

# 昆虫感染性大型微胞子虫の性状解明に関する研究

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

中村 春花

2020

## 目次

緒言 .....	1
第 1 章 <i>Trachipleistophora haruka</i> の生物学的特性 .....	9
序論 .....	9
材料および方法 .....	11
1. 供試微胞子虫株 .....	11
2. 各処理条件における孵化率 .....	12
3. カイコへの感染性の調査 .....	13
結果 .....	15
1. 各処理条件における孵化率 .....	15
2. カイコへの感染性の調査 .....	17
考察 .....	18
第 2 章 チョウ目以外からの昆虫感染性大型微胞子虫株の検索 ...	20
序論 .....	20
材料および方法 .....	22
1. シオカラトンボからの微胞子虫の分離 .....	22
2. トンボ目昆虫由来微胞子虫株の孢子サイズ .....	22
3. SSU rRNA 遺伝子配列による分子系統解析 .....	23
結果 .....	27
1. シオカラトンボからの微胞子虫の分離 .....	27
2. トンボ目昆虫由来微胞子虫株の孢子サイズ .....	27
3. SSU rRNA 遺伝子配列による分子系統解析 .....	30
考察 .....	33
第 3 章 他の昆虫感染性大型微胞子虫の生物学的特性 .....	35
序論 .....	35
材料および方法 .....	36

1. 供試微胞子虫株 .....	36
2. 各処理条件における孵化率の測定 .....	37
3. <i>Trachipleistophora</i> sp. FOA-2014-10 における NaCl の最適孵化濃度の調査 .....	37
4. カイコへの感染性・増殖率の調査 .....	38
結果 .....	40
1. 各処理条件における孵化率 .....	40
2. <i>Trachipleistophora</i> sp. FOA-2014-10 における NaCl の最適孵化濃度 .....	45
3. カイコへの感染率 .....	48
4. 接種濃度別のカイコへの感染性と増殖率 .....	63
考察 .....	71
第 4 章 昆虫感染性大型微胞子虫の孢子形成様式の比較 .....	76
序論 .....	76
材料および方法 .....	77
1. 供試材料 .....	77
2. 微胞子虫孢子液の精製 .....	77
3. 培養細胞への接種と観察 .....	78
結果 .....	80
1. <i>Trachipleistophora haruka</i> の孢子形成様式 .....	80
2. <i>Trachipleistophora</i> sp. FOA-2014-10 の孢子形成様式 .....	84
3. <i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-13 の孢子形成様式 .....	88
4. <i>Nosema bombycis</i> NIS-001 の孢子形成様式 .....	91
考察 .....	94
総合討論 .....	99
摘要 .....	102

謝辭 .....	103
引用文獻 .....	104



## 緒言

国際連合広報センター (UNIC: United Nations Information Centre) (2019) によると 2019 年の時点で 77 億人である世界人口は、2030 年には 85 億人、2050 年には 97 億人、2100 年には 109 億人へと増加すると予測されている。また、国連食糧農業機関 (FAO: Food Agriculture Organization of the United Nations) によると人口増加に比例し、穀物の需要も増加すると予測されている。しかし、食料を生産するための耕地面積は 1965 年から 2015 年まではほぼ変化がなく、今後の増加も期待できない (西本, 2019)。また、農作物の生産において、気候変動や水資源の制約、土壌劣化などの不安定要素が存在し、穀物供給が逼迫するリスクも指摘されている (農林水産省, 2018)。国連気候変動枠組条約 (UNFCCC: United Nations Framework Convention on Climate Change) (2018) によると気候変動により熱帯性暴風雨や洪水、干ばつといった異常気象が引き起こされており、FAO (2017) によれば 2005 年から 2015 年の間には自然災害によって発展途上国の農業部門で 960 億ドル相当の損害が生じ、この 40 年でアジア太平洋地域の自然災害による経済的損失は 16 倍に増加したと報告されている。このような環境下においても世界人口を支える食料を安定して供給するためには、単位耕地面積当たりの生産性の向上が必須である (西本, 2019)。そのためには、新たな耕作地の造成や品種改良による収量の増大だけでなく、効率的な植物保護技術の開発が極めて重要となっている (国見, 2016)。

日本植物防疫協会 (2008) によると、Oerke *et al.* (1994) は、経済的に重要とされる 8 作物の生産性について解析した結果、生産金額ベースにおいて潜在的に 70% の損失を被っていると報告している。つまり、適切な病害虫や雑草の防除を行わなかった場合に生産可能な量は潜在的な収量の 30% ということになると説明している。国見 (2016) によると、現在の世界の推定農業生産額 111 兆円のうち、病害虫や雑草害により 43 兆 3,000 億円の損失があ

るとされており、病虫害や雑草の効率的な防除方法の開発は農業の重要な課題となっている。

現在、病虫害防除には化学合成農薬が主要な役割を果たしている（国見，2016）。化学合成農薬は、農業生産の向上と安定に大きな役割を果たしている一方で、不適切・過剰な使用による環境汚染、生態系の攪乱、農薬抵抗性生物の出現などの問題も引き起こしている（岡田，1993）。環境汚染の原因となった化学合成農薬の例として、有機塩素系殺虫剤が挙げられる。有機塩素系殺虫剤とは、ジクロロジフェニルトリクロロエタン（DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethane）やベンゼンヘキサクロリド（BHC: Benzene Hexachloride）などで、日本においては第二次世界大戦後に使用され始めた。有機塩素系殺虫剤の殺虫効果は極めて高いが、昆虫以外の生物への毒性も強く難分解・蓄積性で環境汚染を引き起こすなどの問題点があったため、1970年代までに国内外で多くの剤が使用禁止となった（木村ら，2010）。その後も、様々な化学合成農薬が開発され続け、1990年頃にはネオニコチノイド系の剤が開発された。ネオニコチノイド系農薬はニコチン類似構造を持ち、毒性については昆虫特異性が高いため、世界中で使用量が増加している。一方、ネオニコチノイド系農薬には浸透性があるため、例えば種子内部に浸透すると成長後も殺虫効果が持続するが、果実内部に浸透すればその残留が問題となる（木村ら，2010）。また、花粉媒介ミツバチの蜂群崩壊症候群（CCD）との関係も指摘されているなどその利用が問題視されている（中村，2015）。このように化学合成農薬は、効率的な病虫害防除を可能にする一方で、過度な使用により環境問題を引き起こすという側面も持ち合わせているため、化学合成農薬に依存した防除体系の改善が求められている。

日本においては、1999年7月に21世紀における食料、農業および農村に関する施策の基本指針となる「食料・農業・農村基本法」が施行され、この基本法の施策を具体的に実施するための基本的な計画として2000年3月に

「食料・農業・農村基本計画」が閣議決定された。この計画では農業の持続的な発展について触れられており、「農業は、食料その他の農産物の供給の機能及びそれ以外の多面的機能という重要な機能を有している。したがって、将来にわたって、食料の安定供給が確保され、かつ、多面的機能が発揮されるようにするためには、農業の持続的な発展が図られなければならない。このため、農業生産に必要な農地、農業用水その他の農業資源及び農業の担い手が確保され、農業技術水準の向上を伴いながら、地域の特性に応じてこれらが効率的に組み合わされた望ましい農業構造が確立されるようにするとともに、農業の自然循環機能（農業生産活動が自然界における生物を介在する物質の循環に依存し、かつ、これを促進する機能）の維持増進により、環境と調和のとれた農業生産の確保が図られるようにしなければならない。」と書かれている（農林水産省, 2000）。その後、2005年3月に新たに閣議決定された「食料・農業・農村基本計画」では、改革の基本的視点として「環境保全を重視した施策の展開」が位置付けられ、環境保全を重視した安定した農業生産を求められるようになった（農林水産省, 2005）。ここで述べられているような環境と調和のとれた農業、すなわち環境保全型農業を推進するためには農薬を効率的に利用する技術の開発が必要であり、その手段のひとつに IPM (Integrated Pest Management) が挙げられる（對馬, 2014）。農林水産省では、IPM の定義を総合的病虫害・雑草管理とし、「利用可能なすべての防除技術を経済性を考慮しつつ慎重に検討し、病虫害・雑草の発生増加を抑えるための適切な手段を総合的に講じるものであり、これを通じ、人の健康に対するリスクと環境への負荷を軽減、あるいは最小の水準にとどめるものである。また、農業を取り巻く生態系の攪乱を可能な限り抑制することにより、生態系が有する病虫害及び雑草抑制機能を可能な限り活用し、安全で消費者に信頼される農作物の安定生産に資するものである。」と定義している（農林水産省, 2005）。IPM における防除では、化学合成農薬を利用する化学的防除

のほかに、生物的防除、物理的防除などの活用が目指されている（對馬, 2014）。

IPM の推進・定着を目指すにあたってはいくつもの課題が挙げられる。その課題のひとつとして、環境負荷の軽減などに向けた農薬使用の改善がある。農薬による防除は IPM においても最も効果的な手段となるため、環境に配慮した薬剤の選択や使用が重要となる。そのためには、病虫害の発生状況に応じて環境負荷軽減を考慮した、選択性薬剤や植物生長調節剤、生物農薬等の使用が求められている（大岡, 2009）。生物農薬とは、天敵生物や天敵微生物、フェロモンやホルモンなどの生化学的物質を含んだ生物防除剤で、これらを使用した病虫害防除を生物防除という。上記のうち天敵微生物を利用した生物農薬は微生物農薬とも言われる。微生物農薬は、昆虫病原微生物を資材化し害虫防除に利用される微生物殺虫剤、植物病害の防除に使用される微生物殺菌剤、雑草防除に使用される微生物除草剤の 3 つに大別されており、細菌、真菌、ウイルス、線虫などが利用されている（国見, 2016）。実際に製剤化されている昆虫病原微生物の一例として、昆虫病原性細菌の *Bacillus thuringiensis* や昆虫病原性糸状菌の *Beauveria bassiana* などが挙げられる。*Bacillus thuringiensis aizawai* は、「ゼンターリ顆粒水和剤」という商品名で住友化学から販売されており、アオムシ、コナガ、ヨトウムシなどの防除に用いられている。*B. bassiana* は、「ボタニガード ES」という商品名でアリスタ ライフサイエンス株式会社から販売されており、コナジラミ類、アザミウマ類、コナガなどの防除に利用されている。本研究対象である微胞子虫は、日本では製剤化されていないが、米国では微生物農薬として登録・製剤化された例がある。

微胞子虫（Microsporidia）は、昆虫や魚類、哺乳類などに感染性を示す単細胞真核生物である（Tanada and Kaya, 1993）。以前は原生生物に分類されていたが、現在は菌界の一分類群に位置づけられている（Keeling, 2009）。これまでに約 187 属 1,500 種が発見され（Vávra and Lukeš, 2013）、いずれも

高い宿主特異性をもっており、宿主の約 4 割が昆虫で占められる (Tanada and Kaya, 1993)。宿主昆虫としては、チョウ目が最も多く、次いでハエ目、コウチュウ目、ハチ目、バッタ目、カメムシ目と多岐に及んでおり、感染すると宿主昆虫に対して病気を引き起こす (青木・畠山, 2014)。微胞子虫に感染した昆虫には、発育遅延や脱皮不全などの病徴が現れ、致死する場合もある。微胞子虫による病気の例としてカイコ微粒子病があり、カイコ *Bombyx mori* (Linnaeus) (チョウ目: カイコガ科) の最も致命的な病気として養蚕業に大きな損失をもたらしてきた (Bhat *et al.*, 2009)。カイコ微粒子病は、微胞子虫 *Nosema bombycis* によって引き起こされ、特に脂肪体、中腸、マルپیギー管、生殖腺に感染しやすいことが明らかになっている (青木・畠山, 2014)。また、感染幼虫の上皮には黒コショウ様の斑点病徴が見られることや経卵感染するなどの特徴がある (Bhat *et al.*, 2009)。既に製剤化されている *Paranosema locustae* はバッタ目に感染し、食欲や発育・繁殖不良を引き起こして感染宿主を衰弱させ、死亡率を高める (Canning, 1962; Henry and Oma, 1974; Ewen and Mukerji, 1980; Johnson and Pavlikova, 1986)。主に脂肪体に感染し、感染が重度になると腹部やまれに胸部がローズピンクやくすんだ赤に変色するという病徴が現れる (Canning, 1962)。 *P. locustae* は微生物農薬として「Nolo Bait™」という商品名で M & R Durango, Inc. から販売されており、アメリカ西部をはじめとする地域や多くの国でバッタ目の防除に利用されている (Plichuk *et al.*, 2013)。

微胞子虫を生物農薬の資材として防除に利用する利点としては、宿主特異性が高く選択的な防除が期待できる点、自然界において昆虫同士の共食いや小鳥などの捕食者により水平伝播するため、広範囲での防除が期待できる点、経卵感染によって垂直伝播もするため、世代を超えた長期的な防除が期待できる点などが挙げられる (安永, 1995)。しかし、今のところ製剤化に至った微胞子虫は *P. locustae* のみである。微生物農薬を開発する上での問題点と

しては、防除効果の安定性や製剤化のための大量培養法・保存性などが挙げられる。微生物農薬は「生き物」を利用しているため、防除効果を安定化させることが難しい。防除効果が不安定になる要因としては、使用する微生物の性質や状態や、防除効果が環境に左右されやすいことなどが考えられる(吉田・對馬, 2013)。昆虫に微胞子虫が感染した場合、感染から死亡までの期間が長いだけでなく、死に至らないケースも多くあるため、短期間での防除に向いていない(安永, 1995)。宿主特異性も高いため、使用する微胞子虫の種類や害虫発生状況や頻度あるいは使用場所の環境を考慮する必要がある。また、微生物農薬を開発する際には製剤化の際に製造コストの低減化を図る必要がある。製造コストを下げるためには効率的な微生物の大量培養法や保存性を高める技術の開発が求められる。また、保存期間の長さは、製剤の流通コストや販路確保の観点からも重要となる(吉田・對馬, 2013)。微胞子虫は偏性細胞内寄生性という特徴を持つため、人工培地での培養が難しく、孢子の大量生産には宿主である昆虫生体を用いることになる。そのため、飼育が容易な昆虫に感染し、孢子の増殖性が高い微胞子虫の種を選抜する必要もある。加えて、微胞子虫の孢子の活性は、温度、保存状態、保存期間によって変化するため、より保存条件の良い株の選抜やより良い保存方法を探さなければならない(安永, 1995)。

既に製剤化されている *P. locustae* 以外に防除資材としての活用が期待されている種は複数報告されている。例としては、ヨーロッパアワノメイガ *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (チョウ目: ツトガ科) に感染する *Nosema pyrausta* (Lewis *et al.*, 2009) やアカヒアリ *Solenopsis invicta* (Buren) (ハチ目: アリ科) に感染する *Vairimorpha invictae* (Briano *et al.*, 2012)、マイマイガ *Lymantria dispar* (Linnaeus) (チョウ目: ドクガ科) に感染する *Vairimorpha disparis* (Solter *et al.*, 2012) などがある。しかし、製剤化への条件を満たすことが難しく、未だ微生物農薬として製剤化には至っていない

い。製剤化への障壁となっている課題のひとつに保存性が挙げられる。一般的に微胞子虫は生理食塩水中で保存されるが、塩は製剤化の際に必要な化合物との相互作用を起こす可能性がある。そのためには生理食塩水ではなく別の方法で保存可能な微胞子虫が求められる。よって、微胞子虫を用いた新たな微生物農薬を実現するためには、これまでに報告された種のみではなく、詳細な研究が行われていない属種に着目して研究を行い、既知微胞子虫にはない新たな有用な特性を有する微胞子虫を発見することが「Nolo Bait™」に次ぐ 2 例目の微胞子虫微生物農薬の開発の糸口になる。

現在、日本では様々な地域で微胞子虫の有用株の検索や資材化研究が進められている。2012 年に東京都小笠原諸島でハスモンヨトウ *Spodoptera litura* (Fabricius) (チョウ目: ヤガ科) の捕獲調査が行われ、捕獲個体から新規の微胞子虫が分離された。分離微胞子虫株のうちの 1 株は、孢子サイズと遺伝子配列解析の結果から既知微胞子虫株と比べて極めて大型の孢子サイズを有する *Trachipleistophora* 属微胞子虫と推定された (Shigano *et al.*, 2015)。日本において *Trachipleistophora* 属微胞子虫の分離例はなく、この株が国内初報告となった。それ以降、大型サイズの微胞子虫は小笠原諸島以外の国内地域で相次いで分離報告されるようになった (Imura *et al.*, 2019)。しかし、*Trachipleistophora* 属微胞子虫の詳細な性状についての報告例は少ないことから、本分離株は既知微胞子虫株とは異なる特性を持つ可能性がある。そこで、国内で分離された大型の孢子サイズの微胞子虫株の詳細な特性について調査することは、微胞子虫を利用した新たな微生物農薬の開発と IPM への活用につながると考え、本研究に取り組んだ。

本論文では、第 1 章で 2012 年に東京都小笠原諸島で捕獲したハスモンヨトウより分離され、国内初報告となった *Trachipleistophora* 属と推定された微胞子虫株の生物学的特性の調査について、第 2 章では日本国内で分離された *Trachipleistophora* 属微胞子虫の特性のさらなる解明を目的として、チョ

ウ目以外の昆虫からの *Trachipleistophora* 属をはじめとする昆虫感染性大型微胞子虫の分離を試みた結果について記載した。第 3 章では、第 2 章で分離され、*Trachipleistophora* 属と推定された株と Imura *et al.* (2019) で報告された *Trachipleistophora* 属と同様に大型の胞子サイズを持つ *Vavraia* 属と推定された株を用いて第 1 章と同様に生物学的特性を調査し、*Trachipleistophora* 属微胞子虫の特徴を再確認すると同時に他の昆虫感染性大型微胞子虫の特性を調査も行って比較した結果を記載した。第 4 章では、第 1~3 章で使用した微胞子虫株の属や種の生物学的特性をより詳細に検討するために細胞接種実験を行い、胞子形成様式を観察した結果を取りまとめた。総合討論では、日本においては大型サイズの微胞子虫の分離例やその特性の調査事例がほとんどないため、新たな知見が得られるだけでなく、未知の株の特性を調査することは、微胞子虫による微生物農薬の製剤化のための手掛かりになりうることから、日本国内で分離された大型微胞子虫の生物学的特性を複数株精査して比較することで、大型微胞子虫の分類学的位置を明らかにし、微生物農薬への活用の可能性について考察した。



## 第 1 章 *Trachipleistophora haruka* の生物学的特性

### 序論

微胞子虫は、現在、約 187 属 1,500 種が発見されている (Vávra and Lukeš, 2013)。その分類は、生物学的特性と分子生物学的特性の両方を踏まえて行われる (青木・畠山, 2014)。生物学的特性には、胞子の形状・大きさ、感染宿主の種類やその病徴、胞子形成様式、孵化特性などが含まれる。また、微胞子虫を微生物農薬として活用することを目指す際には、特に感染宿主や宿主への感染性・病徴、孵化特性といった点について詳細に検討する必要がある。

微胞子虫の宿主の約 4 割とされている昆虫へは経口感染が一般的である。微胞子虫の胞子が昆虫の中腸内に入るとアルカリ性の腸液などの刺激により孵化し、感染する。胞子の孵化には、(1)胞子の活性化 (外部環境から刺激を受ける)、(2)胞子内の浸透圧の増加、(3)極糸の翻転、(4)胞子内のスポロプラズム (Sporoplasm) が極糸を通り移動、といった段階があるとされているが、その正確な過程は明らかになっていない (Keohane and Weiss, 1998)。胞子の活性化が促進される条件としては、アルカリ性・酸性・酸性からアルカリ性またはアルカリ性から中性への pH の変化が挙げられる (Undeen and Avery, 1984; Undeen and Epsky, 1990)。アルカリ性と酸性の両方の条件下で孵化する種もある (Hashimoto *et al.*, 1976)。このように、胞子を孵化させる条件は、宿主特異性や外部環境により種間で大きく異なっている (Undeen and Epsky, 1990)。例えば、カイコ微粒子病の原因である *Nosema bombycis* NIS-001 は、カリウムイオン (K<sup>+</sup>) により胞子の活性化が促され、25°C 付近が至適温度であるとされている (Hashimoto *et al.*, 1976)。*Nosema algerae* (*Anncaliia algerae*: Watts *et al.* (2014) により属名を変更) は、水のみで孵化するとされている (Undeen, 1978)。

本章では、2012 年に東京都小笠原諸島父島で捕獲されたハスモンヨトウ雄成虫から分離された微胞子虫 66 株の中から胞子サイズ測定と小サブユニッ

トリボソーム RNA (Small Sub Unit ribosome RNA: SSU rRNA) 遺伝子配列解析により、*Trachipleistophora* 属の微孢子虫であると推定された 1 株を選び、孵化特性を検証し、その保存条件および孵化特性の確認を行った。また、微生物農薬化を考える際には、昆虫への感染性や胞子の効率的な増殖方法について検討する必要があるため、カイコへの感染性調査も行った。

## 材料および方法

### 1. 供試微孢子虫株

供試材料には、2012年9月28日から10月5日に東京都小笠原諸島父島で捕獲されたハスモンヨトウ雄成虫より分離された微孢子虫株の中から *Trachipleistophora* sp. OSL-2012-10 (以降、*Trachipleistophora haruka* とする) を用いた (Fig. 1)。Shigano *et al.* (2015) の先行研究により、*T. haruka* の孢子サイズの長径と短径は  $4.54 \pm 0.38 \times 2.66 \pm 0.22 \mu\text{m}$  で、SSU rRNA 遺伝子解析により *Trachipleistophora* 属と推定されている。実験対照区として *Nosema bombycis* NIS-001 (*Nb*-NIS) を用いた (Fig. 2)。なお、これらの供試株は蒸留水 (Distilled Water: D.W.) とともに 4℃ の条件下で保存したものをを用いた。

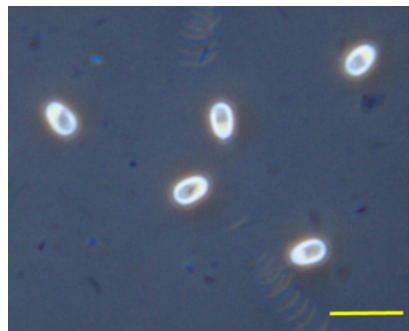


Fig. 1 *T. haruka* の孢子写真

Bar は 10  $\mu\text{m}$  を示す。

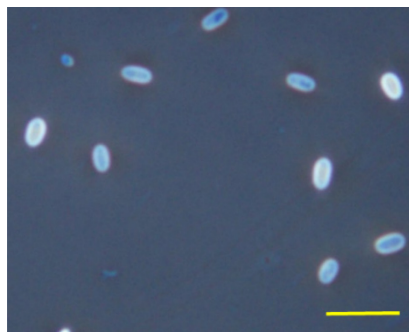


Fig. 2 *Nb*-NIS の孢子写真

Bar は 10  $\mu\text{m}$  を示す。

## 2. 各処理条件における孵化率

胞子の孵化特性を調べるため、蒸留水 (D.W.)、生理食塩水 (NaCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.))、水酸化カリウム水溶液 (KOH (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.))、塩化カリウム水溶液 (KCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) と過酸化水素水 ( $H_2O_2$  (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)) の混合液で孵化処理を行い、孵化率を測定した。また、胞子の孵化に対する温度の影響を調べるため、4℃および 25℃の条件下での孵化実験を行った。いずれの実験とも 3 反復行った。

### 2.1. 4℃条件下における胞子の孵化率

胞子の孵化処理には、蒸留水 (D.W.)、0.85% (w / v) NaCl、0.1 M (mol / L) KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $H_2O_2$  を用いた。胞子の孵化処理操作中は氷上、静置するときは 4℃にて行った。胞子数の計測は 4℃の低温室内で行った。

胞子液 100  $\mu$ l を遠心分離機 Centrifuge 5415D (Eppendorf Ag. 以降、遠心操作は特に言及のない限り同機種を使用した) で 3,000 rpm 10 分間遠心した。遠心後、上澄みを取り除き、胞子を孵化させるために、蒸留水、0.85% (w / v) NaCl、0.1M KOH をそれぞれ 1 ml ずつ入れ 60 分間静置した。KCl と  $H_2O_2$  処理のものは 0.1 M KCl + 3% (w / v)  $H_2O_2$  1 ml の混合液を加えて 40 分間静置した。静置後、3,000 rpm 10 分間遠心操作を行い、遠心後に上澄みを取り除き、0.25% (w / v) トリプシン溶液を 500  $\mu$ l 加え、40 分間静置することで極糸を融解・除去した。静置後、3,000 rpm 10 分間遠心分離を行い、サンプル溶液より上澄みを取り除き、胞子に蒸留水を 100  $\mu$ l 加えて測定用試料とした。この測定用胞子液をよく攪拌し、セルカウンタープレート改良ノイバウエルタイプ (WATSON Co., Ltd.) に 6  $\mu$ l ずつ滴下し、位相差顕微鏡 OPTIPHOT-2 ( $\times$ 400) (Nikon Co.) を用いて孵化胞子数と未孵化胞子数

を計測した。孵化率は、未孵化孢子数÷全孢子数×100により算出した。孢子の孵化処理操作中は氷上、静置するときは4℃にて行った。孢子数の計測は4℃の低温室で行った。

