

小笠原産ハスモンヨトウにおける昆虫感染性微胞子虫の
感染動態および分離株の系統学的類縁関係の解明

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源生産科学専攻
博士後期課程

志賀野 倫明

2015

目次

緒言	1
1 章 ハスモンヨトウの発生消長および感染率調査	4
1-1 序論	4
1-2 材料および方法	6
1-2.1 小笠原のハスモンヨトウの発生消長	6
1-2.2 感染率調査	7
1-2.3 微孢子虫胞子の回収	7
1-2.4 気象記録の収集	8
1-3 結果	9
1-3.1 小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウの発生消長	9
1-3.2 感染率調査	9
1-4 考察	13
1-4.1 小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウの発生消長	13
1-4.2 感染率調査	13
2 章 SSU rRNA 遺伝子配列解析	15
2-1 序論	15
2-2 材料および方法	17
2-2.1 DNA 抽出	17
2-2.2 SSU rRNA 遺伝子の増幅	17
2-2.3 クローニング	18
2-2.4 遺伝子配列解析	19
2-3 結果	21
2-3.1 配列解析	21

2-4 考察	32
2-4.1 小笠原株の解析結果	32
2-4.2 他の地域株との比較と小笠原株の多様性について	33
3 章 3 種のチョウ目昆虫に対する感染性の差異	34
3-1 序論	34
3-2 材料および方法	35
3-2.1 宿主昆虫	35
3-2.2 3 種昆虫への接種	36
3-2.3 感染の確認	36
3-2.4 解剖と感染部位の調査	36
3-3 結果	37
3-3.1 ハスモンヨトウへの感染および感染部位	37
3-3.2 オオタバコガへの感染および感染部位	37
3-3.3 カイコへの感染および感染部位	38
3-4 考察	45
3-4.1 ハスモンヨトウへの感染および感染部位	45
3-4.2 オオタバコガへの感染および感染部位	45
3-4.3 カイコへの感染および感染部位	46
3-4.4 配列解析結果を基にした属ごとの感染性について	46
4 章 胞子形成様式による系統間の比較	48
4-1 序論	48
4-2 材料および方法	50
4-2.1 胞子サイズの計測	50
4-2.2 胞子形成様式の観察	50

4-3 結果	52
4-3.1 胞子サイズの計測	52
4-3.2 胞子形成様式の観察	52
4-4 考察	62
4-4.1 胞子サイズの計測	62
4-4.2 胞子形成様式の観察	62
5 章 総合討論	63
5-1 小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウ由来微胞子虫株の種多様性	63
5-2 小笠原株の微生物農薬資材としての有用性	63
摘要	65
謝辞	67
引用文献	68

緒言

農業は約 1 万年前から始まったといわれており、以降、人間は病害虫による被害を抑えるための戦いを強いられてきた。かつては植物や天敵などの天然物由来のものによる防除が行われていたが、19 世紀頃から農薬の開発が進み、化学物質による効果的な薬剤を大量に施用できるようになった。いわゆる科学農薬は第二次世界大戦後の経済復興や食糧増加と農作業の軽減に貢献したといわれているが、その一方で、日本では化学農薬への依存を引き起こし、また同じ種類の農薬を多用・連用したため、天敵などの生物相を貧困化させ、リサージェンスや抵抗性害虫が発生する原因となった。また、これらを防除するために新たな農薬を多用するという悪循環が発生し、過剰使用による農作物残留や環境汚染などが問題となった。

これらの問題を改善するため、総合的有害生物管理(Integrated Pest Management: IPM)が 1960 年代に提唱された(Norris et al. 2002)。IPM は「害虫防除の実施にあたり、生態学的に正しい手段を駆使して殺虫剤による害を最小に、利益を最大にする」こととされ、以前のような病害虫や雑草の徹底的な防除ではなく、経済的に許容できるレベル以下に被害を抑制することが目的とされた。IPM に用いられる防除方法には化学農薬を用いた化学的防除、栽培時期の調節や周辺環境の改変などを行う耕種的防除、捕殺や物理的な遮断を始めとした機械的・物理的防除、生物農薬や天敵利用を用いる生物的防除などがある(斉藤ら 1999)。これらの方法を経済的に無理のない範囲で最大限効果を発揮するよう矛盾なく組み合わせることで、問題となっている化学農薬の使用を抑制することができる。また、防除技術の研究も進められており、生物農薬ではフェロモン剤ならびに天敵である昆虫や微生物などが市販化され、化学農薬では人獣や天敵への安全性が高い薬剤などが開発されている。しかし、実際には作物へ被害を生じる病害虫や雑草の種類は多く、同時に数種類が発生することもある。そのため複数の防除手段を臨機応変に

組み合わせて応用できるシステムが重要であり、現在でも防除手法や防除資材の開発は IPM の発展に必要不可欠である。

昆虫類に病原性を示す微胞子虫は、偏性細胞内寄生性の単細胞真核生物である。原生生物から哺乳類に至るまで様々な動物に感染し(Wittner and Weis 1999)、これまでに 1,300~1,500 種が存在することが知られていて(Vávra and Lukeš 2013)、宿主に感染した場合には微胞子虫病を引き起こす。最初に報告された微胞子虫は *Nosema bombycis* であり、1860 年代後半に Balbiani と Pasteur の研究によってカイコ微粒子病の原因生物として発見された(Wittner and Weis 1999 ; Peyretaillade et al. 2011)。 *N. bombycis* がカイコ若齢幼虫に感染した場合、多くの個体が微粒子病によって死亡し、生き残った感染個体が蛹化・営繭したとしても生糸の生産量や品質に悪影響を及ぼすことになる(Bhat et al. 2009)。これまでにカイコ微粒子病によってヨーロッパをはじめとする様々な地域で養蚕業に多大なる被害をもたらした(Steinhaus 1949)。他にも、*N. apis* や *N. ceranae* は、セイヨウミツバチ(*Apis mellifera*)やトウヨウミツバチ(*A. cerana*)に感染し、宿主ミツバチのコロニーに壊滅的な被害をもたらしていると言われている(Chen and Huang 2010)。また、魚に感染性のある微胞子虫は水産業に経済的な損失を与え、人に感染性のある微胞子虫は免疫不全の患者に対し、日和見感染することが知られている(Didier and Weiss 2006)。

一方で、昆虫感染性の微胞子虫 *Paranosema (Antonospora) locustae* (Sokolova et al. 2003)がアメリカでバッタ目害虫に対する微生物防除資材として使用されている(Slamovits et al. 2004)。微胞子虫の中には水平伝播に加えて垂直伝播する株も存在するため、数世代にわたる長期的な防除効果が期待できる。しかし、現在のところ微生物農薬として利用されているのは本資材のみで、野外にはまだ知られていない防除資材として潜在的な有用株が存在している可能性がある。

本研究では東京都小笠原諸島父島にて、難防除害虫に指定されているハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) に感染する微胞子虫株から微生物防除資材となりうる株を検索することを最終目的としたが、今回は微胞子虫株の探索、ならびに分離株の系統関係およびそれらの性状調査を実施することに主眼を置いた。小笠原諸島は亜熱帯に属する太平洋上にある 30 余の島々から構成されている。捕食者の少ない独自の生態群集が形成されており、多くの固有昆虫も生息している(戸田ら 2009)。ハスモンヨトウは耐寒性がないことから、通常本州では越冬することは困難であるが、亜熱帯気候に属する沖縄では一年中ハスモンヨトウが発生しており、同じ気候区分に属する小笠原でも年中発生していると考えられる(Tojo et al. 2008)。

本論文では、まず第 1 章で、微胞子虫を分離するためにハスモンヨトウを捕獲した。その結果を「ハスモンヨトウの発生消長および感染動態」として示した。1 章で分離した微胞子虫株は 2~4 章で系統関係および感染性について調査した。2 章では、分子生物学的手法を用いて分離株の系統解析をするため、「SSU rRNA (Small Sub Unit ribosome RNA) 遺伝子配列解析」を行った。3 章では、感染性を調査するため「3 種チョウ目昆虫に対する感染性の差異」を行った。微胞子虫は宿主に感染した場合、胞子形成を行い、その様式を観察することで、形態学的特徴から系統関係を明らかにすることができる。そこで、4 章では、胞子形成様式を観察した結果を「胞子形成様式による系統間の比較」として示した。系統関係調査の結果から、小笠原諸島のハスモンヨトウから分離された微胞子虫株の種多様性について、また、分離株の微生物農薬資材としての有用性についてまとめた。

1 章 ハスモンヨトウの発生活長および感染率調査

1-1 序論

昆虫を宿主とする微生物は多く存在しており、これらを用いた微生物農薬は従来使用されていた化学農薬よりも環境への負荷が少ないと言われている。現在、微生物農薬として利用されている微生物は細菌、カビ、ウイルス、線虫などであり、特にハウス栽培や有機栽培に多く使用されている。微生物農薬に活用される微生物の多くは宿主特異性が高く、特定の害虫に対してのみ高い殺虫効果を示す。そのため、複数種の害虫が発生する農業現場では、化学農薬を含む複数の防除手段を用いた複合的な防除が必要となる。そのため、微生物農薬の場合、あらゆる害虫種に対応するため、新たな微生物資材の確保が求められている。

昆虫感染性微胞子虫は、宿主昆虫に感染して成長遅延を引き起こし、宿主を衰弱させ、重度感染して致死させる場合がある。また一部の株は、通常の経口感染による水平伝播に加えて、経卵感染や経卵巣感染によって垂直伝播することで、次世代にも感染を引き起こすことがある。そのため、微生物農薬として活用できれば数世代にわたる長期防除剤としての効果も期待できる。しかし、現在微生物農薬として利用されているのは *Paranosema (Antonospora) locustae* (Sokolova et al. 2003)のみであり、アメリカでバッタ類やコオロギに対して使用されている (Slamovits et al. 2004)。他にも微生物農薬として有用な株が存在している可能性があり、農業害虫から有用株の検出が進められている。そこで、本研究では微生物農薬に施用可能な有用株を検索することを目的とし、農業害虫であるハスモンヨトウから微胞子虫の検索を行った。

ハスモンヨトウは日本を含む東南アジアを中心として広く分布している。日本では 1950 年代以降から害虫として問題視されるようになり、野菜・花卉・果樹など広範囲の作物を食害する広食性害虫である。国内では年に 5~6

回発生し(井藤ら 2007)、関東・中部以南での被害が比較的多く報告されている。耐寒性が低いことから露地での越冬はできないと言われているが、沖縄のような亜熱帯地域や九州の一部では越冬可能である。越冬できないとされる地域でも毎年被害が発生しているが、それらは気温が上がる 4~6 月頃から国内で越冬した個体に由来したり、台湾や中国南部から飛来していると言われてくる個体に由来する(Tojo et al. 2013)。成長した老熟幼虫は化学農薬が効きにくく難防除害虫に指定されており、また、多い時には一頭あたり約 3,000 粒も産卵するため、農作物への被害が急激に増加する場合がある。防除手段は、成虫はフェロモントラップで捕殺し、幼虫は集団を形成している若齢幼虫のうちに農薬を散布、卵は発見次第除去することなどが有効である。そのため効果的かつ効率的な防除を行うためには、発生消長を把握し、発生状況に応じた処置が必要となる。すでに、ハスモンヨトウなどの一部の害虫では、県試験場などが発生予察の情報を発表しており、その防除に活用されている。

そこで本研究では、微生物農薬として有用な微胞子虫株を小笠原諸島で検索することを目的とした。小笠原諸島は亜熱帯気候に属しているためハスモンヨトウが一年中発生しているといわれており、微胞子虫を検出するための供試試料を多く確保できることが期待できる。ハスモンヨトウを捕獲するために性フェロモントラップを 2012 年 4 月から 2015 年 3 月まで設置し、捕獲したハスモンヨトウ雄成虫からは多くの微胞子虫株を分離した。本章では小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウの発生消長および微胞子虫の感染動向について記載する。

1-2 材料および方法

1-2.1 小笠原のハスモンヨトウの発生消長

小笠原諸島父島(Fig. 1)においてハスモンヨトウに対する捕獲調査を行った。ハスモンヨトウの捕獲は、大林隆司研究員(東京都小笠原亜熱帯農業センター)に依頼した。性フェロモントラップで捕獲するため、性フェロモン剤のSEルアー(ハスモンヨトウ用)と粘着版(Sankei Chemical Co., Ltd.)を使用した。小笠原亜熱帯農業センター施設内圃場に、高さが 0.8m となるようにトラップを設置した(Fig. 2)。設置期間は 2012 年 4 月から 2015 年 3 月までの 3 年間で、粘着板は 7 日ごとに交換した。

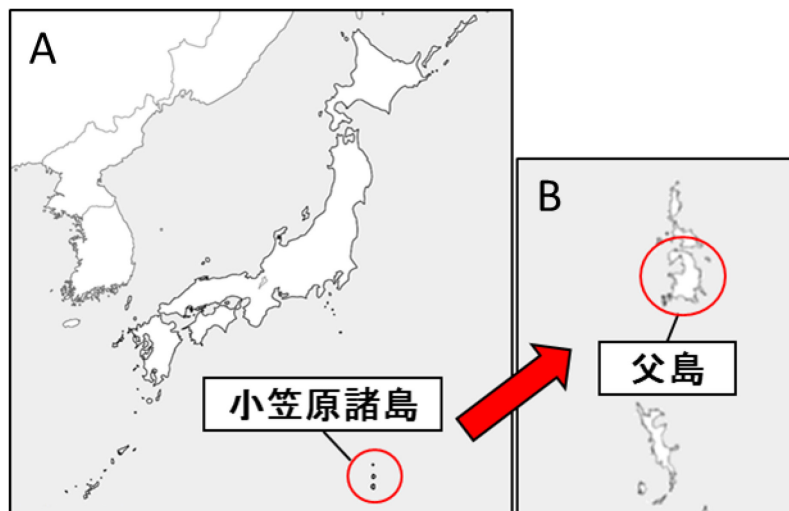


Fig. 1 小笠原諸島

A の赤丸は小笠原諸島、B の赤丸は父島を示す。



Fig. 2 粘着式性フェロモントラップ

(キャップ：SE ルアー ハスモンヨトウ用)

トラップについている金網は、鳥やネズミなどの侵入を防ぐために設置した。

1-2.2 感染率調査

捕獲したハスモンヨトウは粘着版からピンセットで引きはがし、1頭ずつ乳鉢に入れ、生理食塩水(0.85%)1mlを加えて磨砕した。磨砕液からプレパラートを作成し、位相差顕微鏡 DX51(×400)(OLYMPUS)で微胞子虫胞子の有無を観察し、胞子の存在を確認したら感染個体と判定した。

1-2.3 微胞子虫胞子の回収

感染が確認された試料は、胞子を回収するために粗精製を行った。漏斗とろ紙替わりの Lens Cleaning Tissue (GE Healthcare Life Sciences)を用いて試料をろ過し、さらに生理食塩水を流して胞子を含むろ液を回収した。ろ液は 15ml の遠沈管に回収し、卓上多本架遠心機 LC-200 (TOMY SEIKO Co., Ltd.)で 3,000rpm で 10 分間遠心分離した後、胞子層の上にある宿主昆虫由来の残渣をピペティングしてできる限り取り除き、残った胞子を含む沈殿物は生理食塩水を適量加えて懸濁した。この遠心分離の作業を 2・3 回繰り返す。

返して、孢子液を精製した。粗精製後の孢子液は 4℃で保存した。

1-2.4 気象記録の収集

発生消長と感染率への関連性を確認するため、小笠原諸島父島の降水量と平均気温の記録を気象庁 (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>) から得た。

1-3 結果

1-3.1 小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウの発消長

捕獲実験の結果、2012年度は1,872頭、2013年度は2,672頭、2014年度は2,807頭捕獲し、3年間の合計は7,351頭であった(Table 1)。つまり、ハスモンヨトウは年間を通じて発生していたため、1年中捕獲することができた。各月の捕獲数は多いが、2012年6月は43頭、8月は17頭、10月は36頭、2013年8月は93頭、2014年8月は110頭と、他の月と比較して減少した(Table 1、Fig.3-A)。毎年8月頃に捕獲数が低下していたが、8月の気温は毎年一番高い時期であることが関係しているものと思われる(Table 2、Fig. 3-B)

1-3.2 感染率調査

感染個体数は2012年度が1,872頭中74頭(3.95%)に感染、2013年度が2,672頭中87頭(3.26%)に感染、2014年度が2,807頭中86頭(3.06%)に感染し、3年間では7,351頭中247頭(3.36%)に感染していた(Table 1、Fig.3-A)。感染個体は2012年の8月と10月以外は毎月確認された。特に、春から初夏(4～7月頃)に感染個体が多くなり、2012年5月に24頭(12.44%)、2013年6月に29頭(10.90%)、2014年6月に20頭(9.22%)と他の月と比べて増加し、平均値(3.36%)と比較すると約3倍にまで上昇した。

Table 1 ハスモンヨトウの発生消長および微胞子虫の感染率

A (2012年度)				B (2013年度)				C (2014年度)									
年	月	捕獲数 (頭)	感染数 (頭)	感染率 (%)	年	月	捕獲数 (頭)	感染数 (頭)	感染率 (%)	年	月	捕獲数 (頭)	感染数 (頭)	感染率 (%)			
2012	4	239	9	3.77	2013	4	156	8	5.13	2014	4	267	2	0.75			
	5	193	24	12.44		5	182	15	8.24		5	266	13	4.89			
	6	43	3	6.98		6	266	29	10.90		6	217	20	9.22			
	7	123	10	8.13		7	120	4	3.33		7	125	13	10.40			
	8	17	0	0.00		8	93	5	5.38		8	110	5	4.55			
	9	154	1	0.65		9	200	5	2.50		9	201	6	2.99			
	10	36	0	0.00		10	112	3	2.68		10	151	1	0.66			
	11	253	10	3.95		11	285	2	0.70		11	185	2	1.08			
	12	218	9	4.13		12	264	2	0.76		12	321	2	0.62			
	2013	1	209	4		1.91	2014	1	402		4	1.00	2015	1	387	7	1.81
		2	237	3		1.27		2	338		4	1.18		2	339	7	2.06
		3	150	1		0.67		3	254		6	2.36		3	238	8	3.36
合計		1,872	74	3.95	合計		2,672	87	3.26	合計		2,807	86	3.06			

D (2012~2014年度)			
年	捕獲数 (頭)	感染数 (頭)	感染率 (%)
2012	1,872	74	3.95
2013	2,672	87	3.26
2014	2,807	86	3.06
合計	7,351	247	3.36

