

機関番号：10105
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21880004
 研究課題名(和文) 昆虫寄生菌の垂致死性効果を利用したマラリア媒介蚊の新防除技術開発に向けた基礎研究
 研究課題名(英文) Basic research for technical development of new malarial vector control by using sublethal effect of entomopathogenic fungi
 研究代表者
 相内 大吾 (AIUCHI DAIGO)
 国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教
 研究者番号：50552783

研究成果の概要(和文)：野生の蚊類より昆虫寄生性アナモルフ菌類の分離を試み、合計 392 菌株を収蔵する菌株ライブラリを構築した。これら菌株の感染性および病原性を評価したところ 13 菌株が *Anopheles stephensi* に対し感染性を有することが明らかとなった。この内、高い感染性を示した 5 菌株 (*Lecanicillium* 属菌 2 菌株と *B. bassiana* 3 菌株) の病原性を評価したところ、対照区の半数致死日数を半数以下に下回る高病原性系統および対照区と同程度の値を示す弱病原性系統を検出した。

研究成果の概要(英文)：Entomopathogenic fungi were isolated from wild adult mosquitoes to construct fungal culture library specialized for anamorphic entomopathogenic fungi originated from mosquitoes. As a result, fungal culture library housed 392 isolates of anamorphic entomopathogenic fungi was constructed. Then, their infectivity and pathogenicity were assessed. Consequently, 13 isolates showed infectivity against female *Anopheles stephensi*. Among them, 2 isolates of *Lecanicillium* spp and 3 isolates of *Beauveria bassiana* which showed higher infectivity were applied for bioassay of pathogenicity. As a result, high pathogenicity isolate which showed fewer than half of 50% lethal time value of control plot, and low pathogenicity isolate which showed equal level of the value compared with control were detected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：昆虫病理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫寄生性アナモルフ菌類、生物学的防除、感染症媒介蚊、垂致死性効果

1. 研究開始当初の背景

(1) マラリアは現在世界的に大きな脅威となっている感染症の一つで、病原体媒介性の

蚊の吸血行動に伴いヒトからヒトへ媒介される。これまでマラリア対策の手法の一つとして、媒介昆虫の防除が従来から採られてい

る。特にこれまで DDT をはじめとする合成化学農薬によるハマダラカの防除が精力的に行われてきたが、その結果これらは合成化学農薬に対する抵抗性を著しく発達させた。また、双翅目を含む多くの害虫に対し殺虫結晶タンパクを産生する *Bacillus thuringiensis* (Bt) も広く利用されているが、合成化学農薬と同様に 1 次作用点の感受性の低下により抵抗性を獲得していることが報告されている。このことから合成化学農薬および Bt 剤に強く依存した防除法では標的昆虫に対し高度な薬剤抵抗性を発達させる結果に陥るのは必至であり、これらに代わる新たなアプローチが求められている。

(2) 昆虫寄生菌の内、不顕性感染性もしくは強病原性・弱病原性の系統を得るには、そのターゲットとする宿主体内から分離するのが最も効率的である。しかしながら、ハマダラカから分離された昆虫寄生性アナモルフ菌類は世界最大級のジーンバンクである American Type Culture Collection で 3 系統 (カ科分離源で 6 系統)、アメリカ農務省の昆虫寄生菌の微生物バンクで 10 系統 (カ科分離源で 32 系統) とわずかな系統しか登録されていない。

2. 研究の目的

(1) 継続的な蚊類の捕集を行い、分離・同定を実施することで蚊類を主な分離源とする自前の昆虫寄生性アナモルフ菌類の菌株ライブラリを構築し、さらなる研究の足がかりとする。

(2) ハマダラカ防除における合成化学農薬の代替防除技術の確立を視野に入れ、生物学的アプローチ、特に昆虫寄生菌の感染がハマダラカに与える影響を解明することに重点を置き研究を展開する。これらの研究から得られる知見は、亜致死性の増殖抑制効果に特化した新たな病原体媒介節足動物防除法の開発に向けた研究基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 日本国内および西アフリカのブルキナファソにおいて野生の成虫蚊を採取した。蚊類はハンドネットキャッチおよび CDC ライトとラップ、スプレーキャッチのいずれかの方法で採取した。これら蚊類虫体を滅菌水中で摩砕し、摩砕液を昆虫寄生菌選択培地上に平板し培養した。出現したコロニーを -80°C 条件化で保存するとともに、ゲノム DNA を抽出し、ITS 領域のシーケンス解析により同定を実施した。

