

# 微胞子虫類の生物学的諸性状と害虫防除に向けての問題点

九州大学農学部附属生物的防除研究施設天敵微生物学部門 安 永 智 佐

## はじめに

一般に、原生動物 (Protozoa) の中の微胞子虫門 (Microspora), 微胞子虫綱 (Microsporea) に属するものを微胞子虫類 (microsporidia) と呼んでいる。微胞子虫類はミトコンドリアを持たず、原生動物からヒトに至る様々な動物の偏性細胞内寄生体である。微胞子虫類のリボソームは真核生物に共通な 5.8 SrRNA を欠き、また構造においても真核生物及び原核生物の混合型を示すことから、微胞子虫類は最も原始的な真核生物の一員であると考えられている (ISHIHARA and HAYASHI, 1968; CURGY et al., 1980; VOSSBRINCK et al., 1987)。現在、微胞子虫類は記載種約 530, 未記載種 200 以上の、寄生性原生動物 (原虫) では最大のグループを成しており、その約 4 割が昆虫を宿主としている (SPRAGUE, 1977)。宿主昆虫では鱗翅目昆虫が最も多く、次いで双翅目、鞘翅目、膜翅目、直翅目、半翅目と、様々な昆虫から微胞子虫類は検出されている。

昆虫病原性微胞子虫類の中でも代表的な種として、*Nosema bombycis* (NÄGELI) があげられる。この微胞子虫が引き起こす蚕病は、カイコ幼虫の皮膚にコショウ様の小斑点を現す病徴から、カイコ微粒子病 (フランス語で “pébrine : コショウ”) と呼ばれ、養蚕業上大変恐れられてきた。微粒子病大流行の歴史は 1860 年代フランスにまでさかのぼり、若き化学者パスツールがこの研究に携わったことは有名である。彼は、カイコの感染組織中に観察される微粒子 (corpuscles) が病気の原因となる寄生体であり、次代に経卵巣伝達することを明らかにした。また、微粒子病の予防法として、産卵後の母蛾を鏡検し、corpuscles を含まない蛾の産下卵を養蚕に使用するという母蛾検査法を確立した。現在の蚕種製造においても、この方法を基本とした予防体系が継続されている。

日本において 1960 年ごろまでは、母蛾検査時の検査対象となる微胞子虫胞子は *N. bombycis* のみと考えられていた。しかし、母蛾検査の際に、胞子形態が明らかに *N. bombycis* とは異なる微胞子虫胞子が検出されるよう

になり、母蛾検査上の判定に混乱が生じた。そのため、母蛾から分離された胞子形態に差異の見られる微胞子虫の生物学的諸性状が検討されるようになった (藤原, 1980, 1985; 藤原ら, 1985)。また、野外採集の鱗翅目昆虫からも、*N. bombycis* をはじめとする *Nosema* 属微胞子虫に感染した個体が比較的高い頻度で検出されている (広瀬, 1979 a, b; 阿部・河原畑, 1988; 河原畑ら, 1990; 石原・岩野, 1991)。

ここでは、*Nosema* 属微胞子虫の模式種である *N. bombycis* の *in vitro* における性質を中心に、微胞子虫類の生物学的諸性状について書くことにする。また、それらの性状をもとに、天敵微生物として微胞子虫を害虫防除に利用する上での問題点を述べたい。

## I 微胞子虫胞子の形態、発芽機構、及び発芽生理

微胞子虫胞子は、真核細胞の中で最も小型の、最も複雑な細胞であるといっても過言ではない。感染昆虫を磨砕し、簡単な脱脂綿濾過を行ってその濾液を鏡検すると、組織片や細胞顆粒に混じって屈折率の高い卵形からだ円形をした微胞子虫胞子 (図-1) が観察される。微胞子虫胞子の外側は、タンパク質及びキチン質を含む 3 層の胞子殻に包まれている。胞子表面には特異抗原が存在し、この相違により血清学的手法による微胞子虫胞子の識別・同定も行われている (藤原ら, 1966; 佐藤ら, 1981; HAYASAKA and AYUZAWA, 1987; 三毛ら, 1989;

