- Ando, T., S. Yoshida, S. Tatsuki and N. Takahashi (1975) *Agric. Biol. Chem.* 39: 1163–1165.
- Ando, T., S. Yoshida, S. Tatsuki and N. Takahashi (1977) *Agric. Biol. Chem.* 41: 1485–1492.
- Hampson, G. F. (1898) *Proc. Zool. Soc. Lond.* 21: 590–693.
- 井上 寛・岡野磨嵯郎・白水 隆・杉 繁郎・山本英穂 (1960) 原色昆虫大図鑑．第1巻．北隆館，東京．284 pp. [Inoue, H., M. Okano, T. Sirozu, S. Sugi and H. Yamamoto (1960) *Iconographia Insectorum Japonicorum Naturali Edit.* Vol. I. Hokuryukan, Tokyo. 284 pp.]
- 木村貴好 (2002) *Conogethes* 属同胞種の性フェロモンに関する化学生態学的研究．筑波大学農学研究科博士論文．159 pp. [Kimura, T. (2002) Chemoecological studies on sex pheromone of *Conogethes* sibling species. Doctoral thesis, University of Tsukuba. 159 pp.]
- Kimura, T. and H. Honda (1999) *Appl. Entomol. Zool.* 34: 147–153.
- Kimura, T., J. Sakai and H. Honda (2002) *Entomol. Sci.* 5: 237–247.

- Konno, Y., K. Arai, K. Sekiguchi and Y. Matsumoto (1982) *Appl. Entomol. Zool.* 17: 207–217.
- 日本応用動物昆虫学会 (1987) 農林有害動物・昆虫名鑑．日本植物防疫協会，東京．379 pp. [Jpn. Soc. Appl. Entomol. Zool. (1987) *Major Insect and Other Pests Economic Plants in Japan*. Jpn. Plant Prot. Assoc., Tokyo. 379 pp.]
- Reed, D. W. and M. D. Chisholm (1985) *J. Chem. Ecol.* 11: 1645–1657.
- 関口計主 (1974) 茨城県園芸試験場研究報告．特別報告 90 pp. [Sekiguchi, K. (1974) *Bull. Ibaraki Hort. Expt. Stn.* Special Issue, 90 pp.]
- 真梶徳純 (1969) 園芸試験場報告 A No. 8: 155–208. [Shinkaji, N. (1969) *Bull. Hort. Res. Stn. Japan Ser. A No. 8: 155–208.*]
- 上住 泰 (2003) 日本農業害虫大辞典 (梅谷献二・岡田 利編). 全国農村教育協会，東京，p. 904. [Uezumi, Y. (2003) In *Agricultural Insect Pests in Japan* (T. Umeiya and T. Okada eds.). Zenkoku Noson Kyoiku Kyokai, Tokyo, p. 904.]

セイヨウオオマルハナバチのコロニーから 分離された *Nosema bombi* 様微孢子虫と 日本産マルハナバチへの感染

丹羽 里美^{1,*}・岩野 秀俊²・浅田 真一³
松浦 誠⁴・五箇 公一¹

¹ 国立環境研究所

² 日本大学生物資源科学部

³ 神奈川県農業総合研究所根府川試験場

⁴ 三重大学生物資源学部

A Microsporidian Pathogen Isolated from a Colony of the European Bumblebee, *Bombus terrestris*, and Infectivity on Japanese Bumblebee. Satomi NIWA,^{1,*} Hidetoshi IWANO,² Shin-ichi ASADA,³ Makoto MATSUURA⁴ and Kouichi GOKA¹ ¹National Institute for Environmental Studies; 16-2, Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, Japan. ²College of Bioresource Sciences, Nihon University; 1866, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan. ³Kanagawa Prefectural Agricultural Research Institute, Nebukawa Experimental Station; 571-1, Nebukawa, Odawara, Kanagawa 250-0024, Japan. ⁴Faculty of Bioresources, Mie University; 1515, Kamihama-tyo, Tsu, Mie 514-8507, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 48: 60–64 (2004)

Abstract: We investigated introduced commercial colonies of the European bumblebee *Bombus terrestris* to determine whether they were infested by parasitic microorganisms. We isolated microsporidian spores from bees in a colony from the Netherlands. The shape of the spores and the number of polar filament coils, along with the developmental cycle and infection sites of the pathogen, were characteristic of *Nosema bombi*, a known serious pathogen of bumblebees. Laboratory studies

showed that the isolated microsporidia were able to infect *B. hypocrita* and *B. diversus*, two native Japanese bumblebee species. These results strongly suggest that importing commercial colonies of *B. terrestris* carries the risk that pathogenic microsporidia will spread among Japanese bumblebee populations.

