

岐阜県内養蜂場で捕獲された節足動物からの 蜂病ウイルスの検出

北 村 夕 子^{1),2)}浅 井 鉄 夫^{1),3)†}

1) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

2) 岐阜県中央家畜保健衛生所 (〒501-1112 岐阜市柳戸1-1)

3) 岐阜大学家畜衛生地域連携教育研究センター (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)

(2020年7月14日受付・2020年12月14日受理)

要 約

岐阜県3養蜂場で捕獲された節足動物の蜂病ウイルス保有状況をPCR及びシーケンス法により調査した。その結果、スズメバチ類(n=23)からイスラエル急性麻痺ウイルス(IAPV, 87%)及びチデレバネウイルス(DWV, 57%)、バツタ類(n=5)からIAPV(40%)が検出された。分子系統解析の結果、これらの節足動物から検出されたウイルス遺伝子は、飼育ミツバチから検出されたものとクラスターを形成した。本研究より、スズメバチ類は蜂病ウイルスを高率に保有し、これらウイルスの伝播に關与する可能性が示唆された。

——キーワード：節足動物、蜂病ウイルス、飼育ミツバチ。

-----日獣会誌 74, 427~431 (2021)

セイヨウミツバチ *Apis mellifera* は、蜂蜜など畜産物を生産するだけでなく、ポリネーターとして農作物の花粉交配をする重要な家畜である。農林水産省の統計によると、日本国内では、令和元年度時点で9,782戸の養蜂家により21万5,000群のミツバチが飼育されている。近年、セイヨウミツバチの死亡が *Picornavirales* 目 *Dicistroviridae* 科 *Aparavirus* 属の急性麻痺ウイルス (*Acute bee paralysis virus*: ABPV)、イスラエル急性麻痺ウイルス (*Israeli acute paralysis virus*: IAPV) 及びカシミール蜂ウイルス (*Kashmir bee virus*: KBV)、*Picornavirales* 目 *Dicistroviridae* 科 *Triatovirus* 属の黒色女王蜂児病ウイルス (*Black queen cell virus*: BQCV)、*Picornavirales* 目 *Iflaviridae* 科 *Iflavirus* 属のチデレバネウイルス (*Deformed wing virus*: DWV) 及びサックブルードウイルス (*Sacbrood virus*: SBV)、*Picornavirales* 目未分類の慢性麻痺ウイルス (*Chronic bee paralysis virus*: CBPV) の感染と關連することが示唆されている [1]。フランス及びアメリカ合衆国では、野生送粉者を含む節足動物がこれら蜂病ウイルスを保有することが報告されている [2-4]。日本では、セイヨウミツバチが、BQCV, CBPV, IAPV, DWV 及び SBV に不顕性感染していることが報

告されている [5, 6] が、その他の節足動物については不明である。そこで本研究では、岐阜県の養蜂場で捕獲された飼育セイヨウミツバチ (以下、飼育バチ) 並びに節足動物における蜂病ウイルスの保有状況を調査した。

材料及び方法

検体の採取：2019年11月8及び9日に岐阜県内の養蜂場3カ所 (A, B, C) において、巣箱内から飼育バチ成虫5個体を採取した。また、巣箱周辺 (2m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ロスズメバチ) 及びバツタ類を採取した。採取したサンプルは二酸化炭素により安楽殺後、氷冷して実験室に持ち帰った。捕獲した節足動物は形態的特徴をもとに種を同定し、-20℃で保管した。

RNA抽出及びRT-PCR：検体は1個体ずつから体積の約2倍量の滅菌水で乳剤を作成し、遠心 (4,000rpm, 1分間, 室温) 後、上清200μlからRNA抽出キット (NucleoSpin® RNA, MACHEREY-NAGEL, Germany) を用いてRNAを抽出した。各RNA抽出物より、RT-PCRキット (Prime Script™ RT-PCR Kit, タカラバイオ(株), 滋賀) と7種類の蜂病ウイルス検出用

† 連絡責任者：浅井鉄夫 (岐阜大学大学院連合獣医学研究科)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎・FAX 058-293-2997 E-mail: tasai@gifu-u.ac.jp

