

## カイコ病原性微胞子虫 *Vairimorpha* sp. NIS M12の 昆虫培養細胞系への接種と感染増殖

井上志の<sup>1)</sup>・安永智佐<sup>1)</sup>・舟越正子<sup>1)</sup>・

河原畑 勇<sup>1)</sup>・早坂昭二<sup>2)</sup>

1) 九州大学農学部

2) 蚕糸・昆虫農業技術研究所

(1994年4月5日 受領)

SHINO INOUE<sup>1)</sup>, CHISA YASUNAGA<sup>1)</sup>, MASAKO FUNAKOSHI<sup>1)</sup>, TAKESHI KAWARABATA<sup>1)</sup> and SYOJI HAYASAKA<sup>2)</sup>: Infection and development of *Vairimorpha* sp. NIS M12 (Microsporida: Protozoa) in a lepidopteran cell line.

*Vairimorpha* sp. NIS M12, a microsporidian parasite isolated from the silkworm, *Bombyx mori*, successfully infected the cell line of *Spodoptera frugiperda* SF21AE II. After priming with 0.1 N KOH solution, the spores were mixed thoroughly with *S. frugiperda* cells suspended in Rinaldini's solution. Inoculated cells were cultured at 28°C in IPL-41 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. At a ratio of 30 spores per cell, 9.1% of *S. frugiperda* cells were infected initially with sporoplasms 1 hr postinoculation. About 65% of the infected cells harbored a single sporoplasm. The spread of infection and spore production of *V. sp. NIS M12* in cell cultures were markedly different from those of *Nosema bombycis*, while the *in vitro* life cycles of the two parasites was similar. Short-coiled spores occurred 72 hr postinoculation, and long-coiled mature spores were produced 10 days postinoculation. No formation of syncytia was observed in *Vairimorpha* infected cell cultures.

Key words: *Vairimorpha* sp. NIS M12, spore germination, *Spodoptera frugiperda* cell culture

昆虫培養細胞系を用いたカイコ病原性微胞子虫の感染・増殖様式および生活環に関する研究は、主にカイコ微粒子病病原 *Nosema bombycis* を中心に行われてきた (TRAGER, 1937; ISHIHARA and SOHI, 1966; KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; STRETT and LYNN, 1984; IWANO and ISHIHARA, 1991; KAWARABATA *et al.*, 1989)。しかし、その

他のカイコ病原性微胞子虫分離株 (藤原, 1980, 1984a, b, 1985; 藤原ら, 1985) については, *in vitro* での研究は十分であるとはいえない。

*Vairimorpha* sp. NIS M12は、千葉県の養蚕農家で飼育された種繭蚕の母蛾検査で検出された微胞子虫で、主にマルピギー管、絹糸腺、筋肉および脂肪体で増殖し、カイコ幼虫に対して強い病原性を示す (藤原, 1985)。本微胞子虫による被害の発生と感染経路は不明な点が多く、生活史の解明も十分ではない。また、*V. sp. NIS M12* 胞子は *N. bom-*

1) 〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1

2) 〒305 つくば市大わし 1-2

*bycis* 胞子に比較して極めて発芽困難で、苛性カリ処理後昆虫培養細胞浮遊液に接種する通常の方法ではほとんど発芽しない。

本研究では、*in vitro* での発芽が困難な *V. sp. NIS M12* 胞子の人工発芽法を検討し、*V. sp. NIS M12* を昆虫培養細胞に接種して感染増殖させ、持続感染系を樹立した。本研究は、カイコ病原性微孢子虫 *V. sp. NIS M12* の *in vitro* での感染・増殖様式および生活環を明らかにすることを目的としている。

### 材 料 と 方 法

微孢子虫胞子: *Vairimorpha sp. NIS M12* 胞子は、蚕糸・昆虫農業技術研究所保存株を供試した。微孢子虫胞子の精製は、Percoll 密度勾配遠心法(安永ら, 1991)を一部改変して行った。80% Percoll (w/w) 密度勾配上に *V. sp. NIS M12* 胞子浮遊液を重層した後、25℃、2,000 rpm で3分遠心して接種用胞子を調整した。

