鱗翅目昆虫病原性微胞子虫 *Nosema mesnili* NM-HC-A8801 株の *Antheraea eucalypti* 細胞系への接種と増殖¹⁾

横田仁子*・安永智佐*・河原畑勇*・早坂昭二**・津田勝男***

* 九州大学農学部

** 蚕糸・昆虫農業技術研究所

*** 福岡県農業総合試験場生産環境研究所

Infection and Development of *Nosema mesnili* NM-HC-A8801 (Microsporida: Protozoa) in Lepidopteran Cell Line. Satoko YOKOTA, Chisa YASUNAGA, Takeshi KAWARABATA (Institute of Biological Control, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-81, Japan), Syoji HAYASAKA (National Institute of Sericultural and Entomological Science, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan) and Katsuo TSUDA (Institute of Agro-Environmental Science, Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **41**: 89-94 (1997)

Spores of *Nosema mesnili* NM-HC-A8801 primed with 0.1-N KOH solution were inoculated in *Antheraea eucalypti* cell cultures at a ratio of 30 spores per cell. The inoculated insect cells were cultured at 27°C in GRACE's medium supplemented with 10% fetal bovine serum. At 1 h post-inoculation, the percentage of hatched spores was approximately 20%, and about 5% of *A. eucalypti* cells were infected initially with sporoplasms. At 96 h post-inoculation, many-coiled mature spores were produced and an infected *A. eucalypti* cell contained about 40 protozoans. A rapid increase in cell infection rates was observed and the percentage of infected cells reached 90% 120 h post-inoculation. In the life cycle, *N. mesnili* NM-HC-A8801 was diplokaryotic and showed disporous development which are typical of the genus *Nosema*. However, the spread of infection and spore production were markedly different from *N. bombycis* and *Nosema* sp. NIS M11.

Key words: *Nosema mesnili* NM-HC-A8801, *Antheraea eucalypti* cell culture, spread of infection, growth and development

緒 言

鱗翅目昆虫病原性微胞子虫 *Nosema mesnili* (PAILLOT, 1918) は、わが国ではモンシロチョウ (*Pieris rapae curcivora*) 幼虫 (WATANABE, 1974; 阿部・河原畑, 1988) およびアメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*) 幼虫 (阿部, 1988) から記録されている。*N. mesnili* 胞子をカイコ 2 齢幼虫に経口接種すると、接種 10 日後から死亡個体が出現し始め、感染により死亡した幼虫体内の多くの感受性組織に胞子が多数形成されている (WATANABE, 1974; 阿部・河原畑, 1988)。また、アメリカシロヒトリ (*H. cunea*) から得られた分離株 (阿部, 1988) の胞子をハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) 幼虫に経口接種した場合は、カイコ幼虫の場合とは異なり、選択的に神経組織に侵入して接種後数日で神経系の障害に起因する、運動麻痺症状が観察さ

れている (阿部, 1989)。

現在も、*N. mesnili* 各分離株および *Nosema* 属近縁種間における生活環や増殖様式の比較研究は、同調感染が可能で宿主昆虫個体の生理的要因を最低限にまで排除できる昆虫培養細胞系を用いて行われておらず、カイコ病原性微胞子虫 *Nosema bombycis* および *Nosema* sp. NIS M11 株 (安永ら, 1991) との関係についても、定量的かつ詳細な検討はなされていない。

本研究は、アメリカシロヒトリ幼虫から得られた *N. mesnili* NM-HC-A8801 株 (阿部, 1988) の感染・増殖様式および生活環を解明する目的で、*N. mesnili* 胞子をヤママユガ科 *Antheraea eucalypti* 細胞系 (GRACE, 1962) に同調感染させ、経時的に原虫細胞形態および細胞感染率を調査した。

1) 本研究は文部省科学研究費補助金 (一般研究 A : 課題番号 07406004, 総合研究 A : 課題番号 07306004, および基盤研究 B : 課題番号 08456030) の援助を受けて行った。

1996 年 11 月 22 日受領 (Received 22 November 1996)

1997 年 3 月 28 日登載決定 (Accepted 28 March 1997)

材料および方法

1. 昆虫培養細胞

鱗翅目ヤママユガ科由来 *Antheraea eucalypti* 細胞系 (GRACE, 1962) を供試した。培養細胞は、10% ウシ胎児血清を添加した GRACE 培地 (GRACE, 1962) に 27°C で培養し、継代は 1 週間間隔で行った。

