

病原体の相互作用について

大崎麻里菜 熊野柚瑞華 佐々木優 下赤陸斗 西原潔

兵庫県立神戸高等学校 総合理学科 2 年

生物に対して害のある細菌、菌類、ウイルス等が生物に同時に感染したらどのような反応が起こるのか。病原体同士は互いにその毒性を強め合うのか、それともその毒性を弱め合うのか。私たちはカイコガの幼虫に対して毒性のある細菌、菌類を同時に複数カイコガに感染させることで、病原体同士の生物体内での相互作用を調べることにした。その結果、複数の病原体が同時に生物に感染した場合に生物体内で何らかの反応が起こり、一種類の病原体に感染した時と比べ複数の病原体に感染した時の方が生物の生存期間が長くなり、感染した生物の生存に有利な影響が現れる可能性があることがわかった。

1. はじめに

1-1. 研究の動機と目的

2020 年人々の生活を脅かした新型コロナウイルス (COVID19)、生物にこの新型コロナウイルスとインフルエンザが同時に感染したらどのような影響が現れるのだろうか、この疑問が私たちの研究の原点である。特に私たちはこれらのウイルス同士が生物体内で互いの性質を弱め合うことで、感染した生物の生存に対して有益となる影響が現れるのではないかという可能性に注目した。そこで私たちは、実験生物にその生物に対する複数の病原体を同時に感染させることでその生物に対して有益な反応が現れるかを調べ、最終的に医療に応用することを目的とした。しかし、高校生が実験に扱える生物や毒性のある細菌、ウイルス等には限りがあるため、過去に本校の課題研究で使用され比較的飼育の容易なカイコガの幼虫と、ウイルスとは異なるが、カイコガに対して毒性のある細菌 1 種、菌類 2 種を扱うこととした。

1-2. カイコガの飼育方法について

カイコガの卵を 100ml ビーカーの中に 10~30 匹程度重ならないように並べる。そのビーカーを、横半分を切り取り横向きにした 2L ペットボトルの中に置く。その際、ペットボトル内には濡らした新聞紙を入れる。そのペットボトルに微少な穴を開けたラップをかぶせ、温度 25 度、湿度 80~90%のバイオ

トロン内で直射日光の当たらないようにして 3~4 日間経過させ、その後、光に当てることで孵化が開始する。孵化後、体表が黒い蟻蚕と呼ばれる状態のうち適宜桑の葉を原料とした人工飼料を与えながらビーカーの中で飼育し、体表が白くなってきたら中に新聞紙を敷いた段ボールの中に移し、人工飼料を与えながら飼育する。段ボール内に糞や食べ残され乾燥した餌がたまっている場合は、その都度新聞紙を取り替える。飼育は常に温度 25 度、湿度 80%に設定したバイオトロン内で行った。

1-3. 使用した細菌、菌類について

細菌に *Bacillus thuringiensis*(以後 BT と略す)、菌類に *Beauveria bassiana*(以後 BB と略す)、*Metarhizium anisopliae*(以後 MA と略す)を使用した。

Bacillus thuringiensis は卒倒菌とも呼ばれる。菌体内にある結晶性の殺虫性タンパク質が幼虫の腸内の特定部位に結合し、その部位の細胞を破壊することで虫を麻痺状態にする。その後、その傷から消化管内で芽胞化 BT 菌が幼虫の体腔内へ侵入し感染する。*Beauveria bassiana* は白きょう菌とも呼ばれる。微細な胞子が昆虫の宿主の体に接触すると発芽し、殻を通過して体内で繁殖し、数日間で昆虫は死に至る。白いカビとして繁殖し、昆虫死亡時には昆虫の節から白いカビが生えて死亡する。

Metarhizium anisopliae は黒きょう病菌や緑きょう

う病菌とも呼ばれる。胞子が昆虫に付着すると発芽し、菌糸が体表のクチクラを通過して菌が体内で発生する。数日後には昆虫は死に至る。昆虫死亡時、白いカビが昆虫に生えてくるが、湿度が十分に高いと芽胞が形成されてすぐに緑色に変化する。

