

## 研究成果報告書

### 【申請者氏名】

畠山吉則

### 【所属機関】

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

### 【研究題目】

蚕室に流入する微胞子虫の屋外における発生源の解明

### 【研究目的】

かつて微粒子病は防止しなければならない重要な感染菌であったが、現在では母蛾検査による目視の的確な実施により発生を未然に防がれている。しかしながら母蛾検査により毎年一定数の微胞子虫が検出されている。これは屋外より何らかの原因によって微胞子虫が蚕室内に流入し、育成中の蚕に感染しているものと思われる。しかしながらこの屋外環境から蚕室への微胞子虫流入経路は未だに解明されておらず、微粒子病の発生リスクは常にある。本申請では桑園近傍の畑に飛来するモンシロチョウにおける微胞子虫感染状況を調査し、母蛾検査の結果と照合することで蚕室への流入経路を調査した。以下本研究の目的を項目に分けて説明する。

- カイコ微粒子病の拡散防止は健全な育蚕を実施する上で必須である。
- これまで集団母蛾検査で検出された微胞子虫はすべて廃棄されてきている。
- 桑園の近傍には畑があり、その畑作物を加害するヤガにも微胞子虫は感染している。
- これまで流入源の推定のためにヤガを中心に調査を実施してきた。
- しかしながら、蚕室で検出される微胞子虫との間に差異が発生する場合が見られた。
- この問題を解決し、かつ抜本的な微粒子病発生防止対策を講じるためには対象昆虫の種類を増やして調査範囲を拡大する必要がでてきた。
- そこで令和 2 年度では、これまで対象としていなかったモンシロチョウやこれまで未調査であったヤガなどのチョウ目害虫における微胞子虫感染調査と母蛾検査の結果を照合して流入源推定と微胞子虫の動向を調査した。

次に今年度の研究実施および得られた成果について次頁以降で説明する。

## 【研究内容及び成果】

### モンシロチョウの捕獲および微胞子虫感染状況の調査

令和2年度におけるモンシロチョウの微胞子虫感染状況を調査するために、モンシロチョウを捕獲し、蚕微粒子病の調査と同様に磨砕・検鏡により微胞子虫感染の有無を調査した。調査地として日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)に併設されている農場を選定した。調査ほ場には、通常モンシロチョウの餌となるアブラナ科植物がほぼ年間を通じて多数植えられており、また近接する場所には桑園もある。しかしながら令和2年度では新型コロナウイルス感染症の蔓延防止に関する緊急事態宣言発令の影響もあり、通常は春先に行われる野菜の植え付けが大幅に遅れたため、捕獲調査は令和2年9月から12月の秋季に実施した。その結果、合計307頭(オス183頭、メス124頭)を捕獲した。捕獲個体の性比をしてみると、令和2年度はオスが59.6%、メスが40.4%となった(表1)。

表1 モンシロチョウの捕獲数と感染数および感染率

調査年	捕獲数(頭)	感染数(頭)	重度感染数(頭)	感染率(%)	重度感染率(%)
令和2年	307	79	68	25.7	86.1
9月~12月	(183,124)	(51,28)	(49,19)	(27.9,22.6)	(96.1,67.9)

()内の数字は左がオス、右がメスを表す

### モンシロチョウ感染調査

乳鉢に捕獲調査によって得たモンシロチョウ1個体と0.85%(w/v)生理食塩水1mlを加え、乳棒で腹部を磨砕した。磨砕液をスライドガラスに滴下し、カバーガラスを被せ、プレパラートを作成した。作成したプレパラートをシステム生物顕微鏡BX53(オリンパス株式会社)(×400)で任意の5視野を検鏡し、微胞子虫感染の有無を確認した。胞子を確認した場合はカウンターを用いて5視野の胞子数を計測し、1視野あたりの平均胞子数から感染程度の判定を行った。感染程度は胞子数が0の場合を-、1~10を+、11~100を++、101以上を+++とし、++以上を重度感染とした。