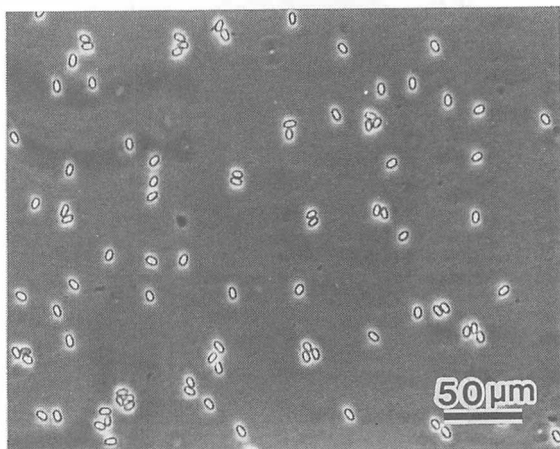


図-1 微胞子虫 *Nosema bombycis* の部分精製胞子

Biological Characteristics of Entomopathogenic Microsporidians and the Potential as Microbial Control Agents for Insect Pests. By Chisa YASUNAGA

KAWARABATA and HAYASAKA, 1987)。小型である(長径3～6  $\mu\text{m}$ , 短径1～3  $\mu\text{m}$ )にもかかわらず、胞子内部には発射装置が備えられており、感染単位である芽体(sporoplasm)を宿主細胞へ命中させるのに素早く適応している。この発射装置は二つの主要な部分、すなわち極膜層と極糸で構成される(図-2)。成熟胞子では、極糸は胞子先端部に極帽に固定され、そこから後方へ伸び、極膜層を通して胞子後端の周縁部でコイル状に巻いている。極膜層は層状構造をとり、胞子が発芽する際に膨張器官として働くとされている。

微胞子虫胞子の発芽機構については、多くの研究報告がなされているが、まだ完全には解明されていない。一般に自然条件下では、宿主昆虫に食下された微胞子虫胞子が中腸内で消化液などの様々な刺激を受け、極膜層や後極胞の膨張などが原因で胞子内圧が高まる結果、極糸が翻転し芽体が出されるという一連の過程を経ると考えられている(福原, 1991; TANADA and KAYA, 1993)。このように、極糸はあたかも注射針の様に宿主細胞(中腸上皮細胞)に突き刺さり、その管腔内を通して芽体が宿主細胞内に注入され感染が成立する。興味深いことに、微胞子虫胞子の構造と発芽機構は、クラゲ、ヒドラといったきょく皮動物の刺胞と驚くほど類似している。

微胞子虫胞子は、宿主昆虫の消化液、アルカリ溶液、過酸化水素水、浸透圧、乾燥等の様々な化学的及び物理的刺激に反応して発芽するが、その刺激となる物質は微胞子虫種や分離株により異なるとされている(UNDEEN,

1990)。カイコ微粒子病原 *N. bombycis* 胞子を *in vitro* で人為的に発芽させる場合、0.2 N KOH 溶液が用いられる(OHISHIMA, 1937)。この溶液を微胞子虫胞子浮遊液に等量混合し、27°Cで40分間処理(プライミング)した後、蒸留水や昆虫細胞培養液に混合して中性の環境に戻すと、90%以上の胞子が発芽する(Ishihara and SOH, 1966; KAWARABATA and Ishihara, 1984; 安永ら, 1992)。このKOH処理法のほかに、ノシメダグラメイガに病原性を示す *Vairimorpha plodiae* 胞子ではEDTA処理法(MALONE, 1984)、及びハマダラカから分離された *N. algerae* 胞子ではKCl処理法(STREET et al., 1980)と、胞子人工発芽法は微胞子虫種によって異なっている。また、様々な人工発芽法に対する胞子の発芽傾向には、微胞子虫種によって顕著な差異が認められており(安永ら, 1992; YASUNAGA et al., 1992)、胞子の発芽生理を微胞子虫を分類する際の基準として採用できる可能性が示唆される。