2. ブイヨン培地を用いた予備実験

2-1.予備実験の目的

実験ではカイコガに摂取させた菌、カイコガ体内の常在菌、カイコガの免疫機能等の多くの要因が結果に影響すると予想されるため、まず、細菌や菌類同士が互いに及ぼす単純な相互作用を検証するための実験を行った。

2-2.予備実験の方法

ブイヨン培地に細菌、菌類を1種類ずつ3通り、2種類ずつ(BTとBB、BTとMA、BBとMA)の3通りの計6通りの組み合わせで直径2mmの滅菌ループを用いて塗布する。この時塗布する細菌や菌類の量が同じになるようにシャーレの下に5ミリ間隔の同心円を書いた紙を設置し、その円の一番内側の線をなぞるように細菌を塗布した。その後これらのシャーレを温度25度湿度70%のバイオトロンで10日培養した。ImageJを用いてシャーレ内における細菌の繁殖した面積を解析した。

2-3.予備実験の結果

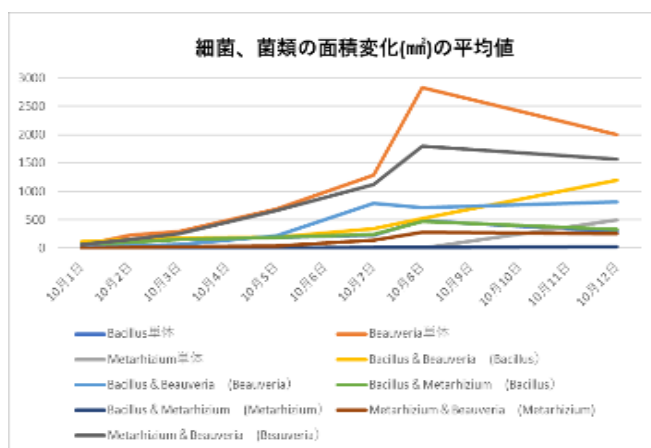


図1 一回目の実験の面積変化の平均値

(図1、図2ともに横軸は日付、縦軸は細菌、菌類がシャーレ内で繁殖した面積の値(mm²)を表す。)

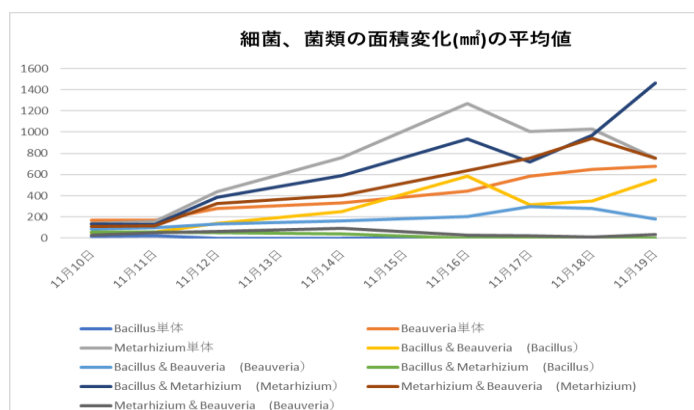


図2 二回目の実験の面積変化の平均値

2-4.予備実験の考察

最終的に、一回目の実験では一種類だけ入れた時のBBの面積が最も大きく、全体的にもBBの面積が大きさの上位を占め、二回目の実験ではBTと入れた時のMAの面積が最も大きく、全体的にもMAの面積が大きくなっていることがわかったが、細菌、菌類を複数入れたことによる増殖度合いの大きな変化は見られなかったため、シャーレ内においては細菌、菌類間に相互作用があるのかは確認できなかった。一回目と二回目で異なる結果となったのは、10月と11月で外気の温度に7度前後の差があったため、冷蔵庫に保存をしていた植え継ぎ用の細菌、菌類の繁殖能力に違いが出たためだと考えられた。

3. カイコガを用いた予備実験

3-1.予備実験の目的

本実験と同じ方法で実験を行い本実験の実験方法を確立させることと、細菌、菌類をカイコガに与えた時のカイコガの様子を確認するために行った。

3-2.予備実験の方法

- ①桑の葉を原料としたペースト状の人工飼料(直径5cm)を厚さ1センチの輪切りにし、1匹あたりの餌が輪切り8分の1の大きさになるように餌を切る。
- ②用意した餌に直径2mmの滅菌ループ1すくい分の細菌、菌類を混ぜてラップで包み餌をこねる。
- ③カイコガを1匹ずつプラスチックカップに入れて②で作った餌をカイコガの口元に与え食べさせる。
- ④カイコガ死亡後や繭形成後にカイコガの体や繭を