昆虫培養細胞: 鱗翅目昆虫由来の *Spodoptera frugiperda* IPLB-SF21AE II (VAUGHN *et al.*, 1977) を供試した。培養細胞は10%ウシ胎児血清添加の IPL-41 培地 (DOUGHERTY *et al.*, 1981) に27℃で培養し、1週間間隔で継代を行って維持した。

微孢子虫胞子の発芽試験: 発芽培地として昆虫細胞培養液の IPL-41 培地、昆虫細胞用塩類溶液の Rinaldini 液 (RINALDINI, 1959)、およびリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (DULBECCO and VOGT, 1954) の3種類を供試した。*V. sp. NIS M12* 胞子浮遊液 50  $\mu$ l ( $2.0 \times 10^8$  spores/ml) に0.2 N 苛性カリ溶液を等量混合し、27℃で40分処理後、直ちに各発芽培地10 ml に接種した。27℃で40分静置後、位相差

顕微鏡下400倍で胞子1,000個当りの胞子発芽数を測定した。

接種: *V. sp. NIS M12* 胞子の *S. frugiperda* 細胞系への接種は、上述の発芽培地のうち Rinaldini 液を用いた行った(安永ら, 1991)。*S. frugiperda* 細胞浮遊液を2,000 rpm で5分遠心し、上清の培養液を Rinaldini 液と交換した。これに苛性カリ処理胞子浮遊液を接種し(胞子:細胞=30:1)、3分攪拌後、再び Rinaldini 液を10%ウシ胎児血清および抗生物質(最終濃度ペニシリン200 units/ml; ストレプトマイシン200  $\mu$ g/ml)を添加した IPL-41 培地と置換した。27℃で1時間静置した後、感染培養の一部を胞子接種1時間後のサンプルとして採取した。感染培養を24穴マルチウェルプレート (Falcon 3047) に分注 (0.5 ml/well) し、27℃で管理しながら経時的にサンプリングを行った。採取したサンプルは塗抹標本にしてギムザ染色後、光学顕微鏡下400倍で観察した。

### 結 果

各種発芽培地における *V. sp. NIS M12* 胞子の発芽

苛性カリ処理した *V. sp. NIS M12* 胞子を3種類の発芽培地に混合し、胞子発芽率を比較した (Table 1)。対照とした蒸留水および IPL-41 培地では、発芽した胞子は1%以下であった。一方、Rinaldini 液および PBS では約30%の胞子発芽率が得られた。

*S. frugiperda* 細胞系における *V. sp. NIS M12* 感染の伝播

苛性カリ処理した *V. sp. NIS M12* 胞子を

Table 1. Comparison of *Vairimorpha sp. NIS M12* spore germination rates among germination media.

Germination medium	Spore germination (%)			
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Mean $\pm$ S. D.
Control (D. W.)	0.07	0.00	0.00	0.02 $\pm$ 0.04 a *
IPL-41 medium	0.33	0.07	0.07	0.16 $\pm$ 0.15 a
Rinaldini's silution	26.2	29.8	27.6	27.9 $\pm$ 1.81 b
PBS	29.3	31.3	32.6	31.0 $\pm$ 1.68 b

\* Values in column joined by the same letter (a or b) are not significantly differnt at the 5% level of probability as determined by the *t*-test.

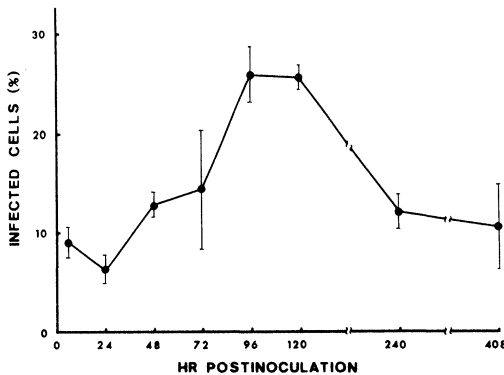


Fig. 1. Spread of *Vairimorpha* sp. NIS M12 infection in *Spodoptera frugiperda* SF21AElI cell line *in vitro* at 27°C. Vertical lines represent the standard deviation.