## 2.2. 25℃条件下における孢子の孵化率

孢子の孵化処理には、蒸留水 (D.W.)、0.85% (w / v) NaCl、0.1M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を用いた。実験前に25℃に保温したウォーターバス (AS ONE Co.) の中で孢子液と蒸留水、0.85% (w / v) NaCl、0.1M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を1時間保温した。なお孵化処理と測定は4℃条件下と同様の方法で行った。

## 3. カイコへの感染性の調査

供試昆虫には、株式会社高原社より購入した実用系統カイコ (錦秋×鐘和) を使用した。カイコを飼育する際の飼料には、シルクメイト 2S (Nosan, Co.) を用いた。供試微孢子虫株には *T. haruka* を用いて、1頭当たりの接種孢子数が  $1.0 \times 10^4$  spore となる接種条件を設定した。接種頭数は10頭とした。

微孢子虫孢子を接種する前日にカイコ 2 齢幼虫を絶食させた。寿司容器 (SF 角桶 2 大和 (23.5×23.5×4.1 cm) (CP Chemical, Inc.)) に、接種濃度に調整した孢子液を 30 μl 滴下したシルクメイト 2S (1.4×1.4×0.2 cm) を1枚入れた。孢子液をシルクメイト片に染み込ませた後、1日間絶食させたカイコの 2 齢幼虫を 10 頭入れ、摂食させた。摂食後は、シルクメイト片を適宜与えながら、27℃ 16 L : 8 D で集団飼育した。飼育は熟蚕になるまで行った。飼育時は適宜観察し、感染性を確認した。

感染率を求めるため、飼育途中で死亡した個体と熟蚕まで成長した個体それぞれを1頭ずつ乳鉢に入れ、D.W.を1 ml 加えて乳棒で磨砕した。磨砕液をスライドガラスに滴下してプレパラートを作製し、システム顕微鏡 BX53

(×400) (Olympus Co.) で任意の 5 視野を観察して胞子の有無を確認した。胞子を確認した場合は、5 視野の胞子数を計測し、感染程度の判定を行った。感染程度は、5 視野の合計胞子数から 1 視野当たりの平均胞子数を算出し、0 胞子を-、1~10 胞子を+、11~100 胞子を++、101 胞子以上を+++と判断して、++以上を重度感染とした。磨砕結果より、感染率を算出した。感染率 (%) は、感染個体数 ÷ 全接種個体数 × 100 により算出した。

## 結果

### 1. 各処理条件における孵化率

*T. haruka* と対照区の *Nb*-NIS の各条件における孵化率測定の結果を Table 1 に示した。4 つの条件で孵化率を測定した結果、*T. haruka* の蒸留水による処理の孵化率の平均は、4℃で 11.4%、25℃で 11.8%であった。一方、対照区の *Nb*-NIS の蒸留水処理の孵化率の平均は、4℃で 2.5%、25℃で 2.1%であった。次に、*T. haruka* の 0.85% (w / v) NaCl による処理の孵化率は、4℃下で 1 回目 20.5%、2 回目 15.3%、3 回目 7.0%、平均 14.3%であった。25℃下は、1 回目 31.9%、2 回目 30.6%、3 回目 30.4%、3 回とも 30%を超え、平均値 31.0%であった。一方、対照区の *Nb*-NIS の 0.85% (w / v) NaCl による処理の孵化率の平均は、4℃で 5.4%、25℃で 1.6%であった。0.1 M KOH による処理において、*T. haruka* の孵化率は、4℃下で 1 回目 46.4%、2 回目 17.9%、3 回目 37.0%、平均 33.8%であった。25℃下では、1 回目 36.5%、2 回目 41.6%、3 回目 44.0%、平均値 40.7%であった。一方、対照区の *Nb*-NIS の 0.1 M KOH による処理の孵化率の平均は、4℃で 79.6%、25℃で 83.2%であった。*T. haruka* の 0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理における孵化率は、4℃下で 1 回目 36.4%、2 回目 31.8%、3 回目 34.1%、平均 34.1%であった。25℃下では、1 回目 36.6%、2 回目 38.3%、3 回目 38.0%、平均値 37.6%であった。一方対照区の *Nb*-NIS の孵化率の平均は、4℃で 84.0%、25℃で 77.6%であった。

以上の結果より、*T. haruka* において蒸留水 (4℃・25℃) と 0.85% (w / v) NaCl (4℃) の孵化率の平均は 11~15%であったが、0.85% (w / v) NaCl (25℃)、0.1 M KOH (4℃・25℃)、0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4℃・25℃) の孵化率の平均は 30%を超えていた。対照区の *Nb*-NIS において 0.1 M KOH と 0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の 2 条件で孢子の孵化を確認し、その孵化率は温度に関係なく 80%前後であった。

Table 1 *T. haruka* および *Nb*-NIS の胞子の各条件における孵化率

Strain	Condition	Percentage of germination (%)							
		4°C				25°C			
		1st	2nd	3rd	Ave.	1st	2nd	3rd	Ave.
<i>T. haruka</i>	D.W.	20.2	0	14.0	11.4	20.3	15.1	0	11.8
	NaCl	20.5	15.3	7.0	14.3	31.9	30.6	30.4	31.0
	KOH	46.4	17.9	37.0	33.8	36.5	41.6	44.0	40.7
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	36.4	31.8	34.1	34.1	36.6	38.3	38.0	37.6
<i>Nb</i> -NIS	D.W.	5.9	0	1.7	2.5	2.2	3.9	0	2.1
	NaCl	6.9	3.5	5.9	5.4	1.2	3.6	0	1.6
	KOH	88.7	72.8	77.2	79.6	79.5	86.3	83.8	83.2
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70.6	93.3	88.0	84.0	55.3	91.8	85.8	77.6

D.W.: 蒸留水、NaCl: 生理食塩水 (0.85% (w / v) NaCl)、KOH: 0.1 M 水酸化カリウム水溶液、KCl+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0.1 M 塩化カリウム水溶液と 3% (w / v) 過酸化水素水の混合液



## 2. カイコへの感染性の調査

*T. haruka* を接種したカイコを時系列的に磨砕した時の孢子数の変化を Table 2 に示した。接種孢子濃度  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) で *T. haruka* をカイコに接種した結果、感染率は 100% で、10 個体中 9 個体が重度感染した。熟蚕前に死亡した個体は 5 齢幼虫 1 個体のみで、残りの 9 個体は熟蚕まで成長した。

Table 2 *T. haruka* を接種したカイコの磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	熟蚕	18	10	+
2	熟蚕	18	80	++
3	熟蚕	19	240	++
4	熟蚕	19	145	++
5	熟蚕	19	75	++
6	熟蚕	19	120	++
7	熟蚕	20	測定不能	+++
8	熟蚕	20	測定不能	+++
9	5 *	21	205	++
10	熟蚕	22	85	++
感染率			100%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の 5 視野の合計孢子数から 1 視野当たりの平均孢子数を算出し、0 孢子を-、1~10 孢子を+、11~100 孢子を++、101 孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。また、測定不能は孢子濃度が非常に高いために、その定量評価ができなかったことを示す。

## 考察

微胞子虫胞子の孵化には様々な化学的および物理的刺激が関係しており、その刺激となる物質は種によって異なる (Undeen, 1990)。化学的な刺激としては、カリウム、リチウム、ナトリウム、セシウムといった陽イオンと臭化物、塩化物、ヨウ化物、フッ化物といった陰イオンが挙げられ、胞子の孵化の促進に用いられている (Undeen and Avery, 1988; Undeen and Epsky, 1990; Frixione *et al.*, 1994)。特にチョウ目昆虫を宿主とする微胞子虫は、カリウムイオンとアルカリ側の pH で孵化するとされている (石原, 1969)。

孵化特性の調査で、対照区の *Nb*-NIS は、 $K^+$ を含む 0.1 M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $H_2O_2$ による処理でのみ孵化を確認した。また、温度による孵化率の変化は少なかった。一方で、*T. haruka* も  $K^+$ を含む 0.1 M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $H_2O_2$ による孵化処理で胞子の孵化を確認した。さらに 25°C条件下で 0.85% (w / v) NaClによる孵化処理を行った場合、 $K^+$ を含む 0.1 M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $H_2O_2$ による孵化処理と同様に胞子が孵化した。 $K^+$ を含む 0.1 M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $H_2O_2$ による孵化処理では、温度により孵化率に変化はなかったが、0.85% (w / v) NaClによる孵化処理では、4°C条件下よりも 25°C条件下の方で高い孵化率を確認した。これらの結果から、*T. haruka*の孵化条件には、 $K^+$ 以外にナトリウムイオン ( $Na^+$ ) や温度変化が含まれることが示唆された。

$Na^+$ により孵化する微胞子虫として、*Nosema apis* (De Graaf *et al.*, 1993) や *Nosema locustae* (*Paranosema locustae* (Shi *et al.*, 2009)) (Whitlock and Johnson, 1990) が既に報告されている。*N. apis*は 0.5 M NaCl と 0.5 M  $NaHCO_3$  (De Graaf *et al.*, 1993)、*P. locustae*は 0.1 M NaClの他に 2.5 M スクロースや 5%ポリエチレングリコール、0.1 M トリス塩酸バッファー (Whitlock and Johnson, 1990) が胞子を孵化させるためには必要であり、一方、生理食塩水のみでの処理では孵化しないことが報告されている (Weiss and Becnel, 2014)。しかし、*T. haruka*の胞子は 25°C条件下において 0.85% (w / v) NaClの生理食塩水のみで孵化することから、この孵化特性は *T. haruka*の胞子が活性化する際の特徴であると考えられた。したがって、*T. haruka*を実験に供する際には胞子液をなるべく氷上等で冷却するとともに、生理食塩水以外の溶液で保存するのが適切である。また、

*Trachipleistophora* 属をはじめとする昆虫感染性大型微胞子虫も同様の性質を持つ可能性があるため、さらに詳細な調査をする必要がある。

*T. haruka* のカイコへの感染率は 100%であった。10 個体中 9 個体が重度感染を確認したものの、すべての個体が 5 齢以上に成長したことから、*T. haruka* はカイコに対して致死性が低い株であること、カイコへ感染させた場合には、その生体内で微胞子虫胞子を安定して増殖させることが可能であることが示唆された。微生物農薬化を見据えた場合、家畜化しているため飼育が容易なカイコを用いて *T. haruka* を増殖すれば、効率的な胞子生産につながるものと期待される。

## 第2章 チョウ目以外からの昆虫感染性大型微胞子虫株の検索

### 序論

第1章の結果より、2012年に初めて日本で確認されたチョウ目昆虫由来の *Trachipleistophora* 属微胞子虫は特異的な孵化特性を有していた。そこで、本章では日本国内で分離された *Trachipleistophora* 属微胞子虫の特性をさらに解明することを目的に、チョウ目昆虫以外の微胞子虫の検索対象としてトンボ目昆虫に着目し、*Trachipleistophora* 属をはじめとする昆虫感染性大型微胞子虫の分離を試みた。

トンボ目昆虫は、自然環境下のみでなく水田や公園の池などでも見られる身近な昆虫である。トンボ目昆虫からの微胞子虫分離例としては、スウェーデンにおけるヤゴからの事例があるが (Larsson, 1986, 1988, 1990)、日本国内における報告例は今までない。肉食性であるトンボ目昆虫は、幼虫期には、例えば水中に生息するカの幼虫を (浦辺ら, 1986)、成虫になると、ハエ目、ハチ目、コウチュウ目などの飛翔性昆虫を捕食する (Sukhacheva, 1996)。アキアカネ *Sympetrum frequens* (Selys) (トンボ目: トンボ科) やイトトンボ類においては、ツマグロヨコバイ *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (カメムシ目: ヨコバイ科) を捕食した観察事例がある (小山・城所, 2003)。ハエ目、ハチ目、コウチュウ目などは、いずれも微胞子虫の感染宿主となっており、ハエ目のアカイエカ *Culex pipiens* (Linnaeus) (ハエ目: カ科) からは *Vavraia culicis* (Weiser, 1977)、ハチ目のセイヨウミツバチ *Apis mellifera* (Linnaeus) (ハチ目: ミツバチ科) からは *Nosema ceranae* (Yoshiyama and Kimura, 2011)、コウチュウ目のサカハチテントウ *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville) (コウチュウ目: テントウムシ科) からは *Tubulosema hippodamiae* (Bjørnson *et al.*, 2011) といった微胞子虫が分離されている。よって、仮に捕食された生物が微胞子虫感染個体であった場合には、捕食者であるトンボ目昆虫へ二次感染を引き起こす可能性がある。そのため、肉食性のトンボ目昆虫から微胞子虫の分離を試みれば、被食者由来の微胞子虫が検出される可能性もあり、トンボ目昆虫は幅広い新規微胞子虫株の探索源になりうる。

そこで、第2章では、神奈川県藤沢市で捕獲されたシオカラトンボ *Orthetrum albistylum speciosum* (Uhler) (トンボ目: トンボ科) に着目して微胞子虫を検索し、分離さ

れた微孢子虫株に対して、胞子サイズ測定と分子系統解析を実施し、属を推定した。

## 材料および方法

### 1. シオカラトンボからの微胞子虫の分離

供試昆虫には、神奈川県藤沢市で2014年に捕獲したシオカラトンボ成虫1,016頭を用いた。捕獲は捕虫網を用いて行った。シオカラトンボから微胞子虫を分離するために、磨砕と検鏡を行った。磨砕は以下の方法で実施した。検鏡しやすくするために翅を切断したトンボの基部を1個体ずつ乳鉢に入れ、0.85% (w/v) NaClを1-5 ml加えて乳棒で磨砕した。次に磨砕液でプレパラートを作製し、システム顕微鏡 BX53 (×400) で検鏡して微胞子虫胞子の有無を確認した。胞子を確認した場合は、常法に従って磨砕液中の夾雑物をろ過と遠心分離によって精製し、0.85% (w/v) NaClを加えて4℃下で保存した。1個体から得られた胞子液を1株とし、複数の分離株の中から4株を選択して以下の実験に用いた。

### 2. トンボ目昆虫由来微胞子虫株の胞子サイズ

攪拌した胞子液をスライドガラスに滴下してプレパラートを作製した。システム顕微鏡 BX53 (×1,000) で検鏡し、顕微鏡デジタルカメラ DP21 (Olympus Co.) とイメージングソフトウェア cellSens Standard 2 (Olympus Co.)を用いて胞子サイズを測定した。測定値より胞子の長径と短径の平均値と標準偏差を算出し、既知の微胞子虫株の胞子サイズの数値との比較を行った。比較には以下の既知微胞子虫株、*Nosema bombycis* NIS-001 (*Nb*-NIS)、*Vairimorpha* sp. NIS-M11、*Vairimorpha* sp. NIS-M12 (Kawarabata, 2003)、*Trachipleistophora hominis* (Field *et al.*, 1996)、*Trachipleistophora extenrec* (Vávra *et al.*, 2011)、*Trachipleistophora* sp. OSL-2012-10 (Shigano *et al.*, 2015)、*V. culicis* (Lobo *et al.*, 2006)、*V. culicis* subsp. *floridensis* (Vávra and Becnel, 2007)、*Vavraia* sp. YGSL-2015-12、*Vavraia* sp. YGSL-2015-13 (Imura *et al.*, 2019)、*Paranosema grylli*、*P. locustae* (Sokolova and Lange, 2002)、*Paranosema whitei* (Milner, 1972) のデータを参考にした。

### 3. SSU rRNA 遺伝子配列による分子系統解析

#### 3.1. DNA 抽出

DNA 抽出は、ガラスビーズ法 (Hatakeyama and Hayasaka, 2002) で行った。0.5 ml チューブに孢子液を適量入れ、STE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 (Nacalai Tesque, Inc.), 1 mM EDTA pH 8.0 (Nippon Gene Co., Ltd.), 10 mM (Kanto Chemical Co., Inc.)) で洗浄した。洗浄後、Glass beads, acid-washed (particle size 425-600  $\mu$ m) (Sigma-Aldrich Japan Co., Llc.) 150 mg と STE buffer 200  $\mu$ l を加えて、VORTEX-GENI 2 (M&S Instruments Inc.) で 30 秒間破碎した。破碎後、上澄み 150  $\mu$ l を 1.5 ml チューブに回収した。上澄み回収後の 0.5 ml チューブに STE buffer 150  $\mu$ l を加え、1 分間再破碎した。破碎後、上澄み 100  $\mu$ l を 1.5 ml チューブに回収した。回収溶液を BLOCK INCUBETOR BI-525A (Astec Co., Ltd.) にて 95°C で 2 分間熱処理した。DNA 抽出溶液のタンパク質を取り除くために、Phenol / Chloroform / Isoamyl alcohol (25: 24: 1) (Nippon Gene Co., Ltd) 処理を行った後、エタノール沈殿により DNA を回収し、TE (pH 8.0) (Nippon Gene Co., Ltd) を加えて 20°C で保存した。

#### 3.2. SSU rRNA 遺伝子の増幅

抽出した DNA の SSU rRNA 遺伝子配列 (1,200 bp) を増幅した。プライマーには、Sigma-Aldrich Japan Co., Llc. に合成委託した VN001F (5' -CAC CAG GTT GAT TCT GCC TGA C-3') および VN001R (5' -GGT TTA CCT TGT TAC GAC TT- 3') (Hatakeyama *et al.*, 1997) を用いた。プライマー以外の PCR 溶液には SP-*Taq* DNA Polymerase (Cosmo Genetech Co., Ltd)、10 $\times$  SP-*Taq* Buffer (Cosmo Genetech Co., Ltd)、2.5 mM dNTP Mixture (Cosmo Genetech Co., Ltd) を使用し、SP-*Taq* DNA Polymerase の終濃度が 0.025 U/ $\mu$ l、プライマーの終濃度が 0.5  $\mu$ M になるように調整した。Mastercycler® Personal (Eppendorf Co., Ltd.) を用いて PCR により遺伝子を増幅した。PCR プログラムは、変性 95°C 1 分、アニーリング 45°C 1 分、伸長 72°C 1 分、40 cycles とした。

PCR 後、アガロースゲル電気泳動で遺伝子の増幅を確認した。Agarose I™ (Amreco Inc.)

と 50×TAE (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)で作製した 2% (w/v) アガロースゲルと Mupid®-2plus (Mupid Co., Ltd.) を用いて、100 V で 30 分間泳動した。泳動後のアガロースゲルを臭化エチジウム水溶液 1 µg/ml に浸して増幅 DNA 断片を染色した。染色後、Chemidoc™ XRS (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用いて泳動図を撮影した。

PCR 後の増幅 DNA 断片は、FastGene™Gel / PCR Extraction kit (Nippon Genetics Co., Ltd) を用いて精製して-20℃で保存した。

### 3.3. クローニング

大腸菌による SSU rRNA 遺伝子の増幅断片のクローニングを行った。PCR 産物をプラスミドベクターに導入するために DynaExpress TA PCR Cloning Kit (pTAC-2) (Biodynamics Laboratory Inc.)を用いた。ライゲーション反応は、16℃ 1時間とした。ライゲーション産物を ECOS™ Competent *E. coli* DH5α (Nippon Gene Co., Ltd.) に形質転換し、培地に広げて培養した。培地には、大腸菌群用 X-GAL 寒天培地「ニッスイ」(Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) に、終濃度を 50 ng/ml となるように調整したアンピシリンナトリウム (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 加えたものを使用し、37℃ 16 時間培養した。

培養によって出現した青と白のコロニーの中から、白いコロニーを選抜し、X-GAL 寒天培地に単離移植して 37℃ 16 時間で培養した。培養と同時に DynaExpress TA PCR Cloning Kit (pTAC-2) に付属の M13F (5' -TGT AAA ACG ACG GCC AGT- 3')、M13R (5' -CAG GAA ACA GCT ATG AC -3') のプライマーと Quick Taq™ HS DyeMix (Toyobo Co., Ltd.) を用いて Mastercycler® Personal で PCR を行い、プラスミドベクターへの挿入 DNA 断片の有無を確認した。PCR プログラムは、変性 94℃ 20 秒、アニーリング 55℃ 20 秒、伸長 72℃ 80 秒、25 cycles とした。アガロースゲル電気泳動は 3.2 に従って実施した。プラスミドベクターの導入が確認されたら、単離移植した菌を液体培地 2-YT BROTH (Thermo Fisher Scientific Inc.) で 37℃ 16 時間振とう培養した。培養後、EZ-10 Spin Column Plasmid DNA Miniprep Kit (Bio Basic Inc.) でプラスミドを回収した。回収後、



導入配列の有無を確認するためにプラスミド DNA に制限酵素処理をした。制限酵素には *Pvu*II (Takara Bio Inc.) を使用し、Mastercycler® Personal で 37°C 1 時間反応させた、反応後は、アガロースゲル電気泳動で切片 DNA の分離パターンを確認した。

### 3.4. 系統樹の作成

回収したプラスミドの SSU rRNA 遺伝子の塩基配列解析は Fasmac Co., Ltd. に委託した。解析用プライマーには、Sigma-Aldrich Japan Co., Llc. に合成委託した SP6 (5' -GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3')、T7 (5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3')、515F (5' -GTG CCA GCM GCC GCG GTA A-3') (M = A or C) を使用した。解析により得られた配列を CAP3 Sequence Assembly Program (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>) (Huang and Madan, 1999)、SeqConv v081 (for Windows) を用いて結合し 1 本化した。次に BLAST (URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) の Nucleotide BLAST による SSU rRNA 遺伝子配列の相同性検索を行った。マルチプルアライメントには、Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 (MEGA7) (URL: <http://www.megasoftware.net/>) (Kumar *et al.*, 2016) および CLISTAL W プログラム (Thompson *et al.*, 1994) を用いた。その後、近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987) で系統樹を作成した。近隣結合法の計算には、Tamura 3-parameter (T92 94 model) (Tamura, 1992) を用い、ブートストラップは 1,000 回とした (Felsenstein, 1985)。既知の微胞子虫の SSU rRNA 遺伝子配列を NCBI (GenBank) より引用した。引用した塩基配列は、Table 3 に示した。外群にはカビの 1 種である *Kickxella alabastrina* (AF007537) の SSU rRNA 配列を用いた。

**Table 3** 系統樹の作成に使用した微胞子虫の株名とその Accession Number 一覧

No.	Strain	Accession No.
1	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	L07255
2	<i>Endoreticulatus bombycis</i>	AY009115
3	<i>Glugea plecoglossi</i>	KY882286
4	<i>Kneallhazia solenopsae</i>	AF031538
5	<i>Nosema apis</i>	U26534
6	<i>Nosema bombycis</i> SES-NU	D85503
7	<i>Nosema furnacalis</i>	U26532
8	<i>Paranosema grylli</i>	AY305325
9	<i>Paranosema locustae</i>	AY305324
10	<i>Paranosema whitei</i>	AY305323
11	<i>Pleistophora</i> sp. Sd-Nu-IW8201	D85500
12	<i>Systemostrema alba</i>	AY953292
13	<i>Tubulinosema acridophagus</i>	AF024658
14	<i>Trachipleistophora</i> sp. AH2006a	DQ403816
15	<i>Trachipleistophora hominis</i>	AJ002605
16	<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-2012-10	LC052202
17	<i>Trachipleistophora</i> sp. KNSL-2015-2	LC422327
18	<i>Trachipleistophora</i> sp. YGSL-2015-10	LC422325
19	<i>Trachipleistophora</i> sp. YGSL-2015-11	LC422326
20	<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M11	D85501
21	<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M12	D85502
22	<i>Vavraia culicis</i>	AJ252961
23	<i>Vavraia culicis</i> subsp. <i>floridensis</i>	XR_552272
24	<i>Vavraia</i> sp. KNSL-2015-3	LC422328
25	<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-12	LC422329
26	<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-13	LC422330
27	<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-14	LC422331
28	<i>Vittaforma corneae</i>	U11046
29	<i>Kickxella alabastrina</i>	AF007537

塩基配列はいずれも NCBI (GenBank) より取得した。

## 結果

### 1. シオカラトンボからの微胞子虫の分離

神奈川県藤沢市で捕獲されたシオカラトンボ 1,016 頭を磨砕した結果、14 株の胞子液を得た。この中から 4 株 (FOA-2014-2、FOA-2014-10、FOA-2014-12、FOA-2014-13) を選抜して、胞子サイズ測定と遺伝子配列解析に供した。

### 2. トンボ目昆虫由来微胞子虫株の胞子サイズ

FOA-2014-2 の胞子サイズの長径と短径は  $4.08 \pm 0.16 \times 2.35 \pm 0.18 \mu\text{m}$ 、FOA-2014-10 は  $4.42 \pm 0.28 \times 2.35 \pm 0.14 \mu\text{m}$ 、FOA-2014-12 は  $4.86 \pm 0.28 \times 2.57 \pm 0.14 \mu\text{m}$ 、FOA-2014-13 は  $4.02 \pm 0.14 \times 1.83 \pm 0.11 \mu\text{m}$  であった (Table 4)。FOA-2014-2 は *T. hominis* ( $4.00 \times 2.40 \mu\text{m}$ ) に、FOA-2014-12 は *Vavraia* sp. YGSL-2015-12 ( $4.87 \times 2.73 \mu\text{m}$ ) と *V. culicis* subsp. *floridensis* ( $4.70 \times 2.70 \mu\text{m}$ ) に、FOA-2014-13 は *Vairimorpha* sp. NIS-M11 ( $3.90 \times 1.70 \mu\text{m}$ ) に近似した胞子サイズであった (Fig. 3)。FOA-2014-10 には特に近似した既知微胞子虫株がなく、*V. culicis* ( $4.50 \times 2.57 \mu\text{m}$ ) と *T. hominis* ( $4.00 \times 2.40 \mu\text{m}$ ) と *P. grylli* ( $4.60 \times 2.15 \mu\text{m}$ ) の間に位置した (Fig. 3)。

