シロイチモジヨトウ幼虫から分離された微胞子虫 *Nosema bombycis* (Microsporida: Nosematidae)

安永智佐*・舟越正子*・河原畑勇*

荒武義信**・岩野秀俊***

* 九州大学農学部

** 熊本県農業研究センター

*** 日本大学農獣医学部

Isolation and Characterization of *Nosema bombycis* (Microsporida: Nosematidae) from Larvae of Beet Armyworm, *Spodoptera exigua*. Chisa YASUNAGA, Masako FUNAKOSHI, Takeshi KAWARABATA (Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan), Yoshinobu ARATAKE (Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center, 3801 Sakae, Koshimachi, Kikuchi-gun, Kumamoto 861-11, Japan) and Hidetoshi IWANO (Faculty of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **36**: 127-134 (1992)

A microsporidian infection causing high mortality levels was found in the larvae of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* reared on an artificial diet. Dead larvae contained a large number of microsporidian spores with a similar morphology to that of *Nosema bombycis* NIS 001. The microsporidian from *S. exigua*, designated *N. sp.* Y9101, was transmitted to the next generation of *S. exigua* via eggs. The rate of spore germination under various stimulated conditions was similar between *N. sp.* Y9101 and *N. bombycis* NIS 001. When studied by the latex adhesion test using latex particles sensitized with various species of monoclonal and polyclonal antibodies, spores of *N. sp.* Y9101 reacted with latex particles sensitized with antibodies against *N. bombycis* NIS 001 spores. Growth and development of *N. sp.* Y9101 and *N. bombycis* NIS 001 in *Antheraea eucalypti* cell cultures seemed similar. On the basis these data, *N. sp.* Y9101 was determined to be a strain of *N. bombycis*.

Key words: *Nosema bombycis*, *Spodoptera exigua*, spore germination, *Antheraea eucalypti* cell culture, lates agglutination test

緒 言

シロイチモジヨトウ *Spodoptera exigua* (HÜBNER) は、1980年代前半から高知および鹿児島県内でネギの主要な害虫として問題化した。その後西日本を中心に本種の発生および被害が拡大し、現在では被害作物も広範囲に及んでいる(河合, 1991)。シロイチモジヨトウには比較的高い薬剤抵抗性があり、薬剤中心の防除はやや困難なので(高井, 1991)、防除にはフェロモン剤等を利用した技術が実用化されている(WAKAMURA et al., 1989; 若村・高井, 1990)。

1991年熊本県農業研究センターで飼育中のシロイチモジヨトウ病死幼虫から微胞子虫胞子が検出され、シロ

イチモジヨトウ幼虫に強い病原性を示すことが確認された。本研究は、このシロイチモジヨトウ病原性微胞子虫の天敵微生物としての利用の可能性も含め、その生物学的性状および血清学的性状を明らかにすることを目的としている。

本研究では、シロイチモジヨトウ幼虫から分離された微胞子虫を、カイコ微粒子病原 *Nosema bombycis* の標準株 NIS 001 と、生物学的性状および胞子表面抗原の血清学的性状などについて比較検討し、*N. bombycis* の一分離株と同定した。

本文に先立ち、*Nosema bombycis* NIS 001 胞子を分与していただいた蚕糸・昆虫農業技術研究所・早坂昭二博士に厚くお礼申し上げる。

1991年12月17日受領 (Received December 17, 1991)

1992年2月4日登載決定 (Accepted February 4, 1992)

材料および方法

1. 微胞子虫胞子

熊本県農業研究センターで人工飼料育中に病死したシロイチモジヨトウ 5 齢幼虫をリン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) 中で磨砕し、脱脂綿で濾過後、分画遠心 (3,000 rpm, 5 分沈殿) を反復して微胞子虫胞子を部分精製した。この微胞子虫分離株を *Nosema* sp. Y9101 とした。また、対照として蚕糸・昆虫農業技術研究所早坂昭二博士より分与を受けた同研究所保存株, *Nosema bombycis* NIS 001 胞子を供試した。

微胞子虫胞子の精製は Percoll 密度勾配遠心法 (佐藤・渡部, 1980) を一部改変して行った。Spinco 60Ti ローターで 22,000 rpm, 6°C, 20 分間遠心して形成した 80% (w/w) Percoll 密度勾配上に胞子浮遊液を重層し, 3,000 rpm, 25°C, 10 分遠心して精製胞子を調製した。