節足動物からの蜂病ウイルスの検出

表1 本研究で用いたプライマーセット

ウイルス名	プライマー配列 (5'-3')	サイズ (bp)	アニーリング温度 (°C)	引用文献
急性麻痺ウイルス (ABPV)	GGAACATGGAAGCATTATTG AATGTCTTCTCGAACCATAG	687	55	[7]
イスラエル急性麻痺ウイルス (IAPV)	GCGGAGAATATAAGGCTCAG CTTGCAAGATAAGAAAGGGGG	586	60	[8]
カシミール蜂ウイルス (KBV)	ATGACGATGATGAGTTCAAG AATTGCAAGACCTGCATC	290	50	[9]
黒色女王蜂児病ウイルス (BQCV)	TGGTCAGCTCCCCTACTACCTTAAAC GCAACAAGAAGAAACGTAACCAC	701	55	[10]
チヂレバネウイルス (DWV)	CCTGGACAAGGCTCTCGGTAGAA CTTCCCATGTGATAAGGTCCTC	203	60	本研究
サックブルードウイルス (SBV)	ACCAACCGATTCTCCTCAGTAG CCTTGGAACCTCTGCTGTGTA	488	60	[5]
慢性麻痺ウイルス (CBPV)	AGTTGTCATGGTTAACAGGATACGAG TCTAATCTTAGCACGAAAGCCGAG	455	55	[11]

表2 各養蜂場で採集されたセイヨウミツバチ及び節足動物におけるウイルスの検出状況

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

* I: イスラエル急性麻痺ウイルス, B: 黒色女王蜂児病ウイルス, D: チヂレバネウイルス

プライマーセット [5, 7-11] を用いて, RT-PCR を実施した (表1). PCR 反応は, 94°C・1分間の熱変性後, 94°C・30秒, 50~60°C・30秒, 72°C・1分を30回繰り返し, 最終伸長反応を72°C・5分間実施した. PCR 産物は1.0%アガロースゲルで電気泳動した.

塩基配列決定及び分子系統解析: PCR 産物は市販キット (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, U.S.A.) を用いて精製後, ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した (LC581763~LC581787 及び LC582746~LC582767). 決定した塩基配列は, National Center for Biotechnology Infor-

mation の BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) で相同性検索を実施した. 得られた塩基配列は, MEGA-X [12] を用いて最尤法による分子系統解析を行った.

統計解析: ウイルス検出率は Fisher の正確確率検定により解析した.

成 績

本研究の結果, 飼育バチから IAPV, BQCV, DWV が, スズメバチ類から IAPV, DWV が, バッタ類から IAPV がそれぞれ検出され, 他のウイルス遺伝子 (ABPV,