Table 2 小笠原諸島父島の気温と降水量

A (2012年度)			B (2013年度)			C (2014年度)								
年	月	平均気温 (°C)	降水量 (mm)	年	月	平均気温 (°C)	降水量 (mm)	年	月	平均気温 (°C)	降水量 (mm)			
2012	4	20.7	157.5	2013	4	20.8	66.0	2014	4	20.1	58.0			
	5	23.2	144.0		5	23.5	241.5		5	23.1	245.5			
	6	26.6	56.5		6	26.4	77.0		6	26.7	82.0			
	7	27.4	6.5		7	27.4	24.5		7	27.9	21.0			
	8	27.9	26.5		8	28.0	18.5		8	28.1	28.0			
	9	27.3	279.5		9	27.4	196.5		9	27.0	130.0			
	10	26.8	144.0		10	25.8	88.5		10	25.7	173.5			
	11	22.1	67.5		11	21.2	159.5		11	21.8	131.0			
	12	19.1	18.5		12	18.8	84.0		12	19.0	93.5			
	2013	1	17.8		55.5	2014	1		17.8	99.0	2015	1	17.0	69.5
		2	17.3		11.0		2		18.0	3.0		2	18.2	11.5
		3	21.0		4.0		3		19.0	45.5		3	20.4	4.0

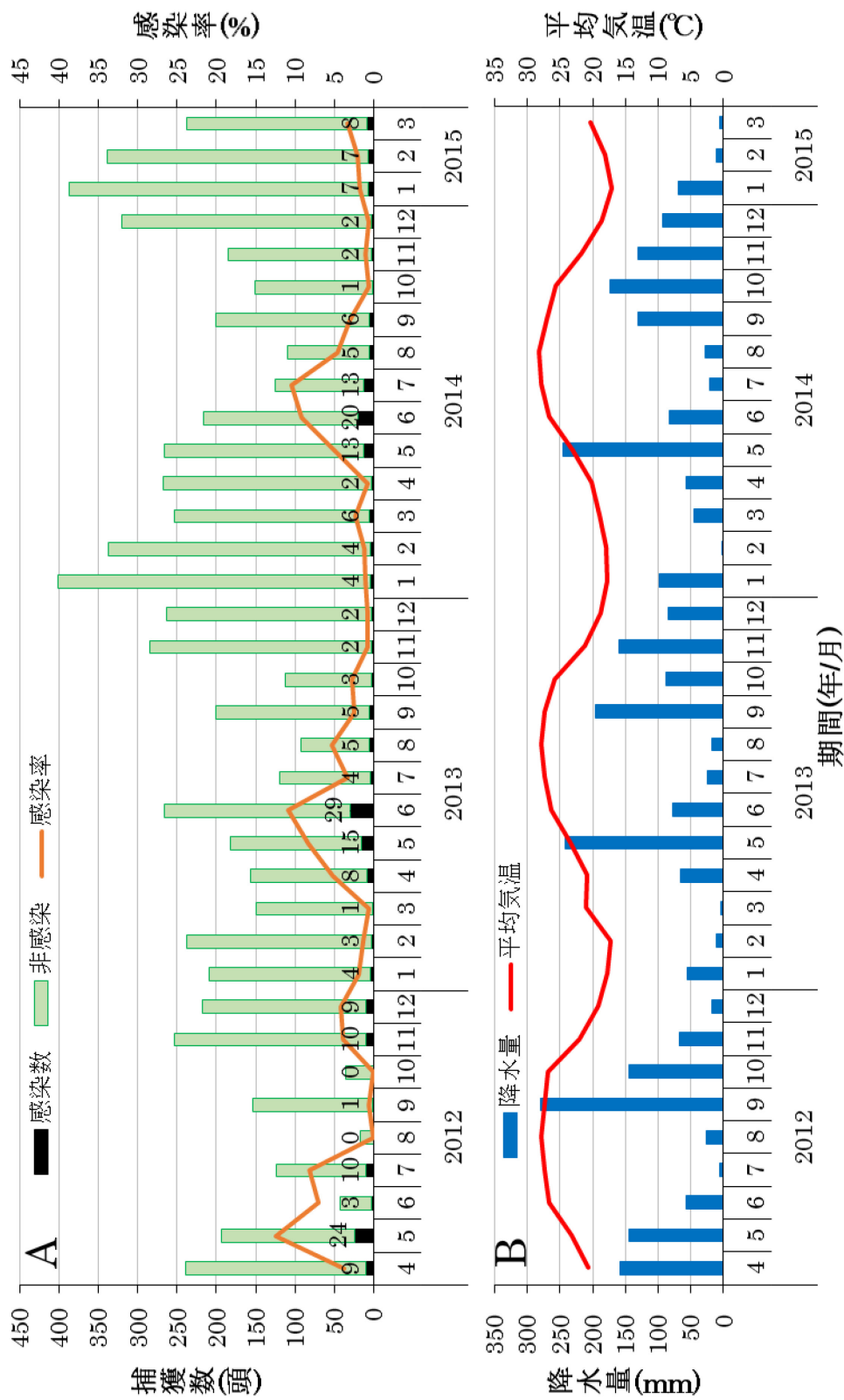


Fig. 3 発生产消長と感染率の気象条件との比較

Aはハスモンヨトウの発生产消長および微生物の感染率を示す。Bは小笠原諸島父島の気温と降水量を示す。

1-4 考察

1-4.1 小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウの発消長

ハスモンヨトウは小笠原で一年中発生していることが示された。小笠原は亜熱帯の気候区分で、平均気温は 17.0～28.1℃であり (Table 2)、ハスモンヨトウの発育零点 10.3℃ (Miyashita 1971) を下回らなかった。冬でも捕獲数は多く、ハスモンヨトウにとって越冬可能な地域であることが示された。しかし、8 月頃には捕獲数が減少する傾向が確認された。捕獲数の減少の理由として天敵の出現や気象条件が考えられる。8 月の気候は気温が高く、降水量が少ない。ハスモンヨトウは恒温条件では 25℃での発育がよいと言われている (Miyashita 1971) が、8 月の気温は毎年 25℃を超えており、地表表面ではこれ以上の温度になっていたことが予想される。生物は不利な環境条件におかれたとき休眠する場合がある。ハスモンヨトウは冬季の休眠については調査が行われている (松浦ら 1991) が、夏の休眠に言及されることは少ない。高温条件下でハスモンヨトウにどのような影響を受けるのか、生理的性状は不明であるが、暑さを避けるために休眠または成長阻害を受けて個体数が減少した可能性が考えられる。

1-4.2 感染率調査

微胞子虫に感染した個体がほぼ毎月確認された。宿主であるハスモンヨトウは一年中多く発生していることから、微胞子虫が継続して感染できる環境にあるといえる。感染率は平均 3%程度であるが、毎年、春から初夏(4～7 月頃)に感染個体が増加し、感染率も 10%程度まで高くなることが確認された。小笠原では春季に降水量が高くなっている。降雨によって、感染体の排泄物や死体から微胞子虫の胞子が水流によって拡散しやすい状況になっていることが示唆された。また、当地域は多湿な気候であるため、微胞子虫の乾燥を防いで胞子の活性を維持する要因になっていると考えられる。降水量は秋季

(9～11 月頃)にも多くなっているが、感染個体は春季のようには上昇しなかった。これは直前にハスモンヨトウの捕獲数が少なかったことと関係していると考えられる。このことから、宿主昆虫の発生状況も微胞子虫病が多く発生する要因であると示唆された。

2 章 SSU rRNA 遺伝子配列解析

2-1 序論

微胞子虫はこれまでにたびたび分類変更が行われている (Keeling 2009)。微胞子虫は真核生物の特徴である核膜に包まれた核を持っているにも関わらず、ミトコンドリアを持たない生物であるといわれていた。Cavalier-Smith (1983)は、ミトコンドリアなどの細胞内共生で獲得したと考えられている細胞小器官を持たない生物種は、獲得以前に存在していた原始的な真核生物であるとし、アーケゾア仮説を提唱した。微胞子虫を含む、これらの特徴を持った生物はアーケゾアに分類され、真核生物の起源を明らかにするために重要な生物といわれた。遺伝子解析技術の発展とともに、様々な遺伝子が解析されるようになり、大腸菌の全ゲノムが解読されたことにより、微胞子虫でも遺伝子解析が進められた。その結果、タンパク質遺伝子の解析(seryl-tRNA synthetase, transcription initiation factor IIB, GTP-binding protein, ubunit of the vacuolar ATPase)をはじめとする研究から、微胞子虫が菌類と類縁関係にあると考えられるようになった (Katinka et al. 2001)。また、微胞子虫からミトコンドリア由来の熱ショックタンパク質(Hsp70)が発見され、*Paranosema (Antonospora) locustae* (当時は *Nosema locustae*) や *Vairimorpha necatrix*、*Encephalitozoon cuniculi*にも存在することが発見された (Germota et al. 1997; Hirt et al. 1997; Peyretailade et al. 1998a)。その後、微胞子虫はミトコンドリアが退化したとされるマイトソームも発見されたため、アーケゾア仮説は否定され、微胞子虫は現在、カビに近い菌類であると分類された (Thomarat et al. 2004; Vivarès et al. 2002; Keeling et al. 2000)。

微胞子虫はゲノムが退化または濃縮化していると言われており、遺伝子サイズも小さい。ゲノムサイズは種によって大きく異なり、最も小さいものは *Encephalitozoon intestinalis* の 2.3Mbp (Peyretailade et al. 1998b)で、最

も大きいものは *Glugea antherinae* の 19.5Mbp (Biderre et al. 1994) である。原核生物である大腸菌は 4.6Mbp であることから、原核生物より小さい種が存在することが確認されている。

微胞子虫の分子生物学的手法を用いた系統解析では、SSU rRNA 遺伝子配列解析が多く行われている。リボソームはタンパク質合成するため生物にとって必要不可欠であり、ほぼすべての生物細胞内で常在的に存在している (Woese 2004)。リボソームをコードしている遺伝子の保存性は高く、広い範囲の生物種を網羅的に検索することができる (Woese 1987)。これらの理由から、rRNA 遺伝子は配列解析に適していると考えられ、様々な生物種で使用されており、より多くの既知生物株と比較することができる。よって、本研究でも分離された微胞子虫株の系統関係を明らかにするため、SSU rRNA 遺伝子解析を行った。

2-2 材料および方法

解析に使用した微孢子虫株は、1章で2012年度に分離された74株の中から、胞子の形態的特徴によって12株を選抜した。株名はOSL-1~12とした。OSLの3文字は、小笠原(Ogasawara)のハスモンヨトウ(*S. litura*)由来株であることを表す。数字は株の識別番号である。

2-2.1 DNA 抽出

DNA抽出では、ガラスビーズ法(Hatakeyama and Hayasaka 2002)を使用した。0.5mlチューブに胞子液を 10^8 胞子以上を取り、STE buffer (10mM Tris HCl pH8.0, 1mM EDTA pH8.0, 10mM NaCl)で洗浄した。G8772 Glass beads, acid-washed (particle size 425-600 μ m) (シグマアルドリッチ株式会社) 150mgと、STE buffer 200 μ lを加え、VORTEX-GENIE 2 (M&S Instruments Inc)で30秒破碎した。回収用の1.5mlチューブに上澄みの150 μ lを回収し、作業用の0.5mlチューブにはSTE buffer 150 μ lを加えた後に、さらに1分破碎し、回収用の1.5mlチューブに上澄みの100 μ lを回収した。ブロックインキュベーターBI-525A (ASTEC)で95 $^{\circ}$ C 2分の熱処理を行い、エタノール沈殿してDNAを回収した。

2-2.2 SSU rRNA 遺伝子の増幅

微孢子虫のSSU rRNA遺伝子の約1,200bpを増幅した。sp-Taq DNA polymerase (Cosmo Genetech Co., Ltd)、10x sp-Taq buffer (Cosmo Genetech Co., Ltd)、2.5mM dNTP mix (Cosmo Genetech Co., Ltd)、プライマーとしてVN001F (5'-CTG CAG GTA CCA CCA GGT TGA TTC TGC CTG AC-3')と、VN001R (5'-GAG CTC GCA TGC GGT TTA CCT TGT TAC GAC TT-3') (Kawakami et al. 2001) (シグマアルドリッチジャパン株式会社に委託・合成)を使用した。PCR溶液はsp-Taq DNA polymeraseの終濃度が

0.025U/ μ l、プライマーは 0.5 μ M になるように調製した。サーマルサイクラーを使用し、変性 95°C 1 分、アニーリング 45°C 1 分、伸長 72°C 1 分 30 秒を 40 サイクル繰り返した。アガロースゲル電気泳動は Agarose, For Routine USE (シグマアルドリッチ株式会社)で 2%のアガロースゲルを作成し、100V で 30 分泳動した。電気泳動後はエチジウムブロマイドを 10,000 倍希釈したもので 20 分染色した。撮影には ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Inc.)を使用した。PCR 産物は GeneAll® Expin TM PCR SV (GENEALL BIOTECHNOLOGY CO., LTD)を用いて精製をした。精製後、エタノール沈殿法によって濃縮した。

2-2.3 クローニング

大腸菌を用いた遺伝子クローニングを行った。DynaExpress TA PCR Cloning Kit (pTAC-2) (BioDynamics Laboratory Inc.)を用いて、PCR 産物をプラスミドベクターに結合した。Ligation 反応は 16°C 2 時間で行った。ライゲーション産物は Competent cell ECOS DH5 α (Wako NIPPON GENE)に形質転換した。X-GAL 寒天培地「ニッスイ」(日水製薬株式会社)に、アンピシリン(0.1ng/100ml)加え、37°C 14 時間培養し、blue-white の選別によってコロニーの選抜を行った。さらに、DynaExpress TA PCR Cloning Kit (pTAC-2) (BioDynamics Laboratory Inc.)付属のプライマーの M13 F/R と、Quick Taq (東洋紡株式会社)を用いて、colony PCR を行い、コロニーの持つベクターを確認した。サーマルサイクラーを使用し、95°C 20 秒、55°C 20 秒、72°C 1 分 20 秒を 25 サイクル繰り返した。colony PCR 終了後、PCR と同様に電気泳動を行った。LB Broth, 1.1 G PER TABLET (シグマアルドリッチ株式会社)にアンピシリン(0.1ng/100ml)を加え、単離した菌を培養した。振とう培養は 37°C 14 時間行った。プラスミド抽出には EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Minipreps Kit (BIO BASIC INC)を使用した。

2-2.4 遺伝子配列解析

回収したプラスミドのシーケンス解析は株式会社ファスマックに委託した。プライマーは SP6 (5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3')と T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3')および 515 (5'-GTG CCA GCA GCC GCG GTA A-3')の 3 種を使用した。シーケンス解析で得られた配列は、CAP3 Sequence Assembly Program (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>)を使用して 3 本の配列を 1 本鎖の配列にした。1 本鎖にした配列は両端のプライマー(VN001 F/R)とプラスミド由来の配列を削除した。配列解析は National Center for Biotechnology Information の サイト (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (以下 NCBI)にて BLAST を利用して行った。プログラムは BLASTN 2.3.0+を用いた (Zhang et al. 2000; Morgulis et al. 2008)。

系統樹構築には、MEGA6 で近隣結合法のパラメーターには Tamura 3-parameter で作成した (Tamura et al. 2013)。微胞子虫の既知 SSU rRNA 遺伝子配列は GenBank (NCBI)から *Encephalitozoon cuniculi* (L07255)、*Endoreticulatus bombycis* (AY009115)、*Nosema apis* (U26534)、*Nosema bombycis* Sd-NU-IW8401 (D85504)、*Nosema bombycis* SES-NU (D85503)、*Nosema furnacalis* (U26532)、*Pleistophora* sp. Sd-Nu-IW8201 (D85500)、*Thelohania solenopsae* (AF031538)、*Trachipleistophora hominis* (AJ002605)、*Tubulinosema acridophagus* (AF024658)、*Vairimorpha necatrix* (Y00266)、*Vairimorpha* sp. NIS-M11 (D85501)、*Vairimorpha* sp. NIS-M12 (D85502)、*Vavraia culicis* (AJ252961)、*Vittaforma corneae* (U11046)15 種のデータを利用し、この他、直接供試試料として韓国のオオタバコガ由来 1 株 (*Vairimorpha kyonggii*) (阿久津ら 2000; 岩野ら 2002)、ベトナムのハスモンヨトウ由来 16 株 (*Nosema* sp. VS1-2007-1 ~

16(AB569590～AB569605))、インドネシアのハスモンヨトウ由来 3 株 (*Nosema* sp. ISL-1(LC052203～LC052205))とケブカノメイガ由来 3 株 (*Nosema* sp. ICP-1~3(LC052206～LC052208))、さらに日本大学生物資源科学部の圃場で捕獲されたハスモンヨトウ由来 6 株(NUSI-1201~06)を使用した。また、外群には大腸菌 *Escherichia coli* (EU014689)を使用した。

2-3 結果

2-3.1 配列解析

シーケンス解析で得られた配列を、NCBIでBLAST検索を行い、スコアの最も高い上位5つの配列をTable 3-A~Cに示した。得られた配列はOSL-10が1,294bpと最も高く、それ以外の供試株は1,165~1,186bpであることから、OSL-10は他の11株よりも約100bpも長かった。BLASTの結果では、配列の相同性(Ident)が高く、各株の最もスコアが高い種では99~100%であった。

MEGA6を用いたアラインメント解析として、既知株の*N. bombycis* SES-NUと*V. necatrix*、*Pleistophora* sp. Sd-Nu-IW8201、*T. hominis*を加えたものを示した(Fig. 4)。OSL-10が長いため、いたるところで空欄がみられるが、Fig. 4-Dの379~394bpの間のようにOSL-10が持たない配列部分も存在した。OSL-6とOSL-7は、配列の全長が同程度で1,200未満である他の9株と比較すると所々で小さな欠損部分があり、逆にFig. 4-Eの492~522bpとFig. 4-Jの1,110~1,149bpの間に9株にはない配列を含んでいた。また、OSL-11とOSL-12の配列は完全に一致した。

MEGA6を用いて系統樹を作製した結果、*Nosema*属に1株(OSL-5)、*Vairimorpha*属に8株(OSL-1~4、8、9、11、12)、*Pleistophora*属に2株(OSL-6、7)、*Trachipleistophora*属に1株(OSL-10)が各クラスターに収束した(Fig. 5)。