Rinaldini 液に浮遊した *S. frugiperda* 細胞に接種し、細胞感染率の経時的变化を調査した (Fig. 1)。接種1時間後の感染率は約9%で、孢子発芽率 (27.9%) の1/3程度であった。接種24時間後、細胞感染率はわずかに低下したが、接種48時間後から上昇傾向に転じ、接種96時間後には約25%に達した。また、接種後120時間以降に、細胞感染率の減少傾向が認められたが、接種10日後には約11%となり、その後も同じレベルで本微孢子虫感染が継続して維持された。

#### *S. frugiperda* 細胞系における *V. sp.* NIS M12の増殖様式

接種1時間後、スポロプラズムに感染した *S. frugiperda* 細胞の65%が単感染であった。この接種条件 (孢子:細胞=30:1) では、重複感染率がやや高くなった。接種24時間後から、原虫細胞の二分分裂による増殖が観察された (Fig. 2)。感染細胞あたりの原虫細胞数は、接種後48時間以降は約15細胞でほぼ一定となった。一方、接種72時間後に、二次感染体に由来する第二世代の原虫細胞およびシゾントの二分分裂増殖が認められた。

#### *S. frugiperda* 細胞系における *V. sp.* NIS M12の生活環

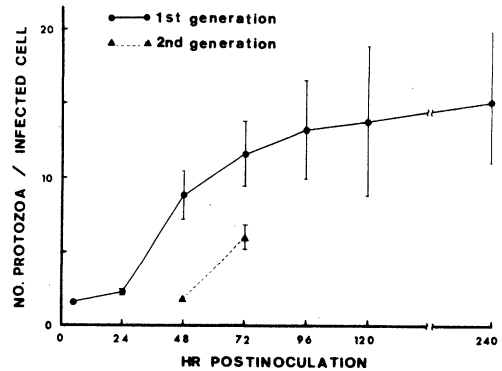


Fig. 2. The growth of *Vairimorpha* sp. NIS M12 in *Spodoptera frugiperda* SF21AElI cells *in vitro* at 27°C.

苛性カリ処理した *V. sp.* NIS M12 胞子を Rinaldini 液浮遊の *S. frugiperda* 細胞に接種した後、経時的にサンプリングを行い、ギムザ染色塗抹標本として光学顕微鏡で観察した。接種1時間後の原虫細胞は二核性のスポロプラズムで、宿主細胞細胞質中に侵入していた (Fig. 3A)。スポロプラズムの細胞質はギムザで濃染されなかった。侵入後、宿主細胞中のスポロプラズムは球形のまま生長し、細胞質がギムザにより濃い青色に染まるようになった。接種18時間後には、紡錘形に生長したシゾントが観察された (Fig. 3B)。接種24時間後から、シゾントの二分分裂による増殖が開始された (Fig. 3C)。接種48時間後には、数回の二分分裂増殖を経過した一部の原虫細胞細胞質内に、ギムザに染色されない高屈折率の小球が出現し、シゾントからスポロントへの分化がみられた (Fig. 3D)。スポロントの二分分裂により2個の短極糸型孢子様原虫細胞が形成された。

接種72時間後には、やや長形のギムザによって濃赤染される球状の構造物が存在するが、他の部分は中空状の短極糸型孢子様原虫細胞、および卵形で内部が薄く青染される原虫細胞が形成された (Fig. 3E)。一方、中空状の短極糸型孢子様孵化殻の出現と同時期に二次感染体が検出され (Fig. 3F)、*S. frugiperda* 細胞細胞質中への新たな

