

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580076

研究課題名(和文)イモゾウムシ病原性原虫の病理学および疫学的研究

研究課題名(英文)Pathological and epizootiological studies of a Farinocystis isolated from the West Indian sweet potato weevil

研究代表者

青木 智佐(Chisa, Yasunaga-Aoki)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20264103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：イモゾウムシ病原性原虫の感染増殖様式および生活環を解明するため、感染イモゾウムシの組織切片を経時的に作製して顕微鏡下で観察した。本原虫は、接種1日後にスポロゾイトが血体腔に侵入した後、一連の複雑な生活環を示した。その一部は本原虫特異的と考えられ、新規の感染増殖様式をもつ可能性が示唆された。次に、本原虫のリボソームRNA遺伝子の一部塩基配列をもとに特異的なプライマーを設計し、PCRを用いた原虫感染簡易検出法を開発した。この方法を利用して本原虫の宿主範囲は非常に狭いことが確認された。また、原虫オーシストの人工脱囊法について検討し、化学的処理後に物理的処理を行う有効な2つの方法を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：A *Farinocystis neogregarine* parasite was isolated from mass-reared colonies of the West Indian sweet potato weevil at the facility of Okinawa Prefectural Plant Protection Center (OPPPC) in 2004. First, development and life cycle of the *Farinocystis* in host weevils were investigated. At 1 day to 2 days post-inoculation, the sporozoites migrated to the fat body and then developed to represent a merogony, gametogony, and sporogony during its complex life cycle. Second, a simple method for detection of the *Farinocystis* infection in OPPPC weevil colonies was successfully developed. Third, the coleopteran insects were inoculated with the *Farinocystis* oocysts and its infection was examined using PCR. The result suggested that the *Farinocystis* has a very narrow host range. Lastly, artificial excystation of the *Farinocystis* oocysts was investigated, and it was revealed that the procedures with a chemical treatment following a physical grinding were effective for the oocyst excystation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：イモゾウムシ *Farinocysts* sp. 生活環 原虫感染簡易検出法 宿主範囲 オーシスト人工脱囊法

### 1. 研究開始当初の背景

イモゾウムシ West Indian sweet potato weevil (学名 *Euscepes postfasciatus*) は、西インド諸島原産のサツマイモの重要害虫である。日本での発生は奄美大島以南の南西諸島および小笠原諸島に限られており、現在その分布拡大を防ぐために特殊害虫に指定され、植物防疫法により厳重に規制されている。

沖縄県では、不妊虫放飼法を軸としたイモゾウムシの根絶防除事業が展開されている。この不妊虫放飼法には、大量の不妊化用イモゾウムシ成虫の確保が必至である。沖縄県病害虫防除技術センターでは、2002年からイモゾウムシの施設内大量増殖が始まり、2004年8月初旬までは安定した生産数を確保していた。ところがそれ以降、不妊化用成虫生産数は急激に低下し、成虫の短命化と産卵数の減少が認められた。そこで、それら成虫の磨砕液を検鏡したところ、原虫オーシストが検出された。

著者らはこれまでの研究から、本原虫をアピコンプレックス門、種虫綱、グレガリナ(簇虫)亜綱、新グレガリナ(裂殖簇虫)目、*Farinocystis* 属の1種であると推定した(森田ら、2007)。また、本原虫感染によってイモゾウムシの短命化や産卵数の減少が引き起こされることが明らかとなり、将来的にIPM(総合的病害虫管理)の1つとして、本原虫をイモゾウムシの微生物的防除に利用できる可能性は十分に考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、現在沖縄県で展開中のイモゾウムシ根絶防除事業での不妊虫用イモゾウムシにおける原虫病の蔓延を防ぐ手段を講じるとともに、本原虫を利用したイモゾウムシの微生物的防除の可能性を検討することを大きな目的として、本原虫の生物学的諸性状、特に病理学および疫学的性状を解明しようとするものである。