Table 3-A BLAST 検索の結果

OSL-1		1,179bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2163	2163	100%	0	99%
2	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2161	2161	100%	0	99%
3	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2150	2150	100%	0	99%
4	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> sd	2137	2137	100%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2135	2135	100%	0	99%

OSL-2		1,180bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2102	2102	99%	0	99%
2	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2098	2098	99%	0	99%
3	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> sd	2084	2084	99%	0	99%
4	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2080	2080	99%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2054	2054	99%	0	98%

OSL-3		1,179bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2167	2167	100%	0	99%
2	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2163	2163	100%	0	99%
3	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2145	2145	100%	0	99%
4	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> sd	2143	2143	100%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2119	2119	100%	0	99%

OSL-4		1,179bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2161	2161	100%	0	99%
2	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2158	2158	100%	0	99%
3	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2139	2139	100%	0	99%
4	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> sd	2137	2137	100%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2113	2113	100%	0	99%

Accession は配列のアクセッションナンバー、Organism は検索配列の生物名を示す。
 Max score は検索配列とヒットした配列が複数個所でヒットした場合の最大のスコアを示す。Total score は検索配列とヒットした配列が複数個所でヒットした場合のスコアの合計を示す。Query cover は検索配列に対して、ヒットした領域のカバー率を示す。E-value は検索配列とヒットした配列が偶然検索される期待値(小さいほど偶然ではない)を示す。Ident は検索配列とヒットした配列が比較している領域の塩基配列の一致率を示す。

Table 3-B BLAST 検索の結果

OSL-5		1,165bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	U09282.1	<i>Nosema trichoplusiae</i>	2119	2119	100%	0	99%
2	HQ615701.1	<i>N. sp.</i> NIWB-12n	2113	2113	100%	0	99%
3	FJ969508.1	<i>N. sp.</i> PA	2113	2113	100%	0	99%
4	EU864528.1	<i>N. sp.</i> PA	2113	2113	100%	0	99%
5	AB125664.1	<i>N. bombycis</i>	2113	2113	100%	0	99%

OSL-6		1,186bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	FJ772431.1	<i>Endoreticulatus sp.</i> Zhenjiang	2169	2169	100%	0	99%
2	AY502945.1	<i>E. sp.</i> CHW-2004 Bulgaria	2169	2169	100%	0	99%
3	JN792450.1	<i>E. sp.</i> Shengzhou	2163	2163	100%	0	99%
4	JN688870.1	<i>E. sp.</i> Shengzhou	2163	2163	100%	0	99%
5	U10342.1	<i>Pleistophora sp.</i> ATCC 50040	2158	2158	100%	0	99%

OSL-7		1,186bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	FJ772431.1	<i>Endoreticulatus sp.</i> Zhenjiang	2169	2169	100%	0	99%
2	AY502945.1	<i>E. sp.</i> CHW-2004 Bulgaria	2169	2169	100%	0	99%
3	JN792450.1	<i>E. sp.</i> Shengzhou	2163	2163	100%	0	99%
4	JN688870.1	<i>E. sp.</i> Shengzhou	2163	2163	100%	0	99%
5	U10342.1	<i>Pleistophora sp.</i> ATCC 50040	2158	2158	100%	0	99%

OSL-8		1,183bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2159	2159	100%	0	99%
2	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2156	2156	100%	0	99%
3	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2137	2137	100%	0	99%
4	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> sd	2135	2135	100%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2111	2111	100%	0	99%

Accession は配列のアクセッションナンバー、Organism は検索配列の生物名を示す。

Max score は検索配列とヒットした配列が複数個所でヒットした場合の最大のスコアを示す。Total score は検索配列とヒットした配列が複数個所でヒットした場合のスコアの合計を示す。Query cover は検索配列に対して、ヒットした領域のカバー率を示す。E-value は検索配列とヒットした配列が偶然検索される期待値(小さいほど偶然ではない)を示す。Ident は検索配列とヒットした配列が比較している領域の塩基配列の一致率を示す。

Table 3-C BLAST 検索の結果

OSL-9		1,183bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2150	2150	100%	0	99%
2	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2148	2148	100%	0	99%
3	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2137	2137	100%	0	99%
4	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> Sd	2124	2124	100%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2122	2122	100%	0	99%

OSL-10		1,294bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	AJ002605.1	<i>Trachipleistophora hominis</i>	2351	2351	100%	0	99%
2	XR_552272.1	<i>Vavraia culicis</i> subsp. floridensis	2132	2132	100%	0	96%
3	AJ252961.1	<i>Vavraia culicis</i>	2109	2109	100%	0	96%
4	DQ403816.1	<i>T. sp.</i> AH2006a	2097	2097	92%	0	98%
5	X74112.1	<i>Vavraia oncoperae</i>	2019	2019	99%	0	95%

OSL-11		1,179bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2178	2178	100%	0	100%
2	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2174	2174	100%	0	99%
3	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2156	2156	100%	0	99%
4	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> Sd	2154	2154	100%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2130	2130	100%	0	99%

OSL-12		1,179bp					
No.	Accession	Organism	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident
1	U11051.1	<i>Nosema necatrix</i> ATCC 30460	2178	2178	100%	0	100%
2	DQ996241.1	<i>Vairimorpha necatrix</i>	2174	2174	100%	0	99%
3	KP208681.1	<i>V. sp.</i> GB-2014	2156	2156	100%	0	99%
4	HQ891818.1	<i>V. sp.</i> sd	2154	2154	100%	0	99%
5	Y00266.1	<i>V. necatrix</i>	2130	2130	100%	0	99%

Accession は配列のアクセッションナンバー、Organism は検索配列の生物名を示す。

Max score は検索配列とヒットした配列が複数個所でヒットした場合の最大のスコアを示す。Total score は検索配列とヒットした配列が複数個所でヒットした場合のスコアの合計を示す。Query cover は検索配列に対して、ヒットした領域のカバー率を示す。E-value は検索配列とヒットした配列が偶然検索される期待値(小さいほど偶然ではない)を示す。Ident は検索配列とヒットした配列が比較している領域の塩基配列の一致率を示す。

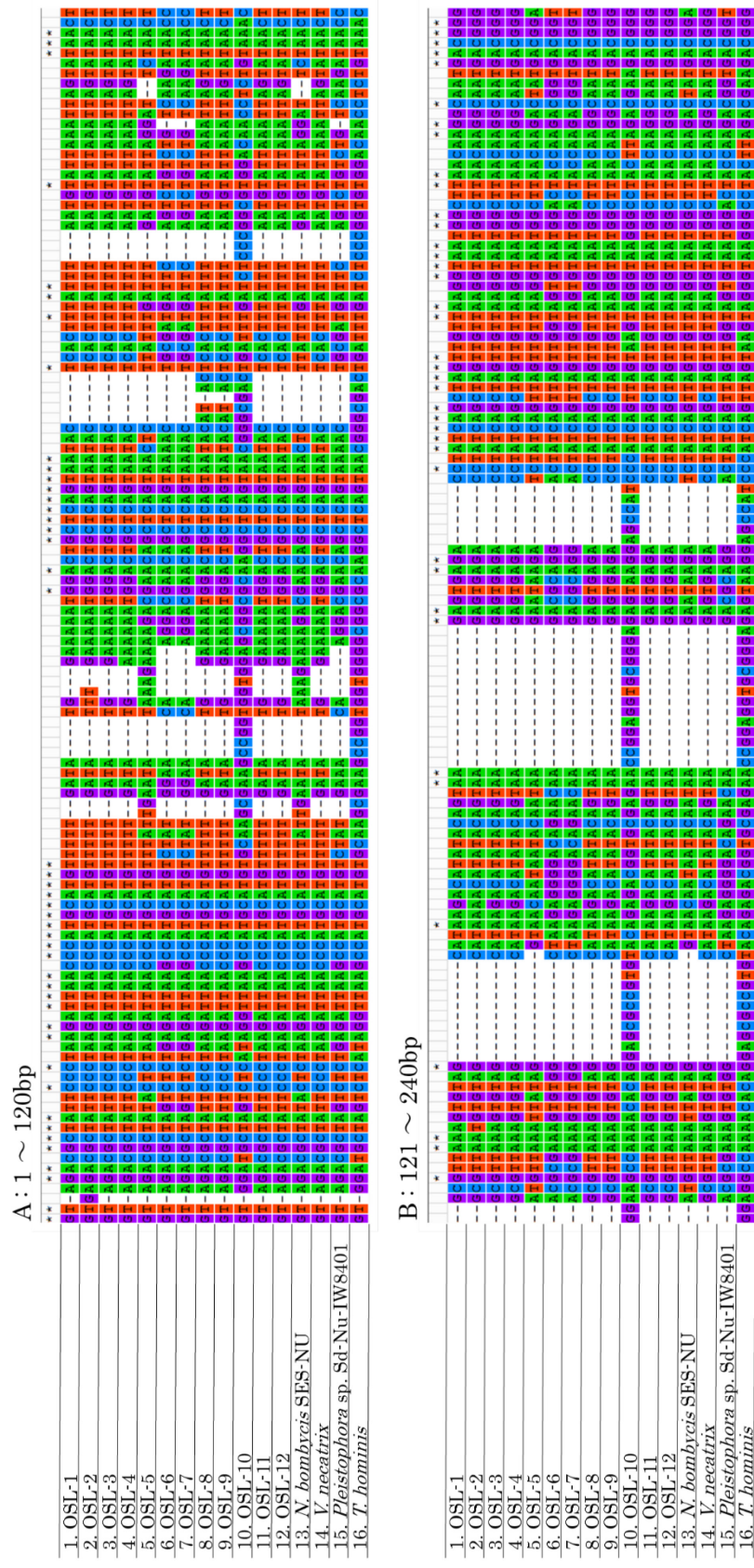


Fig. 4-A・B 微胞子虫のSSU rRNA 遺伝子配列のアラインメント

MEGA6でアラインメントしたものを示した。各アルファベットはA(緑)がアデニン、T(赤)がチミン、G(紫)がグアニン、C(青)がシトシンを表し、-は比較する配列がないことを示す。*は直下の塩基がすべて一致していることを示す。

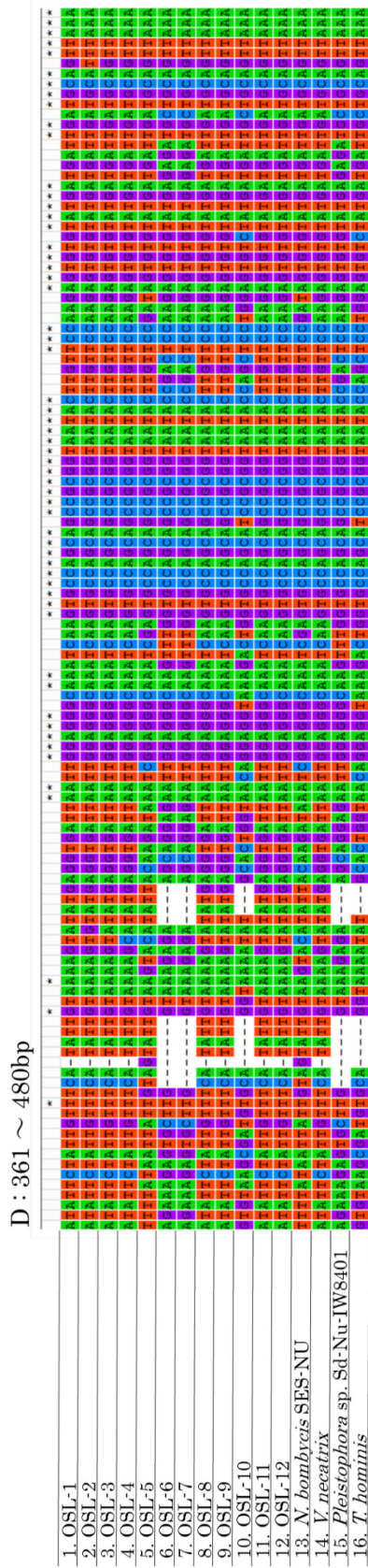
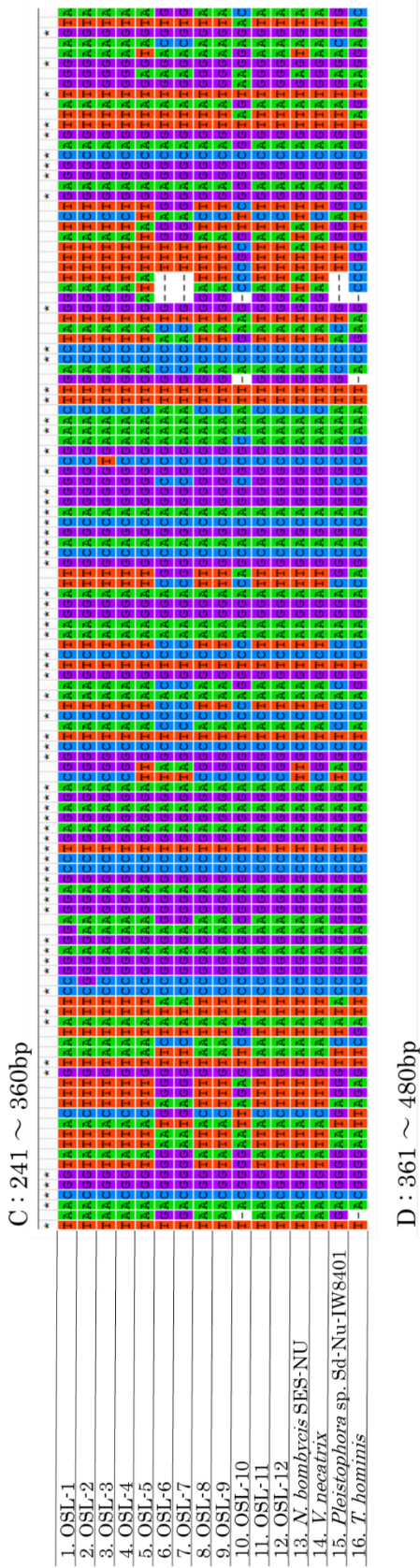
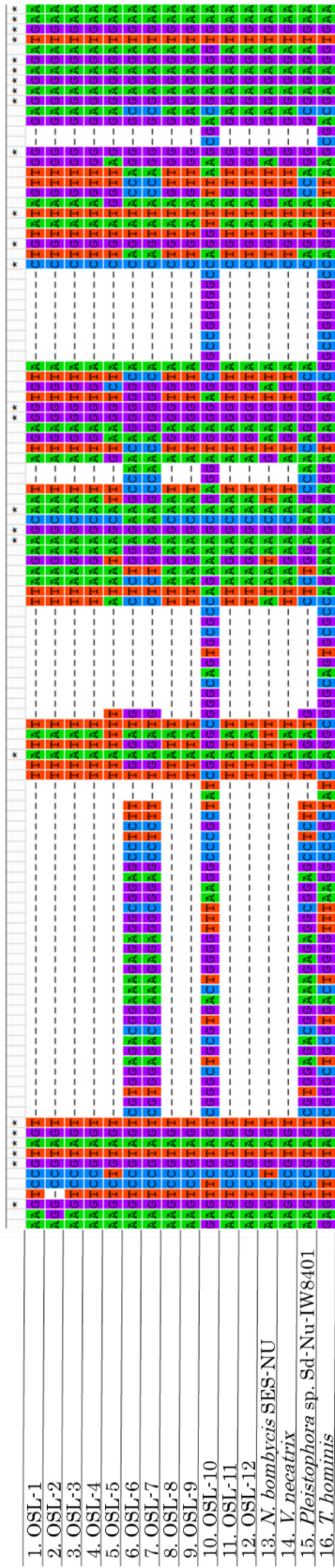


Fig. 4-C・D 微胞子虫のSSU rRNA 遺伝子配列のアラインメント

MEGA6 でアラインメントしたものを示した。各アルファベットは A(緑)がアデニン、T(赤)がチミン、G(紫)がグアニン、C(青)

がシトシンを表し、- は比較する配列がないことを示す。* は直下の塩基がすべて一致していることを示す。

E : 481 ~ 600bp



F : 601 ~ 720bp

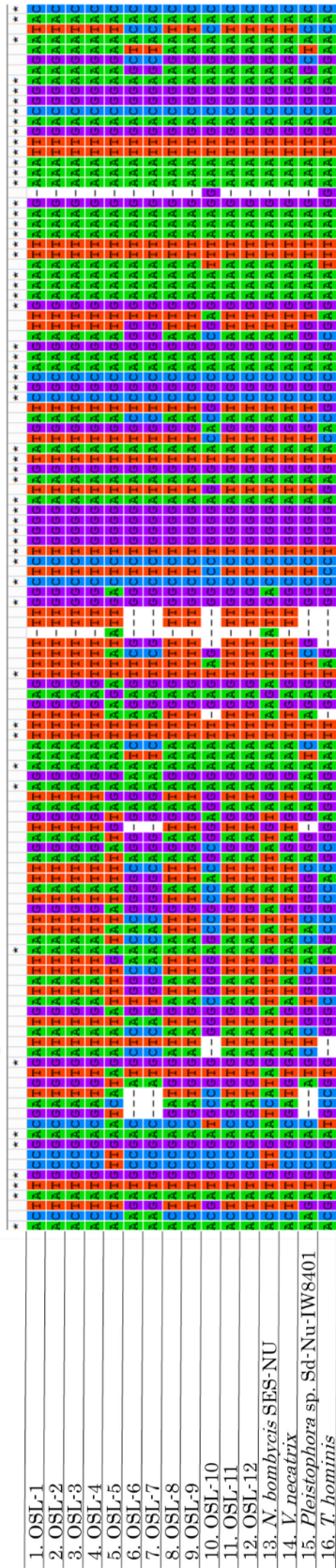


Fig. 4-E・F 微胞子虫のSSU rRNA 遺伝子配列のアラインメント

MEGA6 でアラインメントしたものを示した。各アルファベットは A(緑)がアデニン、T(赤)がチミン、G(紫)がグアニン、C(青)

がシトシンを表し、- は比較する配列がないことを示す。* は直下の塩基がすべて一致していることを示す。

G : 721 ~ 840bp



H : 841 ~ 960bp



Fig. 4-G・H 微胞子虫のSSU rRNA 遺伝子配列のアラインメント

MEGA6 でアラインメントしたものを示した。各アルファベットは A(緑)がアデニン、T(赤)がチミン、G(紫)がグアニン、C(青)

