼虫では死亡を引き起こす [92]。SBV は, DWV と同じ *Iflavirus* 属に属し, 主に幼虫で発症し死に至らせる [92]。ABPV, IAPV 及び KBV はいずれも *Picornavirales* 目 *Dicistroviridae* 科 *Aparavirus* 属に属するウイルスで, 成虫に麻痺や死亡を引き起こし, 幼虫に感染した場合も死亡させるが, その一方で, *Picornavirales* 目未分類の CBPV は成虫だけで発症し, 慢性的な麻痺や死亡を引き起こすとされる [92]。また, 2007 年~2008 年にアメリカ合衆国で大量死した蜂群から検出されたレイクシナイウイルス (Lake Sinai virus : LSV) は *Nodamuvirales* 目 *Sinhaliviridae* 科 *Sinaivirus* 属に分類されるが, 臨床症状や発症するカースト, 発育段階は明らかとなっていない [74, 82]。これまでに

日本には、少なくとも BQCV, DWV, SBV, IAPV 及び CBPV の 5 種類の蜂病ウイルスが分布することが明らかとなっている [45, 57]。

日本国内では、2008 年～2009 年にかけて蜂群数の減少が認められ、花粉交配用蜂群が不足した。これを受けてミツバチの健康を害する要因を解析するため、農林水産省の公募事業により全国的な蜂病の浸潤調査が行われた [27]。その結果、調査蜂群 (n=57) のすべてで蜂病ウイルスが検出され、日本の飼育下のミツバチ (以下、飼育バチ) が高率に蜂病ウイルスを保有することが明らかとなった。この調査を機に日本で蜂病ウイルスの調査が行われるようになり [45, 56, 57, 75, 76], 2018 年度及び 2020 年度には全国の養蜂家で組織される一般社団法人日本養蜂協会が主体となり、全国規模の蜂病ウイルス浸潤状況調査が行われた [40, 42]。この日本養蜂協会の調査は、蜂病ウイルスを日本各地で続発する飼育バチの減少や蜂群の弱体化の一要因として捉えて実施された。養蜂家で組織される団体によって調査が行われたことは、飼育バチでの蜂病ウイルスの疫学や対策に対する養蜂家の関心の高さを示している。

ミツバチや養蜂生産資材の国際的な貿易は、蜂病ウイルスの国を超えた伝播に関与する [7]。国際獣疫事務局 (World Organization for Animal Health: OIE) は陸生動物衛生規約 [44, 59]により、アメリカ腐蛆病菌 (*Paenibacillus larvae*) を含む 6 病原体 (アメリカ腐蛆病菌の他に、ヨーロッパ腐蛆病菌、アカリンダニ、ミツバチトゲダニ属、ミツバチヘギイタダニ属及びハチノスムクゲケシキスイ) の予防措置を定めている。アメリカ腐蛆病の予防措置として、生きたミツバチは当該疾病のない国あるいは地域から輸入すること、また、ミツバチが集めた花粉、蜂蜜などの製品は当該疾病のない国あるいは地域から輸入することに加え、滅菌処理すること、あるいは、陸生動物衛生規約に基づく方法により *P. larvae* の芽胞が確認されないことが規定されている [44, 59]。しか

し、蜂病ウイルスの予防措置については陸生動物衛生規約で定められていない。また、日本の動物検疫では家畜伝染病予防法（昭和 26 年 5 月 31 日法律第 166 号）に定める監視伝染病は検疫対象とされるが、蜂病ウイルスは検疫対象には含まれていない。日本は国外から毎年女王蜂を輸入しており、近年はスロベニア及びオーストラリアが輸入先となっている。2015～2019 年度にかけ、スロベニアから合計 3,787 群の女王蜂が輸入され、オーストラリアから合計 12,096 群の女王蜂が輸入された [28-32]。これまで、スロベニアやアメリカ合衆国の女王蜂から BQCV, DWV, SBV, KBV, CBPV, あるいは, ABPV が検出されている [17, 37]。一方、ミツバチの飼育では花の咲かない時期に市販の餌（代用花粉）が利用される [53]。日本で市販される代用花粉には天然花粉を含むものがあり、輸入される代用花粉のうち原産国が判明しているものは中国や韓国に由来する（表 I）。上述のように、OIE はアメリカ腐蛆病の予防措置として花粉の対策を定めているが、ヨーロッパで市販されている代用花粉から DWV, SBV, IAPV 及び CBPV が検出されていることから [23]、病原体による花粉の汚染は腐蛆病に限らない。日本で市販される代用花粉の中には滅菌あるいは殺菌処理がされているものもあるが、多くの商品ではこれらの処理がされているか不明である（表 I）。以上より、輸入される女王蜂や代用花粉は、日本国内に蜂病ウイルスを持ち込む可能性がある（図 I-①）。

飼育バチは、採蜜やミツバチの育成、販売のために都道府県を越えて日本国内を移動する。養蜂には花の開花に合わせて国内を移動する「転飼養蜂」と一ヶ所に留まって行う「定地養蜂」がある [55]。養蜂振興法（昭和 30 年法律第 180 号）第 4 条第 1 項に基づいて、養蜂家が転飼先の都道府県から受けた転飼許可数は 2019 年に 139,244 群、2020 年に 138,856 群であった [61]。また、ミツバチは養蜂業者により蜂群単位で販売されている。養蜂業者は都道府県内外

の個人養蜂家から蜂群を仕入れ、全国に販売する。蜂群を県外に移動させる場合は、「蜜蜂についての腐蛆病のまん延防止に関する規則」（昭和31年5月16日規則第21号）に基づき、家畜防疫員による腐蛆病検査が行われるが蜂病ウイルスの検査は実施されていない。そのため、蜂病ウイルスは飼育バチの移動とともに日本全国へ運ばれる可能性がある（図 I -②）。

飼育バチは交配や共通の餌場の利用を通じ、巣外で異なる養蜂場の飼育バチと接触する機会がある。女王蜂は繁殖のため、巣外に出て複数の蜂群に由来するオス蜂と交配する [98]。先行研究から、オス蜂の精液から BQCV, DWV, SBV, IAPV 及び ABPV が検出されることが報告されている [94]。また、野外の花や花粉から BQCV, DWV 及び SBV が検出されており、これらを介して養蜂場間で蜂病ウイルスが伝播することが指摘されている [3, 83]。さらに、養蜂家は採蜜や温度調整の目的で所有する複数の養蜂場間で蜂群を移動するため、離れた養蜂場間で蜂病ウイルスが伝播する可能性がある。以上のように、飼育バチは個体同士で直接的に、環境中の花を介して間接的に、さらに、養蜂家による蜂群移動を介しても接触するため、蜂病ウイルスは養蜂場間で伝播されうると考えられる（図 I -③）。

養蜂場の蜂群間においても、飼育バチは他個体と交差することがある。ミツバチには、他蜂群に間違っ入る「迷い込み」 [33]や他の弱っている蜂群から食料や巣材を奪う「盗蜂」 [70]があることが知られている。養蜂家は飼育バチの数を増やす目的で複数の蜂群を合わせる「合同」を行う。このような飼育バチの蜂群間の移動とともに、蜂病ウイルスが運ばれることが指摘されている [10, 14, 36]。また、女王蜂は蜂群の働き蜂の一部とともに元の巣を出て新しい巣を作り（分蜂）、養蜂家は、蜂群数や個体数を増やす目的で人為的な分蜂を行う。分蜂では、蜂病ウイルスがミツバチとともに元の蜂群から新しい蜂群に運

ばれることから、Fries らは分蜂を蜂群間伝播に分類した [36]。さらに、養蜂場内には飼育バチ以外の野生節足動物も存在する。これまでに野生節足動物からも BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV 及び LSV の検出が報告されている [3, 15, 49, 64, 82, 96]。以上のように、養蜂場内の蜂群間においても飼育バチは複数の経路を介して接触するため、蜂病ウイルスが蜂群間で伝播する要因となる (図 I -④)。

社会性昆虫であるミツバチは蜂群内で各個体が仕事を分業し、互いに密接に関与して生活する。成虫間では分泌液の経口的な交換 (「栄養交換 (trophallaxis)」) [91] やグルーミングが行われる [26, 34]。働き蜂の成虫は卵や幼虫の世話をし、巣内で死亡した個体や糞を掃除する [34]。先行研究では、IAPV が栄養交換で個体間伝播し [4], DWV, SBV, IAPV, ABPV 及び KBV は成虫から幼虫への給餌を介し伝播されることが示唆されている [94]。また、ミツバチの糞からは BQCV, DWV, IAPV, ABPV, KBV 及び CBPV が検出されている [94]。このように、蜂群内ではミツバチの生態的な特徴による個体間の接触により蜂病ウイルスが個体間伝播する可能性がある (図 I -⑤)。また、蜂群内にはミツバチの外部寄生虫であるミツバチヘギイタダニ (*Varroa destructor*) や害虫であるハチノスツヅリガ (*Galleria mellonella*) の幼虫が寄生することがある。ミツバチヘギイタダニから BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV 及び CBPV が検出され [42, 94], ハチノスツヅリガの幼虫から BQCV 及び IAPV が検出されている [89]。蜂群内ではこれらの衛生昆虫を介しても蜂病ウイルスがミツバチの間で伝播する可能性がある (図 I -⑤)。

以上のように蜂病ウイルスの伝播には、①国外からの伝播、②日本国内の遠隔地間での養蜂場間伝播、③地域内での養蜂場間伝播、④養蜂場内での蜂群間伝播、そして、⑤蜂群内での個体間伝播という 5 段階が存在する。蜂病ウイル

スはこのように複雑な経路で伝播することから、予防対策を立てることは難しく、これまで具体的な対策は取られなかった。

そこで、本研究では日本の養蜂業で主に利用されるセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) を対象に岐阜県における飼育バチの各蜂病ウイルスの感染状況を明らかにし、予防対策を提案することを目的とした。第一章では、蜂病ウイルスの地域における分布及び調査地域に分布する蜂病ウイルスの由来を明らかにするため、個人養蜂家や養蜂業者が混在し日本で売買される飼育セイヨウミツバチの中継地点となる岐阜県南西部において疫学調査を行った (図 I)。次に、第二章では蜂病ウイルスの分布における野生節足動物の影響を明らかにするため、同地域の野生節足動物において蜂病ウイルスを調査した。さらに、第三章では養蜂場内での蜂病ウイルスの分布の特徴を明らかにするため、同地域に位置する一蜂場で疫学調査を行った。

表 I 日本で市販されている餌 (代用花粉)

販売業社	原産国	天然花粉使用の有無	滅菌あるいは殺菌の有無
A	中国	あり	不明
	不明	あり	あり
	不明	あり	不明
	不明	不明	不明
B	不明	あり	不明
C	韓国	あり	不明
	日本	なし	不明
D	不明	あり	不明
	不明	あり	不明
	不明	あり	不明
E	不明	あり	あり
F	不明	あり	不明
G	中国	あり	あり
H	日本	なし	不明
	不明	不明	不明
I	不明	不明	不明

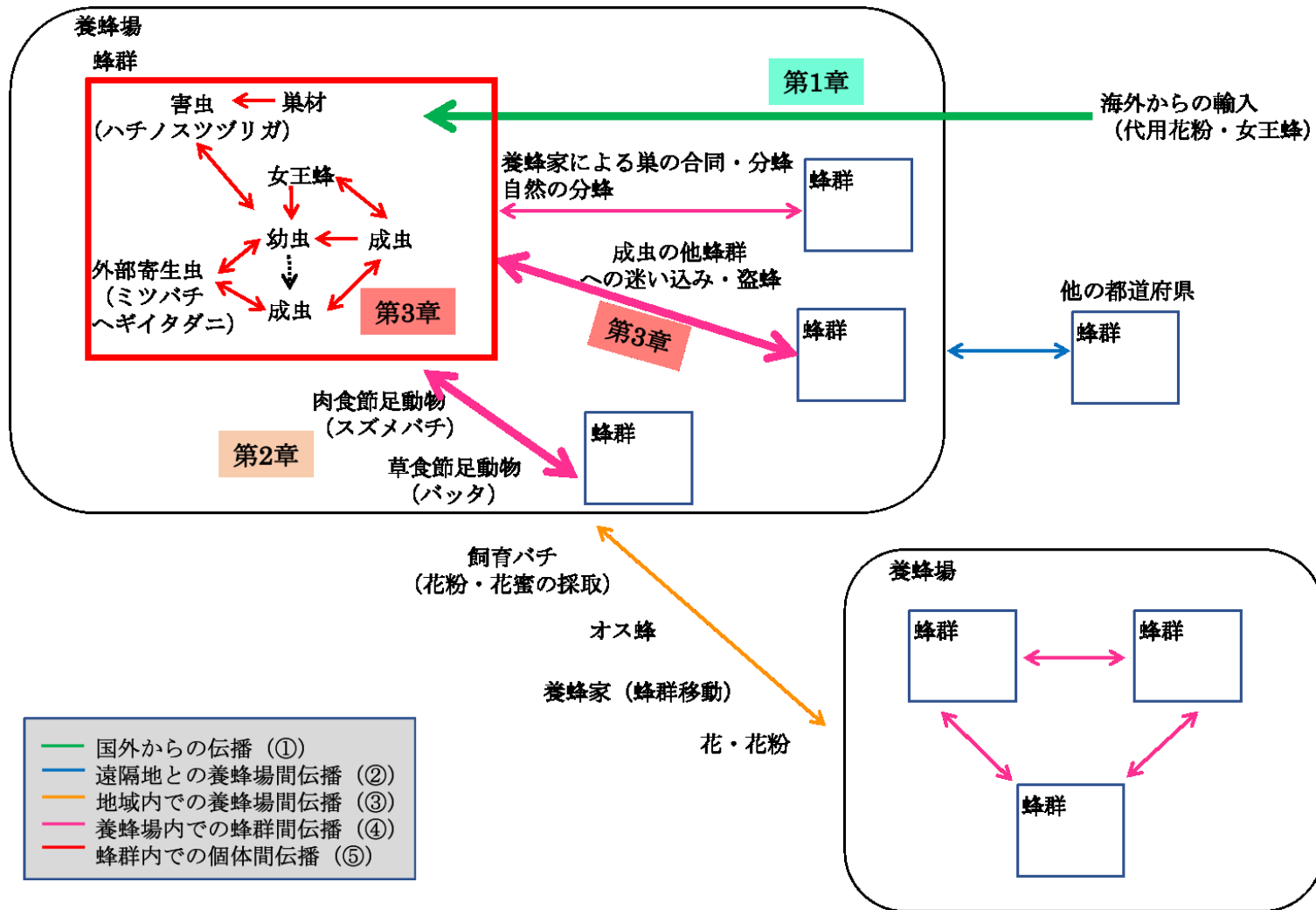


図 I 本研究で対象とした飼育バチにおける蜂病ウイルス伝播経路

第一章

岐阜県南西部の飼育セイヨウミツバチにおける蜂病ウイルスの分布

1. 序論

これまでに、2009年に行われた独立行政法人農研機構畜産草地研究所による全国調査では、日本の飼育バチが BQCV, DWV, SBV, IAPV 及び KBV を保有することが報告された [27]。また、Kojima らが 2009～2010 年に 36 県で実施した調査では飼育バチから BQCV, DWV, SBV 及び IAPV が検出され [45]、2013 年及び 2014 年に栃木県で実施された蜂病ウイルスの分布調査で飼育バチから DWV, SBV, ABPV, KBV 及び CBPV が検出されている [75, 76]。さらに、近年では、2018 年及び 2020 年の日本養蜂協会による全国調査で BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV 及び CBPV が確認されている [40, 42]。これらは健康な蜂群を対象にしているが、病気の蜂群では Morimoto らは死亡成虫から CBPV を検出し [57]、猿山らは栃木県で麻痺症状を呈した蜂群から ABPV 及び CBPV を検出した [75]。しかし、IAPV, ABPV 及び KBV は同じウイルス属に属しゲノム全体の配列が類似することから、これらのウイルスの検出に用いられている既報の PCR プライマーの中にはこの 3 種類を区別できないものがあることが報告されている [22]。日本での過去の調査で用いられたプライマーの中にも、Miranda ら [22]により非特異反応を指摘されたものが含まれるため (表 1-1) [6, 9, 27, 35, 40, 42, 45, 50, 60, 63, 75, 76, 79, 80, 81, 85, 87]、この 3 種類のウイルスの検出結果は注意しなければならない。しかし、Miranda ら [22]により特異性が確認されているプライマーを使用している Kojima ら [45]の調査と CBPV を報告した Morimoto ら [57]の調査から、日本には少なくとも BQCV, DWV, SBV, IAPV 及び CBPV の 5 種類のウイルスが分布していると考えられる。

ミツバチや養蜂生産資材の国際的な取引は、蜂病ウイルスを新たな国に持ち

込む可能性がある [7]。毎年、日本にはスロベニアやオーストラリアから女王蜂が輸入されており、これらの国々では BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV 及び LSV の検出が報告されている [71, 82, 88]。Chen らは女王蜂の卵巣から SBV, BQCV 及び DWV が検出されること、また、BQCV あるいは DWV を保有する女王蜂から生まれた卵では女王蜂と同じウイルスが検出されることを報告している [17]。また、ミツバチに与える代用花粉などの養蜂生産資材は中国や韓国から輸入されており、この2カ国では BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV や LSV が広く分布している [1, 16, 18, 68, 95, 96]。スペインで市販されている代用花粉から DWV, IAPV 及び CBPV が検出され、ルーマニアで市販される代用花粉から SBV が検出されている [23]。このように、日本の養蜂は外国から侵入する複数の蜂病ウイルスの感染リスクに曝されている。

そこで、第一章では日本における 8 種類の蜂病ウイルス (BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV 及び LSV) の分布状況を明らかにするため、岐阜県南西部の養蜂場から採取した働き蜂を対象に調査を行った。また、国外から日本への蜂病ウイルスの侵入リスクを明らかにするため、BQCV, DWV, IAPV 及び LSV について、岐阜県で検出されたウイルスのゲノムと国外のウイルスのゲノムとの遺伝的関連性を評価した。

2. 材料及び方法

2. 1. セイヨウミツバチ検体の収集

2018年5～7月及び2019年5～7月に、岐阜県南西部（西濃・揖斐地域及び岐阜地域）の臨床症状を認める個体が存在しない26蜂場においてセイヨウミツバチ各1群から働き蜂成虫10個体を採材した。採材した検体は養蜂場ごとにポリ袋の中で、ノンフロンダスターエコボンベ（株式会社エンジニア、大阪、日本）を用いて二酸化炭素により速やかに安楽殺後、氷冷して実験室に持ち帰った。各養蜂場から採材した検体は養蜂場ごとに同じ容器に入れ、解析まで-20℃で保管した。

2. 2. 女王蜂の導入歴及び代用花粉の使用についての聞き取り調査

2. 1.で検体を採材した26蜂場で過去1年以内の女王蜂の導入歴と代用花粉の使用について聞き取り調査を行った。聞き取りは養蜂家に対し対面で実施した。

2. 3. DWV プライマーの作製

2. 3. 1. DWV プライマーの設計

DWV ゲノムにおける RdRp 遺伝子領域を RT-PCR 法の標的配列に選択した。ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて GenBank に登録されている DWV の 10 塩基配列の Multiple alignment を行い、保存性の高い配列を検索した。Multiple alignment に用いた DWV の塩基配列のアクセッション番号は AJ489744, AY292384, GU109335, JX878304, JX878305, MF036686, MF770715, MH165180, MH267695 及び NC_004830 であった。

Multiple alignment の結果をもとに Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) を用いてプライマーの設計を行った。

2.3.2. 設計した DWV プライマーの特異性及び感度の確認

設計した DWV プライマーの特異性は、National Center for Biotechnology Information の BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) によりデータベース上で確認した。また、得られた PCR 増幅産物についても Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) で精製後、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、BLAST 検索により既報の DWV 遺伝子との相同性検索を実施した。設計したプライマーの感度は DWV の合成 DNA をサンプルとして PCR を行い確認した。合成 DNA の濃度は、1 回の PCR 反応あたり $1.00 \times 10^0 \sim 1.00 \times 10^6$ コピーを感度試験に用いた。感度試験は 2 回実施し、いずれにおいても検出可能であった最小のコピー数を検出限界とした。感度試験により、設計した DWV プライマーは 1.00×10^3 コピーのウイルスまで検出できることを確認した。

2.4. 蜂病ウイルスの検出

2.4.1. 乳剤の作製

成虫を 5 個体ずつプールし、RNase free dH₂O 2 ml を加えた。バイオマッシャー SP (フナコシ株式会社, 東京, 日本) を用いて乳剤を作製後、遠心 (4,000 rpm, 1 分間, 室温) により上清を分離した。

2. 4. 2. RNA の抽出

RNA 抽出は, NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel, Düren, Germany) あるいは QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands) により行い, 前者の場合は乳剤上清 200 μ l を用い, 後者の場合は乳剤上清 140 μ l を用いてキットのプロトコルに従い実施した。

2. 4. 3. cDNA の合成

得られた RNA 溶液を用いて, Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ (株), 大津, 日本) あるいは Prime Script 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ (株)) にて cDNA を合成した。

Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ (株)) を用いた場合, RNA 溶液 5 μ l にキットに含まれる random 6mer (20 μ M) 1 μ l, dNTP mixture (10 mM each) 1 μ l, RNase free dH₂O 3 μ l を加え, 65°C, 5 分で反応させた後, 4°C で急冷した。この溶液に 5×PrimeScript buffer 4 μ l, RNase Inhibitor (40 U/ μ l) 0.5 μ l, PrimeScript RTase 1 μ l を混合し, 全量が 20 μ l となるように RNase free dH₂O を加えた。この混合液を 30°C, 10 分間, 42°C, 30 分間で反応させた後, 95°C で 5 分間加温し, 反応終了後は 4°C で保存した。

Prime Script 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ (株)) を用いた場合, キットに含まれる試薬にて上記と同様に cDNA を合成した。なお, 本キットでは, random 6 mer (50 μ M) 1 μ l 及び PrimeScript RTase (200 U/ μ l) 1 μ l を使用した。

2. 4. 4. 8 種類の蜂病ウイルスの PCR

8 種類の蜂病ウイルス (BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV 及び

LSV) の検出は, 表 1-2 [6, 8, 25, 45, 65, 69, 80]に示すプライマーセットを用いた。PCR は, *TaKaRa Ex Taq* DNA Polymerase (タカラバイオ (株)) あるいは Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ (株)) に含まれる *TaKaRa Ex Taq* HS を用いて実施した。

LSV 以外の 7 種類の蜂病ウイルスの検出は, Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ (株)) で作成した cDNA 1 μ l に 10 \times PCR Buffer II を 2.5 μ l, *TaKaRa Ex Taq* HS (5 U/ μ l) を 0.25 μ l, dNTP mixture (10 mM each) を 1 μ l, 25 μ M に調整したフォワード及びリバースプライマーを 0.2 μ l ずつ加えて混合したものに RNase free dH₂O を加え全量が 25 μ l となるように調整した。

LSV の検出は, Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ (株)) あるいは Prime Script 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ (株)) で作製した cDNA 1 μ l に 10 \times *Ex Taq* Buffer (Mg²⁺ Plus) (20 mM) を 2.5 μ l, *TaKaRa Ex Taq* (5 U/ μ l) を 0.125 μ l, dNTP mixture (2.5 mM each) を 2 μ l, 25 μ M に調整したフォワード及びリバースプライマーを 1 μ l ずつ加えて混合したものに RNase free dH₂O を加え全量が 25 μ l となるように調整した。

反応液をサーマルサイクラーで 94 $^{\circ}$ C, 1 分間, 1 回の熱変性後, 94 $^{\circ}$ C, 30 秒間の熱変性, 50-60 $^{\circ}$ C, 30 秒間のアニーリング, 72 $^{\circ}$ C, 1 分間の伸張反応を 30 回繰り返し, 最後に, 72 $^{\circ}$ C, 5 分間の伸張反応を 1 回行った。TAE バッファー (40 mM Tris-acetate/1mM EDTA) で作製した 1.0 %アガロースゲルを用い, PCR 増幅産物の電気泳動を行い, 遺伝子の増幅を確認した。

2. 5. PCR 増幅産物のシーケンス解析

得られた PCR 増幅産物は, Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) で精製後, ダイレクトシーケンス法により塩

塩基配列を決定した。塩基配列の解読は、岐阜大学生命科学総合研究支援センターのゲノム研究分野に委託し、サンガー法により行った。

2. 6. 分子系統学的解析

塩基配列は、National Center for Biotechnology Information の BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) により相同性検索を実施した。分子系統学的解析は MEGA-X [48] を用い、既報の蜂病ウイルス遺伝子塩基配列とともに最尤法により行った。また、ブートストラップ解析を 1,000 回繰り返すことにより分子系統解析の信頼性を検証した。LSV の分子系統学的解析は、対象の LSV 遺伝子領域の配列が入手できた LSV1, 2, 3, 4 及び 8 の配列とともに実施した。分子系統学的解析に用いたリファレンス遺伝子の採材国名及びアクセッション番号を表 1-3 に示した。

2. 7. BQCV, IAPV 及び DWV 陽性群におけるウイルス保有状況の解析

プール検体でウイルス遺伝子が検出された群について、別の 5 個体の働き蜂を 1 個体ずつ 1 ml の RNase free dH₂O で乳剤を作製し、上記の 2. 4. に示す方法により各個体のウイルスの保有を調べた。なお、RNA の抽出には QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN), cDNA 合成及び PCR には Prime Script™ RT-PCR Kit (タカラバイオ (株)) を用いた。

2. 8. 統計解析

ウイルス陽性率は、Bonferroni 補正による Fisher の正確確率検定により解析した。解析は統計解析ソフト R (version 4. 0. 5) [67] 及び R Studio (version 1. 4. 1106.) [73] を用いて行なった。

2.9. アクセション番号

本章で得られたウイルス遺伝子塩基配列は, DDBJ に表 1-4 に示すアクセション番号で登録及び公開した。

2.10. 倫理的配慮

本章の研究は, 岐阜大学動物実験委員会の承認を受けた (許可番号 H30-009)。

3. 結果

3.1. 蜂病ウイルス遺伝子の検出

調査した 26 群のうち, 23 群 (88%) の蜂群から BQCV, 11 群 (42%) の蜂群から IAPV, 11 群 (42%) の蜂群から LSV, 10 群 (38%) の蜂群から DWV, 1 群 (4%) の蜂群から SBV が検出された。1 種類のウイルスのみが検出された 4 群を除いて, 各群からは 2 つ以上の蜂病ウイルスが検出された。このうち, 1 群 (4%) から 4 種類のウイルスが検出され, 6 群 (23%) から 3 種類のウイルスが検出された。また, 15 群 (58%) から 2 種類のウイルスが検出された。BQCV は, 検出された他の 4 種類のウイルスよりも有意に多く検出され, SBV は他の 4 種類のウイルスよりも有意に少なく検出された ($P < 0.05$, Bonferroni 補正による Fisher の正確確率検定)。BQCV, IAPV, LSV 及び DWV は調査地域に広く分布し, SBV は調査地域東部に位置する一養蜂場で検出された (図 1-1)。ABPV, KBV 及び CBPV はいずれの検体からも検出されなかった。

3.2. 女王蜂の導入歴及び代用花粉の使用歴とウイルス検出結果の比較

26 蜂場のうち, 3 蜂場 (12 %) が女王蜂を 1 年以内に外部から導入していた。このうち 2 蜂場では産地は不明だが外国産の女王蜂を導入し, 1 蜂場は女王蜂の由来は不明だった。本章で採材した蜂群の女王蜂の由来も不明であった。また, 26 蜂場のうち 14 蜂場 (54 %) は 1 年以内に市販の代用花粉を使用していた。各養蜂場が使用した代用花粉の産地は不明だった。女王蜂の導入あるいは代用花粉の使用は, 本調査地域での BQCV, DWV, IAPV 及び LSV の検出結果と Fisher の正確確率検定において関連が認められなかった。

3. 3. BQCV の分子系統学的解析

Mookhploy ら [56]の報告では、BQCV はカプシドプロテイン遺伝子配列に基づいて 3 つのクレードに分けられているが、本研究で決定した同遺伝子の部分配列 (511 bp) を含めた分子系統学的解析においても、同様に 3 つのクレード (B-I, II 及び III) に分けられた (図 1-2)。岐阜県で検出された BQCV は過去の日本で検出された BQCV や中国, 韓国及びタイで検出された BQCV とともに B-I クレードに分類された。一方, 南アフリカの BQCV は B-II クレードに属し, オーストラリア, ブラジル, また, スロベニアを含むヨーロッパの BQCV は B-III クレードに属した。B-I クレードの BQCV の遺伝子塩基配列は互いに 93.5~100 %の相同性を示し, B-II クレードの BQCV との相同性は 93.2~97.5 %であり, B-III クレードの BQCV との相同性は 90.4~97.1 %であり, クレード間の相同性に差は認められなかった。

3. 4. IAPV の分子系統学的解析

IAPV の 5'UTR-ヘリケース遺伝子部分配列 (540 bp) に基づいた分子系統解析の結果, 岐阜県と諸外国の IAPV は, L 及び O 養蜂場と中国, 韓国及びアメリカ合衆国の IAPV を含むクラスター, L 及び O 養蜂場以外の 8 蜂場とオーストラリア及びスペインの IAPV を含むクラスター, さらに, オーストラリアのみの IAPV を含むクラスターの 3 つクラスターが認められた (図 1-3)。L 及び O 養蜂場と中国, 韓国及びアメリカ合衆国の IAPV は互いに 96.1~98.9%の相同性を示し, L 及び O 養蜂場以外の 8 蜂場とオーストラリア及びスペインの IAPV との相同性は 94.6~97.6%, オーストラリアの IAPV (KY465689~KY465691)との相同性は 94.8~97.2%であった。また, L 及び O 養蜂場以外の 8 蜂場とオーストラリア及びスペインの IAPV は互いに 96.5~99.8%の相同性

を示し、オーストラリアの IAPV (KY465689~KY465691)との相同性は 96.9~98.9%であった。各クラスター間で相同性に明確な差が認められず、1塩基あたりの塩基置換率を示すスケールバーの値も小さいことから、IAPV の系統樹で認められた 3つのクラスターは一つのクレードとみなした。

3. 5. LSV の分子系統学的解析

Šimenc ら [82]の報告では、LSV は RdRp 遺伝子配列に基づいて 5つのクレードに分けられているが、本研究で決定した同遺伝子の部分配列 (540 bp) を含めた分子系統学的解析においても、同様に 5つのクレード (LSV1, 2, 3, 4 及び 8) に分けられた (図 1-4)。また、LSV 陽性検体のうち、5検体 (45%) は LSV3, 6検体 (55%) は LSV4 であった。LSV3 はさらに 3つのクレード (LSV3- I, II 及び III) に分けられ、岐阜県の飼育バチで検出された遺伝子 (n=5) は中国で検出された遺伝子とともにサブクレード LSV3- II に分類された。一方、スロベニア及びスウェーデンはサブクレード LSV3- I に分類され、スロベニア、オーストラリア及びベルギーはサブクレード LSV3- III に分類された。また、LSV4 は 2つのクレード (LSV4- I 及び II) に分けられ、岐阜県の飼育バチ (n=6) で検出された遺伝子は中国で検出された遺伝子とともにサブクレード LSV4- II に分類され、ベルギーで検出された遺伝子は LSV4- I に分類された。

3. 6. DWV の分子系統学的解析

DWV の RdRp 遺伝子部分配列 (159 bp) に基づいた分子系統学的解析の結果、岐阜県で検出された DWV は中国、韓国及びイスラエルの DWV とクラスターを形成し、アメリカ合衆国、ニュージーランド及びヨーロッパ諸国の DWV

とはクラスターを形成しなかった (図 1-5)。岐阜県, 中国, 韓国及びイスラエルの DWV の遺伝子塩基配列は互いに 95.0~100 %の相同性を示したが, アメリカ合衆国, ニュージーランド及びヨーロッパ諸国の DWV 配列とは 90.6~94.3 %の相同性を示した。クラスター間で相同性に明確な差が見られたことから, 岐阜県, 中国, 韓国及びイスラエルの DWV を含むクラスターを D-I クレードとし, アメリカ合衆国, ニュージーランド及びヨーロッパ諸国の DWV を含むクラスターを D-II クレードとした。

3. 7. BQCV, IAPV 及び DWV 陽性群におけるウイルス保有状況の解析

ウイルス陽性群で 5 個体の成虫における各ウイルスの保有状況を調査した結果, BQCV は BQCV 陽性 10 群のうち 7 群 (70 %) で 3 個体以上の個体から検出された (表 1-5)。一方, IAPV は IAPV 陽性 7 群のうち 2 群 (29 %) で 3 個体以上の個体から検出され, DWV は DWV 陽性 6 群のうち 2 群 (33 %) で 3 個体以上の個体から検出された。

4. 考察

本章では、岐阜県の飼育バチが IAPV, LSV, DWV 及び SBV よりも BQCV を多く保有することを示した。2009 年～2010 年に日本の 36 県の 65 蜂場で行われた Kojima らの調査では、DWV が最も多く飼育バチの成虫の 84 %から検出され、次いで成虫の 77%から BQCV, 成虫の 66%から IAPV, 成虫の 39%から SBV が検出された [45]。PCR 法を用いた調査では使用するプライマーや試薬が陽性率に影響する可能性がある。本研究で用いたプライマーのうち、SBV, IAPV, ABPV, KBV, LSV の感度は不明であるが、BQCV 特異的プライマーは 130 コピー相当のウイルスを検出し [8], CBPV 特異的プライマーは感染実験陽性検体抽出物の 10^{-8} 倍希釈液中のウイルスを検出した [69]。また、本研究で作成した DWV 特異的プライマーは 1×10^3 コピー相当の DWV を検出した。本研究で用いた各ウイルスを検出する PCR 法の間で検出感度を単純に比較することはできないが、本研究と Kojima ら [45]の研究では DWV, IAPV 及び LSV 以外のプライマーは共通であった。したがって、岐阜県では Kojima ら [45]の調査に比べ、BQCV が優勢に分布したことが示唆された。Kojima らの調査では年間を通してミツバチの検体を採取したが [45], 本調査では 5～7 月に検体を採取した。蜂病ウイルスの陽性率に季節変動があることは中国 [16]やドイツ [19], フランス [86]で報告されている。例えば、中国で行われた調査では BQCV の陽性率は他の季節に比べて 4 月に高くなり、DWV は 10 月に高い陽性率を示した [16]。BQCV はドイツでは 5 月から 8 月に高頻度に検出され [19], フランスでは 6 月から 8 月に多く検出された [86]。一方、DWV はドイツでは 11 月から 2 月に多く分布し [19], フランスでは 8 月から 11 月に多く分布している [86]。Dalmon らは DWV に自然感染したミツバチでは、高温下で DWV

ウイルス量が低下することを報告したことから [21], 気温の変化はウイルス陽性率の季節変動の一因となる可能性がある。本研究と Kojima ら [45]の研究でのウイルスの陽性率の違いは, 調査の実施期間や地域に起因するかもしれないが, 検体を採取した季節もこれら 4 種類のウイルスの陽性率に影響したと考えられる。さらに先行研究により BQCV や IAPV, DWV が蜂群間及び蜂群内で伝播され, このような伝播にはミツバチだけでなく外部寄生虫であるミツバチヘギイタダニ (*Varroa destructor*) [7, 25, 93]やノゼマ原虫 (*Nosema apis*) [5]が関与する可能性があることが明らかとなっている。本研究の BQCV 陽性群では BQCV は成虫から高頻度に検出された。したがって, 群内の BQCV の水平伝播も岐阜県での BQCV の流行に関与したと考えられた。

IAPV は本研究及び Kojima ら [45]の研究のいずれにおいても, BQCV よりも低い陽性率が観察された。BQCV は血液の流れる血体腔に 1×10^8 コピー相当のウイルスを投与することにより 10 日以内に 61 %の成虫が死亡したのに対し [2], IAPV では同量のウイルスを胸部に塗布することにより 10 日以内に約 50~90 %の成虫が死亡することが報告されている [11]。Amiri らは, ウイルス液を接種した胸背部を除く部位について成虫 5 個体をプールして IAPV ウイルス量を測定し, RNA1ng あたり 2.78×10^2 コピーの IAPV は成虫間の伝播を引き起こさないが, 7.62×10^6 コピーの IAPV は成虫間での伝播を引き起こすことを報告した [4]。また, Deng らは 1×10^{12} コピー相当の IAPV を血体腔内投与された個体での気管における IAPV ウイルス量は接種 36 時間目に最大となり, 時間経過とともに減少することを報告した [24]。研究によりウイルスの投与量や投与方法が異なるため, これらの実験結果を単純に比較することはできないが, BQCV に比べて IAPV は致死性が高く, ウイルス排出期間が短いため, IAPV は個体間で伝播されにくく, BQCV よりも低い陽性率が観察された可能性がある

る。

岐阜県で検出された DWV は中国や韓国の DWV と近縁であったが、ヨーロッパ諸国の DWV とは近縁ではなかった。本章とは用いた抽出法やプライマーは異なるが、中国では働き蜂の 94 % から DWV が検出され [1]、韓国では働き蜂の 8 % から DWV が検出された [18]。これまでに日本の DWV と韓国の DWV の遺伝的関連性について究明した研究はないが、カプシドプロテインの解析により 2018 年以前に日本で検出された DWV と中国の DWV が近縁であることが報告されている [95]。以上の結果から、DWV は中国から日本に継続して侵入している、もしくは、中国に起源を持つ DWV が日本の蜂群で維持されているという 2 つの可能性が示唆された。また、スロベニアでは DWV が働き蜂の 70 % で検出されているが [88]、岐阜ではヨーロッパ諸国に分布する DWV は認められなかった。したがって、スロベニア産の女王蜂は岐阜県での DWV の分布に関与していないと考えられる。

岐阜県で検出された BQCV は、オーストラリアやスロベニアの BQCV よりも 2018 年以前に日本で検出された BQCV や中国、韓国の BQCV と近縁であった。本研究では、日本での先行研究 [45, 56, 95] をもとにカプシドプロテイン領域の分子系統学的解析を行った。分子系統学的解析ではカプシドプロテイン領域塩基配列の多様性は低く、B-I, B-II, B-III の各クレード間で塩基配列に明確な差は認められなかった。しかし、本研究で得られた系統樹は、日本を含むアジアの B-I クレード、南アフリカを含む B-II クレード、スロベニアを含むヨーロッパ諸国やオーストラリアを含む B-III クレードに分かれた。Murray らは各国で検出された BQCV のカプシドプロテイン遺伝子領域の系統関係を解析し、本研究と同様に、日本を含むアジアの BQCV が南アフリカやヨーロッパの BQCV とは異なる系統であることを示した [58]。本研究の分子系統解析によ

り、岐阜県の BQCV は DWV と同様に中国や韓国から継続して侵入しているか、あるいは、国内の蜂群で維持されていることが示唆された。

本章では、岐阜県の飼育バチが LSV を保有することを示した。世界では 30 種類の蜂病ウイルスが報告されているが [7]、これまで日本では限られた種類の蜂病ウイルスについて調査が行われてきた [45, 57]。本章では、日本の飼育バチが LSV を保有することを初めて明らかにし、岐阜県では LSV3 及び LSV4 が優勢に分布した。LSV3 や LSV4 はヨーロッパ諸国に分布することが報告されており [19, 66, 82]、スロベニアのミツバチでは、本章と同じ遺伝子抽出法及びプライマーを用いて成虫の 58 % から LSV3 が検出されている [82]。また、オーストラリアでは次世代シーケンサーでの解析によりミツバチにおける LSV3 の保有が確認されている [71]。しかし、岐阜県で検出された LSV3 と LSV4 はいずれもスロベニアを含むヨーロッパ諸国やオーストラリアではなく、中国の LSV と近縁であった。したがって、岐阜県の LSV は BQCV や DWV と同様に中国から侵入している可能性がある。今後は、国内の蜂病ウイルスの浸潤を継続的に調査することが重要である。

岐阜県で検出された IAPV の配列は養蜂場間で違いが認められたが、他国の IAPV の配列とは類似していた。Reddy らは IAPV の 5'-UTR が韓国、中国、イスラエル、アメリカ合衆国及びオーストラリアの間で高い相同性を示すことを報告した [68]。本研究では、5'-UTR-ヘリケース遺伝子領域を分子系統解析の対象としたことから、岐阜県の IAPV と他国の IAPV は配列に相同性が認められた可能性がある。また、岐阜県で検出された IAPV は配列が互いに異なっていた。アメリカ合衆国では、遺伝子型が異なる複数の IAPV が分布することが報告されている [63]。IAPV は RNA ウイルスであることから遺伝子変異が起りやすい可能性はあるが、岐阜県の飼育バチにも遺伝子変異の蓄積によって

異なる遺伝子型となった複数の IAPV が分布している可能性が考えられる。

岐阜県における SBV の陽性率は非常に低かった。本研究と同じプライマーを用いた Kojima らの調査でも、SBV は飼育バチから検出されたが、その陽性率は 39%に留まった [45]。SBV は幼虫で発症することが報告されている [92]。本研究と Kojima ら [45]の研究では成虫を検体としたことから、SBV の陽性率が低かった可能性がある。一方、中国における先行研究では SBV は成虫の 21%から検出され、幼虫の 18%から検出された [1]。SBV は給餌を介し、巢内で成虫から幼虫へと伝播する [92]。したがって、本研究で明らかとなった成虫での SBV の陽性率は調査地域の SBV 汚染状況を反映する可能性も考えられる。セイヨウミツバチではサックブルード病を発症した幼虫は速やかに巢外に捨てられるため、トウヨウミツバチ (*Apis cerana*) よりも SBV による被害が小さい [92]。また、SBV は成虫にも感染するが、感染は成虫の羽化後 1 日以内にのみ起こることが報告されている [92]。これらの研究結果は、SBV がセイヨウミツバチの巢内で感染が広がりにくいことを示唆している。以上より、セイヨウミツバチでの SBV 感染の広がりにくさが岐阜県における SBV の陽性率に関与した可能性が考えられる。

ABPV, KBV 及び CBPV は、本研究でも Kojima らによる先行研究でも検出されなかった [45]。研究により用いられた遺伝子抽出法やプライマーは異なるが、ABPV は中国の働き蜂の 6%で検出され、スロベニアの働き蜂の 40%で検出された [1, 88]。KBV は韓国の働き蜂の 2%で検出され、スロベニアの働き蜂の 2%で検出された [18, 88]。また、CBPV は中国で働き蜂の 6%で検出され、韓国では働き蜂の 0.4%で検出され、さらに、スロベニアでは働き蜂の 18%で検出された [1, 18, 88]。岐阜県での BQCV, DWV 及び LSV の分子系統解析の結果は、蜂病ウイルスが中国あるいは韓国から持ち込まれている可能性