2. 微胞子虫胞子

アメリカシロヒトリから分離された *N. mesnili* NM-HC-A8801 株 (以下、*N. mesnili*) 胞子は、農林水産省果樹試験場故阿部芳彦博士から分与を受けた。

3. 接種用微胞子虫胞子

N. mesnili に持続感染した *A. eucalypti* 細胞培養中に産生された微胞子虫胞子を、無菌的に回収して接種用微胞子虫胞子を調製した。*N. mesnili* に持続感染した *A. eucalypti* 細胞培養を滅菌蒸留水で 750 g, 25°C, 5 分間遠心し、沈殿した *N. mesnili* 胞子を滅菌蒸留水に再浮遊させた。数回遠心洗浄した後、遠心管中の 100% Percoll (Pharmacia) 上に *N. mesnili* 胞子浮遊液を重層し、1,800 g, 25°C, 20 分間遠心して胞子を沈殿させた。沈殿した *N. mesnili* 胞子を滅菌蒸留水に再浮遊させ数回遠心洗浄した後、蒸留水に浮遊し使用時まで 4°C で保存した。

4. 接 種

N. mesnili 胞子の *A. eucalypti* 細胞系への接種は KAWARABATA and ISHIHARA (1984) の方法を一部改変して行った。*N. mesnili* 胞子浮遊液と 0.2 N 苛性カリ溶液を等量混合し、27°C で 40 分間アルカリ処理した後、*N. mesnili* 胞子と *A. eucalypti* 細胞を 30:1 の比で 50 ml 培養フラスコ内で混合攪拌して接種した。攪拌混合後直ちに胞子・培養細胞混合浮遊液入りの 50 ml 培養フラスコを 400 g, 3 分間遠心した。遠心後、上清をピペットで除き、細胞を 10% ウシ胎児血清および抗生物質 (最終濃度ペニシリン 200 units/ml; ストレプトマイシン 200 µg/ml) を添加した新鮮な GRACE 培地に浮遊後、24 穴マルチウェルプレート (Falcon 3047) に分注 (0.5 ml/well) し 27°C で培養した。マルチウェルプレートから経時的に 6 穴分の微胞子虫感染細胞浮遊液 (約 3 ml) を採取し、採取したサンプルは塗抹標本としてメタノール固定後、ギムザ液で染色し、光学顕微鏡下 400 倍で観察した。

以上、*N. mesnili* 胞子の *A. eucalypti* 細胞系への接種試験は、3 回反復して行った。

5. ラテックス凝集試験

N. bombycis NIS 001 株、*Nosema* sp. NIS M11 株、および *Vairimorpha* sp. NIS M12 株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。微胞子虫胞子および抗体感作ラテックス浮遊液をスライドガ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. *N. mesnili* NM-HC-A8801 株胞子のラテックス凝集試験

N. bombycis NIS 001 株、*N. mesnili* および *Nosema* sp. NIS M11 株の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. mesnili 胞子は、*Nosema* sp. NIS M11 株胞子モノクローナル抗体感作ラテックスと反応したが、抗 *N. bombycis* NIS 001 株胞子および *Vairimorpha* sp. NIS M12 株

Table 1. Monoclonal antibody-sensitized latex agglutination test of *Nosema mesnili* NM-HC-A8801

<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>Nosema mesnili</i> NM-HC-A8801	—	+	—
<i>Nosema</i> sp. NIS M11	—	+	—
<i>Nosema bombycis</i> NIS 001	++	—	—

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

Fig. 1. Spread of *Nosema mesnili* NM-HC-A8801 in *Antheraea eucalypti* cell line *in vitro* at 27°C. Vertical lines represent the standard deviation from three determinations.

Fig. 2. Growth of *Nosema mesnili* NM-HC-A8801 in *Antheraea eucalypti* cell line in vitro at 27°C. Vertical lines represent the standard deviation from three determinations.