がシトシンを表し、- は比較する配列がないことを示す。* は直下の塩基がすべて一致していることを示す。

I : 961 ~ 1080bp



J : 1081 ~ 1200bp

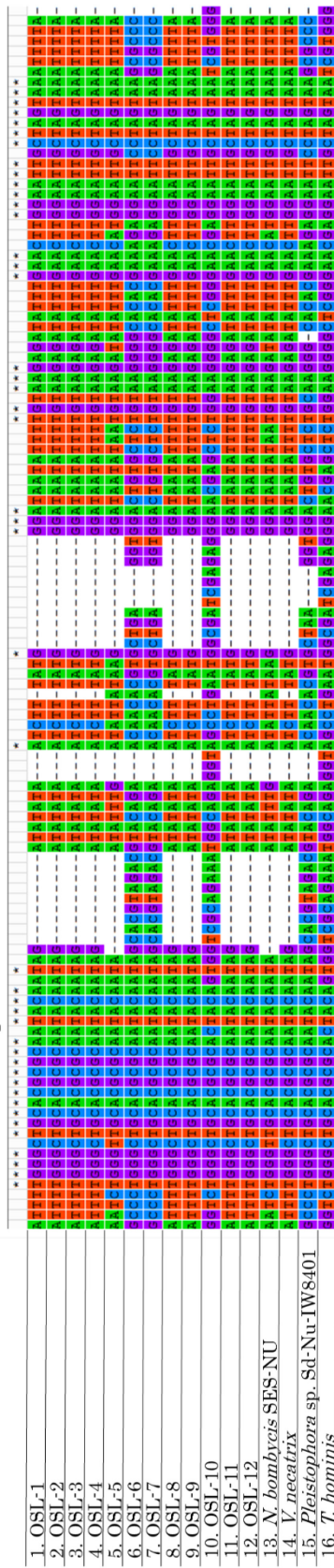


Fig. 4-I・J 微孢子虫の SSU rRNA 遺伝子配列のアラインメント

MEGA6 でアラインメントしたものを示した。各アルファベットは A(緑)がアデニン、T(赤)がチミン、G(紫)がグアニン、C(青)

がシトシンを表し、- は比較する配列がないことを示す。* は直下の塩基がすべて一致していることを示す。

K: 1201 ~ 1320bp

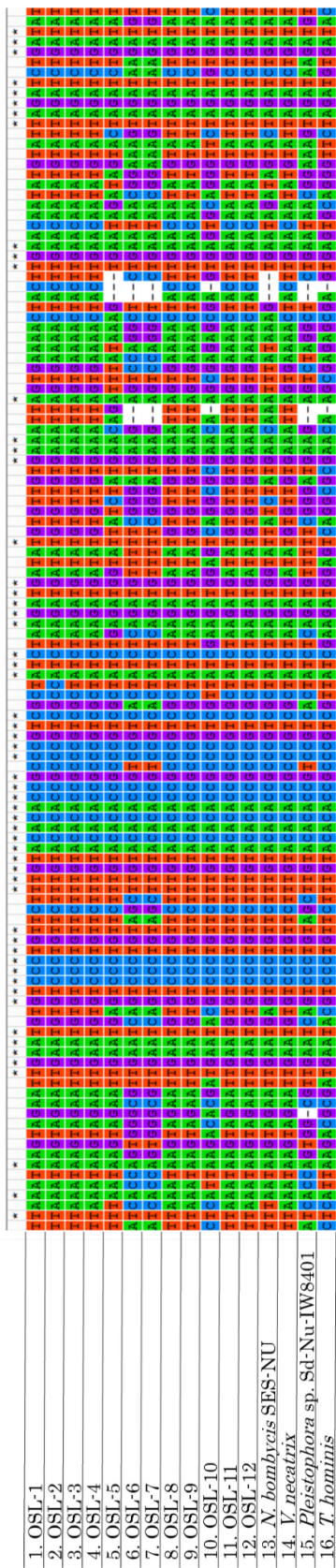


Fig. 4-K 微孢子虫の SSU rRNA 遺伝子配列のアラインメント

MEGA6 でアラインメントしたものを示した。各アルファベットは A(緑)がアデニン、T(赤)がチミン、G(紫)がグアニン、C(青)がシトシンを表し、- は比較する配列がないことを示す。* は直下の塩基がすべて一致していることを示す。

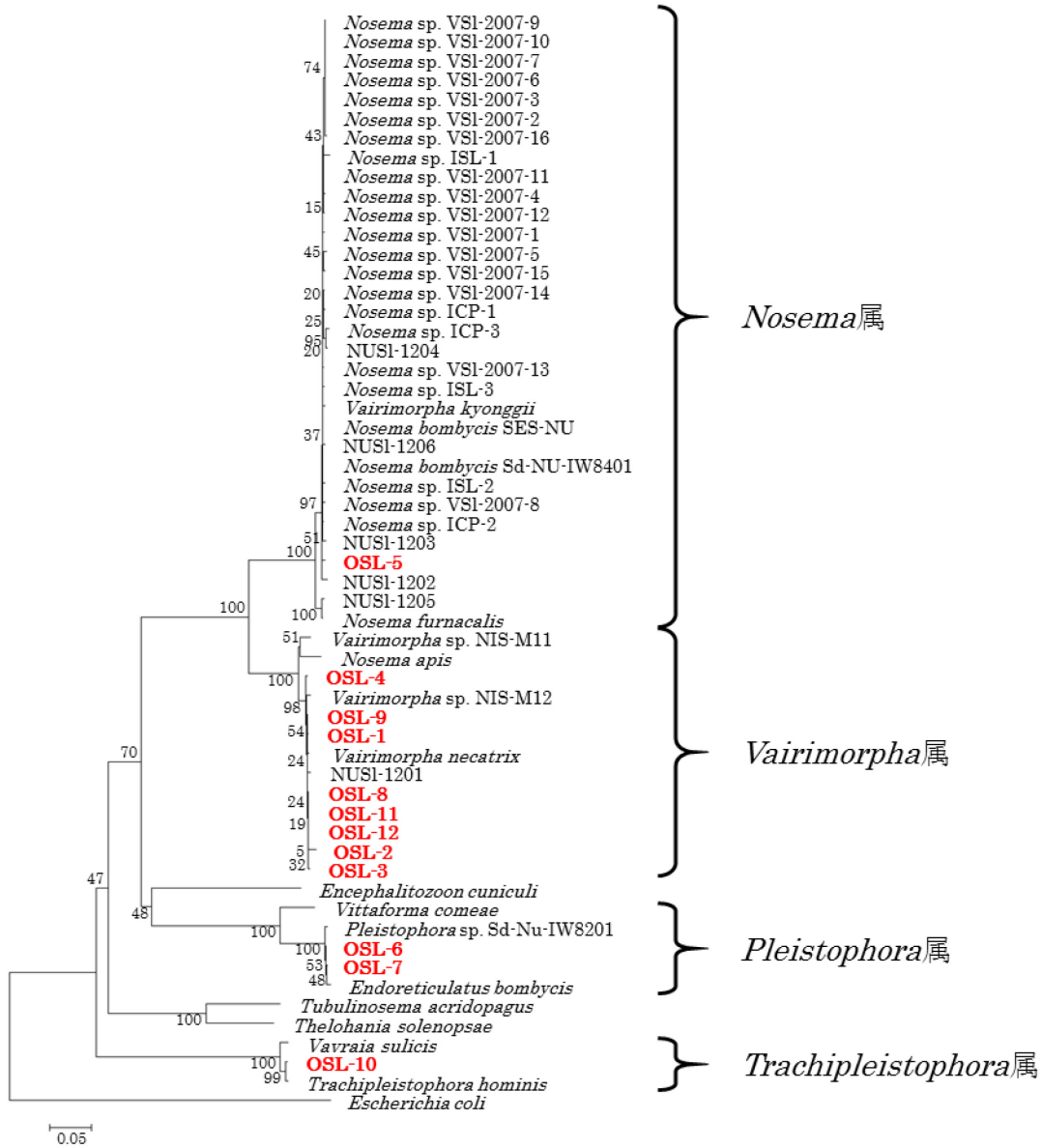


Fig. 5 微孢子虫の SSU rRNA 遺伝子配列による系統樹

MEGA6を用いて、近隣結合法で作成した。各節の数字はブートストラップ値を示した。
 OSL-1~12(赤字)は供試株で、OSLは小笠原(Ogasawara)のハスモンヨトウ(*S. litura*)
 由来株であることを表し、数字は識別番号である。

2-4 考察

2-4.1 小笠原株の解析結果

SSU rRNA 遺伝子配列解析の結果、供試株 12 株は *Nosema* 属、*Vairimorpha* 属、*Pleistophora* 属、*Trachipleistophora* 属の 4 属に分類された (Fig. 5)。*Nosema* 属のクラスターに収束した OSL-5 は、カイコ微粒子病の病原微生物である *N. bombycis* と同じクラスターであるため、近縁種であることが示唆された。*Vairimorpha* 属のクラスターに収束した OSL-1~4、8、9、11、12 の計 8 株のうち、配列比較で OSL-11 と OSL-12 は完全一致したことから、2 株は同一種であると判断した。*Pleistophora* 属のクラスターに収束した OSL-6、7 は、それぞれ近縁な系統関係にあると考えられた。2 株の BLAST 検索の結果は、相同性がどちらも 99% であるが、スコアは *Pleistophora* 属が 2,158、*Endoreticulatus* 属が 2,163~2,169 で、わずかに *Endoreticulatus* 属の方が高い。どちらも遺伝子解析では類似した系統であるが、NCBI に記録されている *Endoreticulatus* 属は *Microsporidia incertae sedis* に分類されており、分類学上はどの科に属するか未定の系統である。本研究では 3 章の感染性と 4 章の形態的特徴結果も考慮したうえで、この 2 株については *Endoreticulatus* 属と近縁関係にある *Pleistophora* 属に分類した。*Trachipleistophora* 属のクラスターに収束した OSL-10 は、*T. hominis* と同じクラスターに収束した。*Trachipleistophora* 属は昆虫と哺乳類に対する感染が知られている系統であり、*T. hominis* は HIV(ヒト免疫不全ウイルス)患者に感染し、同属の *Trachipleistophora extenrec* は哺乳類であるテンレック (*Tenrec ecaudatus*) と昆虫で分離宿主であるハスモンヨトウ近縁種とされる同属のエジプトヨトウ (*S. littoralis*) への感染が知られている (Vávra et al. 2011)。今回の結果から、国内のチョウ目昆虫から *Trachipleistophora* 属の微胞子虫が分離された初めての事例となった。

2-4.2 他の地域株との比較と小笠原株の多様性について

他の地域のチョウ目昆虫から分離された微胞子虫株と比較するため、韓国産の 1 株 (*Vairimorpha kyonggi*) と、ベトナム産の 16 株 (*Nosema* sp. VSI-2007-1~16)、インドネシア産の 6 株 (*Nosema* sp. ISL-1~3 と *Nosema* sp. ICP-1~3)、日大構内産の 6 株 (NuSL-1201~06) を使用した。日大株は *Nosema* 属と *Vairimorpha* 属のクラスター、国外株である韓国、ベトナム、インドネシアは全て *Nosema* 属のクラスターに収束した。*Nosema* 属の株は小笠原を含む 5 地域で検出されていることから、*Nosema* 属の微胞子虫の分布域は広いと考えられる。小笠原からは *Pleistophora* 属と *Trachipleistophora* 属の株を含む 4 属の株が検出されたことから、小笠原は他の地域よりも微胞子虫の多様性に富んでいることが示唆された (Shigano et al. 2015)。

3章 3種のチョウ目昆虫に対する感染性の差異

3-1 序論

昆虫感染性の微胞子虫は、多くの種が複数の宿主昆虫に感染することが報告されている(Sprague 1977)。分離株の宿主域を確認するため、2章と同じ12株を使用し、ハスモンヨトウとオオタバコガ(*Helicoverpa armigera*)、カイコ(*Bombyx mori*)に対する感染実験を行った。ハスモンヨトウは本研究での対象となる微胞子虫の分離宿主であり、オオタバコガはハスモンヨトウと同様に広食性の農業害虫である。オオタバコガ幼虫は果実、花蕾などを好み、葉や花も食害する。トマトやナス等の果菜類では果実に穴をあけるほか、花卉のつぼみや新芽部分に食入して加害するため、不開花や芯止まりなどを引き起こし、商品価値を低下させる。このように、オオタバコガ幼虫は植物体内に潜り込む性質から殺虫剤が届きにくく防除が難しい害虫である。一方、カイコは繭から生糸を生成する益虫である。カイコが微胞子虫に感染すると微粒子病と呼ばれる微胞子虫病を引き起こし、発育遅延や致死させるため、生糸の生産量や品質に大きな被害を生じることがある(Kawarabata 2003)。現在は母蛾検査や消毒技術の向上によって感染被害を抑制することができるようになったが、いまだに微胞子虫が検出され、完全な排除には至っていない。養蚕施設での微胞子虫の感染経路は明らかになってはいないが、要因の一つとして野外のチョウ目昆虫に感染している微胞子虫の胞子が蚕室内に入り込んでカイコに感染性を示すことが考えられる。分離株が益虫に病気を引き起こす株であるか把握する必要があるため、本研究ではカイコに対する感染性も同時に調査した。

3-2 材料および方法

供試微胞子虫株は、2章と同じ12株を使用した。株名は2章で使用した識別名(OSL-1~12)にSSU rRNA遺伝子配列解析結果を反映させ、属名を加えてTable 4に示した。

Table 4 供試株名

	株名
1	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1
2	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2
3	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3
4	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4
5	<i>Nosema</i> sp. OSL-5
6	<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6
7	<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7
8	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8
9	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9
10	<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10
11	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11
12	<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12

属名は2章で分類した属を表した。OSLの3文字は、小笠原(Ogasawara)のハスモンヨトウ(*S. litura*)由来株であることを表し、数字は識別番号である。

3-2.1 宿主昆虫

宿主昆虫には日本大学生物資源科学部生命農学科応用昆虫科学研究室で継代飼育しているハスモンヨトウとオオタバコガを使用し、カイコ(錦秋×鐘和)は株式会社高原社から購入して使用した。各昆虫の飼料としてハスモンヨトウとオオタバコガについてはインセクタ LFS(日本農産工業株式会社)を、カイコに対してはシルクメイト 2S(日本農産工業株式会社)を与えた。

3-2.2 3種昆虫への接種

2 齢の各幼虫に、孢子液を滴下した飼料を与えて経口的に摂食させた。インセクタは 8×8×2mm の大きさに調整したものを、1 頭あたり 10⁴以上の孢子となるように濃度を調整して孢子液を滴下した。シルクメイトは飼育頭数により、厚さ 2mm で 1~2 日中に完食できる量へ調節したものを、1 頭あたり 10⁴孢子となるように濃度を調整して孢子液を滴下した。完食後は微孢子虫を含まない飼料を与え、27℃・16L8D の条件下で飼育し、ハスモンヨトウとオオタバコガは成虫まで、カイコは熟蚕まで観察した。

3-2.3 感染の確認

飼育途中で死亡したものと観察期間が終了したものは、1 頭ずつ乳鉢に入れ、生理食塩水 1ml を加えてすりつぶした。磨砕後の液を用いてプレパラートを作成し、位相差顕微鏡 DX51 (×400) (OLYMPUS) で任意の 5 視野における微孢子虫孢子の有無を観察し、孢子が確認されたものは感染していると判定した。感染が確認されたものは 5 視野の孢子数を計測し、1 視野あたりの平均孢子数を算出した。1 視野における孢子の数で感染程度を判定した。孢子が 0 個は-、1~10 個は+、11~100 個は++、101 以上は+++として、++以上で重度感染とした。

3-2.4 解剖と感染部位の調査

また、接種させた中の数頭を解剖し、感染部位を調査した。4~5 齢の解剖ができる大きさになった個体を解剖し、体内の各組織器官(血球、絹糸腺、マルピーギ管、脂肪体、気管、神経球、中腸上皮、生殖腺)を摘出した。摘出した各組織は押しつぶし法でプレパラートを作製した。感染の確認と感染程度の判定は上記と同様に行った。

3-3 結果

3-3.1 ハスモンヨトウへの感染および感染部位

ハスモンヨトウの接種実験の結果を Table 5-A に示した。*Vairimorpha* sp. OSL-4 以外の 11 株で感染を確認した。*Vairimorpha* sp. OSL-1、3、9 の感染率は低かったが、感染した個体は重度感染した。*Vairimorpha* sp. OSL-11、12 は感染率が 100% であり、すべてが重度感染した。

感染組織の観察結果を Table 6-A に示した。5 株から組織への感染を確認した。*Nosema* sp. OSL-5 と *Vairimorpha* sp. OSL-11、12 では複数の組織で多くの胞子を確認し、*Vairimorpha* sp. OSL-11 は生殖腺にも重度の感染を確認した。*Pleistophora* sp. OSL-6、7 は中腸上皮のみに胞子を確認した。

ハスモンヨトウの死亡率の推移を感染した 11 株で示した (Fig. 6)。*Vairimorpha* sp. OSL-11、12 は接種してから 15 日までにすべて死亡した。

3-3.2 オオタバコガへの感染および感染部位

オオタバコガの接種実験の結果を Table 5-B に示した。*Vairimorpha* sp. OSL-1 以外の 11 株で感染を確認した。*Vairimorpha* sp. OSL-2、4、9、12 と *Nosema* sp. OSL-5、*Trachipleistophora* sp. OSL-10 は感染率が 80% 以上で高い感染率を示した。

感染組織の観察結果を Table 6-B に示した。Table 5-B で感染を確認した 11 株中 6 株で組織への感染がみられた。4 株は若齢幼虫ですべて死亡したため、解剖できなかった。また *Trachipleistophora* sp. OSL-10 はオオタバコガに感染したにもかかわらず、感染している組織を確認できなかった。*Vairimorpha* sp. OSL-2 は摘出した 8 部位すべてで感染した。*Pleistophora* sp. OSL-6、7 は中腸上皮のみから胞子を確認した。

ハスモンヨトウの死亡率の推移を、感染した 11 株で示した (Fig. 7)。接種してから 10 日まで 6 株 (*Vairimorpha* sp. OSL-2~4、8、9、12) の試験区で

死亡率が 50%以上まで急激に増加した。*Vairimorpha* sp. OSL-11 は 7 日までにすべてが死亡したが、感染を確認できたのは 40%であった。

3-3.3 カイコへの感染および感染部位

カイコの接種実験の結果を Table 5-C に示した。*Vairimorpha* sp. OSL-1、2 と *Pleistophora* sp. OSL-6、7 以外の 8 株で感染を確認した。*Vairimorpha* sp. OSL-3、4、8、9、11、12 と *Trachipleistophora* sp. OSL-10 で感染率は 90%以上の高い感染率であった。*Nosema* sp. OSL-5 は感染率が 30%であり、感染した個体は軽度感染であった。