Key words: *Bombus terrestris*; microsporidia; *Nosema bombi*; pollinator; biological invasion

セイヨウオオマルハナバチ *Bombus terrestris* はユーラシア大陸原産の訪花性昆虫である。1980年代の後半に施設栽培トマトのポリネーターとして利用するために大量生産技術がベルギーで開発されて以来、本格的な商品化が進み、日本にも1991年からベルギーおよびオランダから農業資材として輸入が始まった(松浦, 1993; 岩崎, 1995; 小野, 1997)。現在、日本では年間約6万箱のコロニーがトマトなどの花粉媒介昆虫として販売されており(五箇・マルハナバチ普及会, 2003), セイヨウオオマルハナバチをハウスに導入することによって、ホルモン処理の労力削減やトマトの品質向上、さらには減農薬も促進されるなど、多大なメリットが農業従事者および消費者にもたらされた。しかし、その一方で、ハウスから逃亡した女王バチが野外で営巣したとみられる野生巣が1996年秋と2002年初夏に北海道で発見されるなど、本種の野生化が示唆され、餌資源や営巣場所をめぐる競合や、在来種との交雑など生態系への影響が懸念されるようになった(五箇, 1998; 鷲谷, 1998; 五箇・マルハナバチ普及会, 2003)。実際、セイヨウオオマルハナバチは、餌資源が限られた環境下では可能な限りの植物を利用し、ミツバチを含む他のハナバチよりも採餌能力が高

* Corresponding author

日本応用動物昆虫学会誌(応動昆)第48巻 第1号: 60–64 (2004)
2003年4月30日受領 (Received 30 April 2003)
2003年10月29日登載決定 (Accepted 29 October 2003)

いとされている (Dafni, 1998). さらに室内の交尾実験の結果から在来種のエゾオオマルハナバチ *Bombus hypocrita sapporoensis* とセイヨウオオマルハナバチの間に雑種が生じる場合もあるとされる (光畑・小野, 未発表). また, マルハナバチ類に病気を引き起こす病原体ならびに体内寄生性天敵として, 2 種のウイルス病, 数種の菌類, 3 種の原生生物, 1 種のセンチウの他, 多種にわたるダニ, メバエ, ニクバエ, コマユバチ等が知られ (Macfarlane et al., 1995), こうした寄生生物の検疫を一切行わずに大量のコロニーが持ち込まれていることについても, 生態系への影響が懸念されている (Goka et al., 2001). 本研究では, 花粉媒介用の商品として輸入されたセイヨウオオマルハナバチが原生動物の一種である微胞子虫に感染していることを確認し, この微胞子虫の形態および生態的特性に関する調査, および日本在来のマルハナバチへの交差感染実験を行ったので, ここに報告する.

材料および方法

1. 供試虫

オランダから輸入されたセイヨウオオマルハナバチの商品コロニーの 1 コロニーを 1996 年 8 月に購入し, 同年 8 月 27 日より約 1 カ月間トマトハウス内で使用した. その後コロニーを回収し, 冷蔵保存した.