を示唆した。岐阜県で ABPV, KBV 及び CBPV が認められなかったことは、中国あるいは韓国を含む諸外国における陽性率が低く日本にこれらのウイルスが持ち込まれる頻度が低いことが原因かもしれないが、本章の結果から、海外の ABPV, KBV 及び CBPV は岐阜県に持ち込まれていない可能性が示唆された。

岐阜県で検出された DWV, BQCV 及び LSV は中国や韓国から侵入している、あるいは、これらの国に由来するウイルスが日本の蜂群で維持されている可能性が示唆された。国外からのウイルスの侵入経路となりうる代用花粉は、野外で花粉が不足する時期にミツバチの餌として利用される [53]。日本では地域によっては代用花粉を半年以上給餌する場合もあることから、代用花粉は蜂群に継続的に蜂病ウイルスを持ち込む可能性がある。また、蜂群では個体間でウイルス伝播が継続して起こり、蜂群内でウイルスが維持される可能性がある。岐阜県で検出された蜂病ウイルスの由来を明らかにするために、輸入代用花粉のウイルス調査を行う必要がある。

本章では、岐阜県の飼育バチが BQCV, IAPV, LSV, DWV 及び SBV の 5 種類のウイルスを保有し、特に BQCV の陽性率が高いことを明らかにした。転飼蜂群や養蜂業者から導入する国内生産蜂群については、養蜂場の既存の蜂群との間で蜂病ウイルスの伝播が起こらないように、同じ養蜂場での飼育を避けることが望ましいと考えられる。また、BQCV, DWV 及び LSV はスロベニア産あるいはオーストラリア産の女王蜂により持ち込まれていないことが示唆されたが、中国あるいは韓国から輸入される養蜂生産資材（主に代用花粉）は岐阜県での BQCV, DWV 及び LSV の分布に関与する可能性が示唆されたことから、輸入される代用花粉を滅菌するなどの衛生対策が必要である。本章では、LSV が日本の飼育バチに分布することを初めて明らかにした。輸出国を含む他国での蜂病ウイルスの汚染は国内に侵入する可能性があるため、蜂病ウイルスの検出状況

に注視し，日本国内で調査を継続的に行うことが必要である。

表 1-1 これまでに日本での調査で用いられた ABPV, IAPV 及び KBV を検出するプライマー

研究実施主体 あるいは 論文筆頭著者	研究 実施年	用いた PCR プライマー		PCR で増幅される 蜂病ウイルス		
		蜂病ウイルス名	引用文献	ABPV	IAPV	KBV
独立行政法人 農研機構畜産 草地研究所 [27]	2009	ABPV	プライマーの引用 文献が非公表 のため不明	プライマーの引用文献が 非公表のため不明		
		IAPV				
		KBV				
Kojima [45]	2009 2010	ABPV	[6]†	+	不明	不明
			[81]†	+	-	-
			[6]†	+	-	-
		IAPV	[63]†	-	+	不明
			[50]†	-	+	-
	KBV	[80] †	-	-	+	
		[87] †	-	-	+	
猿山 [75]	2013	ABPV	[60]	+	+	不明
		IAPV	NT	NT	NT	NT
		KBV	[60]	不明	+	+
猿山 [76]	2014	ABPV		+	+	+
		IAPV	[35] *	+	+	+
		KBV		+	+	+
一般社団法人 日本養蜂協会 [40, 42]	2018	ABPV	[79]	+	不明	不明
		IAPV	[79]	不明	+	不明
		KBV	[9]	不明	+	+
	2020	ABPV	[79]	+	不明	不明
		IAPV	[79]	不明	+	不明
	KBV	[85]	不明	+	+	

†, 引用文献の記載に誤りがあったため, 論文に記載されたプライマー配列をもとに引用文献を記載した。

*, ABPV, IAPV 及び KBV を同時に増幅するプライマーを使用している。

NT, 検査実施せず。

+, 増幅あり。

-, 増幅なし。

不明, PCR での増幅の有無が不明。

表 1-2 蜂病ウイルスの検出に用いたプライマー配列

ウイルス名	プライマー配列	増幅産物の長さ (bp)	アニーリング 温度 (°C)	引用文献
BQCV	5'-TGGTCAGCTCCCACTACCTTAAAC-3' 5'-GCAACAAGAAGAAACGTAAACCAC-3'	701	55	[8]
DWV	5'-CCTGGACAAGGTCTCGGTAGAA-3' 5'-CTTCCCATGTGATAAGGTCCTC-3'	203	60	本研究
SBV	5'-ACCAACCGATTCCTCAGTAG-3' 5'-CCTTGGAACCTCTGCTGTGTA-3'	488	60	[45]
IAPV	5'-GCGGAGAATATAAGGCTCAG-3' 5'-CTTGCAAGATAAGAAAGGGGG-3'	586	60	[25]
ABPV	5'-GGAACATGGAAGCATTATTG-3' 5'-AATGTCTTCTCGAACCATAG-3'	687	55	[6]
KBV	5'-ATGACGATGATGAGTTCAAG-3' 5'-AATTGCAAGACCTGCATC-3'	290	50	[80]
CBPV	5'-AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG-3' 5'-TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG-3'	455	55	[69]
LSV	5'-TCAAYCTKGAGCGATTTTCGTGCTG-3' 5'-GAGGTGGCGGCGCSAGATAAAGT-3'	603	56	[65]

表 1-3 分子系統解析に用いた各蜂病ウイルスのリファレンス株の採材国名及びアクセッション番号

ウイルス名	リファレンス株の採材国名及び GenBank のアクセッション番号
BQCV	イギリス (GU903462), オーストラリア (KY465686, KY465687), 韓国 (EU770973, JX149531), スロベニア (MH899978, MH899990), タイ (KP730005, KP730024), 中国 (JX679489, JX679491), 日本 (AB723740, AB723741, AB723744, AB723747, KT717337, KP730029-KP730031, KP730033, KP730037), ブラジル (EU292211), ポーランド (EF517520, EF517521), 南アフリカ (AF183905, NC_003784)
DWV	アメリカ合衆国 (AY292384, MH069505), イスラエル (MW397639), イタリア (AJ489744), 韓国 (JX878305), スペイン (MT096518, MT096529), 中国 (MF036686, MH165180), ニュージーランド (MN538208)
IAPV	アメリカ合衆国 (EU224279, EU436423), オーストラリア (KY465689, KY465690, KY465691, KY465696), 韓国 (KC690268, KC690269), スペイン (JX045857), 中国 (HQ897161, KX421583, MG599488)
LSV	アメリカ合衆国 (HQ871931), オランダ (KY354242), オーストラリア (KY465697-KY465700, KY465708, KY465711, KY465714, KY465715, KY465717), スウェーデン (MH267700), スロベニア (MG918125, MH350870-MH350887, MH350890-MH350894), 中国 (KX883223, MF491499, MF491503, MF491505, MF667749-MF667751, MF667757, MF667760, MF667762, MF667765, MT732482), ベルギー (JX878492, KM886903-KM886906, KM886911, KM886912, KM886916, KM886918, KM886920, KM886922), 南アフリカ (KY354244)

表 1-4 本章で得られたウイルス遺伝子塩基配列のアクセッション番号

ウイルス名	アクセッション番号
BQCV	LC556264-LC556268, LC556271, LC556273, LC556275-LC556281, LC556284, LC556285, LC556290, LC556297, LC601634, LC601635, LC601637, LC601638
DWV	LC601623-LC601632
IAPV	LC601608, LC601610-LC601617, LC635481
LSV	LC646147-LC646151, LC646153-LC646158

表 1-5 BQCV, IAPV 及び DWV 陽性群の 5 個体の働き蜂における
ウイルス保有状況

5 個体の働き蜂 における 陽性個体数	BQCV 陽性蜂群 (n=10)	IAPV 陽性蜂群 (n=7)	DWV 陽性蜂群 (n=6)
5	1	2	1
4	4	0	1
3	2	0	0
2	2	0	1
1	1	1	0
0	0	4	3

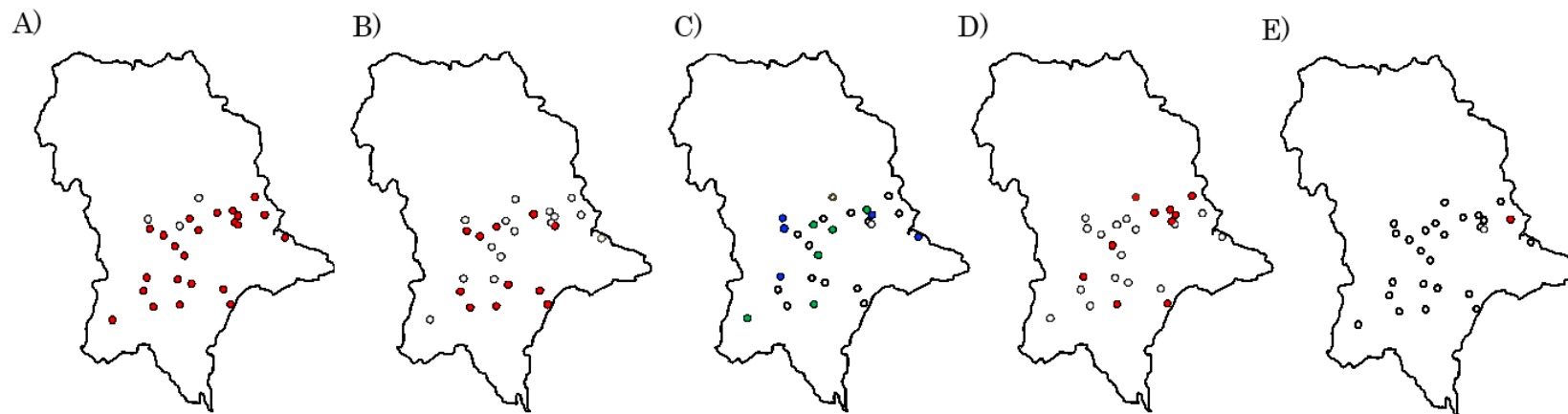
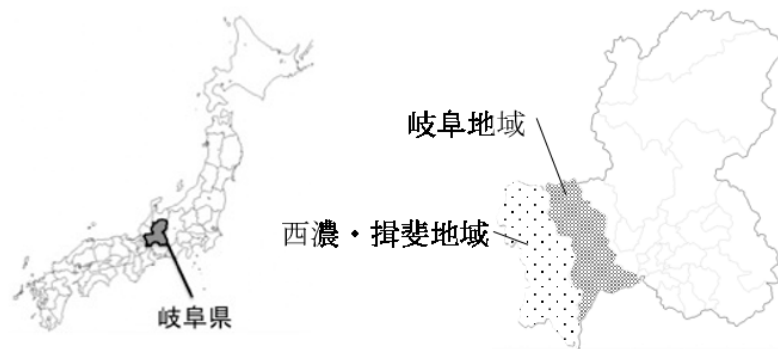


図 1-1 岐阜地域及び西濃・揖斐地域における各蜂病ウイルスが検出された養蜂場の分布
(左上図：日本全国地図，右上図：岐阜県地図，下図：岐阜県岐阜地域及び西濃・揖斐地域地図)

下図の左から A) BQCV, B) IAPV, C) LSV, D) DWV, E) SBV が検出された養蜂場の分布を示す。
赤丸 (●) は蜂病ウイルスが検出された養蜂場を示し，白丸 (○) は蜂病ウイルスが検出されなかった養蜂場を示す。
LSV については，青丸 (●) は LSV3 が検出された養蜂場を示し，緑丸 (●) は LSV4 が検出された養蜂場を示す

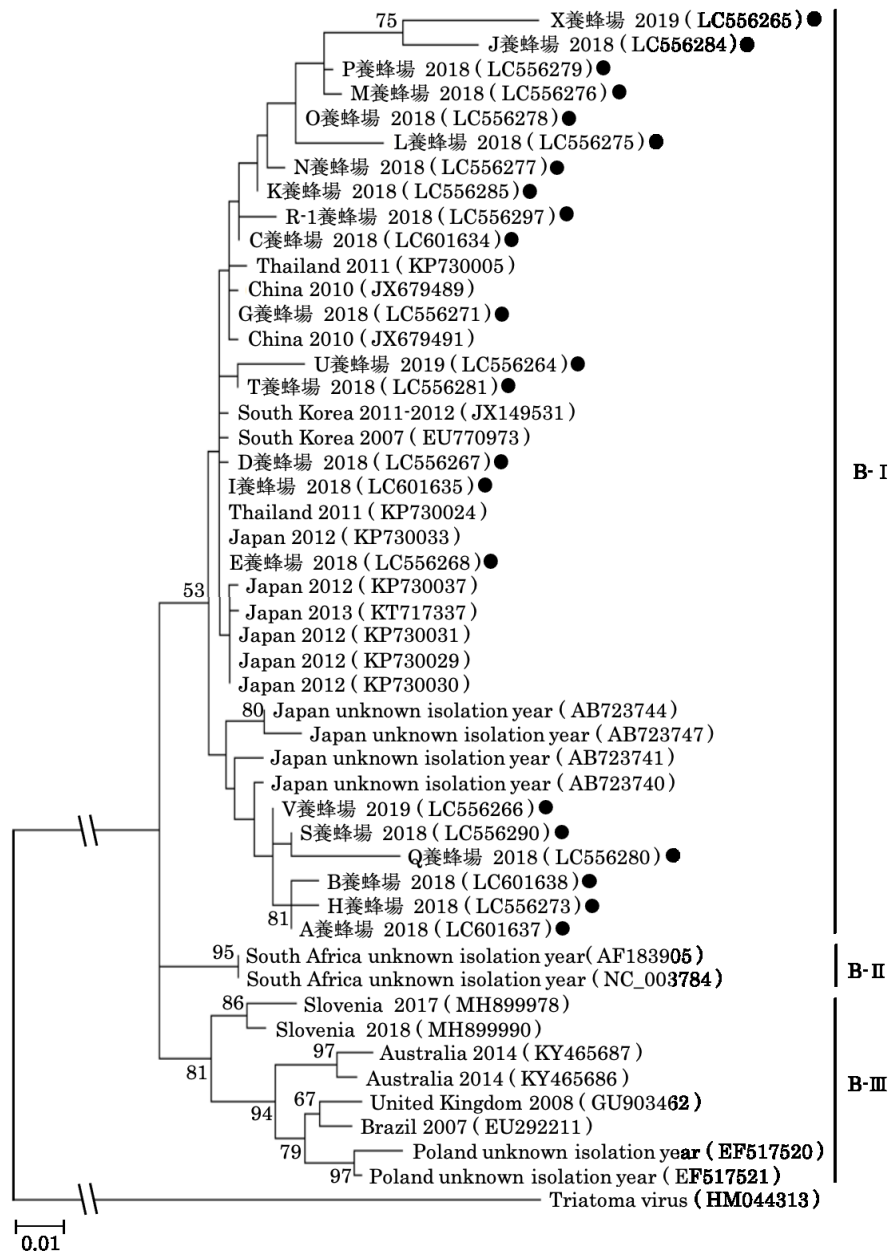


図 1-2 各養蜂場で得られた BQCV のカプシドプロテイン遺伝子領域塩基配列 (511 bp) に基づく系統樹

分子系統解析は、Tamura 3-parameter with a discrete gamma distribution model (T92+G) を用いて最尤法により実施した。本研究で得られた遺伝子配列 (●) は養蜂場名及び検体採材年度とともに示し、既報の遺伝子配列は検体が採材された国名及び採材年度とともに示した。括弧内はアクセッション番号、図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 50 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また、近縁の *Triatoma virus* を外群として示した。

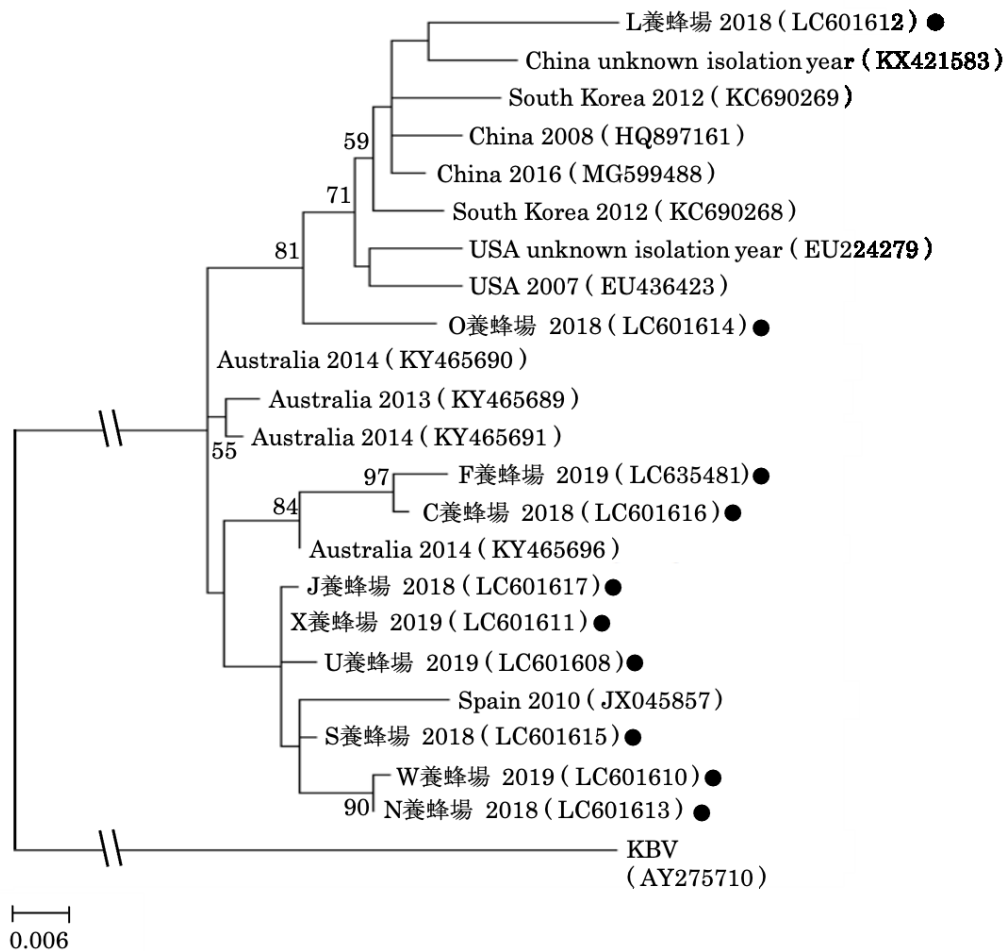


図 1-3 各養蜂場で得られた IAPV の 5'UTR-Helicase 遺伝子領域塩基配列(540 bp) に基づく系統樹

分子系統解析は、Tamura 3-parameter with a discrete gamma distribution model (T92+G) を用いて最尤法により実施した。本研究で得られた遺伝子配列 (●) は養蜂場名及び検体採材年度とともに示し、既報の遺伝子配列は検体が採材された国名及び採材年度とともに示した。括弧内はアクセッション番号、図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 50 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また、近縁のカシミール蜂ウイルス (KBV) を外群として示した。

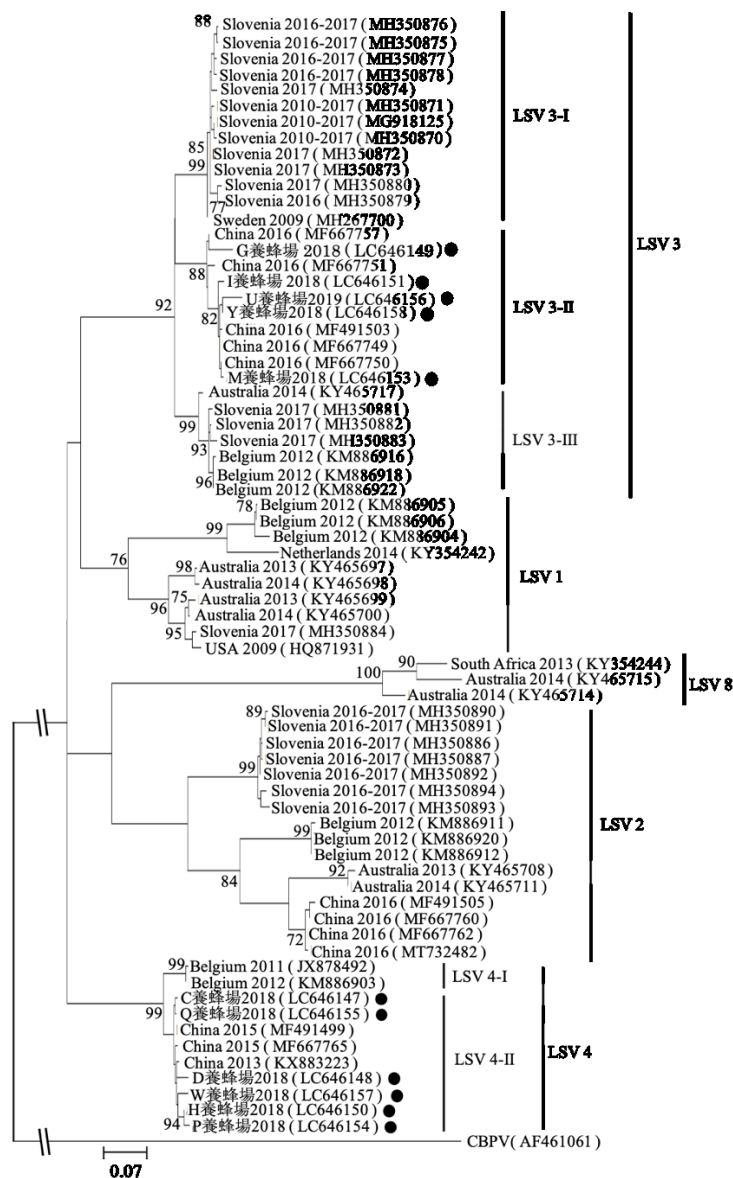


図 1-4 各養蜂場で得られた LSV の RdRp 遺伝子領域塩基配列 (540 bp) に基づく系統樹

分子系統解析は、Kimura 2-parameter with a discrete gamma distribution model (K2+G) 用いて最尤法により実施した。本研究で得られた遺伝子配列 (●) は養蜂場名及び検体採材年度とともに示し、既報の遺伝子配列は検体が採材された国名及び採材年度とともに示した。括弧内はアクセッション番号、図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 70 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また、近縁の慢性麻痺ウイルス (CBPV) を外群として示した。