具体的には、(1)本原虫の感染増殖様式および生活環を明らかにする、(2)本原虫のリボソーム RNA 遺伝子の一部塩基配列を決定し、本原虫特異的な配列をもとにPCR法を用いた原虫感染簡易検出法を開発する、(3)その原虫感染簡易検出法によって、サツマイモ塊根内のイモゾウムシ個体群における本原虫感染率を調査するとともに、(4)各種鞘翅目昆虫を供試して本原虫の宿主範囲および病原性を調査する、また、(5) *in vitro* でのより詳細な本原虫の生活環および感染増殖様式を解明するため、感染単位スポロゾイトをオーシストから人為的に脱囊させるオーシスト人工脱囊法について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) イモゾウムシ病原性原虫の感染増殖様式および生活環の解明

沖縄県病害虫防除技術センターで大量増

殖中に死亡したイモゾウムシ成虫を、滅菌水中で磨砕し、脱脂綿で濾過した。原虫オーシストの精製は、Percoll<sup>®</sup>密度勾配遠心法(安永ら、1991)を改変して行った。まず、脱脂綿濾過試料を30% (w/w) Percoll<sup>®</sup>上に重層し、1,800 g、25°C、20分間遠心した。得られた沈殿を回収し、滅菌水に再浮遊させたものを粗精製オーシストとした。次に、60,000 g、6°C、20分間遠心して形成した30% (w/w) Percoll密度勾配上に、粗精製オーシスト浮遊液を重層し、1,800 g、25°C、20分間遠心した。下方に形成されたオーシストのみを含むバンドを回収した後、滅菌水で遠心洗浄し、精製オーシストを調製した。

イモゾウムシ幼虫および成虫への原虫オーシストの接種は、浸漬による経口接種を行った。すなわち、精製オーシスト浮遊液( $10^8$  oocysts/ml)中にイモゾウムシ幼虫または成虫を一定時間浸漬し、経口的にオーシストを摂食させた。

オーシストを接種したイモゾウムシ個体を経時的に採取し、カルノア液(エタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1, v/v/v)に2日間浸漬して固定した。続いて、95%エタノールで脱水処理を行った後、Technobit 7100 (Kulzur Wehrheim) で包埋し、ミクロトーム(ライカ回転ミクロトーム RN2155, ライカ)で5 μmの切片を作製した。切片をヘマトキシリン・エオシン染色した後、封入してプレパラートを作製して、光学顕微鏡(Axioplan 2 Universal Microscope, ZEISS)下400~1,000倍で観察した。

(2) 本原虫リボソーム RNA 遺伝子の一部塩基配列の決定とイモゾウムシにおける原虫感染簡易検出法の開発

ゲノムDNAの抽出のために、原虫オーシストペレットを1.5 mlチューブ中でチューブミキサーによって磨砕した。磨砕試料をDNA抽出バッファー(100 mM Tris-HCl (pH 9.5)、1 M KCl、100 mM EDTA) 500 μlに懸濁して攪拌した。95°Cで10分間静置した後、再び攪拌し、滅菌超純水で50倍に希釈した。

プライマーの設計へ向け、*Farinocystis* と同目に属し、ヒアリ *Solenopsis invicta* に感染する *Mattesia* YHD株の検出に使用されたプライマーペア p10・p37 (表1) (Valles and Pereira, 2003) を供試してPCRを行った。このPCR増幅産物のダイレクトシーケンスによって塩基配列を決定し、その配列をもとに本原虫に特異的なプライマーペア Pgps1・Pgps2 および Pgps3・Pgps4 を設計した(表1)。次に、本原虫の18S rDNAの塩基配列を用いて、BLAST検索により相同性の高い8種の原虫を選抜し、それらの28S rDNAにおける保存領域をもとに Hall (Reverse primer) を設計した。本プライマーおよび上述のPgps3を用いたPCRにより得られた4.6 kbpの増幅産物のダイレクトシーケンスによって、本増幅産物の塩基配列を決定した後、ITS1およびITS2領域にそれぞれ

Hlsp1( Forward primer )、Hlsp2( Reverse primer ) を設計した (表1)。

PCR では、ゲノム DNA 0.5  $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer for Hybriplol( BIOLINE )1  $\mu$ l、2 mM dNTP 1  $\mu$ l、50 mM MgCl<sub>2</sub> 0.3  $\mu$ l、100  $\mu$ M Forward primer 0.05  $\mu$ l、100  $\mu$ M Reverse primer 0.05  $\mu$ l、0.025 U/ $\mu$ l Hybriplol ( BIOLINE ) 0.05  $\mu$ l の反応液を使用した。また、反応条件は 96 $^{\circ}$ C 2 分、98 $^{\circ}$ C 10 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒の 35 サイクルとした。