**Table 4** 供試株と既知微胞子虫株の孢子サイズ

Strain	Spore size ( $\mu\text{m}$ )		Reference
	Length (mean $\pm$ S.D.)	Width (mean $\pm$ S.D.)	
FOA-2	4.08 $\pm$ 0.16	2.35 $\pm$ 0.18	—
FOA-10	4.42 $\pm$ 0.28	2.35 $\pm$ 0.14	—
FOA-12	4.86 $\pm$ 0.28	2.57 $\pm$ 0.14	—
FOA-13	4.02 $\pm$ 0.14	1.83 $\pm$ 0.11	—
<hr/>			
<i>Nosema bombycis</i> NIS-001	3.60	2.20	Kawarabata (2003)
<i>Paranosema grylli</i>	4.60	2.15	Sokolova and Lange (2002)
<i>Paranosema locustae</i>	5.25	3.00	Sokolova and Lange (2002)
<i>Trachipleistophora extenrec</i>	4.60	2.70	Vávra <i>et al.</i> (2011)
<i>Trachipleistophora hominis</i>	4.00	2.40	Field <i>et al.</i> (1996)
<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-2012-10	4.54	2.66	Shigano <i>et al.</i> (2015)
<i>Vairimorpha</i> sp. NIS-M11	3.90	1.70	Kawarabata (2003)
<i>Vavraia culicis</i>	4.50	2.57	Lobo <i>et al.</i> (2006)
<i>Vavraia culicis</i> subsp. <i>floridensis</i>	4.70	2.70	Vávra and Becnel (2007)
<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-12	4.87	2.73	Imura <i>et al.</i> (2019)
<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-13	5.36	2.91	Imura <i>et al.</i> (2019)

点線上部に供試株、下部に既知微胞子虫株のデータを示した。

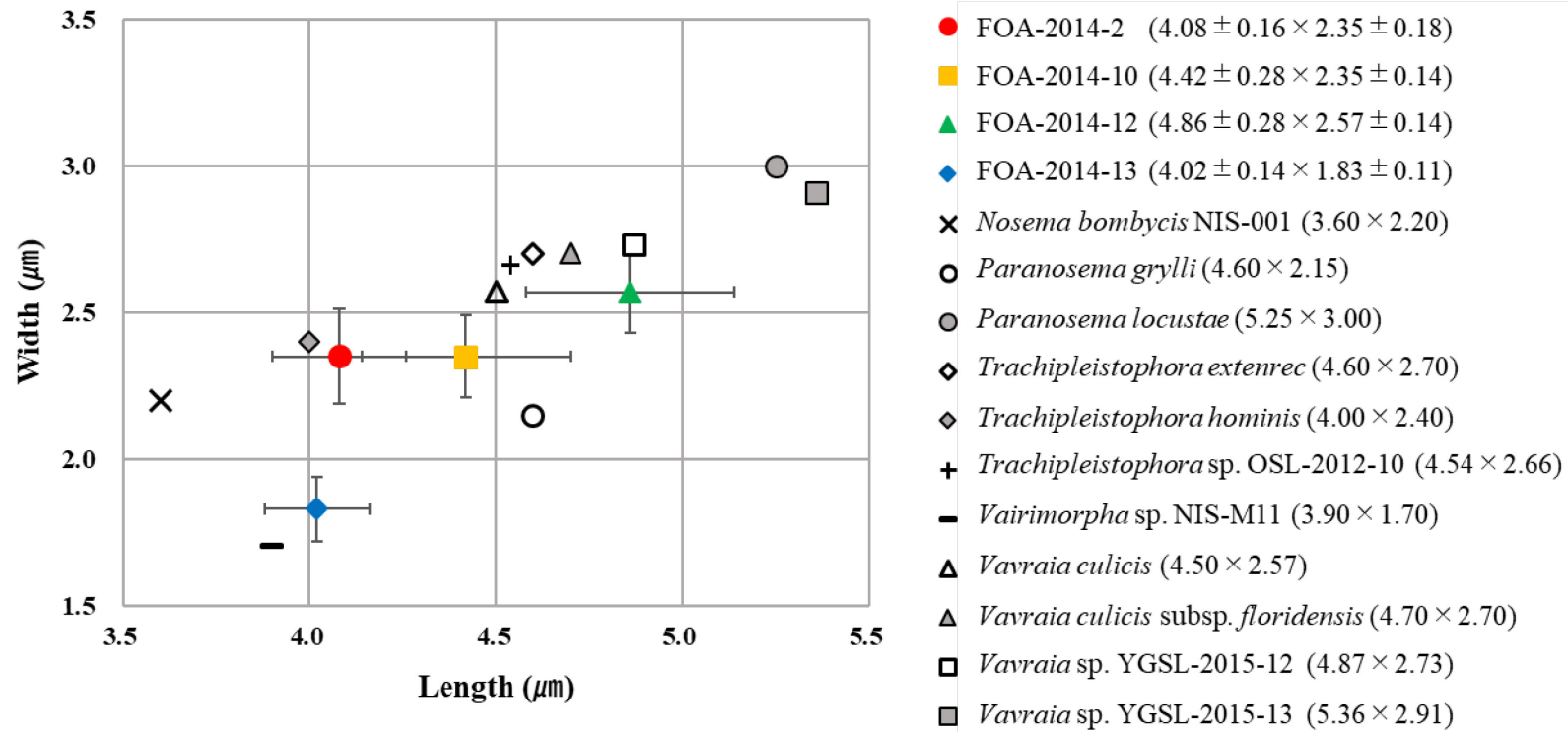


Fig. 3 胞子サイズの分布

右側の凡例には分布図内の各マーカーに対応する微胞子虫の株名を示した。

### 3. SSU rRNA 遺伝子配列による分子系統解析

SSU rRNA 遺伝子配列解析の結果、FOA-2014-2 と FOA-2014-10 は *T. hominis* の配列と 99.8%、FOA-2014-12 は *Vavraia* sp. YGSL-2015-13 の配列と 99.9%、FOA-2014-13 は *P. grylli* の配列と 98.1%の配列相同性を示した (Table 5)。

系統樹においても、FOA-2014-2 と FOA-2014-10 は *T. hominis*、FOA-2014-12 は *Vavraia* sp. YGSL-2015-12 と *Vavraia* sp. YGSL-2015-13、FOA-2014-13 は *P. grylli* と同じクラスターに分類されており、相同性を示した種と同様の結果となった (Fig. 4)。

Table 5 SSU rRNA 遺伝子配列の BLAST による相同性検索結果

Strain	Rank	Description	Query Cover (%)	Ident (%)	Accession No.
FOA-2014-2	1	<i>Trachipleistophora hominis</i>	100	99.77	AJ002605
	2	<i>Trachipleistophora</i> sp. YGSL-2015-11	100	99.61	LC422326
	3	<i>Trachipleistophora</i> sp. YGSL-2015-10	100	99.54	LC422325
	4	<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-2012-10	100	99.54	LC052202
	5	<i>Trachipleistophora</i> sp. KNSL-2015-2	100	99.30	LC422327
FOA-2014-10	1	<i>Trachipleistophora hominis</i>	100	99.77	AJ002605
	2	<i>Trachipleistophora</i> sp. YGSL-2015-11	100	99.61	LC422326
	3	<i>Trachipleistophora</i> sp. YGSL-2015-10	100	99.54	LC422325
	4	<i>Trachipleistophora</i> sp. OSL-2012-10	100	99.54	LC052202
	5	<i>Trachipleistophora</i> sp. KNSL-2015-2	100	99.30	LC422327
FOA-2014-12	1	<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-13	100	99.92	LC422330
	2	<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-12	100	99.85	LC422329
	3	<i>Vavraia</i> sp. KNSL-2015-3	100	99.00	LC422328
	4	<i>Vavraia culicis</i> subsp. <i>floridensis</i>	100	99.00	XR_552272
	5	<i>Vavraia culicis</i>	100	98.69	AJ252961
FOA-2014-13	1	<i>Paranosema grylli</i>	100	98.12	AY305325
	2	<i>Paranosema whitei</i>	100	97.22	AY305323
	3	<i>Antonospora locustae</i>	100	96.78	AY376351
	4	<i>Nosema oryzaephili</i>	100	96.62	HM002483
	5	<i>Paranosema locustae</i>	100	96.48	AY305324

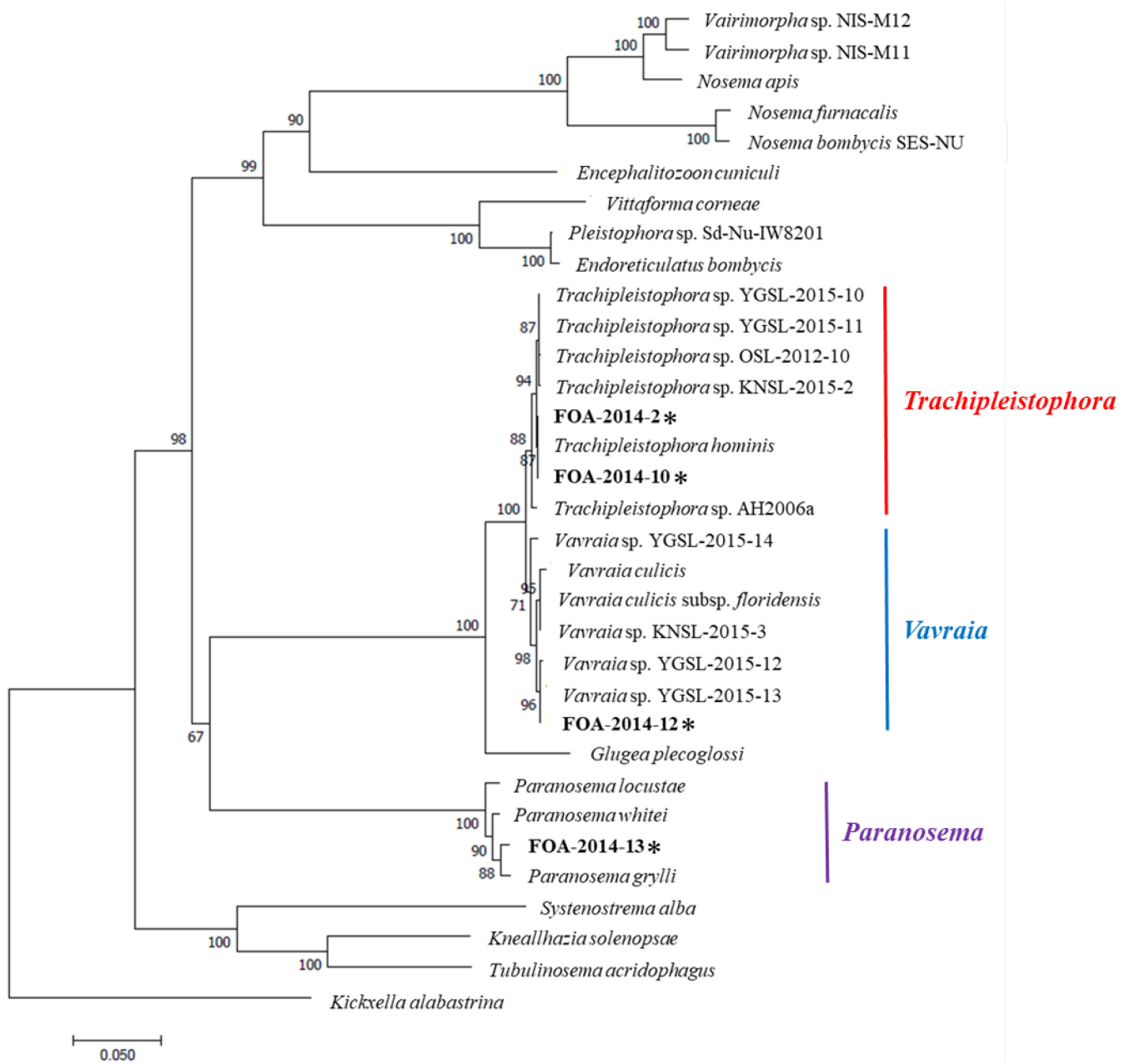


Fig. 4 SSU rRNA 遺伝子配列比較による系統樹

赤は *Trachipleistophora* 属、青は *Vavraia* 属、紫は *Paranosema* 属をそれぞれ示す。本論文で解析した株には\*を付けた。数字はブートストラップ値を示す。



## 考察

トンボ目昆虫からの微胞子虫分離例としては、Larsson (1986, 1988, 1990) によって報告されており、キバネルリボシヤンマ *Aeshna grandis* (Linnaeus) (トンボ目: ヤンマ科) からの微胞子虫 *Systemostrema alba* と *Resiomeria odonatae*、ヨツボシトンボ *Libellula quadrimaculata* (Linnaeus) (トンボ目: トンボ科) からの微胞子虫 *Systemostrema candida*、*Coenagrion hastulatum* (Chapentier) (トンボ目: イトトンボ科) からの微胞子虫 *Nudispora biformis* の分離報告が挙げられる。これらは、いずれもスウェーデンで捕獲されたヤゴから分離されたものである。日本においてトンボ目昆虫からの微胞子虫分離例はないため、本研究による報告は、国内初事例となった。

胞子サイズ測定と SSU rRNA 遺伝子配列解析の結果より、各供試微胞子虫株の属を推定した。FOA-2014-2 は、胞子サイズの比較において *T. hominis* と近似しており、SSU rRNA 遺伝子配列解析においても *Trachipleistophora* 属のクラスターに収束し、*T. hominis* と 99.8% と高い相同性を示したため、*Trachipleistophora* 属であると推定した。FOA-2014-10 は、胞子サイズの近似株が確認されず、*V. culicis* と *T. hominis* と *P. grylli* の間に位置した。SSU rRNA 遺伝子配列解析では、*Trachipleistophora* 属のクラスターに収束し、*T. hominis* の配列と 99.8% と高い相同性を示した。よって、FOA-2014-10 は *Trachipleistophora* 属の可能性が高いものの、他属の可能性も否定できない。FOA-2014-12 は、胞子サイズの比較において *Vavraia* sp. YGSL-2015-12 と近似し、SSU rRNA 遺伝子配列解析では *Vavraia* 属のクラスターに収束し、*Vavraia* sp. YGSL-2015-13 と 99.9% の高い相同性を示したため、*Vavraia* 属微胞子虫であると示唆された。FOA-2014-13 は、胞子サイズ測定では *Vairimorpha* sp. NIS-M11 の値に近似したが、SSU rRNA 遺伝子配列解析では *Paranosema* 属のクラスターに所属し、*P. grylli* の 98.1% の相同性を示した。一方、胞子サイズについては、*Paranosema* 属のいずれの既知微胞子虫株とも近似性はなく、*P. grylli* の SSU rRNA 遺伝子配列との相同性の数値からも、FOA-2014-13 は *Paranosema* 属系統の新種である可能性が示唆された。

本章の研究では、トンボ目昆虫から分離した微胞子虫株の中には、*Trachipleistophora* 属

や *Vavraia* 属といった大型の胞子サイズの昆虫感染性微胞子虫が含まれていた。  
*Trachipleistophora* 属微胞子虫の日本初報告は、2012年に東京都小笠原諸島で捕獲されたハスモンヨトウからの分離記録である (Shigano *et al.*, 2015)。第 1 章より、この *Trachipleistophora* 属微胞子虫株 (*T. haruka*) は、既知株とは異なる特異な孵化特性を持っていることが明らかとなった。よって、トンボ目昆虫から分離した大型の胞子サイズの供試株も *T. haruka* と同様の特性を持つ可能性がある。そこで、大型の胞子サイズの昆虫感染性微胞子虫の特性をさらに詳しく明らかにするために、4 株の中から FOA-2014-10 を選抜し、以降の実験に供試した。

### 第3章 他の昆虫感染性大型微胞子虫の生物学的特性

#### 序論

第1章では、2012年に東京都小笠原諸島父島で捕獲されたハスモンヨトウより検出された微胞子虫株 (*T. haruka*) は、既知微胞子虫株とは異なる特異な孵化特性を有していることを明らかにした。よって、他の *Trachipleistophora* 属をはじめとする大型の胞子サイズの昆虫感染性微胞子虫にも同様の特性を有する可能性が想定された。

そこで、本章では、供試微胞子虫株とした2014年に神奈川県藤沢市で捕獲したシオカラトンボより分離された *Trachipleistophora* sp. FOA-2014-10 (*Trachipleistophora* sp. FOA) と2015年に山口県山口市で捕獲したハスモンヨトウより分離された *Vavraia* sp. YGSL-2015-13 (*Vavraia* sp. YGSL) について *T. haruka* と同様の孵化特性を有するかを調査した。*Vavraia* 属微胞子虫は *Trachipleistophora* 属と同様に大型の胞子サイズを持つ属である。*Trachipleistophora* sp. FOA は、第2章で実施したSSU rRNA 遺伝子配列解析では *Trachipleistophora* 属のクラスターに収束した株である。*Vavraia* sp. YGSL は、Imura *et al.* (2019) によってSSU rRNA 遺伝子配列解析が行われ、*Vavraia* 属のクラスターに分類された株である。この2株に対照として *Nb-NIS* を加え、*T. haruka* と同条件で生物学的特性を調査した。また、第1章の *T. haruka* の結果との比較を行い、昆虫感染性大型微胞子虫株の生物学的特性について検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試微孢子虫株

供試微孢子虫株として、*Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL を用いた。*Trachipleistophora* sp. FOA は、2014年に神奈川県藤沢市で捕獲されたシオカラトンボから分離され (Fig. 5)、第2章で孢子サイズの長径と短径は  $4.42 \pm 0.28 \times 2.35 \pm 0.14 \mu\text{m}$ 、SSU rRNA 遺伝子配列解析では *Trachipleistophora* 属と推定された株である。*Vavraia* sp. YGSL は、2015年に山口県山口市で捕獲されたハスモンヨトウから分離された (Fig. 6)。孢子サイズの長径と短径は  $5.36 \pm 0.40 \times 2.91 \pm 0.20 \mu\text{m}$  で、SSU rRNA 遺伝子配列解析により *Vavraia* 属と推定された株である (Imura *et al.*, 2019)。なお、対照区には第1章と同様に *Nb*-NIS を用いた。これらの供試株は蒸留水 (D.W.) とともに  $4^{\circ}\text{C}$  の条件下で保存したものをを用いた。

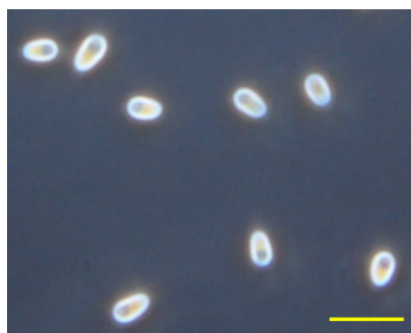


Fig. 5 *Trachipleistophora* sp. FOA の孢子写真

Bar は  $10 \mu\text{m}$  を示す。

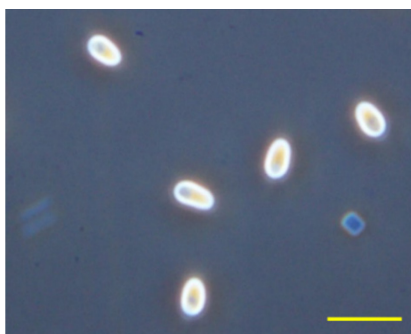


Fig. 6 *Vavraia* sp. YGSL の孢子写真

Bar は  $10 \mu\text{m}$  を示す。

## 2. 各処理条件における孵化率の測定

胞子の孵化特性を調べるため、蒸留水 (D.W.)、生理食塩水 (0.85% (w / v) NaCl)、水酸化カリウム水溶液 (0.1 M KOH)、塩化カリウム水溶液 (0.1 M KCl) と過酸化水素水 (3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) の混合液で孵化処理を行い、孵化率を測定した。また、胞子の孵化に対する温度の影響を調べるため、4℃および 25℃の条件下で 3 回反復して孵化率の測定実験を行った。実験方法は、第 1 章の材料および方法の 2 に従った。

## 3. *Trachipleistophora* sp. FOA-2014-10 における NaCl の最適孵化濃度の調査

昆虫培養細胞への接種実験では微胞子虫胞子の孵化処理に KOH を使用するが、*Trachipleistophora* sp. FOA は KOH で孵化しにくいため、NaCl を用いて孵化処理を行うことにした。そこで、最も孵化に適した NaCl の濃度を確かめるための実験を行った。

### 3.1. NaCl の濃度の違いによる孵化率

供試微胞子虫株には *Trachipleistophora* sp. FOA を用いた。胞子の孵化処理には、0.85%、1.5%、3.0%、5.0%、10.0%の濃度に調整した NaCl と対照区として蒸留水を用いた。実験は、室温 (25℃) 条件下で実施した。

胞子液 100 μl を遠心分離機 Centrifuge 5415D で 3,000 rpm 10 分間遠心した。遠心後、上澄みを取り除き、胞子を孵化させるために、0.85%、1.5%、3.0%、5.0%、10.0%の NaCl と蒸留水をそれぞれ 1 ml ずつ入れ 60 分間静置した。静置後、3,000 rpm 10 分間遠心操作を行い、遠心後上澄みを取り除き、0.25% (w / v) トリプシン溶液を 500 μl 加え、40 分間静置することで極糸を融解・除去した。静置後、3,000 rpm 10 分間遠心分離を行い、上澄みを取り除き、蒸留水を 100 μl 加え、測定用試料とした。この測定用胞子液をよく攪拌し、セルカウンタプレート改良ノイバウエルタイプに 6 μl ずつ滴下し、位相差顕微鏡 OPTIPHOT-2 (倍率×400) を用いて孵化胞子数と未孵化胞子数を計測した。孵化率は、未孵化胞子数÷全胞子数×100 により算出した。

### 3.2. NaCl の濃度と温度条件の違いによる孵化率

3.1.の結果をより詳細に検討するために、温度条件を加えて孵化特性を調べた。孵化処理には、0.85%と3.0%のNaClと蒸留水、供試微胞子虫株には *Trachipleistophora* sp. FOA と対照として *Nb*-NIS を用いた。また、温度による胞子の孵化の影響を調べるため、4°Cおよび25°Cの条件下で3回反復して実験を行った。

孵化処理と測定は、3.1.に従った。なお、4°C条件下の場合は、胞子の孵化処理操作中は氷上、静置するときは4°Cにて行った。胞子数の計測は4°Cの低温室内で行った。25°C条件下の場合は、実験前に25°Cに保温したウォーターバスの中で胞子液と0.85%と3.0%のNaClと蒸留水を1時間保温してから行い、実験操作は室温(25°C)の条件下で実施した。

### 4. カイコへの感染性・増殖率の調査

*Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL のカイコへの感染率を調べると同時に胞子を回収し、生体内における胞子増殖率を算出した。

供試昆虫には、株式会社高原社より購入した実用系統のカイコ(錦秋×鐘和)を使用した。カイコを飼育する際の飼料には、シルクメイト 2S を用いた。供試微胞子虫株には *Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL を用いて、1頭当たりの接種胞子数が  $1.0 \times 10^2$ 、 $1.0 \times 10^4$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^7$  spore となる5つの接種条件を設定した。対照として、D.W.と *Nb*-NIS ( $1.0 \times 10^4$  spore / 頭) 処理の2つの条件を設けた。接種頭数は1区当たり20頭、対照区では10頭とした。

微胞子虫胞子を接種する前日にカイコ2齢幼虫を絶食させた。寿司容器に、各濃度に調整した胞子液をそれぞれ60  $\mu$ l ずつ滴下したシルクメイト 2S (2.0×2.0×0.2cm) を1枚ずつ入れた。対照区では、シルクメイト 2S (1.4×1.4×0.2cm) に胞子液またはD.W.を30  $\mu$ l 滴下した。胞子液をシルクメイト片に染み込ませた後、1日間絶食させたカイコの2齢幼虫を20頭ずつ入れ、摂食させた。摂食後は、シルクメイト片を適宜与えながら、27°C 16 L : 8 D で集団飼育した。飼育は5齢幼虫になるまで行った。飼育時は5日ごとに観察し、感染状況を確認した。

感染率を求めるため、飼育途中で死亡した個体と 5 齢幼虫まで成長した個体を磨砕した。カイコを 1 頭ずつ乳鉢に入れ、D.W.を 1 ml 加えて乳棒ですり潰して磨砕した。磨砕液をスライドガラスに滴下してプレパラートを作製し、システム顕微鏡 BX53 (×400) で任意の 5 視野を観察して胞子の有無を確認した。胞子を確認した場合は、5 視野の胞子数を計測し、感染程度の判定を行った。感染程度は、5 視野の合計胞子数から 1 視野当たりの平均胞子数を算出し、0 胞子を-、1~10 胞子を+、11~100 胞子を++、101 胞子以上を+++と判断して、++以上を重度感染とした。磨砕結果より感染率を算出した。感染率 (%) は、感染個体数 ÷ 全接種個体数 × 100 により算出した。磨砕を行う際、数個体を解剖して感染した際の生体内の状態を確認した。

胞子回収を行うため、全個体の磨砕液をブレンダーでさらに攪拌した。攪拌後の磨砕液を医療ガーゼ (Kawamoto, Co.) で包んだ白十字綿 (Hakujuji Co., Ltd.) でろ過し、4℃下で 1 日静置した。静置後、滅菌 D.W.を加えながら、遠心機 LC-200 (Tomy Seiko Co., Ltd.) を用いて 3,000 rpm で 10 分間遠心して粗精製を行った。遠心後、上澄みを取り除き、滅菌 D.W.を加え、4℃下で保存した。