その結果捕獲頭数307頭中、感染頭数は79頭(オス51頭、メス28頭)だった(表1)。感染個体のうち、感染程度が++以上の重度感染個体は68頭(オス49頭、メス19頭)だった。感染率は25.7%(オス27.9%、メス22.6%)、重度感染率は86.1%(オス96.1%、メス67.9%)となった。また令和2年度で検出された感染個体の感染程度は+が11頭、++が25頭、+++が43頭だった(表2)。また感染程度のうち+++の個体が最も多い結果となった(表2)。

表2 2020年度モンシロチョウ感染個体内訳

感染程度	1~10 (+)	11~100 (++)	101~ (+++)
検出数	11	25	43
重度感染頭数	-	68	

## 孢子サイズ測定

分離した微孢子虫株のおおよその属を推定するために、感染程度が+++だった43株の孢子サイズを測定した。測定の際には、孢子液の入った遠心管を攪拌機により攪拌し、プレパラートを作成し検鏡・測定した。測定は任意の100孢子対象とし、倍率1,000倍に設定したシステム生物顕微鏡に装着したイメージングソフトウェア CellSensStandard で孢子を撮影し、孢子の長径と短径を計測した。なお、1株中で孢子の長径が0.5~1.0 $\mu\text{m}$ 異なる孢子が混在している株は複数種の微孢子虫に感染していると判断し混合株とした。計測後、計測値より平均と標準偏差を算出し、平面分布図を作製した。平面分布図上で指標株(図1右側)と比較し各株の属の推定を行った(図1)。