解剖し、カイコガの体液や中身を直径 2 mmの滅菌ループで採取し、ブイヨン培地に塗布してカイコガの体内で細菌が繁殖しているかを確認する。

3-3.予備実験の結果

繭を作ったカイコガについては繭を切り開いて内部の様子を確認した。

表 1 一種類の細菌を与えたカイコガの様子

カイコガの体長 (mm)	細菌、菌類	14日後の様子	繭内の様子
35	BT	死亡	
47	BT	繭形成	蛹化し生存
60	BT	繭形成	蛹化し生存
49	BB	繭形成	蛹化の途中の状態で死亡
53	BB	繭形成	蛹化する前に死亡
55	BB	繭形成	蛹化し生存
38	MA	8日後に死亡	
42	MA	繭形成	蛹化し死亡
52	MA	繭形成	蛹化する前に死亡

3-4.予備実験の考察

実験で使用した 3 種類の細菌、菌類はすべてカイコガに対して毒性があることがわかった。また、菌類は昆虫の体表に触れることで昆虫に感染すると考えられていたが、カイコガにおいては体内に直接摂取させることで感染させることができるということがわかった。加えて、カイコガの体長が大きいほど細菌、菌類を与えてもカイコガが生存できる可能性が高いことが分かった。

4. 本実験

4-1.本実験の目的

1 種類の細菌、菌類を混ぜた餌をカイコガに与えた時と 2 種類の細菌、菌類を混ぜた餌をカイコガに与えた時の結果を比較することで病原体同士に相互作用があるのか、ある場合にはその相互作用が生物の生存期間を延ばす可能性があるのかを検証するために行った。

4-2.本実験の方法

手順は 3-2.予備実験の方法と同じである。今回は、人工飼料の大きさを 1 匹あたり厚さ 1 センチの輪切り 16 分の 1 の大きさに変更した。また、餌に混ぜる細菌、菌類の量を、1 種類ずつの時は直径 2 mmの滅

菌ループ 2 すくい分に、2 種類ずつの時は 1 種類ごとに直径 2 mmの滅菌ループ 1 すくい分の計直径 2 mmの滅菌ループ 2 すくい分に変更した。

4-3.本実験の結果

表 3 細菌、菌類を与えたカイコガの様子

カイコガの体長 (mm)	細菌、菌類	14日後の様子
32	BT&BB	完全な繭を形成
34	BT&BB	首以降が蛹化し死亡
35	BT&BB	首付近が黒変し尾付近が赤変し死亡
35	BT&BB	繭の形成途中で死亡
35	BT&BB	蛹化し生存
36	BT&BB	体表に変化見られずに死亡
38	BT&BB	首付近が黒変して死亡
38	BT&BB	体が平らになった状態で死亡
38	BT&BB	黒変し体が平らになった状態で死亡
40	BT&BB	若干赤変し蛹化しかけた状態で死亡
33	BT&MA	完全な繭を形成
33	BT&MA	体表にMAが繁殖した状態で死亡
34	BT&MA	完全な繭を形成
34	BT&MA	完全な繭を形成
34	BT&MA	黒変し体が平らになった状態で死亡
35	BT&MA	完全な繭を形成
35	BT&MA	完全な繭を形成
36	BT&MA	完全な繭を形成
37	BT&MA	体が縮み尾がしぼんだ状態で死亡
37	BT&MA	繭の形成途中で死亡
32	MA&BB	完全な繭を形成
33	MA&BB	体表に変化見られず生存
34	MA&BB	完全な繭を形成
34	MA&BB	完全な繭を形成
34	MA&BB	完全な繭を形成
35	MA&BB	完全な繭を形成
35	MA&BB	完全な繭を形成
36	MA&BB	繭の形成途中で死亡
37	MA&BB	黒変し体が平らになった状態で死亡
38	MA&BB	完全な繭を形成
24	BT	尾付近が縮んで死亡
33	BT	体が縮んで死亡
34	BT	体が黒変して死亡
38	BT	頭付近が縮んだ状態で死亡
29	BB	黒変し尾が縮んだ状態で死亡
30	BB	体が縮んで死亡
36	BB	若干黒変し体が平らな状態で死亡
37	BB	生存
29	MA	体にしわが寄った状態で死亡
30	MA	体にしわが寄った状態で死亡
35	MA	若干黒変し首尾付近が縮んで死亡
36	MA	真っ黒に変色して死亡