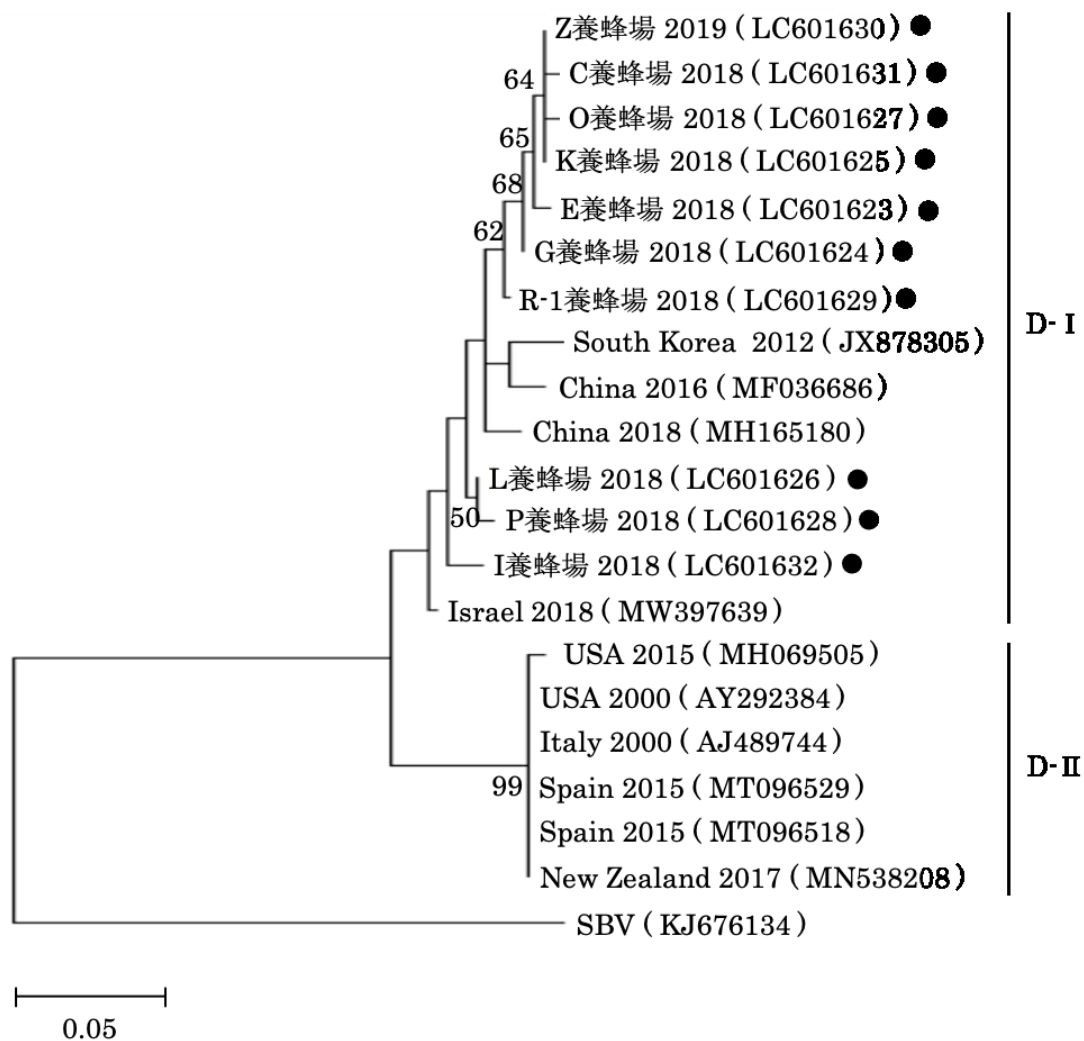


図 1-5 各養蜂場で得られた DWV の RdRp 遺伝子領域塩基配列 (159 bp) に基づく系統樹

分子系統解析は、Kimura 2-parameter (K2) 用いて最尤法により実施した。本研究で得られた遺伝子配列 (●) は養蜂場名及び検体採材年度とともに示し、既報の遺伝子配列は検体が採材された国名及び採材年度とともに示した。括弧内はアクセッション番号、図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 50 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また、近縁のサックブルードウイルス (SBV) を外群として示した。

第二章

養蜂場に生息する野生節足動物における蜂病ウイルスの分布

1. 序論

飼育バチは巣の内外において野生節足動物と生息環境を共有する。

巣内においてはミツバチの外部寄生虫であるミツバチヘギイタダニや害虫であるハチノスツヅリガが存在することがある。ミツバチヘギイタダニはミツバチの成虫や幼虫に寄生し、体液を吸血する [72]。ハチノスツヅリガの幼虫はミツバチの巣や巣内の花粉を食害し、ミツバチの幼虫を捕食する [97]。これまでに日本のミツバチヘギイタダニから BQCV, DWV, SBV, IAPV, KBV 及び CBPV が検出され [42]、ハチノスツヅリガの幼虫から BQCV 及び IAPV が検出されている [89]。これらの巣内に生息する野生節足動物は蜂病ウイルスの保持や飼育バチ個体間の蜂群内伝播を媒介する可能性が指摘されている。

また、野生節足動物が飼育バチと接触して蜂病ウイルスに感染する。蜂病ウイルスは養蜂場で捕獲される野生節足動物で高頻度に検出される [64, 83]。スズメバチやアリなど肉食性の節足動物はミツバチを捕食する。草食性のバッタなどの野生節足動物は巣外で排泄されたミツバチの糞便や巣外に捨てられたミツバチの死体を介し、間接的にミツバチと接する可能性がある。これまで、フランス、アメリカ合衆国及びスロベニアでは、節足動物が、BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV 及び LSV を保有することが報告されている [3, 15, 49, 64, 82, 96]。具体的には、スズメバチ [96]やアリ [12, 15, 64]、カメムシ [49]で BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV 及び LSV が検出されている。これまでに、DWV 陽性のミツバチを食べることでアリが DWV に感染することが報告された [78]。また、同じ花を利用することで、マルハナバチとミツバチの間で DWV や IAPV が伝播することが示唆されている [3, 77, 83]。飼育バチの巣の周囲に生息する野生節足動物は養蜂場内の蜂病ウイルスに感染することで、養蜂場内の蜂群間や養蜂場間でのウイルス伝播に関与する可能性がある。

日本では、日本養蜂協会が作成した養蜂技術指導手引書によりミツバチヘギイタダニ [41]及びハチノスツヅリガ [39]の防除の指針が示されている。しか

し、これ以外の野生節足動物については、スズメバチ類 [54]を除き、防除方法が示されていない。また、スズメバチ類についても、粘着シートやスズメバチ捕獲器を飼育バチの巣箱に設置するという限られた方法しか示されていない [54]。本章では、日本の養蜂場での蜂病ウイルスの維持や伝播における野生節足動物の関与を明らかにして、養蜂場における野生節足動物対策を提案することを目的とした。第一章と同じ地域にある 3 養蜂場で飼育バチならびに野生節足動物における蜂病ウイルスの保有状況を調査した。さらに、飼育バチと野生節足動物が保有するウイルスの遺伝的関連性を解析した。

2. 材料及び方法

2. 1. セイヨウミツバチ及び野生節足動物検体の収集

第一章で複数種類の蜂病ウイルスが検出された養蜂場を含む3カ所（Q, R-1, R-2）で調査を行った。Q 養蜂場及び R-1 養蜂場は第一章で調査し、Q 養蜂場からは BQCV 及び LSV が検出され、R-1 養蜂場からは BQCV 及び DWV が検出された。R-2 養蜂場は、R-1 養蜂場と同じ養蜂家が管理する養蜂場であり、本章で対象とした野生節足動物の生息が確認されたため調査を行った。2019年11月8日及び9日に一つの巣箱内から飼育バチ成虫5個体を採取した。また、巣箱周囲（2 m 以内）において、網、粘着トラップ及びスズメバチ捕獲器によりスズメバチ類（オオスズメバチあるいはキイロスズメバチ）及びバッタ類を採取した。採取した検体は二酸化炭素により安楽殺後、氷冷して実験室に持ち帰り、解析まで -20°C で保管した。捕獲した野生節足動物は Odoi ら[62]の方法、すなわち、insect explorer (<https://www.insects.jp>) を用いて種まで同定した。

2. 2. 乳剤の作製

検体に体積の約2倍量の RNase free dH_2O を加え、第一章と同様の方法で乳剤を作製した。

2. 3. RNA の抽出

RNA 抽出は乳剤上清 200 μl から NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel) を用い、キットのプロトコルに従い実施した。

2. 4. cDNA の合成

抽出した RNA 溶液を用いて、Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ(株)) にて第一章と同様に cDNA を合成した。

2. 5. 8 種類の蜂病ウイルスの PCR 及び PCR 増幅産物のシーケンス解析

第 1 章の表 1-2 に示した 8 種類の蜂病ウイルスのプライマーを用いて、第一章と同様の条件で PCR を行った。PCR では、*TaKaRa Ex Taq* (タカラバイオ(株)) あるいは Prime Script RT-PCR Kit (タカラバイオ(株)) に含まれる *TaKaRa Ex Taq* HS を用いた。さらに、得られた PCR 増幅産物は第 1 章と同様の方法で塩基配列を決定した。

2. 6. 分子系統学的解析

決定した塩基配列は第 1 章と同様の方法で分子系統学的解析を行った。分子系統学的解析に用いたリファレンス遺伝子の採材国名及びアクセッション番号を表 2-1 に示した。

2. 7. 統計学的解析

ウイルス陽性率は、Bonferroni 補正による Fisher の正確確率検定により解析した。解析は第一章と同様に統計解析ソフト R (version 4. 0. 5) [67] 及び R Studio (version 1. 4. 1106.) [73] を用いて行った。

2. 8. アクセッション番号

本章で得られたウイルス遺伝子塩基配列は、DDBJ に登録及び公開した。登録したアクセッション番号は LC581763~LC581787, LC582746~LC582767, LC646159 であった。

2. 9. 倫理的配慮

本章の研究は、岐阜大学動物実験委員会の承認を受けて行った (許可番号 17055)。

3. 結果

3. 1. 調査蜂場で捕獲された野生節足動物の種

3 蜂場において、スズメバチ類 23 個体とバッタ類 5 個体が捕獲された。Q 養蜂場で捕獲されたスズメバチ類 (n=14) は 2 個体がオオスズメバチ、12 個体がキイロスズメバチと同定され、バッタ類 (n=2) はすべてコバネイナゴと同定された。R-1 養蜂場では、捕獲されたスズメバチ類 (n=7) はいずれもオオスズメバチであり、バッタ類 (n=2) はツチイナゴとサトクマダキモドキであった。R-2 養蜂場で捕獲されたスズメバチ類 (n=2) はいずれもオオスズメバチであり、バッタ類 (n=1) はセスジツユムシであった。

3. 2. 蜂病ウイルス遺伝子の検出

飼育バチから IAPV, BQCV 及び DWV が、養蜂場で捕獲されたスズメバチ類から IAPV, DWV 及び LSV が、バッタ類から IAPV が検出され、他のウイルス遺伝子 (ABPV, KBV, CBPV, SBV) は検出されなかった (表 2-2)。飼育バチからは DWV が最も多く検出され (9/15, 60 %), 3 養蜂場全てで遺伝子が検出された。一方、スズメバチ類では LSV (1/23, 4 %) より IAPV (20/23, 87 %) 及び DWV (13/23, 57 %) が多く検出された ($P < 0.01$, Bonferroni 補正による Fisher の正確確率検定)。

Q 養蜂場では、飼育バチ、スズメバチ類、バッタ類のいずれから IAPV 遺伝子が検出された。一方、R-1 養蜂場ではスズメバチ類からのみ、R-2 養蜂場では飼育バチからのみ、IAPV が検出された。また、R-2 養蜂場では、飼育バチからのみ BQCV が検出され、スズメバチ類からのみ LSV が検出された。

3. 3. IAPV の分子系統学的解析

IAPV をターゲットにした PCR で増幅の見られた 26 検体のうち、対象とする領域全長の配列が解読できた 25 検体で IAPV の 5'UTR-ヘリケース遺伝子部分配列 (540 bp) に基づいた分子系統解析を行った。その結果、検出された配

列 (n=25) は 3 つのサブクレード (I, II 及び III) に分けられた (図 2-1)。Q 養蜂場の IAPV の遺伝子塩基配列は互いに 99.8~100 %の相同性を示し, R-1 養蜂場の IAPV との相同性は 96.1~96.3 %であり, R-2 養蜂場の IAPV との相同性は 98.5~98.7 %であった。R-1 養蜂場の IAPV の遺伝子塩基配列は互いに 100 %であり, R-2 養蜂場の IAPV との相同性は 95.9 %であった。分子系統解析及び遺伝子塩基配列の相同性の解析の結果, IAPV は生物種によってではなく, 養蜂場によって分けられた。

3. 4. DWV の分子系統学的解析

DWV の RdRp 遺伝子部分配列 (159 bp) に基づいた分子系統学的解析の結果, 検出された配列 (n=22) は 2 つのクレード (I 及び II) に分かれた (図 2-2)。Q 養蜂場の DWV の遺伝子塩基配列は互いに 96.9~100 %の相同性を示し, R-1 養蜂場の DWV との相同性は 95.6~100 %であり, R-2 養蜂場の DWV との相同性は 96.9~100 %であった。R-1 養蜂場の DWV の遺伝子塩基配列は互いに 95.0~100 %であり, R-2 養蜂場の DWV との相同性は 95.6~100 %であった。また, R-2 養蜂場の DWV の相同性は互いに 98.1~99.4 %であった。分子系統解析及び遺伝子塩基配列の相同性の解析の結果, DWV は生物種や養蜂場によってクレードに分かれなかった。

3. 5. LSV の分子系統学的解析

LSV の RdRp 遺伝子部分的配列 (540bp) に基づいた分子系統学的解析の結果, オオスズメバチから検出された配列 (n=1) は第 1 章で岐阜県の飼育バチから検出された LSV4 と同じクレードに分類された (図 2-3)。オオスズメバチから検出された LSV の塩基配列は, 第 1 章で得られた飼育バチの LSV4 と 96.3~99.1 %の相同性を示した。

4.考察

飼育バチから IAPV, BQCV 及び DWV が検出された養蜂場において、野生節足動物から DWV 及び IAPV が検出された。蜂病ウイルスは、感染ミツバチを摂食することにより直接、また、餌場などの環境を介して間接的に伝播することが報告されている。Payne らは IAPV と DWV を含む 6 ウイルスは養蜂場以外に生息するアリよりも養蜂場近辺に生息するアリで高頻度に検出されることから、ウイルスが飼育バチの死骸や巣内の餌の摂食を通じ飼育バチからアリへと伝播することを示唆した [64]。Schläppi らは DWV 陽性のミツバチを実験的に摂食させることにより、アリが DWV に感染することを報告している [78]。また、飼育バチ及びマルハナバチで DWV が検出された養蜂場の花からもウイルスが検出され、植物を介した伝播の可能性が指摘されている [3]。

分子系統解析の結果、IAPV は生物種ではなく養蜂場によりクレードが分かれた。以上のことから、IAPV は同一養蜂場内において飼育バチと野生の節足動物の間で伝播している可能性が示唆された。スズメバチ類では、DWV が 57 % の個体から検出されたのに対して IAPV は 87 % の個体から検出され、また、LSV (4 %) よりも IAPV の方が有意に多く検出された ($P < 0.01$)。このように、スズメバチ類は IAPV を保有しやすい可能性が考えられ、飼育バチにおける IAPV の対策はスズメバチ類による媒介を含めて検討する必要がある。

飼育バチ及びスズメバチ類に由来する DWV は同一のサブクレードを形成した。Q 及び R-2 養蜂場の飼育バチ (323 及び 182) が保有する DWV と同じ配列の DWV を R-1 養蜂場のオオスズメバチが保有していた。各養蜂場には複数の DWV が共存したが、3 養蜂場で同一の遺伝子配列のウイルスが認められたことから、飼育バチやオオスズメバチにより養蜂場間でウイルスが伝播された可能性が示唆された。

R-2 養蜂場のオオスズメバチから検出された LSV4 は、第一章で岐阜県南西部の養蜂場から検出された LSV4 と近縁であったが、同蜂場の飼育バチでは LSV は検出されなかった。Šimenc らは、マルハナバチから検出された LSV の

系統がマルハナバチの捕獲地点の近くで採取した飼育バチから検出された LSV の系統と一致することを報告した [82]。本研究で、R-1 養蜂場のオオスズメバチが保有する DWV は Q 及び R-2 養蜂場の飼育バチが保有する DWV と配列が一致した。したがって、R-2 養蜂場のオオスズメバチから検出された LSV は、他の養蜂場の飼育バチに由来する可能性が考えられる。

本研究ではバッタから IAPV が検出された。バッタは草食性であり、養蜂場内の草本植物を餌とする。一方、ミツバチには巣の外で排泄をし、死亡した個体を巣の外に捨てる習性がある [34]。このため、蜂病ウイルスに感染した飼育バチがいる養蜂場では飼育バチの排泄物や死体により環境がウイルスに汚染され、バッタが汚染された草本植物を食べることによりウイルスが検出された可能性がある。また、本研究では乳剤作製前に検体の表面の洗浄を行っていないことから、バッタの表面に付着した蜂病ウイルスを検出した可能性もある。いずれの場合でも、バッタから蜂病ウイルスが検出された養蜂場では環境がウイルスに汚染されていたと考えられるが、飼育バチが蜂病ウイルスに陽性となる場合でも Q 養蜂場の IAPV を除き、多くの養蜂場でバッタからウイルスは検出されなかった。したがって、環境中に存在する蜂病ウイルスの量は限られており、バッタが養蜂場内の蜂病ウイルスの維持や伝播に関与する可能性は低いと考えられた。

近年、セイヨウミツバチではスズメバチを集団で取り囲み、熱により死亡させる「熱蜂球行動」により巣を防衛することが細野らにより報告された [38]。細野らは、キイロスズメバチに対する熱蜂球に約 137 個体のミツバチが参加し、オオスズメバチに対する熱蜂球に約 296 個体のミツバチが参加すること、また、熱蜂球に参加したミツバチの大部分は生き残ることを明らかにした [38]。

DWV は 43 °C の条件下でウイルス量が低下することが報告され [21]、熱蜂球内では 44~48 °C の熱が発生することが報告されているが [38]、熱蜂球の形成時間は約 7 分と短いことからウイルスは完全には不活化されない可能性がある。このような熱蜂球行動はスズメバチと飼育バチの体の接触頻度を増やし、スズメバチから飼育バチへと蜂病ウイルスを伝播させる可能性がある。また、

熱蜂球に参加したミツバチ間でも体の接触により蜂病ウイルスが個体間伝播する可能性が考えられる。スズメバチは熱蜂球により死亡するが、ウイルス感染したミツバチによりスズメバチの死体が汚染され、死体の巣外への運搬を介し巣内の他のミツバチの感染源となる可能性がある。キイロスズメバチは巣門の前でミツバチを捕食し、オオスズメバチは巣門の前だけでなく、ミツバチの巣内に侵入し、ミツバチを捕食する [51]。スズメバチ類の対策は、ミツバチの巣外での防除と巣の中への侵入防止を並行して行う必要がある。

本章で、野生の節足動物も蜂病ウイルスを保有していることを明らかにした。特に、スズメバチ科の節足動物は蜂病ウイルスを高率に保有し、養蜂場内での維持や養蜂場内や蜂場間の伝播に関与する可能性が示唆された。農林水産省の平成 22 年度産地収益力向上支援事業全国推進事業により作成された養蜂マニュアル [54]には、養蜂場でミツバチの巣外にいるスズメバチ類の防除法として粘着シートやスズメバチ捕獲器の使用が推奨されている。また、スズメバチ対策には養蜂場やその周辺にあるスズメバチの巣の駆除や市販されているスズメバチ防除器によるオオスズメバチの蜂群内への侵入防止も挙げられる。スズメバチはミツバチを捕食することから、養蜂家は以上のような生きたスズメバチに対する対策を行ってきた。しかし、本研究の結果からこれらのすでに示されている防除方法に加え、熱蜂球で死亡したオオスズメバチの死体をミツバチの巣内から除去することも対策の一つとして検討する必要があると考えられる。