2. 分離微胞子虫胞子の精製

冷蔵保存したコロニーよりハチ成虫を乳鉢に入れ, 少量の生理的食塩水を加えてよく磨砕し, 磨砕液の一部をスライドグラス上にとり, プレパラート標本として位相差顕微鏡にて微胞子虫胞子の有無を検査した. 胞子状の顆粒物を検出した場合は, 四重のガーゼで磨砕液を濾過した後, 遠心分離 (3,000 rpm) を 5 分間行い, 上清液を取り除いて胞子状顆粒物の粗精製を行った. 分離した粗精製液は, 冷蔵 (0~5°C) 下に保存した. 微胞子虫の胞子は花粉顆粒と近似しているため, 胞子状の顆粒物が認められた場合, 胞子であるかどうかを確認する必要がある. そこで, 胞子内の核の存在を調べるため, DAPI 染色を実施し, さらに胞子外殻のキチン質の存在を証明するため, Uvitex2B 染色 (DeGinolami et al., 1995) を行った. 分離した顆粒物が微胞子虫胞子であると確認した場合は, 微胞子虫胞子液に含まれる夾雑物を除くためにパーコールを用いて精製を行った. 胞子液は遠心分離 (3,000 rpm) を 5 分間行い, 上清を取り除いて胞子層のみにし, パーコールを 10 ml 入れてピペティングした後, 遠心分離を行った (Kawarabata and Ishihara, 1984; Iwano and Ishihara, 1991a). 分離後, 上清液を取り除き, パーコールを除去するため, そこに生理的食塩水を加えて再度遠心分離を行った. この操作を数回繰り返した. 得られた胞子液は遠沈管に移し入れて, 使用まで冷蔵 (0~5°C) 下に保存した.

3. 微胞子虫胞子のサイズ測定

微胞子虫胞子のサイズ測定には, イメージ・シアリング測定顕微鏡 (VICKERS Co., Ltd) を用いて, 胞子の長径および短径を測定した ($n=100$).

4. 在来マルハナバチへの交差感染実験

供試虫として, オオマルハナバチ *Bombus hypocrita* のオスバチ 6

個体と新女王バチ 1 個体の合計 7 個体, およびトラマルハナバチ *Bombus diversus* のハタラキバチ 2 個体, オスバチ 8 個体と新女王バチ 1 個体の計 11 個体を単独で用いた. これらはすべて微胞子虫病に感染していないことを確認した室内飼育コロニーから得た. 各コロニー内のマルハナバチを二酸化炭素にて麻酔し, 蜜胃の内容物を吐き出させた後, 分離した精製胞子液 (胞子濃度 4.6×10^7 胞子/ml) の中にハチの口吻を入れ, ハチの腹部を伸縮させることによって胞子液を体内に取り込ませ, その後, ハチが死亡するまで木製飼育箱 (15×10×8 cm) で 50% ショ糖水を与えて飼育した.

5. 微胞子虫感染の確認

微胞子虫胞子の接種後に死亡した個体は, 感染の有無を確認し, 合わせて分離微胞子虫の同定を行うため, 個別に解剖して中腸のなすりつけ標本作製し, メタノールで固定後, ギムザ染色を行って, 各发育ステージを観察した. さらに摘出した中腸あるいはマルピーギ管を 2.5% グルタルアルデヒド溶液にて固定し, 1% 四酸化オスミウム液で後固定を行い, 常法に従って脱水し, エポキシ包埋樹脂 (商品名: Epok 812) に包埋した. 樹脂から超薄切片を作製後, 酢酸ウラニールおよび鉛混合液 (Takagi et al., 1990) にて電子染色後, 透過型電子顕微鏡 (JEOL 1200EX) を用いて发育ステージと胞子を観察した.

結果および考察

今回, 商品として輸入されたセイヨウオオマルハナバチの 1 コロニー内のハタラキバチおよびオスバチから分離された微胞子虫の胞子状顆粒物は, DAPI 染色の結果, 胞子内部に核内 DNA の存在に基づく二核の染色が確認され (Fig. 1a), また Uvitex2B 染色により外殻のキチン質層の発色が認められた (Fig. 1b) ので, 胞子状顆粒物は花粉顆粒ではなく, 微胞子虫胞子であると断定した. 精製した同胞子の形状は楕円形~長円形であり (Fig. 2), そのサイズは長径 $5.07 \pm 0.44 \mu\text{m}$ 短径 $2.83 \pm 0.27 \mu\text{m}$ であった (Table 1). 一般に微胞子虫胞子の形状は, 継代宿主や観察時における胞子処理の相違などによって変異することが指摘されている (Vavra, 1976) が, 少なくとも罹病昆虫から回収後の新鮮胞子の形状比較では, 本株胞子の大きさはミツバチから分離されている *Nosema apis* より小さく, 家蚕から分離されている *Nosema bombycis* (藤原, 1980) よりは一回り以上も大きく, ニュージーランドのセイヨウオオマルハナバチから分離された *N. bombi* (McIvor and Malone, 1995) の胞子サイズと有意差は認められなかった ($p > 0.05$, t 検定). この微胞子虫胞子を在来のマルハナバチであるオオマルハナバチおよびトラマルハナバチの 2 種に交差感染させたところ, 供試したすべての個体 (18 個体) から胞子孵化に伴うと考えられる栄養繁殖期の二核メロント (Fig. 3a, Fig. 4a) の发育形態が観察されたが, メロントの増殖様式は, *N. bombi* と同様に *N. apis* のような連鎖状メロントを形成しなかった (McIvor and Malone, 1995). オオマルハナバチのオスバチ (1 個体) からは, メロント以外にもスポロント, スポロプラストならびに成熟胞子などの胞子形成期の各发育ステージが観察された (Fig. 3). すなわち, 外国産マルハナバチ由来の微胞子虫が在来のマルハナバチにも交差感染することが確認された (Table 2). 分離微胞子虫の发育形態は, 各发育ステー

