

環動昆

原 著

篠崎秀雄・油野崇志・佐野義孝・松本継男：斃死ヤマトシロアリ,
Reticulitermes speratus (Kolbe), から分離された
Serratia marcescens の性状 105

沢田裕一・堀 祐規・西田 哲・松本 崇・西田隆義：緑化害虫
ヒロヘリアオイラガの個体群動態：菌密度の季節的
年次的変動 (英文) 115

加藤敦史・大林延夫：西日本における外来雑草ブタクサ
Ambrosia artemisiifolia L. の昆虫群集 (英文) 125

木村悟朗・平林公男：諏訪湖沿岸部におけるコガタシマトビケラ
成虫の分布 (英文) 133

短 報

篠崎秀雄・油野崇志・佐野義孝・松本継男：ヤマトシロアリ,
Reticulitermes speratus, の簡易飼育法 141

資 料

中野敬一：東京都港区におけるアオドウガネ成虫の発生状況 145

書 評 154
 会 報 155
 会 則 168
 投稿規定 170

Vol. 19

3・4

日本環境動物昆虫学会

2008

斃死ヤマトシロアリ, *Reticulitermes speratus* (Kolbe), から分離された *Serratia marcescens* の性状

篠崎秀雄^{1)*}・油野崇志¹⁾・佐野義孝²⁾・松本継男¹⁾

1) 京都工芸繊維大学繊維学部応用生物学科 〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎

2) 新潟大学農学部農業生産学科 〒950-2181 新潟市西区五十嵐2の町

(受領 2008年6月12日; 受理 2008年10月21日)

Characteristics of *Serratia marcescens* isolated from dead workers of the termite, *Reticulitermes speratus* (Kolbe). Hideo Shinozaki^{1)*}, Takashi Aburano¹⁾, Yoshitaka Sano²⁾ and Tsuguo Matsumoto¹⁾

Abstract

Dead workers of the termite species, *Reticulitermes speratus*, were frequently found on agar plates, using a simplified termite rearing method. They appeared red in color, and were softened. As these symptoms could be due to bacterial infection, we examined the gut contents of the termites, using bacteriological methods. A high incidence of the bacterium, *Serratia marcescens*, was detected in the intestinal cultures. *S. marcescens* was characterized as serovar O6 and biovar A2/6. However, a high dose of *S. marcescens* was apparently necessary for experimental infection of termites, and this bacterium was the predominant species found in the intestines of healthy workers. We therefore inferred that opportunistic infection by *S. marcescens* resulted in compromise of its host on agar.

Key words : *Reticulitermes speratus*, Simplified rearing method, *Serratia marcescens*, Biovar, Serovar

寒天平板でシロア리를飼育すると、しばしば赤化して軟化する死亡個体が出現した。死亡個体の様相から細菌感染が窺えたので、起因菌を検索したところ、ほぼ純粋培養のレベルで *Serratia marcescens* が分離された。分離菌は血清型 O6, 生物型 A2/6 であった。実験感染には分離菌の高濃度接種が必要で致死までに長期間を要する一方、健全個体からも本菌が分離されたことから、死亡原因は宿主昆虫の生理的劣化に伴う日和見的な感染像が推察された。

はじめに

シロアリはミツバチやアリなどとともに、社会性生活を営む代表的な昆虫種である(松本, 1983)。熱帯や亜熱帯地域ではリター層の分解者として有用な昆虫であるが、木質建造物の多い我が国では、それらを食害する極めて難防除性の害虫である。シロアリ被害の防除には、忌避剤の塗布や殺虫剤の散布による化学的な防除法、さらには碎石やステンレススチール網を利用する物理的な防除法などで対応している(Su *et al.*, 1991; Su and Scheffrahn, 1992; 平尾, 1996; Murray *et al.*, 2001; Osbrink *et al.*, 2001a; Remmen and Su, 2005)が、化学的な防除法以外に確実な被害の防除効果は乏しいのが現状と思われる。しかしその化学的な防除法にも、薬剤抵抗性のシロアリの出現が認められる(Patel, 1995)一方、薬剤の人体や環境への影響などを考慮し、新しい

シロアリの防除法の開発が検討されている(梅田ら, 1997; Su *et al.*, 1998; 清水・山路, 2002; 築瀬ら, 2005)。そのなかで *Metarhizium* 属や *Beauveria* 属などの真菌類や, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus thuringiensis* などの細菌を利用した微生物的防除法(Smythe and Coppel, 1965; Kramm and Weat, 1982; Kramm *et al.*, 1982; Zoberi, 1995; Grace and Ewart, 1996; Milner *et al.*, 1997; Yoshimura *et al.*, 1998; Connick *et al.*, 2001; Osbrink *et al.*, 2001b; Shimizu and Yamaji, 2003; Yanagawa and Shimizu, 2005)は、環境に調和した方法としてまた抵抗性の獲得が少ないことなどから、その研究や開発が注目されている。シロアリは腸管内に多種多様な微生物を保有し、生理学的共生の場を提供している(山岡, 1982; Abe *et al.*, 2000)。われわれはこの共生微生物の挙動を制御することによって、シロア리를駆除する方法を検討しよう

1) Department of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology, Kyoto 606-8585, Japan.

2) Faculty of Agriculture, Niigata University, Nishi-ku, Niigata 950-2181, Japan.

*Corresponding author : h.shinozaki@festa.ocn.ne.jp

している。先に寒天平板法を利用してシロアリの飼育法を改良することにより、長期間にわたりシロアリの飼育が可能となった(篠崎ら, 2008)が、その飼育過程で体躯は原形をとどめながらも、赤く呈色しやがて軟化死亡する個体の出現にしばしば遭遇した。この病徴は感染症によるものと容易に想定されたが、この発症に関する経緯や病原微生物に関する詳細な知見は見あたらない。今回観察した斃死個体は急激に致死し、内部組織は可溶化して軟化・崩壊し、悪臭を伴うものであった。これらの所見から細菌感染症が窺えたため細菌学的な検討を行ったところ、ほぼ純粋培養の形で *Serratia marcescens* が分離されたので、その概要をここに報告する。

材料と方法

1. 供試個体

ヤマトシロアリ, *Reticulitermes speratus*, を、篠崎らが改良した寒天平板法(2008)で飼育中に、現出した赤色に呈色した斃死個体を用いた。