(2) 菌株ライブラリの内、代表株 37 菌株について *An. stephensi* に対する感染性を評価

した。接種方法は跗節局所的に昆虫寄生菌を接種するため、濾紙に分生子懸濁液を滴下し (3.7×10^9 分生子/cm²)、30 分間その上を歩行させることで接種し、飼育チャンバーへ移した。5 日後、全個体を表面殺菌し、素寒天培地上に置床した。その後、菌の叢生が確認された個体を感染個体とした。

(3) 上記感染性試験で感染性を示した *Lecanicillium* 属菌 3 菌株と *Beauveria bassiana* 3 菌株の *An. stephensi* に対する病原性を評価した。接種方法は感染性試験と同様、分生子懸濁液を滴下した濾紙を用い跗節局所的な接種を実施した。接種後、飼育チャンバーへ移し、 27°C 、80%RH 条件下で飼育し、生存個体数の推移を全個体が死亡するまで観察した。

4. 研究成果

(1) 日本国内で採取した 1,026 頭の *Aedes* 属および 12 頭の *Culex* 属から合計 5,366 菌株の糸状菌を分離した。これらには *Cladosporium* 属や *Aspergillus* 属、*Geomyces* 属、*Microascus* 属、*Pseudocercospora* 属、*Trametes* 属、*Peniophora* 属、*Acremonium* 属、*Penicillium* 属 *Stachybotrys* 属、*Neonectria* 属、*Fusarium* 属など様々な菌類が含まれており、この内 233 菌株がシーケンス解析により昆虫寄生性アナモルフ菌類であることが明らかとなった。その内訳は主要昆虫寄生菌として知られる *Beauveria bassiana* 78 菌株、*B. brongniartii* 4 菌株、*Isaria farinosa* 29 菌株、*Lecanicillium* 属 94 菌株の他に、蚊類の卵寄生菌として知られる *Paecilomyces carneus* 4 菌株、サシガメの寄生菌として知られる *P. lilacinus* 1 菌株、クモ類寄生菌の *Lecanicillium alaneicola* 14 菌株、ダニ類寄生菌の *Simplicillium lamelicola* 8 菌株と *S. lanosoniveum* 1 菌株が分離された。また、これらの他に *Lecanicillium* 属菌と近縁で線虫寄生菌として知られる *Pochonia suchlasporia* 21 菌株や菌寄生菌の *L. fungicola* 等も分離された。

一方、ブルキナファソで分離された 1,685 頭の *Anopheles gambiae* より合計 13,080 菌株の糸状菌を分離し、この内 94 菌株が昆虫寄生性アナモルフ菌類であることが明らかとなった。その内訳は、*B. bassiana* 3 菌株、*I. farinosa* 1 菌株、*L. alaneicola* 77 菌株、*S. lanosonivium* 3 菌株となった。

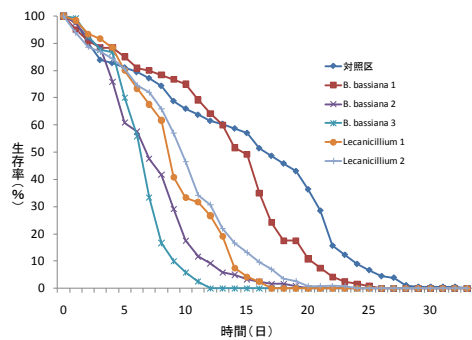
さらに、国産の 447 頭の *Aedes* 属と 5 頭の *Culex* 属の体表を殺菌し、体内のみから昆虫寄生菌の分離を試みたところ 731 菌株の糸状菌が分離され、その内 65 菌株が昆虫寄生性アナモルフ菌類であった。その内訳は、*B. bassiana* 41 菌株、*I. farinosa* 1 菌株、*I. fumosorosea* 1 菌株、*Lecanicillium* 属 22 菌

株であり、飛翔可能な状態の蚊類の昆虫寄生菌潜在感染率は 4.7% となった。また、*B. bassiana* と *Lecanicillium* 属菌の混合感染も観察された。