Fig. 1. Fluorescent micrographs of microsporidian spores stained with DAPI (a) and Uvitex2B (b).

Fig. 2. A phase-contrast micrograph of microsporidian spores isolated from *Bombus terrestris*.

ジが二核単位であり、孢子形成期に孢子囊膜の形成を伴わないので、*Nosema* 属の微孢子虫と判断した。孢子内の二核は連核配列を示し、孢子の内部に螺旋状に収納されている極系の巻き数は、16~22 巻き ($n=13$) であった (Fig. 4b)。この巻き数は *N. apis* より少なく、また *N. bombycis* より多く、*N. bombi* の巻き数とほぼ一致した (Table 1)。極系の巻き数は、微孢子虫の種を特徴付ける形質の一つであると考えられる (Larsson, 1988) ことから、今回分離した微孢子虫は *N. bombi* である可能性が示唆された。さらに供試した微孢子虫の主な寄生部位は、オオマルハナバチおよびトラマルハナバチの中腸ならびにマルピーギ管であったが、これはセ

Fig. 3. The developmental stages of a microsporidium stained with Giemsa infecting the midgut in a *Bombus hypocrita* male. a: meront, b: sporont, c: sporoblast, d: mature spore.

イヨウオオマルハナバチに寄生した *N. bombi* の寄生部位 (McIvor and Malone, 1995; Schmid-Hempel and Loosli, 1998) と一致した。以上の結果、孢子サイズ、孢子に内在する極系の巻き数、発育ステージ、さらには寄生部位などの比較により、本微孢子虫の形態的および生態的特性は *N. bombi* と近似しているものと判断した。

N. bombi は原生生物の中の微孢子虫門微孢子虫綱に属し、セイヨウミツバチに感染する *N. apis* と混同されてきたが、Eijnde and Vette (1993) および McIvor and Malone (1995) の研究から別種であることが明らかにされた。微孢子虫 *N. bombi* はマルハナバチ類のみに感染し、現在までに北ヨーロッパ、北アメリカ (Macfarlane et al., 1995)、スイス (Shykoff and Schmid-Hempel, 1991) およびスウェーデン (Stark, 私信) の在来種に感染が確認されているが、日本在来種での感染報告はない。本報告は、日本に輸入されたセイヨウオオマルハナバチから *N. bombi* 様微孢子虫が検出された

Table 1. Comparison of microsporidian spores isolated from *Bombus terrestris* and other insects

Microsporidia	Host insect	Spore shape	Spore size ^d (μm)		The number of coiled polar filament
			Length Mean $\pm$ S.D.	Width Mean $\pm$ S.D.	
<i>Nosema bombi</i> -like	<i>Bombus terrestris</i>	Ellipsoidal	5.07 $\pm$ 0.44 a	2.83 $\pm$ 0.27 a	16–22
<i>N. bombi</i> ^a	<i>B. terrestris</i>	Ellipsoidal	4.88 $\pm$ 0.42 a	2.88 $\pm$ 0.42 a	14–18
<i>N. apis</i> ^a	<i>Apis mellifera</i>	Ellipsoidal	5.59 $\pm$ 0.71 b	2.99 $\pm$ 0.42 a	18–44
<i>N. bombycis</i> ^{bc}	<i>Bombyx mori</i>	Ovoidal	3.80 $\pm$ 0.21 c	2.20 $\pm$ 0.19 b	10–13