2. 細菌学的検討

死亡個体の腸管内容物を滅菌ピンセットで摘出し、液体培地(ハートインヒュージョン培地(ニッスイ)、以下 HIB と略す)で一夜増菌後、ハートインヒュージョン寒天培地(ニッスイ、以下 HIA と略す)および数種の選択培地(栄研)を併用して、細菌の分離を

行った。得られた分離株は、グラム染色による形態学的所見のほか、以下に示す方法により生化学的性状を調べ、これらの結果に基づき Bergey's manual (9th ed. 1994) に準拠して同定した。まず分離菌の科・属を推測するための第1次鑑別として① HIB による発育性状、② 3% H₂O₂ を用いたカタラーゼ産生試験、③ペーパー(ニッスイ)によるオキシダーゼ産生試験、④ HIA 半流動寒天培地による運動性試験、⑤ 1%ブドウ糖添加の OF 基礎培地(栄研)による酸化・発酵型発育試験を実施した。さらに種を推測するために、次の第2次鑑別試験を行った。⑥ Triple Sugar Iron 培地(以下 TSI と略す、ニッスイ)による発育性状、⑦ Sulfide Indole Motility 培地(以下 SIM と略す、ダイゴ)による発育性状、⑧ DNase 培地(栄研)による DNase 産生試験、⑨ブドウ糖リン酸ペプトン培地(栄研)による Voges-Proskauer 試験(以下 VP と略す)、⑩糖分解用半流動培地(栄研)による 1% 添加グルコースおよびラクトースによる糖分解試験、⑪クリステンセン法によるウレアーゼ試験(栄研)、⑫ゼラチン液化試験(Difco)、⑬胆汁エスクリン培地(Difco)を利用したエスクリン加水分解試験等を実施した。

3. 血清型及び生物型の決定

分離株による感染像を追跡するために、分離菌の血清型別および生物型別を行った。血清型別は市販の O 型別

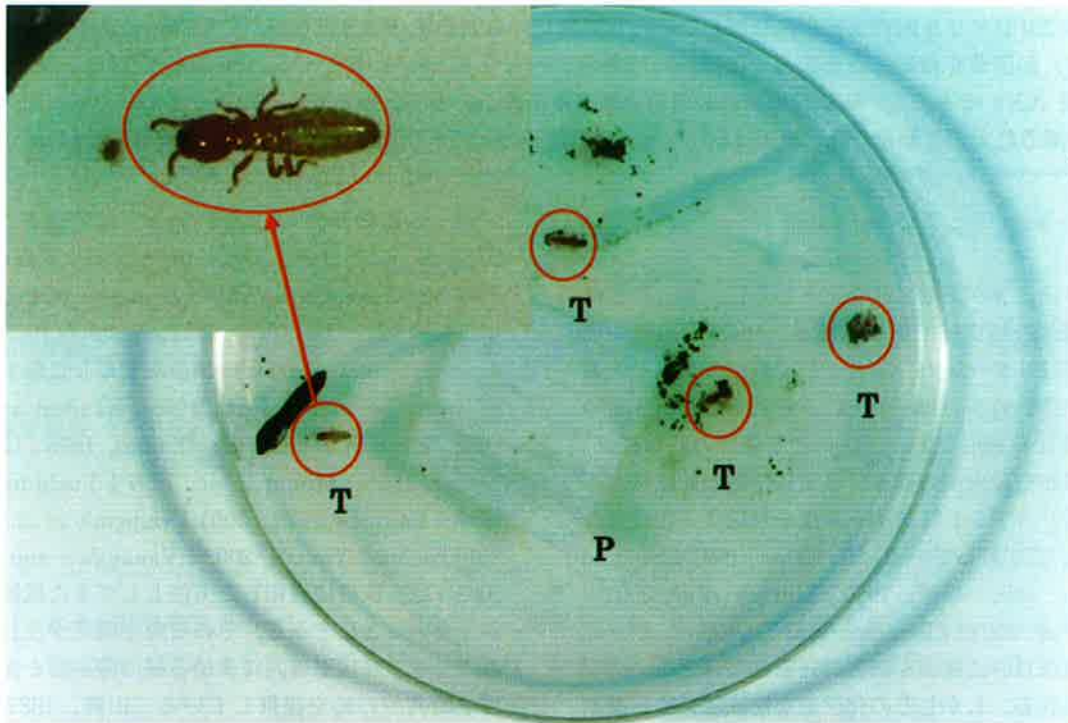


Fig. 1 Dead termite workers, which had been reared on 2% agar plates
T : dead termite workers P : paper

血清 (O1~O16, デンカ製) を用いて凝集反応試験を行い, また生物型別は馬尿酸利用試験を実施して, Bergey's manual (1984) に従って決定した。

4. 感染実験

分離菌株のなかから1株を選別し, それを用いて感染実験を行った。まず供試菌を HIB で 24 時間培養し, 3,000 rpm で 15 分の遠心洗浄を繰り返した後, 滅菌水にて細菌浮遊液を調製した。この菌液を波長 660 nm の吸光度にて菌量を調整し, 供試個体に噴霧する方法で感染させた。感染実験に供試した健全個体は, 学内キャンパス (京都市左京区松ヶ崎) より採取して研究室で松材にて約 2 ヶ月間馴化中のコロニーから選別後, 寒天平板法 (篠崎ら, 2008) で飼育中の 23 個体を用いた。感染は斃死個体の出現の可否で検討した。

5. 感染の拡大・伝播

分離菌の感染力を調べるために, 寒天平板法 (篠崎ら, 2008) で飼育中の 21 個体のなかに, 感染実験に用いた菌株で十分に感染したと想定される 1 個体を放飼し, 共存後の感染の拡大と伝播およびその行動などを検討した。本観察は 1 ヶ月間継続した。

6. 健全個体の細菌学的検討

寒天平板法 (篠崎ら, 2008) で飼育中の試験区から健全な 6 個体を, またロール状口紙で簡易的な飼育を継続中の試験区 (篠崎ら, 2008) から健全な 1 個体を選別し, 先の斃死個体にて用いた細菌の分離および同定法と同様の方法で細菌の検索を行った。