表1 本研究で利用または新たに設計したプライマー

p10	5' GAAAACGGCCATGCACCAC 3'
p37	5' GGAGARGRAGCCTKAGARAYSG 3'
Pgsp1	5' GTTGCTGCATCTTCTTCAGC 3'
Pgsp2	5' CATAAGGTGCTGAAAGTGTCG 3'
Pgsp3	5' TTTTGCTAAGGAAGCGTGGT 3'
Pgsp4	5' GTCGTATGAATCACAATTCCAATCT 3'
Hlsp1	5' CTAAGTTGAAGTCTTTTGCTT 3'
Hlsp2	5' ATTCCTCGGCAGCTCACAG 3'

### (3) イモゾウムシ病原性原虫の宿主範囲および病原性の調査

供試した鞘翅目昆虫は、鞘翅目コガネムシ上科コガネムシ科のアオドウガネ *Anomala albopilosa albopilosa*、シロテンハナムグリ *Pr-otaetia orientalis submarumorea*、およびカブトムシ *Trypoxylus dichotomus*、ハムシ上科ハムシ科のウリハムシ *Aulacophora indica*、マメゾウムシ科のヨツモンマメゾウムシ *Callosobruchus maculatus* およびアズキゾウムシ *Callosobruchus chinensis*、ゾウムシ上科ミツギリゾウムシ科のアリモドキゾウムシ *Cylas formicarius*、オサゾウムシ科のコクゾウムシ *Sitophilus zeamais*、ゾウムシ科のアルファルファタコゾウムシ *Hypera postica*、そしてゴミムシダマシ上科ゴミムシダマシ科のコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* である。

原虫オーシストの鞘翅目昆虫への接種には、 $1 \times 10^7$  oocysts/ml に調整した精製オーシスト浮遊液を用いた。オーシスト浮遊液を、コガネムシ科昆虫には 10  $\mu$ l 経口接種した。ハムシ上科、ゾウムシ上科およびゴミムシダマシ科昆虫には、オーシスト浮遊液に 5 分間浸漬することにより接種した。その後、原虫オーシストを接種した昆虫を 25 $^{\circ}$ C で 2 週間飼育した。

原虫感染の有無は、前述(2)の原虫感染簡易検出法を用いて、本原虫特異的増幅産物の検出により判断した。供試昆虫を滅菌水で 30 分間洗浄し、体表に付着したオーシストを除去した後、脂肪体を摘出した。摘出した脂肪体を検体として、同様に PCR を行った。また、供試昆虫の組織固定切片を前述(1)と同様の方法で作製し、光学顕微鏡下 400 ~ 1,000 倍で観察を行うことによっても、感染の有無を確認した。

### (4) 原虫感染簡易検出法を用いたサツマイモ塊根内での原虫感染率の調査

サツマイモ塊根内のイモゾウムシ個体における原虫感染率を調査するため、累代的にサツマイモを与えて飼育したイモゾウムシ系統の個体をサツマイモ 1 塊根から 100 頭、人工飼料育個体にサツマイモを与えて産卵させた第 3 世代をサツマイモ 3 塊根から 100 頭ずつ採取した。採取したイモゾウムシを 1.5 ml チューブ中でチューブミキサーにより磨砕した後、(2)と同様の方法でゲノム DNA を抽出し、PCR により原虫感染率を調査した。次に、サツマイモ塊根外に脱出後の成虫における原虫感染率を調査するため、任意にサツマイモ飼育系統から 100 頭、人工飼料育個体にサツマイモを与えた第 2 世代から 100 頭を採取し、同様にゲノム DNA を抽出した後、PCR を行った。