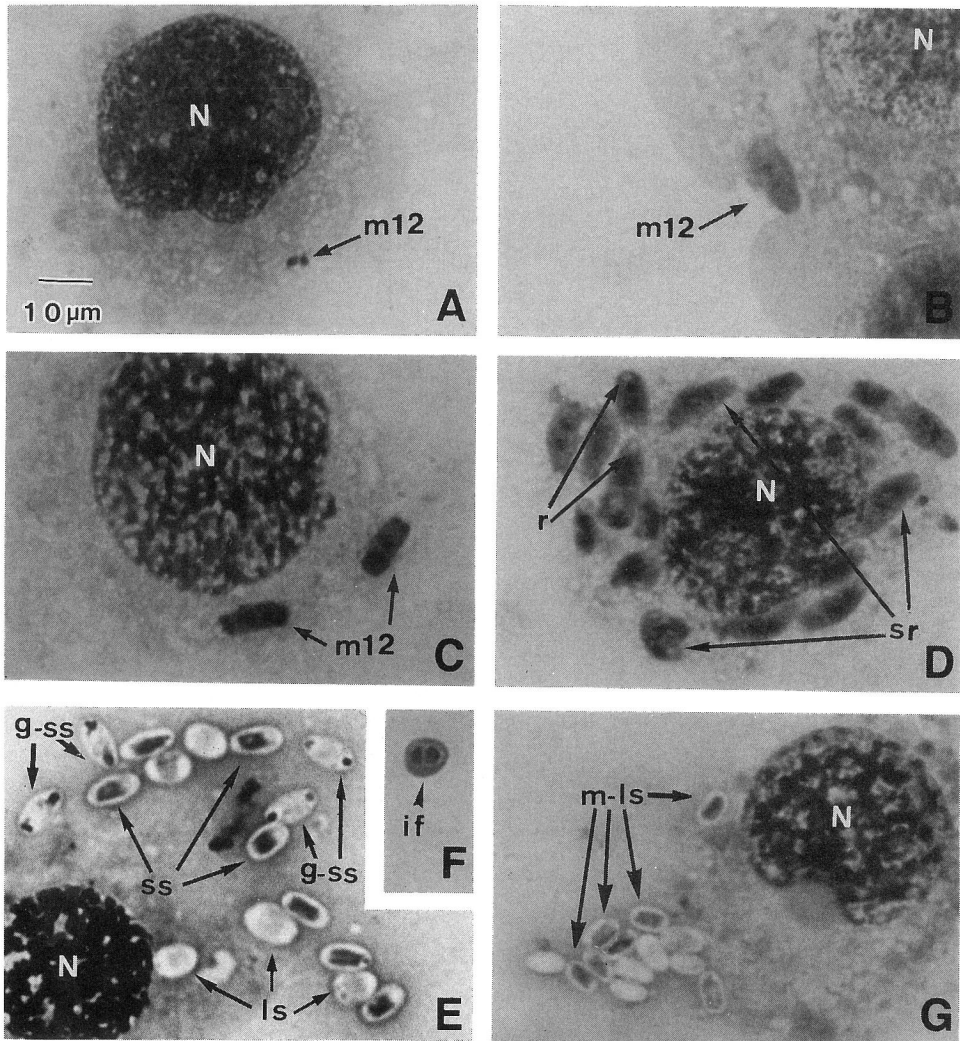


Fig. 3. The life cycle of *Vairimorpha* sp. NIS M12 in *Spodoptera frugiperda* SF21AEII cells *in vitro*. (A) A sporoplasm (m12) of *V. sp.* NIS M12 1 hr postinoculation at 27°C. N, host cell nucleus. (B) A matured schizont (m12) of *V. sp.* NIS M12 18 hr postinoculation. (C) First division of the schizont (m12) 24 hr postinoculation. (D) Formation of sporonts (sr) 48 hr postinoculation. r, refractile spot. (E) Short-coiled spore (sc), germinated short-coiled spore (g-sc) and long-coiled spore (ls) 72 hr postinoculation. (F) A secondary infective form (if) 72 hr postinoculation. (G) Formation of mature long-coiled spore (m-ls) 10 days postinoculation.