結 果

1. 斃死個体

2%寒天平板でシロアリを飼育中に現出した典型的な斃死個体を, Fig. 1 に示した。本図から明らかのように, 死亡個体はすべて赤色を呈し, 体軀は原形をとどめていたが, 内部の組織は軟化し, 腸管内容物の摘出時には溶解状態となり, もはやその原型はとどめていなかった。この病態の変化は時間の経過に伴い顕著に現れた。この斃死個体を顕微鏡下で剖検すると, 健全なヤマトシロアリの腸内で認められる特有の原生動物 *Trichonympha agilis*, *Teratonympha mirabilis* などはほとんど観察されなかった (篠崎ら, 未発表)。

2. 細菌の分離・同定

斃死個体より軟化した組織や腸管内容物を摘出し, ホモジネイト後 Fig. 2 に示した手順に従って細菌の分離を行った。HIB で一夜増菌培養後, 細菌の分離に用いたいずれの培地においても, ほぼ純粋培養に近い状態で

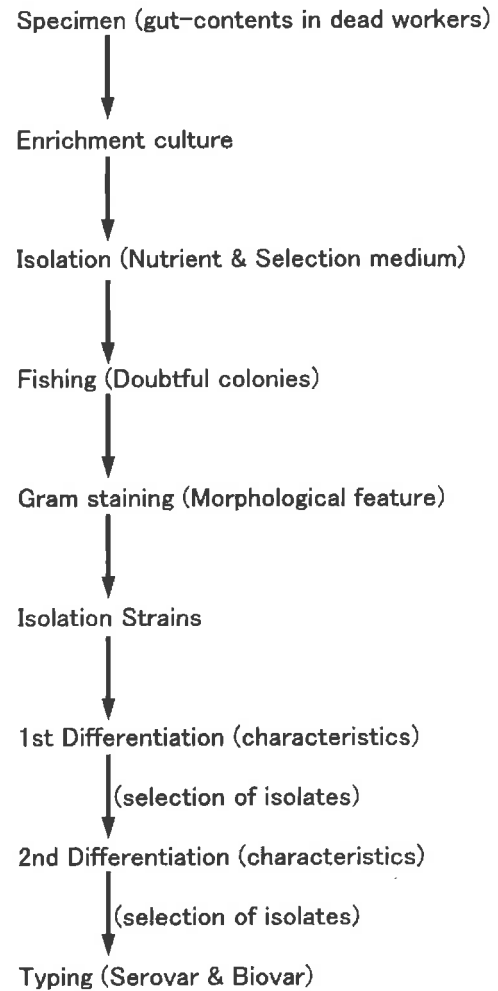


Fig. 2 Procedure for isolation of causative agents from dead termite workers

単一の細菌が分離された。コロニーより釣菌した多数の菌株から, 顕微鏡観察による形態的な所見とコロニーの性状から 6 株に整理し, さらにグラム染色による形態的な性状調査に基づき選択した 3 株を, 分離菌株 KIT-SH517, KIT-SH518, KIT-SH520 とした。

まず分離菌の科・属を推測する第 1 次鑑別の成績を, Table 1 にまとめた。本表の成績から分離株は全てグラム陰性桿菌, カタラーゼ産生, オキシダーゼ陰性, ブドウ糖発酵型発育, 運動性を有するなどの性状を示し, 腸内細菌科に属する細菌種であることが判明した。次に種を推測するために行った第 2 次鑑別試験の成績を, Table 1 に第 2 次鑑別性状として追加した。分離菌の第 1 次及び第 2 次鑑別試験の表現型性状を, Bergey's manual (9th ed. 1994) に準拠して同定したところ, 全て色素産生型の *Serratia marcescens* と判明した。

3. 血清型および生物型

斃死個体の感染経路を調べるために、血清型別および生物型別を行い、その結果を **Table 2** に示した。本表に示すように分離菌は全て O6 型抗体にのみ凝集し、また色素産生で馬尿酸非利用型であったことから、Bergey's manual (1984) に従って検討したところ、分離菌の生物型は A2/6 と判明した。

4. 感染実験

分離菌株の中から、継代培養時に赤色色素 (prodigiosin) の発現が極めて安定的な KIT-SH517 を選択し、感染実験用の供試菌とした。供試菌を OD₆₆₀ = 2.4 に調整し、2%寒天平板上に放飼している健全な 23 個体に噴霧して、感染の成り立ちを検討した。その結果を **Fig. 3** に示した。菌液散布の当日より供試個体の挙動が不活発となり、48 時間後には最初の斃死個体が出

現した。その後は、およそ 1 日毎に斃死個体が出現し、菌液噴霧後 27 日目にはその半数が斃死した。そして 41 日後には供試個体の全てが致死した。これら斃死した個体は、**Fig. 1** に示したものと同様に赤色に呈色した斃死個体で、解剖学的所見でも組織の軟化や腐敗臭を放つものであった。またこれらの死亡個体から **Fig. 2** に従って細菌の分離を行ったところ、得た分離株はすべて血清型 O6、生物型 A2/6 の *S. marcescens* であることが確認された。

5. 感染の拡大・伝播の検討

KIT-SH517 を OD₆₆₀ = 2.2 に調整した菌量で十分に感染したと考えられる 1 個体を、健全な 21 個体のなかに放飼して、罹病個体の出現とその感染の拡大の可否について検討した。その結果を **Table 3** にまとめた。本表から明らかのように、原液 (10⁰: OD₆₆₀=2.2) 感染を受け

Table 1 Biochemical reaction of isolates from dead termite workers

strain		KIT-SH517	KIT-SH518	KIT-SH520
tests of substrates				
1st differentiation				
Gram stain		-	-	-
Shape		r ¹⁾	r	r
Catalase		+	+	+
Oxidase		-	-	-
Oxidation-fermentation		F ²⁾	F	F
Indole		-	-	-
Motility		+	+	+
2nd differentiation				
	growth	R/Y ³⁾	R/Y	R/Y
TSI	H ₂ S	-	-	-
	gas	+	+	+
Voges-Proskauer		+	+	+
Acid production	Glucose	+	+	+
	Lactose	-	-	-
Esculin hydrolysis		+	+	+
Urea hydrolysis		-	-	-
Gelatin hydrolysis		NT ⁴⁾	NT	+
Deoxyribonuclease		+	+	+