表 2-1 分子系統学的解析に用いた各蜂病ウイルスのリファレンス株の採材国名及びアクセッション番号

ウイルス名	リファレンス株の採材国名及び GenBank のアクセッション番号
DWV	イタリア (AJ489744), 韓国 (JX878305), 中国 (MF036686, MH165180), フランス (AY292384)
IAPV	アメリカ合衆国 (EU436423), 韓国 (KC690268), 中国 (HQ897161)
LSV	アメリカ合衆国 (HQ871931), オランダ (KY354242), オーストラリア (KY465697-KY465700, KY465708, KY465711, KY465714, KY465715, KY465717, KY465720), スウェーデン (MH267699, MH267700), スロベニア (MG918125, MH350870-MH350894), 中国 (KX883223, MF491499, MF491503, MF491505, MF667750, MF667751, MF667757, MF667760, MF667762, MF667765, MT732482, MZ821886), ベルギー (JX878492, KM886903-KM886906, KM886911, KM886912, KM886916, KM886918, KM886920, KM886922), 南アフリカ (KY354244)

表 2-2 各養蜂場で採集された飼育バチ及び野生節足動物における蜂病ウイルスの検出状況

種	Q 養蜂場 (%)				R-1 養蜂場 (%)				R2 養蜂場 (%)				合計 (%)			
	I	B	D	L	I	B	D	L	I	B	D	L	I	B	D	L
セイヨウミツバチ	3/5 (60)	0/5	1/5 (20)	0/5	0/5	0/5	5/5 (100)	0/5	1/5 (20)	1/5 (20)	3/5 (60)	0/5	4/15 (27)	1/15 (7)	9/15 (60)	0/15
スズメバチ類	14/14 (100)	0/14	10/14 (71)	0/14	6/7 (86)	0/7	2/7 (29)	0/7	0/2	0/2	1/2 (50)	1/2 (50)	20/23 (87)	0/23	13/23 (57)	1/23 (4)
オオスズメバチ	2/2 (100)	0/2	0/2	0/2	6/7 (86)	0/7	2/7 (29)	0/7	0/2	0/2	1/2 (50)	1/2 (50)	8/11 (73)	0/11	3/11 (27)	1/11 (9)
キイロスズメバチ	12/12 (100)	0/12	10/12 (83)	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	12/12 (100)	0/12	10/12 (83)	0/12
バッタ類	2/2 (100)	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	2/5 (40)	0/5	0/5	0/5
コバネイナゴ	2/2 (100)	0/2	0/2	0/2	-	-	-	-	-	-	-	-	2/2 (100)	0/2	0/2	0/2
ツチイナゴ	-	-	-	-	0/1	0/1	0/1	0/1	-	-	-	-	0/1	0/1	0/1	0/1
サトクマダキモドキ	-	-	-	-	0/1	0/1	0/1	0/1	-	-	-	-	0/1	0/1	0/1	0/1
セスジツユムシ	-	-	-	-	-	-	-	-	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

* I : IAPV, B : BQCV, D : DWV, L : LSV

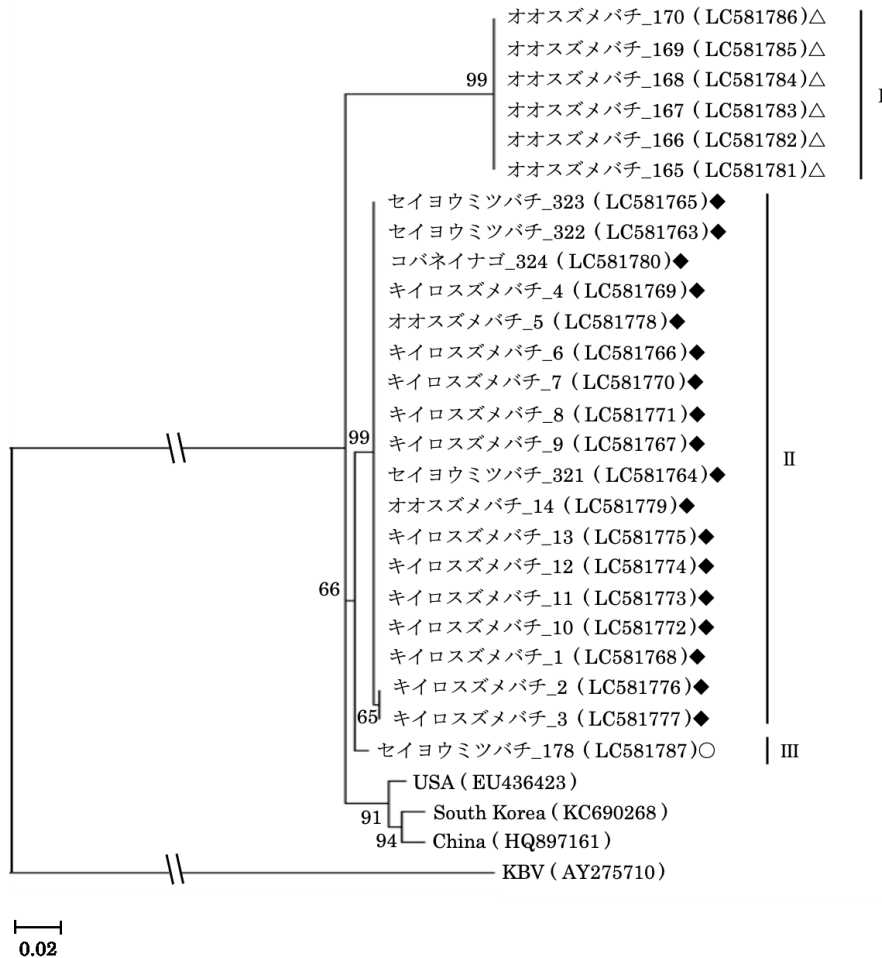


図 2-1 各養蜂場で得られたイスラエル急性麻痺ウイルス (IAPV) の 5'UTR-Helicase 遺伝子領域塩基配列 (540 bp) に基づく系統樹

本研究で得られた遺伝子配列は検出された節足動物種名及び養蜂場を表す記号とともに示した (◆ : Q 養蜂場, △ : R-1 養蜂場, ○ : R-2 養蜂場)。括弧内はアクセッション番号, 図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 50 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また, 近縁のカシミール蜂ウイルス (KBV) を外群として示した。

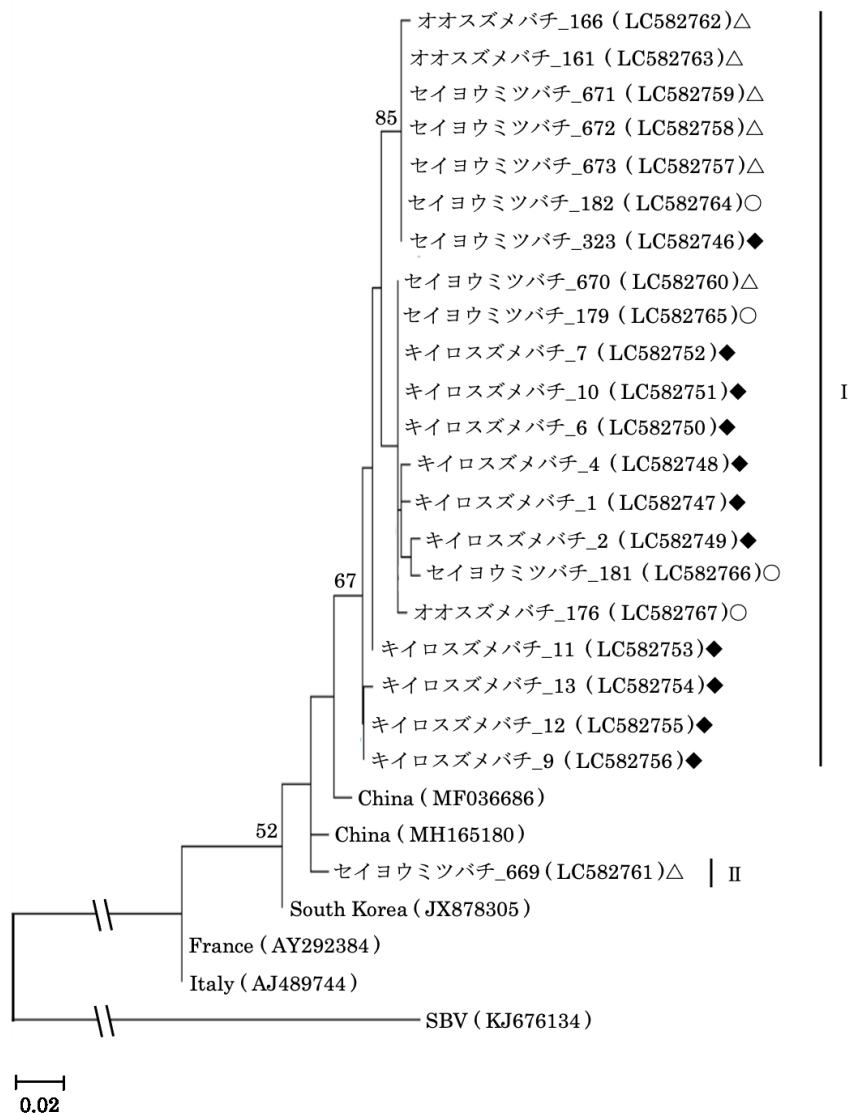


図 2-2 各養蜂場で得られたチズレバネウイルス (DWV) の RdRp 遺伝子領域塩基配列 (159 bp) に基づく系統樹

本章で得られた遺伝子配列は検出された節足動物種名及び養蜂場を表す記号とともに示した (◆ : Q 養蜂場, △ : R-1 養蜂場, ○ : R-2 養蜂場)。括弧内はアクセッション番号, 図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 50 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また, 近縁のサックブルードウイルス (SBV) を外群として示した。

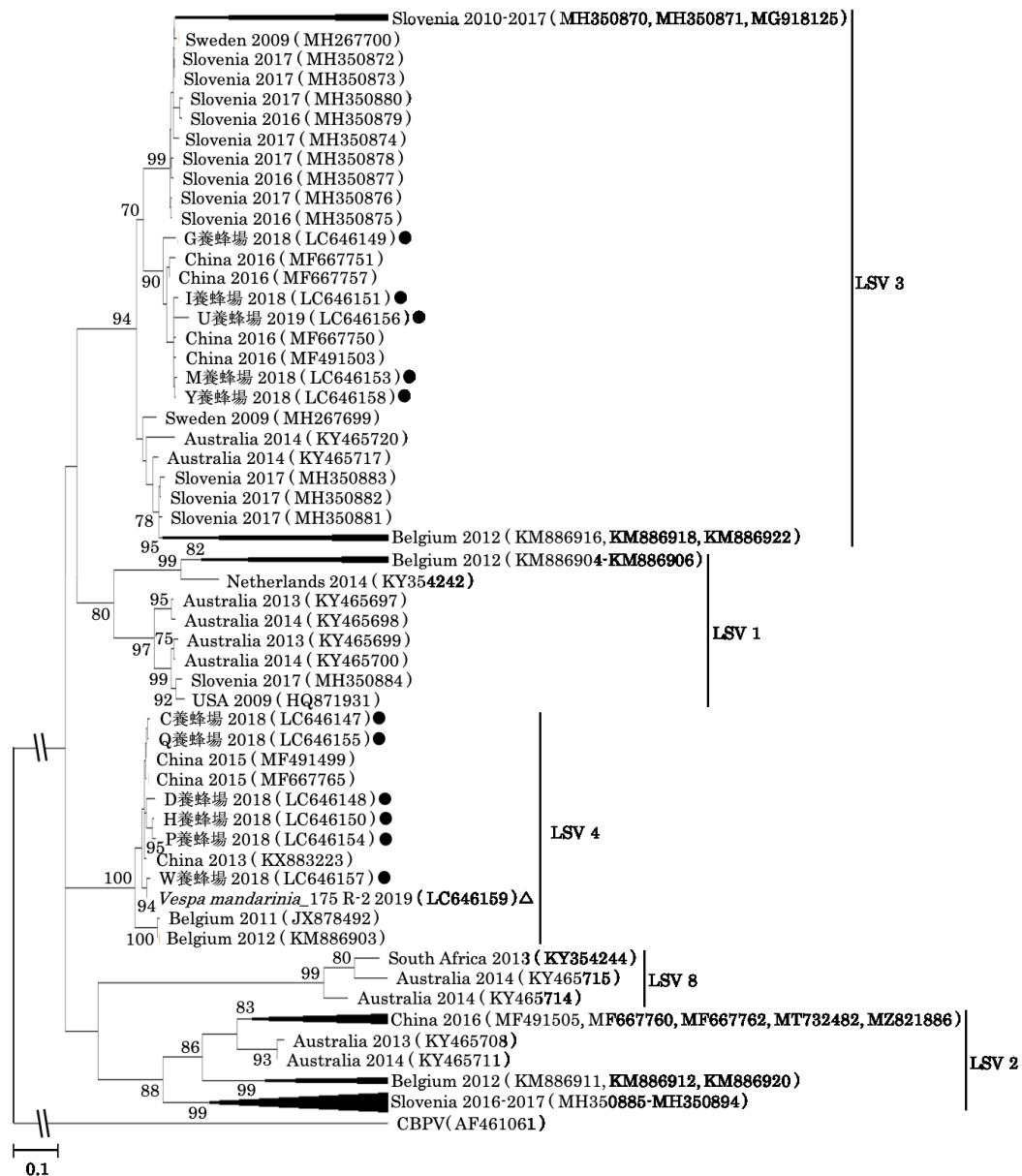


図 2-3 各養蜂場で得られた LSV の RdRp 遺伝子領域塩基配列 (540 bp) に基づく系統樹

分子系統解析は、Kimura 2-parameter with a discrete gamma distribution model (K2+G) 用いて最尤法により実施した。本章で得られた遺伝子配列 (Δ) は検出された節足動物種名とともに示した。また、第一章で得られた遺伝子配列 (●) は養蜂場名及び検体採材年度とともに示し、既報の遺伝子配列は検体が採材された国名及び採材年度とともに示した。括弧内はアクセション番号、図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 70 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また、近縁の慢性麻痺ウイルス (CBPV) を外群として示した。

第三章

一養蜂場における蜂病ウイルスの分布

1. 序論

家畜の一種であるミツバチは、養蜂場において巣箱を用いて飼育される。蜂群には、通常 1 個体の女王蜂、数千個体のオス蜂、そして、数万個体の働き蜂が存在する [77]。女王蜂とオス蜂は繁殖を担い、働き蜂は巣内で幼虫の育児や掃除、巣外では採餌や巣の防衛を行う。このように、ミツバチは蜂群内で仕事を分業するが、分泌液の経口的な交換（「栄養交換 (trophallaxis)」）やグルーミング、死体の巣外への運搬などを介して頻繁に個体間で接触をする特徴がある [26, 34]。また、日本では 2021 年 1 月時点で、10,529 戸の養蜂場において、22 万 4 千群のミツバチが飼育されており、これらの養蜂場の 3 割では 10 群以上のミツバチが飼養されている [61]。養蜂場では複数の蜂群が存在するため、他の蜂群間の個体が接触する機会が多い。

蜂病ウイルスは蜂群内で感染拡大し地域での分布に関与することを第一章で示唆した。これまでに、BQCV や DWV, SBV は蜂群内で女王蜂から卵へ垂直伝播することや [17, 36, 94]、蜂群内で成虫間、また、成虫から幼虫へ水平伝播することが報告されている [94]。IAPV は成虫間での分泌液の栄養交換により伝播し [4]、DWV, SBV, IAPV, ABPV 及び KBV は成虫から幼虫への給餌を介して伝播することが示唆されている [94]。その他、ミツバチの巣内に貯蓄された食物から SBV, KBV 及び IAPV が検出され、ミツバチの糞からも BQCV, DWV, IAPV, ABPV, KBV 及び CBPV が検出される [94]。さらに、CBPV [13] や IAPV [4] は体の接触により個体間で伝播されることが報告され、ミツバチの外部寄生虫であるミツバチヘギイタダニ (*V. destructor*) が BQCV, DWV, SBV, IAPV, ABPV, KBV, CBPV 及び LSV を媒介する可能性が指摘されている [42, 65, 94]。以上のように、蜂群内に侵入したウイルスは蜂群内で容易に感染拡大する。

蜂群間の蜂病ウイルスの伝播には、ミツバチが他蜂群に間違っ入る「迷い込み (Drifting) [33]」や他の弱っている蜂群から食料や巣材を奪う「盗蜂 (Robbing)」 [70] が関与することが指摘されている [10]。さらに、養蜂業では養蜂場内の蜂群数を増やす目的で人為的に一つの蜂群を「分蜂」させ、蜂群内の個体数を増やす

目的で複数の蜂群を合わせて一蜂群とする「合同」が行われる。これらの作業も蜂病ウイルスの蜂群間伝播の要因となる可能性が考えられる。

第一章で BQCV, DWV 及び IAPV 陽性群では群内の複数の成虫からウイルスが検出され、蜂群内でウイルス伝播が起きていることを示唆した。そこで、第 3 章では蜂病ウイルスの感染状況に影響する要因を明らかにするため、岐阜県南西部の一養蜂場において蜂病ウイルスを調査し、巣箱の配置の解析や検出された IAPV 遺伝子の分子疫学的解析を行った。

2. 材料及び方法

2. 1. セイヨウミツバチの収集

岐阜県南西部の一養蜂場で調査を行った。本蜂場は巣箱がランダムに配置され、巣門の方向や巣門間の距離が蜂群ごとに異なっている特徴があったことから調査対象とした。本蜂場は第一章で調査した U 養蜂場と同じ養蜂家が管理する養蜂場で、2021 年以前に調査を行ったことはなかった。2021 年 6～7 月に調査蜂場の全 65 群から飼育バチ成虫 5 個体を採材した。採材した検体は蜂群ごとにポリ袋の中で、二酸化炭素により速やかに安楽殺後、氷冷して実験室に持ち帰った。各蜂群から採材した検体は蜂群ごとに同じ容器に入れ、解析まで 20 °C で保管した。

2. 2. 養蜂場内の蜂群配置図の作成

すべての巣箱を対象に、巻尺を用いて巣箱間の距離及び方位磁石を用いて巣門の方向を記録した。記録に基づいて 100 分の 1 の縮尺で蜂群配置図を作成した (図 3-1)。

2. 3. 各蜂群と隣接蜂群との巣門角度差及び巣門距離の測定

本蜂場の巣箱は、巣門がある短辺の長さが 0.36 m あるいは 0.45 m の 2 種類であった。Dynes ら [33]により 1 m 間隔で巣箱が並ぶ養蜂場でミツバチが最も近い巣箱に迷い込む頻度が高いことが報告されていることから、1 m の巣箱距離に巣箱の短辺の長さを合わせた 1.45 m をミツバチが迷い込む頻度が高い距離と仮定し、各蜂群の巣門の中心から 1.45 m 以内に巣門の中心がある蜂群を隣接蜂群とみなした。全蜂群について、2. 2. で作成した蜂群配置図 (図 3-1) を基に、隣接蜂群との巣門距離を算出した。さらに、各蜂群の巣門の真北からの角度をもとに隣接蜂群間の巣門角度の差を算出した。

2. 4. 蜂病ウイルスの検出

2. 4. 1. 乳剤の作製

検体は1個体ずつから RNase free dH₂O 1 mL で第一章と同様の方法で乳剤を作製し、同じ群由来の5個体の乳剤 28 μL ずつをプールした。

2. 4. 2. RNA の抽出

プール乳剤 140 μL から QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。

2. 4. 3. cDNA の合成

得られた RNA 溶液を用いて、Prime Script 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ(株)) にて第一章と同様に cDNA を合成した。

2. 4. 4. 8 種類の蜂病ウイルスの PCR

第1章の表 1-2 に示した8種類の蜂病ウイルスのプライマー及び TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ(株)) を用いて、第一章と同様の条件で PCR を行った。

2. 5. IAPV 陽性群におけるウイルス保有状況の解析

2. 5. 1. 個体からの IAPV, LSV 及び BQCV の検出

プール検体で IAPV, LSV 及び BQCV が検出された群について、飼育バチ 1 個体ずつの乳剤 140 μL から上記の方法により RNA を抽出した。第一章と同様の条件で cDNA を作成後、PCR 法にて同ウイルスの検出を行った。

2. 5. 2. IAPV のシーケンス解析

養蜂場内の蜂群内伝播及び蜂群間伝播の状況を明らかにするため、養蜂場内の一部で陽性蜂群が認められた IAPV についてシーケンス解析を行った。各 IAPV 陽性群につき、最大 2 個体の飼育バチについて 1 個体ずつ第一章と同様の方法でダイレクトシーケンス法により PCR 産物の塩基配列を決定した。

2.5.3. IAPV の分子系統学的解析

決定した塩基配列は第1章と同様の方法で分子系統学的解析を行った。分子系統学的解析は養蜂場内で検出された IAPV 遺伝子間の関係を明らかにするために、既報の IAPV 遺伝子塩基配列 (EU436423, HQ897161 及び KC690268) とともにを行った。