## II 微胞子虫の生活環

*N. bombycis* の *in vivo* での生活環モデルを図-3に示した。一般に微胞子虫の生活環は複雑である。本来の宿主であるカイコ以外に、ミジンコなどのカイアシ類を中間宿主としてもつ *Amblyospora* 属微胞子虫では、生活環はさらに複雑化している(TANADA and KAYA, 1993)。自然界での微胞子虫による感染には、宿主昆虫が食草と共に微胞子虫胞子を食下することより起こる水平感染と、卵巣を経由して微胞子虫が次代へもたらされる垂直感染がある。

現在、微胞子虫の生活環及びIIIで述べる感染・増殖様

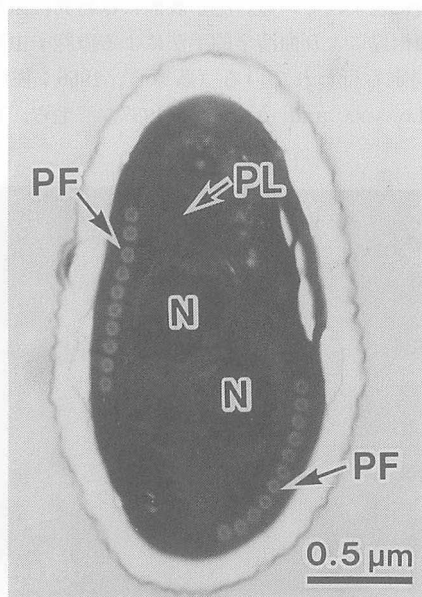


図-2 *Nosema bombycis* 胞子の電子顕微鏡写真  
PF: 極糸, PL: 極膜層, N: 核

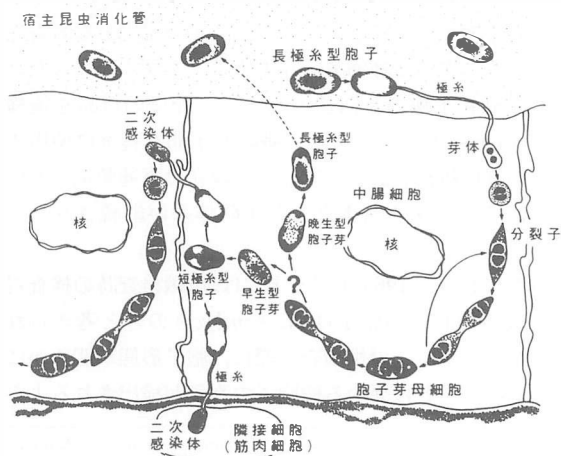


図-3 微胞子虫 *Nosema bombycis* の生活環モデル

式に関する研究は、主に昆虫培養細胞系を用いて行われている。微胞子虫の同調感染は *in vivo* では不可能であるが、*in vitro* では昆虫培養細胞系と微胞子虫の種類に応じた胞子人工発芽法を採用することで同調感染が可能となり、これまでより格段に正確な生活環及び増殖様式を明らかにできる。*in vitro* における微胞子虫の形態、生長、及び増殖に関しては、*in vivo* の場合と顕著な相違は認められていない。代表的な昆虫培養細胞系である鱗翅目ヤマユガ科昆虫由来の *Antheraea eucalypti* 細胞系 (GRACE, 1962) に KOH 処理した *N. bombycis* 胞子を接種し、経時的に採取した感染培養液をギムザ染色塗抹標本にして光学顕微鏡下で観察する。接種1時間後、発芽した胞子から射出された極糸が宿主細胞に突き刺さり、その細胞質中に注入された二核性の芽体 (sporoplasm) が観察される (図-4 A)。胞子接種12時間後、芽体はやや細長い形態の分裂子 (schizont) に生長し (図-4 B)、接種24時間後から無性的な分裂生殖を行う (図-4 C)。数回の二分裂増殖を行った後、分裂子は胞子芽母細胞 (sporont) に分化し (図-4 D)、さらに1回の二分裂により2個の胞子芽 (sporoblast) を産生する (図-4 E)。この胞子芽は現在では早生型胞子芽、また成熟すると短極糸型胞子 (short-coiled spore) と呼ばれ、宿主個体内で細胞から細胞への感染伝播の役割を担う二次感染体