- : negative + : positive

1) r : rod 2) F : Fermentation 3) R/Y (slant/butt) : Red/Yellow

4) NT : not tested

Table 2 Typing of Isolates from dead termite workers

strain	KIT-SH517	KIT-SH518	KIT-SH520
typing			
Serovar (O6)	+	+	+
Biovar	A2/6	A2/6	A2/6
hippurate hydrolysis	-	-	-
pigmentation	red	red	red

+ : agglutination to O6 antibody only

- : negative

た個体が放飼された試験区では、共存2週間を経ても61.9%の生存率が得られた。また各希釈菌液区でもそれぞれ61.9~90.5%の生存率を示し、急激な感染の拡大は認められなかった。しかし、共存3週間後には、いずれ

の試験区でも徐々に生存率の低下が認められ、感染の拡大する様子が窺えた。しかし、決して供試個体が全て感染死する完全致死には至らなかった。蒸留水を噴霧した個体を放飼された対照区では、斃死個体や赤化徴候のあ

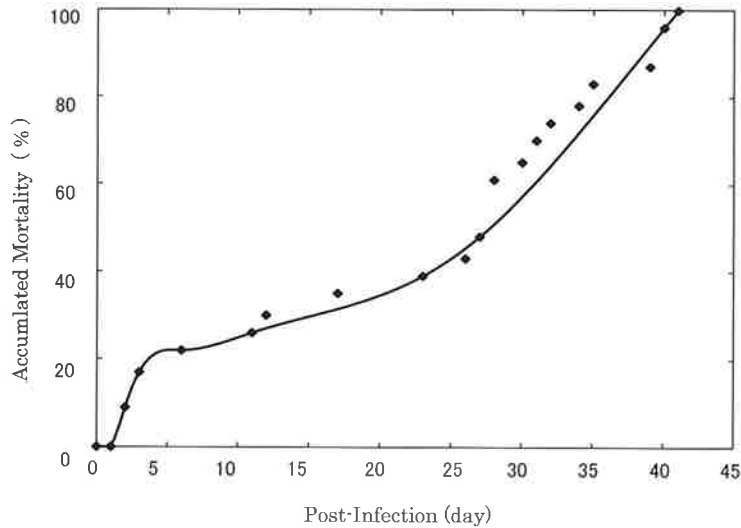


Fig. 3 Experimental infection with *S. marcescens* in termite workers

strain used : KIT-SH517
 No. tested termite workers : 23
 administered dose of bacteria : OD₆₆₀ = 2.4
 rearing temperature : 25°C (dark place)

Table 3 Spreading of *Serratia* infection in termite workers

post-infection (day)	No. of survival workers (%)					control
	Dose of <i>S. marcescens</i>					
	10 ⁰ *)	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	
0	21	21	21	21	21	21
1	21	21	21	21	21	21
2	17	21	19	21	21	21
3	16	20	19	21	20	21
5	16	20	19	21	20	21
7	14 (66.7)	18 (85.7)	18 (85.7)	21 (100)	20 (95.2)	21 (100)
8	13	17	18	19	19	20
13	13	17	13	19	19	20
15	13 (61.9)	17 (81.0)	13 (61.9)	19 (90.5)	18 (85.7)	19 (90.5)
16	13	16	13	18	18	19
20	13 (61.9)	16 (76.2)	12 (57.1)	17 (81.0)	17 (81.0)	18 (85.7)
21	13 (61.9)	14 (66.7)	12 (57.1)	13 (61.9)	16 (76.2)	18 (85.7)
23	13 (61.9)	14 (66.7)	12 (57.1)	13 (61.9)	16 (76.2)	18 (85.7)
27	9	5	8	6	7	10
29	9	5	7	4	5	8
30	6	5	7	4	5	7
31	5	5	5	3	5	6

strain used : KIT-SH517

*) 10⁰ : bacterial dose of OD₆₆₀=2.2

No. of workers used : 21 healthy termite workers in each experiment

る個体の出現は認められなかった。また Fig. 4 に示したように、健全な個体は罹病死した個体をそのまま放置することなく、それらを包埋する行動が見受けられた。この行動は感染5日目後から認められ、死亡個体を摂食することは決してなかった。

6. 健全個体からの分離菌の性状

赤色斃死個体から分離された *S. marcescens* の来歴を調べるために、寒天平板法で飼育中の健全6個体とロール状口紙で簡易飼育中の健全1個体から、*S. marcescens* の分離を Fig. 2 に準じて実施し、その分離菌株の性状を Table 4 にまとめた。寒天平板法で飼育している6個体からは29株を分離し、第1次・第2次鑑別培養所見や生化学的性状の差違から赤色色素の産生株10株 (KIT-SH501~KIT-SH504, KIT-SH509~KIT-SH511, KIT-SH513, KIT-SH514, KIT-SH516) および色素非産生株の1株 (KIT-SH521) の計11株を分離菌とした。またロール状口紙で簡易飼育中の1個体からは、色素非産生株1株 (KIT-SH707) が分離された。これら分離菌株は Table 4 に示した性状から、すべて *S. marcescens* と同定され、血清型別はすべてO6型、また生物型別は色素産生株のみA2/6と判明した。

考 察

グラム陰性桿菌で腸内細菌科に属する *Serratia* 属は、

塵芥や土中、汚水などあらゆる環境に広く分布する細菌種 (Grimont and Grimont, 1978b) で、Bergey's manual (9th ed. 1994) には、*S. marcescens* 以下10種の細菌種が記載されている。Steinhaus (1959) は、シロアリ、*Zootermopsis angusticollis*, をはじめ等翅目 (Isoptera), 鱗翅目 (Lepidoptera), 双翅目 (Diptera), 鞘翅目 (Coleoptera) など、約50種の昆虫に *S. marcescens* が関与することを指摘している。なかでもバツタの1種、*Melanoplus bilituratus* (Bucher, 1959) や、マイマイガ、*Lymantria dispar* (Podgwaite and Cosenza, 1976) など野外昆虫には起病性があるとされる一方、古くからカイコ、*Bombyx mori* にも起病性を有する細菌とされ、たびたび違作を誘起した事例がある (Steinhaus, 1959; 有賀, 1973)。これら昆虫に起病性を有する細菌を、Bucher (1963) は宿主昆虫への依存度と侵襲性の差違から、偏性病原細菌、通性病原細菌、潜勢病原細菌に三大別している。そのなかで *S. marcescens* は、人工培養が容易で、昆虫の体内での増殖も可能であり、組織崩壊や血体腔に侵入するための多種多様な毒素を産生することから、通性昆虫病原細菌と位置づけている。宿主昆虫が脱皮期など腸管防壁の弱まったときに血体腔に侵襲し、活発に増殖することにより敗血症を惹起し宿主昆虫を致死させる。その結果、本菌が産生する赤色色素により死亡個体が赤化すると感染機序がある (福原, 1991)。しかし本菌には chitinase や多様な ptotase など、多くのビルレンスの存在が考えられており (Lysenko,

