

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850227

研究課題名(和文) 昆虫寄生菌感染ハマダラカのリアルタイム行動解析

研究課題名(英文) Real-time behavior analysis of entomopathogenic fungi infected Anopheles mosquito

研究代表者

相内 大吾 (Aiuchi, Daigo)

帯広畜産大学・畜産学部・助教

研究者番号：50552783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまで昆虫寄生菌によるハマダラカの防除研究は致死効果のみ評価されてきたが、本研究課題では宿主探索行動・吸血行動・産卵行動の3種の亜致死性の効果に着目して実施した。その結果、宿主探索行動では菌の感染により熱および色、匂いを認識できなくなることで、吸血行動では吸血率、吸血量が低下すること、産卵行動では卵巣の濾胞の発達が抑制され、産卵数および卵の孵化率が低下することが明らかになった。これらの行動阻害は感染症の媒介効率に直接影響するものと考えられ、昆虫寄生菌の感染により疫学的な意味において不活性なベクターを作り出すことが可能であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Control researches of Anopheles by entomopathogenic fungi have evaluated only virulence, however in this study, we focussed on sub-lethal effect including host seeking behavior, blood sucking behavior, ovipositional behavior. As a result, in host seeking behavior, fungus infected mosquito was less able to detect heat, color, and odor. In blood sucking behavior, the amount and rate of blood sucking were decreased by fungal infection. In ovipositional behavior, follicle development was suppressed and the number of oviposition and hatching rate were decreased. Inhibition of these behaviors will directly affect to efficiency of infectious diseases transmission. It shows that it is possible to generate inactivated vector in epidemiological sense by infection of entomopathogenic fungi.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：昆虫寄生菌 Beauveria bassiana 感染症媒介蚊 Anopheles stephensi ベクターコントロール 行動制御

1. 研究開始当初の背景

マラリアやウエストナイル熱、デング熱、黄熱、日本脳炎等は新興感染症または再興感染症であり、現在も世界的に大きな脅威となっている。これら感染症は全て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。この中でもマラリアは年間 863,000 人の死亡が世界中で報告されており、最重要節足動物媒介性感染症と呼んでも過言ではない。マラリアはマラリア原虫 (*Plasmodium* spp.) が引き起こす感染症であり、ハマダラカ属 (*Anopheles* spp.) によって媒介される。よって、マラリア対策の手法の一つとして、感染症媒介蚊の防除が従来から採られている。昨今、最も精力的に実施されている防除法として DDT をはじめとする合成化学殺虫剤の屋内壁への残留噴霧および殺虫剤練込み蚊帳法が知られている。しかし、既にこれら主要合成化学殺虫剤に対する感染症媒介蚊の感受性低下や著しい抵抗性の発達が確認されている (WHO, GLOBAL PLAN FOR INSECTICIDE RESISTANCE MANAGEMENT, 2012)。つまり、こうした従来の化学的防除法のみでは『薬効の喪失』という深刻な結果を招き、抵抗性の発達と新規薬剤の開発のイタチゴッコに陥るのは必至であり、これらに代わる新たな防除のアプローチが求められている。

一方、真菌の中には蚊類に寄生し死に至らしめる昆虫寄生菌が存在するが、蚊類の幼虫ステージの生息域が広範にわたり、成虫ステージが自由飛翔可能であることから昆虫寄生菌による蚊類の防除の有効性は疑問視されてきた。しかし、近年 Scholte et al. (Science, 2005) により昆虫寄生菌を効率的に蚊類に感染させる技術が開発され、昆虫寄生菌は有用な蚊類の生物防除資材として認知されつつある。また、申請者はこれまで蚊類に対する昆虫寄生菌を用いた代替防除技術の確立を視野に入れ、ハマダラカをターゲットとする蚊類由来の昆虫寄生性アナモルフ菌類に特化した菌株ライブラリを構築した。ここには現時点で日本国内および西アフリカのブルキナファソで採取された蚊類より分離された *Beauveria* 属菌、*Isaria* 属菌、*Lecanicillium* 属菌を主体とする 392 菌株もの昆虫寄生菌が超低温保存状態で収蔵されている。これら昆虫寄生菌のハマダラカに対する病原性バイオアッセイにより、対照区の半数致死日数が 16.6 日であるのに対し、*B. bassiana* 処理区では 5.8 日と非常に高い病原性を有する菌株が検出されている。