2.6. 統計学的解析

ウイルス有病率は Fisher の正確確率検定により解析した。解析は第一章と同様に統計解析ソフト R (version 4.0.5) [67] 及び R Studio (version 1.4.1106.) [73] を用いて行なった。

2.7. アクセッション番号

本章で得られたウイルス遺伝子塩基配列は, DDBJ に登録及び公開した。登録したアクセッション番号は LC655876~LC655892 であった。

3. 結果

3.1. 蜂病ウイルス遺伝子の検出

調査した 65 群のうち、LSV は 46 群 (71 %), BQCV は 40 群 (62 %), IAPV は 11 群 (17 %) 及び SBV は 1 群 (2 %) から検出された。LSV 及び BQCV は他の検出された 2 種類のウイルスよりも有意に多く検出された ($P < 0.01$, Bonferroni 補正による Fisher の正確確率検定)。DWV, ABPV, KBV 及び CBPV はいずれの蜂群からも検出されなかった。

65 群のうち、隣接蜂群の存在する蜂群は 51 群であった。隣接蜂群の存在する蜂群のうち、LSV は 35 群 (69 %), BQCV は 31 群 (61 %), IAPV は 9 群 (18 %) から検出された。また、隣接群のない 14 群からは、LSV は 11 群 (79 %), BQCV は 9 群 (64 %), IAPV は 2 群 (14 %) から検出された。

3.2. 養蜂場内における全蜂群及び陽性蜂群の配置

LSV (図 3-2) あるいは BQCV (図 3-3) が検出された蜂群は蜂場全体に分布し、SBV (図 3-4) が検出された 1 群は養蜂場内の南西端に位置した。隣接蜂群で同じ蜂病ウイルスが検出された小集団を「地点」とすると、IAPV (図 3-5) は養蜂場内の 7 ヶ所の地点から検出され、このうち、養蜂場南西の地点 A では 4 群から検出され、北西の地点 B では 2 群から検出された。また、地点 C~G では各 1 群から IAPV が検出された。

すべての蜂群とその隣接蜂群の組み合わせは 40 組あり、これらの平均巣門距離は 1.18 m、平均巣門角度差は 99 度であった。

3.3. 陽性蜂群とその隣接蜂群との位置関係と隣接蜂群でのウイルス検出状況

LSV が検出された蜂群と隣接する蜂群との組み合わせ ($n=34$) のうち、16 組 (47 %) の隣接蜂群で LSV 感染が認められた。LSV 陽性蜂群との巣門距離が 1.18 m 未満の 15 群のうち、LSV が 8 群 (53 %) から検出され、巣門距離が 1.18 m 以上 1.45 m 以下の 19 群のうち、LSV は 8 群 (42 %) から検出された

(表 3-1)。また、LSV 陽性蜂群との巣門角度差が 99 度未満の 19 群のうち、LSV が 9 群 (47 %) から検出され、巣門角度差が 99 度以上 180 度以下の 15 群のうち、LSV が 7 群 (47 %) から検出された。Fisher の正確確率検定の結果、隣接蜂群での LSV 検出状況は、LSV 陽性蜂群と隣接蜂群との巣門角度差 ($P=1.00$) と巣門距離 ($P=0.73$) の間で有意差は認められなかった。

BQCV が検出された蜂群と隣接する蜂群との組み合わせ ($n=33$) のうち、17 組 (52 %) の隣接蜂群で BQCV 感染が認められた。BQCV 陽性蜂群との巣門距離が 1.18 m 以内の 14 群のうち、BQCV が 9 群 (64 %) から検出され、巣門距離が 1.18m 以上 1.45 m 以下の 19 群のうち、BQCV は 8 群 (42 %) から検出された (表 3-2)。また、BQCV 陽性蜂群との巣門角度差が 99 度未満の 14 群のうち、BQCV が 7 群 (50 %) から検出され、巣門角度差が 99 度以上 180 度以下の 19 群のうち、BQCV が 10 群 (53 %) から検出された。Fisher の正確確率検定の結果、隣接蜂群での BQCV 検出状況は、BQCV 陽性蜂群と隣接蜂群との巣門角度差 ($P=1.00$) と巣門距離 ($P=0.30$) の間で有意差は認められなかった。

IAPV が検出された蜂群と隣接する蜂群との組み合わせ ($n=13$) のうち、2 組 (15 %) の隣接蜂群で IAPV 感染が認められた。IAPV 陽性蜂群との巣門距離が 1.18 m 以内の 7 群のうち、IAPV が 2 群 (29 %) から検出され、巣門距離が 1.18 m 以上 1.45 m 以下の 6 群から IAPV は検出されなかった (表 3-3)。また、IAPV 陽性蜂群との巣門角度差が 99 度未満の 7 群のうち、IAPV が 1 群 (14 %) から検出され、巣門角度差が 99 度以上 180 度以下の 6 群のうち、IAPV が 1 群 (17 %) から検出された。Fisher の正確確率検定の結果、隣接蜂群での IAPV 検出状況は、IAPV 陽性蜂群と隣接蜂群との巣門角度差 ($P=1.00$) と巣門距離 ($P=0.46$) の間で有意差は認められなかった。

3. 4. LSV, BQCV 及び IAPV 陽性群におけるウイルス保有状況の解析

ウイルス陽性群で 5 個体の成虫におけるウイルスの保有状況を調査した結果、IAPV は IAPV 陽性 11 群のうち 5 群 (45 %) で 3 個体以上の個体から検出された (表 3-4)。また、BQCV は BQCV 陽性 8 群のうち 7 群 (88 %) で 3 個体以上

の個体から検出され、LSV は LSV 陽性 8 群のうち 3 群 (38 %) で 3 個体以上の個体から検出された。

3. 5. 養蜂場内に分布する IAPV の分子系統学的解析

IAPV の 5'UTR-ヘリケース遺伝子部分配列 (540 bp) に基づいた分子系統解析の結果、本章で得られた岐阜県の IAPV は 3 つのクレードに分かれた (I, II, III) (図 3-6)。本蜂場で検出されたクレード I の IAPV 遺伝子塩基配列は、互いに 98.5~100 %の相同性を示し、クレード II の配列とは 96.5~97.4 %の相同性、また、クレード III の配列とは 95.9~96.5 %の相同性を示した。また、同蜂場で検出されたクレード II の遺伝子配列は、互いに 99.6 %の相同性を示し、クレード III の配列と 96.5 %の相同性を示した。以上のように、3 つのクレード間では相同性に差が認められた。IAPV 陽性の 7 蜂群について、各蜂群内の 2 個体から得られた IAPV 遺伝子配列を比較したところ、99.1~100 %の相同性を示した (表 3-5)。

3. 6. IAPV の各クレードに属する遺伝子の陽性率及び養蜂場内の分布

本蜂場では、IAPV 陽性の 11 群のうち、7 群 (64 %) からクレード I の IAPV が検出され、2 群 (18 %) からクレード II、また、1 群 (9 %) からクレード III が検出された。IAPV 陽性蜂群のうち、No.49 群は一部の配列しか決定できなかった。地点 A, B 及び E にはクレード I が分布し、地点 C 及び F にはクレード II、また、地点 D にはクレード III が分布した (図 3-5 及び表 3-6)。クレード I が検出された 3 地点 (A, B 及び E) やクレード II が検出された 2 地点 (C 及び F) はそれぞれ養蜂場内に離れて位置した (図 3-5)。また、いずれの地点についても、各地点から最も近い地点では IAPV の異なるクレードが検出された。

4. 考察

一養蜂場における蜂病ウイルスの浸潤調査で、LSV や BQCV は、蜂群間で広く分布する一方、IAPV は限局的に分布することが示された。BQCV 陽性群の大部分で個体レベルでの高い陽性率が認められたのに対し、IAPV 陽性群及び LSV 陽性群では個体レベルでの陽性率は低い傾向が認められた。蜂群内における BQCV 陽性率が高いこと、また、IAPV 陽性率が低いことは第一章でも観察されている。第一章で岐阜県南西部には、IAPV よりも BQCV がより優勢に分布することが明らかになっており、蜂群内や養蜂場での蜂病ウイルスの流行は地域の感染状況に影響する可能性がある。これに対し、LSV では調査地域での蜂場レベルでの陽性率（第一章）や陽性群での個体レベルでの陽性率はいずれも BQCV より低い傾向が認められたが、養蜂場内での蜂群レベルでの陽性率は BQCV より高い傾向が認められた。LSV については、伝播様式や発症ステージ、臨床症状について今後検討する必要がある。BQCV, LSV 及び IAPV の陽性率について同様の傾向が見られるのか、他の養蜂場でも調査を行う必要があるが、蜂病ウイルスの地域における蔓延を防ぐために、養蜂場内での蜂病ウイルス感染の制御は各ウイルスの伝播の特徴に応じて行うことが重要であることが示唆された。

養蜂では「迷い込み」が蜂群間における病原体の水平伝播を起こす可能性が指摘されている [10, 14, 36]。「迷い込み」は養蜂場に設置された巣が視覚的に類似する場合や互いに近接する場合に起こりやすいとされている [33]。本蜂場では近接する蜂群間で同じ遺伝子型の IAPV が認められたことから「迷い込み」が起こっている可能性が示唆された。本蜂場では、巣箱の形や色は酷似していたことから、巣門の距離と向きについて検討した。その結果、統計学的な有意差は認められなかったが、いずれのウイルスの場合も陽性蜂群との巣門距離が 1.18 m 未満の方が 1.18 m 以上 1.45 m 以下の群より陽性率が常に高かった。一方、巣門角度差は、特定の角度範囲であると常に陽性率が高くなるという傾向は見られなかったことから、巣門の方向よりも巣門間の距離の方がウイ

ルスの伝播により関連している可能性がある。本研究から「迷い込み」による蜂病ウイルスの伝播を防止する上で、巣箱間の距離を離すことが感染対策の一つとして考えられた。

IAPV は養蜂場の複数の蜂群で感染が確認されたが、遺伝子解析の結果、地点 A における複数の蜂群の感染は同一クレード（クレード I）による局所感染が示唆された。蜂病ウイルスの伝播には、感染に必要なウイルス量、感染後のウイルス量の変動や感染個体の症状が大きく関係する。Amiri らの実験では、ウイルス液を接種した胸背部を除く部位について成虫 5 個体をプールして IAPV ウイルス量を測定し、RNA1 ng あたり 2.78×10^2 コピーの IAPV では成虫間の伝播を引き起こさなかったが、 7.62×10^6 コピーの IAPV では成虫間での伝播を引き起こすことを報告した [4]。また、 1×10^{12} コピー相当の IAPV を血液の流れる血体腔内に投与された個体で検出されるウイルス量は、接種 36 時間目に一過性に高くなることが報告されている [24]。BQCV は 1×10^8 コピー相当のウイルスを血体腔内に投与することにより 10 日以内に 61 % の成虫が死亡したのに対し [2]、IAPV では同量のウイルスを胸部に塗布することにより 10 日以内に約 50~90 % の成虫が死亡することが報告されている [11]。さらに、Maori らは 1 g 中に 1 μ g の IAPV を含む餌を与えたミツバチが投与 3 日後から飛行能力が低下し、7 日後以降には飛行だけでなく、体を動かすこともできなくなることを報告している [50]。先行研究で用いられている BQCV や IAPV のウイルス量や投与方法は研究ごとに異なっており、また、各研究で用いられたウイルス株の毒性についても情報は無いが、これらの研究からミツバチにおける IAPV 感染は致死性が高く、機能障害を起こすだけでなく、ウイルスの増殖期間も短いため、蜂群間感染を起こしにくいと考えられる。IAPV 陽性蜂群では、異なる個体から検出された IAPV 遺伝子配列の相同性は高かったことから、IAPV が蜂群内で伝播されたことが示唆された。地点 A の局所感染は、蜂群内での陽性率の高い蜂群 (No.5 群) が含まれていたことによって、偶発的に引き起こされた可能性がある。今後、継続的な調査により、蜂病ウイルスの病態を考慮した衛生対策を構築する必要がある。

調査蜂場では、隣接蜂群の有無に関わらず蜂群からウイルスが検出された。蜂群間伝播に「盗蜂」が関与することが指摘されている [10]が、養蜂業では養蜂家による「合同」も蜂群間の伝播を引き起こしうる。また、養蜂場外から各蜂群に同じウイルスが持ち込まれた可能性もある（第二章）。以上より、本蜂場では蜂群のウイルス感染がミツバチの「迷い込み」以外の要因でも引き起こされていることが示された。

本章では、LSV, BQCV 及び IAPV の蜂群間伝播には、巣箱間の距離が影響することが示唆された。調査蜂場では LSV や BQCV が広く分布し、その要因として隣接した蜂群でのウイルス伝播が示唆された。これらのウイルスの蜂群間伝播を防ぐためには、蜂群間の距離を広くすることで、ミツバチの「迷い込み」が発生しない飼養管理が必要である。また、調査蜂場では「迷い込み」以外の要因でも蜂群の感染が起きていることが示唆された。養蜂で行われる「合同」も、蜂病ウイルス陽性農場ではウイルス伝播を助長するため不用意に実施しないことが望まれる。

表 3-1 LSV 陽性蜂群と隣接蜂群との位置関係と隣接蜂群での LSV 検出状況

LSV 陽性蜂群と隣接蜂群*との位置関係		LSV 陽性蜂群の 隣接蜂群数	隣接蜂群での LSV 検出状況	
			陽性	陰性
巢門距離	1.18 m 未満	15	8 (53%)	7 (47%)
	1.18 m 以上 1.45 m 以下	19	8 (42%)	11 (58%)
巢門角度差	99 度未満	19	9 (47%)	10 (53%)
	99 度以上 180 度以下	15	7 (47%)	8 (53%)

*隣接蜂群, 陽性蜂群の巢門中心部の 1.45 m 以内に巢門中心部が位置する蜂群

表 3-2 BQCV 陽性蜂群と隣接蜂群との位置関係と隣接蜂群での BQCV 検出状況

BQCV 陽性蜂群と隣接蜂群*との位置関係	BQCV 陽性蜂群の 隣接蜂群数	隣接蜂群での BQCV 検出状況	
		陽性	陰性
巣門距離	1.18 m 未満	9 (64%)	5 (36%)
	1.18 m 以上 1.45 m 以下	8 (42%)	11 (58%)
巣門角度差	99 度未満	7 (50%)	7 (50%)
	99 度以上 180 度以下	10 (53%)	9 (47%)

*隣接蜂群, 陽性蜂群の巣門中心部の 1.45 m 以内に巣門中心部が位置する蜂群

表 3-3 IAPV 陽性蜂群と隣接蜂群との位置関係と隣接蜂群での IAPV 検出状況

IAPV 陽性蜂群と隣接蜂群*との位置関係		IAPV 陽性蜂群の 隣接蜂群数	隣接蜂群での IAPV 検出状況	
			陽性	陰性
巣門距離	1.18 m 未満	7	2 (29%)	5 (71%)
	1.18 m 以上 1.45 m 以下	6	0 (0%)	6 (100%)
巣門角度差	99 度未満	7	1 (14%)	6 (86%)
	99 度以上 180 度以下	6	1 (17%)	5 (83%)

*隣接蜂群, 陽性蜂群の巣門中心部の 1.45 m 以内に巣門中心部が位置する蜂群

表 3-4 LSV, BQCV 及び IAPV 陽性群の 5 個体の働き蜂における
ウイルス保有状況

5 個体の働き 蜂における 陽性個体数	LSV 陽性蜂群 (n=8)	BQCV 陽性蜂群 (n=8)	IAPV 陽性蜂群 (n=11)
5	0	3	1
4	0	3	2
3	3	1	2
2	3	1	5
1	2	0	1

表 3-5 各蜂群の成虫 2 個体から検出された IAPV 遺伝子塩基配列の相同性

蜂群名	成虫 2 個体から検出された IAPV 遺伝子塩基配列の相同性 (%)
No.5 群	99.8
No.11 群	100
No.31 群	99.1
No.42 群	100
No.48 群	100
No.56 群	99.8
No.64 群	100

表 3-6 イスラエル急性麻痺ウイルス (IAPV) 陽性群の働き蜂 5 個体における IAPV の保有状況

働き蜂 5 個体 における IAPV 陽性個体数	観察された 蜂群数 (n=11)	IAPV が検出された地点及び蜂群						
		地点 A	地点 B	地点 C	地点 D	地点 E	地点 F	地点 G
5	1	No.5*						
4	2	No.42*						No.49§
3	2	No.48*				No.64*		
2	5	No.45*	No.11* No.31*		No.56‡		No.1†	
1	1			No.13†				

*, IAPV のクレード I が検出された蜂群

†, IAPV のクレード II が検出された蜂群

‡, IAPV のクレード III が検出された蜂群

§, IAPV が検出されたがクレードが不明の蜂群



図 3-1 調査蜂場における蜂群の配置
数字は蜂群名、矢印は各蜂群の巢門の方向を示す

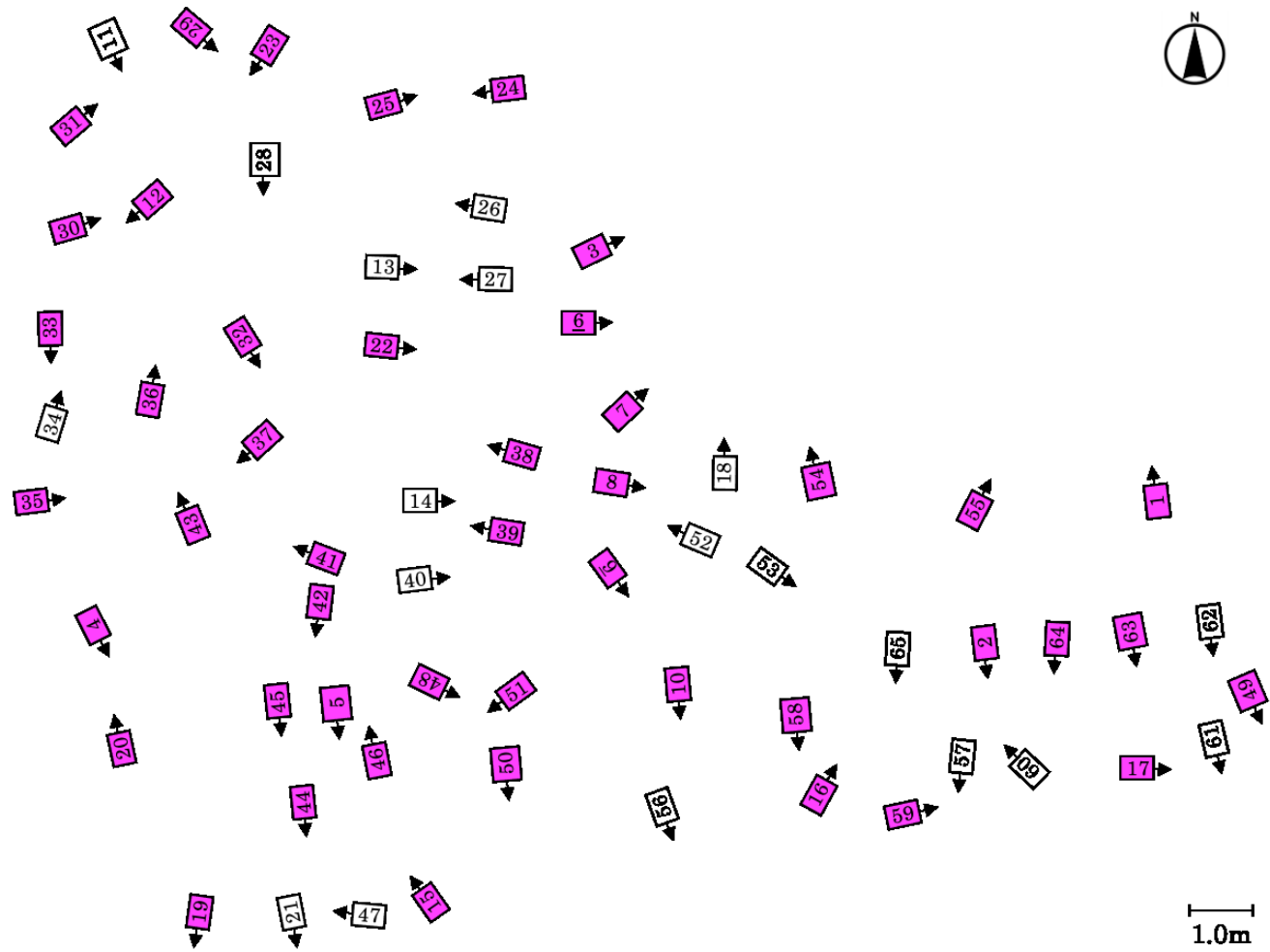


図 3-2 調査蜂場におけるレイクシナイウイルス (LSV) 陽性蜂群の配置
 数字は蜂群名, 矢印は各蜂群の巣門の方向を示す。また, 色の付いた巣箱は LSV 陽性蜂群を表す。



図 3-4 調査蜂場におけるサックブルードウイルス (SBV) 陽性蜂群の配置
 数字は蜂群名, 矢印は各蜂群の巣門の方向を示す。また, 色の付いた巣箱は SBV 陽性蜂群を表す。