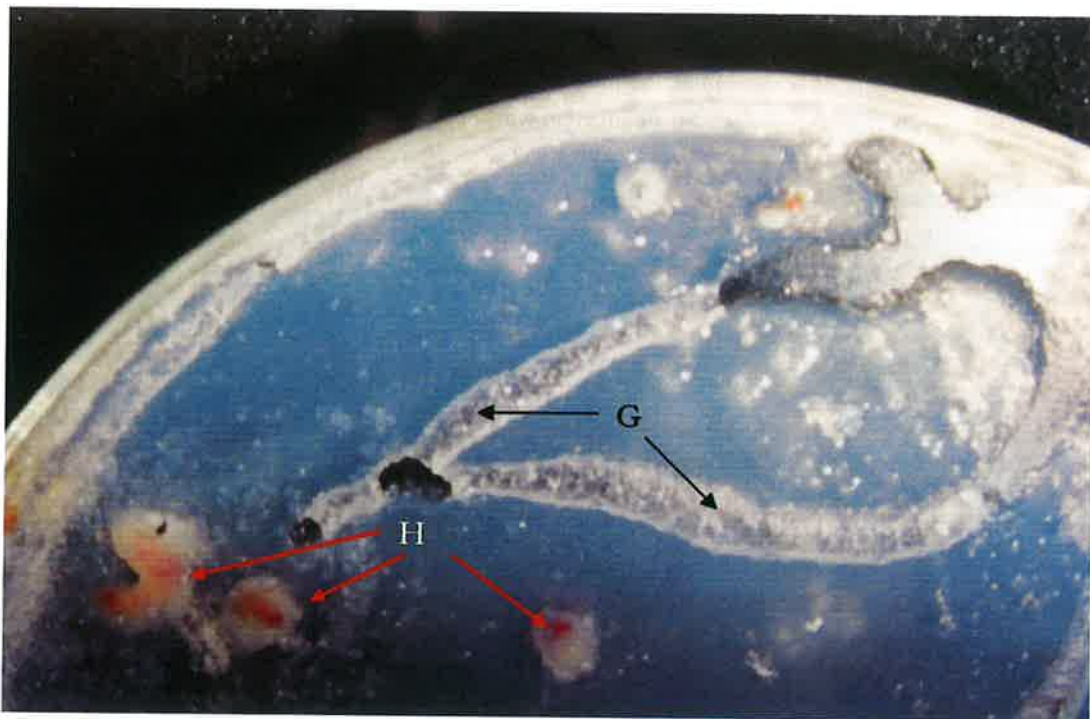


Fig. 4 Dead termite workers 10 days post-infection

G : termite tunnel

H : dead termite workers buried in agar sheet

Table 4 Biochemical reaction of isolates from healthy termite workers

tests or substrates	strain											
	KIT-SH501	KIT-SH502	KIT-SH503	KIT-SH504	KIT-SH509	KIT-SH510	KIT-SH511	KIT-SH513	KIT-SH514	KIT-SH516	KIT-SH521	KIT-SH707
1st differentiation												
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape	r ¹⁾	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r	r
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidation fermentation	F ²⁾	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Indole	±	-	-	-	±	-	±	-	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2nd differentiation												
growth	R/Y ³⁾	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y	R/Y
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gas	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urea hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	NT ⁴⁾	+	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Deoxyribonuclease	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Typing of isolates												
Serovar	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6	0-6
Biover	A2/6	A2/6	A2/6	A2/6	A2/6	A2/6	A2/6	A2/6	A2/6	A2/6	NT	NT
hippurate hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NT	NT
pigmentation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Simplified rearing method	agar	agar	agar	agar	agar	agar	agar	agar	agar	agar	agar	paper

- : negative, + : positive

1) r : rod 2) F : Fermentation

3) R/Y (slant/butt) : Red/Yellow

4) NT : not tested

1976), 発病機序に関する詳細な記載は今日まであまり十分とはいえない。また本菌は, イエシロアリ, *Coptotermes formosanus*, *Mastotermes darwiniensis*, *Reticulitermes hesperus* など多くのシロアリが保有していることが報告されており (Thayer, 1976; Kuhnigk *et al.*, 1994; Varma *et al.*, 1994), シロアリの腸内細菌叢の構成員として生理的意義を有していると推測される一方, De Bach and McOmie (1939) が, *S. marcescens* による *Zootermopsis augusticollis* の感染例を報告しているが, 詳細な感染像の言及には至っていない。

今回の実験で, 50%致死率を得るには 27 日程度を要し, 全個体が斃死する完全致死に達するには感染後 41 日以上必要であった。さらに感染の拡大は, 極めて緩慢な様相を呈することが判明した。高濃度の菌量接種で 100%の致死期間を得るのに, Khan *et al.* (1977) は, *Mastotermes championi* で 7 日, *Bifiditermes besoni* で 12 日, *Heterotermes indicola* で 13 日を要し, また Osbrink *et al.* (2001b) や Connick *et al.* (2001) はイエシロアリ, *Coptotermes formosanus* の感染実験で 19 日を要したことを報告しているが, 本実験で得た知見はこれらの結果と同様であった。一方健全な個体から *S. marcescens* が分離された。Thayer (1976) は, シロアリの腸管叢を構成する細菌の一つとして *S. marcescens* を報じている。これらの事実から本菌が血体腔へ侵襲し敗血症死に至らしめるには, 宿主の生理状態に依存することが極めて大きい要因と判断された。今回ヤマトシロアリの寒天平板法による簡易飼育中に現出した感染像は, 寒天平板のみによる栄養条件の劣化に伴った宿主側の日和見的な感染ではないかと推測される。ヒトの臨床的所見においても *S. marcescens* は, 宿主の免疫機能の劣化に伴って肺感染症, 尿路感染症, 敗血症などの菌交代現象による日和見感染や, 院内感染の拡大に関与する代表的な起因菌の一つとされている (林, 2001; 藪内, 2002)。