昆虫寄生菌は、(1) 経皮的に感染を成立させ、(2) 宿主昆虫の血体腔内で増殖後、(3) 敗血症を引き起こすことで宿主昆虫を殺す。通常、昆虫寄生菌の防除効果はこのよう一連の感染過程の結果もたらされる病原性のみ着目し、評価される。しかし、昆虫寄生菌は感染が成立してから死に至るまでの間

にタイムラグが生じるため、特に感染症媒介蚊に対する防除効果を評価する上では蚊類繁殖率および感染症伝播リスクの観点からも、その間の成虫の行動の変化を勘案しなければ総合的な防除効果を評価することはできない。また、昆虫寄生菌は様々な節足動物に対し、感染することで直接宿主を殺す致死効果だけではなく、多様な亜致死性の影響を与えることが知られている (Blanford et al., Science, 2005)。そこで本研究では、ハマダラカの生活環を完結させるために不可欠な 3 種類の行動パターンに着目し、昆虫寄生菌の感染がこれらの行動に与える影響を経時的・定量的に解析することを目的とし研究を展開した。

2. 研究の目的

まず一つ目の研究目的として、『宿主探索行動』の行動パターンの評価を挙げる。宿主探索行動は宿主由来の様々な誘因要素 (CO₂、熱、湿度、匂い、動き、色等) によって励起され、宿主への飛来が成功した場合のみ吸血が可能となる。よって、ハマダラカが標的を確実に認識し、吸血による効率的な栄養摂取を行うことは蚊類の生存において極めて重要な行動の一つであるといえる。次に、『吸血行動』の評価はそれ自身がマラリア伝播に関わる直接的な行動であると共に、ハマダラカの卵巣成熟・産卵のために必須であり、さらには吸血量が産卵数に直接関係するため疫学上大変重要な要素である。最後に、『産卵行動』の評価はハマダラカの生活環を完結させるだけでなく、次世代のポピュレーションサイズを決定し、種の保存に直結する重要な行動パターンである。以上のようにこれら 3 種類の行動パターンはドミノ的に連鎖し、いずれかの行動が阻害されても生活環の完結には至らない。また、宿主探索もしくは吸血行動活性の減少の効果はハマダラカのマラリア保有率の減少、宿主吸血率の減少、吸血ハマダラカ数の減少として現われ、マラリア原虫のベクターとしての機能の低下・喪失を招くであろう。さらに言い換えれば、もしハマダラカの生存期間中にこれらの行動が阻害され、実行されないのであれば、疫学的な意味において不活性なベクターであるといえる。

一方、これらの行動解析には一般に短期間でのチョイステストや帰結的パラメータ (例えば吸血量や総産卵数など) からの解析が行われてきた。しかし、昆虫寄生菌の感染の影響を理解するためには、感染の進行 (時間) と行動量の変化という二次元的な視点から総行動量を定量化する必要がある。申請者はこれまでに、蚊類の熱センシング行動を詳細に解析するために開発された、『自動行動アッセイ装置』を用いてハマダラカの光誘引行動解析を行ってきた。本装置は旧来より使われてきた olfactometer や wind tunnel のよう