な侵入が観察された。二次感染体はその後シゾンに生長し、二分増殖を開始した。内部がギムザで淡染される胞子に移行中の原虫細胞は接種96時間後から増加した。細胞質内がギムザによって青染される胞子の形成は、接種10日後に確認された (Fig. 3G)。

また、*Vairimorpha* 属にみられる胞子形成の温度依存性を確認する目的で、培養温度を27℃、20℃および15℃の3区で調査した。今回の試験条件下では、*V. sp.* NIS M12の胞子はすべて *Nosema* 属と同様の二胞子型 (disporous) で形成され、octospore 形成は誘起されなかった。

### 考 察

現在、わが国における代表的なカイコ病原性微胞子虫分離株として、*N. bombycis* NIS 001、*N. sp.* NIS M11および *V. sp.* NIS M12が農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所に継代保存されている。*N. bombycis* はカイコ微粒子病病原として母蛾検査の対象となっている最も重要度の高い種類で、これまでの昆虫培養細胞系を利用したカイコ病原性微胞子虫の感染増殖および生活環に関する研究も上述のように *N. bombycis* を中心に行われてきた。一方、*N. bombycis* に次いで重要なカイコ病原性微胞子虫とみなされる *N. sp.* NIS M11 (藤原 1980, 1985; 藤原ら, 1985) は、胞子の人工発芽が困難な種類であるため、昆虫培養細胞系を利用した感染増殖および生活環に関する研究は最近になって始められている (安永ら, 1991)。

カイコ病原性微胞子虫 *V. sp.* NIS M12 は、胞子の人工発芽が *N. sp.* NIS M11以上に困難なため、胞子人工発芽接種法による感染増殖に関する研究は従来進展がみられなかった。*V. sp.* NIS M12胞子を *N. bombycis* 胞子と同一の苛性カリ処理による胞子発芽接種法 (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984) で昆虫培養細胞へ接種しても胞子は発芽せず、スポロプラズムによる感染の成立は認められない。このように、*Vairimorpha* 属では苛性カリ処理による発芽が困難なため、基準種 *V. necatrix* では EDTA 処理胞子を *Heliothis zea* 細胞系へ接種し、感染培養が得られている (KRUTTI *et al.*, 1990)。しかし、*N. sp.* NIS M11

胞子の場合、EDTA 処理胞子は苛性カリ処理胞子に比較して、昆虫細胞培養中の胞子発芽率は高いがスポロプラズムによる感染効率が低い欠点が認められている (YASUNAGA *et al.*, 1992)。

難発芽性微胞子虫 *V. sp.* NIS M12 胞子を高率で人工発芽させ昆虫培養細胞に感染させる目的で、発芽培地としての細胞培養用塩類溶液を検討した。苛性カリ処理した *V. sp.* NIS M12 胞子は昆虫細胞培養液の IPL-41 培地ではほとんど発芽しなかった。しかし、ニワトリ胚用塩類溶液の Rinaldini 液またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) では約30%の胞子が発芽した。Rinaldini 液および PBS の浸透圧 (280 mOsm) は、IPL-41 液 (355 mOsm) よりやや低く、*V. sp.* NIS M12 胞子に対する発芽促進効果には、発芽培地の低浸透圧が一部関与している可能性がある (UNDEEN, 1990)。

一般に、発芽困難な微胞子虫胞子を昆虫培養細胞へ接種する場合、初期細胞感染率を高める目的で宿主細胞あたりの接種胞子量を増加する場合がある。*V. sp.* NIS M12 胞子の *S. frugiperda* 細胞系への接種では、宿主細胞あたり *N. bombycis* の場合より3培量多い胞子を接種した。その結果多重感染細胞の割合がやや高くなったが、多重感染細胞における微胞子虫の生長および増殖は正常であった。