2. 宿主昆虫接種試験

N sp. Y9101 胞子浮遊液 (10^8 胞子/ml) を人工飼料上に滴下後、カイコ孵化幼虫 (供試品種: 芙蓉×東海) または 2 齢幼虫 20 頭に 25°C, 48 時間食下させて接種した。

シロイチモジヨトウ 終齢幼虫に *N* sp. Y9101 胞子浮遊液 (10^8 胞子/ml) を人工飼料上に滴下後、終齢幼虫 50 頭に 25°C, 48 時間食下させて接種した。接種区のシロイチモジヨトウ成虫が産卵した卵塊から孵化した幼虫 30 頭を人工飼料を用いて個体別飼育したところ、幼虫の生長に停止が認められたので、接種 1 週間後の時点で幼虫を個体別に磨砕し鏡検した。

3. 胞子サイズの測定

精製胞子を 0.1% プロタミン (Sigma) でコーティングした後、イメージシリング測定顕微鏡 (Vickers-ユニオン光学) を使用し、倍率 400 倍で胞子 ($n=50$) の長径と短径を計測した。

4. 微胞子虫胞子の発芽処理および昆虫培養細胞系への接種

培養細胞は、鱗翅目昆虫由来の *Antheraea eucalypti* 細胞 (GRACE, 1962) を供試した。培養条件は 27°C で、10% ウシ胎児血清を添加した Grace 培地 (GRACE, 1962) で培養した。

微胞子虫胞子の人工発芽には、苛性カリ処理法 (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984), 塩化カリ処理法 (STREETT et al., 1980), および EDTA 処理法 (MALONE, 1984) を採用した。微胞子虫胞子浮遊液 (約 1×10^8 胞子/ml) に各処理液を等量加え、27°C で 30 分処理後、*A. eucalypti* 細胞浮遊液と混合して接種した。微胞子虫胞

子と昆虫培養細胞の比は 10 : 1 とした。胞子・細胞混合液を 3 分間室温で攪拌後、27°C に 1 時間静置した。接種 1 時間後、胞子・細胞混合液の一部をサンプルとして採取し、胞子発芽率を測定した。つづいて胞子・細胞混合液を 24 穴マルチウェルプレート (Falcon 3047) に分注 (0.5 ml/well) し、27°C で 1 時間インキュベートした。マルチウェルプレートを 27°C, 2,000 rpm, 10 分間遠心し、上清を 10% ウシ胎児血清および抗生物質 (最終濃度ペニシリン 200 単位/ml; ストレプトマイシン 200 μ g/ml) を添加した Grace 培地と交換して 27°C で培養した。所定時間にサンプリングを行い、採取したサンプルを塗抹標本にしてギムザ染色後、光学顕微鏡で観察した。

5. モノクローナル抗体感作ラテックス

N. bombycis NIS 001, *Nosema* sp. NIS M11, および *Vairimorpha* sp. NIS M12 胞子に対するモノクローナル抗体感作ラテックス・キット (三毛ら, 1988, 1989) は、ヤクルト (株) より購入した。

6. ポリクローナル抗体感作ラテックス

抗 *N. bombycis* NIS 001 胞子血清の調製は、精製胞子を苛性カリ処理 (0.2 N KOH, 27°C, 30 分) した後、1% ホルマリン固定 (4°C, 18 時間) し抗原 (5×10^8 胞子/ml) とした。各精製胞子 1 ml を 1 週間間隔で 5 回家兔に静脈注射し、最終免疫の 1 週間後に全採血して抗血清を調製した。

ウサギ IgG は CLARK and ADAMS (1977) の方法を一部改変して精製した。抗 *N. bombycis* NIS 001 胞子血清 2 ml を蒸留水 18 ml と混合した後、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 飽和溶液 20 ml を加え、氷冷下で 60 分間放置した。塩析後 Spinco 60 Ti ローターで 15,000 rpm, 15 分遠心し、沈殿を PBS (pH 7.2) 4 ml に溶解した。Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィー (NAPTM-25 Column, Pharmacia) で脱塩後、DEAE セルロースカラムクロマトグラフィー (DE52, Whatman) により IgG 分画を回収した。