な行動学的実験装置とは一線を描き、蚊類が疑似標的である熱源に到達した際に見られる行動を直接的に評価可能で、高い精度で蚊類の行動量を定量化できる。この装置は東京慈恵医科大学の嘉糠洋陸教授により開発され、蚊類の熱センシング行動が CO₂ の存在下で劇的に誘起されること、それが連続性の誘導であること (CO₂→熱) を世界に先駆けて見出した (Maekawa et al., Parasites & Vectors 2011)。本研究ではこの自動行動アッセイ装置を昆虫寄生菌感染ハマダラカの各種行動解析に運用可能な仕様に改良し、実験に導入することで効率的かつ網羅的な行動解析を実現することも目的とした。

野生の蚊類の 1 日の平均生存率は約 80% 程度とされており、マラリア感染宿主からの吸血後、蚊の体内で感染態のスポロゾイトを形成するのに 14 日間要することを考慮すれば、わずか 4% 程度の個体がマラリア伝播リスクを有するハマダラカであると言える。つまり、これらの個体が防除の真のターゲットである。よって、昆虫寄生菌の直接的な致死効果に加えて、昆虫寄生菌の感染が上述の行動に対し影響するのであれば、マラリアの伝播に大きなインパクトを与えることが可能である。本研究は、これまで定量化が困難であった『宿主探索行動』、『吸血行動』、『産卵行動』の総行動量に関し、自動行動アッセイ装置を導入することでこれらをリアルタイムに定量・解析し、世界で初めて昆虫寄生菌による総体的なハマダラカの防除効果を把握しようとするものである。これら行動学的アプローチによる新防除機構の解明は、全く新しい感染症媒介蚊防除法を構想する原動力となることが期待された。

3. 研究の方法

申請者は予め日本国内および西アフリカのブルキナファソで採取された蚊類より昆虫寄生性アナモルフ菌類を分離し、リファレンス可能な蚊類由来に特化した菌株ライブラリを構築していた。供試菌株はこのライブラリに収蔵されている 392 菌株の内、ハマダラカに感染性を示す代表株として *Beauveria bassiana*、*Isaria farinosa*、*Beauveria brongniartii*、*Lecanicillium* 属菌を用いて病原性と感染性を評価するスクリーニングを実施した。これにより、半数致死日数が 5.8 日と高い病原性を示す *B. bassiana* 1 菌株を選抜した。これら昆虫寄生菌のハマダラカへの接種は申請者らが確立した分子子を定着させた濾紙表面を歩行させる方法を用い、ハマダラカの附節先端局所的に昆虫寄生菌を付着させ、感染を成立させた。

一方、自動行動アッセイ装置は恒温インキュベータ内で自由飛翔するハマダラカの行動量を非侵襲的かつ経時的に定量できるだけでなく、単一の処理の効果抽出し解析することが可能な点で優れている。自由行動す

るハマダラカが熱源であるペルチェ素子に誘引されタッチダウンする際に、赤外線レーザーを遮断すると自動的にタッチダウン数をカウントするシステムとなっている。本研究では熱センシング行動の解析用に開発された初号機に改良を加え、昆虫寄生菌感染ハマダラカの行動解析用にシステムを再構築して運用する。具体的にはこれまで恒温インキュベータ内にアッセイ装置を設置していたものを人工気象器に変更し、温度・日長だけではなく湿度コントロールをも可能な仕様にする (全試験に亘って環境条件は 16 時間明期・27 °C・80%RH)。さらに、各種行動の解析に運用できるよう、ペルチェ素子に代わるそれぞれの目的に応じたターゲットを測定エリアに設置出来るようターゲットボックスを改変すると共に、データ集積モニタソフトのプログラムを長期間の解析が可能となるよう再構築した。