### (5) オーシスト人工脱囊法の検討

感染単位のスプロゾイトをオーシストから脱囊させる、オーシスト人工脱囊法について検討した。

化学的処理では、まず、オーシスト浮遊液 ( $10^6 \sim 10^8$  oocysts/ml) を遠心して、オーシストペレットを得た。このペレットに対し、以下の処理を行った。オーシストペレットを 2 mM タウロコール酸ナトリウムに懸濁し、27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。オーシストペレットを 2.2% NaHCO<sub>3</sub>、4 mM タウロコール酸ナトリウム、0.04% トリプシンに懸濁し、27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。オーシストペレットを 0.4% トリプシン、0.75% タウロコール酸ナトリウムに懸濁し、27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。オーシストペレットを 0.75% タウロコール酸ナトリウム、2.5 mM MgCl<sub>2</sub> に懸濁し、27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。トリプシン濃度による脱囊数の変化を調査するため、オーシストペレットを 1%、2.5%、および 5% トリプシンに懸濁し、27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。また、pH の効果を調査するため、オーシストペレットを 2 mM タウロコール酸ナトリウム (pH 5.5) に懸濁して 27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した後、PBS (pH 8.0) で洗浄した。再び、2 mM タウロコール酸ナトリウム (pH 8.0) に懸濁し、27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。さらに、次亜塩素酸ナトリウム処理の効果を調査するため、オーシストペレットを有効塩素濃度 0.1% の次亜塩素酸ナトリウムに懸濁し、直ちに PBS で洗浄した後、2 mM タウロコール酸ナトリウム (pH 8.0) あるいは 5% トリプシンに懸濁して、27 $^{\circ}$ C で 2 時間処理した。

物理的処理では、上述の化学的処理を行った後、ペレットを PBS で洗浄し、少量の PBS 中でチューブミキサーを用いて 30 秒間、1 分間、3 分間、または 5 分間破砕した。

オーシスト脱囊率は、化学的処理および物理的処理後、光学顕微鏡下 400 倍でオーシスト 1,000 個のうち脱囊しているオーシストの数を計測することにより評価した。各試験は

3 回反復し、Duncan の多範囲検定法 (有意水準 5%) により統計処理を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) イモゾウムシ病原性原虫の感染増殖様式および生活環の解明

イモゾウムシに経口的に摂取されたオーシストは、宿主の中腸で脱嚢し、接種 1 日後にはスポロゾイトが血体腔に観察された。スポロゾイトは長径 10~15  $\mu\text{m}$ 、短径 2~3  $\mu\text{m}$  で、接種 2 日後までに、中腸から血体腔、脂肪体へと移動した。増員増殖期になると、スポロゾイトは丸い形状となり、小核メロントに成長した。接種 2~4 日後には、宿主脂肪体中に、球状で多核の小核メロントが観察された。小核メロントは様々な大きさを呈し、約 30  $\mu\text{m}$  前後で複数の核を有していた。小核メロゾイトには 2 つの型、すなわち、球形もしくは半球形で単核のもの (図 1A-a) と、細長いスポロゾイトに類似した蠕虫状のもの (図 1A-b) が認められた。前者の型の小核メロゾイトは大核メロゾイトへと成長したが、後者の型の小核メロゾイトは接種 5 日後以降も観察され続けた。接種 6 日後から観察された大核メロントは球状で、直径 30~35  $\mu\text{m}$  程度であった。大核メロントは出芽分裂して、直径 12  $\mu\text{m}$ ~13  $\mu\text{m}$  の大核メロゾイトを形成した。大核メロゾイトは球形もしくは半球形を呈し、大きな核を中心に 1 つ有していた。高感染率の宿主個体では、脂肪体のほとんどが大核メロントおよび大核メロゾイトで占められていた。接種 7 日後には、半球形の大核メロゾイトは対となり (図 1B)、ガメトを形成した (図 1C)。接種 7~15 日後には、ガメトシストが観察された (図 1D)。ガメトシストは約 20 個前後の核を含み、それらがガメトを形成した後、接合して 10 個前後の球状のザイゴートを形成した (図 1E)。その後、ザイゴートは固いオーシスト殻で覆われ始め、オーシストが形成されるに至った (図 1F)。8 個以上のオーシストを含むガメトシストが多く認められ、接種 13 日後には、成熟したオーシストがガメトシストから遊離して血体腔へ放出された。