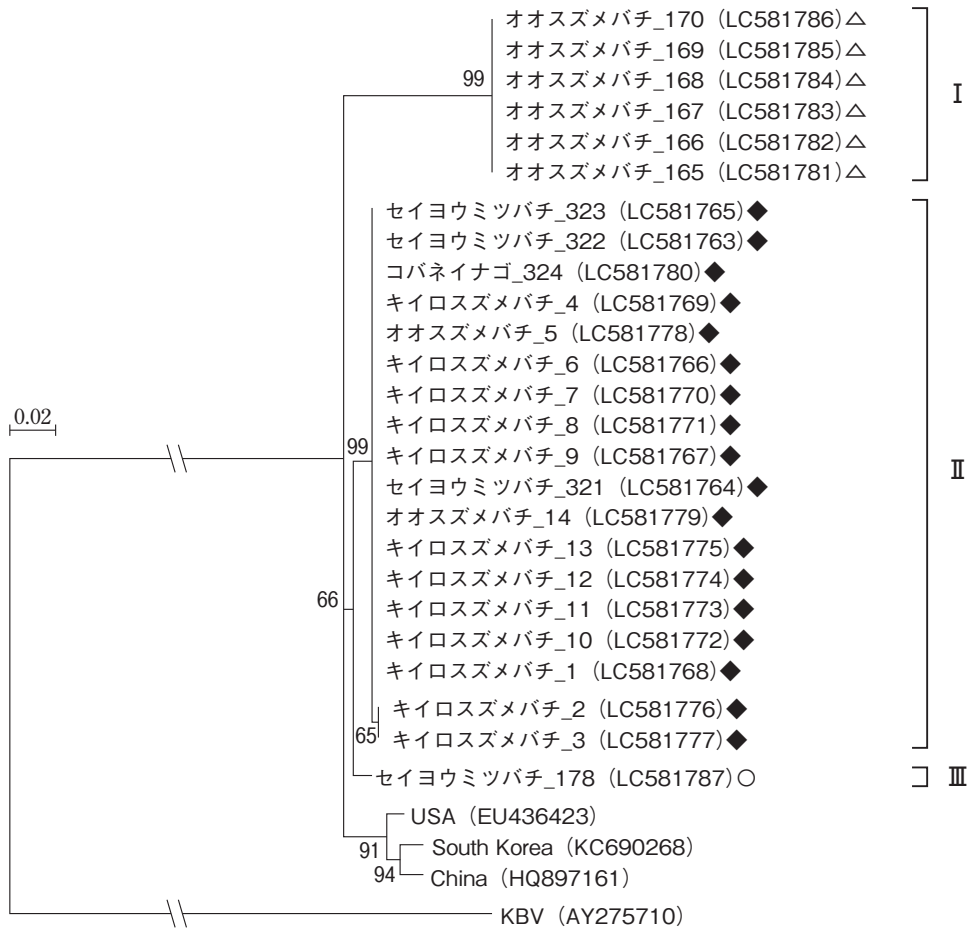


図1 各養蜂場で得られたイスラエル急性麻痺ウイルス (IAPV) の5'UTR及びHelicase 遺伝子領域塩基配列 (540bp) に基づく系統樹

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 (◆:A養蜂場, △:B養蜂場, ○:C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す (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. 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.

KBV, CBPV, SBV) は検出されなかった (表2). 飼育バチからはDWVが最も高く検出され(9/15, 60%), 3養蜂場すべてで遺伝子が検出された. 一方, スズメバチ類ではDWVよりIAPVの方が多く検出された ($P<0.05$).

養蜂場Aでは, 飼育バチ, スズメバチ類, バッタ類のいずれからでもIAPV遺伝子が検出された. 一方, 養蜂場Bではスズメバチ類からのみ, 養蜂場Cでは飼育バチからのみ, IAPV遺伝子が検出された. 検出されたIAPV遺伝子の塩基配列 (540bp) による分子系統解析の結果, 25の配列は3つのサブクラスターに分けられた (図1). これらのサブクラスターは, 生物種によってではなく, 養蜂場によって分けられた. DWVは, 3養蜂場すべてのスズメバチ類及び飼育バチから検出された (表2). 検出された22のDWV遺伝子配列 (159bp) による分子系統解析の結果, これらは2つのクラスターに分かれた (図2). これらの配列は生物種や養蜂場によってクラスターが分かれなかった.

考 察

本研究で, 節足動物からDWV及びIAPVが検出された養蜂場の大部分で, 飼育バチからウイルスが検出された (表2). 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 [4] 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, ウイルスがミツ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と考察した. Schläppiら [13] 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. 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内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 [14].