以上の結果より、合計 392 菌株を収蔵する蚊類由来に特化した昆虫寄生性アナモルフ菌類の菌株ライブラリの構築に成功した。

(2) (3) これら菌株ライブラリの内、代表菌株として 37 菌株を感染性試験に供試した。その結果、37 菌株中 13 菌株 (*Lecanicillium* 属菌 4 菌株、*B. bassiana* 7 菌株、*I. farinosal* 菌株、*P. carneus* 1 菌株) が *An. stephensi* 雌成虫に対し感染性を示した。

さらに、これら 13 菌株の内高い感染性を示した 5 菌株 (*Lecanicillium* 属菌 2 菌株および *B. bassiana* 3 菌株) の *An. stephensi* に対する病原性を評価した。対照区の半数致



図：昆虫寄生菌感染 *An. stephensi* の生存率

日数 (LT_{50}) が 15.2 日であったのに対し、最も高い病原性を示した *B. bassiana* 3 で 6.7 日と半数以下の LT_{50} 値を示した。*B. bassiana* 3 処理区では接種 5 日後から著しく死亡個体数が増加し、接種 12 日後には全個体が死亡した (上図)。感染症媒介蚊の防除においてその即効性を評価する一つの目安として、病原体がベクターに侵入して感染性を獲得するまでの期間、外部潜伏期 (Extrinsic incubation period: EIP) がある。つまり EIP の間に感染症媒介蚊を殺すことができれば、病原体媒介のリスクを抑制することができる。マラリア原虫の EIP が本条件下では約 10 日間であることを考慮すると、*B. bassiana* 3 はその感染症媒介蚊の防除効果およびマラリア媒介リスクの抑制効果が十分に期待できるレベルにあると考えられる。

一方、*B. bassiana* 1 の LT_{50} 値は 13.7 日であり、接種 15 日前後から死個体が増加する弱病原性を示した (上図)。本菌株は不顕性感染性ではないものの、接種後 2 週に亘り症状が顕在化しないため、今後の昆虫寄生菌感染による垂致死性密度抑制効果の評価にお

いて重要な鍵となると考えられる。

以上の結果から、蚊類は多様な昆虫寄生菌を保菌しており、それらを分離することで独自の菌株ライブラリを構築することに成功した。また、それらの中から感染症媒介蚊に対し高い病原性を有する菌株および弱病原性の菌株が検出された。これらライブラリに収蔵された菌株は将来的な感染症媒介蚊防除法の確立に向けた研究基盤となるであろう。また、今後これらの菌株が感染症媒介蚊の生存・繁殖・病原体媒介にどのような影響を与えるかを解析することで、蚊媒介性の感染症防圧に向けた重要な知見をもたらすと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 5 件)

①石山海嗣, 竹下隼也, 小池正徳, 福本晋也, 嘉糠洋陸, 相内大吾. *Anopheles stephensi* 雌成虫に対する蚊由来昆虫寄生性アナモルフ菌類の感染性の評価. G110. 博多 2011 年 3 月

②竹下隼也, 石山海嗣, 小池正徳, 福本晋也, 嘉糠洋陸, 相内大吾. 野生蚊由来の昆虫寄生性アナモルフ菌類の分離およびその潜在感染率の評価. G109 博多 2011 年 3 月

③相内大吾. 昆虫寄生菌を用いたベクターコントロール. 「昆虫寄生菌・昆虫寄生線虫研究の最前線」第 9 回昆虫病理研究会シンポジウム. S07. 富士吉田 2010 年 9 月 (招待講演)

④M. Ishiyama, M. Koike, S. Fukumoto, H. Kanuka, J. Takeshita and D. Aiuchi. Isolation of anamorphic entomopathogenic fungi from wild mosquitoes collected in Japan and Burkina-Faso. The 43rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. 141, Trabzon (Turkey). July 2010 (Corresponding author)

⑤石山海嗣, 小池正徳, 福本晋也, 嘉糠洋陸, 相内大吾. ブルキナファソおよび十勝管内における蚊由来昆虫寄生性アナモルフ菌類の探索. 第 54 回日本応用動物昆虫学会. 123. 千葉 2010 年 3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相内 大吾 (AIUCHI DAIGO)

国立大学法人帯広畜産大学・原虫病研究センター・助教

研究者番号: 50552783