ラテックス粒子の感作は SHIMIZU et al. (1983) の方法を一部改変して行った。ラテックス粒子浮遊液 (Difco, $\phi=0.81, \mu\text{m}$) 1 ml と IgG 溶液 (1 mg/ml) 1 ml を L 字管中で混合し、30°C で 30 分ゆるやかに攪拌した。混合液に 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 8.2) を 3 ml 加え、30°C, 30 分ゆるやかに攪拌した。さらに 1% ウシ血清アルブミン (BSA: Armour) 添加 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 8.2) を加えてブロッキングした。感作終了後、0.05% Tween 80 添加グリシン緩衝液でラテックス粒子

を遠心 (3,000 rpm, 30 分) 洗浄した。最終的に、感作ラテックスを 1% BSA, 0.05% Tween 80, および 0.1% NaN_3 を含む 0.1 M グリシン緩衝液 (pH 8.2) に浮遊させた。各ポリクローナル抗体感作ラテックス浮遊液は 4°C で保存した。

7. ラテックス凝集試験

胞子および抗体感作ラテックス浮遊液をスライドグラス上で等量混合し、室温で 30 分反応させた後、位相差顕微鏡で鏡検して判定した。

結 果

1. 胞子形態

シロイチモジヨトウ幼虫の微胞子虫感染組織を鏡検したところ、pansporoblast は観察されなかった。また、幼虫感染像および胞子形態がカイコ微粒子病病原 *Nosema bombycis* と類似していたので、*Nosema* 属微胞子虫による感染と判断した。

シロイチモジヨトウから分離された微胞子虫 *Nosema* sp. Y9101 およびカイコ微粒子病病原 *Nosema bombycis* NIS 001 の精製胞子 50 個の長径、短径について測定した結果、胞子の長径には両分離株間で有意差が認められなかった。一方、胞子の短径には両分離株間で差異が認められた (Table 1)。

2. 胞子人工発芽法と胞子発芽率

N. sp. Y9101 胞子および *N. bombycis* NIS 001 胞子を苛性カリ、塩化カリおよび EDTA で処理し、各処理区の胞子発芽率を比較した (Table 2)。

苛性カリ処理では、両分離株とも 80% 以上の高い胞子発芽率が得られた。一方、塩化カリおよび EDTA 処理では、両分離株とも胞子発芽率は 4% 以下であった。人工発芽処理による胞子発芽率は、両分離株とも同様の傾向を示した。

3. *Nosema* sp. Y9101 の宿主昆虫に対する病原性

N. sp. Y9101 胞子浮遊液 (10^8 胞子/ml) を人工飼料上に滴下後、カイコ孵化幼虫または 2 齢幼虫 20 頭に 25°C, 48 時間食下させて接種した。孵化幼虫接種区では 3 齢までに、2 齢接種区では 4 齢までに全幼虫が微胞子虫感染により死亡した。

同様に、*N. sp.* Y9101 胞子浮遊液 (10^8 胞子/ml) を人工飼料上に滴下後、シロイチモジヨトウ終齢幼虫 50 頭に 25°C, 48 時間食下させて接種した。一部の幼虫は蛹化時または羽化時に死亡したが、羽化した成虫は正常に交尾産卵した。接種区の成虫が産卵した卵塊から孵化した幼虫 30 頭を人工飼料育てて個体育した。接種区の幼虫

Table 1. Spore size measurements of *Nosema* isolates

<i>Nosema</i> isolates	Length (μm)	Width (μm)
<i>N. sp.</i> Y9101	3.64 ± 0.16	2.18 ± 0.10
<i>N. bombycis</i> NIS 001	3.64 ± 0.14	2.29 ± 0.12
F	0.73 ($p < 0.01$)	26.31 ($p > 0.01$)

Measurement was made using an image shearing microscope (Vickers-Union Kougaku). Fifty fresh spores of each strain were examined.