以下、供試する昆虫はネズミマラリアを媒介するステフェンスハマダラカ (*Anopheles stephensi*) で本研究室において累代飼育している系統を用いた。昆虫寄生菌感染ハマダラカが吸血飛来するにあたって宿主認識に利用する誘因要素に対する反応性の変化を評価した。本試験では各種の物理・化学的誘因刺激を単独で処理し、ケージ内の 60 匹の未吸血雌ハマダラカのターゲットへのタッチダウン数を 10 日間前後に亘って記録した。ターゲットの誘因要素はペルチェ素子 (熱)、CO₂ (匂い)、黒色紙 (色) を用い、感染の進行に伴うこれらターゲットへ誘引される行動量の変化を定量化した。CO₂ を用いた誘引試験では、自動行動アッセイ装置を用いることが困難であったことから、新たに Y 字管を用いたオルファクトメータを作成した。誘引源の CO₂ は、酵母が排出する CO₂ を利用し、各菌感染後日数における経時的な行動評価を実現した。以上の計画により昆虫寄生菌の感染によりハマダラカが宿主に接近できない、「アンチ・アクセス効果」の全貌を明らかにした。

昆虫寄生菌の感染がハマダラカの吸血行動に与える影響を行動量と繁殖率の変化から評価した。ケージ上部に疑似宿主としてパラフィルム内に封入された脱繊維血液を設置した。疑似宿主は昆虫寄生菌の感染初期・中期・後期のタイミングで導入し、ハマダラカの吸血率および吸血量を評価することで吸血行動量を定量化した。また、解剖学的手法により卵巣の発達程度および卵形成 (濾胞の発育) 程度を評価した。以上の計画を通じて昆虫寄生菌の感染によりハマダラカが産卵のための吸血が十分に行えない、もしくは血液を消化できない、「アンチ・フィーディング効果」について明らかにした。

宿主探索行動および吸血行動を完遂したハマダラカの産卵行動に与える昆虫寄生菌感染の影響を評価した。各菌感染後日数における吸血蚊ケージ内に産卵トレイを設置し

て産卵を促し、産卵数を計数した。産卵トレイは毎日交換し、そのまま飼育することで次世代の孵化率も併せて評価した。以上の計画により昆虫寄生菌の感染により産卵行動がとれない、もしくは卵形成が阻害されるなどの「アンチ・リプロダクション効果」の全容を明らかにした。

以上の宿主探索行動・吸血行動・産卵行動の3行動パターンおよびこれらを補完するパラメータに対する昆虫寄生菌感染の影響を網羅的に定量し、総合的な昆虫寄生菌の防除効果を明らかにした。

4. 研究成果

平成 25 年度は自動行動アッセイ装置を人工気象器内に移設し、温度・湿度コントロール下で各種行動を解析できるよう再構築した。当アッセイ装置を用いて昆虫寄生菌 *B. bassiana* を附節局所的に摂取したハマダラカの熱源に対する宿主探索行動を解析した。対照区では 10 日間の試験期間で 500~1000 回熱源へのタッチダウンが継続的に記録された。一方、昆虫寄生菌処理区では、菌接種後 2 日間は暗期に対照区と同様 1000 回を超える活発な熱源へのタッチダウンが記録されたが、菌接種 3 日後から急激に熱源へのタッチダウン数が 100 回前後に減少した。また、ターゲットとして黒色紙(色)を用いた試験では、対照区では 10 日間の試験期間で明期に 900~1300 回の黒色紙へのタッチダウンが継続的に記録された。一方、昆虫寄生菌処理区では、菌接種 5 日間は明期に 900~1300 回のタッチダウンが認められ、昆虫寄生菌による視認による宿主探索行動への影響は認められなかった。しかし、菌接種 6 日後から黒色紙へのタッチダウン数は徐々に減少することが明らかとなった(300 回)。これまで昆虫寄生菌による害虫防除研究は主に対象となる害虫の生子を基準にその効果が評価されてきた。上述の研究成果により、昆虫寄生菌が直接的に害虫を致死する以前にも様々な亜致死性の効果を示すことが明らかとなった。つまり、昆虫寄生菌の感染によりハマダラカは、熱および色を認識することが不可能となり、結果として宿主を認知出来なくなる可能性が示された。宿主を認知出来ない個体は際有的に吸血が出来ないことを意味し、昆虫寄生菌の感染により疫学的な意味において不活性なベクターを人工的に作り出すことに成功したと言える。また、その影響が現れるまでに熱探知と視認間でタイムラグが生じていることから、両認知能力に与える影響はそれぞれ異なるメカニズムによって生じているものと推察される。