細胞感染率は、接種後120時間以降ゆるやかな低下傾向を示した。これは、宿主昆虫培養細胞として供試した *Spodoptera* 細胞の倍加時間が比較的短いことに起因していると考えられる (KAWARABATA *et al.*, 1989)。

*S. frugiperda* 細胞に感染した *V. sp.* NIS M12 の宿主細胞あたりの原虫細胞産生数は、*Antheraea eucalypti* 細胞に感染した *N. bombycis* の場合の約 1/5 (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; KAWARABATA *et al.*, 1989) で、*N. sp.* NIS M11 の場合の約 1/3 である (安永ら, 1991)。しかし、細胞あたりの原虫細胞生数が少ないにもかかわらず、本微胞子虫は *S. frugiperda* 細胞系における持続感染状態を維持している。一方、*V. necatrix* は *H. zea* 細胞系で持続感染状態が成立せず (KRUTTI *et al.*, 1990)、また *N. sp.* NIS M11 では、*A. eucalypti* 細胞系において数回の継代後、感染細胞が検出されなくなった (安永ら, 1991)。*V. sp.*

NIS M12 感染培養は現在20回の継代を行った後も維持されており、これらのことから、*V. sp. NIS M12* の *S. frugiperda* 細胞系への宿主適合性は高いと判断された。

昆虫培養細胞系での *V. sp. NIS M12* 感染の伝播は、*Nosema* 属微胞子虫と同様、二次感染体に由来している (KAWARABATA and ISHIHARA, 1984; IWANO and ISHIHARA, 1989, 1991; 安永ら, 1991)。また、*S. frugiperda* 細胞系における *V. sp. NIS M12* の生活環で観察される原虫細胞の種類は、27℃培養条件下では、基本的に *N. bombycis* と同様であった。接種72時間後に観察された濃赤染される球状構造物を伴った中空状原虫細胞は、短極糸型孢子 (IWANO and ISHIHARA, 1991) 様原虫細胞で、二次感染体の母細胞であると考えられる。

*V. necatrix* 感染した *H. zea* 細胞系には、感染細胞の融合によるシンシチウム形成が観察されている (KRUTTI *et al.*, 1990)。しかし、*V. sp. NIS M12* に感染した *S. frugiperda* 細胞にシンシチウム形成は認められなかった。また、*Vairimorpha* 属の基準種 *V. necatrix* は *in vivo* で温度依存的に、*Nosema* 型の二孢子形成と *Thelohania* 型の8孢子を形成する (PILLEY, 1976)。本研究では、27℃、20℃および15℃培養温度で *V. sp. NIS M12* 感染細胞に *Nosema* 型の二孢子形成のみが観察され、8孢子形成に至る条件は不明である。

今後、微胞子虫 *V. sp. NIS M12* の、*in vitro* における *Thelohania* 型 octospore の形成条件を含め、温度依存的な全生活環を明らかにし、カイコ病原性微胞子虫分離株での本微胞子虫の分類学的位置づけを明確にする必要がある。

### 摘 要

カイコ病原性微胞子虫 *Vairimorpha sp. NIS M12* 孢子を、苛性カリ処理後昆虫細胞培養液 IPL-41 と混合したが、孢子はほとんど発芽しなかった。一方、苛性カリ処理した *V. sp. NIS M12* 孢子をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) または Rinaldini 液と混合した場合は、約30%の孢子が発芽した。Rinaldini 液に浮遊した鱗翅目昆虫由来の *Spodoptera frugiperda* SF21AII 細胞系に苛性カリ処理した *V. sp. NIS M12* 孢子を接種し、スポロブ

ラズムによる感染およびシズントの二分裂による増殖を確認した。また、27℃、20℃および15℃の培養条件下では、*Nosema bombycis* と類似した生活環が観察され、octospore の形成は見られなかった。本研究で樹立した *V. sp. NIS M12* の持続感染培養では、感染した *S. frugiperda* 細胞の融合によるシンシチウム形成は観察されなかった。