Table 2. Comparison of spore germination rates between *Nosema* isolates

<i>Nosema</i> isolates	Exp. no.	Treatments		
		KOH	KCl	EDTA
<i>Nosema</i> sp. Y9101	1	81.8	1.9	1.3
	2	89.8	1.4	2.5
	3	91.0	2.0	2.2
<i>Nosema bombycis</i> NIS 001	1	93.3	2.1	1.8
	2	92.7	4.1	2.2
	3	87.2	2.2	3.2
χ^2		19.6 ($p < 0.01$)	7.2 ($p < 0.01$)	1.1 ($p > 0.01$)

は 1 週間経過しても 2 齢に生長しなかったもので、幼虫を個体別に磨砕して鏡検したところ、鏡検した幼虫全部に微胞子虫胞子が多数観察された。

4. *Nosema* sp. Y9101 の昆虫培養細胞系での感染および増殖様式

N. sp. Y9101 および *N. bombycis* NIS 001 の精製胞子を用いて、苛性カリ処理法でそれぞれ *A. eucalypti* 細胞に接種し、*A. eucalypti* 細胞における両微胞子虫分離株の増殖様式を経時的に比較した (Fig. 1)。両分離株接種区とも、接種 24 時間後から原虫細胞の二分裂による増殖が開始した。感染細胞における原虫細胞数の増加は、接種 96 時間後まで継続した。一方、二次感染体由来する第二世代の原虫細胞は、接種 48 時間後から新たに感染した宿主細胞内に認められた。

N. sp. Y9101 および *N. bombycis* NIS 001 を接種した *A. eucalypti* 細胞における細胞感染率の経時的变化を調査した (Fig. 2)。接種 1 時間後の初期感染率は両接種区ともに約 3~6% であった。接種 24 時間後まで細胞感染率の変動がややみられたが、その後細胞感染率は次第に増加し、接種 7 日後には約 30% に達した。両分離株間の接種後の各時間における感染率には、多少の相違が認められたが、基本的なパターンは両者とも同様であった。

また、*A. eucalypti* 細胞に感染した *N. sp.* Y9101 および *N. bombycis* NIS 001 の生活環境に出現した原虫細胞の種類および出現時期についても比較した。接種 1 時間

Fig. 1. Growth of *Nosema* sp. Y9101 and *N. bombycis* NIS 001 in *Antheraea eucalypti* cells *in vitro*. The vertical lines represent the standard deviation from three determinations.

Fig. 2. Spread of *Nosema* sp. Y9101 and *N. bombycis* NIS 001 infections in *Antheraea eucalypti* cell cultures. The vertical lines represent the standard deviation from three determinations.

後の原虫細胞の90%以上が二核性のスポロプラズムで、宿主細胞の細胞質中に侵入しているのが観察された。接種12時間後の原虫細胞は、やや細長い形態の二核性シズントに生長し、接種24時間後から二分分裂による二核性シズントの増殖像が観察された (Fig. 3-1)。接種36時間後には高屈折率の小球をもつスポロントが認められ、スポロントは二分分裂して2個のスポロプラストを形成した。この発育時期のスポロプラストは全体的にギムザで赤色に濃染され、原虫細胞内部の観察は困難であった (Fig. 3-2)。接種後約48時間から二次感染体および内部が中空状のスポロプラストが観察された。二次感染体は約8時間でシズントに生長し、二分分裂による増殖を開始した。接種72時間後には、一部のスポロプラストで内

部が徐々に染色されるようになり (Fig. 3-3)、少数の感染細胞では接種96時間後に、すでに成熟胞子の形成が確認された (Fig. 3-4)。 *A. eucalypti* 細胞に感染した *N. sp. Y9101* および *N. bombycis* NIS 001 の生活環中に出現した原虫細胞の種類および出現時期は明瞭な差異が認められなかった。

5. *Nosema* sp. Y9101 胞子表面抗原のラテックス凝集法による比較

N. sp. Y9101 胞子および *N. bombycis* NIS 001 精製胞子を抗原として、モノクローナル抗体感作ラテックスおよびポリクローナル抗体感作ラテックスによる凝集試験を行い、胞子表面抗原について比較した。

N. sp. Y9101 胞子は、シロイチモジヨトウ幼虫から回

Fig. 3. Life cycle of *Nosema* sp. Y9101 in *Antheraea eucalypti* cells *in vitro*. (1) Schizonts (SZ) of *N. sp.* Y9101 24-h postinoculation, N, host cell nucleus, (2) Formation of short-coiled spores (SS) 48-h postinoculation, (3) Germinated short-coiled spores (g-SS) and developing long-coiled spores (LS) 72-h postinoculation, (4) Formation of long-coiled spores (LS) 96-h postinoculation.

