

	イイミ社
氏 名	石井 嶺広
本籍（国籍）	群馬県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第連研 682 号
学位授与年月日	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	Inactivation of transmission capability of disease vector by entomopathogenic fungi（昆虫寄生性糸状菌による病原体ベクターの媒介能インアクティベーション）
学位審査委員	主査 帯広畜産大学教授 小池 正徳 副査 相内 大吾(帯広 助教),長谷 修(山形 准教授),安 嬰(岩手 講師)

論文の内容の要旨

昆虫寄生菌は自然界に普遍的に存在する微生物であり、その長い歴史の中で宿主昆虫と密接な関係を築き上げてきた。感染症を理解する上で媒介者として重要な役割を担う節足動物（ベクター）もまた、自然界において昆虫寄生菌と密接な関係を築き上げてきたと考えられる。ハマダラカ属の蚊によって媒介されるマラリアは、年間 58 万人もの死者を出すことから世界的な脅威となっている。マラリア防除は、主に媒介者であるハマダラカを合成化学殺虫剤で殺すことにより防除されてきたが、薬剤的抵抗性の発達が世界中で問題となっていることから代替防除技術の確立が急務とされている。一方で、近年では昆虫寄生菌による感染症媒介蚊の防除研究が注目されている。しかしながら、これらの研究は蚊類を除いた昆虫由来の菌株を使用しており、昆虫寄生菌が自然界で蚊にどのような影響を与えているかは不明なままである。また、これまでに成虫蚊に感染した昆虫寄生菌の感染動態を解明した研究もない。さらに、昆虫寄生菌は様々な宿主昆虫の行動を変化させることも知られている。本研究では、自然界における蚊と菌の関係を明らかにするとともに、昆虫寄生菌が蚊にどのように感染するかを解明する。加えて、行動学的なアプローチから菌感染蚊の病原体媒介能を評価することで、感染症媒介蚊と昆虫寄生菌の関係を解明し、新たな防除法を視野に入れた研究を展開する。

はじめに、自然界における蚊と昆虫寄生菌の関係を明らかにするために、日本および西アフリカに位置するマラリア流行国のブルキナファソにおいて野生蚊の採集を行った。採集された 3000 頭以上の野生蚊から昆虫寄生菌の分離を試みた結果、計 413 菌株の昆虫寄生菌が分離された。これらの菌をハマダラカに対して接種すると、病原性や感染性の高い菌

株の検出に成功した。特に *Beauveria bassiana sensu lato* 60-2 は半数致死日数 5.8 日を示し、他の研究報告と比較しても非常に病原性の高い菌株であった。これらの結果から、自然界において昆虫寄生菌は普遍的に蚊に付着もしくは感染しており、それらの中には蚊類の防除に特化した菌株が存在することが明らかとなった。

次に、昆虫寄生菌の感染動態の解明のため、*B. bassiana s.l.* 60-2 をハマダラカに跗節局所的に接種し、菌感染蚊のパラフィン切片をグロコット染色することで菌の感染動態を観察した。その結果、菌の侵入は跗節だけではなく口吻でも起きており、その後菌が他の部位に比べて頭部へ早く侵入する傾向が観察された。また、一般的に昆虫寄生菌はまず宿主の血体腔内で増殖し、宿主の死後に様々な組織・器官へ侵入するとされてきていたが、本研究では宿主が生きている感染初期の段階から *B. bassiana s.l.* 60-2 が様々な器官・組織へ侵入していることが明らかとなった。さらに、菌の脳への感染と死亡率に高い相関がみられた上、死個体の頭部を観察すると全ての個体に菌の脳感染が起きていた。最後に、ハマダラカの跗節もしくは口吻それぞれに対して菌を接種し、ハマダラカの生存率を比較すると、口吻経由の接種が跗節経由に比べハマダラカを早期に死に至らしめた。以上の結果から、跗節局所的接種方法は跗節および口吻で菌の感染が起き、特に口吻経由による頭部（さらに脳）への感染が、蚊類の防除にとって重要であることが示唆された。

以上で得られた知見（*B. bassiana s.l.* 60-2 の頭部への感染が早いことや、宿主が死ぬ前に菌が様々な器官・組織に侵入すること）や、昆虫寄生菌が様々な宿主昆虫の行動に変化をもたらす研究報告を基に、本研究では *B. bassiana s.l.* 60-2 に感染したハマダラカのマラリア伝播能に関わる行動（宿主探索行動・吸血行動）や繁殖能（産卵・濾胞発育）に着目した。熱および色に対する宿主探索行動の評価には自動行動アッセイ装置を用い、においに対する宿主探索行動には Y 字管型オルファクトメータを用いて評価した。その結果、菌感染蚊は健全個体に比べて全誘引源に対する誘引性が減少し、特に熱およびにおいに対しては感染初期（2, 3 日目）から劇的に誘引性が減少する結果となった。また、脱繊維血に対するハマダラカの吸血およびその後の産卵数を評価した結果、菌感染蚊は吸血率・吸血量・産卵数がともに健全個体と比べて有意に減少することが明らかとなった。さらに、吸血済みの菌感染蚊における濾胞発育を評価すると、濾胞の発育が全く見られない個体が観察された。健全個体と比べて、菌感染蚊は菌感染 4 日目から濾胞発育率が有意に減少し、その後産卵された卵の孵化率も減少する結果となった。昆虫寄生菌がハマダラカに感染することは、宿主探索行動や吸血行動の阻害によりマラリア媒介能が劇的に低下するだけでなく、繁殖能が低下することでポピュレーションを徐々に縮小できることから間接的にマラリア媒介能を抑える可能性が示唆された。