感染組織の観察結果を Table 6-C に示した。Table 5-C で感染を確認した 8 株すべてから組織への感染を確認した。特に、マルピーギ管、脂肪体、中腸上皮、生殖腺で重度感染した。

カイコの死亡率の推移を、感染した 8 株で示した(Fig. 8)。カイコの熟蚕になるまでの期間は 20 日後頃を想定していたが、*Vairimorpha* sp. OSL-4、9 では 40 日まで熟蚕にならない個体を確認できた。

すべての調査区で、宿主は感染による外部病徴は現れなかった。しかし *Trachipleistophora* sp. OSL-10 はカイコに感染した場合、外部病徴はないが、解剖すると感染した組織が白濁し、絹糸線が肥大化している様子が確認された(Fig. 9)。顕微鏡で肥大化部分を確認したところ、視野一面に胞子が拡がり、パンスポロブラスト膜に包まれた胞子の集合体と、ばらばらになって遊離している胞子がみられた。

Table 5 3種のチョウ目昆虫における微胞子虫の感染率と感染程度

A: ハスモンヨトウ

分離株	接種濃度 (spore/ml)	感染率 (%)	接種頭数 (頭)	-	+	++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	1.0×10^4	10	10	9	0	0	1
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	1.0×10^4	50	10	5	2	0	3
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	1.0×10^4	50	10	5	0	0	5
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	1.0×10^4	0	10	10	0	0	0
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	1.0×10^4	60	10	4	1	3	2
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	1.0×10^4	60	10	4	2	1	3
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	1.0×10^4	20	10	8	2	0	0
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	6.7×10^5	70	10	3	0	3	4
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	4.8×10^5	10	10	9	0	0	1
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	1.0×10^4	80	5	1	3	1	0
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	1.0×10^4	100	7	0	0	1	6
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	1.0×10^4	100	6	0	0	0	6

B: オオタバコガ

分離株	接種濃度 (spore/ml)	感染率 (%)	接種頭数 (頭)	-	+	++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	2.3×10^4	0	8	8	0	0	0
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	1.0×10^4	100	8	0	0	2	6
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	1.0×10^4	70	10	3	0	6	1
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	3.1×10^4	80	10	2	5	2	1
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	1.0×10^4	100	8	0	1	4	3
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	1.0×10^4	56	9	4	0	3	2
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	1.0×10^4	44	9	5	0	2	2
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	2.8×10^4	60	10	4	2	4	0
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	2.9×10^4	88	8	1	1	3	3
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	1.0×10^4	100	10	0	0	3	7
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	1.0×10^4	40	10	6	0	2	2
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	1.0×10^4	80	10	2	0	1	7

C: カイコ

分離株	接種濃度 (spore/ml)	感染率 (%)	接種頭数 (頭)	-	+	++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	1.6×10^4	0	16	16	0	0	0
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	1.0×10^4	0	15	15	0	0	0
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	1.0×10^4	100	25	0	0	1	24
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	1.0×10^4	96	23	1	0	2	20
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	1.0×10^4	30	23	16	7	0	0
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	1.0×10^4	0	15	15	0	0	0
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	2.4×10^4	0	31	31	0	0	0
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	8.9×10^4	100	25	0	2	7	16
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	4.4×10^4	92	25	2	0	5	18
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	1.0×10^4	100	10	0	1	7	2
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	1.0×10^4	100	10	0	0	0	10
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	1.0×10^4	100	10	0	0	1	9

顕微鏡の1視野あたりに計測された孢子数によって、-: 0、+: 1~10、++:

11~100、+++: 101以上と評価した。

Table 6 3種のチョウ目昆虫に対する感染組織の調査

A: ハスモンヨトウ

分離株	接種濃度 (spore/ml)	感染率 (%)	血球	神経球	絹糸腺	気管	マルピーギ管	脂肪体	中腸上皮	生殖腺
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	1.0×10^4	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	1.0×10^4	50	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	1.0×10^4	50	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	1.0×10^4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	1.0×10^4	60	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	×
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	1.0×10^4	60	-	-	-	-	-	-	++	-
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	1.0×10^4	20	-	-	-	-	-	-	+++	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	1.0×10^4	70	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	1.0×10^4	10	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	1.0×10^4	80	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	1.0×10^4	100	++	++	++	+	+++	+++	++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	1.0×10^4	100	++	+++	++	++	+	+++	+	-

B: オオタバコガ

分離株	接種濃度 (spore/ml)	感染率 (%)	血球	神経球	絹糸腺	気管	マルピーギ管	脂肪体	中腸上皮	生殖腺
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	2.3×10^4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	1.0×10^4	100	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	1.0×10^4	70	解剖不可							
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	3.1×10^4	80	解剖不可							
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	1.0×10^4	100	-	++	++	++	++	+++	+++	++
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	1.0×10^4	56	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	1.0×10^4	44	-	-	-	-	-	-	++	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	2.8×10^4	60	解剖不可							
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	2.9×10^4	88	+	-	+++	-	+++	+++	++	-
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	1.0×10^4	100	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	1.0×10^4	40	解剖不可							
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	1.0×10^4	80	+	-	+	-	+++	+++	+++	+++

C: カイコ

分離株	接種濃度 (spore/ml)	感染率 (%)	血球	神経球	絹糸腺	気管	マルピーギ管	脂肪体	中腸上皮	生殖腺
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	1.6×10^4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	1.0×10^4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	1.0×10^4	100	+	++	-	-	+++	+++	+++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	1.0×10^4	96	+	-	+	-	+++	+++	+++	+
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	1.0×10^4	30	+	-	-	+	++	++	+	+
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	1.0×10^4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	2.4×10^4	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	8.9×10^4	100	++	-	-	-	+++	+++	+++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	4.4×10^4	92	-	-	-	-	++	+++	++	+++
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	1.0×10^4	100	+	-	+++	++	+++	+++	+++	+++
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	1.0×10^4	100	+	-	-	-	++	-	+++	×
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	1.0×10^4	100	+	-	-	-	-	-	+++	-

顕微鏡の1視野あたりに計測された孢子数によって、- : 0、+ : 1~10、++ :

11~100、+++ : 101以上と評価した。×は摘出できなかったことを示す。

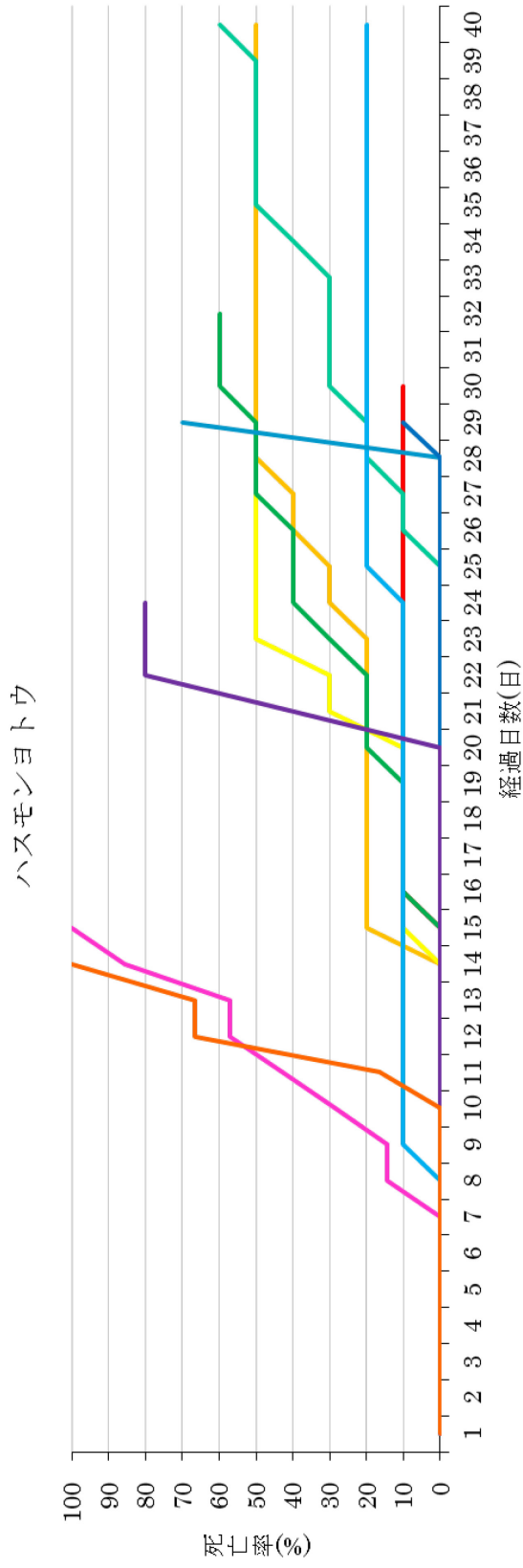


Fig. 6 ハスモンヨトウの微胞子虫感染による死亡率の推移

感染が確認できた11株を示した。各グラフは、赤(→)は *Vairimorpha* sp. OSL-1、橙(→)は *Vairimorpha* sp. OSL-2、黄(→)は *Vairimorpha* sp. OSL-3、緑(→)は *Nosema* sp. OSL-5、鶯(→)は *Pleistophora* sp. OSL-6、水色(→)は *Pleistophora* sp. OSL-7、青(→)は *Vairimorpha* sp. OSL-8、紺(→)は *Vairimorpha* sp. OSL-9、紫(→)は *Trachipleistophora* sp. OSL-10、ピンク(→)は *Vairimorpha* sp. OSL-11、朱(→)は *Vairimorpha* sp. OSL-12 を示した。

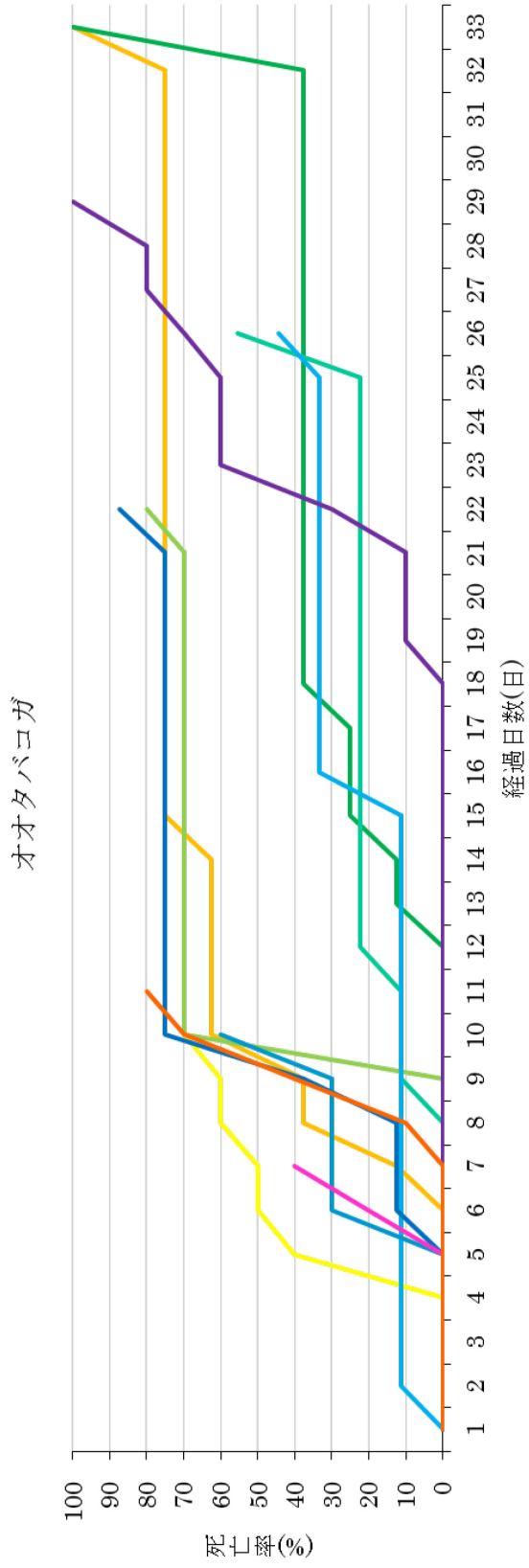


Fig. 7 オオタバコガの微胞子虫感染による死亡率の推移

感染が確認できた 11 株を示した。各グラフは、橙(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-2、黄(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-3、黄緑(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-4、緑(■)は *Nosema* sp. OSL-5、鶯(■)は *Pleistophora* sp. OSL-6、水色(■)は *Pleistophora* sp. OSL-7、青(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-8、紺(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-9、紫(■)は、*Trachipleistophora* sp. OSL-10、ピンク(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-11、朱(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-12 を示した。

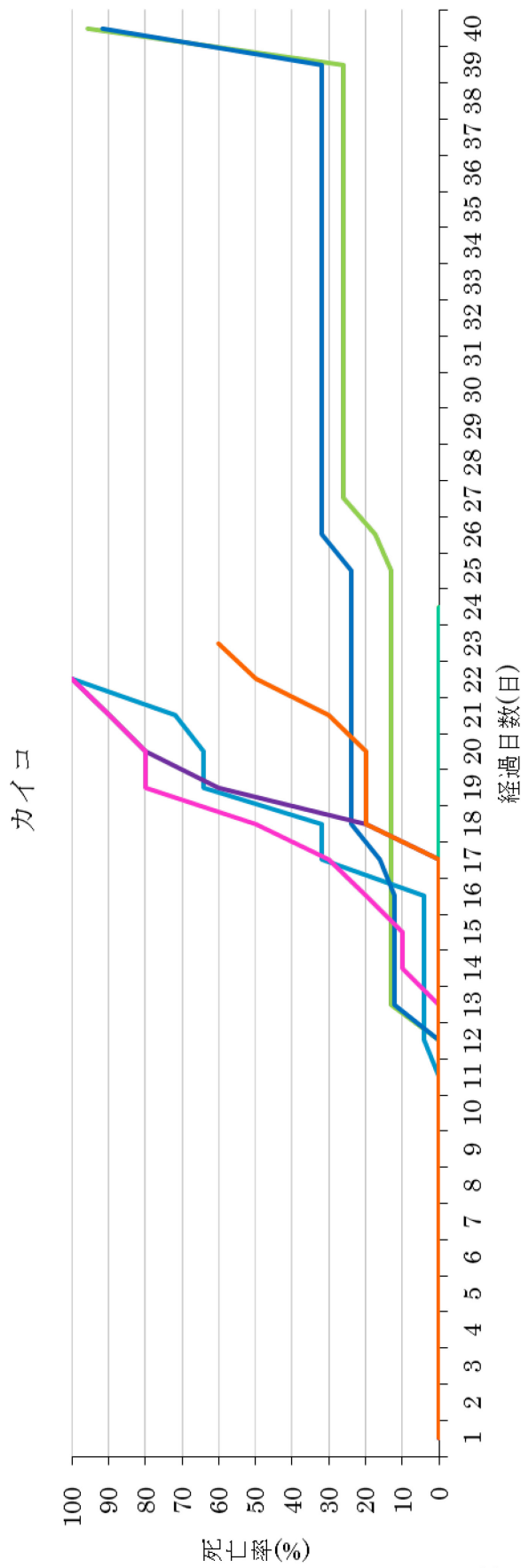


Fig. 8 カイコの微胞子虫感染による死亡率の推移

感染が確認できた8株を示した。各グラフは、黄(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-3、黄緑(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-4、緑(■)は *Nosema* sp. OSL-5、青(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-8、紺(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-9、紫(■)は *Trachipleistophora* sp. OSL-10、ピンク(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-11、朱(■)は *Vairimorpha* sp. OSL-12 を示した。

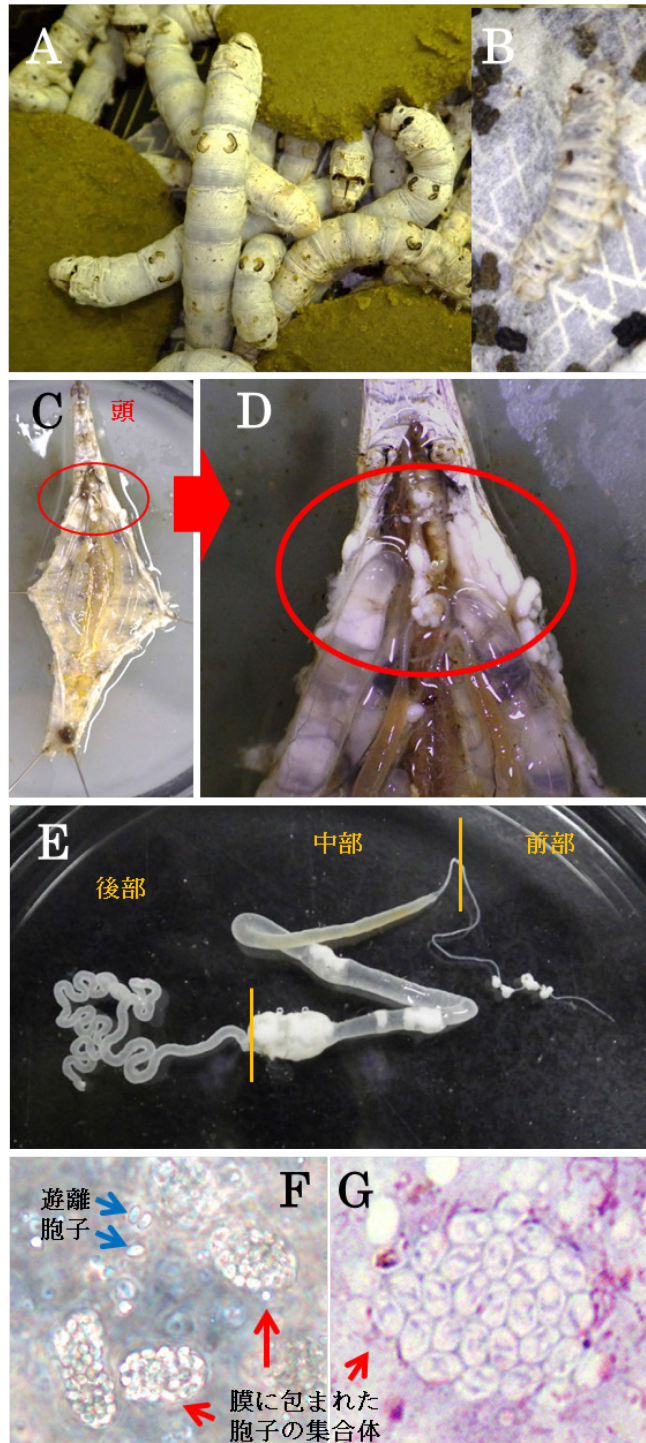


Fig. 9 *Trachipleistophora* sp. OSL-10 のカイコに対する感染の症状

A は飼育中のカイコ、B は死亡したカイコ、C は解剖したカイコの白濁部分、D は白濁部分の拡大写真、E は肥大化した絹糸腺、F は肥大化した絹糸腺の位相差顕微鏡写真、G はギムザ染色後の顕微鏡写真を示した。