^a McIvor and Malone (1995).^b Fujiwara (1980).^c Iwano and Ishihara (1991b).^d Means within each column followed by the same letter are not significantly different at 5% level by the Tukey's test.Table 2. The cross infectivity of a microsporidian spore isolated from *Bombus terrestris* on the Japanese bumblebees

Bumblebee	Caste	Day period until death after inoculation (days)	Developmental stage found in dead adult
<i>Bombus hypocrita</i>	New queen	1	Meront
	Male	1	Meront
	Male	1	Meront
	Male	2	Meront
	Male	4	Meront
	Male	6	Meront
	Male	16	Meront · Sporont · Sporoblast · Spore
<i>B. diversus</i>	New queen	10	Meront
	Male	1	Meront
	Male	1	Meront
	Male	1	Meront
	Male	4	Meront
	Male	7	Meront
	Male	9	Meront
	Male	16	Meront
	Male	24	Meront
	Worker	2	Meront
	Worker	11	Meront

Fig. 4. Electron micrographs of a microsporidium infecting the midgut in a *Bombus hypocrita* male. a: meront, b: spore, N: nuclear, PF: polar filament.

初事例となる。微胞子虫病に感染した個体は、飛翔力の消失、攻撃性の増加、女王バチの卵巣の縮小といった影響がみられる (Famthan and Potter, 1914)。*N. bombi* の近縁種とされる *N. apis* に感染したミツバチはマルハナバチと同様に飛翔能力が低下するが (Kearns and Thomson, 2001)、両者の病原体に起因した微胞子虫病の外部的徴候は発現しにくい、病気の診断が困難な場合が多い。また *N. bombi* は数種の異なるマルハナバチから分離されているが、これらが同一種であるかどうかは不明である (Ruijter, 1997)。このように、*N. bombi* は病原性が強い上に、分類学的・生態学的知見も十分でないことから、今後我が国に本種が侵入した場合、その影響の評価はきわめて困難と考えられる。

近年、アメリカ合衆国の増殖工場で大量増殖されていた同国西部地域用のマルハナバチ *Bombus occidentalis* が *N. bombi* に感染したことで増殖に深刻な打撃を受けた。このことによって、西部地域には生息していない東部地域用のマルハナバチ *Bombus impatiens* を出荷することになった (Kearns and Thomson, 2001)。しかし、このようなコロニーの大量移送は病気をより一層拡散させることにつながるものとして危惧される。また、商品として輸入されたセイヨウオオマルハナバチからマルハナバチポリブダニ *Locustacarus buchneri* が発見され (五箇ら, 2000)、逃亡したセイヨウオオマルハナバチからこのダニが日本在来マルハナバチ野生個体群に水平感染していることも明らかにされている (Goka et al., 2001; 五箇ら, 2002)。さらに欧州産の野外のセイヨウオオマルハナバチは鞭毛虫トリパノゾーマ属の *Crithidia bombi* (Shykoff and Schmid-Hempel, 1991) や胞子虫の *Apicystis bombi* (Liu et al., 1974; Lipa and Triggiani, 1996; Macfarlane et al., 1995) の感染率が高いことが知られており、これらの病原体も商品コロニーとともに日本に持ち込まれる恐れがある。こうした寄生物の中でも特に *N. bombi* は注意を要する種と考えられる。

今回分離された微胞子虫が *N. bombi* であることを確認するためには分子遺伝的解析も含めた更なる詳しい調査が必要であるが、*N. bombi* である可能性が高い。今後、セイヨウオオマルハナバチの野生化が進行すればマルハナバチポリブダニと同様に日本産のマルハナバチ個体群に *N. bombi* が感染し、在来個体群に打撃を与える恐れがある。病気の侵入を回避するためには、導入されるセイヨウオオマルハナバチコロニーのコロニー内感染率を含めた感染状況をチェックするとともに、野外におけるセイヨウオオマルハナバチおよび日本産マルハナバチにおける感染状況のモニタリングも行う必要があり、早急に検疫体制を整えることが重要であろう。