増殖率を求めるため、胞子回収後の胞子液の胞子濃度を算出した。胞子液をよく攪拌し、セルカウンタープレート改良ノイバウエルタイプに滴下して胞子数を計測した。計測値より、胞子液全量内の胞子数を算出した。その後、胞子増殖率 (%) を回収胞子液全量内の胞子数 ÷ 接種胞子数 × 100 により算出した。

## 結果

### 1. 各処理条件における孵化率

#### 1.1. *Trachipleistophora* sp. FOA

*Trachipleistophora* sp. FOA と対照区の *Nb*-NIS の各処理条件における孵化率測定の結果を Table 6 に示した。第 1 章の *T. haruka* と同じ 4 条件で孵化率を測定した結果、*Trachipleistophora* sp. FOA の蒸留水処理の孵化率の平均値は、4°C で 2.0%、25°C で 4.1% であった。これに対して、対照区の *Nb*-NIS の蒸留水処理の孵化率の平均値は、4°C で 3.3%、25°C で 4.6% であった。次に *Trachipleistophora* sp. FOA の 0.85% (w / v) NaCl 処理の孵化率は、4°C 下で 1 回目 4.7%、2 回目 1.1%、3 回目 3.0%、平均 2.9% であった。25°C 下では、1 回目 52.9%、2 回目 28.6%、3 回目 22.2%、平均 34.6% であった。一方、対照区の *Nb*-NIS の 0.85% (w / v) NaCl 処理の孵化率の平均値は、4°C で 1.3%、25°C で 4.6% であった。0.1 M KOH 処理による *Trachipleistophora* sp. FOA の孵化率は、4°C 下で 1 回目 1.8%、2 回目 0.6%、3 回目 3.2%、平均 1.9% であった。25°C 下では、1 回目 18.9%、2 回目 6.4%、3 回目 5.4%、平均値 10.2% であった。0.1 M KOH による処理の孵化率は、4°C と 25°C ともに 20% を下回る値であった。一方、対照区の *Nb*-NIS の 0.1 M KOH による処理の孵化率の平均は、4°C で 63.0%、25°C で 84.5% であった。最後に、*Trachipleistophora* sp. FOA の 0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の孵化率の平均値は、4°C 下で 70.3%、25°C 下で 77.7% であった。対して対照区の *Nb*-NIS の 0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の孵化率の平均は、4°C で 75.2%、25°C で 76.3% であった。

以上の結果より、対照の *Nb*-NIS において 0.1 M KOH と 0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の 2 条件で胞子の孵化が確認され、その孵化率は温度に関係なく 70% 前後であることが明らかになった。*Trachipleistophora* sp. FOA において、蒸留水 (4°C・25°C) と 0.85% (w / v) NaCl (4°C) 処理での孵化率の平均は 5% 以下であったが、0.85% (w / v) NaCl (25°C) 処理の孵化率の平均値は 34.6%、0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4°C・25°C) 処理では 70% を超えた。一方で、0.1 M KOH 処理の平均孵化率は 4°C で 1.9%、25°C で 10.0% となっており、0.1 M KCl + 3% (w / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4°C・25°C) 処理よりも低かった。



**Table 6** *Trachipleistophora* sp. FOA および *Nb*-NIS の各条件における孵化率

Strain	Condition	Percentage of germination (%)							
		4°C				25°C			
		1st	2nd	3rd	Ave.	1st	2nd	3rd	Ave.
FOA-2014-10	D.W.	0	0	6.1	2.0	8.3	1.3	2.8	4.1
	NaCl	4.7	1.1	3.0	2.9	52.9	28.6	22.2	34.6
	KOH	1.8	0.6	3.2	1.9	18.9	6.4	5.4	10.2
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	70.3	70.3	70.3	70.3	76.7	79.2	77.2	77.7
<i>Nb</i> -NIS	D.W.	3.7	0	6.1	3.3	4.8	6.9	2.2	4.6
	NaCl	0	3.0	0.7	1.3	3.5	4.9	5.5	4.6
	KOH	70.5	47.6	71.0	63.0	83.7	88.0	81.8	84.5
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	75.9	76.5	73.3	75.2	69.4	81.6	77.9	76.3

D.W.: 蒸留水、NaCl: 生理食塩水 (0.85% (w / v) NaCl)、KOH: 0.1 M 水酸化カリウム水溶液、KCl+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0.1 M 塩化カリウム水溶液と 3% (w / v) 過酸化水素水の混合液

## 1.2. *Vavraia* sp. YGSL

*Vavraia* sp. YGSL と対照区の *Nb*-NIS の各条件における孵化率測定の結果を Table 7 に示した。*T. haruka* と *Trachipleistophora* sp. FOA と同じ 4 条件で孵化率を測定した結果、*Vavraia* sp. YGSL の蒸留水による処理の孵化率の平均は、4°C で 2.6%、25°C で 22.2%であった。これに対して、対照の *Nb*-NIS の蒸留水処理の孵化率の平均は、4°C で 1.2%、25°C で 1.8%であった。0.85% (w/v) NaCl 処理において、*Vavraia* sp. YGSL の孵化率は、4°C 下で 1 回目 9.5%、2 回目 10.1%、3 回目 0%、平均 6.5%であった。25°C 下では、1 回目 55.6%、2 回目 50.2%、3 回目 38.8%と、いずれも 35%を超え、平均値 48.2%となった。一方、対照区の *Nb*-NIS の 0.85% (w/v) NaCl 処理の孵化率の平均は、4°C で 3.2%、25°C で 5.9%であった。次に、*Vavraia* sp. YGSL の 0.1 M KOH 処理の孵化率は、4°C 下で 1 回目 59.3%、2 回目 66.7%、3 回目 58.8%、平均 61.6%であった。25°C 下では、1 回目 61.3%、2 回目 59.2%、3 回目 49.0%、平均値 56.5%であった。一方、対照区の *Nb*-NIS の 0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による処理の孵化率の平均は、4°C で 84.8%、25°C で 65.3%であった。0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理による孵化率については、*Vavraia* sp. YGSL では、4°C 下で 1 回目 57.6%、2 回目 63.6%、3 回目 56.7%、平均 59.3%であった。25°C 下では、1 回目 48.6%、2 回目 55.9%、3 回目 45.6%、平均値 50.0%であった。一方、対照の *Nb*-NIS では、4°C で 84.6%、25°C で 65.9%であった。

以上の結果より、対照の *Nb*-NIS において 0.1 M KOH と 0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 処理の 2 条件で胞子の孵化を確認し、その孵化率の平均は温度に関係なく 60%以上であった。*Vavraia* sp. YGSL において、蒸留水 (4°C) と 0.85% (w/v) NaCl (4°C) の孵化率は 0-11%、蒸留水 (25°C) では 20%前後であったが、0.85% (w/v) NaCl (25°C)、0.1 M KOH (4°C・25°C)、0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4°C・25°C) ではおおむね 50%を超えた。

Table 7 *Vavraia* sp. YGSL および *Nb*-NIS の各条件における孵化率

Strain	Condition	Percentage of germination (%)							
		4°C				25°C			
		1st	2nd	3rd	Ave.	1st	2nd	3rd	Ave.
YGSL-2015-13	D.W.	0	5.5	2.2	2.6	20.5	28.1	18.0	22.2
	NaCl	9.5	10.1	0	6.5	55.6	50.2	38.8	48.2
	KOH	59.3	66.7	58.8	61.6	61.3	59.2	49.0	56.5
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	57.6	63.6	56.7	59.3	48.6	55.9	45.6	50.0
<i>Nb</i> -NIS	D.W.	0	3.7	0	1.2	1.5	0.7	3.1	1.8
	NaCl	4.7	0	5.1	3.2	3.5	4.9	9.2	5.9
	KOH	85.6	81.5	87.2	84.8	58.2	65.2	72.4	65.3
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	88.8	82.5	82.4	84.6	69.9	53.0	74.7	65.9

D.W.: 蒸留水、NaCl: 生理食塩水 (0.85% (w / v) NaCl)、KOH: 0.1 M 水酸化カリウム水溶液、KCl+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0.1 M 塩化カリウム水溶液と 3% (w / v) 過酸化水素水の混合液

### 1.3. 3種の昆虫感染性大型微胞子虫の孵化率の比較

本研究に用いた昆虫感染性大型微胞子虫 3 株、*T. haruka*、*Trachipleistophora* sp. FOA、*Vavraia* sp. YGSL と対照の *Nb*-NIS の各処理条件での平均孵化率を Table 8 に示した。

0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4°C・25°C) 処理では、3 株とも *Nb*-NIS と同様に孵化を確認した。0.1 M KOH (4°C・25°C) 処理では、*T. haruka* と *Vavraia* sp. YGSL は *Nb*-NIS と同様に孵化したが、*Trachipleistophora* sp. FOA の孵化率は、4°C で 1.9%、25°C で 10.2% と低かった。*Nb*-NIS においては、蒸留水と 0.85% (w/v) NaCl 処理では温度条件にかかわらず孵化率は 6% 以下であったが、昆虫感染性大型微胞子虫 3 株は 25°C 条件下での 0.85% (w/v) NaCl による処理で 30% 以上の孵化率を示した (Table 8)。

よって、この 3 種の供試株の昆虫感染性大型微胞子虫の孵化には K<sup>+</sup> 以外に温度変化と 0.85% (w/v) NaCl が関与していることが明らかとなった。また、*T. haruka* と *Vavraia* sp. YGSL は同じ孵化特性を示したが、*Trachipleistophora* sp. FOA ではこれら 2 株と異なる孵化特性を示した。

**Table 8** 各処理条件における平均孵化率の総括表

Condition	Average germination rate (%)				
	<i>T. haruka</i>	FOA	YGSL	<i>Nb</i> -NIS	
4°C	D.W.	11.4	2.0	2.6	2.5
	NaCl	14.3	2.9	6.5	5.4
	KOH	33.8	1.9	61.6	79.6
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34.1	70.3	59.3	84.0
25°C	D.W.	11.8	4.1	22.2	2.1
	NaCl	31.0	34.6	48.2	1.6
	KOH	40.7	10.2	56.5	83.2
	KCl+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37.6	77.7	50.0	77.6

## 2. *Trachipleistophora* sp. FOA-2014-10 における NaCl の最適孵化濃度

### 2.1. NaCl の濃度の違いによる孵化率

5つの濃度の NaCl で孵化処理をした *Trachipleistophora* sp. FOA の孵化率は、0.85%濃度で 25.1%、1.5%濃度で 36.8%、3.0%濃度で 52.4%、5.0%濃度で 23.9%、10.0%濃度で 30.5%となった (Table 9)。対照とした蒸留水処理の孵化率は 5.5%であった (Table 9)。よって、3.0%濃度の NaCl による処理の孵化率が最も高い結果となった。

Table 9 NaCl の濃度の違いによる *Trachipleistophora* sp. FOA の孵化率

Concentration of NaCl (%)	Percentage of germination (%)
0.85	25.1
1.5	36.8
3.0	52.4
5.0	23.9
10.0	30.5
D.W.	5.5

### 2.2. NaCl の濃度と温度の違いによる孵化率

*Trachipleistophora* sp. FOA と対照の *Nb*-NIS について、NaCl 濃度と温度条件を組み合わせて実施した孵化率測定結果を Table 10 に示した。その結果、*Trachipleistophora* sp. FOA の 0.85% (w / v) NaCl による処理の孵化率は、4°C 下で 1 回目 11.2%、2 回目 12.3%、3 回目 4.4%、平均 9.3%であった。25°C 下では、1 回目 30.5%、2 回目 27.4%、3 回目 30.9%、平均値 29.6%であった。一方、対照の *Nb*-NIS の 0.85% (w / v) NaCl による処理の孵化率の平均は、4°C で 2.8%、25°C で 4.8%であった。3.0%NaCl 処理では、*Trachipleistophora* sp. FOA の孵化率は、4°C 下で 1 回目 25.6%、2 回目 31.8%、3 回目 32.7%、平均 30.0%であった。25°C 下は、1 回目 71.4%、2 回目 65.3%、3 回目 66.1%、3 回とも 60%を超え、平均値 67.6%であった。一方、対照の *Nb*-NIS の 3.0%NaCl による処理の孵化率の平均は、4°C で 4.8%、25°C で 5.9%であった。蒸留水処理における *Trachipleistophora* sp. FOA の孵

化率の平均は、4°Cで2.3%、25°Cで1.5%、一方、対照の *Nb*-NIS では、4°Cで2.7%、25°Cで2.0%であった。

よって、*Trachipleistophora* sp. FOA では25°C条件下の3.0%NaClでの孵化率が最も高くなった。

Table 10 *Trachipleistophora* sp. FOA と *Nb*-NIS の NaCl 濃度と温度の違いによる孵化率

Strain	Condition	Percentage of germination (%)							
		4°C				25°C			
		1st	2nd	3rd	Ave.	1st	2nd	3rd	Ave.
FOA-2014-10	0.85%NaCl	11.2	12.3	4.4	9.3	30.5	27.4	30.9	29.6
	3.0% NaCl	25.6	31.8	32.7	30.0	71.4	65.3	66.1	67.6
	D.W.	1.7	3.3	1.8	2.3	2.5	2.0	0	1.5
<i>Nb</i> -NIS	0.85%NaCl	1.3	1.7	5.5	2.8	1.2	4.9	8.1	4.8
	3.0% NaCl	1.6	7.1	5.6	4.8	1.0	5.6	11.0	5.9
	D.W.	0.1	1.6	6.2	2.7	0.5	0	5.5	2.0

各条件における孵化率とその平均値を示した。

### 3. カイコへの感染率

*Trachipleistophora* sp. FOA をカイコに接種した結果、感染率は  $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区で 0% (Table 11, 12)、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 20% (Table 13)、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区で 85% (Table 14)、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区で 70%であった (Table 15)。どの接種濃度区においても 90%以上の個体が 5 齢まで成長した。 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区では、感染した 4 個体のうち 3 個体が重度感染した (Table 13)。 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区では感染した 17 個体のうち 10 個体 (Table 14)、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区では感染を確認した 14 個体のうち 9 個体が重度感染個体であった (Table 15)。経過観察中の死亡個体は、どの区においても 2 頭以下、うち感染を確認したのは  $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区の 4 齢で死亡した 1 個体のみであったが、その感染程度は軽度であった (Table 15)。これに対して、*Vavraia* sp. YGSL のカイコへの感染率は、 $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区で 0% (Table 16, 17)、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 30% (Table 18)、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区で 100% (Table 19)、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区で 95% (Table 20)、どの接種濃度区においても 90%以上の個体が 5 齢まで成長した。 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で感染した 6 個体は全て軽度感染であった (Table 18)。 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区ではいずれも 19 個体で感染を確認し、そのうち 16 個体が重度感染個体であった (Table 19, 20)。経過観察中に死亡した個体が  $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 1 頭ずつ発生したが、生育ステージはそれぞれ 2 齢と 5 齢であった (Table 16, 18)。 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区の死亡個体の感染程度は軽度感染であった (Table 18)。 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区では 3 頭の 5 齢死亡個体を、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区では 4 齢と 5 齢の死亡個体をそれぞれ 2 頭ずつ確認したが、死亡個体はいずれも重度感染していた (Table 19, 20)。なお、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区においては、接種後の経過観察中に 1 頭損失した。損失理由としては、餌替え時の作業の過誤が挙げられる。*Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL とを比べると、後者のほうが高い感染率を示した。対照の D.W. 区での感染率は、0% (Table 21)、また、*Nb*-NIS 接種区の感染率は 100%であった (Table 22)。また、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区の個体を解剖したところ、絹糸腺で白いシストが観察



された (Fig. 7)。このような状態の絹糸腺は、*Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL の両方で確認された。

Table 11 *Trachipleistophora* sp. FOA の  $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	4	18	0	-
2	5	18	0	-
3	5	18	0	-
4	5	18	0	-
5	5	18	0	-
6	5	18	0	-
7	5	18	0	-
8	5	18	0	-
9	5	18	0	-
10	5	18	0	-
11	5	18	0	-
12	5	18	0	-
13	5	18	0	-
14	5	18	0	-
15	5	18	0	-
16	5	18	0	-
17	5	18	0	-
18	5	18	0	-
19	5	18	0	-
20	5	18	0	-
感染率			0%	

感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。

Table 12 *Trachipleistophora* sp. FOA の  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	5 *	15	0	-
2	5	18	0	-
3	5	18	0	-
4	5	18	0	-
5	5	18	0	-
6	5	18	0	-
7	5	18	0	-
8	5	18	0	-
9	5	18	0	-
10	5	18	0	-
11	5	18	0	-
12	5	18	0	-
13	5	18	0	-
14	5	18	0	-
15	5	18	0	-
16	5	18	0	-
17	5	18	0	-
18	5	18	0	-
19	5	18	0	-
20	5	18	0	-
感染率			0%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の 5 視野の合計孢子数から 1 視野当たりの平均孢子数を算出し、0 孢子を-、1~10 孢子を+、11~100 孢子を++、101 孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。

Table 13 *Trachipleistophora* sp. FOA の  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	4 *	15	0	-
2	4	18	0	-
3	5	18	0	-
4	5	18	0	-
5	5	18	0	-
6	5	18	0	-
7	5	18	0	-
8	5	18	0	-
9	5	18	0	-
10	5	18	0	-
11	5	18	4	-
12	5	18	0	-
13	5	18	0	-
14	5	18	25	+
15	5	18	77	++
16	5	18	76	++
17	5	18	0	-
18	5	18	0	-
19	5	18	0	-
20	5	18	72	++
感染率			20%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。

Table 14 *Trachipleistophora* sp. FOA の  $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	5	18	122	++
2	5	18	67	++
3	5	18	63	++
4	5	18	301	++
5	5	18	51	+
6	5	18	0	-
7	5	18	76	++
8	5	18	8	+
9	5	18	235	++
10	5	18	0	-
11	5	18	79	++
12	5	18	45	+
13	5	18	39	+
14	5	18	3	-
15	5	18	33	+
16	5	18	13	+
17	5	18	183	++
18	5	18	69	++
19	5	18	205	++
20	5	18	14	+
感染率			85%	

感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。

Table 15 *Trachipleistophora* sp. FOA の  $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	3 *	9	0	-
2	4 *	14	41	+
3	5	18	0	-
4	5	18	15	+
5	5	18	146	++
6	5	18	測定不能	+++
7	5	18	測定不能	+++
8	5	18	612	+++
9	5	18	0	-
10	5	18	0	-
11	5	18	31	+
12	5	18	60	++
13	5	18	測定不能	+++
14	5	18	72	++
15	5	18	0	-
16	5	18	9	+
17	5	18	54	++
18	5	18	185	++
19	5	18	0	-
20	5	18	25	+
感染率			70%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。また、測定不能は孢子濃度が非常に高いために、その定量評価ができなかったことを示す。

Table 16 *Vavraia* sp. YGSL の  $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	2 *	5	1	-
2	5	17	0	-
3	5	17	0	-
4	5	17	0	-
5	5	17	0	-
6	5	17	0	-
7	5	17	0	-
8	5	17	0	-
9	5	17	0	-
10	5	17	0	-
11	5	17	0	-
12	5	17	0	-
13	5	17	0	-
14	5	17	0	-
15	5	17	0	-
16	5	17	0	-
17	5	17	0	-
18	5	17	0	-
19	5	17	0	-
20	5	17	0	-
感染率			0%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の 5 視野の合計孢子数から 1 視野当たりの平均孢子数を算出し、0 孢子を-、1~10 孢子を+、11~100 孢子を++、101 孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。

Table 17 *Vavraia* sp. YGSL の  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	4 *	10	0	-
2	5 *	17	0	-
3	5	17	0	-
4	5	17	0	-
5	5	17	0	-
6	5	17	0	-
7	5	17	0	-
8	5	17	0	-
9	5	17	0	-
10	5	17	0	-
11	5	17	0	-
12	5	17	0	-
13	5	17	0	-
14	5	17	0	-
15	5	17	0	-
16	5	17	0	-
17	5	17	0	-
18	5	17	0	-
19	5	17	0	-
20	5	17	0	-
感染率			0%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。



Table 18 *Vavraia* sp. YGSL の  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	5 *	18	28	+
2	5	18	15	+
3	5	18	0	-
4	5	18	0	-
5	5	18	0	-
6	5	18	0	-
7	5	18	0	-
8	5	18	0	-
9	5	18	0	-
10	5	18	0	-
11	5	18	0	-
12	5	18	0	-
13	5	18	0	-
14	5	18	0	-
15	5	18	0	-
16	5	18	13	+
17	5	18	43	+
18	5	18	11	+
19	5	18	0	-
20	5	18	6	+
感染率			30%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の 5 視野の合計孢子数から 1 視野当たりの平均孢子数を算出し、0 孢子を-、1~10 孢子を+、11~100 孢子を++、101 孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。

Table 19 *Vavraia* sp. YGSL の  $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	5 *	19	測定不能	+++
2	5 *	19	186	++
3	5 *	19	252	++
4	5	19	130	++
5	5	19	221	++
6	5	19	14	+
7	5	19	64	++
8	5	19	測定不能	+++
9	5	19	測定不能	+++
10	5	19	239	++
11	5	19	246	++
12	5	19	153	++
13	5	19	30	+
14	5	19	75	++
15	5	19	測定不能	+++
16	5	19	132	++
17	5	19	測定不能	+++
18	5	19	測定不能	+++
19	5	19	50	+
20				
感染率			100%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。また、測定不能は孢子濃度が非常に高いために、その定量評価ができなかったことを示す。

Table 20 *Vavraia* sp. YGSL の  $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区の磨砕結果

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	4 *	14	測定不能	+++
2	4 *	19	測定不能	+++
3	5 *	19	測定不能	+++
4	5 *	19	測定不能	+++
5	5	19	測定不能	+++
6	5	19	測定不能	+++
7	5	19	60	++
8	5	19	測定不能	+++
9	5	19	239	++
10	5	19	127	++
11	5	19	5	+
12	5	19	101	++
13	5	19	180	++
14	5	19	43	+
15	5	19	286	++
16	5	19	150	++
17	5	19	6	+
18	5	19	測定不能	+++
19	5	19	0	-
20	5	19	226	++
感染率			95%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。また、測定不能は孢子濃度が非常に高いために、その定量評価ができなかったことを示す。

Table 21 D.W. 区の磨砕結果 (対照区)

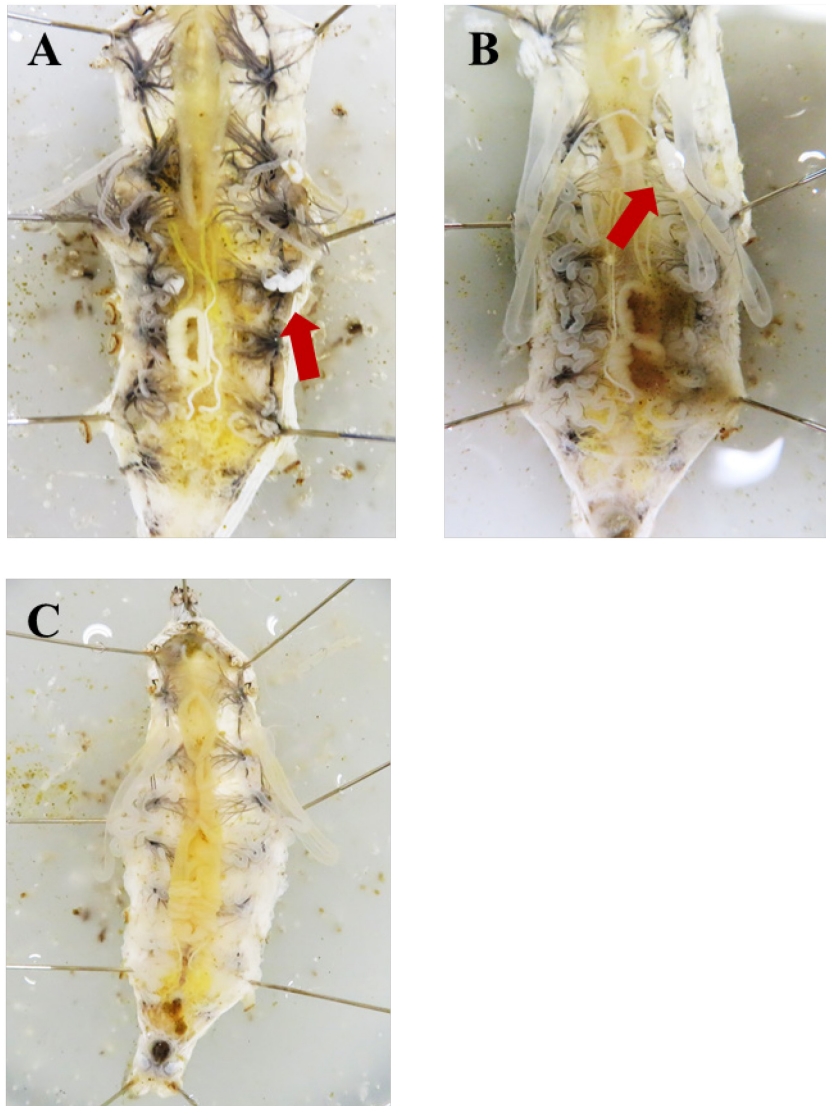
No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	5	17	0	-
2	5	17	0	-
3	5	17	0	-
4	5	17	0	-
5	5	17	0	-
6	5	17	0	-
7	5	17	0	-
8	5	17	0	-
9	5	17	0	-
10	5	17	0	-
感染率			0%	

