

(様式1)

審査基準 (申請に対する処分関係)

	担当課	畜産課	検索番号	1-3
法令名	家畜伝染病予防法	根拠条項	32-1	
許認可等	蜜蜂腐蛆病検査証明書の発行			
1. 法令の定め (許認可等要件)				
○ 家畜等の移動制限 (家畜伝染病予防法32条第1項)				
都道府県知事は、家畜伝染病のまん延を防止するため必要があるときは、規則を定め、一定種類の家畜、その死体又は家畜伝染病の病原体をひろげる恐れがある物品の当該都道府県の区域内での移動、当該都道府県内への移入又は当該都道府県外への移出を禁止し、又は制限することができる。				
みつばちについての腐蛆病のまん延防止に関する規則				
第1条 (目的)				
この規則は、家畜伝染病予防法第32条第1項の規定に基き、みつばちについての腐蛆病のまん延を防止するため、みつばちについての腐蛆病の病原体をひろげるおそれがある物品の移動を制限することを目的とする。				
第2条 省略				
第3条 (移入の禁止)				
みつばち及びみつばちについての腐蛆病の病原体をひろげるおそれがある物品は、県内に移入してはならない。ただし移入前1月以内に飼育地の都道府県知事、家畜保健衛生所長又は家畜防疫員が行う検査に合格したもので、腐蛆病検査証明書を所有し、かつ、巣箱に腐蛆病検査済証をはつてあるものは、この限りでない。				
第4条 (移動の禁止)				
1 みつばち及びみつばちについての腐蛆病の病原体をひろげるおそれがある物品を県外へ移出してはならない。ただし移出前1月以内に家畜保健衛生所長又は家畜防疫員が行う検査をうけて合格したものは、この限りでない。				
2 前項ただし書の検査をうけようとする者は、あらかじめ、腐蛆病検査申請書を、移出の日前5日までにその飼育地を管轄する家畜保健衛生所長に提出しなければならない。				
3 第1項ただし書の検査に合格したのものについては、検査を行った家畜保健衛生所長又は家畜防疫員が、腐蛆病検査証明書を交付し、かつ、巣箱ごとに腐蛆病検査済証をはるものとする。				
第5、6条 省略				
2. 審査基準				
病性鑑定指針 (平成20年6月2日付け20消安第880号農林水産省消費・安全局長通知)				
○ 病原体 : アメリカ腐蛆病 <i>Paenibacillus larvae</i>				
ヨーロッパ腐蛆病 <i>Melissococcus plutonius</i>				
(1) 疫学調査				
① 近くで本病が発生				

- ② 以前に同一農家もしくは同一蜂場で本病が発生
- ③ 新しく蜂群を導入
- ④ 出所不明の蜂蜜を給餌用として使用
- ⑤ 他蜂場と器具を共通に使用
- ⑥ 消毒していない古い巣箱、巣脾を使用

## (2) 臨床検査

＜アメリカ腐蛆病＞

- ① 有蓋蜂児が死亡
- ② 特徴的な膠臭
- ③ 死亡蜂児は粘稠性を帯び2～3cm の糸を引き褐色～チョコレート～黒色へと変化
- ④ 死亡蜂児は巣房の下面に固着、乾燥（乾燥腐蛆（スケイル））
- ⑤ 巣脾の産卵圏が不規則で有蓋房の中に無蓋房が点在

＜ヨーロッパ腐蛆病＞

- ① 無蓋蜂児が死亡
- ② 発酵臭、酸臭
- ③ 死亡蜂児は粘稠性はなく、虫体内部は水様で透明～汚白色～灰褐色へと変化
- ④ 死亡蜂児は不定形で巣房の側壁または底部にみられる。

## (3) 簡易細菌検査（直接鏡検）

＜アメリカ腐蛆病＞

乾燥した腐蛆（スケイル）を 2.5%ニグロシンまたは墨汁で混和乾燥して鏡検するか、パ  
イファー染色によって鏡検し、多数ある芽胞を確認する。

＜ヨーロッパ腐蛆病＞

新鮮な死亡蜂児をスライドガラス上で解体すると、チョークの粉様の中腸内容物を見ることが  
できる。中腸内容物または死亡蜂児の乳剤をスライドガラス上に薄く塗抹後、グラム染  
色し、多数のグラム陽性紡錘形連鎖球菌を確認する。腐敗が進んだ蜂児には、様々な細菌が  
二次感染しているため、直接鏡検の材料には適さない。