3-4 考察

3-4.1 ハスモンヨトウへの感染および感染部位

ハスモンヨトウに対して 12 株中 11 株が感染した。*Vairimorpha* sp. OSL-11、12 の 2 株は感染率が 100%で、接種してから 15 日までにすべて死亡した。これらはハスモンヨトウに対して高い殺虫効果と比較的短い時間で殺虫する能力を有していた。感染部位の調査では *Vairimorpha* sp. OSL-11 は生殖腺でも重度感染が確認され、経卵感染や経卵巣感染する可能性がある。*Pleistophora* sp. OSL-6、7 の 2 株は中腸上皮のみで孢子の存在が確認できた。*Pleistophora* sp. OSL-6 は重度感染の個体があるにもかかわらず、他の組織では孢子を観察されなかったことから、中腸でのみ部分感染する株であると考えられる。*Trachipleistophora* sp. OSL-10 は感染するが、軽度感染であることが多く、感染組織が観察できなかった。供試した 12 株はハスモンヨトウから分離されたが、*Vairimorpha* sp. OSL-4 は感染が確認できず、*Vairimorpha* sp. OSL-1、9 と *Pleistophora* sp. OSL-7 は非常に低い感染率であった。これらの株の孢子は、すでに失活している可能性も考えられたが、反復実験や人為的に孢子を孵化させる調査によって失活していないことを確認している。よって、これらの株では野外でハスモンヨトウ以外の宿主が本来の宿主であることを示唆された。

3-4.2 オオタバコガへの感染および感染部位

オオタバコガには 12 株中 11 株が感染した。*Vairimorpha* sp. OSL-2、4、9、12 と *Nosema* sp. OSL-5、*Trachipleistophora* sp. OSL-10 の 6 株は感染率が 80%以上の高い感染率を示した。解剖したものは、*Vairimorpha* sp. OSL-2、9、12 と *Nosema* sp. OSL-5 の 4 株は複数の組織に重度感染し、*Pleistophora* sp. OSL-6、7 の 2 株は中腸上皮のみに感染した。以上のことから、*Nosema* 属、*Vairimorpha* 属、*Trachipleistophora* 属はオオタバコガ

に重度感染し、殺虫する株が存在し、*Pleistophora* 属はハスモンヨトウと同様に中腸のみに部分感染する株と判断した。特に、*Vairimorpha* sp. OSL-2～4、8、9、11、12 の 7 株は比較的短い時間で殺虫した。

3-4.3 カイコへの感染および感染部位

カイコには 12 株中 8 株で感染を確認した。*Vairimorpha* sp. OSL-3、4、8、9、11、12 と *Trachipleistophora* sp. OSL-10 の 7 株では 90%以上の高い感染率であった。感染した場合、感染カイコに外部病徴は確認されなかったため、養蚕施設で感染した場合、発見が遅れ、被害が拡大することが懸念される。

Trachipleistophora sp. OSL-10 が感染した場合、重度感染した組織が形成された胞子が充満することで白濁し、絹糸線では組織が肥大化した。このことから養蚕に感染した場合、生産する生糸の品質や生産量に悪影響を及ぼす可能性がある。

3-4.4 配列解析結果を基にした属ごとの感染性について

Nosema sp. OSL-5 はオオタバコガに 100%感染し、強い感染性を示したが、カイコでは 30%と感染率は低かった。本株はカイコ微粒子病の病原微生物である *N. bombycis* と胞子の形態や遺伝子解析が類似していた。また、*N. bombycis* はカイコへの感染性が異なる系統が存在しており、カイコから分離された *N. bombycis* Bm-NU は 2 齢幼虫に感染させた場合、3～5 齢に至るまでにほぼ死亡させるという強毒性を示し、スジキリヨトウから分離された *N. bombycis* Sd-NU-IW8401 は同様に感染させた場合、5 齢以降になって死亡した(岩野・石原 1991)弱毒性を示した。一方、ベトナムのハスモンヨトウから分離された *Nosema* sp. VSI-2007-16 は *N. bombycis* と同系統でありながら、カイコに対して非感染性であった(岩野ら 2015)。*Nosema* sp. OSL-5

の感染率は低く、感染しても軽度感染で、熟蚕になっても調査期間が終わるまで死亡しなかった。カイコに対して感染するが殺虫性も小さいことから、上記の *N. bombycis* とは致死性の異なる別系統の株であることが示唆された。

Vairimorpha 属に分類された株は、ハスモンヨトウにのみ感染した株など、宿主によって感染性に違いがみられた。軽度感染しかしない株も含まれていたが、一部はハスモンヨトウやオオタバコガに重度感染することが確認され、終齢幼虫までに致死させる株が含まれていた。このことから、*Vairimorpha* 属は配列解析では 8 株を含んでいたが、分離株は複数種が存在していることが示唆された。

Pleistophora 属の株はハスモンヨトウとオオタバコガに感染し、中腸上皮のみで胞子が確認されたことから、部分感染する株であることが示唆された。同属の既知株である *Pleistophora* sp. Sd-Nu-IW8201 はカイコに感染することが知られているが、小笠原株の *Pleistophora* 属株 2 株はカイコに感染しないため、既知株とは異なる株であることが示唆された。

Trachipleistophora 属の株は 3 種の供試昆虫に感染し、特にカイコに対して重度の感染が確認された。飼育中のカイコに外部病徴は出現しなかったが、解剖すると重度感染した組織が白濁し、特に絹糸腺では一部組織が肥大化した (Fig. 9)。このことから、カイコに感染した場合は、繭の生産上、悪影響を与える可能性があることが示唆された。

4 章 孢子形成様式による系統間の比較

4-1 序論

微孢子虫は宿主の外では主に孢子で存在し、宿主の細胞内に感染して孢子形成を行う。孢子や発育段階の形態的特徴は種によって異なり、分類する際の判断材料となる。

微孢子虫の孢子は一般的に卵円形や長楕円形、洋梨型であり、1~2 個の核を内在している。孢子の外殻はタンパク質とキチン質からなる外膜(exospore)と内膜(endospore)の 2 層から形成されており、内部には芽体(sporoplasm)とそれを宿主細胞内に送り込むための発射装置が備えられている。発射装置は極糸(polar filament または polar tube)と極膜層(lamellar polaroplast)、後極胞(posterior vacuole)から構成される。孢子が消化液などの刺激を受けると極膜層と後極胞が膨張して孢子の内圧が上がり、極糸がホースを裏返すように外翻・突出して宿主細胞に突き刺さり、管腔を通過して孢子内容物である芽体が宿主細胞内に押し出される(Keeling and Fast 2002)ことで、感染が成立する。

微孢子虫の発育段階様式は、栄養繁殖期(proliferative phase)、孢子形成期(sporogonial phase)の 2 相に分けることができる。栄養繁殖期では、芽体が宿主細胞内に侵入すると増殖を開始して、細胞分裂と核分裂を繰り返して様々な形と核を持ったメロント(meront)となる。その後、孢子形成期へと移行すると、メロントは 1 ないし数核の細胞に分裂してスポロント(sporont : 孢子芽母細胞)になり、それが細胞分裂と核分裂をしてスポロブラスト(sporoblast : 孢子芽細胞)となり、その後孢子が形成される。*Nosema* 属の微孢子虫では、形成された孢子には宿主の排泄物とともに排出され、新たな感染源となる長極糸型孢子(environmental spore、spores with many coils)と、体内で形成されるとすみやかに自発的に発芽して隣接する細胞に二次感染を拡げる短極糸型孢子(primary spore、spores with a few coils)が形成さ

れる。

これらのステージは属レベルで特徴付けされており (Fig. 10)、主に胞子の形状と胞子形成期の形態的特徴から区別することができる。胞子は大きさ・形・核数・極糸の巻き数、胞子形成期では胞子芽母細胞の周囲に形成される多胞子芽膜(pansporoblastic membrane)の有無、胞子芽母細胞から形成される胞子数などによって分類される(Canning and Lorn 1986)。

本章では、各ステージの形態的特徴を観察し、2章の遺伝子解析の結果で識別された属とそれらが一致するのか比較した。観察する試料としては3章で感染させた宿主昆虫から、解剖して摘出した感染組織を用いた。胞子の形状と長径・短径については位相差顕微鏡を使用して計測した。各発育ステージを観察する標本は、感染実験で摘出した感染している組織のなすりつけ標本を作製し、ギムザ染色して生物顕微鏡で観察した。

4-2 材料および方法

供試微孢子虫株は 2 章と 3 章で使用した 12 株を使用した。胞子は保存している懸濁液を使用し、発育段階の観察には 3 章で解剖した個体の感染組織標本を作製した。

4-2.1 胞子サイズの計測

胞子懸濁液からプレパラートを作成し、顕微鏡 DX51 (OLYMPUS)と顕微鏡デジタルカメラ(OLYMPUS)を使用した。観察倍率 400 倍で撮影した胞子から、任意の 100 胞子の長径と短径を計測し、平均値と標準偏差を算出した。

4-2.2 胞子形成様式の観察

胞子形成様式は属によって特徴が異なり、胞子や胞子形成期の特徴を比較した(Fig. 10、Table 7)。解剖して摘出した感染組織をスライドグラス上に置き、なすりつけ標本を作成した。作製した標本は 100%メタノール(シグマアルドリッチジャパン株式会社)を用いて 10 分間固定し、PBS(+) とギムザ染色用リン酸塩緩衝液 pH 6.4 (キシダ化学株式会社)で pH を調整し、ギムザ染色液(メルク株式会社)で染色した。染色標本は顕微鏡 DX51 (OLYMPUS)で観察した。

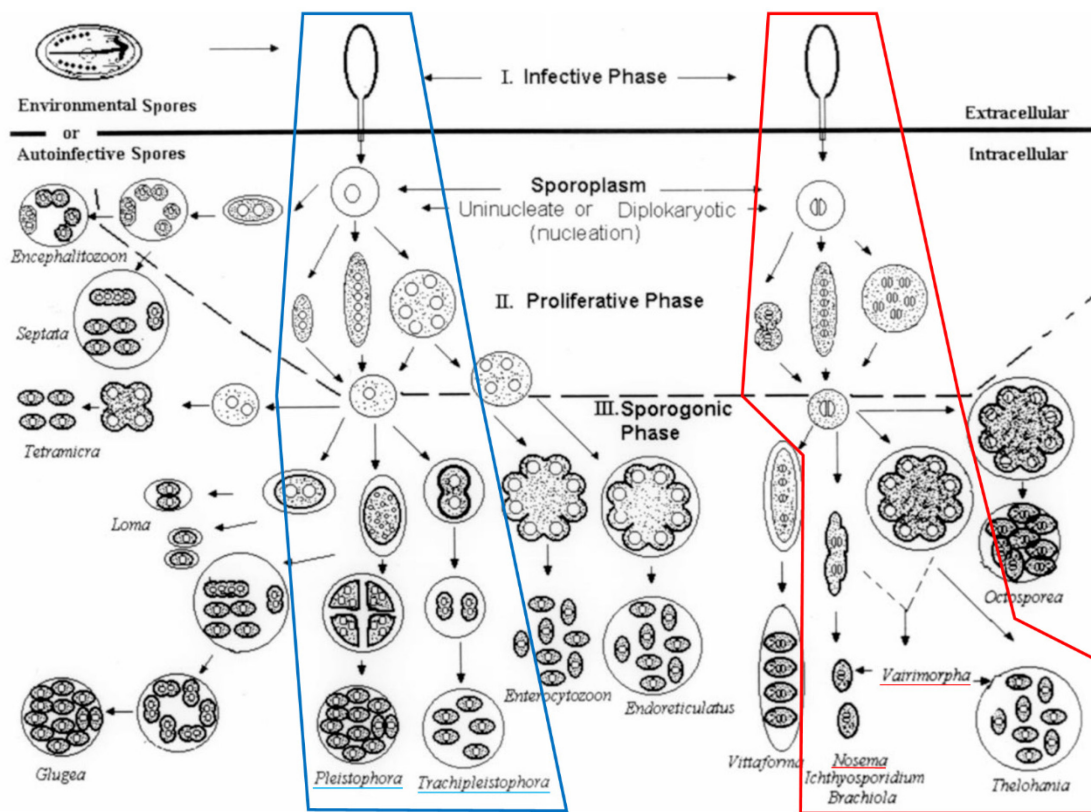


Fig. 10 微孢子虫類の孢子形成様式の一覧

Weiss LM (2001)から引用した図を改変した。赤枠は *Nosema* 属と *Vairimorpha* 属を、青枠は *Pleistophora* 属と *Trachipleistophora* 属の孢子形成様式を示した。

Table 7 4属の孢子形成様式の特徴

属	孢子		孢子形成期	
	核	形	パンスポロ ブラスト膜	形成孢子
<i>Nosema</i>	連核	卵円形(中型)	なし	遊離した連核性孢子
<i>Vairimorpha</i>				
・ <i>Nosema</i> 型	連核	楕円形	なし	遊離した連核性孢子
・ <i>Thelohania</i> 型			あり	膜内に8個の単核性孢子
				低温条件(18℃以下)
<i>Pleistophora</i>	単核	卵円形(小型)	あり	膜内に16個以上の単核性孢子
<i>Trachipleistophora</i>	単核	卵円形(大型)	あり	膜内に2~36個の単核性孢子

Vairimorpha 属は生育温度が低温条件(18℃以下)の際、通常の *Nosema* 型の形成様式に加えて、パンスポロブラスト膜に包まれた *Thelohania* 型と呼ばれる 8 個の単核性孢子を形成した。

4-3 結果

4-3.1 胞子サイズの計測

胞子サイズの計測結果を Table 8 に示し、グラフ化したものを Fig. 11 に表した。今回の結果では供試株は 4 つのグループに大別された。*Vairimorpha* sp. OSL-2 の長径は他の *Vairimorpha* 属よりも短かく、*Vairimorpha* sp. NIS-M11 と *N. bombycis* NIS-001 株にサイズが近かったが、胞子の形状は楕円形であった (Fig. 13-A)。

4-3.2 胞子形成様式の観察

確認できた胞子形成様式を Fig. 12~23 に示し、その中で観察できた各発育ステージを Table 9 に示した。スポロプラズムは *Pleistophora* sp. OSL-7 と *Vairimorpha* sp. OSL-11 のみで確認した。メロントとスポロントはほとんどの株で観察できた。スポロブラストは 6 株確認した。短極糸型胞子は *Vairimorpha* sp. OSL-8、12 で確認された。*Pleistophora* sp. OSL-6、7 と *Trachipleistophora* sp. OSL-10 で、パンスポロブラスト膜に包まれた状態で 16~30 個の胞子が形成されるのを確認した (Fig. 17、18、21)。

Table 8 胞子サイズによる比較

株名	胞子サイズ (μm)			
	長径	標準偏差	短径	標準偏差
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	4.49 ± 0.31	×	2.17 ± 0.12	
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	3.69 ± 0.36	×	1.84 ± 0.25	
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	3.92 ± 0.32	×	2.07 ± 0.19	
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	4.47 ± 0.34	×	2.21 ± 0.15	
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	3.24 ± 0.42	×	1.89 ± 0.25	
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	2.18 ± 0.23	×	1.26 ± 0.10	
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	2.32 ± 0.29	×	1.30 ± 0.13	
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	4.41 ± 0.32	×	2.01 ± 0.23	
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	4.46 ± 0.41	×	2.14 ± 0.21	
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	4.54 ± 0.38	×	2.66 ± 0.22	
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	4.37 ± 0.40	×	2.14 ± 0.09	
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	4.39 ± 0.31	×	2.04 ± 0.12	
<i>N. bombycis</i> NIS-001	3.6		2.2	
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M11	3.9		1.7	
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M12	5.1		2.1	
<i>Pleistophora</i> sp. NIS-M27	2.5		1.3	
<i>T. extenrec</i>	4.6		2.7	

比較対象として *N. bombycis* NIS-001 (藤原 1985)、*Vairimorpha* sp. NIS-M11 (藤原 1980)、*Vairimorpha* sp. NIS-M12 (藤原 1980)、*Pleistophora* sp. NIS-M27 (田中ら 1972)、*T. extenrec* (Vávra et al. 2011)を使用した。