表 4 与えた細菌、菌類ごとのカイコガの様子の割合

細菌、菌類	死亡した(%)	繭を形成しかけて死亡した(%)	繭を形成した(%)	繭を作らず生存していた(%)
BT	100	0	0	0
BB	75	0	0	25
MA	100	0	0	0
BT&BB	50	30	10	10
BT&MA	30	10	60	0
MA&BB	10	10	70	10

BT のみを与えた個体は 4 匹すべて死亡、BB のみを与えた個体は 4 匹中 1 匹が生存、MA のみを与えた個体は 4 匹すべてが死亡、BT と BB を与えた個体は 10 匹中 2 匹が生存、BT と MA を与えた個体は 10 匹中 6 匹が生存、MA と BB を与えた個体は 10 匹中 8 匹が生存した(生存した個体の数には繭を形成した個体の数も含む)。繭を形成した個体の内 8 匹が成虫にまで成長した。また、実験で用いたカイコガと同じ時期に生育していたカイコガでかつ菌を与えなかったカイコガは通常通り成長することを確認した。死亡したカイコガの体内を解剖しシャーレ内に中身を塗布したところ、与えた細菌、菌類がシャーレ内に繁殖したことから細菌、菌類がカイコガに感染してカイコガが死に至ったことが確認できた。

4-4.本実験の考察

カイコガの体長や育つ条件、与える餌の量を同じにしたにも関わらず、カイコガが蛹や繭を形成したり成虫にまで成長できたりしたのは二種類の菌を与えた時のみで、菌を与えても生存し続けた個体の数も二種類の菌を与えた時の方が一種類の菌を与えた時よりも多かったことから、カイコガに複数の菌を与えた場合において菌同士が互いの繁殖を抑え合うことでカイコガの生存期間が延びているのではないかと考えられる。特に、BB と MA の二つをカイコガに同時に与えた時において生存率が 80%で他の組み合わせより生存率が高かったことと、予備実験においてはこの二つの組み合わせと他の組み合わせで結果に大きな差がなかったことより本実験においての細菌、菌類間の相互作用にはカイコガの体内環境が関係していると考えられる。

5. 結論

この研究により、ある生物に対して複数の病原体が同時に感染した時、それらの病原体が生物体内で互いの繁殖を抑制し合うなどして、結果的に病原体に感染した生物に対して生存期間を延ばすなどの、生存に有益な効果を表す可能性があることがわかった。また病原体同士の相互作用には病原体が感染する生物の体内環境が関係していることが分かった。

6. 今後の展望

今回の実験では細菌、菌類の組み合わせごとに最大 10 匹のカイコガを用いることしかできなかったが、カイコガの個体差の影響を減らすために用いるカイコガの個体数を増やしてさらに実験を行う。また、与える細菌、菌類の量の比率を変える等の方法で複数の細菌、菌類がカイコガに感染した時にカイコガの生存に最も有益な効果をもたらす時の条件を調べる。さらに今回相互作用が確認できなかったシャーレでの予備実験を追加で行い、本実験の結果の解明に役立てていく。

7. 謝辞

今回の実験を行うにあたり終始指導をしてくださった本校教諭の繁戸克彦先生、西畑佳代子先生、本校 SA の方々、その他私たちの実験に関わってくださった方々にお礼を申し上げます。また、今回実験で使ったカイコガの幼虫は株式会社高原社様から、実験で使った細菌、菌類は独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター生物資源利用促進課様からいただきました。

8. 参考文献

[15196.full.pdf \(pnas.org\)](https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.15196.full.pdf)

Nichole A .Broderick ,Kenneth F. Raffa, and Jo Handelsman (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity(最終閲覧日 2021 年 1 月 16 日)