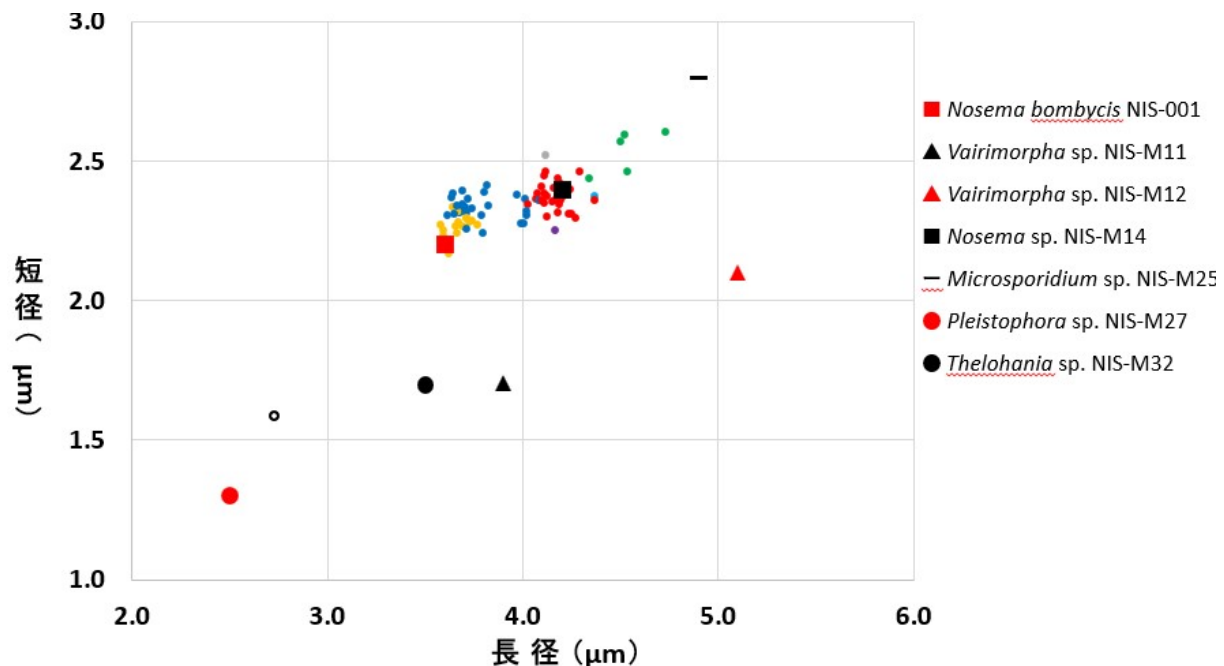


図1 モンシロチョウより分離された微孢子虫の孢子サイズ

指標とした標準株には右側の物を使用した。

指標株には *Nosema bombycis* NIS-001、*Vairimorpha* sp. NIS-M11、*Vairimorpha* sp. NIS-M12、*Nosema* sp. NIS-M14、*Microsporidium* sp. NIS-M25、*Pleistophora* sp. NIS-M27、*Thelohania* sp. NIS-M32 を使用した。また、本研究における分離株の属の推定の基準として、分離株の長径・短径両方の標準偏差内に指標株が存在した場合、その指標株の付近に株が分布したと判断した。分離株の長径・短径両方の標準偏差が2つの指標株の間に位置した場合、2つの指標株間に分布したと判断した。標準偏差内に指標株が存在しない場合は不明と判断。

また43株の内訳を見てみると43株中79%にあたる34株が混合株、9株が単一株であった。*N. bombycis* 付近に分布した株は43株中20株確認された。またM14付近に分布した株は43株中20株確認された。Nb-M14に分布した株は43株中22株確認された。M11・M14、M14-M12、M27-M32 および不明に分布した株はそれぞれ43株中1株確認された。また、分離株43株中 *Nosema* 属付近に分布した株は41株であった(表3)。

43株中79%にあたる34株が混合株、9株が単一株であった。分離株の孢子サイズは *N. bombycis* NIS-001(長径:3.6、短径:2.2)付近(以後Nbと省略)、*Nosema* sp. NIS-M14(長径:4.2、

短径：2.4)付近(以後 M14 と省略)、*N. bombycis* NIS-001～*Nosema* sp. NIS-M14 中間(長径：3.6～4.1、短径：2.2～2.39)(以後 Nb と M14 中間と省略)、*Nosema* sp. NIS-M14 間～*Microsporidium* sp. NIS-M25 間(長径：4.3～4.8、短径：2.4～2.6)(以後 M14 と M25 間と省略)、*Vairimorpha* sp. NIS-M11～*Nosema* sp. NIS-M14 間(長径：3.9～4.2 短径：1.7～2.4)(以後 M11 と M14 中間と省略)、*Nosema* sp. NIS-M14～*Vairimorpha* sp. NIS-M12 間(長径：4.2～5.1、短径：2.1～2.4)(以後 M14 と M12 中間と省略)、*Pleistophora* sp. NIS-M27～*Thelohania* sp. NIS-M32 間(長径：2.5～3.5、短径：1.3～1.7)(以後 M27 と M32 中間と省略)、周辺に指標株が無い領域(以後不明と省略)の7か所に分布した(図1)。

Nb 付近に分布した株は 43 株中 20 株確認された(図1)。M14 付近に分布した株は 43 株中 30 株確認された。Nb と M14 中間に分布した株は 43 株中 22 株確認された。M11 と M14 中間、M14 と M12 中間、M27 と M32 中間および不明に分布した株はそれぞれ 43 株中 1 株確認された。また、分離株 43 株中 *Nosema* 属付近に分布した株は 41 株だった。

表3 孢子サイズにより分類された微胞子虫分類群一覧

	株型	株数	
	Nb	1	
	M14	1	
	Nb と M14 中間	5	単一株
単一株	M14 と M12 中間	1	21%
	M27 と M32 中間	1	
	M14 および Nb と M14 中間	13	
	M14 および M14 と M25 中間	1	
2 種混合	Nb および標準株ではないもの大型株	1	
	Nb および M14	12	
	Nb および M14 および M14 と M25 中間	1	混合株
	Nb および Nb と M14 中間 2 種	2	79%
	Nb および M11 と M14 中間 2 種	1	
3 種混合	Nb および M14 および M14 と M25 中間	1	
	Nb および Nb-M14 および M14 と M25 中間	1	
	M14 および Nb-M14 および M14 と M25 中間	1	
	合計	43	-