(secondary infective form) の母細胞であると考えられている (IWANO and ISHIIHARA, 1989, 1991)。この原虫細胞も胞子と名のつくとおり I で述べたような構造を有し、二次感染体を隣接する宿主細胞へ注入する。そこで、生活環の早期に観察されることから早生型胞子芽、及び極糸の長さの違いから短極糸型胞子とされている。胞子接種48時間後になると、短極糸型胞子の孵化殻と、新たに宿主細胞に感染した二次感染体が認められるようになる (図-4 F)。二次感染体は芽体の約1/2の時間で分裂子に生長し、芽体と同様の生活環を開始する。一方、胞子接種72時間後ごろから、内部が徐々に染色されてくる原虫細胞の数が増加してくる (図-4 G)。これは早生型胞子芽に対して晩生型胞子芽と呼ばれている。晩生型胞子芽は成熟して、接種6日後には接種源とした胞子、すなわち長極糸型胞子 (long-coiled spore) となり生活環が完結する (図-4 H)。一代代所要時間は微胞子虫種によって異なっている。

以上のように、*N. bombycis* はその生活環中で、短極糸型胞子及び長極糸型胞子の2種類の胞子を産生する。この性質はおそらく *Nosema* 属微胞子虫に普遍的なものと思われる。短極糸型胞子は宿主昆虫個体内で感染を伝播する役割を果たす。一方、長極糸型胞子は宿主細胞が微胞子虫感染により崩壊する際に消化管内に放出され、

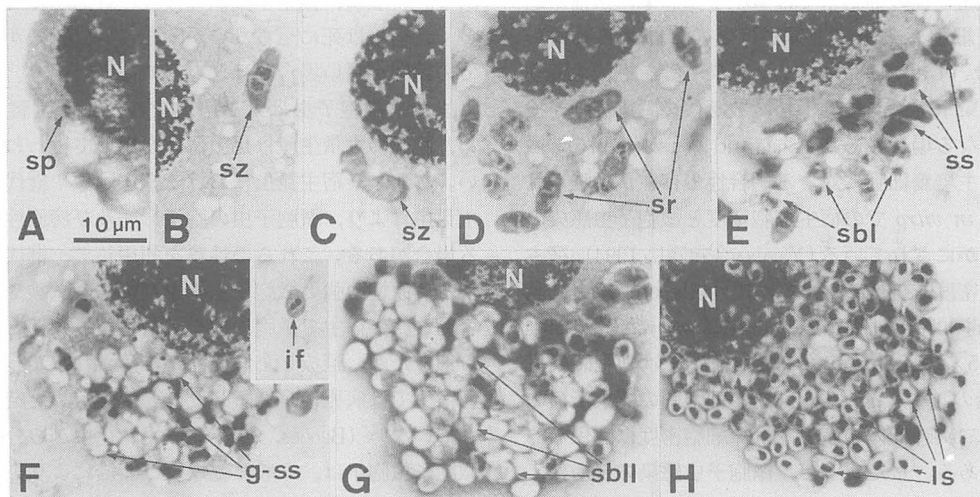


図-4 *Antheraea eucalypti* 細胞系に感染した微胞子虫 *Nosema bombycis*

(A) 胞子接種1時間後の芽体 (sp)、宿主細胞の核 (N) ; (B) 接種12時間後の分裂子 (sz) ; (C) 接種24時間後に観察された分裂子の二分裂増殖像 ; (D) 接種36時間後、胞子芽母細胞 (sr) ; (E) 早生型胞子芽 (sbl) 及び短極糸型胞子 (ss) ; (F) 接種48時間後、短極糸型胞子孵化殻 (g-ss) 及び二次感染体 (if) ; (G) 接種72時間後、晩生型胞子芽 (sblI) ; (H) 接種6日後、長極糸型胞子 (ls)