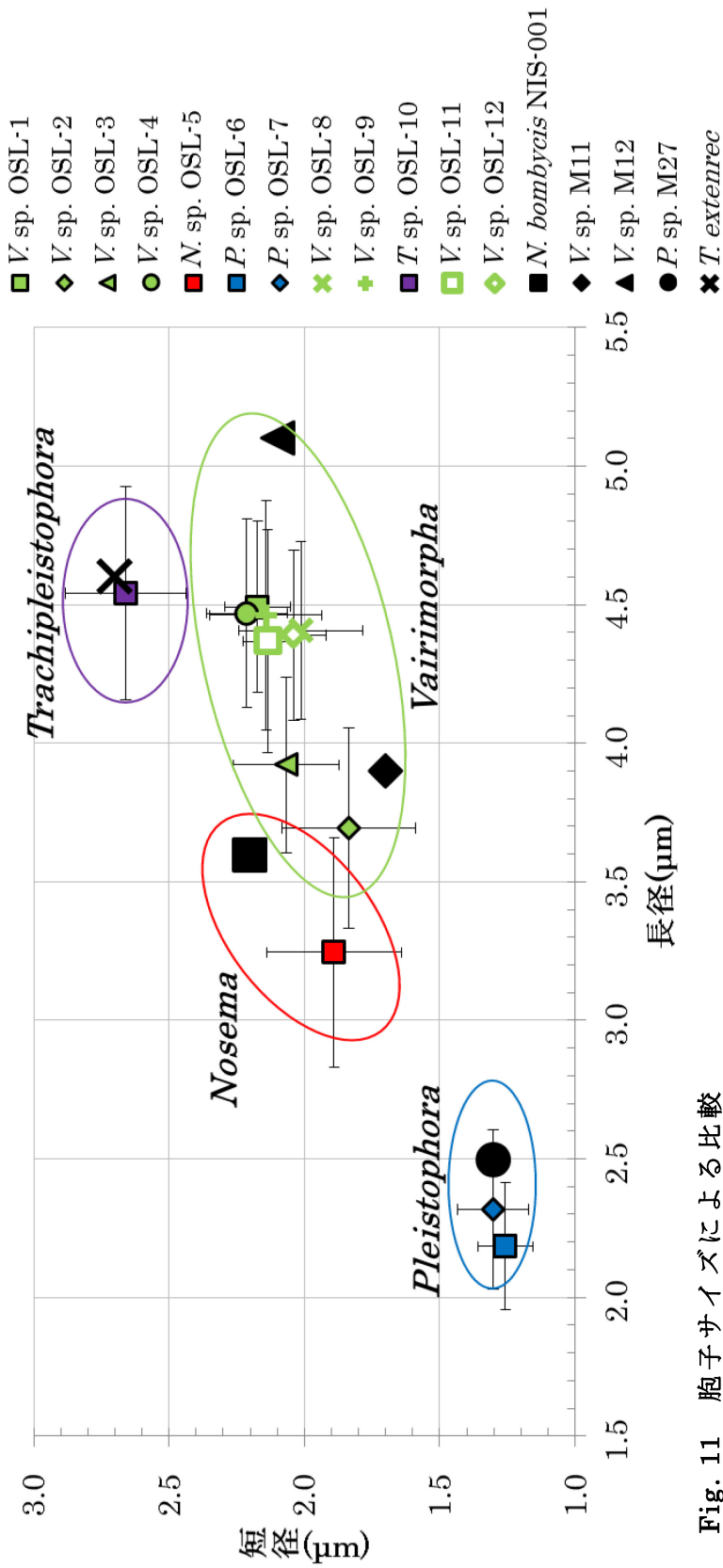


Fig. 11 胞子サイズによる比較

各マークから出ているバーは標準偏差を示した。SSU rRNA 遺伝子配列解析で分類された属によって、赤 (*Nosema* 属)、黄緑 (*Vairimorpha* 属)、青 (*Pleistophora* 属)、紫 (*Trachipleistophora* 属) で示した。



Fig. 12 *Vairimorpha* sp. OSL-1 の孢子

A は孢子、バーは 10 μ m を示した。

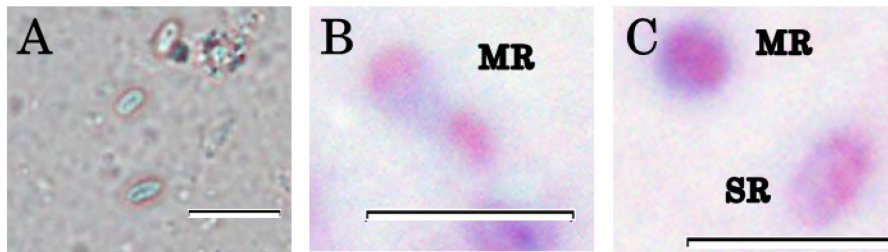


Fig. 13 *Vairimorpha* sp. OSL-2 の孢子形成様式

A は孢子、B は分裂中の 4 核性メロント (MR : meront)、C は 2 核性メロントとスポロント (SR : sporont)、バーは 10 μ m を示した。

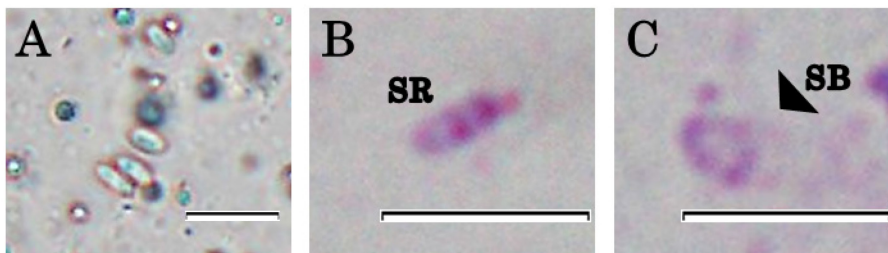


Fig. 14 *Vairimorpha* sp. OSL-3 の孢子形成様式

A は孢子、B はスポロント (SR : sporont)、C はスポロblast (SB : sporoblast)、バーは 10 μ m を示した。

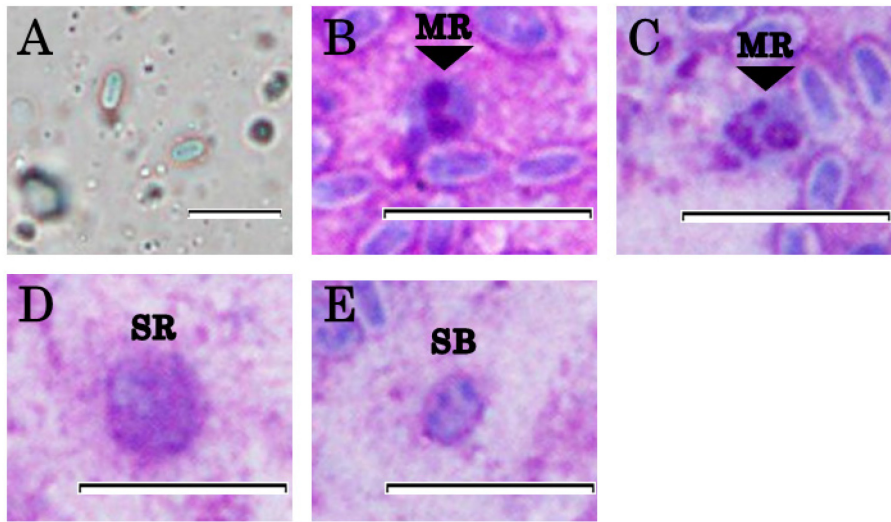


Fig. 15 *Vairimorpha* sp. OSL-4 の孢子形成様式

A は孢子、B は 2 核性メロント(MR : meront)、C は 4 核性メロント、D はスポロント (SR : sporont)、E はスポロblast(SB : sporoblast)、バーは 10µm を示した。

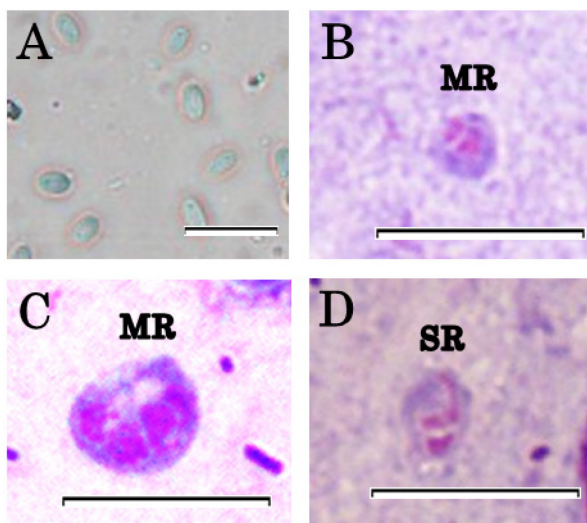


Fig. 16 *Nosema* sp. OSL-5 の孢子形成様式

A は孢子、B は 2 核性メロント(MR : meront)、C は 4 核性メロント、D はスポロント (SR : sporont)、バーは 10µm を示した。

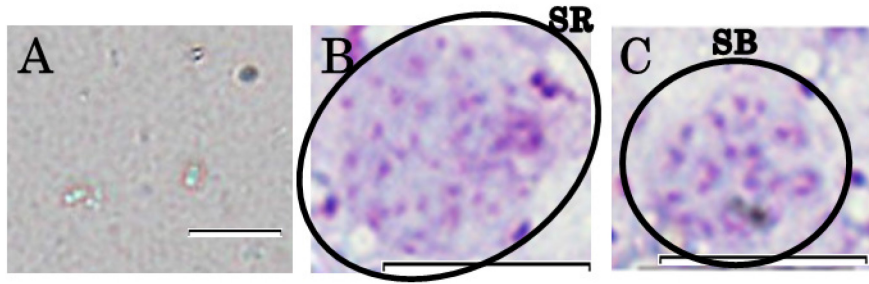


Fig. 17 *Pleistophora* sp. OSL-6 の孢子形成様式

A は孢子、B はスポロント(SR: sporont)、C はスポロblast(SB: sporoblast)、バーは 10µm を示した。

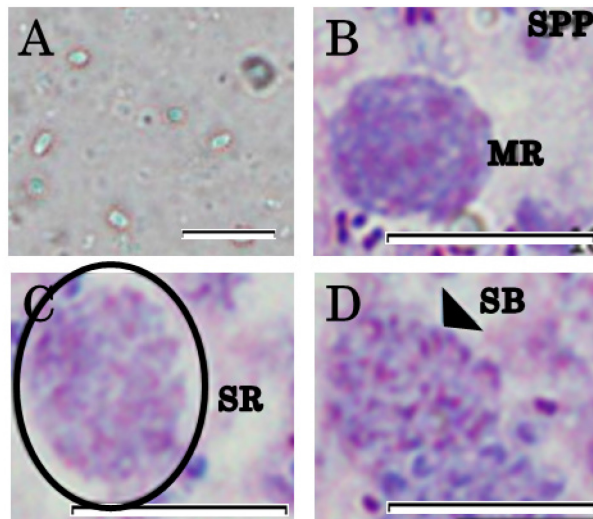


Fig. 18 *Pleistophora* sp. OSL-7 の孢子形成様式

A は孢子、B はスポロプラズム(SPP: sporoplasm)と多核性メロント(MR: meront)、C は多核性スポロント(SR: sporont)、D はスポロblast(SB: sporoblast)、バーは 10µm を示した。

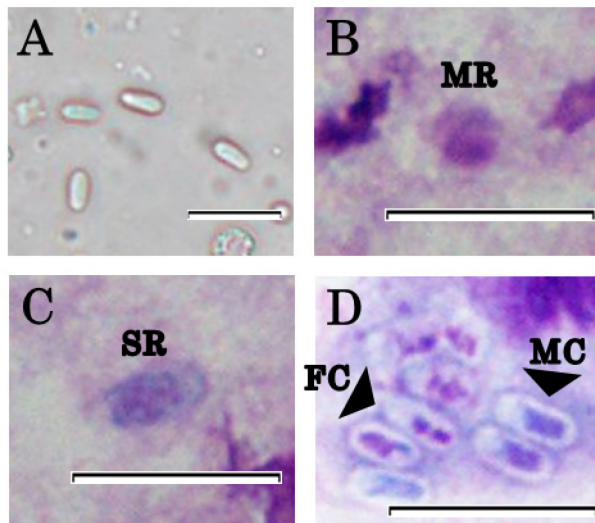


Fig. 19 *Vairimorpha* sp. OSL-8 の孢子形成様式

A は孢子、B は 2 核性メロント(MR : meront)、C はスポロント(SR : sporont)、D は短極糸型孢子(FC : spores with a few coils)と長極糸型孢子(MC : spores with many coils)、バーは 10 μ m を示した。

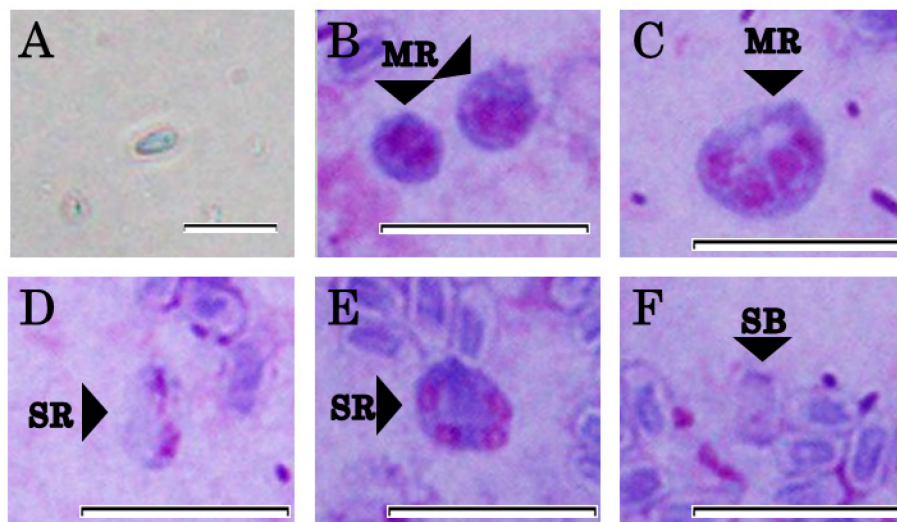


Fig. 20 *Vairimorpha* sp. OSL-9 の孢子形成様式

A は孢子、B は 2 核性メロント(MR : meront)、C は 4 核性メロント、D は分裂中の 2 核性スポロント(SR : sporont)、E は 4 核性スポロント、F はスポロブラスト(SB : sporoblast)、バーは 10 μ m を示した。

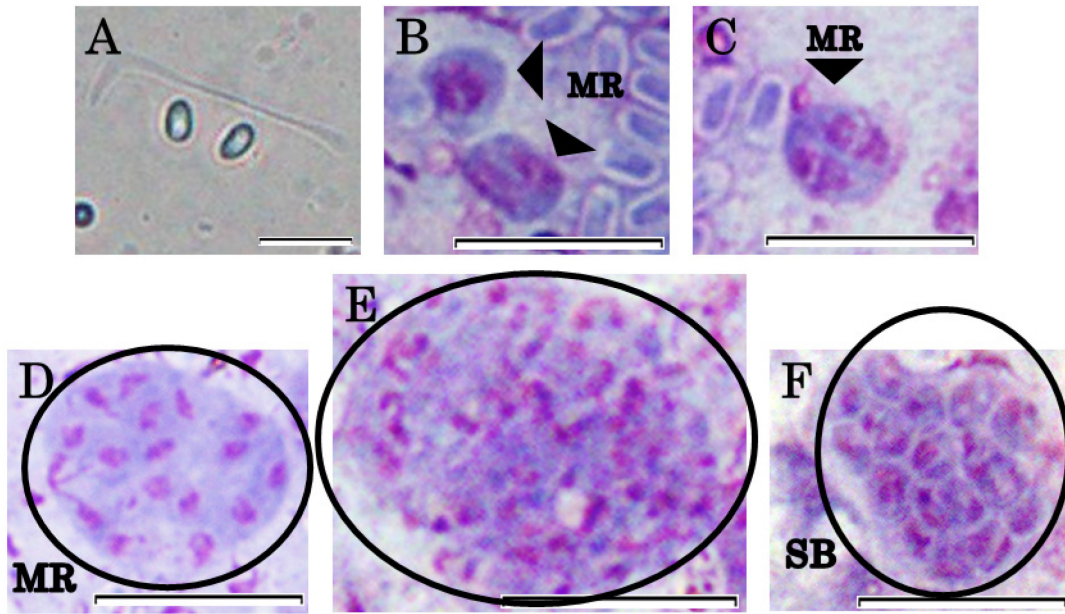


Fig. 21 *Trachipleistophora* sp. OSL-10 の孢子形成様式

A は孢子、B は 2 核性メロント(MR : meront)、C は 4 核性メロント、D は多核性メロント、E は多角体、F はスポロブラスト(SB : sporoblast)、バーは 10 μ m を示した。

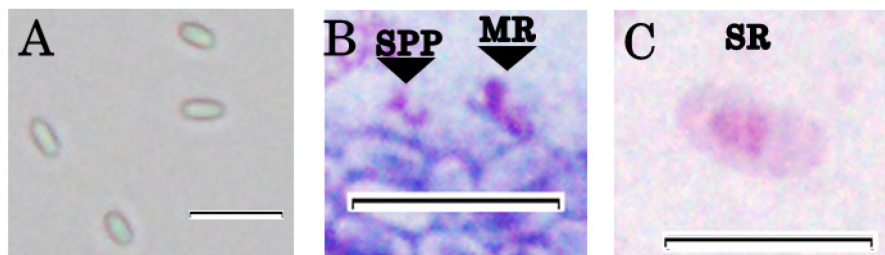


Fig. 22 *Vairimorpha* sp. OSL-11 の孢子形成様式

A は孢子、B はスポロプラズム(SPP : sporoplasm)と 2 核性メロント(MR : meront)、C は 2 核性スポロント(SR : sporont) 、バーは 10 μ m を示した。

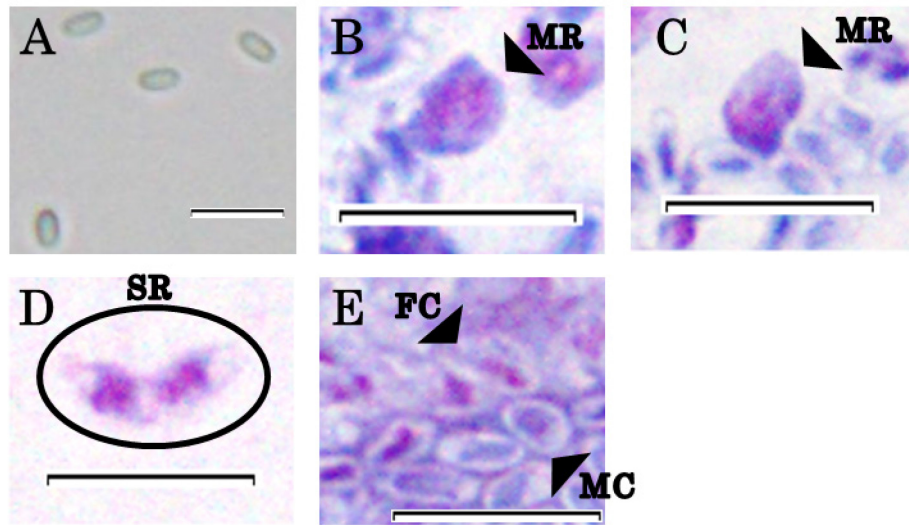


Fig. 23 *Vairimorpha* sp. OSL-12 の孢子形成様式

A は孢子、B は 2 核性メロント(MR : meront)、C は 4 核性メロント、D は分裂中の 4 核性スポロント(SR : sporont)、E は短極糸型孢子(FC : spores with a few coils)と長極糸型孢子(MC : spores with many coils)、バーは 10 μ m を示した。