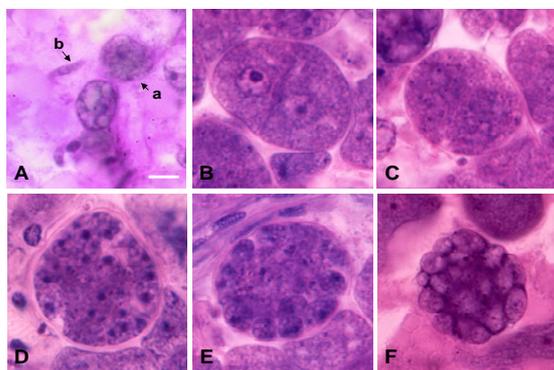


図 1 本原虫の生活環中に観察された原虫細胞 (Bar=10  $\mu\text{m}$ )

代表的な鞘翅目昆虫病原性新グレガリナ目原虫である *Mattesia* 属原虫 (Brooks, 1988) および *F. tribolii* (Ashford, 1968) の生活環と比較すると、本原虫の生活環では小核メロゾイトには 2 つの型が存在し、球形または半球形で単核の型は *M. trogodermæ* および *F. tribolii* に類似した形態であった。しかし、細長い蠕虫状の型はスポロゾイトに類似した細胞で、最初に認められた接種 5 日後からオーシストが成熟し終わる接種 15 日後まで継続して観察され、*M. trogodermæ* および *F. tribolii* の生活環では確認されないものであった。また、*F. tribolii* の一世代所要時間は 7 日であったが、本原虫ではその約 2 倍の 13~14 日を要した。

##### (2) イモゾウムシにおける原虫感染簡易検出法の開発

本研究で設計したプライマー Pgps1 (Forward primer) を用いた場合、Reverse primer として Pgps2 および Pgps4 のいずれのプライマーを供試しても、本原虫に非特異的な増幅産物が多数確認された。また、精製オーシストからの抽出 DNA であっても、明瞭な本原虫特異的な増幅産物は検出されなかった。Pgps3 (Forward primer) を用いた場合は、Reverse Primer として Pgps2 および Pgps4 を供試すると、明瞭な本原虫特異的な増幅産物が検出された。この際、Pgps3・Pgps2 のプライマーペアにおいては、非特異的な増幅産物は検出されなかったが、Pgps3・Pgps4 のプライマーペアにおいては、少量ながら非特異的な増幅産物が検出された。

本原虫の ITS 領域に特異的なプライマーペア Hlsp1・Hlsp2 を新たに設計して PCR を行ったところ、458 bp の本原虫特異的な増幅産物が得られた。本増幅産物は内部に *EcoRI* の認識配列を含んでおり、RFLP 解析に有効であると考えられた。また、本プライマーペアの感度は  $10^4$  oocysts/0.5 ml であり、原虫の簡易検出法として利用できるものであった。さらに、PCR 酵素として HybriPol (BIOLINE) を用いることにより、簡便にゲノム DNA を抽出することができる上、抽出 DNA の精製なしでも PCR に供試することが可能となった。

##### (3) イモゾウムシ病原性原虫の宿主範囲および病原性の調査

数種鞘翅目昆虫に原虫オーシストを接種し、感染の有無を PCR 法で確認した結果、コガネムシ科、ゴミムシダマシ科およびハムシ上科マメゾウムシ科昆虫では、本原虫特異的な増幅産物を検出することはできなかった。ハムシ上科ハムシ科のウリハムシでは 5 個体中 1 個体で、一方、ゾウムシ上科昆虫では、アリモドキゾウムシで 100 個体中 15 個体、コクゾウムシでは 10 個体中 9 個体、アルファルファタコゾウムシでは 10 個体中 1 個体で本原虫特異的な増幅産物が得られた。各個体の組織固定切片を作製し、光学顕微鏡下

で観察したところ、コガネムシ科、ゴミムシダマシ科およびハムシ上科の各昆虫では、非接種個体と接種個体の間で脂肪体の性状に違いは認められなかった。一方、ゾウムシ上科昆虫では、本原虫のスポロゾイトと思われる原虫細胞が脂肪体の間隙に観察された。しかし、感染イモゾウムシの脂肪体中で見られる増員増殖期以降の原虫細胞は観察されなかった。