胞子の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 1)。

2. *A. eucalypti* 細胞系における *N. mesnili* NM-HC-A8801 株感染の伝播

N. mesnili 胞子の接種 1 時間後の発芽率は約 34% で、*A. eucalypti* 細胞感染率は約 5% であった (Fig. 1)。また、*A. eucalypti* 細胞感染率は接種 24 時間後までは、ほぼ同レベルで推移した。接種 48 時間後以降は二次感染体由来する第二世代および後代の *N. mesnili* が、新たに *A. eucalypti* 細胞に侵入して増殖を開始し、*A. eucalypti* 細胞の感染率が急激に増加した。さらに、接種 120 時間後には *A. eucalypti* 細胞の感染率は約 90% に上昇した。接種 7 日後に感染培養を新鮮な培養液で希釈して第 1 回の継代を行ったが、この時の *A. eucalypti* 細胞感染率は約 95% に達した。

3. *A. eucalypti* 細胞系における微胞子虫 *N. mesnili* NM-HC-A8801 株の増殖

胞子接種 1 時間後の *A. eucalypti* 細胞の細胞質内に侵入した、*N. mesnili* の第一世代は 95% 以上が単独感染であった (Fig. 2)。*N. mesnili* のスポロプラズムは 18 時間後にはシズントに生長し、接種 24 時間後からシズントの二分増殖が開始され、シズントの二分増殖は通常 4~5 回行われた。原虫細胞数の急速な増加は接種 72 時間後まで継続し、その後の二分増殖による増加はやや不活発になった。接種 120 時間後には *A. eucalypti* 細胞における *N. mesnili* の第一世代の原虫細胞数の増加はほと

んど停止した。*N. mesnili* のスポロプラズムに単独感染した *A. eucalypti* 細胞の *N. mesnili* 胞子産生数は約 38 個であった。

4. *A. eucalypti* 細胞系における *N. mesnili* NM-HC-A8801 株の生活環

苛性カリ処理した *N. mesnili* 胞子を *A. eucalypti* 細胞系に混合接種した後、経時的にギムザ染色塗抹標本を作成して光学顕微鏡で観察した。

接種 1 時間後、*N. mesnili* 胞子の発芽により極糸を通じて射出されたスポロプラズムが *A. eucalypti* 細胞の細胞質に侵入しているのが確認された (Fig. 3-1)。*N. mesnili* のスポロプラズムは二核性で、ギムザ染色により核は赤染されたが、細胞質は濃染されなかった。接種 12 時間後の *N. mesnili* のスポロプラズムは核および全体が肥大し、細胞質が宿主細胞の細胞質よりやや濃い青色に染色された (Fig. 3-2)。接種 18 時間後、原虫細胞は球形から紡錘形のシズントに生長した (Fig. 3-3)。シズントの最初の二分増殖による増殖像は接種 24 時間後に観察され (Fig. 3-4)、シズントの二分増殖が最も盛んな時期は接種 24~30 時間後であった。接種 30 時間後からは、一部のシズントの細胞質内にギムザで染色されない高屈折率の小球が出現し、*N. mesnili* のスポロント形成が開始された (Fig. 3-5)。その後、スポロントは二分増殖して 2 個のスポロプラストを産生し、接種 36 時間後には短極糸型胞子が形成された。*N. mesnili* の短極糸型胞子は内部にギムザで濃染される球状物を有し、輪郭は明瞭であった (Fig. 3-6)。接種 48 時間後には、一部に濃赤染物を残し他の部分は中空状である原虫細胞および内部が完全に中空状の原虫細胞が出現した (Fig. 3-7a)。同時に、第一世代の短極糸型胞子由来と推定される二次感染体が、新たに感染した *A. eucalypti* 細胞の細胞質中に観察された (Fig. 3-7b)。一方、*A. eucalypti* 細胞に侵入した *N. mesnili* の二次感染体は約 8 時間でシズントに生長し、二分増殖による増殖と *A. eucalypti* 細胞における第二世代としての生活環を開始した。接種 72 時間後からは、スポロプラズム由来の *N. mesnili* 第一世代または二次感染体由来の第二世代に感染した *A. eucalypti* 細胞が混在する状態となった。また、一部の感染宿主細胞中には、内部が淡青染される長極糸型胞子へ移行中の原虫細胞が多数観察されるようになった (Fig. 3-8)。接種 96 時間後以降は、ギムザにより内部が濃青染される長極糸型胞子が出現し、*N. mesnili* 第一世代の生活環が完了した (Fig. 3-9)。

考 察

昆虫培養細胞系を利用した昆虫病原性微胞子虫の感染増殖様式および生活環の解明は、GRACE (1962) が世界最初の鱗翅目ヤマムガ科昆虫 *A. eucalypti* 由来の細胞系樹立に成功して以来、次第に活発になってきた (JARONSKY, 1984)。昆虫病原性微胞子虫の感染増殖様式および生活環の研究には鱗翅目昆虫由来の培養細胞系が多く利用されているが、この実験系の特徴は微胞子虫胞子の同調感染が可能なることにある (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984)。本研究では、苛性カリ処理した *N. mesnili* NM-HC-A8801 株 (阿部, 1988) の胞子をヤマムガ科由来 *A. eucalypti* 細胞系に同調感染させ、*N. mesnili* の感染増殖様式および生活環の解明と *Nosema* 属近縁種との比較を試みた。