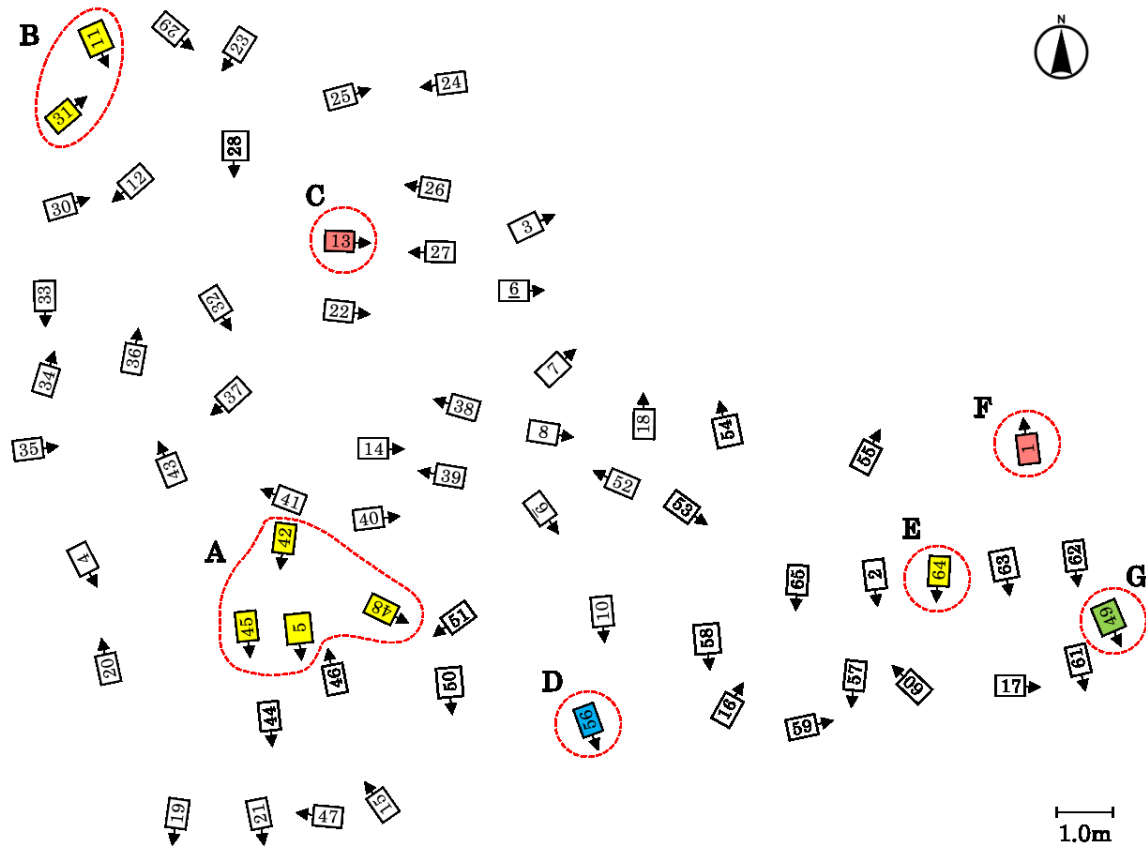


図 3-5 調査蜂場におけるイスラエル急性麻痺ウイルス (IAPV) 陽性蜂群の配置

数字は蜂群名、矢印は各蜂群の巣門の方向を示す。色の付いた巣箱は IAPV 陽性蜂群を表し、黄色はクレード I、ピンク色はクレード II、青色はクレード III、緑色はクレード不明を表す。また、アルファベットは各地点名を示し、赤色破線で囲まれた蜂群は各地点に属する蜂群を示す。

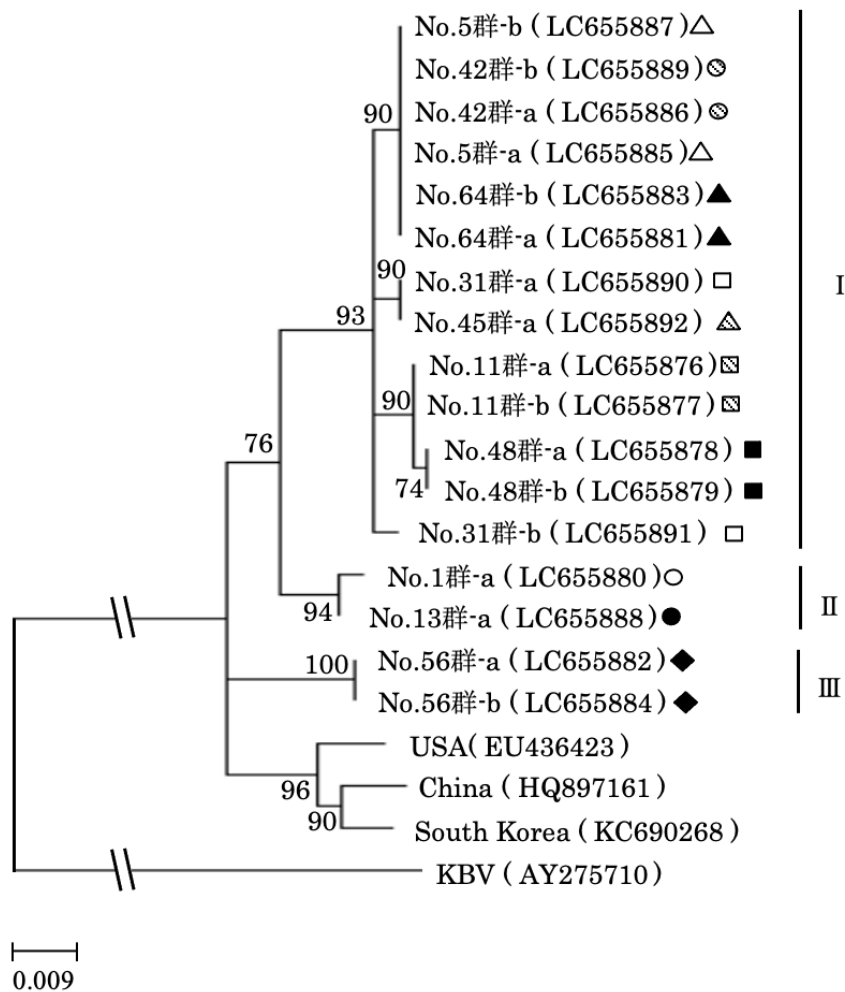


図 3-6 調査蜂場で得られたイスラエル急性麻痺ウイルス (IAPV) の 5'UTR-Helicase 遺伝子領域塩基配列 (540 bp) に基づく系統樹

調査蜂場で得られた遺伝子配列は検出された蜂群名、個体名及び蜂群を表す記号とともに示した (○: No.1 群, △: No.5 群, ☒: No.11 群, ●: No.13 群, □: No.31 群, ⊗: No.42 群, △: No.45 群, ■: No.48 群, ◆: No.56 群, ▲: No.64 群)。括弧内はアクセッション番号, 図中の数値はブートストラップ値を示し (1,000 回演算, 百分率), ブートストラップ値は 50 以上のものを示す。スケールバーは 1 塩基あたりの塩基置換率を示す。また, 近年のカシミール蜂ウイルス (KBV) を外群として示した。

結論

飼育バチは蜂蜜などの生産だけでなく、花粉運搬者としても働き、日本の食料生産において重要な役割を担っている。そのため、飼育バチの個体数減少や死亡を引き起こしうる蜂病ウイルスは、日本の養蜂業にとって今後大きな問題になると考えられる。蜂病ウイルスは、代用花粉などの養蜂生産資材や女王蜂の輸入により国外から持ち込まれ（表Ⅱ-①）、蜂群の転飼や売買により国内の離れた地域間で伝播しうる（表Ⅱ-②）。同じ地域の養蜂場間（表Ⅱ-③）や養蜂場内の蜂群間（表Ⅱ-④）、また、蜂群内（表Ⅱ-⑤）において、飼育バチや野生節足動物、養蜂家を介し伝播する可能性がある。このように蜂病ウイルスの伝播様式は複雑で多岐に渡っているため、その予防対策は日本では十分に検討されてこなかった。そこで、本研究では蜂病ウイルスを制御するために重点を置くべきポイントを明らかにし、養蜂家が利用できる予防対策を提案するため、日本の養蜂業の中継地点である岐阜県南西部（西濃・揖斐地域及び岐阜地域）で調査を行い、以下の成果を得た。また、本研究で明らかとなった蜂病ウイルスの予防対策を行うべきポイントを図Ⅱに示した。

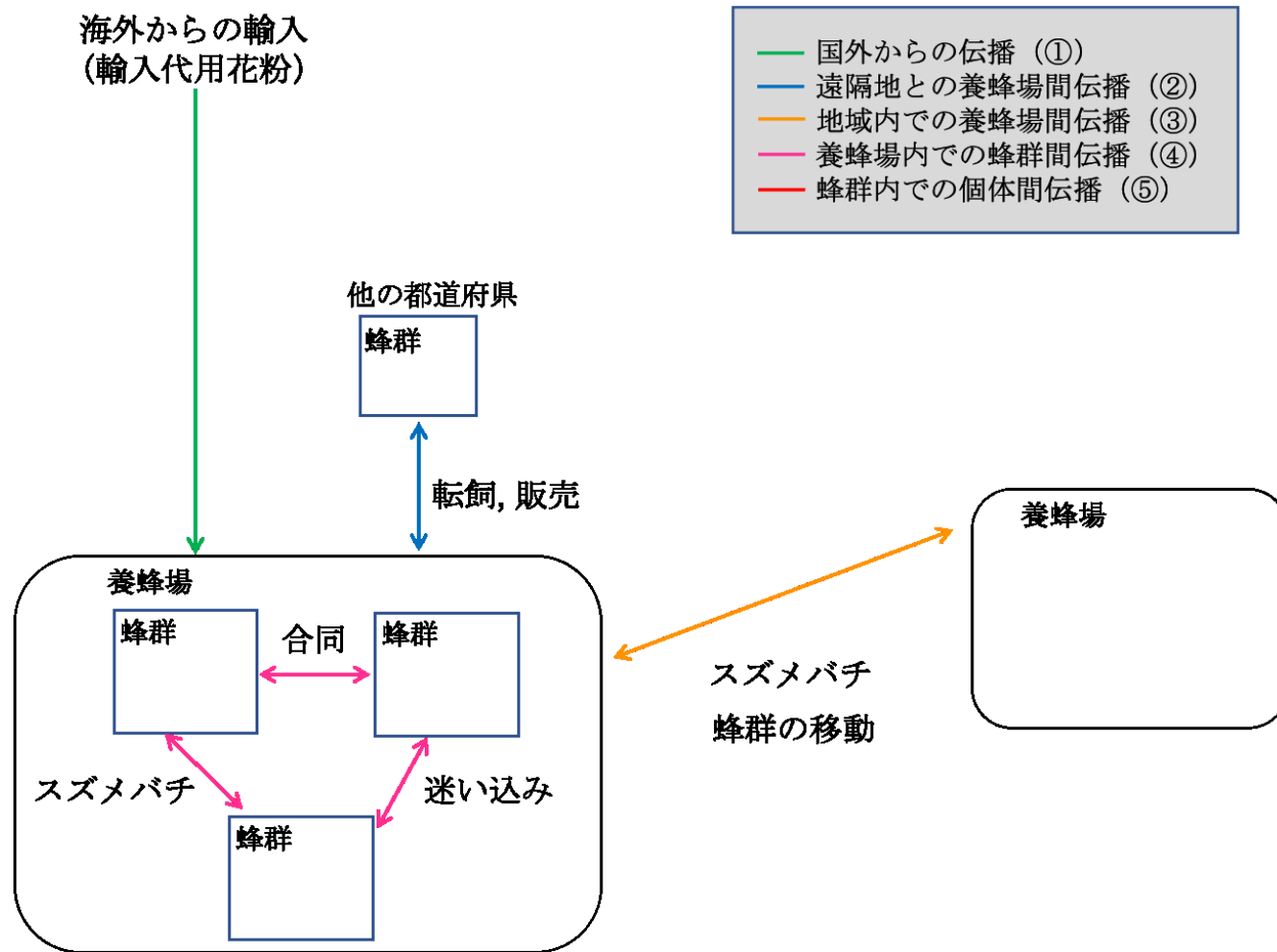
1. 岐阜県南西部の飼育バチには BQCV, LSV, IAPV, DWV 及び SBV の 5 種類の蜂病ウイルスが分布し、BQCV の陽性率が高いことが明らかとなった。転飼蜂群や養蜂業者から導入する蜂群は、養蜂場に新たな蜂病ウイルスを持ち込む可能性があることから、養蜂場の既存の蜂群と同じ場所で飼育しない、もしくは、養蜂場内で既存の蜂群と離して飼育することが必要である（表Ⅱ）。
2. 継続的に日本に輸入されているスロベニア産あるいはオーストラリア産の女王蜂は岐阜県での BQCV, DWV 及び LSV の分布に関与しないことが示唆された。岐阜県で検出された BQCV, DWV 及び LSV は、中国あるいは韓国

のウイルスとの関連が認められ、輸入代用花粉の衛生対策の必要性が示唆された。輸入代用花粉の対策としては、滅菌済みの天然花粉を用いた製品や天然花粉に由来しない製品を利用することが必要である。

3. LSV が日本の飼育バチに分布することが初めて明らかになった。海外での蜂病ウイルスの検出状況に注視し、国内の蜂病ウイルスの浸潤を継続的に調査する重要性が示された。
4. スズメバチ類は蜂病ウイルスを高率に保有し、蜂病ウイルスの養蜂場内での維持や養蜂場内や養蜂場間の伝播に関与する可能性が示唆された。本研究は、養蜂場でのスズメバチ類の駆除や防除がミツバチの外敵対策としてだけでなく、蜂病ウイルスの感染対策においても重要であることを示した。
5. バッタ類は蜂病ウイルスを保有したが、その陽性率は低かったことから、養蜂場内の蜂病ウイルスの保持や伝播に関与する程度は低いと考えられた。したがって、バッタについての予防対策の優先度は低い。
6. BQCV, IAPV 及び LSV の蜂群間伝播には、蜂群の巣門の方向よりも巣門間の距離が影響することが示唆された。養蜂場内の蜂病ウイルス伝播を予防するためには、蜂群間の距離を可能な限り十分離して設置することが必要である。

本研究により、岐阜県南西部の飼育セイヨウミツバチにおける蜂病ウイルスの感染状況を明らかにするとともに、蜂病ウイルスの制御のためには、養蜂場内での蜂群間伝播の防止に特に重点を置くべきであること、さらに、調査地域は岐阜県の一部と限られてはいるが、疫学的特徴に基づいて蜂病ウイルスの予防対策方針を示した。家畜保健衛生所では蜂病ウイルスの検査体制を整備し、国内の浸潤状況の調査を行うこと、また、蜂群の分蜂、合同、導入前に蜂群の蜂病ウイルス検査を行うことが必要である。本研究で得られた蜂病ウイルスについ

ての知見は、飼育バチの健康を守るとともに、日本の養蜂業の発展に貢献するものと考えられる。



図Ⅱ 本研究で明らかとなった蜂病ウイルス予防対策を行うべきポイント

表Ⅱ 蜂病ウイルスの各伝播経路における危害因子とその予防対策

伝播経路の段階	危害因子	伝播の要因となる頻度	予防対策	
			日本における既報の対策	本研究により作成した対策
国外からの伝播 (①)	輸入女王蜂	低	—	・ 予防対策の優先度は低い。
	輸入代用花粉	中あるいは高	—	・ 滅菌済みの天然花粉を用いた製品や天然花粉に由来しない製品を利用する。
遠隔地との養蜂場間伝播 (②)	転飼や販売による蜂群の移動	中あるいは高	—	・ 養蜂場の既存の蜂群と同じ場所で飼育しない。 ・ 養蜂場の既存の蜂群と同じ場所で飼育する場合は、既存の蜂群との距離を離して配置する。
地域内での養蜂場間伝播 (③)	肉食節足動物 (スズメバチ)	高	・ 養蜂場内での粘着トラップ ・ スズメバチ捕獲器による防除 ・ 養蜂場周辺にあるスズメバチの巣の駆除 ・ スズメバチ防除器による巣への侵入防止	・ 蜂群内のスズメバチの死体の除去
	野生送粉者 (マルハナバチ)	不明*	—	・ 対策不可能
	養蜂家による蜂群移動	中あるいは高	—	・ 他蜂場から蜂群を移動する場合は、既存の蜂群との距離を離して配置する。

*不明，本研究では取り扱っていない。

表Ⅱ 蜂病ウイルスの各伝播経路における危害因子とその予防対策（続き）

伝播経路の段階	危害因子	伝播の要因となる頻度	予防対策	
			日本における既報の対策	本研究により作成した対策
養蜂場内での蜂群間伝播 (④)	成虫の他蜂群への迷い込み	高	－	・養蜂場内の蜂群間の距離を広げる。
	肉食節足動物 (スズメバチ)	高	・養蜂場内での粘着トラップ ・スズメバチ捕獲器による防除 ・養蜂場周辺にあるスズメバチの巣の駆除 ・スズメバチ防除器による巣への侵入防止	・群内のスズメバチの死体の除去
	草食節足動物 (バッタ)	低	－	・予防対策の優先度は低い。
	野生送粉者 (マルハナバチ)	不明*	－	・対策不可能
	養蜂家による巣の合同	不明	－	・蜂病ウイルス陽性農場ではウイルス伝播を助長するため不用意に実施しないことが望まれる。
	養蜂家による巣の分蜂	不明	－	・蜂病ウイルス陽性農場ではウイルス伝播を助長するため不用意に実施しないことが望まれる。
蜂群内での個体間伝播 (⑤)	ミツバチヘギイタダニによる飼育バチ成虫や幼虫の吸血	不明	・養蜂用殺ダニ剤による駆除 ・植物抽出物による忌避 ・粉糖法や加温法によりダニを落とす。 ・女王蜂を隔離し、産卵を止める。 ・オス蜂の幼虫でダニを誘引し、駆除	・既報の対策を行う。
	ハチノスツツリガによる飼育バチ幼虫の捕食や巣の食害	不明	・高温 (46℃以上, 80分)による駆除 ・巣板の冷凍処理 (-6.7℃, 270分あるいは-17.9℃, 120分) による駆除 ・炭酸ガスによる駆除 ・スムシ駆除剤 (<i>Bacillus thuringiensis</i>)による駆除	・既報の対策を行う。

*不明, 本研究では取り扱っていない。

謝辞

本研究において、終始、数多くのご指導、ご助言、激励を賜りました岐阜大学大学院連合獣医学研究科 浅井鉄夫教授に心より深謝いたします。また、研究の遂行に際して、貴重なご指導、ご助言を頂きました麻布大学伝染病学研究室 長井誠教授に深謝いたします。

本論文の作成にあたり、貴重なご助言を賜りました帯広畜産大学原虫病研究センター 鈴木宏志教授、岩手大学獣医微生物学研究室 村上賢二教授、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 動物感染症研究領域 高松大輔細菌グループ長、東京農工大学国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷哲也教授に深謝いたします。

大学院進学の機会を与えて頂きました岐阜県畜産課の森敦元課長、岐阜県中央家畜保健衛生所の大平雅史元所長に厚く御礼申し上げます。常に、本研究への多大なるご理解とご支援を賜りました岐阜県家畜防疫対策課の高井尚治課長、また、岐阜県中央家畜保健衛生所の山下博幸元所長、中井麻生前所長、溝口博史所長をはじめとする岐阜県中央家畜保健衛生所の皆様に深謝いたします。

また、私の研究生生活を支えてくださいました岐阜大学連合獣医学研究室の皆様、私の家族に厚く深謝いたします。

最後に、本研究の遂行にあたり、多大なるご理解とご協力をいただき、研究を続けるモチベーションを与えていただいた故小森和廣氏をはじめとする岐阜県南西部地域の養蜂家の方々に心からの謝意を記します。

引用文献

1. Ai, H., Yan, X. and Han, R. 2012. Occurrence and prevalence of seven bee viruses in *Apis mellifera* and *Apis cerana* apiaries in China. *J. Invertebr. Pathol.* **109**: 160–164.
2. Al Naggar, Y. and Paxton, R.J. 2020. Mode of transmission determines the virulence of black queen cell virus in adult honey bees, posing a future threat to bees and apiculture. *Viruses.* **12**: 535.
3. Alger, S.A., Burnham, P.A., Boncristiani, H.F. and Brody, A.K. 2019. RNA virus spillover from managed honeybees (*Apis mellifera*) to wild bumblebees (*Bombus* spp.). *PLoS ONE.* **14**: e0217822.
4. Amiri, E., Seddon, G., Zuluaga Smith, W., Strand, M.K., Tarpy, D.R. and Rueppell, O. 2019. Israeli acute paralysis virus: honey bee queen-worker interaction and potential virus transmission pathways. *Insects.* **10**: 9.
5. Bailey, L., Ball, B.V. and Perry, J.N. 1983. Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Ann. Appl. Biol.* **103**: 13–20.
6. Bakonyi, T., Grabensteiner, E., Kolodziejek, J., Rusvai, M., Topolska, G., Ritter, W. and Nowotny, N. 2002. Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6446–6450.
7. Beaurepaire, A., Piot, N., Doublet, V., Antuñez, K., Campbell, E., Chantawannakul, P., Chejanovsky, N., Gajda, A., Heerman, M., Panziera, D., Smagghe, G., Yañez, O., de Miranda, J.R. and Dalmon, A. 2020. Diversity and global distribution of viruses of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Insects.* **11**: 239.
8. Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M. and Davison, S. 2001. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2384–2387.
9. Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H. and Nowotny, N. 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 2414–2420.