Table 9 確認された胞子形成様式

供試株	胞子形成様式							長極糸型胞子 (通常胞子)
	スポロプラズム	メロント	スポロント	スポロブラスト	短極糸型胞子	長極糸型胞子 (通常胞子)		
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-1	×	×	×	×	×	×	×	○
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-2	×	○	○	○	×	×	×	○
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-3	×	×	○	○	○	○	×	○
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-4	×	○	○	○	○	○	×	○
<i>Nosema</i> sp. OSL-5	×	○	○	○	×	×	×	○
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-6	×	×	○	○	○	○	×	○
<i>Pleistophora</i> sp. OSL-7	○	○	○	○	○	○	×	○
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-8	×	○	○	○	×	○	○	○
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-9	×	○	○	○	○	○	×	○
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-10	×	○	○	×	○	○	×	○
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-11	○	○	○	○	×	×	×	○
<i>Vairimorpha</i> sp. OSL-12	×	○	○	○	×	×	○	○

Fig. 12～23 で確認されたステージは○、確認できなかつたステージは×で示した。

4-4 考察

4-4.1 胞子サイズの計測

胞子の形状は *Nosema* 属、*Pleistophora* 属、*Trachipleistophora* 属が卵円形や洋梨形で、*Vairimorpha* 属は長楕円形であった。卵円形の 3 属は胞子サイズが異なり、*Pleistophora* 属 < *Nosema* 属 < *Trachipleistophora* 属の順に大きくなった。胞子の形状と大きさによって属ごとに大別することができた。しかし、*Vairimorpha* 属の株の中でも長径の長さに差があり、*Vairimorpha* sp. OSL-2 ($3.69 \times 1.84 \mu\text{m}$) は既知株である *Vairimorpha* sp. NIS-M11 ($3.9 \times 1.7 \mu\text{m}$) よりも短かった。*Vairimorpha* sp. OSL-1、3、4、8、9、11、12 は *Vairimorpha* sp. NIS-M11 よりも大きく、最も長径の長い *Vairimorpha* sp. OSL-1 と *Vairimorpha* sp. OSL-2 を比較すると $0.8 \mu\text{m}$ ほど差があり、これらは同属でありながら別系統である可能性が高いことを示唆した。

4-4.2 胞子形成様式の観察

胞子形成期は *Nosema* 属と *Vairimorpha* 属が 2 核性の遊離胞子を形成した。*Pleistophora* sp. OSL-6、7 と *Trachipleistophora* sp. OSL-10 はパンスポロプラスト膜という袋状の膜の中で複数の胞子を形成している様子が確認され、3 株は膜内に 16~30 個の胞子が観察された。以上のことから、供試した株の各胞子の特徴は SSU rRNA 遺伝子配列解析で分類した 4 属とすべて一致した。

5 章 総合討論

5-1 小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウ由来微胞子虫株の種多様性

小笠原諸島父島におけるハスモンヨトウ由来の微胞子虫 12 株の系統関係を調査するため、SSU rRNA 遺伝子配列解析ならびに孢子形成様式の形態的特徴を観察した。解析結果から、これらは *Nosema* 属、*Vairimorpha* 属、*Pleistophora* 属、*Trachipleistophora* 属の 4 属に分類されたが、孢子形成様式の結果からも各属の特徴を示し、遺伝子配列解析の結果と孢子形成様式の形態的特徴での結果が一致した。また、本研究と同様に韓国、ベトナム、インドネシア、日本大学生物資源科学部の圃場で捕獲されたチョウ目昆虫由来微胞子虫株の遺伝子解析も行った。日大株は *Nosema* 属と *Vairimorpha* 属の 2 種のみが分離され、国外の株は *Nosema* 属のみが分離された。このことから、小笠原のハスモンヨトウに感染している微胞子虫は多様性に富んでいることが示唆された。また、国内のチョウ目昆虫由来微胞子虫では *Nosema* 属(藤原 1985; 岩野・石原 1991)、*Vairimorpha* 属(藤原 1980)、*Pleistophora* 属(田中ら 1972)、*Thelohania* 属(藤原 1984)の分離例が報告されているが、*Trachipleistophora* 属の事例はこれまでに報告されていない。本研究で検出された *Trachipleistophora* 属の微胞子虫株は、すでに哺乳類のテンレックからの報告事例(Vávra et al. 2006)はあるものの、国内のチョウ目昆虫から分離された初の事例であり、小笠原諸島特有の系統であると考えられた。一地点で 4 属もの系統を検出したことから、小笠原諸島ではハスモンヨトウ感染性微胞子虫の種ならびに遺伝子の多様性が高いことが示された(Shigano et al. 2015)。

5-2 小笠原株の微生物農薬資材としての有用性

ハスモンヨトウは野菜・花卉・果樹など広範囲の作物を食害する広食性害虫である。本種の老齢幼虫は化学農薬が効きにくく、また一部の薬剤に対し

て薬剤抵抗性を示すことが報告されている(広瀬 1994; 市川ら 1991)。新たな防除技術の活用が求められており、その一つとして微生物農薬の利用が期待されている。

本研究の感染実験の結果、農業害虫であるハスモンヨトウやオオタバコガに感染し、強い殺虫性を示す株が確認された。特に、*Vairimorpha* sp. OSL-11、12 の 2 株はハスモンヨトウとオオタバコガの両方に感染して強い殺虫性があることが確認された。しかし、益虫であるカイコに対する感染実験でも強い殺虫性が確認された。以上のことから、*Vairimorpha* sp. OSL-11、12 の 2 株はハスモンヨトウとオオタバコガに対する微生物農薬資材として有用であることが示唆されたが、養蚕施設の近くでは使用を避けるなど、使用するには注意が必要であると考えられる。

摘要

東京都小笠原諸島父島において微生物防除剤として活用できる有用な微胞子虫株を検索するために、農業害虫であるハスモンヨトウから微胞子虫を分離した。2012年4月から2015年3月までの3年間にわたり、ハスモンヨトウの発生活動と微胞子虫の感染動態を調査した。当地域ではハスモンヨトウが一年中発生しており、感染個体もほとんど毎月確認された。捕獲数は毎月高いが、8月頃は低下した。感染率は5~7月頃に上昇する傾向がみられ、多くの微胞子虫株が分離された。

2012年度に分離した74株の中から形態的特徴によって12株を選出し、遺伝子解析と3種のチョウ目昆虫に対する感染実験を行った。SSU rRNA 遺伝子配列解析では分離株は4属の系統に識別されることが確認され、感染実験では各属の胞子の形態的特徴と胞子形成様式を観察した。*Nosema* 属に分類されたのは1株で、分離株の中では中間的なサイズで卵円形の胞子をしており、胞子形成は多胞子芽膜を作らずに一つずつ別々に形成された。*Vairimorpha* 属は8株で長楕円形をしており、胞子形成は *Nosema* 属と同様であった。*Pleistophora* 属は2株で、小サイズの卵円形をしており、多胞子芽膜の中に16~30の胞子を形成した。*Trachipleistophora* 属は1株で、大サイズの卵形をしており、胞子形成は *Pleistophora* 属と同様であった。4属に分類された分離株の配列解析と形態的特徴は一致しており、当地域における微胞子虫株の多様性が示された。

また、感染実験では宿主による感染性の相違ならびに感染部位について調査した。*Nosema* 属の株は、配列解析でカイコ微粒子病の病原微生物 *N. bombycis* と同じクラスターに収束したが、カイコに感染はするものの感染率は低く致死性は確認できなかったため、類似した別系統であると考えられた。*Vairimorpha* 属の8株は、いくつかの株が異なる感染性を示したことから、複数の系統が含まれていることが示唆された。一部の株がハスモンヨトウと

オオタバコガに対して重度感染し、これらは微生物防除資材として有用な株になると考えられた。*Pleistophora* 属株はハスモンヨトウとオオタバコガに感染し、主に中腸に部分感染する株であった。*Trachipleistophora* 属株は 3 種に感染するが、特にカイコに対して重度感染し、絹糸腺は白濁して肥大化させることから、繭生産上、悪影響を与える恐れもあることが示唆された。また、本研究で *Trachipleistophora* 属の微孢子虫株を分離したが、これは国内のチョウ目昆虫から分離された初事例となった。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご協力いただいた以下の方々に対して感謝申し上げます。まず、本研究および論文作成には、日本大学生物資源科学部生命農学科応用昆虫科学研究室の岩野秀俊教授ならびに畠山吉則准教授に多大なるご支援と的確なご指示を賜りました。また、本論文の作成に際し、日本大学生物資源科学部森林資源科学科森林動物学研究室の岩田隆太郎教授、日本大学生物資源科学部くらしの生物学科くらしの微生物研究室の光澤浩教授に査読していただきました。次に、本研究で使用した小笠原のハスモンヨトウは東京都小笠原亜熱帯農業センターの大林隆司研究員から提供していただきました。また、論文内で使用したサンプルについてはインドネシアのものは Gadjah Mada University の Arman Wijonarko 博士、ベトナムのサンプルは Can Tho University の Tran Van Hai 博士から提供していただきました。最後に、応用昆虫科学研究室の方々には実験協力や日々の生活の中でお世話になりました。

以上の方々のおかげでここまで研究をまとめることができました。この場をお借りして改めて深く感謝の意を示します。

引用文献

- 阿久津四良・岩野秀俊・福原敏彦 (2000) オオタバコガ個体群における微胞子虫の発生について. 農林害虫防除研究会 News Letter (6) 2
- Bhat SA, Bashir I, Kamili AS (2009) Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera- bombycidae). *Afr. J. Agric. Res.* 4 (13) 1519-1523
- Bidierre C, Pagès M, Méténier G, David D, Bata J, Prensier G, Vivarès CP (1994) On small genomes in eukaryotic organism: Molecular karyotypes of two microsporidian species (Protozoa) parasites of vertebrates. *C. R. Acad. Sci. III* 317 (5) 399-404
- Canning EU, and Lorn J (1986) The microsporidia of vertebrates. *Academic Press, London* 289
- Cavalier-Smith T (1983) A 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In: Schenk HEA, Schwemmler W, editors. Endocytobiology II: Intracellular space as oligogenetic ecosystem. *Walter de Gruyter* 1027-1034
- Chen YP and Huang ZY (2010) *Nosema ceranae*, a newly identified pathogen of *Apis mellifera* in the USA and Asia. *Apidologie* 41 364-374
- Didier ES and Weiss LM (2006) Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19 (5) 485-492
- 藤原公 (1980) カイコから分離された 3 種の微胞子虫 (*Nosema* sp.) について. 日蚕雑 49 (3) 229-236
- 藤原公 (1984) 蚕から分離された *Thelohania* sp.. 日蚕雑 53 (5) 459-460
- 藤原公 (1985) 種繭養蚕において検出された微胞子虫類. 日蚕雑 54 (2) 108-111

- Germota A, Philippe H, Guyader HL (1997) Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 87 (2) 159-168
- Hatakeyama Y, and Hayasaka S (2002) Specific amplification of microsporidia DNA fragments using multiprimer PCR. *JARQ* 36 (2) 97-102
- Hirt RP, Healy B, Vossbrinck CR, Canning EU, Embley TM (1997) A mitochondrial Hsp70 orthologue in *Vairimorpha necatrix*: molecular evidence that microsporidia once contained mitochondria. *Curr. Biol.* 7 (12) 995-998
- 広瀬拓也 (1994) 高知県におけるハスモンヨトウの薬剤抵抗性について. 四国植防 (29) 107-112
- 市川耕治・大野徹・浅山哲 (1991) ハスモンヨトウのメソミル剤に対する感受性検定. 関西病虫害研究会報 (33) 125-126
- 井藤麻未・坂巻祥孝・津田勝男・櫛下町鉦敏 (2007) 食餌の異なるハスモンヨトウ *Spodoptera litura* (Fabricius)の発育と繁殖特性. *South Pacific Studies* 27 (2) 73-82
- 岩野秀俊・阿久津四良・畠山吉則・Wijonarko A. 藤島加奈子・井上佳緒里・福原敏彦 (2002) 韓国産オオタバコガから分離された *Vairimorpha* 属微胞子虫株の性状. 第46回日本応用動物昆虫学会講要 39
- 岩野秀俊・石原廉 (1991) *Nosema bombycis* のスジキリヨトウ成虫からの分離. 日蚕雑 60 (4) 279-287
- 岩野秀俊・川上紗代子・山本裕一・志賀野倫明・Tran Van Hai・畠山吉則 (2015) ベトナム産ハスモンヨトウから分離された微胞子虫 *Nosema bombycis* の家蚕に対する感染特性. 日蚕雑 84 (3) 237-243

- Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Méténier G, Thomarat F, Prensier G, Barbe V, Peyretailade E, Brottier P, Wincker P, Delbac F, Alaoui HE, Peyret P, Saurin W, Gouy M, Weissenbach J, Vivarès CP (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414 450-453
- Kawakami Y, Iwano H, Hatakeyama Y, Inoue T, Canning EU, Ishihara R (2001) Use of PCR with the specific primers for discrimination of *Nosema bombycis*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 70 (1) 43-48
- Kawarabata T (2003) Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan. *J. Seric. Sci. Jpn.* 72 (1) 1-32
- Keeling P (2009) Five questions about microsporidia. *PLoS Patho* 5 (9) 1-3
- Keeling PJ and Fast NM (2002) Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annu. Rev. Microbiol.* 56 93-116
- Keeling PJ, Luker MA, Palmer JD (2000) Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17 (1) 23-31
- 松浦博一・内藤篤・菊池淳志 (1991) ハスモンヨトウの耐寒性と越冬に関する研究 I. 各発育段階における低温の影響. 応動昆 35 (1) 39-44
- Miyashita K (1971) Effectsof constantand alternating temperatures on the development of *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera : Noctuidae) Kazuyoshi. *Appl. Entomol. Zool.* 6 (3) 105-111
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R, Schäffer AA (2008) Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* 24 (16) 1757-1764

- Norris RF, Kogan M, Caswell-Chen EP (2002) Concepts in integrated pest management. *Prentice Hall* (小山重郎・小山晴子 (訳) (2006) IPM 総論 有害生物の総合的管理. 築地書店. 155-158)
- Peyretilade E, Broussolle V, Peyret P, Métenier G, Gouy M, Vivarès CP (1998a) Microsporidia, amitochondrial protists, possess a 70-kDa heat shock protein gene of mitochondrial evolutionary. *Origin. Mol. Biol. Evol.* 15 (6) 683-689
- Peyretilade E, Biderre C, Peyret P, Duffieux F, Méténier G, Gouy M, Michot B, Vivarès CP (1998b) Microsporidian *Encephalitozoon cuniculi*, a unicellular eukaryote with an unusual chromosomal dispersion of ribosomal genes and a LSU rRNA reduced to the universal core. *Nucleic Acids Res.* 26 (15) 3513-3520
- Peyretilade E, El Alaoui H, Diogon M, Polonais V, Parisot N, Biron DG, Peyret P, Delbac F (2011) Extreme reduction and compaction of microsporidian genomes. *Res. Microbiol.* 162 (2) 598-606
- 斉藤哲夫・松本義明・平嶋義宏・久野英二・中島敏夫 (1999) 新応用昆虫学 三訂版. 朝倉書店 110-182
- Shigano T, Hatakeyama Y, Nishimoto N, Watanabe M, Yamamoto Y, Wijonarko A, Ohbayasi T, Iwano H (2015) Variety and diversity of microsporidia isolated from the common cutworm *Spodoptera litura* in Chichijima, Ogasawara Islands. *J. Insect Biotech. Sericol.* 84 (3) 69-73.
- Slamovits CH, Fast NM, Law JS, Keeling PJ (2004) Genome compaction and stability in microsporidian intracellular parasites. *Curr. Biol.* 14 (10) 891-896

- Sokolova YY, Dolgikh VV, Morzhina EV, Nasonova ES, Issi IV, Terry RS, Ironside JE, Smith JE, Vossbrinck CR (2003) Establishment of the new genus *Paranosema* based on the ultrastructure and molecular phylogeny of the type species *Paranosema grylli* Gen. Nov., Comb. Nov. (Sokolova, Seleznirov, Dolgikh, Issi 1994), from the cricket *Gryllus bimaculatus* Deg. *J. Invertebr. Pathol.* 84 (3) 159-172
- Sprague V (1977) Annotated list of species of microsporidia. In: Bulla Jr LA, Cheng TC (eds) Comparative pathobiology. volume 2 systematics of the microsporidia. *Plenum press, New York* 31-334
- Steinhaus EA (1949) Protozoan infections. In: Principles of the insect pathology. *McGraw-Hill Book Co.* 592-602
- 田中茂雄・清水孝夫・小林正彦・石原廉 (1972) 家蚕の新原虫病について. 日蚕雑 41 (2) 89-95
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30 (12) 2725-2729
- Thomarat F, Vivarès CP, Gouy M (2004) Phylogenetic analysis of the complete genome sequence of *Encephalitozoon cuniculi* supports the fungal origin of microsporidia and reveals a high frequency of fast-evolving genes. *J. Mol. Evol.* 59 (6) 780-791
- 戸田光彦・中川直美・鋤柄直純 (2009) 小笠原諸島におけるグリーンアノールの生態と防除. 地球環境 14 (1) 39-46
- Tojo S, Ryuda M, Fukuda T, Matsunaga T, Choi D, Otuka A (2013) Overseas migration of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), from May to mid-July in East Asia. *Appl. Entomol. Zool.* 48 (2) 131-140

- Tojo S, Mishima H, Kamiwada H, Ngakan PO, Chang KS (2008) Variations in the occurrence patterns of male moths of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) among Southeastern Asian countries, as detected by sex pheromone trapping. *Appl. Entomol. Zool.* 43 (4) 569-576
- Vàvea J, Horak A, Modry D, Lukes J, Koudela B (2006) *Trachipleistophora extenrec* n. sp. a new microsporidian (Fungi: Microsporidia) infecting mammals. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (6) 467-476
- Vávra J, Kamler M, Modrý D, Koudela B (2011) Opportunistic nature of the mammalian microsporidia: experimental transmission of *Trachipleistophora extenrec* (Fungi: Microsporidia) between mammalian and insect hosts. *Parasitol. Res.* 108 (6) 1565-1573
- Vávra J and Lukeš J (2013) Microsporidia and ‘The Art of Living Together’. *Adv. Parasitol.* 82 253-319
- Vivarès CP, Gouy M, Thomarat F, Méténier G (2002) Functional and evolutionary analysis of a eukaryotic parasitic genome. *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (5) 499-505
- Weiss LM (2001) Microsporidia: emerging pathogenic protists. *Acta. Trop.* 78 (2) 89-102
- Wittner M and Weiss LM (1999) The microsporidia and microsporidiosis. *ASM Press* 1-553
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51 (2) 221-271
- Woese CR (2004) A new biology for a new century. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68 (2) 173-186

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W (2000) A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7 (1-2) 203-214