感染程度は、検鏡時の5視野の合計孢子数から1視野当たりの平均孢子数を算出し、0孢子を-、1~10孢子を+、11~100孢子を++、101孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。

Table 22 *Nb*-NIS の  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区の磨砕結果 (対照区)

No.	齢期	経過日数 (日)	5視野孢子数 (spore)	感染程度
1	4 *	9	測定不能	+++
2	4 *	9	133	++
3	3 *	13	測定不能	+++
4	3 *	13	測定不能	+++
5	3 *	13	測定不能	+++
6	3 *	13	測定不能	+++
7	4 *	13	測定不能	+++
8	3 *	15	測定不能	+++
9	4 *	15	測定不能	+++
10	4 *	15	測定不能	+++
感染率			100%	

\*は死亡個体を示した。感染程度は、検鏡時の 5 視野の合計孢子数から 1 視野当たりの平均孢子数を算出し、0 孢子を-、1~10 孢子を+、11~100 孢子を++、101 孢子以上を+++と判断して、++以上を重度感染として評価した。また、測定不能は孢子濃度が非常に高いために、その定量評価ができなかったことを示す。



**Fig. 7** 3種の微孢子虫胞子をカイコに接種した時の解剖状況

Aは *Trachipleistophora* sp. FOA の  $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 接種区 (接種 18 日後)、B は *Vavraia* sp. YGSL の  $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 接種区 (接種 19 日後)、C は D.W.区 (接種 15 日後) のカイコの解剖写真を示す。絹糸腺の白いシストが確認された部分を赤矢印で示す。

#### 4. 接種濃度別のカイコへの感染性と増殖率

接種後の経過日数ごとに接種個体の齢期を記録した結果、*Trachipleistophora* sp. FOA 接種区では、接種 5 日後にはすべての濃度区でおおむね 3 齢幼虫に、また、接種 10 日後には、80%以上の個体が 4 齢幼虫まで成長していた。接種 13 日後には 5 齢幼虫が観察され始め、 $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区では、75%の個体が 5 齢幼虫へと成長した。接種 16 日後には全濃度区においてほぼすべての個体が 5 齢幼虫となった (Table 23)。よって、*Trachipleistophora* sp. FOA 接種区では、接種濃度の違いによる成長速度に大きな差はなく、急激な個体数の減少も確認されなかった (Fig. 8)。これに対し、*Vavraia* sp. YGSL 接種区では、接種 5 日後には全区において 3 齢幼虫に、接種 10 日後には、 $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区の全生存個体が 4 齢幼虫へと成長したのに対し、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区の生存個体は全て 3 齢幼虫のままであった。また、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区においては、80%以上の個体が 4 齢幼虫へと成長したが、一部で 3 齢幼虫も確認された。接種 13 日後には、 $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区では 5 齢幼虫が観察され始めたが、他の 3 区では全生存個体が 4 齢幼虫のままであった。接種 16 日後になると  $1.0 \times 10^2$  (spore / 頭) 区と  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区の全生存個体は 5 齢幼虫へと成長していた。他の 3 区においても 70%前後の個体が 5 齢幼虫へと成長し、一部で 4 齢幼虫も観察された (Table 24)。*Vavraia* sp. YGSL 接種区では、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区および  $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区で他の 2 区に比べ成長の遅延が確認されたが、経過観察期間内に急激な個体数の減少は確認されなかった (Fig. 9)。対照の D.W.区では、全個体が 10 日後に 4 齢幼虫に、16 日後に 5 齢幼虫へと成長した (Table 25, Fig. 10)。同じく対照の Nb-NIS では、接種 13 日後に生存していた個体は全て 3 齢幼虫であり、接種 16 日後には全個体が死亡した (Table 26, Fig. 11)。

**Table 23** *Trachipleistophora* sp. FOA 接種区における接種後の経過日数ごとの生存頭数

齢期	生存頭数 (頭)																			
	5日後					10日後					13日後					16日後				
	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
2齢	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3齢	20	20	19	20	20	4	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4齢	0	0	0	0	0	16	20	17	20	17	19	5	16	11	14	2	0	1	0	1
5齢	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	15	4	9	5	18	19	18	20	17
計	20	20	20	20	20	20	20	20	20	19	20	20	20	20	19	20	19	19	20	19

経過日数ごとの生存頭数を齢期ごとに集計した。10<sup>2</sup>から10<sup>7</sup>は各接種濃度である1.0×10<sup>2</sup>から1.0×10<sup>7</sup> (spore / 頭) 区を示す。



**Table 24** *Vavraia* sp. YGSL 接種区における接種後の経過日数ごとの生存頭数

齢期	生存頭数 (頭)																			
	5日後					10日後					13日後					16日後				
	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
2齢	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3齢	19	20	20	19	20	0	0	3	19	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4齢	0	0	0	0	0	19	19	17	0	19	6	13	20	19	20	0	0	7	5	4
5齢	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	6	0	0	0	19	19	13	14	15
計	19	20	20	19	20	19	19	20	19	20	19	19	20	19	20	19	19	20	19	19

経過日数ごとの生存頭数を齢期ごとに集計した。10<sup>2</sup>から 10<sup>7</sup>は各接種濃度である 1.0×10<sup>2</sup>から 1.0×10<sup>7</sup> (spore / 頭) 区を示す。

**Table 25** 微孢子虫胞子を接種していない D.W. 区における経過日数ごとの生存頭数 (対照区)

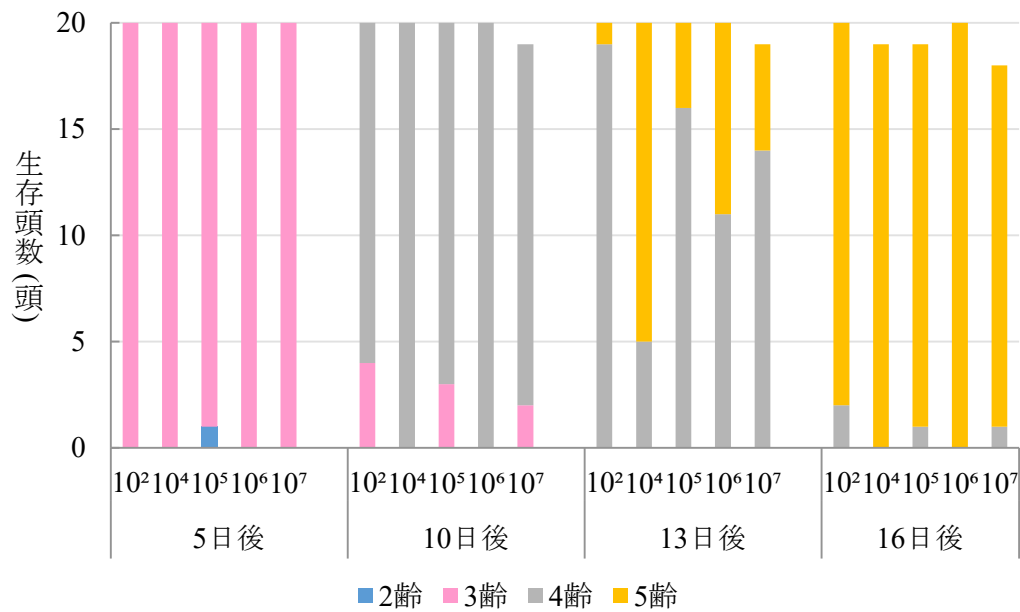
齢期	生存頭数 (頭)			
	5日後	10日後	13日後	16日後
	-	-	-	-
2齢	0	0	0	0
3齢	10	0	0	0
4齢	0	10	5	0
5齢	0	0	5	10
計	10	10	10	10

経過日数ごとの生存頭数を齢期ごとに集計した。

**Table 26** *Nb*-NIS 接種区における接種後の経過日数ごとの生存頭数 (対照区)

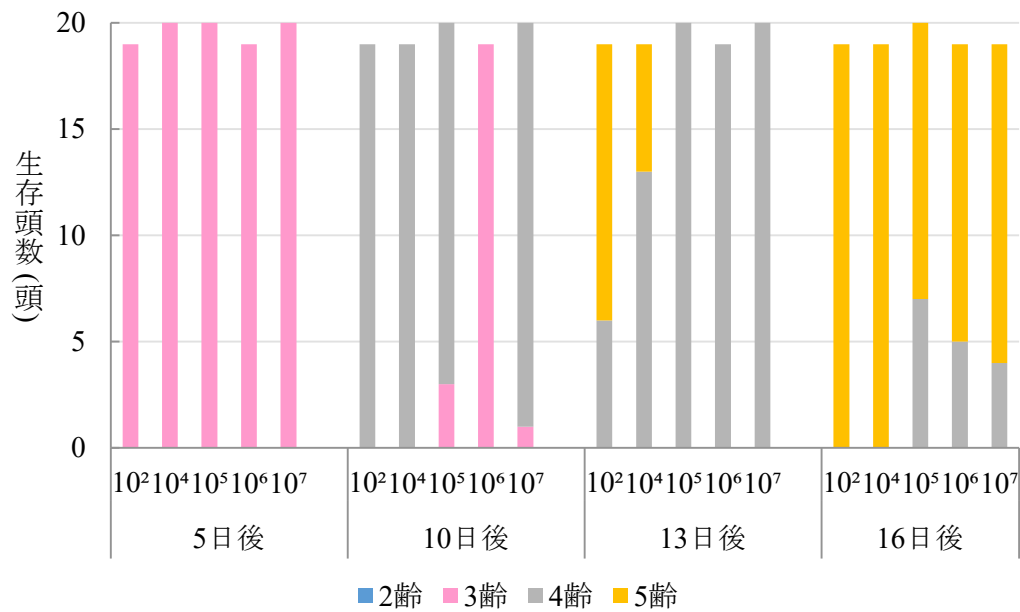
齢期	生存頭数 (頭)			
	5日後	10日後	13日後	16日後
	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$
2齢	0	0	0	0
3齢	10	7	1	0
4齢	0	1	2	0
5齢	0	0	0	0
計	10	9	3	0

経過日数ごとの生存頭数を齢期ごとに集計した。 $10^4$ は接種濃度である  $1.0 \times 10^4$  (spore / 頭) 区を示す。



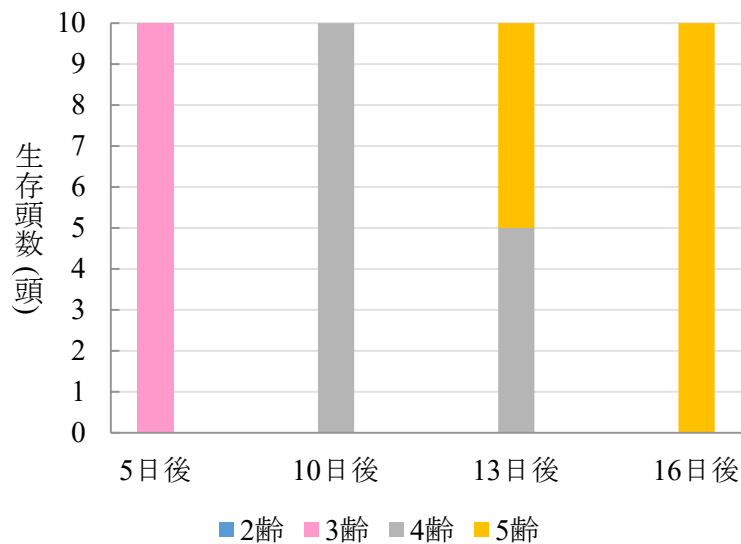
**Fig. 8** *Trachipleistophora* sp. FOA 接種区におけるカイコの齢期と生存頭数の推移

縦軸は生存頭数を、横軸は経過日数を示す。棒グラフは青の部分が 2 齢、桃色が 3 齢、灰色が 4 齢、黄色が 5 齢の頭数を示す。



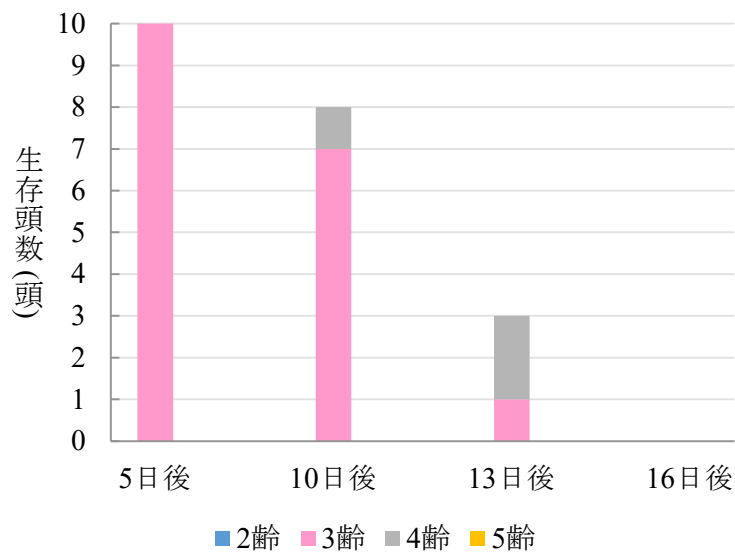
**Fig. 9** *Vavraia* sp. YGSL 接種区におけるカイコの齢期と生存頭数の推移

縦軸は生存頭数を、横軸は経過日数を示す。棒グラフは青の部分が 2 歳、桃色が 3 歳、灰色が 4 歳、黄色が 5 歳の頭数を示す。



**Fig. 10** D.W. 区におけるカイコの齢期と生存頭数の推移

縦軸は生存頭数を、横軸は経過日数を示す。棒グラフは青の部分が 2 齢、桃色が 3 齢、灰色が 4 齢、黄色が 5 齢の頭数を示す。



**Fig. 11** Nb-NIS 接種区におけるカイコの齢期と生存頭数の推移

縦軸は生存頭数を、横軸は経過日数を示す。棒グラフは青の部分が 2 齢、桃色が 3 齢、灰色が 4 齢、黄色が 5 齢の頭数を示す。

磨砕後の感染個体を精製し、回収孢子数を算出した結果、*Trachipleistophora* sp. FOA の  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区では  $2.1 \times 10^7$  (spore)、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区では  $4.4 \times 10^7$  (spore)、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区では  $7.4 \times 10^8$  (spore) となった。回収孢子数は、接種濃度に比例して増加、増殖率はそれぞれ、1,050%、220%、370%となり、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区が最も高くなった (Table 27)。これに対して、*Vavraia* sp. YGSL における回収孢子数は、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区では  $1.2 \times 10^7$  (spore)、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区では  $3.5 \times 10^8$  (spore)、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区では  $8.5 \times 10^8$  (spore) となった。回収孢子数は、*Trachipleistophora* sp. FOA と同様に接種濃度に比例して増加し、増殖率はそれぞれ、600%、1,750%、425%となり、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区が最も高くなった (Table 28)。

**Table 27** *Trachipleistophora* sp. FOA 接種区での孢子増殖率

接種濃度 (spore / 頭)	接種孢子数 (spore)	回収孢子数 (spore)	増殖率 (%)
$1.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$	$2.1 \times 10^7$	1,050
$1.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$	$4.4 \times 10^7$	220
$1.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$7.4 \times 10^8$	370

孢子増殖率 (%) は、回収孢子液全量内の孢子数 ÷ 接種孢子数 × 100 により算出した数値を示す。

**Table 28** *Vavraia* sp. YGSL 接種区での孢子増殖率

接種濃度 (spore / 頭)	接種孢子数 (spore)	回収孢子数 (spore)	増殖率 (%)
$1.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^6$	$1.2 \times 10^7$	600
$1.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$	$3.5 \times 10^8$	1,750
$1.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$8.5 \times 10^8$	425

孢子増殖率 (%) は、回収孢子液全量内の孢子数 ÷ 接種孢子数 × 100 により算出した数値を示す。

## 考察

微胞子虫胞子の孵化には様々な化学的および物理的的刺激が関係しており、その刺激となる物質は種によって異なるとされる (Undeen, 1990)。化学的な刺激の 1 例として挙げられる  $\text{Na}^+$ により孵化する微胞子虫として、*N. apis* (De Graaf *et al.*, 1993) や *N. locustae* (*P. locustae* (Shi *et al.*, 2009)) (Whitlock and Johnson, 1990) が既に報告されている。しかし、これらの微胞子虫胞子は生理食塩水のみでの処理では孵化しないことが報告されている (Weiss and Becnel, 2014)。しかし、第 1 章で示したとおり、*T. haruka* の胞子は 25°C 条件下において 0.85% (w / v) NaCl のみでも孵化することを確認した。この結果より *T. haruka* には既知微胞子虫株とは異なる特異な孵化特性を有していることが明らかとなった。そこで、*Trachipleistophora* 属微胞子虫の特徴を再確認する必要があると同時に、他の *Trachipleistophora* 属をはじめとする大型胞子サイズの昆虫感染性微胞子虫にも同様の特性を有する可能性があると考え、トンボ目昆虫由来の *Trachipleistophora* sp. FOA とチョウ目昆虫由来の *Vavraia* sp. YGSL の生物学的特性を併せて調査した。

孵化特性の調査で対照とした *Nb*-NIS は、 $\text{K}^+$ を含む 0.1 M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ による処理でのみ孵化を確認した。なお、温度による孵化率の変化は少なかった (Fig. 10, 12)。一方、*Trachipleistophora* sp. FOA においては、 $\text{K}^+$ を含む 0.1 M KCl + 3% (w / v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ による孵化処理で胞子の孵化を確認した。また、25°C 条件下で 0.85% (w / v) NaCl による孵化処理を行った場合、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ の処理の孵化率よりも低いものの胞子の孵化を確認した。しかし、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ 処理と同様に  $\text{K}^+$ を含む 0.1 M KOH 処理では、4°C 下で蒸留水と 0.85% (w / v) NaCl と同レベルの 10% 以下の孵化率を、25°C 条件下では 0.1 M KCl + 3% (w / v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ と 0.85% (w / v) NaCl による処理よりも低い 20% 以下の孵化率を示した。よって、 $\text{K}^+$ を含んでも溶液によっては、孵化特性に違いをもたらすこと、および、全体的に 4°C 条件よりも 25°C 条件において孵化率が高くなる傾向にあることが明らかになった。*Vavraia* sp. YGSL においては、 $\text{K}^+$ を含む 0.1 M KOH、0.1 M KCl + 3% (w / v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ による孵化処理で胞子の孵化を確認した。さらに 25°C 条件下で 0.85% (w / v) NaCl による孵化処理を行った場合、 $\text{K}^+$ を含む 0.1 M KOH、

0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による孵化処理と同レベルで孢子が孵化した。特に 0.85% (w/v) NaCl では、4℃条件の孵化率は 10%程度であったが、25℃条件では平均でおよそ 50%を示し、孢子の孵化に温度条件が影響を与えていることが推察された。*Vavraia* 属微孢子虫を孵化させる既知の条件として、*V. culicis* と *Vavraia oncoperae* の報告例がある。すなわち、*V. culicis* は 0.2 M KCl で、*V. oncoperae* は 3 mM EDTA で事前処理をしたのち 0.2 M KCl で孵化するとされている (Undeen, 1983; Malone, 1990)。*Vavraia* sp. YGSL においても 0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による処理で孵化することを確認した。

第 1 章において調査した *T. haruka* は、0.1 M KOH、0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理と 25℃条件下の 0.85% (w/v) NaCl 処理で孢子の孵化を確認したことから、本株の孵化特性には、K<sup>+</sup>以外に Na<sup>+</sup>や温度変化が含まれるものと考えられた。これまで Na<sup>+</sup>が孢子の孵化に関与することはあるが生理食塩水のみでの処理では孵化しないことが報告されていることから (Weiss and Becnel, 2014)、25℃条件下の 0.85% (w/v) NaCl のみで孵化する点は *T. haruka* の孢子が活性化する際の特徴であることが明らかになった。また、本章で調査した 2 株においても *T. haruka* と同様の傾向を確認した (Fig. 12)。本研究で供試した *Trachipleistophora* 属と *Vavraia* 属の特徴として、大型の孢子サイズであることがあげられる。よって、孵化特性に K<sup>+</sup>以外に Na<sup>+</sup>や温度変化が含まれ、特に 25℃条件下の 0.85% (w/v) NaCl のみで孵化する点は、昆虫感染性大型微孢子虫の特徴となる可能性が示唆された。しかし、*Trachipleistophora* sp. FOA においては 0.1 M KOH の処理における孵化率が低かったのに対し、他の 2 株においては 0.1 M KOH でも孵化するなど、同属で同様の特徴を有する微孢子虫間においても孵化条件における差異を確認した。KOH は第 4 章で行う細胞接種実験の際に、孢子の孵化処理に使用する溶液であることから、KOH を用いない他の孵化処理方法についての検討を行った。

5 つの濃度の NaCl で孵化処理をした *Trachipleistophora* sp. FOA の孵化率は、3.0% NaCl において最も高くなった。より詳細に孵化特性を調べるために 4℃と 25℃の温度条件で、0.85% (w/v) NaCl、3.0% NaCl、D.W.で孵化率を測定した。その結果、25℃条件下の 3.0% NaCl における平均孵化率が 67.6%となり、0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>による孵化



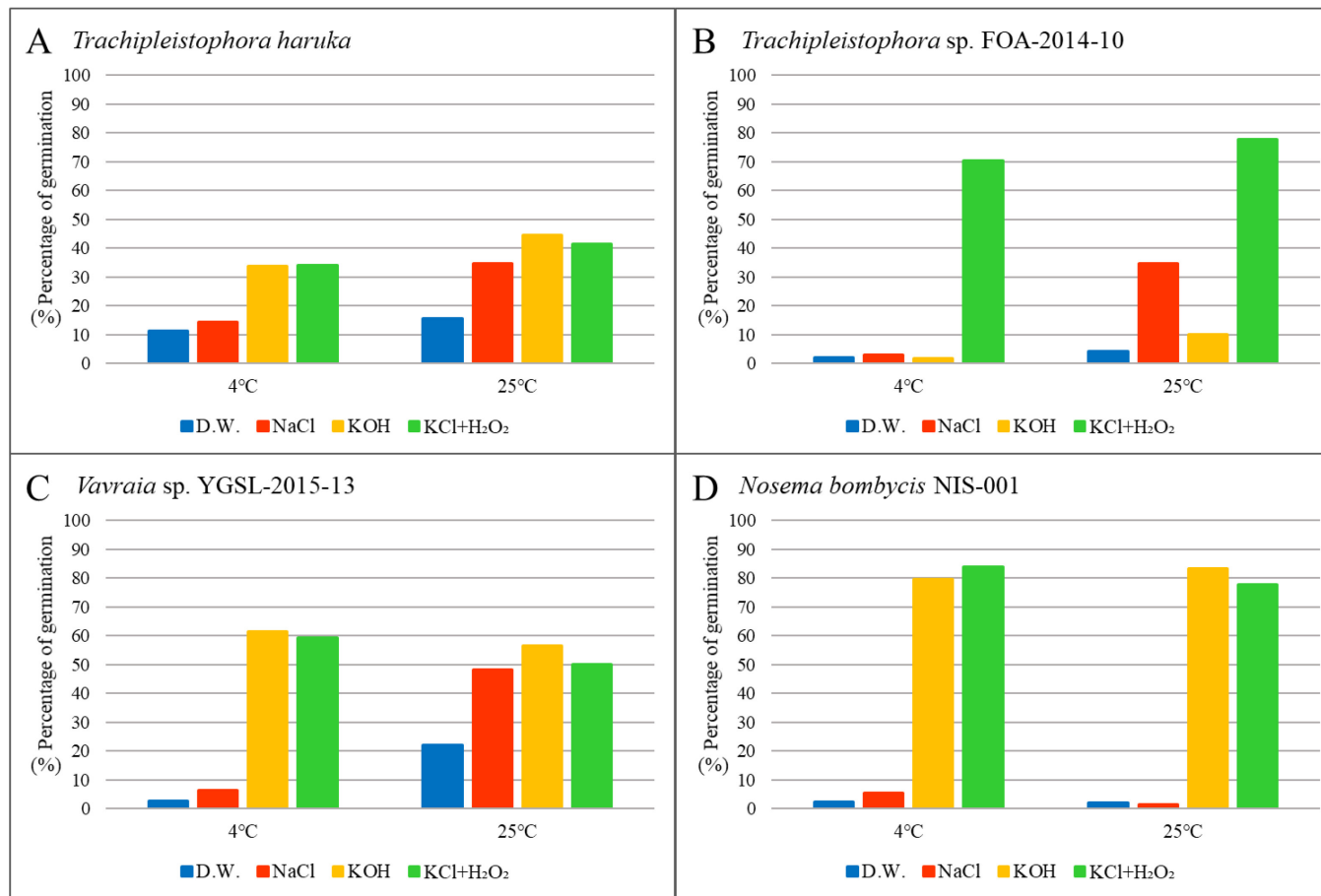


Fig. 12 各供試株の孵化特性（総括）

縦軸は孵化率、横軸は温度条件を示す。青の棒グラフは D.W.、赤は NaCl、黄色は KOH、緑は KCl+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の処理による孵化率を示す。

処理の平均値 (4°C: 70.3%、25°C: 77.7% (Table 6)) に近い値となった。よって、3.0%の濃度の NaCl であれば、細胞接種実験の際に妨げにならないと判断し、第 4 章の細胞接種実験の *Trachipleistophora* sp. FOA の孢子の孵化処理条件とした。