Table 3. Monoclonal antibody-sensitized latex agglutination test of *Nosema* isolates

<i>Nosema</i> isolates	Monoclonal antibodies ¹⁾		
	<i>Nosema bombycis</i> NIS 001	<i>Nosema</i> sp. NIS M11	<i>Vairimorpha</i> sp. NIS M12
<i>N. sp.</i> Y9101 (Insect host)	+	—	—
<i>N. sp.</i> Y9101 (Cell culture)	+	—	—
<i>N. bombycis</i> NIS 001	+	—	—

¹⁾ Yakult (Tokyo, Japan): Pebrine assay kit.

収した場合も、*A. eucalypti* 細胞から回収した場合も、抗 *N. bombycis* NIS 001 胞子モノクローナル抗体感作ラテックスと強く反応したが、抗 *N. sp.* NIS M11 胞子および *V. sp.* NIS M12 胞子モノクローナル抗体感作ラテックスとの反応は陰性であった (Table 3)。

N. sp. Y9101 胞子および *N. bombycis* NIS 001 精製胞子を抗原として、ポリクローナル抗体感作ラテックスに

Table 4. Polyclonal antibody-sensitized latex agglutination test of *Nosema* isolates

<i>Nosema</i> isolates	Polyclonal antibodies		
	<i>Nosema bombycis</i> NIS 001	<i>Nosema</i> sp. NIS M11	<i>Vairimorpha</i> sp. NIS M12
<i>N. sp.</i> Y9101 (Insect host)	+	±	—
<i>N. sp.</i> Y9101 (Cell culture)	+	±	—
<i>N. bombycis</i> NIS 001	+	±	—

よる凝集試験を行った (Table 4)。シロイチモジヨトウ幼虫由来および *A. eucalypti* 細胞由来の *N. sp.* Y9101 精製胞子はいずれも、抗 *N. bombycis* NIS 001 胞子抗体感作ラテックスとは強く反応したが、抗 *N. sp.* NIS M11 胞子抗体感作ラテックスに対しては弱い凝集反応を示したにすぎなかった。抗 *N. sp.* NIS M11 胞子抗体感作ラテックスに対する同程度の弱い凝集反応は、対照抗原と

した *N. bombycis* NIS 001 胞子を用いた場合にも認められた。

一方、抗 *V. sp.* NIS M12 胞子ポリクローナル抗体感作ラテックスに対する *N. bombycis* NIS 001 精製胞子およびシロイチモジヨトウ幼虫ならびに *A. eucalypti* 細胞由来の *N. sp.* Y9101 精製胞子の凝集反応はいずれも陰性であった。

考 察

本研究でシロイチモジヨトウが、わが国においてカイコ微粒子病病原 *N. bombycis* の自然界における一宿主となっていることが確認された。*N. bombycis* は、わが国では野外採集のモンシロチョウおよびスジキリヨトウ成虫から分離され(阿部・河原畑, 1988; 河原畑ら, 1990; 岩野・石原, 1991), カイコ微粒子病の発生源としての野外昆虫の役割が改めて問題となってきた。野外採集の鱗翅目昆虫成虫からは、*Nosema* 属微胞子虫に感染した個体が比較的高い頻度で鏡検により検出されるので(広瀬, 1979a, b; 阿部・河原畑, 1988; 河原畑ら, 1990; 岩野・石原, 1984, 1991), 鱗翅目昆虫における微胞子虫病の発生は普遍的現象であると考えられる。

カイコおよびその他の鱗翅目昆虫から検出された微胞子虫の同定には、主として胞子の形態学的形質が使用され、場合によっては病原性、感受性組織、宿主範囲、経卵巣伝達の有無などの生物学的性状も考慮されてきた(藤原, 1969, 1980, 1984a, b, 1985; 藤原ら, 1985; 広瀬, 1971, 1977, 1979a, b, c; 広瀬・上田, 1967)。

シロイチモジヨトウから分離された *N. sp.* Y9101 と *N. bombycis* NIS 001 胞子の長径および短径の測定結果はきわめて類似していた。短径で認められた多少の差異は、*N. bombycis* NIS 001 からクローニングにより得られた各クローンが産生する胞子間でも認められるので(HAYASAKA and KAWARABATA, 1990), 種内変異の範囲に属する差異と判断される。また、微胞子虫胞子は継代宿主により、病原性および胞子形態が変化する場合があるが(広瀬・上田, 1979), このような場合にも胞子形態の変化は連続的で、継代宿主に起因するにしても、種内変異の範囲に留まっている可能性が高い。多くの場合、微胞子虫胞子のみを材料に種の同定がなされているが、*Nosema* 属微胞子虫においては、胞子の形態学的形質のみでは種の同定はほとんど不可能に近いと考えられる。