分子系統解析の結果, IAPVは生物種より養蜂場に

節足動物からの蜂病ウイルスの検出

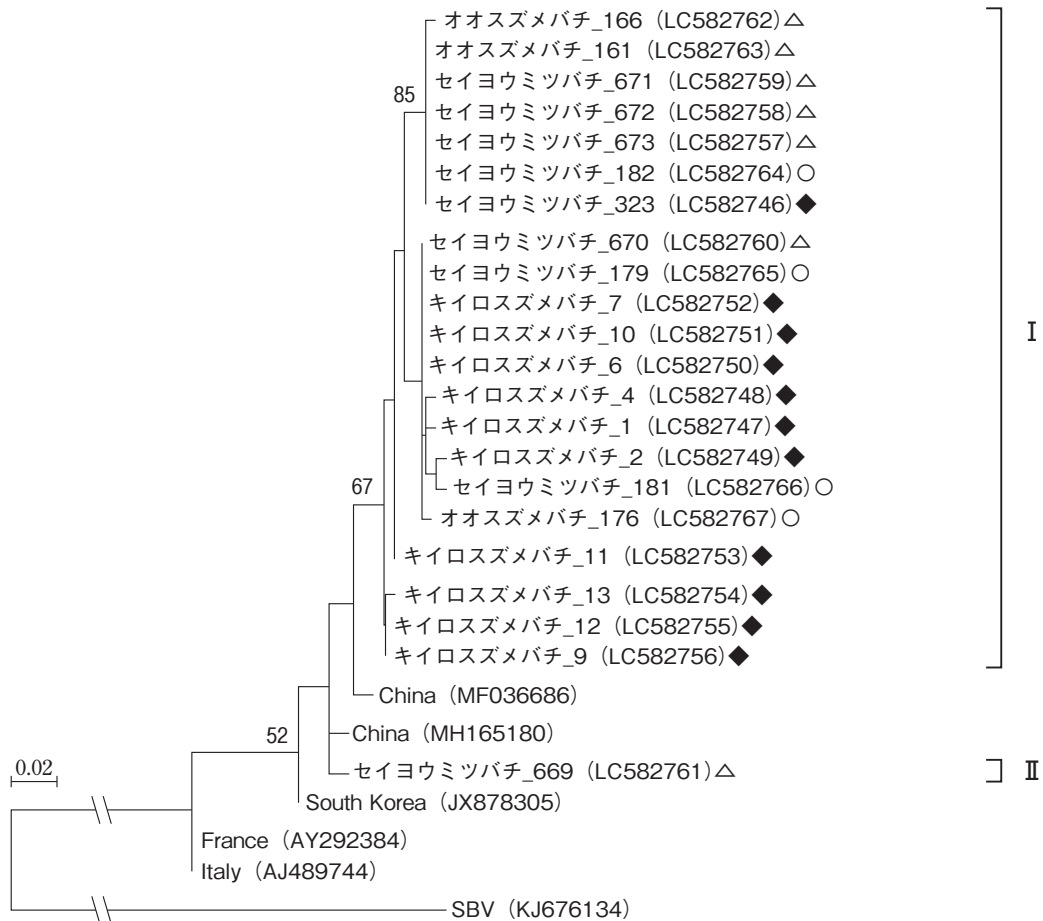


図2 各養場で得られたチダレバネウイルス (DWV) の RdRp 遺伝子領域塩基配列 (159bp) に基づく系統樹

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 (◆: A 養蜂場, △: B 養蜂場, ○: C 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す (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。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。

よってクラスターが分かれたことから (図1), 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。また、スズメバチ類では DWV よりも IAPV の方が有意に多く検出された。Levitt ら [3] は、IAPV 陽性ミツバチを過去に飼育した場所で捕獲したマルハナバチから IAPV を検出したことを報告している。このように、スズメバチ類は IAPV に対する感受性が高い可能性が考えられ、ミツバチにおける 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 は同一のサブクラスターを形成した (図2)。Kojima ら [5] が 2009~2010 年に 36 県で行った調査で、DWV は 84% の養蜂場で検出され、また、著者らが 2018~2019 年に岐阜県で実施した調査で DWV は養蜂場の 55.6% で検出された (未発表データ)。このように DWV は国内の養蜂場に広く分布するウイルスの一つである。A 及び C

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 B 養蜂場のオオスズメバチ及び飼育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、養蜂場間でウイルス伝播した可能性が示唆された。

本研究の結果、日本においてセイヨウミツバチのみでなく、野生の節足動物が蜂病ウイルスを保有していることが明らかになった。今後、各蜂病ウイルスの野外での伝播様式について、さらに研究が必要と考えられる。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、伝播に関与する可能性が示唆されたことから、スズメバチの巣の駆除や養蜂場での防除を徹底する対策が必要である。