その臨床的立場から, *S. marcescens* 感染には疫学的調査 (Nasu *et al.*, 1982) や免疫学的調査が多用されており, とくに血清型別や bacteriocin 型別, 生物型別などは常用されている。それによると臨床由来の *S. marcescens* は O1, O3, O4, O8, O12, O13 などの多様な特異型をもつ (Gaston and Pitt, 1989; Yanagawa *et al.*, 2007) が, 昆虫の *S. marcescens* 感染では大流行病の発生が少ないことから, 生物型別や血清型別など疫学上重要な情報は乏しく, Grimont and Grimont (1978a) が昆虫由来の *S. marcescens* の生物型別を実施し, A 2 型を得ているにすぎない。Khan *et al.* (1977) や Osbrink *et al.* (2001b) も, *S. marcescens* を分離しているが, それらの型別までには至っていない。今回の実験で分離した色素産生株は, すべて血清型別 O6 型のみ凝集し, 生物型別は A 2/6 型であった。臨床系由来の *S. marcescens* が多様な血清型を示すのに対し, 昆虫由来株では単一の型

別しか示さない結果となったが, この結果は, 今後さまざまな昆虫から *S. marcescens* の分離を行い, 型別を実施することにより昆虫起病性の *S. marcescens* の分布とその病原性をもとに昆虫特異型とする生態型別 (ecovar) を提案したいと考えている。

今回の感染実験で, 健全な個体が斃死した個体を包埋する行動が認められた。人為的に斃死個体を覆った包埋物を取り除いても, 再度包埋を繰り返した。この行動はコロニー内での集団感染を抑止する効果があるものと思われるが, 本知見は, シロアリの微生物的防除を今後考究するための基礎的知見の一つと判断している。

引用文献

- Abe, T., D. E. Bignell and M. Higashi (eds.) (2000) *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 有賀久雄 (1973) 昆虫病理汎論. pp. 424-430, 養賢堂, 東京.
- Bergey, D. H., J. G. Holt, N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams (1984) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Bergey, D. H. and J. G. Holt (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 9th ed. Baltimore, Williams & Wilkins.
- Bucher, G. E. (1959) Bacteria of Grasshoppers of western Canada: III. Frequency of occurrence, pathogenicity. *J. Insect. Pathol.* 1 : 391-405.
- Bucher, G. E. (1963) Nonsporulating bacterial pathogens. In "Insect Pathology An Advanced Treatise" (Steinhaus, E.A., ed), 2 : pp.117-147, Academic Press, New York.
- Connick, W. J. Jr., W. L. A. Osbrink, M. S. Wright, K. S. Williams, D. J. Daigle, D. L. Boykin and A. R. Lax (2001) Increased mortality of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) exposed to eicosanoid biosynthesis inhibitors and *Serratia marcescens* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *Environ. Entomol.* 30 : 449-455.
- De Bach, P. H. and W.A. McOmie (1939) New Diseases of Termites Caused by Bacteria. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 32 : 137-146.
- 福原敏彦 (1991) 昆虫病理学. pp.53-69, 学会出版センター, 東京.
- Gaston, M. A. and T. L. Pitt (1989) O-Antigen specificities of the serotype strains of *Serratia marcescens*. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 2697-2701.
- Grace, J. K. and D. M. Ewart (1996) Recombinant cells