これまで昆虫寄生菌の防除効果には致死効果つまり「ベクターを殺す」ことに焦点が置かれてきた。本研究により、昆虫寄生菌と感染症媒介蚊の関係を解明した結果、昆虫寄生菌によりベクターの媒介能が不活性化されるという知見が得られた。これらの知見を蚊の防除研究に導入することで、革新的な防除技術の確立につながると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文では、自然界における蚊と菌の関係を明らかにするとともに、昆虫寄生菌が蚊にどのように感染するかを解明し、加えて、行動学的なアプローチから菌感染蚊の病原体媒介能を評価することで、感染症媒介蚊と昆虫寄生菌の関係を解明し、新たな防除法を視野に入れた研究を展開することを目的とした。

第1章では、日本および西アフリカに位置するマラリア流行国のブルキナファソにおいて野生蚊の採集を行った。採集された3000頭以上の野生蚊から計413菌株の昆虫寄生菌が分離された。これらの菌をハマダラカに対して接種すると、病原性や感染性の高い菌株の検出に成功した。特に *Beauveria bassiana sensu lato* 60-2 は半数致死日数5.8日を示し、他の研究報告と比較しても非常に病原性の高い菌株であった。これらの結果から、自然界において昆虫寄生菌は普遍的に蚊に付着もしくは感染しており、それらの中には蚊類の防除に特化した菌株が存在することを明らかにした。

第2章では、昆虫寄生菌の感染動態の解明のため、*B. bassiana s.l.* 60-2 をハマダラカに跗節局所的に接種し、菌感染蚊のパラフィン切片をグロコット染色することで菌の感染動態を観察した。その結果、菌の侵入は跗節だけではなく口吻でも起きており、その後菌が他の部位に比べて頭部へ早く侵入する傾向が観察された。また、一般的に昆虫寄生菌はまず宿主の血腔内で増殖し、宿主の死後に様々な組織・器官へ侵入するとされてきていたが、本研究では宿主が活着している感染初期の段階から *B. bassiana s.l.* 60-2 が様々な器官・組織へ侵入していることを明らかにした。

第3章では、ハマダラカの跗節もしくは口吻それぞれに対して菌を接種し、ハマダラカの生存率を比較すると、口吻経由の接種が跗節経由に比べハマダラカを早期に死に至らしめた。以上の結果から、跗節局所的接種方法は跗節および口吻で菌の感染が起き、特に口吻経由による頭部（さらに脳）への感染が、蚊類の防除にとって重要であることが示された。

第4章では *B. bassiana s.l.* 60-2 に感染したハマダラカのマラリア伝播能に関わる行動（宿主探索行動・吸血行動）や繁殖能（産卵・濾胞発育）に着目し、熱および色に対する宿主探索行動の評価には自動行動アッセイ装置を用いてにおいに対する宿主探索行動にはY字管型オルファクトメータを用いて評価した。その結果、菌感染蚊は熱およびにおいに対しては感染初期（2, 3日目）から劇的に誘引性が減少する結果となった。また、脱繊維血に対するハマダラカの吸血およびその後の産卵数を評価した結果、菌感染蚊は吸血率・吸血量・産卵数がともに健全個体と比べて有意に減少し、菌感染蚊は菌感染4日目から濾胞発育率が有意に減少し、その後産卵された卵の孵化率も減少する結果となった。昆虫寄生菌がハマダラカに感染することは、宿主探索行動や吸血行動の阻害によりマラリア媒介能が劇的に低下するだけでなく、繁殖能が低下することでポピュレーションを徐々に縮小できることから間接的にマラリア媒介能を抑える可能性が示唆された。

以上の結果から、これまで昆虫寄生菌の防除効果には致死効果つまり「ベクターを殺す」ことに焦点が置かれてきた。本研究により、昆虫寄生菌と感染症媒介蚊の関係を解明した結果、昆虫寄生菌によりベクターの媒介能が不活性化されるという新しい知見が得られた。これらの知見を蚊の防除研究に導入することで、革新的な防除技術の確立につながると考えられる。よって、本審査委員会は、同人を大学院連語農学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるのに十分な資格を有するものと判定した。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Ishii, M., J. Takeshita, M. Ishiyama, M. Tani, M. Koike and D. Aiuchi (2015). 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(1):39-50.

参考論文

1. 小池正徳, 齊佳鶴玲, 相内大吾, 石井嶺広, 浅野眞一郎(2016)
Insect pathogen によるデュアルコントロール 昆虫と自然 51(7):45-48
2. 小池正徳, 高橋尚樹, 笹原勇太, 齊佳鶴玲, 石井嶺広, 相内大吾, 浅野眞一郎(2016)
昆虫病原性 *Bacillus thuringiensis* の生態学(1) ファイトバイオームにおける *Bacillus thuringiensis* 昆虫と自然 51(13):39-41