本研究を行うにあたり、ご助言をいただいた岐阜県中央家畜保健衛生所の渡辺博幸氏に深謝する。

引用文献

- [1] McMenamin AJ, Genersch E : Honey bee colony losses and associated viruses, *Curr Opin Insect Sci*, 8, 121-129 (2015)
- [2] Celle O, Blanchard P, Olivier V, Schurr F, Cougoule N, Faucon JP, Ribière M : 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 (2008)
- [3] Levitt AL, Singh R, Cox-Foster DL, Rajotte E, Hoover K, Ostiguy N, Holmes EC : Cross-species transmission of honey bee viruses in associated arthropods, *Virus Res*, 176, 232-240 (2013)
- [4] Payne AN, Shepherd TF, Rangel J : The detection of honey bee (*Apis mellifera*)-associated viruses in ants, *Sci Rep-UK*, 10, 2923 (2020)
- [5] Kojima Y, Toki T, Morimoto T, Yoshiyama M, Kimura K, Kadowaki T : Infestation of Japanese native honey bees by tracheal mite and virus from non-native European honey bees in Japan, *Microb Ecol*, 62, 895-906 (2011)
- [6] Morimoto T, Kojima Y, Yoshiyama M, Kimura K, Yang B, Kadowaki T : Molecular identification of chronic bee paralysis virus infection in *Apis mellifera* colonies in Japan, *Viruses*, 4, 1093-1103 (2012)
- [7] Bakonyi T, Grabensteiner E, Kolodziejek J, Rusvai M, Topolska G, Ritter W, Nowotny N : Phylogenetic analysis of acute bee paralysis virus strains, *Appl Environ Microb*, 68, 6446-6450 (2002)
- [8] Di Prisco G, Pennacchio F, Caprio E, Boncristiani Jr HF, Evans JD, Chen Y : *Varroa destructor* is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*, *J Gen Virol*, 92, 151-155 (2011)
- [9] Shen M, Cui L, Ostiguy N, Cox-Foster D : 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 (2005)
- [10] Benjeddou M, Leat N, Allsopp M, Davison S : Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR, *Appl Environ Microb*, 67, 2384-2387 (2001)
- [11] Ribière M, Triboulot C, Mathieu L, Aurières C, Faucon JP, Pépin M : Molecular diagnosis of chronic bee paralysis virus infection, *Apidologie*, 33, 339-351 (2002)
- [12] Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K : MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms, *Mol Biol Evol*, 35, 1547-1549 (2018)
- [13] Schläppi D, Lattrell P, Yañez O, Chejanovsky N, Neumann P : Foodborne transmission of deformed wing virus to ants (*Myrmica rubra*), *Insects*, 10, 394 (2019)
- [14] Alger SA, Burnham PA, Boncristiani HF, Brody AK : RNA virus spillover from managed honeybees (*Apis mellifera*) to wild bumblebees (*Bombus* spp.), *PLoS One*, 14, e0217822 (2019), (online), (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217822>), (accessed 2020-12-19)

Detection of Bee Virus Species from Wild Arthropods in Apiaries in Gifu Prefecture

Yuko KITAMURA^{1),2)} and Tetsuo ASAI^{1),3)†}1) *Department of Applied Veterinary Science, The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*2) *Gifu Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1112, Japan*3) *Education and Research Center for Food Animal Health, Gifu University (GeFAH), 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*

SUMMARY

In this study we examined the distribution of bee virus species among wild arthropods captured at three apiaries in Gifu prefecture using PCR and sequencing methods. The results showed that wild hornets (n=23) were positive for *Israeli acute paralysis virus* (IAPV, 87%) and *Deformed wing virus* (DWV, 56%), and the wild grasshoppers (n=5) were positive for IAPV (40%). Phylogenetic analyses showed that IAPV and DWV derived from these wild arthropods formed a cluster with those from reared honeybees. Our results indicated that wild hornets possess bee virus species and may be related to transmission cycles in apiaries in Japan.

— Key words : arthropods, bee virus, reared honeybees.

† *Correspondence to : Tetsuo ASAI (Department of Applied Veterinary Science, The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University)*

1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan TEL · FAX 058-293-2997 E-mail : tasai@gifu-u.ac.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 427 ~ 431 (2021)