- of *Pseudomonas fluorescens* : a highly palatable encapsulation for delivery of genetically engineered toxins to subterranean termites (Isoptera:Rhinotermitidae). *Letters in Applied Microbiology*. 23 : 183-186.
- Grimont, P. A. D. and F. Grimont (1978a) Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. *J. Clin. Microbiol.* 8 : 73-83.
- Grimont, P. A. D. and F. Grimont (1978b) The genus *Serratia*. *Ann. Rev. Microbiol.* 32 : 221-248.
- 林 英生 (2001) グラム陰性桿菌. pp. 276-277, 「医科細菌学 (吉川昌之介・笹川千尋編)」, 南江堂, 東京.
- 平尾素一 (1996) 米国におけるシロアリ防除の現状. *しろあり* 105 : 24-32.
- Khan, K. I., F. Qaisra, R. H. Jafri and M. Ahmad (1977) Susceptibility of various species of termites to a pathogen, *Serratia marcescens*. *Pakistan. J. Scient. Res.* 29 : 46-47.
- Kramm, K. R. and D. F. Weat (1982) Effects of ingested *Metarhizium*, *Beauveria*, and *Gliocladium* conidia on worker termites (*Reticulitermes* sp.). *J. Invertebr. Pathol.* 40 : 7-11.
- Kramm, K. R., D. F. Weat and P. G. Rockenbach (1982) Transfer of the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* between *Reticulitermes* sp. termites. *J. Invertebr. Pathol.* 40 : 1-6.
- Kuhnigk, T., E. M. Borst, A. Ritter, P. Kämpfer, A. Graf, H. Hertel and H. König (1994) Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of xylophagous termites. *Sys. Appl. Microbiol.* 17 : 76-85.
- Lysenko, O. (1976) Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *J. Invertebr. Pathol.* 27 : 385-386.
- 松本忠夫 (1983) 社会性昆虫の生態. pp. 4-7, 培風館, 東京.
- Milner, R. J., J. A. Staples and G. G. Lutton (1997) The effect of humidity on germination and infection of termites by the hyphomycete, *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 69 : 64-69.
- 三澤成毅 (1996) 血清型別 *Serratia marcescens*. *臨床と微生物* 23 : 703-707.
- Murray, R. T., C. von Stein, I. R. Kennedy and F. Sanchez-Bayo (2001) Stability of chlorpyrifos for termiticidal control in six Australian soils. *J. Agric. Food. Chem.* 49 : 2844-2847.
- Nasu, M., J. Goto and I. Goto (1982) An epidemiological study of *Serratia marcescens* infections by bacteriocin typing. *Microbiol Immunol.* 26 : 795-801.
- Osbrink, W. L., A. R. Lax and R. J. Brenner (2001a) Insecticide susceptibility in *Coptotermes formosaus* and *Reticulitermes virginicus* (Isoptera : Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 94 : 1217-1228.
- Osbrink, W. L. A., K. S. Williams, W. J. Connick Jr, M. S. Wright and A. R. Lax (2001b) Virulence of bacteria associated with the Formosan subterranean termite (Isoptera : Rhinotermitidae) in New Orleans, LA. *Environ. Entomol.* 30 : 443-448.
- Patel, T (1995) *New Scientist*. 4 Feb : pp. 21. London : New Science Pub.
- Podgwaite, J. D. and B. J. Cosenza (1976) A strain of *Serratia marcescens* pathogenic for larvae of *Lymantria dispar* : characterization. *J. Invertebr. Pathol.* 27 : 185-190.
- Remmen, L. N. and N. -Y. Su (2005) Tunneling and mortality of eastern and Formosan subterranean termites (Isoptera : Rhinotermitidae) in sand treated with thiamethoxan or fipronil. *J. Econ. Entomol.* 98 : 906-910.
- 篠崎秀雄・油野崇志・佐野義孝・松本継男 (2008) ヤマトシロアリの簡易飼育法. 環動昆 (印刷中).
- 清水 進・山路素子 (2002) 数種昆虫病原性糸状菌のヤマトシロアリに対する病原性. 応動昆 46 : 89-91.
- Shimizu, S. and M. Yamaji (2003) Effect of density of the termite, *Reticulitermes speratus* Kolbe (Isoptera : Rhinotermitidae) , on the susceptibilities to *Metarhizium anisopliae*. *Appl. Entomol. Zool.* 38 : 125-130.
- Smythe, R. V. and H. C. Coppel (1965) The susceptibility of *Reticulitermes flavipes* (Kolbe) and other termite species to an experimental preparation of *Bacillus thuringiensis* Berliner. *J. Invertebr. Pathol.* 7 : 423-426.
- Steinhaus, E. A. (1959) *Serratia marcescens* Bizio as an insect pathogen. *Hilgardia*. 28 : 351-380.
- Su, N. -Y., J. D. Thomas and R. H. Scheffrahn (1998) Elimination of subterranean termite populations from the statue of liberty national monument using a bait matrix containing an insect growth regulator, hexaflumuron. *J. Am. Inst. Conserv.* 37 : 282-292.
- Su, N. -Y., R. H. Scheffrahn and P. M. Ban (1991) Uniform size particle barrier : A physical exclusion device against subterranean termites (Isoptera : Rhinotermitidae). *J. Econ. Entomol.* 84 : 912-916.
- Su, N. -Y and R. H. Scheffrahn (1992) Penetration of size-particle barriers by field populations of subterranean termites (Isoptera: Rhinotermitidae). *J.*

- Econ. Entomol.* 85 : 2275-2278.
- Thayer, D. W. (1976) Facultative wood-digesting bacteria from the hind-gut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *J. Gen. Microbiol.* 95 : 287-296.
- 梅田光夫・中山幸治・勝田純郎 (1997) モリブデンおよびタンゲステン化合物のシロアリ防除への応用 2. 準実地効力試験. 環動昆 8 : 99-104.
- Varma, A., B. K. Kolli, J. Paul, S. Saxena and H. König (1994) Lignocellulose Degradation by microorganisms from termite hills and termite guts: a survey on the present state of art. *FEMS. Microbiol. Rev.* 15 : 9-28.
- 藪内英子 (2002) セラチア属菌. pp. 384-387, 「細菌学 (竹田美文・林英生編)」, 朝倉書店, 東京.
- 山岡郁雄 (1982) シロアリと腸内共生原虫. 遺伝 36 : 52-57.
- Yanagawa, A. and S. Shimizu (2005) Defence strategy of the termite, *Coprototermes formosanus* Shiraki to entomopathogenic fungi. *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* 16 : 17-22.
- Yanagawa, Y., K. Marumo, Y. Nakamura and T. Shimaura (2007) Isolation rate of non-hemagglutinating strains of *Serratia marcescens* from clinical specimens in a general hospital : comparison of serotypes O2 and O14. *J. Infect. Chemother.* 13 : 151-156.
- 築瀬佳之・藤井義久・奥村正悟・吉村 剛・今村祐嗣・石田充克・川村浩寿・奥村敏信 (2005) 種々の粒子材料のシロアリ物理バリアへの適用—粒子径, 粒子形状および表面形状がシロアリの貫通行動に与える影響—. 材料 54 : 387-391.
- Yoshimura, T. and M. Takahashi (1998) Termiticidal performance of an entomogenous fungus, *Beauveria brongniartii* (Saccardo) petch in laboratory tests. *Jpn. J. Environ. Entomol. Zool.* 9 : 16-22.
- Zoberi, M. H. (1995) *Metarhizium anisopliae*, a fungal pathogen of *Reticulitermes flavipes* (Isoptera : Rhinotermitidae). *Mycologia.* 87 : 354-359.

Population dynamics of an invasive grub moth *Parasa lepida* (Cramer) that damages ornamental trees : the seasonal and annual fluctuations of the cocoon density

Hiroichi Sawada¹⁾, Yuuki Hori¹⁾, Satoshi Nisida¹⁾, Takashi Matsumoto²⁾ and Takayoshi Nishida³⁾

1) School of Environmental Science, The University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga 522-8533, Japan

2) Graduate School of Human and Environmental Studies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

3) Laboratory of Insect Ecology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

(Received August 28, 2008 ; Accepted October 21, 2008)

Abstract

We analyzed population dynamics of an invasive grub moth *Parasa lepida* (Cramer) (Lepidoptera : Limacodidae) in terms of the cocoon and adult density on various host plants consisting of 51 tree species of 404 individual trees at the campus of the University of Shiga Prefecture, Hikone, Shiga, western Japan during 5 years from 2003 to 2007. The cocoons occurred twice a year, the first generation in middle July -middle August and the second generation in middle September -late October. After hibernating as the pre-pupae within the cocoons, the adults of the second generation emerged during early June to early July in the following year. The mortality of cocoons was consistently higher in the second generation than in the first generation, resulting in the very low density of adults in the second generation. In the first generation, however, the survival rate of the cocoons decreased year by year from 91.0 % in 2003 to 45.1 % in 2007. The population growth rate from the second generation adults to the first generation cocoons (R_1) was higher when the adult density was higher, indicating the presence of the inversely density dependent processes in R_1 . As the consequence the cocoon density fluctuated violently year by year in the first generation. In contrast, the population growth rate between the first generation adults and the second generation cocoons (R_2) functioned both density dependently and complementary with the adult density, resulting in the exclusively stable cocoon density in the second generation. We discussed ecological mechanisms in particular agents of larval mortality that were assumed to be responsible to the inversely density dependent processes and the density dependent processes in R_1 and R_2 , respectively.