糞に混じって他個体及び次世代における新たな感染源となる。これら胞子はおのの役割から、極糸の長さ以外にも胞子殻の厚さや発芽機構が異なっている。長極糸型胞子の胞子殻は短極糸型胞子と比べて厚く、また I で述べたように発芽するには何らかの物理化学的刺激を必要とする。これは、感染源として自然界に放出されたとき活性を失わないように、そして宿主が存在しない環境で不用意に発芽しないようにするための防御策と考えることもできる。一方、短極糸型胞子は自発的に発芽するとされ、隣接細胞に極糸を命中させて個体内における感染の伝播に直接関与しているが、感染細胞当たりの形成数は長極糸型胞子よりも少ない。

### III 微胞子虫の感染・増殖様式

KOH 処理した *N. bombycis* 胞子を、胞子：細胞の比が 10:1 となるような条件で *A. eucalypti* 細胞系に接種すると、胞子接種 1 時間後、約 9 割の発芽胞子から放出された芽体により 5% 前後の初期細胞感染率が得られる (安永ら, 1992)。この接種条件では、ほとんどの感染細胞がそれぞれ 1 個の芽体を含む単感染 (single infection) となっている。その後原虫細胞が生長して短極糸型胞子となり、二次感染体が出現し始める胞子接種 48 時間後ごろから細胞感染率は急激な増加傾向を示す。そして胞子接種 7 日後には細胞感染率は約 30% に達する。細胞感染率の推移は微胞子虫と宿主細胞の組合せで変化し、増殖速度が速い種の細胞系では微胞子虫感染の伝播が追いつかず、細胞感染率の上昇がほとんど認められない (KAWARABATA et al., 1989)。また、感染培養を継代するうちに細胞感染率が徐々に低下し、数継代後感染細胞が検出されなくなる場合もあり (SOHI and WILSON, 1976)、微胞子虫の宿主培養細胞に対する適合性の存在が示唆される。さらに、*in vitro* での宿主細胞密度と微胞子虫感染の関係が明らかにされている (YASUNAGA et al., 1994)。宿主昆虫細胞の密度を継代ごとに  $5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> 以上に調整すると、約 20% の細胞感染率で *N. bombycis* 感染が維持され、 $2.5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度では細胞感染率は 10% 前後のレベルを保つ。一方、細胞間の感染伝播の役割を担う二次感染体の産生率は、細胞密度に関係なくほぼ一定である。したがって、微胞子虫感染の伝播は、一感染細胞内に産生された短極糸型胞子の極糸射程圏内に存在する隣接細胞の数と、それら細胞への極糸の命中率に依存していると思われる。

1 個の宿主細胞内に形成される原虫細胞の数は、感染に成功した芽体が分裂子に生長し、それが二分増殖を開始する接種 24 時間後から急激に増加する。*N.*

*bombycis* の場合、胞子接種 96 時間後には、*A. eucalypti* 細胞 1 個当たり約 40 個の原虫細胞が産生される (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; 安永ら, 1991)。原虫細胞産生数と宿主昆虫細胞の大きさ、及びその昆虫細胞系での微胞子虫感染の持続には相関関係は認められない。したがって、微胞子虫の感染・増殖様式は、微胞子虫の宿主細胞適合性により異なると推察される。