平成 26 年度は前年度に確認した熱源へのハマダラカの誘引性に関して、より詳細なデータを採ることを目的とした。これまで採用してきた附節局所的な昆虫寄生菌接種法ではハマダラカの附節のみならず口吻にも菌

が付着することが明らかとなった。そこで、昆虫寄生菌を附節と口吻に分けて接種したところ、熱への誘引が口吻接種では 3 日後から急激に減少するのに対し、附節接種では徐々に減少することが明らかとなり、ハマダラカの早期の致死には口吻経路の感染が重要であることを証明した。また、オルファクトメータを用いた匂い(CO₂)への誘引試験では、対照区において 60 - 80%の個体が匂いに誘引されるのに対し、菌接種区では誘引率が 22%にまで減少した。したがって、昆虫寄生菌に感染したハマダラカは匂い源を認識できないものと考えられる。さらに、昆虫寄生菌感染個体の吸血率を評価したところ、対照区では 63 - 80%の個体が吸血するのに対し、菌接種個体では菌接種 3 日後から吸血率が 30%程度に減少した。また、その吸血した 30%の個体の吸血量も対照区では 1 個体あたり 2.6mg であるのに対し、菌接種区では 1.9mg と大幅に吸血量が減少した。以上の結果からハマダラカは昆虫寄生菌に感染することで、宿主探索の鍵となる熱や色だけでなく匂いも認識できなくなることが明らかとなった。さらに、宿主探索行動のみならず、吸血率や吸血量といった吸血行動にも影響を与えることから、昆虫寄生菌は多様なアプローチによってベクターを不活性化していると言える。

平成 27 年度は前年度の結果を踏まえ、吸血行動から産卵行動への一連の行動に関する項目を評価した。吸血後、卵巣の濾胞の発達程度を評価したところ、対照区で濾胞の発達率が 90%程度であるのに対し、昆虫寄生菌接種個体では菌感染 3 日後から濾胞発達率は低下し、5 日後には 60%と有意に低い値を示した。また、産卵数は菌感染 2 日後から有意に低い値を示し、菌感染 3 日以降の吸血個体の産卵数は対照区の半分以下となった。さらに、これら卵の孵化率を評価したところ、対照区では 80%以上の値を示したのに対し、昆虫寄生菌感染個体は菌感染 4 日後から孵化率が低下し、6 日後で 60%と有意に低い値を示した。以上の結果から、ハマダラカは昆虫寄生菌に感染することで吸血行動を阻害され、卵巣の濾胞の発達程度の低下、産卵数の減少、次世代の孵化率の低下を引き起こすことが明らかとなった。したがって、昆虫寄生菌の感染は宿主探索行動と吸血行動の低下を引き起こすことでマラリア伝播リスクを低減するだけではなく、次世代の個体群サイズにも大きく影響を与えていると考えられる。一方、これまでの研究で用いた昆虫寄生菌は高病原性系統であったことから、ハマダラカの行動を評価する際に致死の影響を大きく受けるという課題があった。そこで、低病原性系統の選抜を行い、感染力は有するものの病原性が低い系統を見出した。これにより、菌感染がハマダラカの行動に与える影響を純粋に評価できることが期待された。しかし、これら低病原性系統は吸血率および吸血量、

産卵数、孵化率のいずれにも影響を与えることは無かった。期待された純粋な行動変化の評価は達成されなかったものの、今後両系統の特製の比較により、ハマダラカの行動に影響を与える要因を解明する材料となることが期待される。