N. mesnili NM-HC-A8801 株胞子のモノクローナル抗体感作ラテックス吸着試験 (HAYASAKA and AYUZAWA, 1987; 三毛ら, 1988) を行った結果、*N. mesnili* NM-HC-A8801 株の胞子表面抗原は *Nosema* sp. NIS M11 株胞子表面抗原と共通抗原を有することが明らかになった。しかし、苛性カリプライミング法による *N. mesnili* 胞子の GRACE 液中における発芽率は約 20% で、*Nosema* sp. NIS M11 株胞子の場合の 5% 以下 (YASUNAGA et al., 1995) とは明瞭な差異のあることが明らかになった。一方、苛性カリプライミング法による *N. mesnili* 胞子の GRACE 液中における発芽率は *N. bombycis* 胞子 (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; 安永ら, 1992) の 1/2 以下で、胞子表面抗原についても、用いたモノクローナル抗体との反応の範囲内で、*N. bombycis* 胞子との共通抗原の存在を示唆する結果は得られなかった。

また、接種 7 日後の *A. eucalypti* 細胞系における *N. mesnili* の細胞感染率は約 95% にも達し、同様の条件下で *N. bombycis* および *Nosema* sp. NIS M11 株の細胞感染率がそれぞれ約 30% (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; 安永ら, 1992) と 20% 以下 (安永ら, 1991) であったのに比較して、*in vitro* における感染の伝播は *N. mesnili* が最も早かった。

さらに、*N. mesnili* の *A. eucalypti* 細胞における長極糸型胞子産生数は感染細胞あたり約 38 で、*Nosema* sp. NIS

M11 株 (安永ら, 1991) の場合とほぼ同数であった。一方、*N. bombycis* の *A. eucalypti* 細胞における成熟胞子産生数は約 70 (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; KAWARABATA et al., 1989) で、*N. mesnili* の場合の 2 倍近い値であった。このように、*N. mesnili* の *A. eucalypti* 細胞における感染増殖は、*N. bombycis* および *Nosema* sp. NIS M11 株の場合とは明瞭に異なることが確認された。

Nosema 属微胞子虫は全ライフサイクルにおいて連核性であり、1 個のスポロントから 2 個のスプロプラストを産生する (CALI, 1971)。*A. eucalypti* 細胞系における *N. mesnili* NM-HC-A8801 株の生活環でもこの特徴は確認され、基本的には *Nosema* 属の基準種 *N. bombycis* (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984) およびカイコ病原性微胞子虫 *Nosema* sp. NIS M11 株 (安永ら, 1991) と同様の生活環を示した。

Nosema 属微胞子虫の昆虫培養細胞系での伝播は、二次感染体由来している (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; IWANO and ISHIHARA, 1989, 1991; 安永ら, 1991)。IWANO and ISHIHARA (1991) は *N. bombycis* における微胞子虫胞子二型性について報告し、培養早期に認められる短極糸型胞子と培養後期に認められる長極糸型胞子で、極糸の長さおよび胞子殻の厚さが異なることを電顕で観察した。本研究でも、接種 48 時間後には二次感染体出現と同時にスプロプラズムを放出した胞子殻とは明らかに形状の異なる卵形の胞子殻が観察され、二次感染体放出後の短極糸型胞子孵化殻 (IWANO and ISHIHARA, 1991) と推定された。二次感染体の感染細胞外への出現時期は、*N. bombycis* で接種 48 時間後 (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984)、*Nosema* sp. NIS M11 株で接種 72 時間後 (安永ら, 1991) であり、*N. mesnili* NM-HC-A8801 株は *N. bombycis* とほぼ同時間で産生されることが明らかになった。

また、接種 96 時間後に観察された内部が濃青染された長卵形の微胞子虫胞子は長極糸型胞子 (IWANO and ISHIHARA, 1991) と判断された。長極糸型胞子の出現までの時間は *N. mesnili* NM-HC-A8801 株では接種 96 時間後で、*N. bombycis* の接種 144 時間後 (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984) および *Nosema* sp. NIS M11 株の接種 240 時間後 (安永ら, 1991) に比較して極めて短時間であった。