Key words : *Parasa lepida* (Cramer), Population dynamics, Annual population fluctuation, Density dependence, Inversely density dependence

Introduction

Parasa lepida (Cramer) (Lepidoptera : Limacodidae) is an invasive moth, widely distributed in tropical-subtropical regions such as southern China, south-east Asia, India, and sub-Saharan Africa (Hirashima, 1989 ; Zhang, 1994). In Japan *P. lepida* was first recorded in Kagoshima in 1921, thereafter expanding the distribution range north-eastward in Kyushu and Honshu, and in 1980s frequent outbreaks occurred by defoliating persimmons and cherry trees (Oda and Hattori, 1981). Recently, the range expansion reaches

up to Kanto district (Nakano, 2003). *P. lepida* is regarded as a serious pest of street trees and garden trees, and also as a noxious pest that gives pain in human skin.

To establish an effective management system of a given pest it is necessary to understand ecological mechanisms that cause the population changes through quantification of mortality factors such as natural enemies as well as knowledge of the life history (Price and Waldbauer, 1982 ; Levins, 1986 ; Nakasuji, 1997). Yamazaki *et al.* (1994b) examined the cocoon density of *P. lepida* at 65 sites within Osaka,

Kyoto and Shiga Prefectures, and speculated that the natural enemy was the major factor that determined the distribution and abundance, on the ground that *P. lepida* occurred exclusively in urban areas with few enemies, but it was absent in its surrounding areas with abundant enemies. On the basis of detailed analyses of the cocoon mortality at the campus of the University of Shiga Prefecture in the suburbs of Hikone, Nishida *et al.* (2006) documented a very high mortality due to bird predation on the cocoon during winter. At the same site Sawada *et al.* (2008a) conducted detailed population censuses that covered all the developmental stages and documented following results: (1) *Trichogramma dendrolimi* Matsumura, a parasitoid wasp was the major agent of the egg mortality, (2) the larval mortality in the first generation was caused by generalist predators such as paper wasps, spiders, ladybird beetles and mantis, but the mortality rate was fairly low, (3) the larval mortality in the second generation was very high primary due to a putative nuclear polyhedrosis virus (NPV) and a fungal disease, and (4) the occurrence of the putative NPV was strongly density dependent, with frequent occurrence in the year of the high larval density and in the hosts of the great larval density.

In the present article we analyzed the seasonal and annual fluctuations of *P. lepida* population based on the density of the cocoon and the adult, and the respective mortality factors and survival rate of each generation on 404 host trees of 51 species over 5 years during 2003 and 2007. And also we interpreted the observed seasonal and annual trends of *P. lepida* population in relation to the egg and larval mortality documented in our previous studies (Sawada *et al.* 2008a, b).

Materials and Methods

Parasa lepida (Cramer)

P. lepida is a notorious pest of street trees and ornament trees particularly in urban areas. The larvae, forming a compact aggregation in the early stage, feed on tree leaves. This species is also regarded as a noxious pest because contact with its larval spines can cause dermatitis in humans (Oda and Hattori, 1981; Miyata, 1981).

P. lepida occurs twice a year in western Japan with the first generation adults in early to late June and the second generation adults in early August to middle September, and hibernates as the cocoon stage (Oda

and Hattori, 1981). This species is a typical polyphagous herbivore feeding on a wide range of trees. For instance, Yamazaki *et al.* (1994a) found the cocoon on all the 62 tree species of 31 families examined except for conifers, the tulip tree *Liriodendron tulipifera*, the southern magnolia *Magnolia grandiflora*, and the oleander *Nerium indicum* in Osaka, Kyoto and Shiga Prefectures. In the original distribution range such as India and south-east Asia, the host range consisted of 78 host plant species of 35 families including legumes (Fabaceae), palms (Arecaceae), and Euphorbias (Euphorbiaceae) (Robinson *et al.*, 2001). Additionally, in India and south-east Asia *P. lepida* is known as a pest of mango, coconut, coffee, cacao and so on (Kalshoven, 1981; Kapoor *et al.*, 1985; Jeyabalan and Murugan, 1996).

Study site and census trees

The population censuses were conducted at the campus of the University of Shiga Prefecture (USP) (35° 17' N, 136° 15' E) locating in the suburbs of Hikone City, Shiga Prefecture. USP was founded in 1995 when approximately 70 species of trees were planted at 30 ha of the campus. The campus was similar to a large city garden, in which a large number of *P. lepida* cocoon were observed. We chose 282 individual trees of 36 deciduous species and 122 individual trees of 15 evergreen species as the census trees among a total of approximately 70 tree species. The majority of deciduous species were Chinese tallow tree *Triadica sebifera*, Yoshino cherry *Prunus X yedoensis* and Japanese zelkova *Zelkova serrata*, and that of evergreen species were oaks *Quercus myrsinaefolia* and *Q. glauca*, and camphor laurel *Cinnamomum camphora*. On each census tree we recorded the number of cocoon formed, the mortality factors of the cocoons, and the number of the cocoons from which the adults emerged. To standardize the number of tree species examined we chose 10 individual trees for each tree species unless the tree density was less than 10.

Census of the cocoon density

The cocoon density was examined every week during which the larvae formed the cocoon, middle July–late August for the first generation and middle September–early November for the second generation, over 10 generations of 5 years, from the first generation of 2003 to the second generation of 2007. To avoid double counting, the cocoons were