コガネムシ科、ゴミムシダマシ科およびマメゾウムシ科昆虫では、PCRによる検出、組織固定切片の観察のいずれにおいても、本原虫の感染は認められなかった。ハムシ科ウリハムシでは、PCR検出法により1個体に本原虫特異的と見られる増幅産物が検出されたが、組織固定切片の観察では原虫細胞は観察されなかった。このことから、ウリハムシも本原虫に非感染であると考えられた。一方、ゾウムシ上科昆虫では、PCR検出法で一部の個体に本原虫特異的な増幅産物が認められ、組織固定切片にはスポロゾイト様原虫細胞も観察されたが、増員増殖期以降の原虫細胞を観察することはできなかった。従って、本原虫の宿主範囲はゾウムシ上科に限られる、非常に狭いものと判断された。

ゴミムシダマシ科コクヌストモドキは、*Farinocystis* 属の唯一の記載種である *F. tribolii* の宿主として知られている (Ashford, 1968; Rabindra et al., 1981)。しかし、イモゾウムシから分離された *Farinocystis* 属の1種と推定される本原虫は、コクヌストモドキに感染しなかった。このことから、本原虫は新種か、あるいは、長期間イモゾウムシを宿主としてきたことにより病原性が変化した可能性があるかと推察された。

#### (4) 原虫感染簡易検出法を用いたサツマイモ塊根内での原虫感染率の調査

サツマイモ4塊根から各100頭のイモゾウムシを採取してPCRを行った結果、サツマイモ飼育系統では6個体、人工飼料育系統にサツマイモを与えた第3世代では0~2個体の原虫感染が認められた。しかし、サツマイモ塊根内のほとんどの幼虫、蛹、および羽化直後の成虫においては、原虫の感染は検出されなかった。また、サツマイモ塊根外に脱出した成虫を供試してPCRを行ったところ、原虫感染率はサツマイモ飼育系統で59個体、人工飼料育個体にサツマイモを与えた第2世代では8個体で原虫感染が認められた。本原虫病が垂直伝播すると仮定すると、サツマイモ飼育系統において成虫の半数以上が感染していたにもかかわらず、サツマイモ塊根内の幼虫、蛹、および羽化直後の成虫にほとんど感染が見られないということは考えにくい。従って、本原虫病では、経卵巣伝播は起こらないと判断された。サツマイモ塊根外の成虫においては、サツマイモ飼育系統で約60%の原虫感染率を示したにもかかわらず、人工飼料育個体にサツマイモを与えた第2世代での

原虫感染率が約10%であったことから、本原虫感染の伝播は緩慢であると考えられた。

#### (5) オーシスト人工脱囊法の検討

2 mM タウロコール酸ナトリウムによる化学的処理後に物理的処理を行った結果、本原虫オーシストの脱囊率は破碎時間に比例して増加し、5分間の物理的破碎を行った実験区では約20%の脱囊率が得られた。2.2% NaHCO<sub>3</sub>、4 mM タウロコール酸ナトリウム、0.04%トリプシンによる化学的処理後に物理的処理を行った結果、やはり脱囊率は破碎時間に比例して増加し、5分間の破碎により10%前後の脱囊率となった。一方、0.4%トリプシン、0.75%タウロコール酸ナトリウムによる化学的処理後に物理的処理を行った結果、5分間の破碎によっても10%に満たない低い脱囊率となった。また、0.75%タウロコール酸ナトリウム、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>による化学的処理後に物理的処理を行った結果、5分間の破碎で10%前後の脱囊率が得られた。

トリプシン濃度による脱囊数の変化を調査した結果、コントロールおよびいずれのトリプシン濃度処理区でも、脱囊したオーシスト数は破碎時間に比例して増加する傾向にあった。また、5%トリプシン処理後5分間の破碎を行った区では、1,000個中100個以上の脱囊したオーシストが見られた。

イモゾウムシが属する鞘翅目ゾウムシ科の消化管内は、pH 5.2からpH 8.4というpH勾配が存在する。また、2 mM タウロコール酸ナトリウムによる化学的処理と物理的処理により、20%前後の脱囊率が得られたことより、オーシストをpH 5.5のタウロコール酸ナトリウムで処理した後に、pH 8.0のタウロコール酸ナトリウム、あるいは、5%トリプシンで処理することによる脱囊率への効果を調査した。その結果、どちらの処理区においても脱囊率は5%前後となり、pHを変化させることによる効果は認められなかった。