### IV 微生物的防除に利用する上での問題点

現在、微生物農薬として登録されている微胞子虫は、アメリカで開発された商品名 Noloc の *Nosema locustae* だけである。トノサマバッタ (*Locusta migratoria*) から分離・記載されたこの微胞子虫は、アメリカ西部の牧草地でバッタ類の防除に利用されている (渡部, 1988)。このほかにも、畑作や果樹の鱗翅目害虫病原性の *Vairimorpha necatrix* や、カに病原性を示す *N. algerae* 及び *Vavraia culicis* で微生物的防除への利用が検討されている (BROOKS, 1988)。微胞子虫は宿主範囲が広く、また自然界では昆虫同士の共食いや小鳥などの捕食者によっても病原体の拡散がみられる。さらに、経卵巣伝達による次代の微胞子虫感染率は場合によってはほぼ 100% に達するなど、微胞子虫の長期的な害虫防除での利用可能性は高いと思われる。

しかし、短期間での害虫防除を目的とした場合、微胞子虫の最大の短所は、その病原性の低さにあると考えられる。一般に、微胞子虫病は慢性の経過をたどる場合が多く、宿主は死に至らないか、あるいは感染から死亡までの期間が長い場合がほとんどである。

また、微胞子虫は人工培地での培養が困難であるため、胞子の大量生産は昆虫個体を用いて行わねばならない。しかし、宿主昆虫における継代回数や継代を行う宿主昆虫により、微胞子虫の胞子形態及び病原性が変化する場合がある。これらの性質を利用して、継代中に出現する病原性の強い微胞子虫株を選抜する試験や、飼育の容易な代替宿主で微胞子虫を大量生産しようとする試みもあったが、選抜した病原性が維持されなかったり、代替宿主では病原性が低下したりと、安定した結果は得られていない (BROOKS, 1977)。また、昆虫から分離された微胞子虫胞子は、一般に乾燥及び凍結により失活することが多い。通常は、蒸留水、生理食塩水、またはリン酸緩衝生理食塩水に胞子浮遊液として冷蔵 (0~10°C) 保存している。しかし、胞子の活性は温度、保存状態、及び保存期間によって変化するため (VÁVRA and MADDOX, 1976)、微胞子虫胞子の保存法は胞子の大量生産と同じく、今後に残された大きな課題である。

さらに、微胞子虫胞子の発芽は特定の物理化学的刺激に反応した極糸の機械的な射出であり、宿主特異性はかなり低いものと思われる。*N. bombycis* は 28°C 培養条件下で、ヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞系で増殖し感染を広めることができる。したがって、広い宿主域をもつということは一方では利点となるが、目的とする害虫だけでなく、カイコなどの益虫にまで影響を及ぼす可能性も否定できない。実際に、シバの主要な害虫であるスジキリヨトウや、ネギの害虫として重要視されているシロイチモジヨトウから、害虫防除因子として有望な病原性の高い微胞子虫が検出されている(岩野, 1987; 石原・岩野, 1991; 安永ら, 1992)。しかし、試験の結果、それらは *N. bombycis* をはじめとするカイコ病原性微胞子虫と同定され、日本など養蚕が行われている国での利用は難しい。

### おわりに

TRAGER (1937) が初めて *N. bombycis* をカイコ卵巣小管の初代培養に感染させることに成功し、また世界初の昆虫培養細胞系 (GRACE, 1962) が樹立されてから後、昆虫病原性微胞子虫に関する研究は宿主昆虫個体だけでなく、昆虫培養細胞系を用いて盛んに行われてきた。しかし、微胞子虫の感染・増殖及び生活環などの基礎的な研究はいまだ十分であるとはいえず、現在の分類基準も見直されるべき段階にきている。したがって、微胞子虫を害虫の微生物的防除に利用し、また一方で蚕病を予防するには、解明すべき諸性状が多く残されており、天敵微生物としての成果を得るためにはさらに長い道のりを経なければならないだろう。特に、*Nosema* 属微胞子虫類の種レベルでの明確な分類は、カイコ微粒子病との関係からも重要であり、また微胞子虫の種内及び種間変異についても詳細な検討が必要とされる。

自然界において微胞子虫は、ある種の昆虫の密度を制御する要因となっており、昆虫の自然個体群での微胞子虫病の発生はかなり普遍的な現象であると推測される。今後、微胞子虫の微生物的防除因子としての可能性については、長期的展望で害虫防除に利用する方向で再検討していくことが望まれる。

### 引用文献

1) 阿部芳彦・河原畑 勇 (1988): 日蚕雑 57: 147~150.