#### 蚕や複数のヤガへの感染性試験

モンシロチョウから分離された微胞子虫が、蚕に対して感染性を有するのかを調査するために、蚕および複数のヤガに対して簡易接種実験を実施した。分離された重度感染株である 43 株中より単一株の *N.bombycis* 系統を含む 9 株を蚕およびオオタバコガとハスモンヨトウに対して接種した。その結果、検出された 1 株の *N.bombycis* 系統を含む複数系統で蚕に感染性

を示した。またオオタバコガ及びハスモンヨトウにも弱い感染性を示した。

### 大日本蚕糸会蚕業技術研究所にて母蛾検査により検出された微胞子虫の性状調査

協力研究員である野澤瑞佳氏から蚕業技術研究所の母蛾検査によって分離された微胞子虫の分与を受け、性状の調査を実施した。その結果、検出された全 139 サンプルのうち *N.bombycis* の検出は 17 件であり全体の 12.2%であったのに対し、複数の微胞子虫の混合サンプルは 69 件であり検出数のほぼ半数の 49%であった(表 4)。この結果は例年にはあまり見られない傾向であり、屋外の流入源での微胞子虫感染状況に何らかの変化があったことを示唆するものであった。

表 4 蚕業技術研究所で検出された微胞子虫の内訳一覧

系統	Nb	M11	M14	M27	M29	Nb, M11	Nb, M14	M14, M27	M27, M29	Nb, M11, M14	Nb, M11, M12
検出数	17	1	31	12	9	50	13	2	2	1	1
検出率 (%)	12.2	0.7	22.3	8	6.4	36	9.4	0.14	0.14	0.7	0.7
	単一株 50.4%					混合株 49.6%					

### 【今後の課題】

令和 2 年度のモンシロチョウにおける単一株の検出比率は 21%であり、混合サンプルの検出率は 79%であった。令和 2 年度モンシロチョウの捕獲調査と同時期に捕獲されたヤガの検査結果を見てみると、ほとんどが単一株の感染であった。この結果を見ると微胞子虫の混合株が多く検出されたのはモンシロチョウであり、他のヤガとは検出状況が大きく異なっていた。一般的に *N.bombycis* は蚕に対して強い感染性を有するが、モンシロチョウや他のヤガでは感染力も弱い。そのため年によっては全体に占める検出率が上がる傾向も見られる。またモンシロチョウから分離された *N.bombycis* は 20 株でありの検出頻度は 47%程度であった。このうち単一株のものを蚕に接種したところ感染性を示した。混合サンプルの検出率、および *N.bombycis* の感染性を考慮すれば他のヤガと比べてモンシロチョウが屋外における蚕感染性微胞子虫の宿主である可能性が高いといえる。しかしながら令和 2 年度の調査ではモンシロチョウの捕獲数が少なく得られた微胞子虫株も 43 株と非常に少なかった。そのため全体像を確認するためには、最低でも 200 株程度の微胞子虫を確保する必要があると考えている。

令和 2 年度のモンシロチョウの捕獲調査は緊急事態宣言の影響もあり野菜の作付けの影響もあったが、問題なく遂行され、複数の微胞子虫を分離した。しかしながら、野菜類の作付け状況が例年よりも小規模となったため、通常モンシロチョウ発生環境とは異なっていた可能性もある。そのため令和 2 年度の実施結果がそのまま正しいものであるのか、特例的なものであるのかを判断できなかった。そこで当初は単年度での研究を計画していたが、複数年での調査が必要であると判断し、令和 3 年度も調査を継続して実施することとし、研究の延長を申請した。次年度も引き続きモンシロチョウと母蛾検査結果との関連性を調査したい。