10. Betti, M. and Shaw, K. 2021. A multi-scale model of disease transfer in honey bee colonies. *Insects*. **12**: 700.
11. Bhatia, S., Baral, S.S., Vega Melendez, C., Amiri, E. and Rueppell, O. 2021. Comparing survival of Israeli acute paralysis virus infection among stocks of U.S. honey bees. *Insects*. **12**: 60.
12. Bigot, D., Dalmon, A., Roy, B., Hou, C., Germain, M., Romary, M., Deng, S., Diao, Q., Weinert, L.A., Cook, J.M., Herniou, E.A. and Gayral, P. 2017. The discovery of Halictivirus resolves the *Sinaivirus* phylogeny. *J. Gen. Virol.* **98**: 2864–2875.
13. Blanchard, P., Ribière, M., Celle, O., Lallemand, P., Schurr, F., Olivier, V., Iscache, A.L. and Faucon, J.P. 2007. Evaluation of a real-time two-step RT-PCR assay for quantitation of chronic bee paralysis virus (CBPV) genome in experimentally-infected bee tissues and in life stages of a symptomatic colony. *J. Virol. Methods*. **141**: 7–13.
14. Brosi, B.J., Delaplane, K.S., Boots, M. and de Roode, J.C. 2017. Ecological and evolutionary approaches to managing honeybee disease. *Nat. Ecol. Evol.* **1**: 1250–1262.
15. Celle, O., Blanchard, P., Olivier, V., Schurr, F., Cougoule, N., Faucon, J.-P. and Ribière, M. 2008. Detection of chronic bee paralysis virus (CBPV) genome and its replicative RNA form in various hosts and possible ways of spread. *Virus Res.* **133**: 280–284.
16. Chen, G., Wu, Y., Deng, J., Wen, Z., Wang, S., Chen, Y., Hu, F. and Zheng, H. 2021. Seasonal variation of viral infections between the eastern honey bee (*Apis cerana*) and the western honey bee (*Apis mellifera*). *MicrobiologyOpen*. **10**: e1162.
17. Chen, Y.P., Pettis, J.S., Collins, A. and Feldlaufer, M.F. 2006. Prevalence and transmission of honeybee viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 606–611.
18. Choe, S.E., Nguyen, L.T., Noh, J.H., Koh, H.B., Jean, Y.H., Kweon, C.H. and Kang, S.W. 2012. Prevalence and distribution of six bee viruses in

- Korean *Apis cerana* populations. *J. Invertebr. Pathol.* **109**: 330–333.
19. D'Alvise, P., Seeburger, V., Gihring, K., Kieboom, M. and Hasselmann, M. 2019. Seasonal dynamics and co-occurrence patterns of honey bee pathogens revealed by high-throughput RT-qPCR analysis. *Ecol. Evol.* **9**: 10241–10252.
 20. Dainat, B., Evans, J.D., Chen, Y.P., Gauthier, L. and Neumann, P. 2012. Dead or alive: deformed wing virus and *Varroa destructor* reduce the life span of winter honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 981–987.
 21. Dalmon, A., Peruzzi, M., Le Conte, Y., Alaux, C. and Pioz, M. 2019. Temperature-driven changes in viral loads in the honey bee *Apis mellifera*. *J. Invertebr. Pathol.* **160**: 87–94.
 22. de Miranda, J.R., Cordoni, G. and Budge, G. 2010. The acute bee paralysis virus-Kashmir bee virus-Israeli acute paralysis virus complex. *J. Invertebr. Pathol.* **103** Suppl. 1: S30–S47.
 23. de Sousa Pereira, K., Meeus, I. and Smagghe, G. 2019. Honey bee-collected pollen is a potential source of *Ascospaera apis* infection in managed bumble bees. *Sci. Rep.* **9**: 4241.
 24. Deng, Y., Yang, S., Zhao, H., Diao, Q. and Hou, C. 2021. IAPV-induced paralytic symptoms associated with tachypnea via impaired tracheal system function. *Int. J. Mol. Sci.* **22**:10078.
 25. Di Prisco, G., Pennacchio, F., Caprio, E., Boncristiani Jr, H.F., Evans, J.D. and Chen, Y. 2011. *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *J. Gen. Virol.* **92**: 151–155.
 26. 土畑重人, 辻和希. 2013. 社会性昆虫における分業システムのモデリング, 計測と制御. **52**: 183–188.
 27. 独立行政法人農研機構畜産草地研究所. 2009. 蜂病の全国浸潤調査. ミツバチ不足に関する調査研究報告書. (<http://www.beelineinc.net/sakujo02.pdf>) . (参照 2021-11-18) .
 28. 動物検疫所. 2015. 動物検疫所動物検疫年報. (<https://www.maff.go.jp/>

- aqs/tokei/attach/pdf/toukeinen-3.pdf) . (参照 2021-11-15) .
29. 動物検疫所. 2016. 動物検疫所動物検疫年報. (<https://www.maff.go.jp/aqs/tokei/attach/pdf/toukeinen-9.pdf>) . (参照 2021-11-15) .
 30. 動物検疫所. 2017. 動物検疫所動物検疫年報. (<https://www.maff.go.jp/aqs/tokei/attach/pdf/toukeinen-21.pdf>) . (参照 2021-11-15) .
 31. 動物検疫所. 2018. 動物検疫所動物検疫年報. (<https://www.maff.go.jp/aqs/tokei/attach/pdf/toukeinen-26.pdf>) . (参照 2021-11-15) .
 32. 動物検疫所. 2019. 動物検疫所動物検疫年報. (<https://www.maff.go.jp/aqs/tokei/attach/pdf/toukeinen-34.pdf>) . (参照 2021-11-15) .
 33. Dynes, T.L., Berry, J.A., Delaplane, K.S., Brosi, B.J. and de Roode, J.C. 2019. Reduced density and visually complex apiaries reduce parasite load and promote honey production and overwintering survival in honey bees. *PLoS ONE*. **14**: e0216286.
 34. Evans, J.D. and Spivak, M. 2010. Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J. Invertebr. Pathol.* **103** Suppl 1: S62–S72.
 35. Francis, R.M., Nielsen, S.L. and Kryger, P. 2013. Varroa-virus interaction in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*. **8**: e57540.
 36. Fries, I. and Camazine, S. 2001. Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology. *Apidologie*. **32**: 199–214.
 37. Gregorc, A. and Bakonyi, T. 2012. Viral infections in queen bees (*Apis mellifera carnica*) from rearing apiaries. *Acta Vet. Brno*. **81**: 15–19.
 38. 細野翔平. 2017. セイヨウミツバチによるコロニー防衛戦術 熱蜂球による外敵排除の行動学的解析.
 39. 一般社団法人日本養蜂協会. 2016. 巣板の保管管理 (防虫) . pp. 17–20. 養蜂技術指導手引書Ⅲ 養蜂における衛生管理 消毒技術. (<http://www.beekeeping.or.jp/wordpress/wp-content/uploads/2021/>

- 03/eiseitext_A4.pdf) . (参照 2021-11-18) .
40. 一般社団法人日本養蜂協会. 2019. 蜜蜂に対するウイルス感染等実態調査. pp. 14–22. 蜜蜂に対するウイルス感染等実態調査事業報告書. (<http://www.beekeeping.or.jp/wordpress/wp-content/uploads/2019/04/H30-JRAhokoku.pdf>) . (参照 2021-11-18) .
41. 一般社団法人日本養蜂協会. 2020. 駆除法. pp. 26–29. 養蜂技術指導手引書V 養蜂における衛生管理 ダニ防除技術. (http://www.beekeeping.or.jp/wordpress/wp-content/uploads/2021/03/danitext_A4.pdf.) . (参照 2021-11-18) .
42. 一般社団法人日本養蜂協会. 2021. 蜜蜂のダニ寄生とウイルス感染率の実態調査報告. pp. 16–33. 蜜蜂のダニ寄生とウイルス感染率の実態調査報告書. (<http://www.beekeeping.or.jp/wordpress/wp-content/uploads/2021/04/R3-JRAhokoku.pdf>) . (参照 2021-11-18)
43. Intergovernmental Science Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services (IPBES). 2016. The Assessment Report on Pollinators, Pollination and Food Production.
44. International Epizootic Office (OIE) . 2013. APIDAE. Terrestrial Animal Health Code. (https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/index.php?id=169&L=1&htmlfile=titre_1.9.htm) . (accessed 2021-11-18) .
45. Kojima, Y., Toki, T., Morimoto, T., Yoshiyama, M., Kimura, K. and Kadowaki, T. 2011. Infestation of Japanese native honey bees by tracheal mite and virus from non-native European honey bees in Japan. *Microb. Ecol.* **62**: 895–906.
46. Konuma, A. and Okubo, S. 2015. Valuating pollination services for agriculture in Japan. *Jpn. J. Ecol.* **65**: 217–226.
47. Kulhanek, K., Steinhauer, N., Rennich, K., Caron, D.M., Sagili, R.R., Pettis, J.S., Ellis, J.D., Wilson, M.E., Wilkes, J.T., Tarpy, D.R., Rose, R., Lee, K., Rangel, J. and vanEngelsdorp, D. 2017. A national survey of

- managed honey bee 2015–2016 annual colony losses in the USA. *J. Apic. Res.* **56**: 328-340.
48. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**: 1547–1549.
49. Levitt, A. L., Singh, R., Cox-Foster, D.L., Rajotte, E., Hoover, K., Ostiguy, N. and Holmes, E.C. 2013. Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods. *Virus Res.* **176**: 232–240.
50. Maori, E., Lavi, S., Mozes-Koch, R., Gantman, Y., Peretz, Y., Edelbaum, O., Tanne, E. and Sela, I. 2007. Isolation and characterization of Israeli acute paralysis virus, a dicistrovirus affecting honeybees in Israel: evidence for diversity due to intra- and inter-species recombination. *J. Gen. Virol.* **88**: 3428–3438.
51. Matsuura, M. and Yamane, S. 1990. The wasp as enemy of the honeybee. pp. 261–263. *In*: Biology of the Vespine Wasps, 1st ed. Springer-verlag. Berlin.
52. McMenamin, A.J. and Genersch, E. 2015. Honey bee colony losses and associated viruses. *Curr. Opin. Insect Sci.* **8**: 121–129.
53. ミツバチ協議会. 2011. 給餌. pp. 21–22. 養蜂マニュアル.
(<http://www.beekeeping.or.jp/wordpress/wp-content/uploads/2020/03/youhouka-1shuusei.pdf>) . (参照 2021-11-18) .
54. ミツバチ協議会. 2011. ミツバチにおける病気の種類と管理方法. pp. 51–52. 養蜂マニュアル. (<http://www.beekeeping.or.jp/wordpress/wp-content/uploads/2020/03/youhouka-1shuusei.pdf>) . (参照 2021-11-18) .
55. ミツバチ協議会. 2012. 養蜂歴. pp. 10. 養蜂マニュアルⅡ.
(<http://www.beekeeping.or.jp/wordpress/wp-content/themes/beekeeping/images/council/H23youhouka-2.pdf>) . (参照 2021-11-18) .

56. Mookhploy, W., Kimura, K., Disayathanoowat, T., Yoshiyama, M., Hondo, K. and Chantawannakul, P. 2015. Capsid gene divergence of black queen cell virus isolates in Thailand and Japan honey bee species. *J. Econ. Entomol.* **108**: 1460–1464.
57. Morimoto, T., Kojima, Y., Yoshiyama, M., Kimura, K., Yang, B. and Kadowaki, T. 2012. Molecular identification of chronic bee paralysis virus infection in *Apis mellifera* colonies in Japan. *Viruses.* **4**: 1093–1103.
58. Murray, E.A., Burand, J., Trikoz, N., Schnabel, J., Grab, H. and Danforth, B.N. 2019. Viral transmission in honey bees and native bees, supported by a global black queen cell virus phylogeny. *Environ. Microbiol.* **21**: 972–983.
59. Mutinelli, F. 2011. The spread of pathogens through trade in honey bees and their products (including queen bees and semen): overview and recent developments. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **30**: 257–271.
60. Nielsen, S. L., Nicolaisen, M. and Kryger, P. 2008. Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie.* **39**: 310–314.
61. 農林水産省. 2021. 養蜂をめぐる情勢.
(<https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/sonota/attach/pdf/bee-28.pdf>) . (参照 2021-11-18) .
62. Odoi, J.O., Yamamoto, M., Sugiyama, M. and Asai, T. 2021. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolated from arthropods in Gifu City, Japan. *Microbiol. Immunol.* **65**: 136–141.
63. Palacios, G., Hui, J., Quan, P.L., Kalkstein, A., Honkavuori, K.S., Bussetti, A.V., Conlan, S., Evans, J., Chen, Y.P., vanEngelsdorp, D., Efrat, H., Pettis, J., Cox-Foster, D., Holmes, E.C., Briese, T. and Lipkin, W.I. 2008. Genetic analysis of Israel acute paralysis virus: distinct clusters are circulating in the United States. *J. Virol.* **82**: 6209–6217.
64. Payne, A.N., Shepherd, T.F. and Rangel, J. 2020. The detection of honey

- bee (*Apis mellifera*)-associated viruses in ants. *Sci. Rep.* **10**: 2923.
65. Ravoet, J., De Smet, L., Wenseleers, T. and de Graaf, D.C. 2015. Genome sequence heterogeneity of Lake Sinai Virus found in honey bees and Orf1/RdRP-based polymorphisms in a single host. *Virus Res.* **201**: 67–72.
 66. Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., De Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G. and de Graaf, D.C. 2013. Comprehensive bee pathogen screening in Belgium reveals *Crithidia mellificae* as a new contributory factor to winter mortality. *PLoS ONE.* **8**: e72443.
 67. R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
 68. Reddy, K.E., Noh, J.H., Kim, Y.H., Yoo, M.S., Doan, H.T.T., Ramya, M., Jung, S.C., Quyen, D.V. and Kang, S.W. 2013. Analysis of the nonstructural and structural polyprotein regions, and complete genome sequences of Israel acute paralysis viruses identified from honeybees (*Apis mellifera*) in Korea. *Virology.* **444**: 211–217.
 69. Ribière, M., Triboulot, C., Mathieu, L., Aurières, C., Faucon, J.-P. and Pépin, M. 2002. Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection. *Apidologie.* **33**: 339–351.
 70. Rittschof, C.C. and Nieh, J.C. 2021. Honey robbing: could human changes to the environment transform a rare foraging tactic into a maladaptive behavior? *Curr. Opin. Insect Sci.* **45**: 84–90.
 71. Roberts, J.M.K., Anderson, D.L. and Durr, P.A. 2017. Absence of deformed wing virus and *Varroa destructor* in Australia provides unique perspectives on honeybee viral landscapes and colony losses. *Sci. Rep.* **7**: 6925.
 72. Rosenkranz, P., Aumeier, P. and Ziegelmann, B. 2010. Biology and control of *Varroa destructor*. *J. Invertebr. Pathol.* **103** Suppl 1: S96–S119.
 73. RStudio. 2012. Rstudio: integrated development environment for r. RStudio Inc, Boston, Massachusetts.

74. Runckel, C., Flenniken, M.L., Engel, J.C., Ruby, J.G., Ganem, D., Andino, R. and DeRisi, J.L. 2011. Temporal analysis of the honey bee microbiome reveals four novel viruses and seasonal prevalence of known viruses, *Nosema*, and *Crithidia*. *PLoS ONE*. **6**: e20656.
75. 猿山由美, 濱谷景祐, 矢島佳世, 青木亜紀子, 宇佐美佳秀. 2013. 蜜蜂の麻痺病の発生事例とウイルス性疾病の浸潤状況. pp. 50–55. 栃木県家畜保健衛生業績発表会集録.
(<https://www.pref.tochigi.lg.jp/g66/system/desaki/desaki/documents/h25gyouhatsu6.pdf>) . (参照 2021-11-18) .
76. 猿山由美, 濱谷景祐, 山口修. 2014. 蜜蜂の麻痺病ウイルスの浸潤状況と衛生対策. pp. 51–54. 栃木県家畜保健衛生業績発表会集録.
(<http://www.pref.tochigi.lg.jp/g66/system/desaki/desaki/documents/06mitubati.pdf>) . (参照 2021-11-18) .
77. 笹川浩美, 門脇辰彦. 2003. 動物行動と視覚遺伝子の発現制御 ミツバチをモデルシステムにした解析. *化学と生物* **41**(6): 359–365.
78. Schläppi, D., Lattrell, P., Yañez, O., Chejanovsky, N. and Neumann, P. 2019. Foodborne transmission of deformed wing virus to ants (*Myrmica rubra*). *Insects*. **10**: 394.
79. Sguazza, G.H., Reynaldi, F.J., Galosi, C.M. and Pecoraro, M.R. 2013. Simultaneous detection of bee viruses by multiplex PCR. *J. Virol. Methods*. **194**: 102–106.
80. Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N. and Cox-Foster, D. 2005. Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *J. Gen. Virol.* **86**: 2281–2289.
81. Siede, R., König, M., Buchler, R., Failing, K., Thiel, H.J. 2008. A real-time PCR based survey on acute bee paralysis virus in German bee colonies. *Apidologie*. **39**: 650–661.
82. Šimenc, L., Kuhar, U., Jamnikar-Ciglencečki, U. and Toplak, I. 2020.

- First complete genome of Lake Sinai virus lineage 3 and genetic diversity of Lake Sinai virus strains from honey bees and bumble bees. *J. Econ. Entomol.* **113**: 1055–1061.
83. Singh, R., Levitt, A.L., Rajotte, E.G., Holmes, E.C., Ostiguy, N., Vanengelsdorp, D., Lipkin, W.I., dePamphilis, C.W., Toth, A.L. and Cox-Foster, D.L. 2010. RNA viruses in hymenopteran pollinators: Evidence of inter-taxa virus transmission via pollen and potential impact on non-*Apis* hymenopteran species. *PLoS ONE*. **5**: e14357.
 84. Steinhauer, N., Kulhanek, K., Antúnez, K., Human, H., Chantawannakul, P., Chauzat, M.P. and vanEngelsdorp, D. 2018. Drivers of colony losses. *Curr. Opin. Insect Sci.* **26**: 142–148.
 85. Stoltz, D., Shen, X.R., Boggis, C., Sisson, G. 1995. Molecular diagnosis of Kashmir bee virus infection. *J. Apic. Res.* **34**: 153–160.
 86. Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E. and Bergoin, M. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7185–7191.
 87. Todd, J.H., de Miranda, J.R. and Ball, B.V. 2007. Incidence and molecular characterization of viruses found in dying New Zealand honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with *Varroa destructor*. *Apidologie*. **38**: 354–367.
 88. Toplak, I., Rihtarič, D., Ciglencečki, U.J., Hostnik, P., Jenčič, V. and Barlič-Maganja, D. 2012. Detection of six honeybee viruses in clinically affected colonies of carniolan gray bee (*Apis mellifera carnica*). *Slov. Vet. Res.* **49**: 89–96.
 89. Traiyasut, P., Mookhploy, W., Kimura, K., Yoshiyama, M., Khongphinitbunjong, K. and Chantawannakul, P. 2016. First detection of honey bee viruses in wax moth. *Chiang Mai J. Sci.* **43**: 695–698.
 90. vanEngelsdorp, D. and Meixner, M.D. 2010. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and

the factors that may affect them. *J. Invertebr. Pathol.* **103** Suppl. 1: S80–S95.

91. Vidal-Naquet, N. 2015. Biology of *Apis mellifera* L.: from the individual to the super-organism. pp. 5–44. *In: Honeybee Veterinary Medicine: Apis mellifera* L., 1st ed. 5m Publishing, Sheffield.
92. Vidal-Naquet, N. 2015. Honeybee viruses and viral diseases. pp. 67–87. *In: Honeybee Veterinary Medicine: Apis mellifera* L., 1st ed. 5m Publishing, Sheffield.
93. Wang, S., Chen, G., Lin, Z., Wu, Y., Hu, F. and Zheng, H. 2019. Occurrence of multiple honeybee viruses in the ectoparasitic mites *Varroa* spp. in *Apis cerana* colonies. *J. Invertebr. Pathol.* **166**: 107225.
94. Yañez, O., Piot, N., Dalmon, A., de Miranda, J.R., Chantawannakul, P., Panziera, D., Amiri, E., Smaghe, G., Schroeder, D. and Chejanovsky, N. 2020. Bee viruses: routes of infection in Hymenoptera. *Front. Microbiol.* **11**: 943.
95. Yang, B., Peng, G., Li, T. and Kadowaki, T. 2013. Molecular and phylogenetic characterization of honey bee viruses, *Nosema* microsporidia, protozoan parasites, and parasitic mites in China. *Ecol. Evol.* **3**: 298–311.
96. Yang, S., Gayral, P., Zhao, H., Wu, Y., Jiang, X., Wu, Y., Bigot, D., Wang, X., Yang, D., Herniou, E.A., Deng, S., Li, F., Diao, Q., Darrouzet, E. and Hou, C. 2019. Occurrence and molecular phylogeny of honey bee viruses in Vespids. *Viruses.* **12**: 6.
97. 吉田敏治. 1981. ハチノスツヅリガの生態と防除. ミツバチ科学 **2**(3): 115–122.
98. 吉田忠晴. 2011. ミツバチの配偶行動. 日本農薬学会誌. **36**: 497–502.