### 文 献

- DOUGHERTY, M. E., WEINER, M. R., VAUGHN, L. J. and REICHELDERFER, F. C. (1981): Physical factors that affect *in vitro* *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus infection. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1166-1172.
- DULBECCO, R. and VOGT, M. (1954): Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.*, **99**, 167-182.
- 藤原 公 (1980): カイコから分離された3種の微胞子虫 (*Nosema* spp.) について. 日蚕雑, **49**, 229-236.
- 藤原 公 (1984a): 蚕から分離した *Pleistophora* 様微胞子虫. 日蚕雑, **53**, 398-402.
- 藤原 公 (1984b): 蚕から分離された *Thelohania* sp. 日蚕雑, **53**, 459-460.
- 藤原 公 (1985): 種繭養蚕において検出された微胞子虫類. 日蚕雑, **54**, 108-111.
- 藤原 公・香川敏昭・安藤博司 (1985): 種繭養蚕の蚕蛾から分離した *Nosema bombycis* 様微胞子虫. 日蚕雑, **54**, 117-121.
- ISHIHARA, R. and SOHI, S. S. (1966): Infection of ovarian tissue culture of *Bombyx mori* by *Nosema bombycis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **8**, 538-540.
- IWANO, H. and ISHIHARA, R. (1989): Intracellular germination of spores of a *Nosema* sp. immediately after their formation in cultured cell. *J. Invertebr. Pathol.*, **54**, 125-127.
- IWANO, H. and ISHIHARA, R. (1991): Dimorphism of spores of *Nosema* spp. in cultured cell. *J. Invertebr. Pathol.*, **57**, 211-219.
- KAWARABATA, T. and ISHIHARA, R., (1984): Infection and development of *Nosema bombycis* (Microsporidia: Protozoa) in cell line of *Antheraea eucalypti*. *J. Invertebr. Pathol.*, **44**, 52-62.

- KAWARABATA, T., ISHIHARA, R., HAYASAKA, S., and IWANO, H. (1989): In "Invertebrate cell System Applications", Vol. II, pp. 69-74., CRC Press, Boca Raton, Florida.
- KRUTI, J. T., MUNDERLOH, G. U. and NODA, H. (1990): *Vairimorpha necatrix*: infectivity for and development in a lepidopteran cell line. J. Invertebr. Pathol., **55**, 61-68.
- PILLEY, M. B. (1976): A new genus, *Vairimorpha* (Protozoa: Microsporida), for *Nosema necatrix* Kramer 1965: pathogenicity and life cycle in *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Invertebr. Pathol., **28**, 177-183.
- RINALDINI, M. L. (1959): An improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. Exp. Cell Res. **16**, 477-505.
- STREETT, A. D. and LYNN, E. D. (1984): *Nosema bombycis* replication in *Manduca sexta* cell line. J. Parasitol., **70**, 452-454.
- TRAGER, W. (1937): The hatching of spores of *Nosema bombycis* NAGELI and the partial development of the organism in tissue cultures. J. Parasitol., **23**, 226-227.
- UNDEEN, H. A. (1990): A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. J. Theor. Biol., **142**, 223-235.
- VAUGHN, L. J., GOODWIN, H. R., TOMPKINS, J. G. and McCRAWLY, P. (1977): The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). In Vitro, **13**, 213-217.
- 安永智佐・舟越正子・河原畑 勇・早坂昭二 (1991): カイコ病原性微孢子虫 *Nosema* sp. NIS M11 胞子の昆虫培養細胞への接種と増殖. 日蚕雑, **60**, 450-456.
- YASUNAGA, C., FUNAKOSHI, M. and KAWARABATA, T. (1992): Comparative inoculation of *Antheraea eucalipti* (Lepidoptera: Saturniidae) cell cultures with EDTA or KOH primed spores of *Nosema* sp. NIS M11 (Microsporida: Nosematidae). J. Invertebr. Pathol., **60**, 109-110.