次亜塩素酸ナトリウムによる処理は、トリプシンの働きを効率的にするとの報告がある (Smith et al., 2005)。また、昆虫培養細胞系を使用した *in vitro* 実験でコンタミネーションを防ぐ手段になると考えられることから、次亜塩素酸ナトリウムによる前処理を用いることを試みた。様々な脱囊法で供試されている次亜塩素酸ナトリウム濃度では、ダメージを受けたオーシストが数多く観察されたことから、ダメージが比較的低い0.1%次亜塩素酸ナトリウムによる前処理を行った。続いて、2 mM タウロコール酸ナトリウムまたは5%トリプシンによる処理を行い、さらに物理的処理を行った結果、全体的に脱囊率は低いものとなった。しかし、2 mM タウロコール酸ナトリウムによる処理よりも5%トリプシン処理の方が、脱囊率が高くなる傾向が認められた。

以上のことより、以下の2つのオーシスト

人工脱囊法が有効であると判断された。  
オシストベレットを2 mM タウロコール酸  
ナトリウムに懸濁、27°C で2 時間処理 PBS  
で2 度洗浄 少量のPBS 中でチューブミキ  
サーにより5 分間以上破碎。 オシストベ  
レットを0.1%次亜塩素酸ナトリウムに懸濁  
PBS で2 度洗浄 5%トリプシンに再び懸  
濁 27°C で2 時間処理 PBSで2 度洗浄 少  
量のPBS 中でチューブミキサーにより5 分間  
以上破碎。

本研究で検討したいずれの脱囊法でも、運  
動性を保持したスポロゾイトが数多く観察  
された。今後は、より高い脱囊率が得られる  
脱囊法および効率的なスポロゾイト回収法  
を検討していく必要がある。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

青木智佐、新見はるか、松山隆志、金城邦  
夫、熊野了州、サツマイモの大害虫イモゾ  
ウムシの根絶をめざして - 根絶防除事業と  
原虫病、化学と生物、査読有、51巻、2013  
年、500-506

[http://www.jsbba.or.jp/pub/journal\\_kasei/kasei\\_contents/vol51\\_7\\_2013.html](http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/vol51_7_2013.html)

新見はるか、青木智佐、鶴田幸成、松山隆  
志、飯山和弘、清水 進、イモゾウムシ病  
原性*Farinocystis*原虫の宿主範囲の調査、  
Entomotech、査読有、37巻、2013、1-6

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/sanshi-kyushu/entomotech37.html>

青木智佐、特殊害虫イモゾウムシから見つ  
かった原虫病、蚕糸・昆虫バイオテック、  
査読無、80 巻、2011、211-213

[https://www.jstage.jst.go.jp/browse/konchubio tec/80/3/\\_contents/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/browse/konchubio tec/80/3/_contents/-char/ja/)

### 〔学会発表〕(計8件)

新見はるか、青木智佐、イモゾウムシ病原  
性原虫の病理学および疫学的研究、2012年  
度ゾウムシ研究会、2012年11月28日、鹿児  
島県農業開発総合センター大島支場

新見はるか、青木智佐、イモゾウムシ病原  
性原虫の宿主範囲の調査、第56回日本応用  
動物昆虫学会大会、2012年3月28日、近畿大  
学農学部

新見はるか、青木智佐、PCRを用いたイモ  
ゾウムシ病原性*Farinocystis*様原虫の検出-2、  
日本蚕糸学会東北支部・関東支部・関西支  
部・九州支部合同大会 蚕糸・昆虫機能利  
用学術講演会、2011年11月5日、岩手大学農  
学部

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

青木 智佐 (YASUNAGA-AOKI, Chisa)  
九州大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：2 0 2 6 4 1 0 3

### (2)研究協力者

新見はるか (NIIMI, Haruka)  
九州大学・大学院生物資源科学府・修士  
課程

松山隆志 (MATSUYAMA, Takashi)  
沖縄県病害虫防除技術センター・主任研  
究員