- 2) BROOKS, W. M. (1988): CRC Handbook of Natural Pesticides, Vol. V, Part A (C. W. Ignoffo, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 13~149.
- 3) CURGY, J. -J. et al. (1980): Biol. Cell. 38: 49~51.
- 4) 藤原 公ら (1966): 蚕糸研究 58: 14~19.
- 5) ——— (1980): 日蚕雑 49: 229~236.
- 6) ——— (1985): 同上 54: 108~111.
- 7) ———ら (1985): 同上 54: 117~121.
- 8) 福原敏彦 (1991): 昆虫病理学, 学会出版センター, 東京, 234 pp.
- 9) GRACE, T. D. C. (1962): Nature 195: 788~789.
- 10) HAYASAKA S. and C. AYUZAWA (1987): J. Seric. Sci. Jpn. 56: 169~170.
- 11) 広瀬安春 (1979 a): 蚕糸研究 111: 118~123.
- 12) ——— (1979 b): 同上 112: 275~279.
- 13) ISHIHARA R. and S. S. SOHI (1966): J. Invertebr. Pathol. 8: 538~540.
- 14) ISHIHARA, R. and Y. HAYASHI (1968): J. Invertebr. Pathol. 11: 377~385.
- 15) 石原 廉・岩野秀俊 (1991): 日蚕雑 60: 236~237.
- 16) 岩野秀俊 (1987): 応動昆 31: 321~327.
- 17) IWANO, H. and R. ISHIHARA (1989): J. Invertebr. Pathol. 54: 125~127.
- 18) ——— (1990): J. Invertebr. Pathol. 57: 211~219.
- 19) KAWARABATA, T. and R. ISHIHARA (1984): J. Invertebr. Pathol. 44: 52~62.
- 20) ——— and S. HAYASAKA (1987): J. Invertebr. Pathol. 50: 118~123.
- 21) KAWARABATA, T. et al. (1989): Invertebrate Cell System Applications, Vol. II (J. MITSUHASHI, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 69~74.
- 22) 河原畑 勇ら (1990): 日蚕雑 59: 288~292.
- 23) MALONE, A. L. (1984): J. Invertebr. Pathol. 44: 192~197.
- 24) 三毛明人ら (1989): 日蚕雑 58: 392~395.
- 25) OHSHIMA, K. (1937): Parasitology 29: 220~224.
- 26) 佐藤令一ら (1981): 日蚕雑 50: 180~184.
- 27) SOHI, S. S. and G. G. WILSON (1976): Can. J. Zool. 54: 336~342.
- 28) SPRAGUE, V. et al. (1977): Comparative Pathology, Vol. 2 (L. A. BULLA, Jr. and T. C. CHENG, eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 31~334.
- 29) STREETT, A. D. et al. (1980): J. Protozool. 27: 113~117.
- 30) TANADA, Y. and H. K. KAYA (1993): Insect Pathology, Academic Press, San Diego, 414~458.
- 31) TRAGER, W. (1937): J. Parasitol. 23: 226~227.
- 32) UNDEEN, A. H. (1991): J. Theor. Biol. 142: 223~235.
- 33) VÁVRA, J. and J. V. MADDOX (1976): Comparative Pathology, Vol. 1 (L. A. BULLA Jr. and T. C. CHENG, eds.), Plenum Press, New York and London, pp. 298~300.
- 34) VOSSBRINCK, et al. (1987): Nature 326: 411~414.
- 35) 渡部 仁 (1988): 微生物で害虫を防ぐ, 裳華房, 東京, pp. 163.
- 36) YASUNAGA, C. et al. (1992): J. Invertebr. Pathol. 60: 109~110.
- 37) ——— et al. (1994): J. Euk. Microbiol. 41: 133~137.
- 38) 安永智佐ら (1992): 応動昆 36: 127~134.