また、微胞子虫胞子は宿主の消化液、アルカリ処理、過酸化水素処理、浸透圧、乾燥等のさまざまな化学および物理的刺激に反応して発芽するが、その刺激となる物

質は微胞子虫種および分離株により異なるとされる(UNDEEN, 1990)。本研究では初めて、*N. sp.* Y9101 および *N. bombycis* NIS 001 胞子の人工発芽法による発芽率比較試験を行い、微胞子虫胞子の発芽生理的性状が分類学的形質になりうるかどうかの可能性を検討した。両分離株ともに苛性カリ処理で高い発芽率が得られ、塩化カリおよび EDTA 処理ではほとんど発芽しなかった。一方、カイコに対する病原性の差異で *N. bombycis* とは別種とされる *Nosema sp.* NIS M11 の胞子では、苛性カリ処理による発芽率は EDTA 処理の場合より約 7 倍低くなっている(YASUNAGA et al., unpublished)。また、*Nosema algerae* では、中性付近における塩化カリ処理で高い胞子発芽率が得られているが(UNDEEN and AVERY, 1988), *N. bombycis* はこの条件ではほとんど発芽しない。

本研究では *N. bombycis* 分離株間には共通する発芽生理上の性質が認められ、*N. sp.* NIS M11 および *N. algerae* グループとは明瞭に異なっているため、微胞子虫胞子の発芽生理的性状が分類学的形質になりうる可能性は高いと推察される。今後、微胞子虫の種、属および科レベルのグルーピングを行う上で、胞子発芽の生理学的性状の検討の必要性が増加すると考えられる。

鱗翅目ヤママユガ科昆虫由来の *A. eucalypti* 細胞(GRACE, 1962)における *N. bombycis* NIS 001 の感染増殖様式および生活環に関しては、これまでいくつかの報告がある(KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; KAWARABATA and HAYASAKA, 1987; KAWARABATA et al., 1989)。*N. sp.* Y9101 の胞子形成様式は *Nosema* 属に典型的な二胞子型(CALI, 1971)で、*A. eucalypti* 細胞系における生活環中に出現した原虫細胞の種類および出現時期についても、*N. bombycis* NIS 001 との差異は認められなかった。また、*N. sp.* Y9101 の宿主としての *A. eucalypti* 細胞系との適合性を検討した結果、*A. eucalypti* 細胞系における *N. sp.* Y9101 の感染の伝播および増殖様式は *N. bombycis* NIS 001 の場合と完全に一致していた。また、*N. sp.* Y9101 の *A. eucalypti* 細胞系における感染と増殖は 20 代以上継代後も安定して継続し、*N. bombycis* NIS 001 の場合と同様、持続感染細胞系が樹立された。

一般に、昆虫培養細胞系の微胞子虫研究への利用は、この系では同調感染が可能で詳細な観察が容易なうえ、宿主の組織、生育時期や変態、性別などの要素を最大限排除できるので、微胞子虫の生活環を研究する上で最大の利点となっている。*A. eucalypti* 細胞は、超大型の細胞であり、かつ管理が容易であるため、この細胞系で安定

した維持が可能な微胞子虫の研究への利用価値は高いものと判断される。

また最近、微胞子虫胞子の血清学的研究により胞子表面抗原の種特異性が注目され、新たな血清学的同定法の開発とその可能性が検討された (HAYASAKA and AYUZAWA, 1987; KAWARABATA and HAYASAKA, 1987; 三毛ら, 1988, 1989)。微胞子虫胞子表面抗原は安定性が高く (HAYASAKA and AYUZAWA, 1987; KAWARABATA and HAYASAKA, 1987), その検出および判定が容易 (HAYASAKA and AYUZAWA, 1987; 三毛ら, 1988, 1989) であることから微胞子虫分類上の重要な形質になりうると考えられている。