カイコに接種した結果、*Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL はともに  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 以上の接種濃度で感染を確認した。よって、この 2 株も *T. haruka* と同様にカイコへの感染性があることが判明した。*Trachipleistophora* sp. FOA の感染率は、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 20%、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区で 85%、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区で 70%となっており、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区以上で高くなる傾向にあり、また、重度感染個体も確認された。*Vavraia* sp. YGSL においても感染率は、 $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 30%、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区で 100%、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区で 95%となっており、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区以上で高くなる傾向にあり、また、重度感染個体も確認された。ただ、どの区においても 90%以上の個体が 5 齢まで成長し、成長速度も *Trachipleistophora* sp. FOA では D.W.区とほとんど変わらず、また、接種濃度による差も確認されなかった。*Vavraia* sp. YGSL でも、感染を確認した  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区以上では成長の遅延が確認されたが、死亡個体はどの区においても 1 個体以下であった。これらの結果より、この 2 株はカイコの体内で孢子を増殖させるが、成長を極度に遅延させることはないものの、絹糸腺においてシストを確認できるほどの重点的な感染が確認されたため、繭を作る際の吐糸の段階から影響を及ぼし、上蔟時や営繭後に死に至る可能性が示唆された。

感染個体より孢子回収をした結果、*Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL ではともに回収孢子数が接種濃度に比例して増加した。増殖率を算出したところ、*Trachipleistophora* sp. FOA では  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 1,050%、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区で 220%、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区で 370%、*Vavraia* sp. YGSL では  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 600%、 $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区で 1,750%、 $1.0 \times 10^7$  (spore / 頭) 区で 425%となったことから、回収孢子数の多さが増殖率の高さにはつながらないという結論が得られた。

本章で供試した 2 株には、カイコに感染しても若齢致死させず、老齢幼虫まで成長させるという特徴が認められた。微生物農薬への利用を検討する際、カイコにこのような病徴を

示す株は、第 1 章の *T. haruka* と同様に有用株になるものと推察した。また、*Trachipleistophora* sp. FOA は  $1.0 \times 10^5$  (spore / 頭) 区で 1,050%、*Vavraia* sp. YGSL は  $1.0 \times 10^6$  (spore / 頭) 区で 1,750% と非常に高い孢子増殖率を示したことから、より増殖率が高い条件を追究することで、効率的な孢子生産が可能となるものと期待される。

## 第4章 昆虫感染性大型微胞子虫の胞子形成様式の比較

### 序論

微胞子虫の属や種の種類は、生物学的特性と分子生物学的特性の両方を踏まえて行われる(青木・畠山, 2014)。Larsson (1999)によれば、宿主や極糸の構造、胞子形成過程における核数や胞子の形成数、胞子形成時に形成される膜の有無などが分類基準になるとされている。これらの特徴の中には、微胞子虫を宿主に感染させ、胞子形成様式を観察しなければ決定できない項目もある。経口感染が一般的である昆虫の場合は、昆虫が微胞子虫胞子の付着した餌を摂食し、胞子が中腸内に入ると腸液のアルカリ性消化液やカリウムイオンなどの刺激により孵化し、極糸を外翻しながら突出させ、中腸細胞などの細胞組織を貫通する。この時に胞子内の核を含む胞子原形質の一部であるスポロプラズム(芽体)が極糸の中を通り、宿主細胞内へ送り込まれる。その後、侵入したスポロプラズムがメロント(分裂子)、スポロント(胞子芽母細胞)、スポロプラスト(胞子芽)の順に発育し、分裂・増殖を繰り返しながら最終的に多数の胞子を形成する。微胞子虫の胞子形成様式は属によって異なり、属を推定するための指標の1つとなる(青木・畠山, 2014)。しかし、昆虫へ感染実験では生体の状態や生体組織により、観察を妨げられることがある。

そこで、本章では第1から3章で調査した、*T. haruka*、*Trachipleistophora* sp. FOA、*Vavraia* sp. YGSLの3株を用いて、昆虫培養細胞への接種実験を行った。経過時間ごとに観察し、胞子形成様式を確認するところで、供試微胞子虫株の属や種を詳細に検討した。

## 材料および方法

### 1. 供試材料

供試微胞子虫株には、*T. haruka* と *Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL、対照区として *Nb-NIS* を用いた。

供試培養細胞には、研究室で継代培養を行っている *Sf9* 細胞（ツマジロクサヨトウ卵巣由来細胞）を用いた（Fig. 13）。細胞培養液には、昆虫細胞培養用培養液 TC-100 (SIGMA-ALDRICH, Inc.) に 10%ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) (General Electric, Co.) と 1% 抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic) (Penicillin G, sulfuric acid streptomycin, amphotericinB, Ampicillin) (Life Technologies, Co.) を添加したものをを用いた。

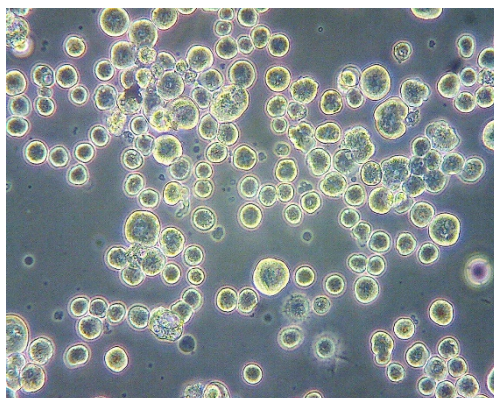


Fig. 13 *Sf9* 細胞

継代 7 日後の細胞を 200 倍の倍率で観察した。

### 2. 微胞子虫胞子液の精製

昆虫から回収した胞子液には、細菌や夾雑物が多く含まれているので、そのまま細胞に接種するとコンタミネーションが起こる可能性が高くなる。細菌や夾雑物を取り除く必要があるため、コロイドシリカ (Ludox® HS-40) (SIGMA-ALDRICH, Inc.) を用いた密度勾配遠心分離法 (Solter *et al.*, 2012) による精製を行った。遠心分離には日立分離用超遠心機 CP80WX (Hitachi Koki Co., Ltd.) とスイングローター P28S2 (Hitachi Koki Co., Ltd.) を用いた。遠心分離を行う以外の作業は、全てクリーンベンチ PCV1305BRG3 (Hitachi, Ltd.) 内で行った。また、なるべく氷上で胞子液を冷却しながら行った。

まず、50 ml チューブに Ludox® HS-40 16 ml と 0.05 M NH<sub>4</sub>Cl (NACALAI TESQUE, INC.) 1 ml 入れた。次に Ludox® HS-40 の上に層を重ねるように滅菌 D.W. 16 ml と 0.05 M NH<sub>4</sub>Cl 1 ml 入れ、チューブのふたを閉め、横に倒して 2 時間静置した。静置後、50 ml チューブの中身を CENTRIFUGE WAVE 40PA TUBE (Hitachi Koki Co., Ltd.) に移し、5 分静置した。孢子液 1 ml に 0.1% (w/v) SDS (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を 0.5 ml 入れ、攪拌し、静置後のチューブ内の液体の上に層を重ねるように入れ、超遠心機で 5°C で 10,000 rpm 30 分間遠心した。遠心後、孢子層のみを 15 ml チューブに移した。滅菌 D.W. を加えて攪拌し、遠心機 LC-200 を用いて 3,000 rpm 10 分間遠心を行った。Ludox® HS-40 を取り除くために、この作業を 3 回繰り返した。遠心後、上澄みを取り除き、滅菌 D.W. を 10 ml、Amphotericin B Suspension (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を 1 ml、Kanamycin Sulfate Solution (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を 100 µl 入れて、4°C 下で保存した。

### 3. 培養細胞への接種と観察

*Sf9* 細胞に対して供試微孢子虫株 *T. haruka*、*Trachipleistophora* sp. FOA、*Vavraia* sp. YGSL と *Nb-NIS* の接種実験を行った。遠心分離を行う以外の作業は全てクリーンベンチ PCV1305BRG3 内で行った。

孢子液に Amphotericin B Suspension (孢子液 1 ml に対し Amphotericin B 100 µl) を入れて攪拌し、遠心機 LC-200 で 3,000 rpm 10 min 遠心を行った。遠心後、上澄みを取り除き、*Trachipleistophora* sp. FOA については 3.0% NaCl を、それ以外の 3 種については 0.1 M KOH を 1 ml 加えて 40 分間静置し、孢子を活性化させた。静置中に培養していた *Sf9* 細胞を 50 ml チューブに移し、遠心機 LC-200 を用いて 2,000 rpm 10 分間遠心を行った。遠心後は上澄みを取り除き、新しい培地を 15 ml 入れた。よく攪拌し、Falcon® セルカルチャーフラスコ 50 mL プラグシールキャップスラントネック (Corning, Inc.) へ入れ、そこに活性処理を行った孢子液を一気に入れ、静かに攪拌した。攪拌後、微孢子虫を接種した細胞液を Falcon® セルカルチャーフラスコ 25 mL プラグシールキャップスラントネック

ク (Cornig, Inc.) 15 個に 1 ml ずつ分注した。Falcon® セルカルチャーフラスコ 25 mL プラグシールキャップスラントネック の底面全体に微胞子虫を接種した細胞液を手早く広げて馴染ませ、40 分間静置した。静置後は上澄みを静かに取り除き、新しく培地を 2.5 ml 加え、27°C 下で培養した。

接種 12、24、72、120、168、192、216、240、264、288、312、336、360 時間後に標本を作製した。*T. haruka* の標本はサイトスピンを用いて、その他の標本は遠心式集細胞装置 CYTOPRO® 7622 型 (Phoenix Science Inc.) を用いて作製した。

サイトスピンによる標本は、浮遊細胞収集バケツト (Tomy Seiko Co., Ltd.) に細胞培養液を入れ、遠心機 LC-200 で 1,500 rpm 12 分間遠心を行った。遠心式集細胞装置 CYTOPRO® 7622 型による標本は、シングルチャンパーに細胞培養液を入れ、1,500 rpm 12 分間遠心してスライドガラス上に細胞を貼り付けた。遠心後、プレパラートに 100%メタノール (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) を滴下して細胞を固定した。5 分間静置後に風乾した。

作製した標本はそれぞれギムザ染色を行った。ギムザ液 (Merck, Ltd.) にリン酸塩緩衝液 (Kishida Chemical Co., Ltd.) を 1 : 9 の比率で加えた溶液を標本に滴下し、30 分間静置した。静置後、ギムザ液を水道水で洗い流し、風乾した。ギムザ染色を行った標本は、システム顕微鏡 BX53 (×1,000) で検鏡し、胞子形成過程を観察した。

## 結果

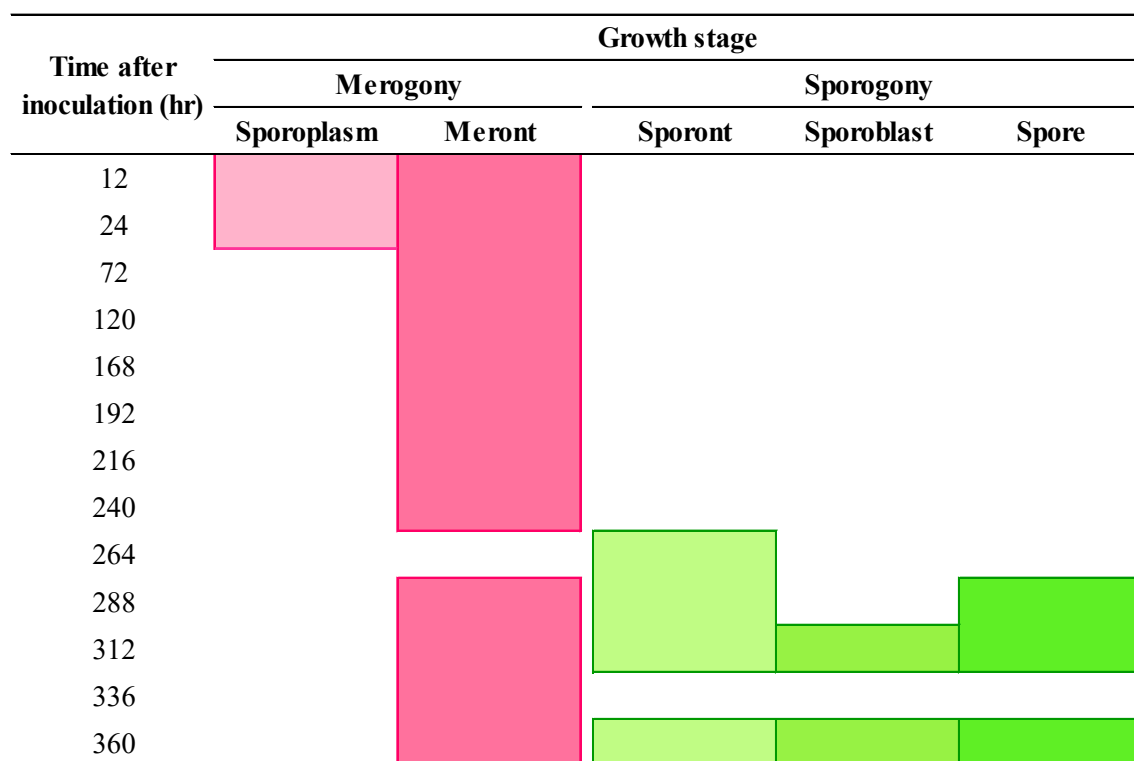
### 1. *Trachipleistophora haruka* の孢子形成様式

*T. haruka* を *Sf9* 細胞に接種した結果、孢子形成に至る各発育ステージが確認された。スポロプラズムとメロントは接種 12 時間後より、スポロントは接種 264 時間後より、スポロブラストは接種 312 時間後より、孢子は接種 288 時間後より確認された。接種 240 時間後まででは栄養繁殖期のみが、接種 264 時間以降では孢子形成期が確認された (Table 39)。

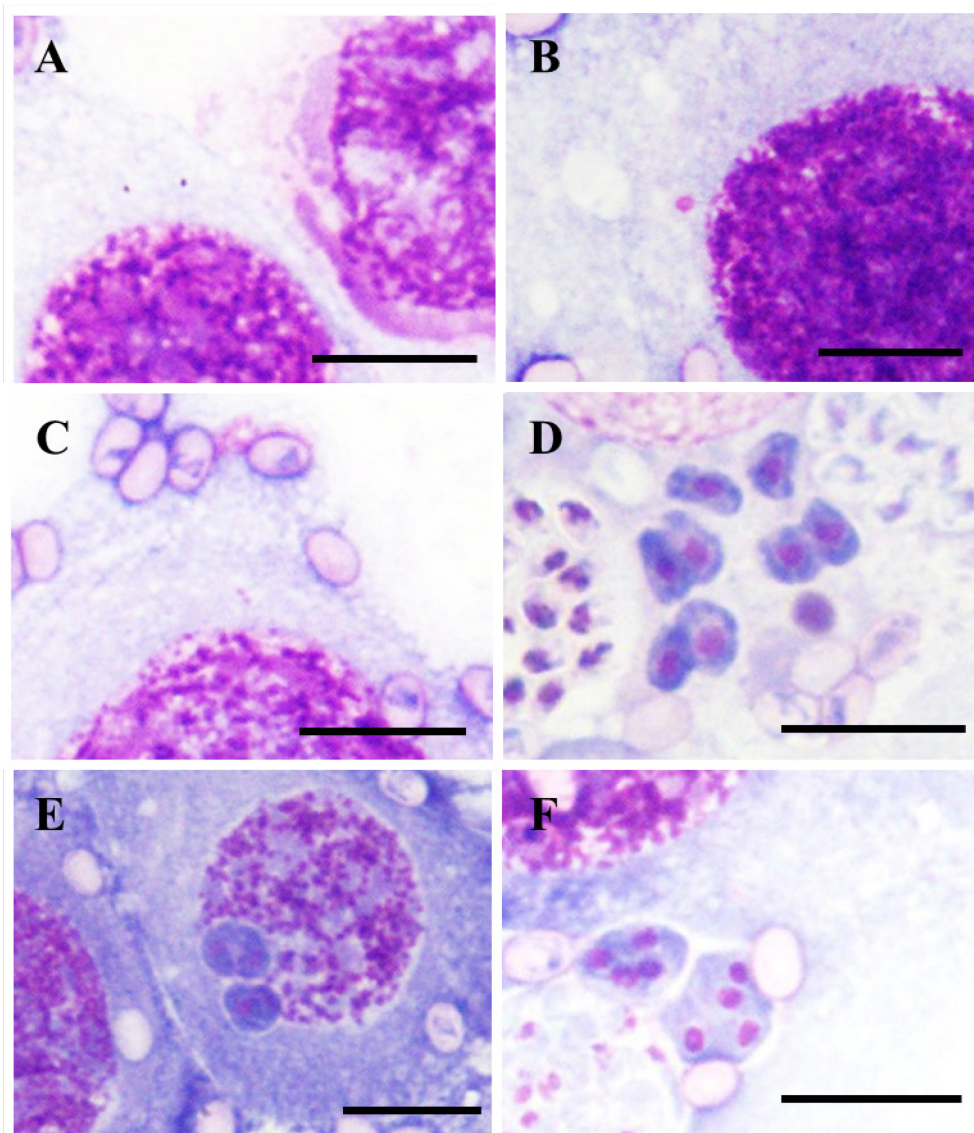
観察された発育ステージの例として、栄養繁殖期では接種 24 時間後の標本から単核のスポロプラズム (Fig. 14-A)、接種 192 時間後の標本から単核の初期メロント (Fig. 14-B)、接種 24 時間後の標本から核分裂した 2 核の初期メロント (Fig. 14-C)、接種 360 時間後の標本から細胞分裂をした単核のメロント (Fig. 14-D)、接種 360 時間後の標本から 2 核のメロント (Fig. 14-E)、接種 288 時間後の 4 核のメロント (Fig. 14-F) がそれぞれ確認された。孢子形成期の孢子形成様式として、接種 312 時間後の標本からスポロント (Fig. 15-A)、接種 312 時間後の標本からスポロブラスト (Fig. 15-B)、接種 288 時間後の標本から孢子 (Fig. 15-C) が確認された。スポロント以降の発育ステージではパンスポロブラスト膜を確認し、膜内には 8~27 個の単核性孢子を形成していた。



Table 29 *T. haruka* の発育ステージの推移

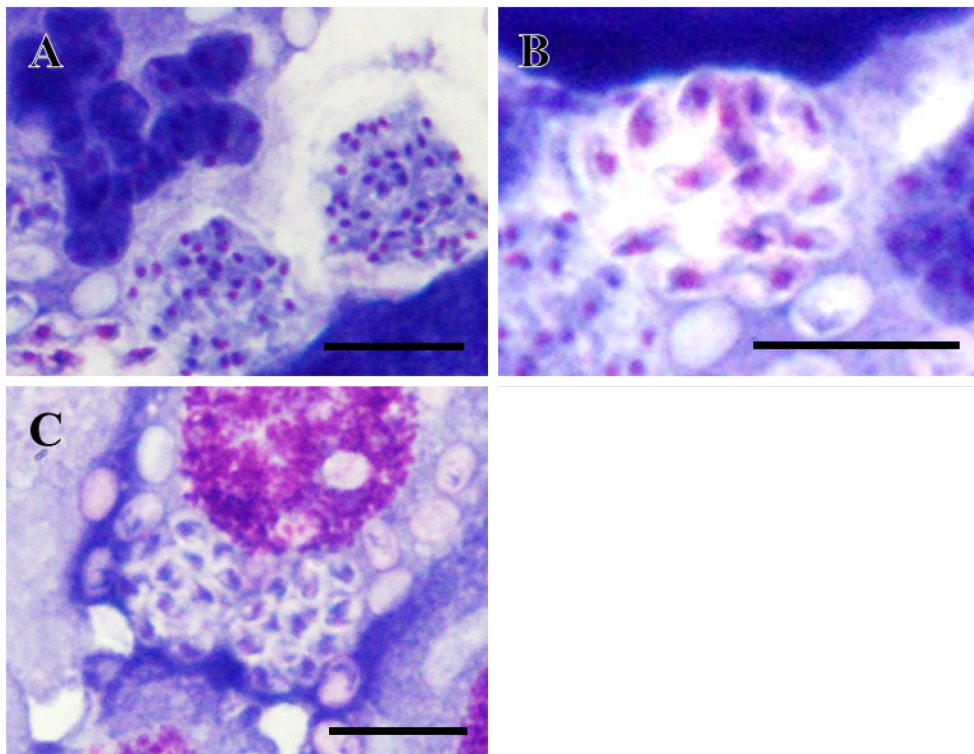


経過時間ごとに確認した発育ステージのマス塗りつぶして示した。桃色系で栄養繁殖期 (Merogony)、緑系で孢子形成期 (Sporogony) の発育ステージを示した。



**Fig. 14** *T. haruka* の孢子形成様式 (栄養繁殖期)

A は接種 24 時間後の単核のスポロプラズム、B は接種 192 時間後の単核の初期メロント、C は接種 24 時間後の核分裂した 2 核の初期メロント、D は接種 360 時間後の細胞分裂をした単核のメロント、E は接種 360 時間後の 2 核のメロント、F は接種 288 時間後の 4 核のメロントを示した。Bar は 10  $\mu\text{m}$  を示す。標本は 1,000 倍の倍率で観察した。



**Fig. 15** *T. haruka* の孢子形成様式 (孢子形成期)

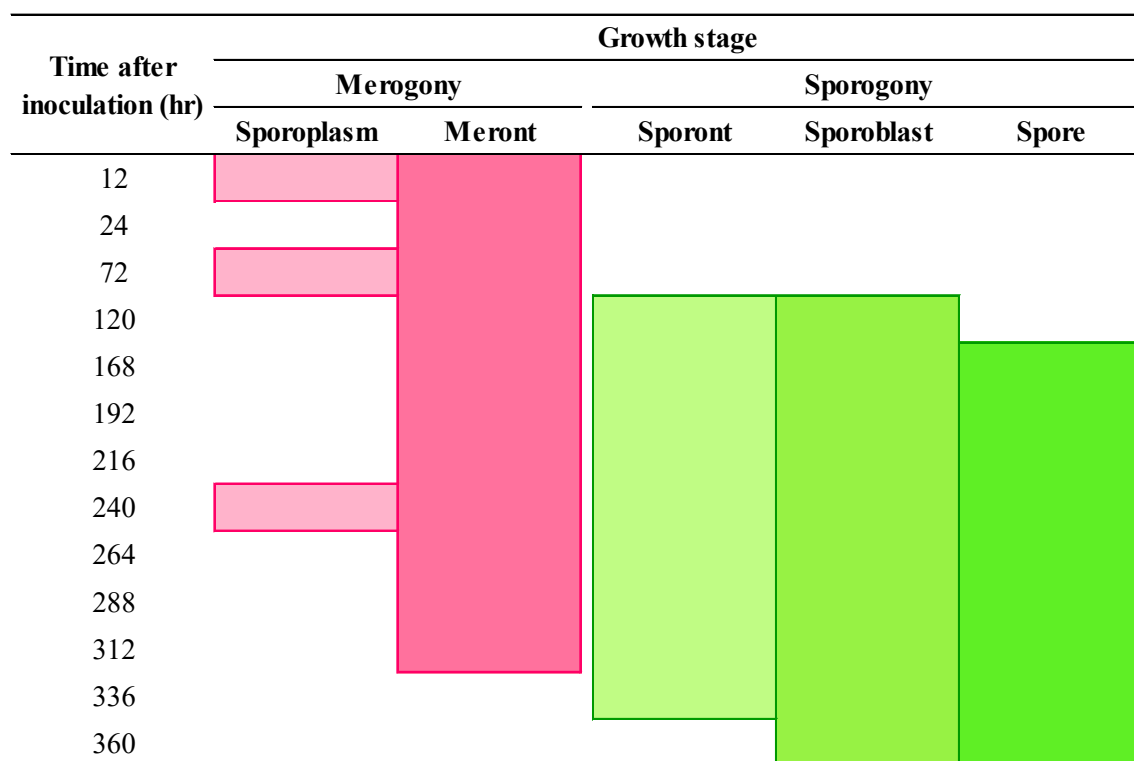
A は接種 312 時間後のスポロント、B は接種 312 時間後のスポロブラスト)、C は接種 288 時間後の孢子を示した。Bar は 10 µm を示す。標本は 1,000 倍の倍率で観察した。