引用文献

- Dafni, A. (1998) *Bee World* 79(3): 113–114.
 DeGinolami, P. C., C. R. Ezratty, G. Desai, A. McCullough, D. Asmuth, C. Wanke and M. Federman (1995) *J. Clin. Microbiol.* 33: 805–810.
 Eijnde, J. Van den and N. Vette (1993) *Proc. Exp. Appl. Ent. N. E. V. Ams.* 4: 205–208.
 Famthan, H. B. and A. Potter (1914) *Ann. Trop. Med. Parasit.* 8: 623–638.
 藤原 公 (1980) *日蚕雑* 49: 229–236. [Fujiwara, T. (1980) *J. Seric. Sci. Jpn.* 49: 229–236.]
 五箇公一 (1998) *日本生物地理* 53: 91–101. [Goka, K. (1998) *Bull. Biogeogr. Soc. Jpn.* 53: 91–101.]
 五箇公一 (2002) *昆虫と自然* 37(3): 8–11. [Goka, K. (2002) *Nature and Insects* 37(3): 8–11.]
 五箇公一・マルハナバチ普及会 (2003) *植物防疫* 57: 452–456. [Goka, K. and Bumblebee Working Group in Japan (2003) *Plant Protect.* 57: 452–456.]
 五箇公一・岡部貴美子・丹羽里美・米田昌浩 (2000) *応動昆* 44: 47–50. [Goka, K., K. Okabe, S. Niwa and M. Yoneda (2000) *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 44: 47–50.]
 Goka, K., K. Okabe, M. Yoneda and S. Niwa (2001) *Mol. Ecol.* 10: 2095–2099.
 Iwano, H. and R. Ishihara (1991a) *J. Invertebr. Pathol.* 57: 211–219.
 岩野秀俊・石原 廉 (1991b) *日蚕雑* 60: 279–287. [Iwano, H. and R. Ishihara (1991b) *J. Seric. Sci. Jpn.* 60: 279–287.]
 岩崎正男 (1995) *ミツバチ科学* 16: 17–23. [Iwasaki, M. (1995) *Honeybee Science* 16: 17–23.]
 Kawarabata, T. and R. Ishihara (1984) *J. Invertebr. Pathol.* 44: 52–62.
 Kearns, C. A. and J. D. Thomson (2001) *The Natural History of Bumblebees: A Sourcebook for Investigations*. University Press of Colorado, Colorado. 130 pp.
 Larsson, J. I. R. (1988) *Archive Protistend.* 136: 1–37.
 Lipa, J. J. and O. Triggiani (1996) *Apidologie* 27: 29–34.
 Liu, H. J., R. P. Macfarlane and D. H. Pengelly (1974) *J. Invertebr. Pathol.* 23: 225–231.
 Macfarlane, R. P., J. J. Lipa and H. J. Liu (1995) *Bee World* 62: 141–153.
 松浦 誠 (1993) *マルハナバチによるトマトの花粉媒介・植物防疫協会, 東京*, pp. 173–176. [Matsuura, M. (1993) In *Pollination for Tomato by Bumblebees*. Japan Plant Protection Association, Tokyo, pp. 173–176.]
 McIvor, C. A. and L. Malone (1995) *NZ J. Zool.* 22: 25–31.
 小野正人 (1997) *農業バイオテクノロジー関連技術調査報告書*. pp. 26–44. [Ono, M. (1997) In *Agrichemical Biotechnology Related Technical Investigation Report*. pp. 26–44.]
 Ruijter, A. de (1997) *Acta Horticult.* 437: 261–269.
 Schmid-Hempel, P. and R. Loosli (1998) *Apidologie* 29: 525–535.
 Shykoff, J. A. and P. Schmid-Hempel (1991) *Apidologie* 22: 117–125.
 Takagi, I., K. Yamada, T. Sato, T. Hanaichi, T. Iwamoto and L. Jin (1990) *J. Electron Microsc.* 39: 67–68.
 Vavra, J. (1976) In *Comparative Pathology Vol. 1. Biology of the Microsporidia* (L. A. Bulla, Jr. and T. C. Cheng eds.). Plenum Press, New York, pp. 87–111.
 鷲谷いづみ (1998) *日生態誌* 48: 73–78. [Washitani, I. (1998) *Jpn. J. Ecol.* 48: 73–78.]