本研究では, *N. sp. Y9101* および *N. bombycis* NIS 001 の胞子表面抗原を、それぞれモノクローナル抗体感作ラテックスおよびポリクローナル抗体感作ラテックス凝集試験で比較した。その結果、シロイチモジヨトウ幼虫で産生された *N. sp. Y9101* の胞子表面抗原とカイコ幼虫で産生された *N. bombycis* NIS 001 の胞子表面抗原に差異が認められなかった。また、昆虫細胞培養から回収した *N. sp. Y9101* の胞子表面抗原は、シロイチモジヨトウ幼虫で産生された *N. sp. Y9101* の胞子表面抗原およびカイコ幼虫で産生された *N. bombycis* NIS 001 の胞子表面抗原と同様であると判断された。このことから、胞子表面抗原は継代宿主によっては変化しない安定した性質と考えられ、*Nosema* 属微胞子虫分類上の新たな形質としての重要性が強く示唆された。また、両株とも抗 *N. sp. NIS M11* 胞子ポリクローナル抗体感作ラテックスと弱い凝集反応を示すことが認められ、両株が *N. sp. NIS M11* と共通の胞子表面抗原を有していることが、本研究によりはじめて明らかとなった。

以上の結果を総合して、シロイチモジヨトウから分離された *N. sp. Y9101* を *N. bombycis* と同定した。本株のカイコにおける経卵巣伝達性は未確認であるが、シロイチモジヨトウにおける経卵巣伝達性は確認された。今後、わが国におけるカイコ以外の鱗翅目昆虫における *N. bombycis* 感染の消長と養蚕農家におけるカイコ微粒子病の発生との関係をさらに解明する必要がある。

摘 要

シロイチモジヨトウ *Spodoptera exigua* (HÜBNER から *Nosema* 属微胞子虫胞子が検出された。本分離株 *N. sp. Y9101* は、宿主であるシロイチモジヨトウに強い病原性を示し、カイコに対する病原性も確認された。*N. sp. Y9101* はその胞子形態、人工発芽法 (苛性カリ、塩化カ

リ、および EDTA 処理) による胞子発芽率、*Antheraea eucalypti* 培養細胞での感染増殖様式、および胞子表面抗原 (モノクローナルおよびポリクローナル抗体感作ラテックスによる凝集試験) により *N. bombycis* と同定された。

引 用 文 献

- 阿部芳彦・河原畑勇 (1988) モンシロチョウから分離された微胞子虫類の性状。日蚕雑 57: 147—150.
- CALI, A. (1971) Morphogenesis in the genus *Nosema*. In Proceedings, IVth International Colloquium on Insect Pathology, University of Maryland Press, College Park, pp. 431—438.
- CLARK, F.M. and A.N. ADAMS (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475—483.
- 藤原 公 (1969) 蚕に寄生する新しい微胞子虫について (予報)。日蚕関東講要 20: 90.
- 藤原 公 (1980) カイコから分離された 3 種の微胞子虫 (*Nosema* spp.) について。日蚕雑 49: 229—236.
- 藤原 公 (1984a) 蚕から分離した *Pleistophora* 様微胞子虫。日蚕雑 53: 398—402.
- 藤原 公 (1984b) 蚕から分離された *Thelohania* sp. 日蚕雑 53: 459—460.
- 藤原 公 (1985) 種繭養蚕において検出された微胞子虫。日蚕雑 54: 108—111.
- 藤原 公・香川敏昭・安藤博司 (1985) 種繭養蚕の蚕蛾から分離した *Nosema bombycis* 様微胞子虫。日蚕雑 54: 117—121.
- GRACE, T.D.C. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissues grown *in vitro*. Nature 195: 788—789.
- HAYASAKA, S. and C. AYUZAWA (1987) Diagnosis of microsporidians, *Nosema bombycis* and closely related species by antibody-sensitized latex. J. Seric. Sci. Jpn. 56: 169—170.
- HAYASAKA, S. and T. KAWARABATA (1990) Cloning of a microsporidian, *Nosema bombycis* (Microsporidia: Nosematidae) in insect cell cultures by a limiting dilution method. J. Invertebr. Pathol. 55: 35—40.
- 広瀬安春 (1971) 野外昆虫に対する家蚕・柞蚕微粒子病病原体の感染 (II)。蚕糸研究 78: 76—79.
- 広瀬安春 (1977) 野外昆虫に対する家蚕・柞蚕微粒子病病原体の感染 (III)。蚕糸研究 104: 105—108.
- 広瀬安春 (1979a) 昆虫寄生の微胞子虫類について。蚕糸研究 111: 118—123.
- 広瀬安春 (1979b) 野外昆虫から採取された微胞子虫類の交叉感染。蚕糸研究 111: 124—128.
- 広瀬安春 (1979c) ニカメイガ寄生微胞子虫のカイコおよび他種昆虫への感染性について。蚕糸研究 112: 275—279.