## (4) ミルクテスト

＜アメリカ腐蛆病＞

0.5%のスキムミルク液 1～2ml に腐蛆（スケイル）1 匹分を加え、静かに振盪した後  
10 分～20 分静置する。

*P. larvae* の出す蛋白分解酵素作用で、スキムミルク液は透明化する。なお、1%スキム  
ミルク液を用い37℃に保温する方法でも構わない。ただし、*P.larvae* が存在していても、必  
ずしも陽性とはならないので注意

## (5) 細菌培養試験（分離培養）

＜アメリカ腐蛆病＞

- ①腐蛆を使用し、J寒天培地またはコロンビア血液寒天培地を用いて 37 °Cで 2 ～4 日炭  
酸ガス（5%）培養をする。
- ②半透明の円型（約 1～3mm）集落を形成する。

＜ヨーロッパ腐蛆病＞

- ①Bailey の培地あるいは KSBHI 培地を用いて腐蛆から分離培養を行う。35 ～37 °C、5  
～20%CO<sub>2</sub> 条件下で、3～5 日間嫌気培養をする。
- ② 白色の小集落を形成する。

## (6) 細菌性状分析

### <アメリカ腐蛆病>

*P. larvae*: カゼイン水解 (+)、カタラーゼ (-または弱陽性)、ゼラチン (+)、澱粉水解 (-)、糖からの酸生成: グルコース (+)、トレハロース (+)、アラビノース (-)、キシロース (-) 糖からの酸産生能は、J 培地から寒天およびブドウ糖を除いたものを基礎培地として試験を行う。

### <ヨーロッパ腐蛆病>

*M. plutonius* には世界各国でヨーロッパ腐蛆病症例から一般的に分離され、古くから知られる典型的な性状を示す株 (典型株) と、典型株とは性状が大きく異なる株 (非典型株) が存在するが、PCR ではどちらも陽性となる 1), 6)。

典型株: 紡錘形連鎖球菌、嫌気性ないし微好気性、グルコース (+)、フルクトース (+)、D マンノース (+)、L アラビノース (-)、D セロビオース (-)、サリシン (-)、エスクリンの加水分解 (-)、βグルコシダーゼ (-)、Na/K 比<1 で発育 (BHI 寒天での発育 (-)、KSBHI 寒天での発育 (+))

非典型株: 紡錘形連鎖球菌、嫌気ないし微好気条件を好むが、Na/K 比<1 の培地では好気条件でも発育可能、グルコース (+)、フルクトース (+)、D マンノース (+)、L アラビノース (+)、D セロビオース (+)、サリシン (+)、エスクリンの加水分解 (+)、βグルコシダーゼ (+)、Na/K 比に関係なく発育 (BHI 寒天での発育 (+)、KSBHI 寒天での発育 (+))

糖からの酸産生能は、Bailey の培地からグルコースを除き、寒天濃度を 0.2%にした培地を基礎培地として試験を行う。酸産生能の強さは株により差があるため、+と記載されている項目でも、きわめて弱い陽性しか示さない株も存在する。

## (7) PCR

### <アメリカ腐蛆病>

アメリカ腐蛆病菌 *P. larvae* の検出、同定は 16SrRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 2), 3), 4) が利用できる。死亡蜂児からも検査可能とされている 2), 4)。診断にあたっては各種検査成績と併せて判断する。

### <ヨーロッパ腐蛆病>

ヨーロッパ腐蛆病菌 *M. plutonius* の検出、同定は 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした PCR 5) と Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 遺伝子および Fur family transcriptional regulator 遺伝子をターゲットとした Duplex PCR 6) が利用できる。死亡蜂児から直接検出することもできる。診断にあたっては各種検査成績と併せて判断する。なお、Duplex PCR では、典型株と非典型株を識別することができる。

その他:

(分離培地)

### ① J 培地の組成

トリプトン	0.5g
酵母エキス	1.5g
リン酸水素二カリウム (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.3g
ブドウ糖	*
寒天	1.5g
蒸留水	100ml
pH 7.3~7.5	

\* 滅菌後無菌的に 0.2%になるように加える。

② Bailey 培地の組成

酵母エキス	1g
ブドウ糖	1g
可溶性澱粉	1g
寒天	1.5g
リン酸二水素カリウム (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.36g
蒸留水	100ml
5M KOH で pH 6.6 に調整	

115°C、10 分、高圧滅菌

③ KSBHI 培地

BHI 培地	3.7g
リン酸二水素カリウム (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2.04g
可溶性澱粉	1g
寒天	1.5g
蒸留水	100ml