以上の研究成果より、昆虫寄生菌はハマダラカを致死するだけではなく、実に多様な方面からハマダラカの行動を変化させていることが明らかとなった。これまでのハマダラカの生物防除研究は、ハマダラカそれ自身の生死のみに着目し、個体を殺すことで病原体の伝搬を阻止するというコンセプトであった。しかし、本研究課題の結果を踏まえると、昆虫寄生菌の感染により宿主探索行動が阻害され、宿主に到達した個体の吸血行動が阻害され、さらに吸血を行った個体の産卵行動が阻害され、産卵された次世代の孵化も阻害されることが示された。これらの行動変化により病原体伝播リスクは格段に低下し、次世代の再生産も大きく低減されるものと考えられる。つまり、昆虫寄生菌に感染したハマダラカは生物としては生きているが、ベクターとしては死んでいる状態にあると言える。本研究は、この不活化したベクターを人工的に作出することが可能であることを示しており、今後全く新しいコンセプトに基づく防除技術や防除資材の開発につながることを期待される。

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)

[雑誌論文](計 1件)

M. Ishii, J. Takeshita, M. Ishiyama, M. Tani, M. Koike, and D. Aiuchi. Evaluation of the pathogenicity and infectivity of entomopathogenic hypocrealean fungi, isolated from wild mosquitoes in Japan and Burkina Faso, against female adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Fungal Ecology*. 15: 39-50 (2015)
doi:10.1016/j.funeco.2015.02.002 (査読有)

[学会発表](計 9件)

M. Ishii, M. Koike, and D. Aiuchi. Entomopathogenic fungus inhibits blood feeding and egg production of mosquito. 第60回日本応用動物昆虫学会. 138, 大阪府立大学(大阪府・堺市) 2016年3月
M. Ishii. Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana sensu lato* inhibits propagation of malaria mosquito *Anopheles stephensi*. The 2nd Tokyo Vector Encounter. Tokyo (Japan).

March 2016 (招待講演)

D. Aiuchi. Behavioral control of anopheline mosquito by entomopathogenic fungi: Death as a vector. JSPS Core-to-Core Program/International Symposium on Frontier Science of Pathogen-transmitting Vectors. 22-23 Tokyo (Japan). February 2015. (招待講演)

M. Ishii, M. Koike, and D. Aiuchi. *Beauveria bassiana* inhibits host seeking behavior of *Anopheles stephensi*. The 48th annual meeting of the Society for invertebrate Pathology. 83, Vancouver (Canada). August 2015

石井嶺広, 小池正徳, 相内大吾. 昆虫寄生菌は感染症媒介蚊の宿主探索行動を阻害する. 第59回日本応用動物昆虫学会. 144, 山形大学(山形県・山形市) 2015年3月
石井嶺広, 小池正徳, 相内大吾. 昆虫寄生菌による病原体ベクターの行動制御~ベクターとしての死~. 第11回昆虫病理研究会シンポジウム, 富士カーム(山梨県・富士吉田市) 2014年9月(招待講演)

M. Ishii, M. Koike, and D. Aiuchi. Behavioral control of malarial mosquito by entomopathogenic fungi: Death as the vector. The 47th annual meeting of the Society for invertebrate Pathology. 109, Mainz (Germany). August 2014

石井嶺広, 小池正徳, 相内大吾. 昆虫寄生性糸状菌による感染症媒介蚊の宿主探索行動の行動抑制~ベクターとしての死~. 第58回日本応用動物昆虫学会. 169, 高知大学(高知県・高知市) 2014年3月.

M. Ishii, M. Koike and D. Aiuchi. Histopathological observation of infection dynamics of *Beauveria bassiana* in adult female *Anopheles stephensi* using Grocott stain. The 46th annual meeting of the Society for invertebrate Pathology. 88, Pittsburgh (USA). August 2013

[図書](計 0件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

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・畜産学部・助教

研究者番号：50552783