- 広瀬安春・上田金時 (1967) 野外昆虫に対する家蚕・柞蚕微粒子病原体の感染. 蚕糸研究 64: 62—65.
- 広瀬安春・上田金時 (1979) 柞蚕微粒子病原虫の継代宿主による感染性の変化. 蚕糸研究 110: 105—110.
- 岩野秀俊・石原 廉 (1984) スジキリヨトウから分離された微胞子虫, *Pleistophora* sp. について. 日大農獣医学部学術研究報告 41: 25—33.
- 岩野秀俊・石原 廉 (1991) *Nosema bombycis* のスジキリヨトウ成虫からの分離. 日蚕雑 60: 279—287.
- 河合 章 (1991) シロイチモジヨトウの生態と被害発生. 植物防疫 45: 231—234.
- KAWARABATA, T. and S. HAYASAKA (1987) An enzyme-linked immunosorbent assay to detect alkali-soluble spore surface antigens of *Nosema bombycis* (Microspora: Nosematidae). J. Invertebr. Pathol. 50: 118—123.
- KAWARABATA, T. and R. ISHIHARA (1984) Infection and development of *Nosema bombycis* (Microsporidia: Protozoa) in a cell line of *Antheraea eucalypti*. J. Invertebr. Pathol. 44: 52—62.
- KAWARABATA, T., R. ISHIHARA, S. HAYASAKA and H. IWANO (1989) Infection and sporogenesis of *Nosema bombycis* (Microspora: Nosematidae) in lepidopteran cell lines. In: Invertebrate Cell System Applications. Vol. II. (J. MITSUHASHI ed.), Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 69—74.
- 河原畑勇・早坂昭二・一田昌利・瀬川裕美・寺峰 孜・植松秀男・安田慶次 (1990) 桑園周辺で採集したモンシロチョウ成虫から検出された微胞子虫類. 日蚕雑 59: 288—292.
- MALONE, A.L. (1984) Factors controlling *in vitro* hatching of *Vairimorpha plodiae* (Microspora) spores and their infectivity to *Plodia interpunctella*, *Heliothis virescens*, and *Pieris brassicae*. J. Invertebr. Pathol. 44: 192—197.
- 三毛明人・大脇 真・深田哲夫 (1988) 家蚕微胞子虫類胞子に対する単クローン抗体の作製. 日蚕雑 57: 189—195.
- 三毛明人・大村 浩・大脇 真・深田哲夫 (1989) 単クローン抗体感作ラテックスによる蚕微粒子病診断の試み. 日蚕雑 58: 392—395.
- 佐藤令一・渡部 仁 (1980) 平衡密度勾配遠心法による *Nosema bombycis* を含む数種微胞子虫胞子の精製. 日蚕雑 49: 512—516.
- SHIMIZU, S., M. OHBA, K. KANDA and K. AIZAWA (1983) Latex agglutination test for the detection of the flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol. 42: 151—155.
- STREET, A.D., D. RALPH and F. HINK (1980) Replication of *Nosema algerae* in three insect cell lines. J. Protozool. 27: 113—117.
- 高井幹夫 (1991) シロイチモジヨトウの薬剤抵抗性. 植物防疫 45: 239—241.
- UNDEEN, H.A. (1990) A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. J. Theor. Biol. 142: 223—235.
- UNDEEN, H.A. and S.W. AVERY (1988) Effect of anions on the germination of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae) spores. J. Invertebr. Pathol. 52: 84—89.
- 若村定男・高井幹夫 (1990) 合成性フェロモンによるシロイチモジヨトウの防除 III. 合成性フェロモン処理がライトトラップによる雌成虫の捕獲率に及ぼす影響. 応動昆 34: 161—163.
- WAKAMURA, S., M. TAKAI, S. KOZAI, H. INOUE, I. YAMASHITA, S. KAWAHARA and M. KAWAMURA (1989) Control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (HÜBNER) (Lepidoptera: Noctuidae), using synthetic sex pheromone I. Effect of communication disruption in welsh onion fields. Appl. Entomol. Zool. 24: 387—397.