## 2. *Trachipleistophora* sp. FOA-2014-10 の孢子形成様式

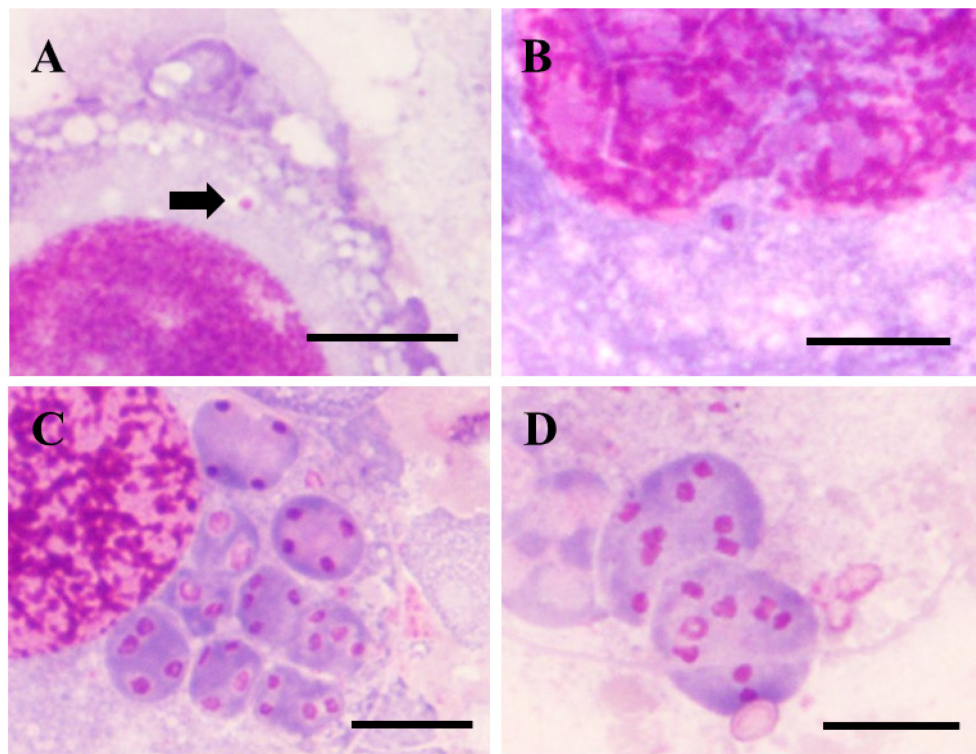
*Trachipleistophora* sp. FOA を *Sf*9 細胞に接種した結果、孢子形成に至る各発育ステージが確認された。スポロプラズムとメロントは接種 12 時間後より、スポロントとスポロブラストは接種 120 時間後より、孢子は接種 192 時間後より確認された。接種 72 時間後までは栄養繁殖期のみが観察され、接種 120 時間以降では孢子形成期が確認された (Table 30)。

観察された発育ステージの例として、栄養繁殖期では接種 12 時間後の標本から単核のスポロプラズム (Fig. 16-A)、接種 72 時間後の標本から単核の初期メロント (Fig. 16-B)、接種 120 時間後の標本から 2 核あるいは 4 核のメロント (Fig. 16-C)、接種 120 時間後の標本から多核体メロント (Fig. 16-D) などがそれぞれ確認された。孢子形成期の発育ステージとして、接種 336 時間後の標本からスポロント (Fig. 17-A)、接種 360 時間後の標本からスポロブラスト (Fig. 17-B)、接種 360 時間後の標本から孢子 (Fig. 17-C) が確認された。また、接種 336 時間後の標本から 64 核を持つスポロブラスト (Fig. 17-D) が確認された。スポロント以降の発育ステージではパンスポロブラスト膜が確認され、膜内には 7~32 個の単核性孢子が形成されていた。

Table 30 *Trachipleistophora* sp. FOA の発育ステージの推移



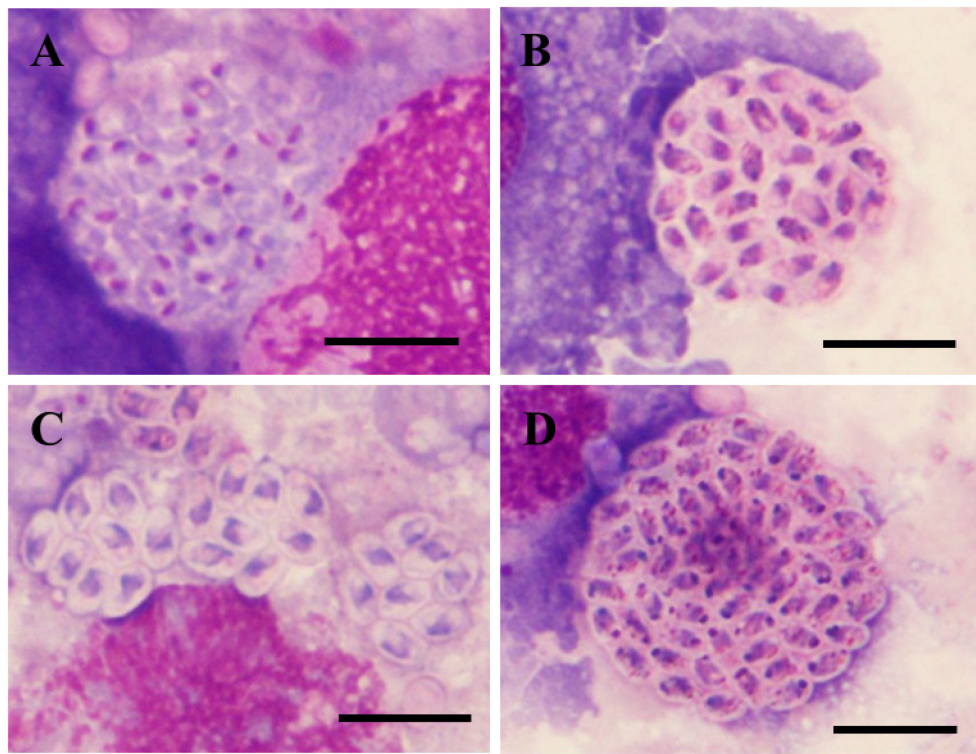
経過時間ごとに確認した発育ステージのマス塗りつぶして示した。桃色系で栄養繁殖期 (Merogony)、緑系で孢子形成期 (Sporogony) の発育ステージを示した。



**Fig. 16** *Trachipleistophora* sp. FOA の孢子形成様式 (栄養繁殖期)

Aは接種 12 時間後の単核のスポロプラズム、Bは接種 72 時間後の単核の初期メロント、Cは接種 120 時間後の 2 核あるいは 4 核のメロント、Dは接種 120 時間後の多核体メロントを示した。Bar は 10  $\mu\text{m}$  を示す。標本は 1,000 倍の倍率で観察した。





**Fig. 17** *Trachipleistophora* sp. FOA の孢子形成様式 (孢子形成期)

A は接種 336 時間後のスポロント、B は接種 360 時間後のスポロブラスト、C は接種 360 時間後の孢子、D は接種 336 時間後の 64 核を持つスポロブラストを示した。Bar は 10  $\mu$ m を示す。標本は 1,000 倍の倍率で観察した。

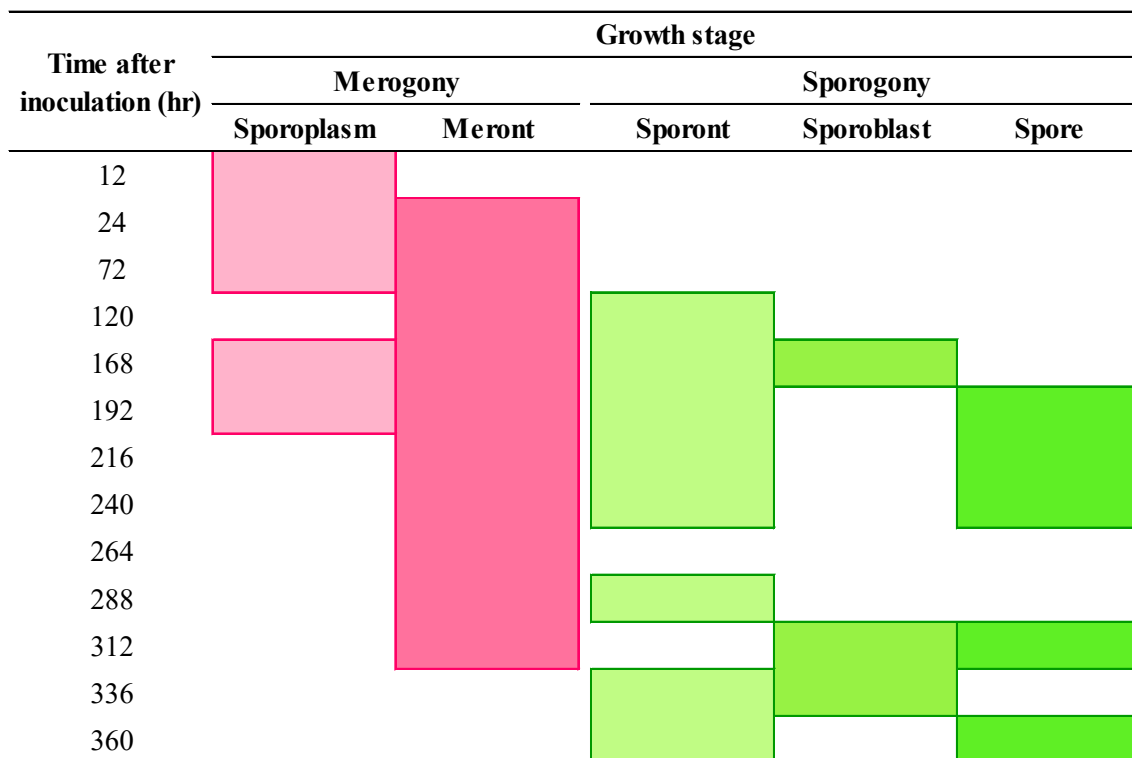
### 3. *Vavraia* sp. YGSL-2015-13 の孢子形成様式

*Vavraia* sp. YGSL を *Sf9* 細胞に接種した結果、孢子形成に至る各発育ステージが確認された。スポロプラズムは接種 12 時間後より、メロントは接種 24 時間後より、スポロントは接種 120 時間後より、スポロブラストは接種 168 時間後より、孢子は接種 192 時間後より確認された。接種 72 時間後までは栄養繁殖期のみが観察され、接種 120 時間以降では孢子形成期への移行が確認された (Table 31)。

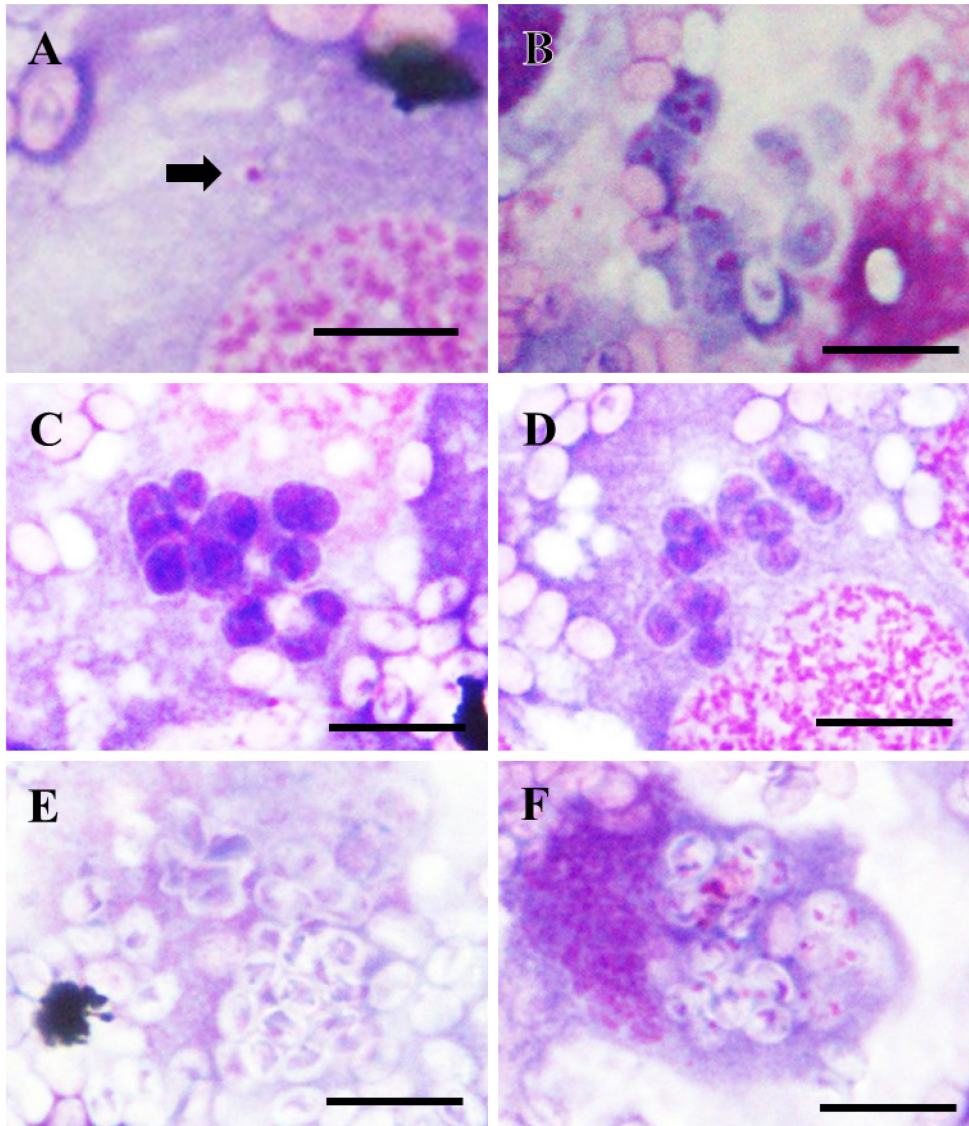
観察された発育ステージの例として、栄養繁殖期では接種 192 時間後の標本から単核のスポロプラズム (Fig. 18-A)、接種 240 時間後の標本から 2 核あるいは 4 核のメロント (Fig. 18-B) などがそれぞれ確認された。孢子形成期の発育ステージとして、接種 216 時間後の標本から単核性のスポロント (Fig. 18-C) と 2 核性のスポロント (Fig. 18-D)、接種 336 時間後の標本からスポロブラスト (Fig. 18-E)、接種 192 時間後の標本から孢子 (Fig. 18-F) が確認された。スポロント以降の発育ステージではパンスポロブラスト膜が確認され、膜内には 16~40 個の単核性孢子が形成されていた。



Table 31 *Vavraia* sp. YGSL の発育ステージの推移



経過時間ごとに確認した発育ステージのマス塗りつぶして示した。桃色系で栄養繁殖期 (Merogony)、緑系で孢子形成期 (Sporogony) の発育ステージを示した。



**Fig. 18** *Vavraia* sp. YGSL の孢子形成様式

A は接種 192 時間後の単核のスポロプラズム、B は接種 240 時間後の 2 核あるいは 4 核のメロント、C は接種 216 時間後の単核性のスポロント、D は接種 216 時間後の 2 核性のスポロント、E は接種 336 時間後のスポロブラスト、F は接種 192 時間後の孢子を示した。

Bar は 10  $\mu\text{m}$  を示す。標本は 1,000 倍の倍率で観察した。

#### 4. *Nosema bombycis* NIS-001 の孢子形成様式

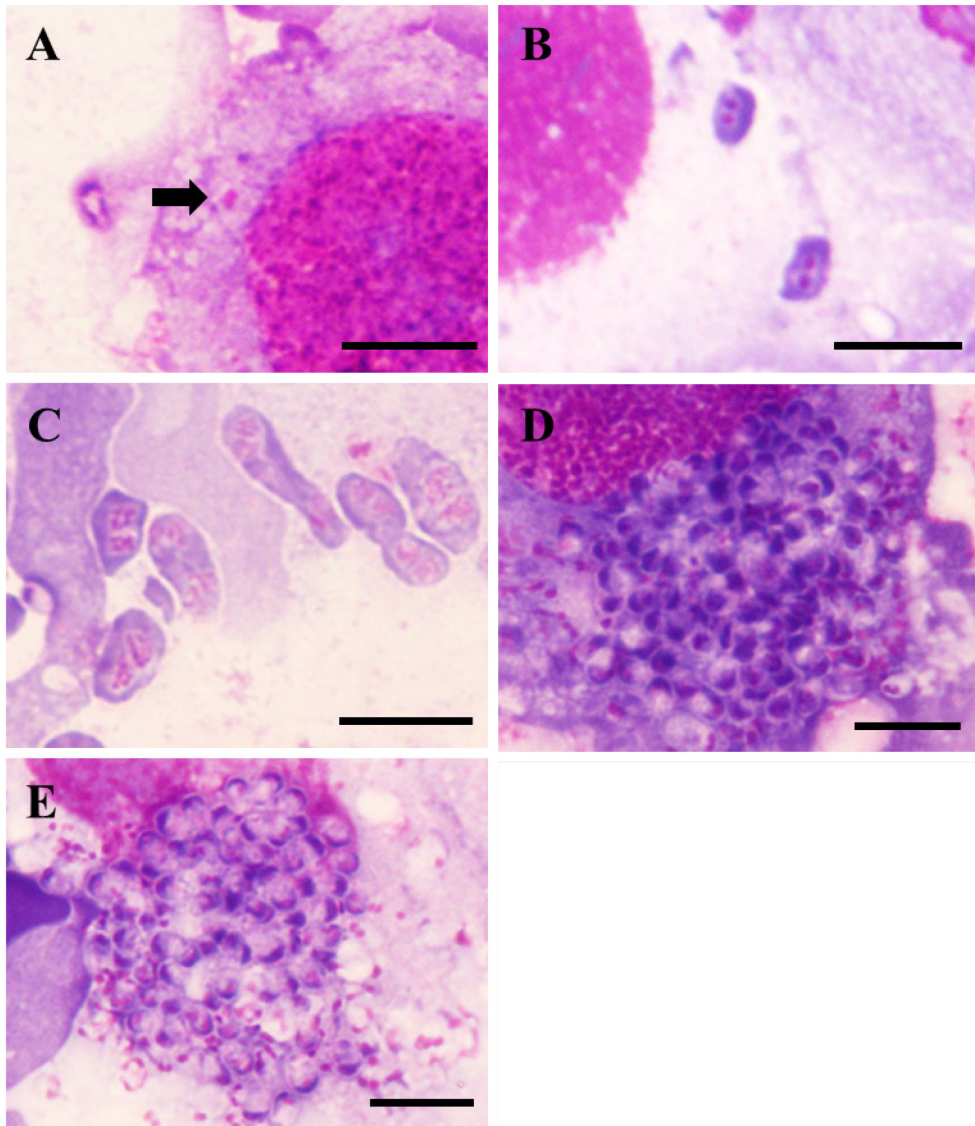
*Nb*-NIS を *Sf*9 細胞に接種した結果、各発育ステージが確認された。接種 12 時間後には既に孢子形成期に移行しており、接種 72 時間以降に孢子が確認された (Table 32)。

観察した発育ステージの例として、栄養繁殖期では接種 12 時間後の標本から 2 核のスポロプラズム (Fig. 19-A)、接種 24 時間後の標本から 2 核のメロント (Fig. 19-B) などがそれぞれ確認された。孢子形成期の発育ステージとして、接種 72 時間後の標本からスポロント (Fig. 19-C)、スポロブラスト (Fig. 19-D)、接種 120 時間後の標本から孢子 (Fig. 19-E) が確認された。なお、パンスポロブラスト膜の形成は確認されなかった。

Table 32 *Nb*-NIS の発育ステージの推移

Time after inoculation (hr)	Growth stage				
	Merogony		Sporogony		
	Sporoplasm	Meront	Sporont	Sporoblast	Spore
12	■	■	■		
24		■	■		
72		■	■	■	■
120		■	■	■	■
168		■	■	■	■
192		■	■	■	■
216		■	■	■	■
240		■	■	■	■
264		■	■	■	■
288		■	■	■	■
312		■	■	■	■
336		■	■	■	■
360		■	■	■	■

経過時間ごとに確認した発育ステージのマス塗りつぶして示した。桃色系で栄養繁殖期 (Merogony)、緑系で孢子形成期 (Sporogony) の発育ステージを示した。



**Fig. 19** *Nb*-NIS の孢子形成様式

A は接種 12 時間後の 2 核のスポロプラズム、B は接種 24 時間後の 2 核のメロント、C は接種 72 時間後のスポロント、D は接種 72 時間後のスポロブラスト、E は接種 120 時間後の孢子を示した。Bar は 10  $\mu$ m を示す。標本は 1,000 倍の倍率で観察した。

## 考察

*Trachipleistophora* 属微胞子虫のタイプ種である *T. hominis* の孢子形成様式 (Hollister *et al.*, 1996) と *Vavraia* 属微胞子虫のタイプ種である *V. culicis* の孢子形成様式 (Weiss and Becnel, 2014) は報告例があるため、本研究の観察結果をこれらと比較することで供試微胞子虫株の属や種の検討を行った。

*Sf9* 細胞に供試微胞子虫 4 株を接種した結果、*T. haruka* において接種 240 時間後まででは栄養繁殖期のみ、接種 264 時間以降では孢子形成期を確認した。*Trachipleistophora* sp. FOA においては接種 72 時間後までは栄養繁殖期のみが観察され、接種 120 時間以降では孢子形成期が確認された。*Vavraia* sp. YGSL では接種 72 時間後までは栄養繁殖期のみが観察され、接種 120 時間以降では孢子形成期への移行が確認された。対照の *Nb-NIS* は接種 12 時間後には既に孢子形成期に移行していた。孢子形成を確認した時間は、*T. haruka* で接種 288 時間後、*Trachipleistophora* sp. FOA で接種 192 時間後、*Vavraia* sp. YGSL で接種 192 時間後、*Nb-NIS* で接種 72 時間後であった (Table 33)。これらの結果より、昆虫感染性微胞子虫の *Trachipleistophora* 属と *Vavraia* 属の供試株は対照の *Nb-NIS* に比べ、孢子形成に長時間を要することが明らかとなった。供試株の中で、最も時間を要したのは *T. haruka* であった。*Trachipleistophora* sp. FOA と *Vavraia* sp. YGSL は *T. haruka* よりも短く、互いに類似した傾向を示した。

Table 33 供試微孢子虫 4 株の孢子形成時間

Strain	Time after inoculation (hr)													
	~	12	24	72	120	168	192	216	240	264	288	312	336	360
<i>Trachipleistophora haruka</i>	~ 240									264 SP				
<i>Trachipleistophora</i> sp. FOA-2014-10	~ 72				120 SP									
<i>Vavraia</i> sp. YGSL-2015-13	~ 24			72 SP										
<i>Nosema bombycis</i> NIS-001	~	12 SP												

桃色の範囲は栄養繁殖期、緑の範囲は孢子形成期を示した。SPは初めに形成された孢子を確認した時間を示した。

標本観察により、*T. haruka* では、スポロプラズム、スポロブラスト、胞子は単核であることを確認した。胞子形成期ではパンスポロブラスト膜の形成を、スポロブラストと胞子の発育ステージではパンスポロブラスト膜内に 8~27 個の胞子形成を確認した (Table 34)。*Trachipleistophora* sp. FOA では、スポロプラズム、スポロント、スポロブラスト、胞子は単核であることを、胞子形成期ではパンスポロブラスト膜の形成を確認した。スポロブラストと胞子の発育ステージではパンスポロブラスト膜内に 7~32 個の胞子形成を確認した (Table 34)。*Trachipleistophora* 属のタイプ種である *T. hominis* の胞子形成様式はパンスポロブラスト膜内に 2~32 個の単核性胞子を形成することとされている (Hollister *et al.*, 1996)。よって、供試微胞子虫 2 株で確認した胞子形成様式は *Trachipleistophora* 属のタイプ種の形成様式に近似していることが明らかになった。*Vavraia* sp. YGSL では、スポロプラズム、スポロント、スポロブラスト、胞子は単核であることを、胞子形成期ではパンスポロブラスト膜の形成を確認した。スポロブラストと胞子の発育ステージではパンスポロブラスト膜内に 16~28 個の胞子形成を確認した (Table 35)。*Vavraia* 属のタイプ種である *V. culicis* の胞子形成様式は、パンスポロブラスト膜内に 8・16・32 個の単核性胞子を形成することとされている (Weiss and Becnel, 2014)。よって、*Vavraia* sp. YGSL で確認した胞子形成様式は *Vavraia* 属のタイプ種に近似していたことが明らかになった。



**Table 34** *Trachipleistophora* 属の観察結果 (総括表)

項目	<i>Trachipleistophora hominis</i>	<i>T. haruka</i>	FOA-2014-10
胞子の核数	単核	単核	単核
形成胞子数(spore)	2~32	8~27	7~32
パンスポロブラスト膜の有無	有	有	有

*Trachipleistophora* 属のタイプ種として *T. hominis* を示した (Hollister *et al.*, 1996)。

**Table 35** *Vavraia* 属の観察結果まとめ (総括表)

項目	<i>Vavraia culicis</i>	YGSL-2015-13
胞子の核数	単核	単核
形成胞子数(spore)	8・16・32	16~28
パンスポロブラスト膜の有無	有	有

*Vavraia* 属のタイプ種として *V. culicis* を示した (Weiss and Becnel, 2014)。

しかし、*T. haruka* では栄養繁殖期において、単核の初期メロントの細胞質が発育せずに 2 核へと核分裂し、その後細胞質を発育させながら 2、4 核へと核分裂していく形成過程と単核の初期メロントが細胞質を発育させながら単核のメロントへと細胞分裂していく形成過程が確認された。細胞分裂した単核メロントはさらに核分裂をする可能性もある。このことから、*T. haruka* の栄養繁殖期（メロント形成）は 2 型ある可能性が示唆された。*Trachipleistophora* 属のタイプ種の *T. hominis* において、栄養繁殖期が 2 型であるという報告例はないため (Hollister *et al.*, 1996)、これは *T. haruka* の特徴であると言える。*Vavraia* sp. YGSL では、パンスポロブラスト膜につつまれた 2 核性のスポロントと膜内に 40 個の胞子を形成した形態が、また、*Trachipleistophora* sp. FOA では、64 核性のスポロブラストがそれぞれ確認された。*Vavraia* 属の胞子形成数は膜内に 8・16・32 胞子と定義されているが、まれに 64 胞子を形成することもある (Weiss and Becnel, 2014)。64 核性のスポロブラストが確認された *Trachipleistophora* sp. FOA は、*Vavraia* 属である可能性も排除できない。このように、タイプ種にはない形態が観察されたことから、供試微胞子虫 3 株は、遺伝子配列解析にて推定された近縁種の別系統である可能性もある。