Fig. 3. Life cycle of *Nosema mesnili* NM-HC-A8801 in *Antheraea eucalypti* cells *in vitro*. (1) Invasion of sporoplasm (sp) 1 h post-inoculation. N: host cell nucleus. (2) *N. mesnili* 12 h post-inoculation. (3) Schizont (sz) of *N. mesnili* 18 h post-inoculation. (4) First division of schizont (sz) 24 h post-inoculation. (5) Formation of sporonts (sr) 30 h post-inoculation. r: refractile spot. (6) *N. mesnili* 36 h post-inoculation. fs: few-coiled spores, s: spherical body. (7a) Germinated few-coiled spore (g-fs) 48 h post-inoculation. (7b) Secondary infective form (if) invading host cell. (8) Developing many-coiled spores (ms) 72 h post-inoculation. (9) Formation of mature many-coiled spores (m-ms) 96 h post-inoculation.

今後、天敵微生物としての *N. mesnili* について、種内変異、超微形態、宿主特異性と病原性および国内における分布等を明らかにする必要があると考えられる。

摘 要

苛性カリ処理した微胞子虫 *Nosema mesnili* NM-HC-A8801 株胞子を *Antheraea eucalypti* 細胞系に接種し、感染・増殖様式および生活環について検討した。胞子接種 1 時間後、一感染細胞あたりのスポロプラズムの侵入数は 1 個から 2 個であった。接種 24 時間後以降、一感染細胞あたりの原虫数は増加し始め、接種 120 時間後には原虫細胞産生数は約 38 個に達した。細胞感染率は接種 1 時間後、5% であった。接種 48 時間後以降、二次感染体が未感染細胞へ侵入するため細胞感染率が増加し、接種 120 時間後、約 90% の細胞感染率であった。継代による細胞感染率の推移を調査したところ、継代 15 回後以降も約 50~60% の高い細胞感染率を維持した。また、*N. mesnili* NM-HC-A8801 株は、カイコ微粒子病病原 *N. bombycis* と同様の生活環を示し、基本的な増殖増殖は二分分裂であることが確認された。

引 用 文 献

- 阿部芳彦 (1988) アメリカシロヒトリから分離された *Nosema mesnili*. 日蚕雑 57: 200-202.
- 阿部芳彦 (1989) 微胞子虫 *Nosema mesnili* (Microsporida: Nosematidae) に感染したハスモンヨトウ幼虫の急性麻痺症状. *Jpn. J. Appl. Ent. Zool.* 33: 247-249.
- 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*. *Proc. IVth Int. Colloq. Insect Pathol.* 4: 104-112.
- 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.
- IWANO, H. and R. ISHIHARA (1989) Intracellular germination of spores of a *Nosema* sp. immediately after their formation in cultured cell. *J. Invertebr. Pathol.* 54: 125-127.
- IWANO, H. and R. ISHIHARA (1991) Dimorphism of spores of *Nosema* spp. in cultured cell. *J. Invertebr. Pathol.* 57: 211-219.
- JARONSKI, S.T. (1984) Microsporidia in cell culture. In: *Advances in Cell Culture*. (K. MARAMOROSCH ed.), vol. 3, Orlando, Florida: Academic Press, pp. 183-229.
- KAWARABATA, T. and R. ISHIHARA (1984) Infection and development of *Nosema bombycis* (Microsporida: 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 line. In: *Invertebrate Cell System Applications*. (J. MITSUHASHI ed.), vol. II, Boca Raton, Florida: CRC Press, pp. 69-74.
- 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.
- PAILLLOT, M.A. (1918) Deux microsporidies nouvelles parasites des chenilles de *Pieris brassicae*. *C. R. Soc. Biol.* 81: 66-68.
- WATANABE, H. (1974) First report of microsporidian infection of the cabbageworm, *Pieris rapae crucivora* BOISDUVAL (Lepidoptera: Pieridae) in Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 9: 133-142.
- 安永智佐・舟越正子・河原畑勇・早坂昭二 (1991) カイコ病原性微胞子虫 *Nosema* sp. NIS M11 胞子の昆虫培養細胞への接種と増殖. 日蚕雑 60: 450-456.
- 安永智佐・舟越正子・河原畑勇・荒武義信・岩野秀俊 (1992) 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). 応動昆 36: 127-134.
- YASUNAGA, C., S. INOUE, M. FUNAKOSHI, T. KAWARABATA and S. HAYASAKA (1995) A new method for inoculation of poor germinator, *Nosema* sp. NIS M11 (Microsporida: Nosematidae), into an insect cell culture. *J. Euk. Microbiol.* 42: 191-195.