*Trachipleistophora* 属のタイプ種である *T. hominis* は、*Pleistophora* 属微胞子虫と *Vavraia* 属微胞子虫の形態的特徴の比較により *Trachipleistophora* 属に分類されている (Hollister *et al.*, 1996)。*Vavraia* 属のタイプ種である *V. culicis* は当初 *Pleistophora* 属に分類されていたが、その後、形態的特徴により *Vavraia* 属へと変更されている (Weiser, 1977)。*Trachipleistophora*、*Vavraia*、*Pleistophora* の 3 属は、パンスポロブラスト膜を持つという特徴を有している。特に *Trachipleistophora*、*Vavraia* の 2 属は、形態的にも遺伝子 (SSU rRNA・RPB1) 的にも近似しており分類が難しい (Vávra *et al.*, 2006)。よって、本研究で供試した 3 株の分類についても、今後さらに詳しく生物学的特性や分子生物学的特性を研究することで、*Trachipleistophora* 属、*Vavraia* 属の定義がより明確にできるものと考えられる。

## 総合討論

微胞子虫は微生物農薬としての活用が期待されているが、現在、製剤化されているのは1例のみである。今後活用を期待されている種は数多く存在するが、製剤化への条件を満たすことが難しく未だ微生物農薬として製剤化には至っていない。製剤化への障壁となっている課題のひとつに保存性が挙げられる。一般的に微胞子虫は生理食塩水中で保存されるが、塩は製剤化の際に必要となる化合物との相互作用を起こす可能性がある。そのためには生理食塩水ではなく別の方法で保存可能な微胞子虫の発見が求められる。よって、「Nolo Bait™」に次ぐ2例目の微胞子虫による微生物農薬の開発の糸口を発見するためには、これまでに報告された種のみではなく、詳細な研究が行われていない属種に注目して研究を行い、既知微胞子虫にはない新たな知見を得る必要がある。日本においては大型サイズの微胞子虫の分離例やその特性の調査事例はほとんどない。そこで、本研究では日本国内で分離された大型の胞子サイズを持つ微胞子虫の生物学的特性を複数株精査して比較を行い、属や種の分類学的位置を明らかにし、微生物農薬への活用の可能性を検討するため、孵化特性の調査と細胞接種による胞子形成様式の観察を行った。

*T. haruka*、*Trachipleistophora* sp. FOA、*Vavraia* sp. YGSL の孵化特性を調査した結果、*T. haruka* と *Vavraia* sp. YGSL では 0.1 M KOH (4・25°C)、0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4・25°C) および 0.85% (w/v) NaCl (25°C) 処理で、*Trachipleistophora* sp. FOA では 0.1 M KCl + 3% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4・25°C) と NaCl (25°C) 処理で胞子の孵化が確認された。この結果より、大型微胞子虫3株の孵化特性には、K<sup>+</sup>以外に Na<sup>+</sup>と温度が関係していることが明らかになった。Na<sup>+</sup>が胞子の孵化に関与している微胞子虫の報告例はあるが (Weiss *et al.*, 2014)、生理食塩水のみで孵化する微胞子虫の報告例はない中で、供試微胞子虫3株の胞子は 25°C条件下であれば生理食塩水のみで孵化するという孵化特性を有していた。この点は *Trachipleistophora* 属微胞子虫や他の大型微胞子虫の胞子が活性化する際の特徴にもなる可能性がある。よって、保存には従来の生理食塩水の利用は不適であり、孵化特性調査において他の条件に比べて胞子の孵化が抑えられている傾向にあった蒸留水 (D.W.) を含む、別の保存条件を検討する必要がある。例えば、微生物農薬化を想定した場合、水保存

は利点のひとつになる。また、利点として、安価である、液体の蒸発などによる濃度変化が起らないため安定的に胞子を保存できる、他の物質と混合する際に影響がなく手間がかからない、などが挙げられる。実際に農作物に散布することを想定すると、生理食塩水で保存したものをそのまま使用すると塩害が生じる可能性があるが、水保存であれば全く問題ない。このように製剤化を想定した場合、水保存をはじめとする  $\text{Na}^+$  を含まない保存方法を追究すべきである。加えて、供試した 3 株にはカイコへの感染性も確認された。カイコは家畜化し、飼育が容易で成育コントロールもしやすいため、胞子の大量増殖に向いている。微胞子虫による微生物農薬は、1980 年の「Nolo Bait™」の登録以降、40 年間新規製剤化されていない。本研究で供試した 3 株には、保存性と胞子の生産性の面で世界で 2 例目の製剤として、また、今後の新たな剤の開発に向けた突破口となる可能性がある。

胞子形成様式を観察した結果、大型サイズの 2 属の胞子形成は、*Nosema* 属に比べ長時間を要した。*T. haruka* ではパンスポロプラスト膜に 8 から 27 個の単核性胞子の形成を、*Trachipleistophora* sp. FOA では膜内に 7 から 32 個の単核性胞子の形成を確認した。*Trachipleistophora* 属のタイプ種の *T. hominis* の胞子形成様式は膜内に 2 から 32 個の単核性胞子を形成すると報告されているため、これら 2 株の胞子形成様式はタイプ種と近似していた。*Vavraia* sp. YGSL では膜内に 16 から 28 個の単核性胞子の形成を確認した。*Vavraia* 属のタイプ種の *V. culicis* の胞子形成様式は膜内に 8・16・32 個の単核性胞子すると報告されているため、*Vavraia* sp. YGSL の胞子形成様式もタイプ種のものに近似していた。供試した 3 株いずれも SSU rRNA 遺伝子による系統解析で推定された属のタイプ種に近似していた。しかし、*T. haruka* では 2 パターンのメロント、*Trachipleistophora* sp. FOA では膜内に 64 核のスポロプラスト、*Vavraia* sp. YGSL では 2 核性のスポロントと膜内に 40 個の単核性胞子といった、既知の報告例にはない形態も確認された。これらの結果より、供試した 3 株には遺伝子配列解析にて推定された近縁種とは別系統である可能性もある。*Trachipleistophora*、*Vavraia* の 2 属は、形態的にも遺伝子 (SSU rRNA・RPB1) 的にも近似しており分類が難しいとされている (Vávra *et al.*, 2006)。本論文で行った DNA 配列による系統解析でも、これらの大型微胞子虫と高い類縁関係が示された。よって、本研究に供

試した 3 株の分類においても、不確かな部分が存在した。

本研究により、日本において分離された大型の *Trachipleistophora* 属と *Vavraia* 属の微胞子虫には、25°Cの生理食塩水で孵化するという既知微胞子虫株にはない新規の孵化特性を有していることが明らかとなった。これは、大型の微胞子虫に共通する特性となる可能性がある。現在、製剤化されている *P. locustae* は大型の胞子サイズの微胞子虫で、孵化の際に  $\text{Na}^+$  を必要とする (Whitlock and Johnson, 1990)。よって、大型の微胞子虫孵化特性には  $\text{Na}^+$  が関与していることから、これまでに製剤化に成功した株と同様の傾向を持つ供試株は製剤化できる可能性がある一方、胞子形成様式の観察により、この 3 株には遺伝子配列解析で推定された *Trachipleistophora* 属、*Vavraia* 属の近縁種あるいは他属に類別される可能性も示された。*Trachipleistophora* 属と *Vavraia* 属は、形態的にも遺伝子的にも近似しており、分類が難しいものの、本研究で用いた 3 株が有する新規の孵化特性やユニークな発育ステージが明らかとなったことは、今後の微胞子虫の分類の進展に貢献するものと期待される。

## 摘要

総合的病害虫管理 (IPM) を推進する上で、化学農薬の使用量を低減して効率よく病害虫を防除するための技術として、生物的防除の普及が期待されている。害虫の生物的防除への活用が期待されている微生物のひとつに微胞子虫が挙げられる。微胞子虫は、現在 1,500 種ほど報告されているが、属や種によって異なる特性を有するため、微生物農薬としての利用は進んでいない。特にこれまで微胞子虫を用いた微生物農薬の製剤化の障壁となっている課題の一つに保存条件の問題がある。微胞子虫は一般的に生理食塩水中で保存されるが、塩は製剤化に必要な他の化合物との相互作用を起こしやすい。そのためには、製剤化の課題解決には塩を用いずに保存可能で、今までにない特性を持つ微胞子虫の検出・研究が必要である。そこで、本研究では日本国内で分離された大型微胞子虫に着目し、生物学的特性を複数株精査して比較を行った。

本論文ではまず、*T. haruka*、*Trachipleistophora* sp. FOA、*Vavraia* sp. YGSL の孵化特性を調査した。その結果、大型微胞子虫 3 株の孵化特性には、 $K^+$  以外に  $Na^+$  と温度が関係していることを確認した。 $Na^+$  が孢子の孵化に関与している微胞子虫の報告例はあるが (Weiss *et al.*, 2014)、生理食塩水のみで孵化する微胞子虫の報告例はなく、供試微胞子虫 3 株の孢子は、既知の微胞子虫において報告されていない孵化特性を有することが明らかとなった。この点は *Trachipleistophora* 属微胞子虫や他の大型微胞子虫の孢子が活性化する際の特徴となる従来にはない孵化特性であるため、製剤化を目指す際の問題解決の糸口となるものと期待される。次に、孢子形成様式を観察した結果、大型サイズの *Trachipleistophora* 属および *Vavraia* 属の孢子形成は、*Nosema* 属に比べ長時間を要した。また、いずれも SSU rRNA 遺伝子による系統解析で推定された各属のタイプ種に近似していたが、既知報告にはない発育ステージも観察された。これらの結果より、供試した 3 株は遺伝子配列解析で推定された上記近縁種の別系統である可能性が示唆された。*Trachipleistophora* および *Vavraia* の 2 属は、形態的にも遺伝子的にも近似しており分類が難しいとされている (Vávra *et al.*, 2006)。今後、さらに詳しく生物学的特性や分子生物学的特性を研究することで大型微胞子虫の分類の進展が期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり丁寧なご指導を賜りました、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畠山吉則准教授と岩野秀俊元特任教授に心より感謝と御礼を申し上げます。また、学位申請に際し、査読等でご指導を賜りました、主査の日本大学生物資源科学部生命農学科遺伝育種研究室の山田昌彦教授、副査の日本大学生物資源科学部生命農学科植物医科学研究室の北宜裕教授、日本大学生物資源科学部森林資源科学科森林植物・微生物学研究室の太田祐子教授に深く感謝致します。

また、共同研究者である栗本尚樹氏、荒井怜奈氏、井村祐二氏、研究室で様々な面で助けていただいた応用昆虫科学研究室の方々にも感謝申し上げます。

## 引用文献

- 青木智佐・畠山吉則 (2014) 原虫病. 最新 昆虫病理学 (国見裕久・小林迪弘 編). 講談社, 東京, pp. 71-107.
- Bhat, S. A., I. Bashir and A. S. Kamili (2009) Microsporidiosis of silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae): A review. *Afr. J. Agric. Res.* 4 (13): 1519-1523.
- Bjørnson, S., J. Le, T. Saito and H. Wang (2011) Ultrastructure and molecular characterization of a microsporidium, *Tubulosema hippodamiae*, from the convergent lady beetle, *Hippodamia convergens* Guérin-Méneville. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 280-288.
- Briano, J., L. Calcaterra and L. Varone (2012) Fire ants (*Solenopsis* spp.) and their natural enemies in southern South America. *Psyche* 2012: 198084.
- Canning, E. U. (1962) The pathogenicity of *Nosema locustae* Canning. *J. Insect Pathol.* 4: 257-266.
- De Graaf, D.C., G. Masschelein, F. Vandergeynst, H. F. De Brabander and F. J. Jacobes (1993) *In vitro* germination of *Nosema apis* (Microspora: Nosematidae) spores and its effect on their  $\alpha$   $\alpha$ -trehalose/D-glucose ratio. *J. Invert. Pathol.* 62: 220-225.
- Ewen, A. B. and M. K. Mukerj, (1980) Evaluation of *Nosema locustae* (Microsporidia) as a control agent of grasshopper population in Saskatchewan. *J. Invertebr. Pathol.* 35: 295-303.



FAO (2017) The impact of disasters and crises on agriculture and food security. URL:  
<http://www.fao.org/3/I8656EN/i8656en.pdf>

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.

Field, A. S., D. J. Marriott, S. T. Milliken, B. J. Brew, E. U. Canning, J. G. Kench, P. Darveniza and J. L. Harkness (1996) Myositis associated with a newly described microsporidian, *Trachipleistophora hominis*, in a patient with AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 34: 2803-2811.

Frixione, E., L. Ruiz and A. H. Undeen (1994) Monovalent cations induce microsporidian spore germination *in vitro*. *J. Euk. Microbiol.* 41: 464-468.

Hashimoto, K., Y. Sasaki and K. Takinami (1976) Conditions for extrusion of the polar filament of the spore of *Pleistophora anguillarum*, a microsporidian parasite in *Anguilla japonica*. *Bull. Jpn. Soc. Sic. Fish* 42: 837-845.

Hatakeyama, Y. and S. Hayasaka (2002) Specific amplification of microsporidia DNA fragments using multiprimer PCR. *JARQ.* 36: 97-102.

Hatakeyama, Y., Y. Kawakami, H. Iwano, T. Inoue and R. Ishihara (1997) Analyses and taxonomic inferences of small subunit ribosomal RNA sequences of five microsporidia pathogenic to the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 66: 242-252.

Henry, J. E. and E. A. Oma (1974) Effect of prolonged storage of spores on field applications of *Nosema locustae* (Microsporidia: Nosematidae) against grasshoppers. *J. Invertebr. Pathol.* 23: 371-377.

Hollister, W. S., E. U. Canning, E. Weidner, A. S. Field, J. Kench and D. J. Marriott (1996) Development and ultrastructure of *Trachipleistophora hominis* n.g., n.sp. after *in vitro* isolation from an AIDS patient and inoculation into athymic mice. *Parasitology* 112: 143-154.

Huang, X. and A. Madan (1999) CAP:3 A DNA sequence assembly program. *Genome Res.* 9: 868-877.

石原廉 (1969) 小孢子虫類 (Microsporidia) に関する最近の知見. 日蚕雑 38 (2): 176-183.

Imura, Y., Y. Hatakeyama, M. Takahashi, T. Ohbayashi, S. Mizobe and H. Iwano (2019) A novel approach using microsporidia to estimate the flight route of the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 54: 185-192.

Johnson, D. L. and E. Pavlikova (1986) Reduction of consumption by grasshoppers (Orthoptera: Acrididae) infected with *Nosema locustae* Canning (Microsporidia: Nosematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 48: 232-238.

Kawarabata, T. (2003) Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan. *J. Insect Biotech. Sericol.* 72: 1-32.

Keeling, P. (2009) Five questions about microsporidia. *PLoS Pathog.* 5 (9): e1000489.

Keoghane, E. M. and L. M. Weiss (1998) Characterization and function of the microsporidian polar tube: a review. *Folia Parasitol.* 45: 117-127.

木村・黒田順子・黒田洋一郎・川野仁 (2010) 脳神経系をかく乱する農薬による新たな環境問題—ハチ大量死が私たちに伝えること—. *ファルマシア* 46 (7): 654-658.

国際連合広報センター (2019) 世界人口推計 2019 年版: 要旨 10 の主要な調査結果 (日本語訳). (2019 年 7 月 2 日) URL: [https://www.unic.or.jp/news\\_press/features\\_backgrounds/33798/](https://www.unic.or.jp/news_press/features_backgrounds/33798/)

Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7): 1870-1874.

国見裕久 (2016) 総合的有害生物管理における生物防除資材の利用の現状と課題—日本生物防除議会 (JBCA) の発足に寄せて—. *植物防疫* 70 (9): 626-642.

Larsson, J. I. R. (1986) Ultrastructural investigation of two microsporidia with rod-shaped spores, with descriptions of *Cylindrospora fasciculata* sp. nov. and *Resiomeria odonataegen.* et sp. nov. (Microspora, Thelohaniidae). *Protistologica* 22: 379-398.

Larsson, J. I. R. (1988) On the taxonomy of the genus *Systemostrema* Hazard & Oldacre, 1975 (Microspora, Thelohaniidae), with description of two new species. *Syst. Parasitol.* 11: 3-17.

- Larsson, J. I. R. (1990) On the cytology and taxonomic position of *Nudispora biformis* n. g., n. sp. (Microspora, Thelohaniidae), a microsporidian parasite of the dragon fly *Coenagrion hastulatum* in Sweden. *J. Protozool.* 37: 310-318.
- Larsson, J. I. R. (1999) Identification of microsporidia. *Acta. Protozool.* 38: 161-197.
- Lewis, L. C., D. J. Bruck, J. R. Prasifka and E. S. Raun (2009) *Nosema pyrausta*: Its biology, history, and potential role in a landscape of transgenic insecticidal crops. *Biol. Control* 48: 223-231.
- Lobo, M. L., H. Silveira, S. Ramos, L. Xiao and O. Matos (2006) Characterization of a pathogen related to *Vavraia culicis* detected in a laboratory colony of anopheles stephensi. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: S65-S67.
- Malone, L. A. (1990) In vitro spore hatching of two microsporidia, *Nosema costelytrae* and *Vavraia oncoperae*, from New Zealand pasture insects. *J. Invertebr. Pathol.* 55: 441-443.
- Milner, R. J. (1972) *Nosema whitei*, a microsporidan pathogen of some species of *Tribolium*. I. Morphology, life cycle, and generation time. *J. Invertebr. Pathol.* 19: 231-238.
- 中村純 (2015) ネオニコチノイド系農薬の使用規制でミツバチを救えるか. 日本農薬学会誌 40 (2): 191-198.

日本植物防疫協会 (2008) 病虫害と雑草による農作物の損失. URL:  
[http://www.jppa.or.jp/tecinfo/data/sonsitsu\\_2008.pdf](http://www.jppa.or.jp/tecinfo/data/sonsitsu_2008.pdf)

西本麗 (2019) 農薬産業の世界動向. 日本農薬学会誌 44 (1): 5-14.

農林水産省 (2000) 平成 12 年 食料・農業・農村基本計画. URL:  
[https://www.maff.go.jp/j/keikaku/k\\_aratana/pdf/12\\_keikaku.pdf](https://www.maff.go.jp/j/keikaku/k_aratana/pdf/12_keikaku.pdf)

農林水産省 (2005) 総合的病虫害・雑草管理 (IPM) 実施指針. URL:  
[https://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/gaicyu/g\\_ipm/pdf/byougai\\_tyu.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/gaicyu/g_ipm/pdf/byougai_tyu.pdf)

農林水産省 (2018) 平成 30 年度 食料・農業・農村の動向. URL:  
[https://www.maff.go.jp/j/wpaper/w\\_maff/h30/attach/pdf/zenbun-23.pdf](https://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h30/attach/pdf/zenbun-23.pdf)

Oerke, E.C., H. W. Dehne, F. Schonbeck and A. Weber (1994) *Crop Production and Crop Protection – Estimated losses in major food and cash crops –*. Elsevier., Amsterdam.  
808 pp.

岡田斉夫 (1993) 生物農薬実用化にあたっての問題点. 関東東山病虫害研究会年報 40: 1-5.

大岡高之 (2009) 総合的病虫害・雑草管理 (IPM) への取組. 植物防疫 63 (7): 409-412.

小山純・城所隆 (2003) 水田内のクモ類, アカネ属トンボ幼虫およびユスリカ類 成・幼虫  
に対する水稲初期害虫防除の影響. 北日本病虫研報 54: 123-125.

- Plichuk, S., C. J. Bardi and C. E. Lange (2013) Spore loads of *Paranosema locustae* (Microsporidia) in heavily infected grasshoppers (Orthoptera: Acridoidea) of the Argentine Pampas and Patagonia. *J. Invertebr. Pathol.* 114: 89-91.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-42.
- Shi, W.-P., Shi., Y.-Y. Wang, F. Lv, C. Guo and X. Cheng (2009) Persistence of *Paranosema* (*Nosema*) *locustae* (Microsporidia: Nosematidae) among grasshopper (Orthoptera: Acrididae) populations in the Inner Mongolia Rangeland, China. *BioControl.* 54: 77-84.
- Shigano, T., Y. Hatakeyama, N. Nishimoto, M. Watanabe, Y. Yamamoto, A. Wijonarko, T. Ohbayashi and H. Iwano (2015) Variety and diversity of microsporidia isolated from the common cutworm *Spodoptera litura* in Chichijima, Ogasawara Islands. *J. Insect Biotech. Sricol.* 84: 69-73.
- Sokolova, Y. Y. and C. E. Lange (2002) An ultrastructural study of *Nosema locustae* Canning (Microsporidia) from three species of Acrididae (Orthoptera). *Acta Protozool.* 41: 229-237.
- Solter, L. F., J. J. Becnel and D. H. Oi. (2012) Microsporidian entomopathogens. In *Insect pathology* 2<sup>nd</sup> ed. (F. E. Vega and H. K. Kaya, eds.). Academic Press, London, pp. 221-263.

Sukhacheva, G. A. (1996) Study of the natural diet of adult dragonflies using an immunological method. *Odonatologica* 25 (4): 397-403.

Tanada, Y. and H. K. Kaya (1993) *Insect Pathology*. Academic Press., San Diego. 666 pp.

Tamura, K. (1992) Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687.

Thompson, J. D., D. G. Higgins and T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (22): 4673-4680.

對馬誠也 (2014) 日本における総合防除と IPM: 多様な農業に対応した様々な戦略の必要性. 日植病報 80: 188-196.

Undeen, A. H. (1978) Spore hatching processes in some *Nosema* species with particular reference to *N. algerae* (Vávra and Undeen). In W. M. Brooks. (Eds.) *Selected Topics on the Genus Nosema (Microsporida)*. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 11, 29-49.

Undeen, A. H. (1983) The germination of *Vavraia culicis* spores. *J. Protozool.* 30 (2): 274-277.

Undeen, A. H. (1990) A proposed mechanism for germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *J. theor. Biol.* 142: 223-235.

Undeen, A. H. and S. E. Avery (1984) Germination of experimentally nontransmissible microsporidia. *J. Invertebr. Pathol.* 43: 299–301.

Undeen, A. H. and S. E. Avery (1988) Ammonium chloride inhibition of the germination spores of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 52: 326-334.

Undeen, A. H. and N. D. Epsky (1990) In vitro and vivo germination of *Nosema locustae* (Microspora: Nosematidae) spores. *J. Invertebr. Pathol.* 56: 371–379.

UNFCCC (2018) Protecting Farmers from Climate Impacts Must Become Priority – UN. (2018 年 3 月 16 日) URL: <https://cop23.unfccc.int/news/protecting-farmers-from-climate-impacts-must-become-priority-un>

浦辺研一・池本孝哉・会田忠次郎 (1986) 水田におけるアキアカネ幼虫のシナハマダラカ幼虫に対する天敵としての役割に関する研究. 衛生動物 37 (3): 213-220.

Vávra, J. and J. J. Becnel (2007) *Vavraia culicis* (Weiser, 1947) Weiser, 1977 revisited: cytological characterisation of a *Vavraia culicis*-like microsporidium isolated from mosquitoes in Florida and the establishment of *Vavraia culicis* subsp. *floridensis* subsp. n.. *Folia Parasitol.* 54: 259-271.

Vávra, J., A. Horák, D. Modrý, J. Lukeš and B. Koudela (2006) *Trachipleistophora extenrec* n. sp. a New Microsporidian (Fungi: Microsporidia) Infecting Mammals. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53 (6): 464-476.



Vávra, J., M. Kamler, D. Modrý and B. Koudela (2011) Opportunistic nature of the mammalian microsporidia: experimental transmission of *Trachipleistophora extenrec* (Fungi: Microsporidia) between mammalian and insect hosts. *Parasitol. Res.* 108: 1565-1573.

Vávra, J. and J. Lukeš (2013) Microsporidia and 'The Art of Living Together'. *Adv. Parasitol.* 82: 253-320.

Watts, M. R., R. C. F. Chan, E. Y. L. Cheong, S. Brammah, K. R. Clezy, C. Tong, D. Marriott, C. E. Webb, B. Chacko, V. Tobias, A. C. Outhred, A. S. Field, M. V. Prowse, J. V. Bertouch, D. Stark and S. W. Reddel. (2014) *Anncaliia algerae* microsporidial myositis. *Emerg. Infect. Dis.* 20 (2): 185-191.

Weiser, J. (1977) Contribution to the classification of microsporidia. *Vestn. Cesk. Spol. Zool.* 41: 308-321.

Weiss, L. M. and J. J. Becnel (eds.) (2014) *MICROSPORIDIA pathogens of opportunity*. WILEY Blackwell., UK. 709 pp.

Whitlock, V. H. and S. Johnson (1990) Stimuli for the in Vitro Germination and Inhibition of *Nosema locusta* (Microspora: Nosematidae) Spores. *J. Invert. Pathol.* 56: 57-62.

安永智佐 (1995) 微孢子虫類の生物学的諸性状と害虫防除に向けての問題点. 植物防疫 49 (5):187-191.

吉田重信・對馬誠也 (2019) 植物病害に対する微生物農薬の研究開発における課題と展望.  
化学と生物 51 (8): 541-547.

Yoshiyama, M. and K. Kimura (2011) Distribution of *Nosema ceranae* in the European honeybee, *Apis mellifera* in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* 106: 263-267.